

第一章 前言

第一節 實驗源起

乳癌在女性的癌症中佔相當重的比例，乳癌主要是源自於乳腺管上皮細胞，研究顯示，脂質和其代謝產物在乳腺的發展上扮演相當重要的角色，脂肪細胞可以調節上皮細胞的生長和分化。流行病學的研究顯示，肥胖及高脂肪攝取可增加婦女乳癌的發生率。然而在探討與乳癌有關的基因上，很少涉及脂質代謝的基因，特別是 peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR a) 及 Apolipoprotein E(ApoE) 基因。PPAR a 是一種經由 ligand 誘導的轉錄因子(transcription factor)，可調節與脂肪酸氧化、細胞外脂質代謝、止血及發炎反應等有關蛋白質的基因表現。而 ApoE 參與脂質代謝，ApoE4 基因表現可提高血液總膽固醇、低密度脂蛋白膽固醇及三酸甘油酯濃度，且可增加罹患冠狀動脈心血管疾病及阿滋海默症的危險性。此外，ApoE 基因的多型性表現，也會影響大腸癌、前列腺癌及初級腦瘤的病理發展。因此，PPAR a 及 ApoE 基因多型性是否與乳癌的罹患率相關，乃是本實驗所要探討的主要課題。

第二節 實驗目的

主要探討台灣乳癌婦女 PPAR a 及 ApoE 的基因多型性與罹患

乳癌的危險性是否有關。本實驗有以下三項目的：(一) 利用變性梯度膠體電泳 (denaturing gradient gel electrophoresis) 及 DNA 直接定序以確定乳癌病患個體內 PPAR α 基因是否有變異。(二) 經由 PCR 反應及 RFLP (restriction fragment length polymorphism) 的方法分析乳癌病患的 ApoE 基因多型性。(三) 利用個案控制的方法，分析統計健康對照組之 PPAR α 及 ApoE 基因多型性，並與乳癌病患之結果作比較，探討 PPAR α 及 ApoE 基因多型性與乳癌的相關性，臨床結果也一併分析比較。

第二章 文獻探討

第一節 癌症

2-1-1 癌症的定義

癌症 (Cancer) 的發生是因為生物體內一些不正常的細胞生長不受控制而導致的。正常的體細胞其生長、分裂及死亡是受到有秩序的控制。在人的孩提及青春時期，正常細胞會快速的進行生長及分裂直至成人為止。而在成人之後的時期，細胞的分裂通常是為了替換掉老化或死亡的細胞及修補外傷。癌細胞 (Cancer cell) 與正常體細胞的不同之處是在於，癌細胞能夠逃避所該面臨的死亡而快速且持續的生長及分裂。

2-1-2 癌症的起因

癌細胞的形成主要是因為其內的去氧核糖核酸受到傷害 (DNA damage) 而發生突變 (Mutation)，之後造成基因 (Gene) 所轉譯 (Translation) 的蛋白質過度表現 (Overexpression) 或是不表現。在正常細胞，這些 DNA mutants 會經由細胞本身的修補機制而將之修正；但是在癌細胞內這些受到傷害的 DNA 並未修復，最後影響到細胞的生長發育，使細胞不正常的快速增殖而不受到任何一種細胞生長調節機制的控制。造成 DNA damage 的原因有很多，比如粒子輻射、自由基、化學藥劑或是抽煙等等均會造成 DNA damage。

2-1-3 癌症的特性

癌症一般來說會形成腫瘤 (Tumor), 但是並非所有的腫瘤都是致癌性的 (Cancerous), 良性腫瘤 (Benign tumor) 不會轉移至身體的其他部分且不會威脅生物體之生命 ; 惡性腫瘤 (Malignant tumor) 則是會侵入周邊組織或是轉移至生物體的其他區域。此外有一些癌症 , 如血癌 (Leukemia) 不會形成腫瘤 , 其癌細胞反而會藉由血液和血液生成器官及循環系統而轉移至可供其生長的組織中。

所謂的轉移 (Metastasis) 指的就是癌細胞藉由血液及淋巴系統而移動到生物體內的其他區域 , 並且在該區域生長及置換正常的組織。在命名方面舉例來說 , 當細胞形成乳癌 (Breast cancer) 且蔓延至其他器官如肝臟 , 那麼該癌症仍然被稱之為乳癌而非肝癌 (Liver cancer)。

不同類型的癌症其癌細胞的生理也非常不同 , 例如 , 肺癌 (Lung cancer) 及乳癌是兩種非常不同的疾病 , 在生長上他們有不同的生長速度 , 且對於治療方式也有不同的反應 , 這就是為什麼在癌症治療上需要針對各種不同的癌症以不同的方式進行治療。

第二節 乳癌

2-2-1 乳癌的盛行率

在美國，乳癌是一種女性常見的癌症，預估在 2004 年大約有 215,990 例新的女性病例(stage I ~ IV)被診斷出來，同時大約有 200 萬名被診斷出來且接受治療的乳癌女性患者存活。此外乳癌在美國女性癌症致死排行榜排名第二，僅次於肺癌。在 2004 年，大約會有 40,110 位女性及 470 位男性將死於乳癌 [1]。而在台灣，行政院衛生署於 2004 年 6 月 24 日公布民國 2003 年台灣地區十大死因及十大癌症排名，在十大死因排名中，惡性腫瘤連續 22 年蟬連第 1 名，在十大癌症排名中，女性乳癌排名第四，在 2003 年因乳癌而死亡之人數為 1,381 位，每十萬人死亡率為 10.41 [2]。

2-2-2 乳房的結構

女性乳房主要由小葉(Lobules) 乳管(Ducts)及基質(Stroma) 所構成。小葉是泌乳腺體，乳管則是連接小葉至乳頭之間的通道，至於基質則是由環繞乳管、小葉、血管及淋巴管的脂肪組織及結締組織所構成的 (圖一) [1]。

2-2-3 乳癌的起因

乳癌是一種由乳房細胞所形成的惡性腫瘤，這疾病常見於女性，但是男性亦有機會罹患此病。大部分的乳癌是起源於乳管 (Ductal)，部分則是起源於小葉 (Lobular) 和其他組織 [1]。

淋巴管 (Lymphatic vessels) 像血管一樣，但是負責輸送淋巴

(Lymph)。淋巴是一清澈的液體，其內包含了組織液、廢物及免疫細胞。淋巴結位於淋巴管上，具有小豆子般的外型，具有收集免疫細胞的功用，與生物體免疫系統有關。乳房內的大部分淋巴管會連接至腋窩的淋巴結 (Axillary lymph nodes) 部分淋巴結則是連結至乳房內的淋巴結 (Internal mammary nodes) 及鎖骨之上或之下的淋巴結 (Supra- or Infraclavicular nodes)。

癌細胞可藉由進入淋巴管而散佈至淋巴結。當乳癌細胞抵達 axillary lymph nodes，他們可以在此持續的生長，而且通常會造成淋巴結腫脹，此外亦易由此散佈至身體的其他器官。

2-2-4 良性乳房腫塊 (Benign Breast Lumps)

大部分的乳房腫塊都是良性而不是癌。大部分的腫塊是 fibrocystic changes 所造成的。Fibrocystic 意指纖維化 (Fibrosis) 和囊腫 (Cysts)。纖維化是形成纖維 (或像疤) 組織，而囊腫是填滿液體的囊泡。Fibrocystic changes 會造成乳房腫脹且疼痛。由開始發生至感覺到會有一段時間。乳房會感到有結且不平滑，此外在有時候乳頭會輕微的流出清澈或些微混濁的液體。纖維性瘤 (Fibroadenomas) 或乳頭淋瘤 (Papillomas) 等良性的乳房腫瘤，只會不正常的生長，但是他們並非是癌症且不會從乳房蔓延至其他器官進而威脅到生命 [1]。

2-2-5 乳癌的分類

幾乎所有的乳癌都是由乳房的小葉或乳管開始發展。因為乳房是一腺體組織，所以被稱之為乳腺癌。兩種主要的乳腺癌分別是管道癌（Ductal carcinoma）及小葉癌（Lobular carcinoma）。

（一）管道癌

常見的管道癌主要分成管道原位癌及浸潤性（侵入性）管道癌兩種。

1. 管道原位癌（Ductal carcinoma in situ, DCIS）：管道原位癌亦稱管道內癌（Intraductal carcinoma），是非侵入性乳癌中最為常見的類型。DCIS 意指癌細胞尚未穿透管道壁而擴散進入周邊乳房組織。乳房 X 光攝影是早期發現 DCIS 的最佳檢查方式。DCIS 在病理學區分上若發現到在某些區域有死亡的或退化的癌細胞（稱之為 Tumor necrosis）之現象出現，此腫瘤會被診斷為較具侵略性且被命名為面皰瘤（Comedocarcinoma）[\[1\]](#)。
2. 浸潤性（侵入性）管道癌（Infiltrating (or invasive) ductal carcinoma, IDC）：這是最常見的乳癌。他起源於乳房內之輸送乳汁的乳管，且能穿透管壁而侵入乳房之脂肪組織。而在這時期，他能夠藉由血流及淋巴系統而轉移至身體的其他部位。大約有 80% 的侵入性乳癌是 IDC [\[1\]](#)。

(二) 小葉癌

常見的小葉癌主要分成小葉原位癌及浸潤性（侵入性）小葉癌兩種。

1. 小葉原位癌 (Lobular carcinoma in situ, LCIS)：不算是一真正的癌症。LCIS 也被稱之為小葉瘤形成 (Lobular neoplasia)，有時候會被歸類於一種非侵入性乳癌 (Noninvasive breast cancer)。LCIS 起源於泌乳腺體但是不會穿透小葉壁。大部分乳癌專家認為 LCIS 通常是不會轉變成侵入性癌症，但是女性在其同側或另一側罹患侵入性乳癌的風險會較高。基於這理由，罹患 LCIS 之女性最好每年進行二或三次身體檢查，並進行乳房 X 光檢查 [1]。
2. 浸潤性（侵入性）小葉癌 (Infiltrating (or invasive) lobular carcinoma, ILC)：ILC 起源於泌乳腺體或小葉。相似於 IDC，ILC 可轉移至身體的其他部位。大約 10% 的侵入性乳癌是 ILC。在乳房 X 光檢查方面，ILC 較 IDC 難以檢查出來 [1]。

(三) 其他特殊的乳癌

乳癌除了常見的管道癌及小葉癌之外，尚有一些較為特殊的病變，但其出現頻率較低，這些特殊的病變分別有發炎性乳癌、髓質癌、黏液性腺癌、乳房 Paget 氏症、葉狀腫瘤及管性腺癌等。

1. 發炎性乳癌 (Inflammatory breast cancer) : 這是一種不常見的侵入性乳癌 , 佔所有乳癌約 1% 至 3% 左右。他會使得乳房皮膚看起來成紅色且會覺得發熱 , 並使得皮膚變厚及產生凹痕。目前已知皮膚上的改變並非由於發炎或是感染所造成 , 而是由於癌細胞堵住淋巴管或是皮膚上的通道所造成的 [1]。
2. 髓質癌 (Medullary carcinoma) : 這是一種較特別的浸潤性乳癌 , 在其腫瘤組織與正常組織之間有明顯的區隔。此外他亦有一些特別的特徵 , 如癌細胞體積較大且在其腫瘤邊緣有免疫細胞的出現 , 另外在預後 (Prognosis) 的情況亦較其他類型的侵入性乳癌來的好 [1]。髓質癌的出現大約是所有乳癌的 5% [1]。
3. 黏液性腺癌 (Mucinous carcinoma) : 又名膠質性腺癌 (Colloid carcinoma) , 是一種少見的侵入性乳癌 , 主要是由黏液產生癌細胞 (Mucus-producing cancer cells) 所形成。其預後較其他常見的侵入性乳癌來得好 [1]。
4. 乳房 Paget 氏症 (Paget's disease of the nipple) : 這類型的乳癌開始於乳管並蔓延至乳頭及乳房暈 (Areola) 之皮膚。為一罕見的癌症 , 出現機率佔所有乳癌的 1%。乳頭及乳暈的皮膚通常覆有硬皮且成紅色鱗片狀 , 此外還伴隨著滲血或一些分泌物 , 還會有發熱及發癢的症狀出現。乳房 Paget 氏症被認為可

能與原位癌或浸潤性乳腺癌有關 [1]。

5. 葉狀腫瘤 (Phyllodes tumor): 此為一種極為罕見的乳房腫瘤，起源於乳房基質，葉狀腫瘤通常為良性，但仍有少數為惡性的。在治療方面，良性葉狀腫瘤為切除癌化及周邊部分正常乳房組織；惡性葉狀腫瘤為切除癌化及周邊較廣大的正常乳房組織，或是進行乳房切除術 [1]。
6. 管性腺癌 (Tubular carcinoma): 為一種特殊的浸潤性乳腺癌，在所有乳癌中約佔 2% 左右，與其他浸潤性管道癌及小葉癌相較起來，具有較佳的預後 [1]。

2-2-6 罹患乳癌的危險因子

造成乳癌生成的危險因子 (Risk factors) 有許多種 (表一) [1, 3]，有些因子是無法去避免的，像是老化 (Aging)、性別 (Gender)、種族 (Race)、遺傳的危險因子 (Genetic risk factors)、家族遺傳 (Family history)、經期 (Menstrual periods) 及私人癌症病史及治療方式等等。與生活方式相關的危險因子是可以避免的，如生育的年紀、口服避孕藥 (Oral contraceptive) 的使用、賀爾蒙置換療法 (Hormone replacement therapy, HRT)、酒精 (Alcohol) 的飲用、肥胖 (Obesity) 及高脂食物 (High-fat diets) 的攝食、運動及環境污染 (Environmental pollution) 等等。

(一) 年齡與種族

在美國約 18% 的女性在其 40 多歲時被診斷出罹患乳癌，但約 77% 的女性則是在其年紀大於 50 歲之後才被診斷出來，在台灣被診斷出罹患乳癌的女性其平均年齡大約較西方女性提早約 10 歲左右，但是與西方國家相較起來年紀愈大愈容易得到乳癌的事實是一致的。

(二) 基因

目前在乳癌相關基因的研究上已經有些基因被確認出來當其發生變異(Mutations), 會容易造成乳癌的生成，這些基因如: *BRCA1*、*BRCA2*、*ATM*、*p53*、*PPAR* 等。

1. Breast cancer 1 (*BRCA1*): *BRCA1* 是一種腫瘤抑制基因 (Tumor suppressor gene), 位於人類第 17 對染色體 17q21 之上，共有 22 個 exons 可轉譯出 220 Kd 含 1863 個氨基酸之蛋白質，此蛋白質在其 N 端上具備與鋅結合的 RING 區域 (Zinc-binding RING domain), 且此蛋白質可與 BRAD1、*BRCA2*、Rad51 及 p53 等蛋白質相互作用，*BRCA1* 主要功能是活化同源染色體重組 (Homologous recombination) 和 DNA 雙股斷裂修補 (Double strand break repair) 之機制 [4]。
2. Breast cancer 2 (*BRCA2*): *BRCA2* 也是一種腫瘤抑制基因，位

於人類第 13 對染色體 13q12 之上，可轉譯出 384 Kd 含 3418 個氨基酸之蛋白質，主要功能是活化細胞在 DNA 合成時期的 DNA 修補機制 [4]與維持染色體 (Chromosome) 的完整 [5]。遺傳到突變的 *BRCA1* 或 *BRCA2* 之女性，在其一生中會有 35% 至 85% 的機率會有乳癌生成的現象 [1]。

3. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) gene : *ATM* , 是一種 checkpoint protein kinase , 主要功能是藉磷酸化 *BRCA1* 而修補受損的 DNA。研究發現在 *BRCA1*-deficient 細胞株中因 *ATM* 無法磷酸化突變的 *BRCA1* , 致使突變的 *BRCA1* 無法挽救對輻射過敏的 *BRCA1*-deficient 細胞株 , 而印證 checkpoint kinase *ATM* 磷酸化 *BRCA1* 而起動 DNA 修補的機制 [6]。
4. *p53:p53* 是一種腫瘤抑制基因 , 位於人類第 17 對染色體 17p13.1 上 , 可轉譯出 53Kd 的核磷酸蛋白質 (nuclear phosphoprotein) , *p53* 的主要功能是調節細胞週期 (Cell cycle) 的進行及參與細胞凋亡 (Apoptosis) 的途徑。當 DNA 受損時 , 正常的 *p53* 會大量產生 , 而使細胞週期停在 G0/G1 時期且參與 DNA 修補 , 若細胞無法進行 DNA 修補 , 則促使細胞走向細胞凋亡的路徑 [7]。在乳癌研究方面 , 之前許多的研究都在確認各種 *p53* 的 mutations , 但在使用 comprehensive meta-analysis 分析之後發現

到只有 20% 的乳癌患者會出現 p53 mutant [8]。而且罹患 Li-Fraumeni cancer susceptibility syndrome 的患者，其體內之 p53 基因會有較高的機率是 Germ-line mutations [9]。此外 p53 mutation 在不同類型乳癌中會有不同的出現機率，如果患者本身之 BRCA1 及 BRCA2 基因有突變或者是其乳癌類型是 high grade DCIS 則其 p53 mutation 會較為常見 [10-12]，如果是典型的髓質癌 (Medullary carcinoma) 患者其 p53 突變的機率是百分之百 [13]。

5. Peroxisome proliferator-activated receptor ? (PPAR ?) : PPAR ? 隸屬於 nuclear receptor superfamily，主要存在脂肪組織、肝臟 [14]、骨骼肌 [15]、乳房 [16] 等處。目前研究發現活化 PPAR ? 與許多癌症有關，例如 Colon cancer、Lung cancer、Bladder cancer、Gastric cancer、Breast cancer 等。就乳癌與 PPAR ? 之間的相關性而言，不論是 in vitro 或 in vivo 的實驗均證實 PPAR ? 在經過 ligand 如 thiazolidinediones (TZDs) 的活化後會抑制乳癌細胞的增殖 (Proliferation) 及促進乳癌細胞分化 (Differentiation) 的現象出現 [17, 18]。若將維生素 A (Retinoic acid) 與 PPAR ? ligand 一起給予，則會抑制乳癌細胞生長及促進細胞凋亡 (Apoptosis) [17]。另一方面卻在高度表現 PPAR ? 的基因轉殖

鼠與mouse mammary tumor virus polyoma middle Texpressing transgenic mice交配所繁殖的mice中發現到完全相反的結果，被ligand所活化的PPAR γ 會促進乳癌的發育 [18]。

(三) 家族遺傳

家族遺傳在增加罹患乳癌風險方面有分六項 [1, 3]：(1) 二位以上的親屬有罹患乳癌或卵巢癌(Ovarian cancer) (2) 母親，姊妹，祖母、姨母或姑母在 50 歲以前罹患過乳癌。(3) 有親屬罹患乳癌及卵巢癌。(4) 一位以上的親屬罹患兩種癌症 (乳癌及卵巢癌或兩種不同的乳癌) (5) 男性親屬罹患乳癌。(6) 家族中有罹患與遺傳乳癌相關的疾病，如 Li-Fraumeni 或 Cowdens Syndromes。

(四) 月經

月經方面，初經在 12 歲以前或 55 歲以後停經，發展乳癌的風險會大大提高。此外在 35 歲以前切除兩側卵巢，其罹患乳癌之風險會是正常停經婦女罹患乳癌風險的 40% 左右 [3]。

(五) 癌症病史及治療方式

在私人癌症病史及治療方式方面，曾經罹患乳癌之婦女其再度罹患乳癌的風險會增為 3 至 4 倍左右。使用乳房切片檢查法(Breast biopsies) 偵測到乳房增生疾病 (Proliferative breast disease) 且發現到有不規則的增生現象 (Atypical hyperplasia)，則其罹患乳癌的風

險將增為 4 至 5 倍。女性在孩提或少女時期因罹患一些癌症，如何杰金氏疾病(Hodgkin's disease)或非何杰金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma) 而對胸腔進行放射線治療，其罹患乳癌的風險最高將提升至正常人的 12 倍 [1, 3]。

(六) 生育

在生育方面，從未生育與較晚生育的婦女罹患乳癌的風險均較高，30 歲以後生育第一胎與 20 歲以前生育第一胎的婦女相較起來，其罹患乳癌的風險是其二倍，而超過 35 歲以後生育第一胎其罹癌風險較從未生育之婦女來得高。最後，第二胎生育時間較早的婦女會減低其罹患乳癌之風險 [3]。

(七) 口服避孕藥

口服避孕藥是一種乳癌的危險因子這點仍有待更進一步的確認，但在 2003 年 Deligeoroglou [19] 及 Kumle [20] 等學者在其研究中指出，至今仍持續服用口服避孕藥達十年以上者，其未來年罹患乳癌的風險會較高些。

(八) 賀爾蒙置換療法

停經的婦女其體內的賀爾蒙量會有很明顯的變動，而致使在生理上產生一些病變如骨質酥鬆 (Osteoporosis) 等等，為了預防病變的產生通常醫師會指示患者服用一些雌激素(Estrogen)或黃體激素

(Progesterone) , 這種療法稱之為HRT , 但HRT會使得罹患乳癌的風險提高 [21, 22]。而且Estrogen和Progesterone會促進乳癌細胞生長 [23]。

(九) 酒精

有報告指出酒精的飲用會增加罹患乳癌的風險 [24] , 特別是酒精會增加雌三醇 (Oestradiols) 生成而增加罹患乳癌的風險 [25]。

(十) 肥胖

現代快步調的生活節奏 , 而使得愈來愈多人增加碳水化合物 (Carbohydrate) 及高脂食物的攝取加上愈來愈少運動 , 造成愈來愈多人產生發育上的問題 (Growing problem) -肥胖 [26] , 肥胖的停經後婦女 , 大約有 30%左右的機率會使得其血漿中 bioavailable oestradiol 濃度上升而提升其罹患乳癌的風險 [23, 27, 28]。

(十一) 環境污染

在環境與乳癌的相關性方面 , 目前已知會影響乳癌發生的因子有粒子輻射 (Ionizing radiation) 抽煙。但化學藥品 (Chemicals) 僅在啮齒類動物上發現到對乳癌發生有影響 , 在人身上未有直接影響的報告發表。此外 , 重金屬如鎘 (Cadmium) 的污染及二手煙較易罹患乳癌 [29]。

(十二) 飲食

在飲食種類與乳癌的研究方面，目前大多著重於脂肪類、維生素、纖維素與罹患乳癌的風險分析，其在研究對象選擇上，除了依照分佈區域的不同之外，尚有依照年齡進行飲食與罹患乳癌的評估。在青少年飲食方面，報告指出脂肪及纖維素與乳癌的罹患是沒有關連，但是提高蔬菜油及維生素 E 的攝取則能降低罹患乳癌的風險 [30]。此外，若是綜合總脂肪、飽和脂肪及肉類的攝取進行罹患乳癌風險評估，發現這些物質攝取的愈多罹患乳癌的風險就愈高 [31]。

2-2-7 臨床上乳癌的階段分類

階段系統 (Stage system) 是一對癌症擴散蔓延標準化的分類方式，在癌症的治療上這種分類方式提供了一個重要的指標，不同階段的癌症有其不同的治療方式。在判定癌症階段前必須進行一連串的检查，舉凡乳房 X 光攝影、骨頭掃描、電腦斷層掃描、核磁共振及血液檢查。目前最常使用的 stage system 是 American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM system。此系統對癌症進行分類主要是依據 T、N、M 三個 stages。

T stage 主要是判定腫瘤的大小，N stage 主要是判定癌細胞蔓延至淋巴結的情形，M stage 則是判定癌細胞有無轉移的現象出現 (表二)。

第三節 Peroxisome proliferator activated receptor α 與乳癌的相關性

在上述導致乳癌的危險因子中，基因及肥胖還有油脂的攝取對於乳癌的罹患有著重要的影響。在基因方面除了一些腫瘤抑制基因的缺失，如 BRCA1、BRCA2、p53 等會使罹患乳癌的風險提高之外，另外如 PPAR α 此調控脂質代謝基因對於乳癌也有一定影響力。因此，人體內調控脂質代謝恆定的基因，除了前述如 PPAR α 外，其他如調控脂肪酸 β -oxidation 的 Peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR α) 基因 [32] 及參與血脂質代謝如 Apolipoprotein E (ApoE) 基因 [33]，皆是具有高選擇性的候選基因。

2-3-1 Peroxisome proliferator activated receptors (PPARs)

過氧化體增生活化受體 (Peroxisome proliferator activated receptors) 隸屬於核受體群 (Nuclear receptor superfamily)，是一種受配體 (ligand) 活化的轉錄因子 (Transcription factor) [34, 35]。

2-3-2 PPARs 的分類

PPARs 基因有三種亞型 (α , β/δ , γ)，在不同的組織中有不同的分佈情形。PPAR α 基因位於染色體於 22q12-q13.1 [36]，共計有 8 個 exons 且其中 exon 3 至 exon 8 可轉錄出含 468 個氨基酸的 PPAR α 蛋白質；PPAR β 基因位於染色體於 6p21.2-p21.1，共計 13 個 exons 且 exon 4 至 exon 9 可轉錄出含 441 個氨基酸的 PPAR β 蛋白質；最

後 PPAR ？基因位於染色體於 3p25，有 8 個 exons。

2-3-3 PPARs 的結構

PPARs 跟其他核受體 (Nuclear receptor) 一樣，具備一些功能區域 (Function domain) (圖二)。A/B domain 上具備 ligand-independent activation function domain (AF-1)，可藉由被磷酸化 (Phosphorylation) 的方式活化 PPARs；C domain 為受體與 DNA 結合的區域 (DNA binding domain, DBD)，該區域具有兩個 Zn-fingers 結構，使得 PPARs 可以專一的與 PPRE 結合；D domain 允許受體在結構上可以進行彎曲 (Bend)，而可與 co-activators 及 repressors 產生互動 (Interaction)；E domain 為配體與受體結合的區域 (Ligand binding domain, LBD)，其上具備 ligand-dependent activation function domain (AF-2)，可藉由與配體結合的方式而活化 PPARs；最後，F domain 位於核受體蛋白質之 C 端 (C-terminal)，目前功能未明 [37]。

2-3-4 PPARs 的活化機制

PPAR 的活化機制有兩條路徑，分別是 ligand-dependent pathway 及 ligand-independent pathway。在 ligand-independent pathway 方面，有研究指出在 PPAR a 的 A/B domain 上發現找出數個 serine 磷酸化位置 [14, 38, 39]，在該處可藉由被磷酸化而活化 PPAR a 的活性；

另外在 ligand-dependent pathway 方面，乃是藉由配體 (ligand) 結合 PPARs 之 LBD 而使得 PPARs 被活化。

活化的 PPARs 需與受 ligand 活化的視黃醇類 X 受體(retinoic X receptors, RXR) 形成 heterodimer 結構，才能結合上位於目的基因 (Target gene) 的啟動者(Promoter) 區域上的 peroxisome proliferator response element(PPRE) 序列，來調控基因的轉錄(圖三) [35, 40]。

(一) Retinoic X receptors

RXR 在結構上具備兩個 subunits 功能各不同，ligand binding domain 及 DNA binding domain。ligand binding domain 除了可與 ligand 結合之外，本身尚具 Dimerization 及 Transactivation 功能，DNA binding domain 本身具辨識 DNA 序列並結合至其上的功能。RXR 二聚體形成依序列辨識的方向不同而可分成三種，Palindrome、Direct Repeat、Inverted Palindrome，其中 RXR 與 PPARs 所形成的 Heterodimer 是屬於 Direct Repeat [41]。

(二) Peroxisome proliferator response element (PPRE)

PPRE 是屬於 direct repeat-1 (DR-1) 的 element，其特點是在兩個 hexanucleotides 序列中間夾雜一個鹼基。Hexanucleotides 序列為保守性序列為 AGGTCA (圖三)。

(三) 配體

配體分兩大類型，一是自然的配體 (Natural ligand) ，如一些脂質代謝後的產物，另一是合成的配體 (Synthetic ligand) 。不同的 PPARs ，有不同的配體，概述如下：

1. Peroxisome proliferator activated receptors α : 在 PPARs 的三種亞型中以 PPAR α 研究較少，目前已知能使 PPAR α 活化的自然的配體有廣泛而多樣的飽和 (saturated) 及不飽和脂肪酸 (unsaturated fatty acid) , 如 palmitic acid、oleic acid、linoleic acid 及 arachidonic acid [42-44] ，此外 lipoxygenase 代謝物 8(S)-hydroxyeicosatetraenoic acids(8(S)-HETE) 亦具活化 PPAR α 的能力 [45]。合成的配體則有 Wy14643 [43]。
2. Peroxisome proliferator activated receptors β : 飽和及不飽和脂肪酸皆可以活化 PPAR β ，如多元不飽和脂肪酸的 dihomio- γ -linolenic acid、eicosapentaenoic acid 及 arachidonic acid ，而屬於飽和脂肪酸的 palmitic acid 及其代謝產物亦可活化 PPAR β 。
3. Peroxisome proliferator activated receptors γ : 在 PPAR γ 方面，自然的配體包含 linoleic acid、linolenic acid、arachidonic acid 及 eicosapentaenoic acid [46] 等等，而藉 15-lipoxygenase 可將 linolenic acid 轉換成可活化 PPAR γ 的 9-HODE 及 13-HODE

[47] , 也有研究指出 PGD2 的衍生物 15-deoxy-^{12,14}-prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂)可活化 PPAR ? [48, 49]。

2-3-5 PPAR a 功能與癌症相關之研究

(一) PPAR a 功能

在人及成鼠中 PPAR a 主要表現於肝、腎、心、肌肉、等在高度進行脂肪酸氧化的組織中 [42, 50-52]。活化的 PPAR a 可促使脂肪酸結合蛋白 (Fatty acid binding protein, FABP) 及脂肪酸輸送蛋白 (Fatty acid transport protein, FATP) 的產生 , 來輔助脂肪酸穿過細胞膜且運送至目的胞器以進行利用 , 另外亦可活化促使 acetyl CoA oxidase (ACO)、 enoyl-CoA hydratase/dehydrogenase multifunctional enzyme 及 keto-acyl-CoA thiolase enzymes 等在過氧化? 體進行 β -oxidation 所需要的酵素 [34, 37, 53, 54]。因此 PPAR a 在維持脂質及葡萄糖體內平衡 (Homeostasis) 扮演相當重要的角色 [55, 56] ; 若給予糖尿病患 fibrate 類降血脂的藥物可以活化 PPAR a 基因的表現進而在肝臟內增加脂肪酸的 β -oxidation 而加強 fatty acid flux 及 degradation , 進一步改善葡萄糖體內平衡、體重、及能量體內平衡 [57]。

(二) PPAR a 與癌症相關之研究

在動物實驗方面，有許多都是針對啮齒類動物之肝臟進行研究 [58, 59]，進而以此模式去推敲 PPAR α 在人體上可能造成的影響。但是人與啮齒類動物之 PPAR α 分佈情形並不一樣，PPAR α 在啮齒類動物的肝臟中分佈極多，但是在人較少，所以就有學者轉而針對 PPAR α 在啮齒類動物肝癌所扮演的角色，來探討人與啮齒類動物之間種族的差異性 (species differences) [60, 61]。為什麼 PPAR α 會與肝癌的發生有關係？有學者從脂質的 beta 及 omega 氧化 (β -, ω -oxidation) 觀點進一步說明，PPAR α 促使進行脂質氧化的酵素轉譯且進行脂質氧化，但是脂質氧化的同時會產生過氧化氫 (H_2O_2)，過量的 H_2O_2 存在時就易造成 DNA 的受損，進而容易造成肝癌的發生 [62]。此外在 mouse skin tumor 方面，PPAR α 蛋白質會出現在表皮 (epidermis) 及刺瘤 (papillomas)，且 PPAR α 在刺瘤的表現量比在表皮來得多，而且添加 PPAR α 的配體 linoleic acid 及 Wy-14643 會使 skin tumor 發生機率下降 30%，所以學者認為一些 PPAR α 的 ligand 可能具有預防 skin tumor promotion 的功效 [63]。另外有學者則是針對 PPAR α 與乳癌進行研究。使用 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4, 5-b]pyridine 誘發老鼠產生乳癌，並且偵測 PPAR α 的表現量，發現癌化組織內的 PPAR α 表現量高出正常組織的 12 倍 [64]。

在 In vitro 研究方面，針對人類 colon carcinoma Caco-2 cells differentiation 的 time-course study 發現，PPAR α ，PPAR γ 1 及 PPAR γ 2 的蛋白質表現量逐步上升，但是分析其 mRNA 則未發現到有顯著的升高情形，因此推測 Caco-2 cell 的 PPAR α 表現量之所以上升可能是跟 translational rate 有關 [65]。另一方面，雖然 PPAR α mRNA 在 benign prostatic tissue 的表現極微量，但是在人類前列腺上皮細胞株 LNCaP 內卻是過度表現，若是加入 10 nM 的 androgen-mibolerone，誘導 96 小時，發現 PPAR α mRNA 與控制組相較卻是降了 40%左右 [66]。此外，在人類乳癌細胞株 MDA-MB-231 及 MCF-7 中發現活化的 PPAR α 會促進癌細胞增生且 PPAR α mRNA 表現量上升 [67]。但是，PPAR α 基因多型性是否與罹患乳癌有關連，仍未被探討。

第四節 Apolipoprotein E 與乳癌的相關性

2-4-1 ApoE 在 lipoprotein 代謝所扮演的角色

Apolipoprotein E (ApoE) 在血脂質的代謝上扮演著重要的角色，同時 ApoE 也是數種 lipoprotein 的構成物質之一。ApoE 蛋白質分子量為 34 Kd，在人類其基因位於第 19 對染色體上。ApoE 有三種 protein isoforms E2、E3 及 E4，分別對應三種基因型 e2、e3、e4，

可形成六種對偶基因表現型(分別是 2/2、2/3、2/4、3/3、3/4 及 4/4)。E3 為最常見的基因型。E2 及 E4 為點突變 (Point mutation) 所造成的，E2 是第 158 codon 由 CGC 突變成 TGC，而使得氨基酸由 Arg 改變成 Cys；E4 則則是第 112 codon 由 TGC 突變成 CGC，而使得氨基酸由 Cys 改變成 Arg。這些突變對於 ApoE 蛋白質功能會造成影響。ApoE2 與 LDL receptor 結合的能力會降低，而使得清除 chylomicron 及 VLDL remnants 的能力降低，造成肝臟內膽固醇濃度下降，因此使得肝臟會大量表現 LDL receptor 來因應，最後會導致降低血液總膽固醇、低密度脂蛋白膽固醇及三酸甘油酯濃度；相反的，ApoE4 與 LDL receptor 結合的能力會升高，而使得清除 chylomicron 及 VLDL remnants 的能力大幅提昇，使得肝臟膽固醇含量增加，所以肝臟會降低表現 LDL receptor 來因應，最後會致使升高血液總膽固醇、低密度脂蛋白膽固醇及三酸甘油酯濃度，而增加罹患冠狀動脈心血管疾病的危險性 [68]。

2-4-3 apoE 與癌症相關之研究

ApoE 除了與阿滋海默症及心血管疾病有關之外，也有不少在癌症方面的相關報告。依癌症類別來區分，在前列腺癌 (Prostate cancer) 方面，有學者指出 ApoE 之 e4 allele 可能與前列腺癌的發生有關係 [69]，但有趣的是在以挪威人為主所進行的研究中則是

指出 ApoE 之 e4 allele 並非是前列腺癌發生的危險因子 [70]，最近，則是有學者使用 differential display cloning 方法分析 ApoE mRNA 在各種前列腺癌細胞中的表現情形，而發現到 ApoE mRNA 僅在 PC-3 這株細胞有高度表現，此外使用免疫組織化學法則是發現到在前列腺內皮瘤（Prostatic intraepithelial neoplasias, PINs）周邊組織可發現到 ApoE 的表現，但是若非在周邊組織則無 ApoE 表現 [71]。在 colorectal cancer 方面，有學者以日本男性為研究對象，探討血脂值與 ApoE 基因型和 colorectal cancer 之間的相關性，而發現到血液總膽固醇、低密度脂蛋白膽固醇濃度均與 proximal 和 distal adenomas 發生無關，僅三酸甘油酯濃度與 distal adenomas 發生有正相關 [72]，此外有學者則是研究東英格蘭人之 ApoE 基因型與 colorectal cancer 罹患率的相關性，研究中指出基因型與 colorectal cancer 之間的相關性跟性別是有密切的關係，攜帶 2/3 基因型的男性會增加其罹患 colorectal cancer 的機率，但女性則不會有此現象，而攜帶 3/3 基因型的人（不分男女）其罹患 colorectal cancer 都是較低的 [73]。最後在 brain tumor 方面，起自 1992 年時即發現到 ApoE 在許多種腦瘤上均有表現而非只在 astrocytomas 上表現 [74]，另外有學者則是使用雜交技術證實 ApoE 在腫瘤上有表現量增加之情況 [75]。

至於 ApoE 基因多型性對於乳癌的影響，近期某些研究指出美國婦女 ApoE4 基因表現與乳癌有關，ApoE4 會對三酸甘油酯與乳癌危險性之間的關連性造成影響 [76]。然而，另一些學者卻發現若只比較高加索婦女 ApoE2 與 ApoE3 或 ApoE4 與 ApoE3 基因多型性表現，其 ApoE 基因多型性與罹患乳癌的危險性無關 [77]。另一方面，英國婦女 ApoE2 或 ApoE4 基因多型性表現也發現與乳癌生長速率及臨床結果無關 [78]。然而經由不同族群的研究分析顯示，依族群不同 ApoE 基因多型性有不同的表現頻率 [79]。因此，ApoE 的基因多型性表現與罹患乳癌危險性相關與否，仍受爭議，推究其原因可能與不同族群的基因表現有關。

第三章 研究架構與研究設計

第一節 研究架構

本實驗分為三階段，第一階段為乳癌病患 Genomic DNA bank 及臨床診斷資料庫的建構，第二階段為基因多型性分析，第三階段為使用統計方式將資料庫與基因多型性進行鏈結，以分析基因多型性與哪些臨床診斷之間有相關性。

第二節 研究設計

在第一階段方面，臨床診斷資料庫是從乳癌患者病歷內建構出 age、tumor grade、TNM stage、Estrogen receptor (ER)、Progesterone receptor (PR)、HER-2/neu、associated DCIS or LCIS、lymphatic or vascular invasion、recurrence of the breast cancer 等研究項目，並以微軟公司發行的辦公室套裝軟體 Excel 2000 進行研究項目的整理；而 Genomic DNA bank 則是抽取病患的血液，從白血球中分離及抽取 Genomic DNA 以建構 DNA 資料庫。

在第二階段方面，主要是進行基因多型性分析。在 PPAR α 部分，首先將 PPAR α DNA 序列以 exon 為單位分成 8 個片段，並將這 8 個 exons 分別以 PCR 增幅及變性梯度膠體電泳 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE) 分析乳癌病患之 genomic

DNA，之後將電泳分析結果與他人相異的樣本進行 DNA 定序。隨後將 DNA 定序結果以 NCBI 網站上的 Blast 程式進行基因序列比對，若發現有 mutation 存在，則針對該 mutation 設計限制？片段長度多型性(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)分析實驗，最後以 PCR-RFLP 方式分析所有乳癌病患組及健康人控制組在該 mutation 上的 genotype；在 apoE 部分，則是直接使用 PCR-RFLP 方式直接分析乳癌病患組及健康人控制組 apoE 之 genotype。

在第三階段方面，則是使用統計分析將第一階段及第二階段之結果整合在一起，以分析基因多型性與臨床診斷研究項目之間的相關性。在此階段使用 SPSS ver.10.0.7C 統計軟體執行統計及分析基因多型性與臨床診斷數據之間的相關性。首先使用卡方檢定 (Pearson χ^2 test) 分析 PPAR a 基因多型性及 apoE genotype 與乳癌罹患之間的關連性及與臨床診斷項目之間的關連性。若發現 PPAR a 基因多型性或 apoE genotype 與研究項目有關連性，則使用 logistic regression 分析在基因型中以何種基因型較具有影響力。

第四章 研究材料及研究方法

第一節 研究材料

4-1-1 研究對象血液檢體的取得

實驗組由中國醫藥大學附設醫院及署立豐原醫院外科共同提供乳癌患者（總數為 306 位；平均年齡是 48.52 ± 11.35 歲；年齡分佈範圍為 28 - 85 歲；女性）的血液檢體；對照組由台中捐血中心提供正常捐血者（總數為 300 位；平均年齡是 32.05 ± 10.91 歲；年齡分佈範圍為 19-65 歲；女性）的血液檢體，對照組血液檢體均經篩檢 Hepatitis B virus (HBV)、Hepatitis C virus (HCV)、Human Immunodeficiency Virus (HIV)、Human T-lymphotropic virus (HTLV)、Alanine aminotransferase (ALT)、Serological Test for Syphilis (STS)。

4-1-2 試劑

Amresco 公司：Tris-acetate , Tris-borate , Tween-20

Applied Biosystems 公司：ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit

BMA 公司：SYBR Green

Cayman chemical 公司：anti-PPAR α antibody

Invitrogen 公司：Formamide

Merck 公司： $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, KCl , NaCl , NaF

NEN Life Science 公司 : Polyvinylidene fluoride

New England BioLabs 公司 : NEBuffer DpnII , NEBuffer 3 , NEBuffer
4 , 限制? *DpnII* , *DdeI* , *Sau96I*

Pierce 公司 : BCA Protein Assay Reagent , SuperSignal[®] West Pico
Chemiluminescent Substrate

Promega 公司 : Thermophilic DNA Polymerase 10X Buffer, Magnesium
Free , Agarose , 100 mM dATP , 100 mM dCTP , 100
mM dGTP , Taq DNA Polymerase , 25 mM Magnesium
Chloride Solution , 6X loading dye , 100 bp standard ,
10 bp standard

Santa Cruz 公司 : donkey-antirabbit IgG-HRP

Sigma 公司 : Ammonium Persulfate , Bromophenol blue , Xylene
Cyanole , Mineral oil , TEMED , PMSF , Igepal , EDTA ,
Aprotinin , Leupeptin , Sodium Orthovanadate

USB 公司 : Urea , Tris

Viogene 公司 : DNA extraction kit , PCR Clean Up-M

4-1-3 儀器

1. ABI 3730 DNA Analyzer : 購自 Applied Biosystems 公司
2. ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer : 購自 Applied Biosystems 公

司

3. GeneAmp PCR System 9700：購自 Applied Biosystems 公司
4. GS-6R 離心機：購自 Beckman 公司
5. Kodak EDAS 290：購自 Kodak 公司
6. Mupid-2：購自 Advance 公司
7. PCR 反應儀 iCycler：購自 BIO-RAD 公司
8. U-2000 分光光度計：購自 Hitachi 公司
9. Universal Mutation Detection System：購自 BIO-RAD 公司
10. 1510R-MT 超音波震盪器：購自 Branson 公司

第二節 實驗方法

4-2-1 萃取 PPAR α 蛋白質

將約 0.25 g 的病患乳癌組織及周邊正常乳房的脂肪組織分別加入 1 ml lysis buffer (內含 10 mM pH 8.0 Tris, 2 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5 mM KCl, 1 mM PMSF, 0.5% Igepal), 間隔 5 分鐘左右劇烈震盪一次, 共反應 15 分鐘, 之後以均質機打碎組織, 600 x g 離心 10 分鐘後去除上清液, 加入 500 μl nuclear lysis buffer (內含 10 mM pH 8.0 Tris, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 % Igepal, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Aprotinin, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Leupeptin, 1 mM PMSF, 1 mM Orthovanadate, 10 mM NaF) 置

於冰上，間隔 5 分鐘左右劇烈震盪一次共反應 30 分鐘，接下來以超音波震盪器打破核膜，操作時間為操作 10 秒鐘休息 20 秒鐘，共計 2 至 3 次左右，最後以 $13000 \times g$ 離心 15 分鐘，留下上清液並將上清液以 Bicinchoninic Acid (BCA) Assay 進行蛋白質定量，並於 -30 儲存備用 [80]。

4-2-2 蛋白質定量 (BCA assay)

先將 BCA 及 CuSO_4 以 50 比 1 的比例混合成 working solution，取 200 μl working solution 加入 10 μl 上述組織核蛋白萃取液 (樣本已稀釋 20 倍)，在劇烈震盪後室溫反應 2 小時，之後以 OD_{570} 測其吸光值 [81]。

4-2-3 分析 PPAR α 蛋白質 (西方墨點法)

以 10% Polyacrylamide 在 30 mA 電流下進行電泳分析 2 小時，再以 50 V 電壓進行轉印 1.5 小時，將蛋白質轉印至 PVDF，以 TBST (內含 50 mM Tris, 250 mM NaCl, 0.5% Tween-20) 進行清洗 10 分鐘共計兩次，以 5% 脫脂牛奶溶於 TBST 進行 blocking，並置於 4 隔夜。接著以 TBST 清洗 10 分鐘三次，之後加入一級抗體 (anti-PPAR α , 1 : 500 稀釋) 震盪反應 2 小時，接下來以 TBST 清洗 10 分鐘三次，之後加入二級抗體 (1 : 1000 稀釋) 震盪反應 1 小時。然後以 TBST 清洗 10 分鐘 3 次，最後以 ECL 試劑反應 4 分鐘，並使用 Kodak

底片進行顯影 [82]。

4-2-4 抽取 Genomic DNA

5 ml 血液檢體以 4 3000 rpm 離心 10 分鐘後，抽取 buffy coat 層並使用 DNA extraction kit (Viogene[®] 公司) 萃取 genomic DNA ，最後使用分光光度計測量 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值以進行定量。

4-2-5 變性梯度膠體電泳分析(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)

將由血液檢體所抽取之 genomic DNA 以表三所列之 PCR primer 進行 PCR ，以增幅 *PPAR α* 基因之 exon 1 至 exon 8 各 DNA 片段 ，其反應條件為 (A) Exon 1 : Step 1 95 ， 2 分鐘。 Step 2 95 ， 30 秒 ， 62 ， 30 秒 ， 72 ， 45 秒 ， 共 40 cycles。 Step 3 72 ， 1 分鐘。 Step 4 4 停止反應。 (B) Exon 2、 Exon 4、 Exon 7 和 Exon 8 : Step 1 95 ， 2 分鐘。 Step 2 95 ， 30 秒 ， 60 ， 30 秒 ， 72 ， 45 秒 ， 共 40 cycles。 Step 3 72 ， 1 分鐘。 Step 4 4 停止反應。 (C) Exon 3 : Step 1 95 ， 2 分鐘。 Step 2 95 ， 30 秒 ， 55 ， 30 秒 ， 72 ， 45 秒 ， 共 40 cycles。 Step 3 72 ， 1 分鐘。 Step 4 4 停止反應。 (D) Exon 5 : Step 1 95 ， 2 分鐘。 Step 2 95 ， 30 秒 ， 54 ， 30 秒 ， 72 ， 45 秒 ， 共 40 cycles。 Step 3 72 ， 1 分鐘。 Step 4 4 停止反應。 (E) Exon 6 : Step 1 95 ， 2 分鐘。 Step 2 95 ， 30 秒 ， 64 ， 30 秒 ， 72 ，

45 秒，共 40 cycles。Step 3 72℃，1 分鐘 Step 4 4℃ 停止反應。

將經 PCR 增幅的各 *PPAR α* 基因 exon 片段，用 DGGE 來偵測其基因上的多型性，其反應條件為：(A) Exon 1：12% polyacrylamide gel，變性劑 (Denaturing solution) 濃度為 10% ~ 80%，在 190 V 電壓及 55℃ 環境下進行電泳分析 3 小時。(B) Exon 2：8% polyacrylamide gel，變性劑濃度為 10% ~ 60%，在 190 V 電壓及 55℃ 環境下進行電泳分析 4 小時。(C) Exon 3：12% polyacrylamide gel，變性劑濃度為 10% ~ 60%，在 190 V 電壓及 55℃ 環境下進行電泳分析 4 小時 45 分鐘。(D) Exon 4：12% polyacrylamide gel，變性劑濃度為 30% ~ 70%，在 190 V 電壓及 55℃ 環境下進行電泳分析 4 小時 45 分鐘。(E) Exon 5：8% polyacrylamide gel，變性劑濃度為 20% ~ 60%，在 190 V 電壓及 55℃ 環境下進行電泳分析 3 小時 30 分鐘 (F) Exon 6：8% polyacrylamide gel，變性劑濃度為 20% ~ 50%，在 190 V 電壓及 55℃ 環境下進行電泳分析 3 小時 30 分鐘。(G) Exon 7：8% polyacrylamide gel，變性劑濃度為 20% ~ 50%，在 190 V 電壓及 55℃ 環境下進行電泳分析 4 小時 15 分鐘。(H) Exon 8：8% polyacrylamide gel，變性劑濃度為 10% ~ 50%，在 190 V 電壓及 55℃ 環境下進行電泳分析 4 小時 30 分鐘。

電泳分析結束後，將凝膠用 SYBR Green 進行染色約 4 分鐘後，

使用 Kodak EDAS 290 將電泳結果照相及數位化保存。

4-2-6 限制? 片段長度多型性分析 (RFLP)

經由 DGGE 篩檢出呈現不同基因多型性之樣本進行 DNA 定序，將定序結果以 NCBI 網站上的 Blast 程式 [83] 進行分析，以找出基因突變所在位置並以此設計 RFLP 來大規模篩檢乳癌及對照組之 DNA 檢體。設計限制? 片段長度多型性分析實驗時若無法順利找出所需之限制內切? ，我們使用 mismatch-PCR RFLP 技術 [84] 設計出可執行限制? 片段長度多型性分析之所需 primer (表四)。

將由血液檢體所抽取之 genomic DNA 以 PCR 增幅 *PPAR α* 基因之 exon 3、exon 5 及 exon 6 和 ApoE 之 DNA 片段，其反應條件為 (A) Exon 3 和 Exon 6：Step 1 95 °C，2 分鐘。Step 2 95 °C，30 秒，55 °C，30 秒，72 °C，45 秒，共 40 cycles。Step 3 72 °C，2 分鐘。Step 4 4 °C 停止反應。(B) Exon 5：Step 1 95 °C，2 分鐘。Step 2 95 °C，30 秒，54 °C，30 秒，72 °C，45 秒，共 40 cycles。Step 3 72 °C，2 分鐘。Step 4 4 °C 停止反應。(C) ApoE：Step 1 95 °C，2 分鐘。Step 2 95 °C，30 秒，60 °C，30 秒，72 °C，45 秒，共 40 cycles。Step 3 72 °C，2 分鐘。Step 4 4 °C 停止反應。

將 PCR 所增幅的 PCR 產物，分別加入適當的限制? (Restriction Enzyme) 及緩衝液，並將之送入 PCR 反應儀以適當溫度進行反應，

之後將反應後的產物以 Agarose gel 進行分析，最後使用 Kodak EDAS 290 將電泳結果照相及數位化保存。詳細反應條件為：(A) Exon 3 S24F：取 11 μ l PCR 產物加入 4 units *DpnII* (儲存於 200 mM NaCl, 10 mM pH 7.4 的 Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 200 μ g/ml BSA and 50% glycerol)、4 μ l 10X NEBuffer *DpnII* (內含 pH 6.0 100 mM NaCl, 50 mM Bis Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM dithiothreitol) 及適當的 ddH₂O，反應時間及溫度為 37 °C，3 小時，65 °C，20 分鐘停止反應後 4 °C 保存。電泳分析條件為 3.5% Agarose，以 100 V 電壓進行約 45 分鐘。(B) Exon 5 L162V：取 25 μ l PCR 產物加入 4 units *DdeI* (儲存於 50 mM KCl, 10 mM pH 7.4 的 Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 200 μ g/ml BSA and 50% glycerol)、4 μ l 10X NEBuffer 3 (內含 pH 7.9 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT) 及適當的 ddH₂O，反應時間及溫度為 37 °C，3 小時，65 °C，20 分鐘停止反應後 4 °C 保存。電泳分析條件為 3.5% Agarose，以 100 V 電壓進行約 45 分鐘。(C) Exon 6 V227A：取 11 μ l PCR 產物加入 2 units *Sau96I* (儲存於 50 mM KCl, 10 mM pH 7.4 的 Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 200 μ g/ml BSA and 50% glycerol)、4 μ l 10X NEBuffer 4 (內含 pH 7.9 50 mM potassium acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM

dithiothreitol) 及適當的 ddH₂O , 反應時間及溫度為 37 °C , 3 小時 , 65 °C , 20 分鐘停止反應後 4 °C 保存。電泳分析條件為 3% Agarose , 以 100 V 電壓進行約 35 分鐘。(D) ApoE : 取 25 µl PCR 產物加入 10 units *Hha*I (儲存於 50 mM KCl, 10 mM pH 7.4 的 Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 200 µg/ml BSA and 50% glycerol) , 4 µl 10X NEBuffer 4 (內含 pH 7.9 50 mM potassium acetate, 20 mM Tris-acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM dithiothreitol) , 0.4 µl 100X BSA 及適當的 ddH₂O , 反應時間及溫度為 37 °C , 3 小時 , 65 °C , 20 分鐘停止反應後 4 °C 保存。電泳分析條件為 3% Agarose , 以 100 V 電壓進行約 35 分鐘。

4-2-6 臨床診斷資料庫的建立

進行與基因多型性統計分析的臨床診斷數據有 ER、PR、HER-2/neu、tumor grade、TNM stage、vascular invasion、lymphatic invasion、recurrence of the breast cancer。ER、PR、HER-2/neu 是使用免疫組織化學 (Immunohistochemistry) 進行判定。Vascular invasion、lymphatic invasion、tumor grade、TNM stage 使用 H&E 染色判定。至於乳癌復發則是藉由長期追蹤乳癌患者達五年而進行判定的。

4-2-7 統計分析

在統計上，研究對象平均年齡以 $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ 表示。且使用卡方分析來分析基因多型性與疾病和病人臨床診斷數據的關連性，當 $p < 0.05$ 表示在統計上有顯著的差異性。若發現到基因多型性與臨床數據有顯著相關性後，再使用 logistic regression 進行分析，以判讀在基因多型性中以何種基因型對於臨床診斷有顯著的影響。所使用的統計分析軟體為 SPSS ver. 10.0.7C。

第五章 研究結果

5-1 建立乳癌病患 Clinical outcome 資料庫

乳癌病患之 clinical outcome 資料庫，主要是由中國醫藥大學附設醫院乳房外科陳達仁醫師與署立豐原醫院外科部吳建廷醫師提供乳癌病患資料所建構而成。資料庫內記載了病人的許多相關臨床診斷數據和一些背景調查，如年齡、家族遺傳、有無停經、腫瘤大小、病理診斷、有無 bone scan、ER、PR、HER-2/neu、tumor grade、TNM stage、vascular invasion、lymphatic invasion、recurrence of the breast cancer、CEA、Ca153 等等。

5-2 建立乳癌病患及正常對照組 DNA 基因庫

因應 DGGE 及 RFLP 實驗所需，我們使用 DNA extraction kit (Viogene[®] 公司)萃取出 306 位乳癌患者及 300 位正常人之 genomic DNA，而建構成 DNA 基因庫，並以-80 保存備用。

5-3 PPAR a 在乳房組織中表現情形

為了分析 PPAR a 在不同組織內表現的情形，使用西方墨點法分析四位乳癌患者其乳房組織的癌化 (Cancer tissue) 及周邊非癌化組織 (Surrounding cancer-free tissue) 中 PPAR a 蛋白質的表現 (圖四)。結果顯示四位患者之 PPAR a 分佈情形類似，PPAR a 均在癌化組織中有明顯的表現而在周邊非癌化組織無明顯的表現。

5-4 分析 PPAR a 基因多型性

PPAR a 基因共含八個 exons，經由 DGGE 分析結果如圖五至圖七所示。相同的 DNA 序列在 DGGE 電泳圖上會呈現出相同的分佈情形，若序列上有出現一個點突變，在 DGGE 電泳圖上其分佈情形將會異於其他未突變之序列，而同型合子 (Homozygous) 與異型合子 (Heterozygous) 在 DGGE 電泳圖上的分佈情形亦會不同。實驗結果顯示 PPAR a exon 1 (圖五 A), exon 2 (圖五 B), exon 4 (圖五 C), 及 exon 8 (圖五 D) 上僅有一種明顯的分佈情形並未發現基因多型性，而 exon 3 (圖六 A), exon 5 (圖六 B), exon 7 (圖六 C) 則有不規則的基因多型性。另外在 PPAR a exon 6 (圖七) 上總共看到明顯的三種分佈情形，分別是圖七 A 上有兩種及圖七 B 上有三種分佈情形。

為了瞭解 PPAR a 是否有基因多型性存在，我們依據在 DGGE 實驗所得到的結果，將各 exon 具有獨特基因多型性之 Genomic DNA 片段進行 DNA 定序，並且以 NCBI 網站上的 Blast 程式將定序結果與 NCBI 網站上之正常 PPAR a DNA 序列進行 DNA 序列比對，而進一步推算出是基因上何處有發生突變。我們最後得知 PPAR a 在 exon 3 及 exon 6 上有突變出現。分別是 exon 3 的 S24F mutation，codon 由 TCT 轉變成 TTT 而使得第 24 個氨基酸由 S 更換成 F (圖

八); exon 6的 V227A mutation, 其 codon 由 GTC 轉變成 GCC 而使得第 227 個氨基酸由 V 更換成 A (圖十)。此外我們額外針對一目前已知的 PPAR α exon 5的 L162V mutation 進行分析, 該突變是因 codon 由 CTT 轉變成 GTT 而使得第 162 個氨基酸由 L 更換成 V (圖九)。

5-5 分析實驗族群的基因型

在確認 PPAR α 之 DNA 突變所在位置之後, 我們採用 PCR-RFLP 的實驗方式來確認乳癌患者及正常人的基因型。此外我們也採用 PCR-RFLP 的實驗方式分析乳癌患者及正常人的 ApoE 基因型。

PPAR α exon 3 S24F mutation 之 RFLP 設計圖如圖十一 A 所示, 實際電泳結果圖則如圖十一 B 所示。經 PCR 增幅後的產物其序列長度為 450 bp, 若所分析之樣本其序列為 wild type, 則序列在經過與限制? *DpnII* 反應之後會產生三段 DNA 片段, 片段長度分別為 16 bp, 273 bp 及, 161 bp; 若序列為 mutation 則最後會產生二段 DNA 片段, 片段長度分別為 289 bp 及 161 bp。

PPAR α exon 5 L162V mutation 之 RFLP 設計圖如圖十二 A 所示, 實際電泳結果圖則如圖十二 B 所示。經 PCR 增幅後的產物其序列長度為 280 bp, 若所分析之樣本其序列為 wild type, 則序列在經過與限制? *DdeI* 反應之後會產生三段 DNA 片段, 片段長度分別為

97 bp, 159 bp 及 , 24 bp ; 若序列為 mutation 則最後會產生二段 DNA 片段 , 片段長度分別為 97 bp 及 183 bp。

PPAR a exon 6 V227A mutation 之 RFLP 設計圖如圖十三 A 所示 , 實際電泳結果圖則如圖十三 B 所示。經 PCR 增幅後的產物其序列長度為 496 bp , 若所分析之樣本其序列為 wild type , 則序列在經過與限制? *Sau96I* 反應之後會產生二段 DNA 片段 , 片段長度分別為 479 bp 及 17 bp ; 若序列為 mutant type 則最後會產生三段 DNA 片段 , 片段長度分別為 325 bp , 154 bp 及 17 bp。

在 ApoE 基因型方面 , RFLP 設計圖如圖十四 A 所示 , 實際電泳圖如圖十四 B 所示。PCR 增幅之產物其序列長度為 246 bp , 若樣本所攜帶之對偶基因為 e2 , 則會出現 16 bp , 18 bp , 38 bp , 83 bp 及 91 bp 共五片段 ; 若為 e3 則會出現 16 bp , 18 bp , 35 bp , 38 bp , 48 bp 及 91 bp 共六片段 ; 若為 e4 則會出現 16 bp , 18 bp , 19 bp , 35 bp , 38 bp , 48 bp 及 91 bp 共七片段。

5-6 乳癌臨床診斷與 PPAR a 基因多型性之關連性

以 RFLP 分析所有參與者之 PPAR a 突變位置基因型後 , 將這些基因型資訊與 clinical outcome 資料庫整合在一起 , 並且使用統計方法進行分析。

首先使用卡方分析來分析罹患乳癌與 PPAR a 基因其上之三個

單點突變處有無相關性存在，並且計算各突變處之 allele frequency 及表現型的分佈情形 (表五)。發現到 L162V mutation 之 L 表現型出現頻率是 100% 並無突變型存在，且 S24F，V227A 二種突變與乳癌的罹患無明顯的相關性存在 ($p > 0.05$)。

在其他臨床診斷與 PPAR α 基因多型性方面，經由卡方分析得知 S24F 及 V227A mutation 分別與 HER-2/neu (表六)，ER (表七)，PR (表七)，tumor grade (表八)，TNM stage (表九，十)，lymphatic invasion (表十一)，乳癌復發 (表十二) 均無明顯的相關性存在 ($p > 0.05$)；在 S24F 與 V227A mutation 之相互作用對罹患乳癌的影響方面，經卡方分析後發現兩突變之間並無顯著性的協同效應出現 ($p > 0.05$ ，表二十二)。

5-7 乳癌臨床診斷與 ApoE 基因多型性之關連性

在 ApoE 方面，首先使用卡方分析分析 ApoE 基因多型性與乳癌罹患之相關性，並且計算 allele frequency 及對偶基因表現型的分佈情形 (表十三)。發現 ApoE 基因多型性與乳癌的罹患有相關性 ($p = 0.014$)，為了得知是哪一種 allele carrier 較易罹患乳癌，我們使用 logistic regression 進行分析，最後發現 e4 carrier 比 e3 carrier 可增加罹患乳癌的風險 ($p = 0.006$) (表十四)。此外在 HER-2/neu 方面，卡方分析的結果發現 HER-2/neu status 與 ApoE 基因多型性有關 ($p =$

0.005)(表十五), 進一步經由 logistic regression 分析方面則是呈現, e4 carrier 的乳癌患者比 e3 carrier 的乳癌患者其 HER-2/neu status 較易呈現 negative 狀態 ($p = 0.004$)(表十六)。至於在其他項目方面, 由卡方分析得知 ApoE 與 ER (表十七), PR (表十七), tumor grade (表十八), lymphatic invasion (表二十) 及乳癌復發 (表二十一) 彼此之間無明顯的相關性存在 ($p > 0.05$)。

5-8 ApoE 基因多型性及 PPAR a polymorphism 與乳癌的相關性

為了瞭解 ApoE 基因多型性及 PPAR a polymorphism 之間雙基因的協同效應 (Synergism) 是否會影響到罹患乳癌的風險性。在 PPAR a S24F mutation 方面, 首先採用卡方分析分析 S24F mutation 與 ApoE 之間的協同效應與罹患乳癌的相關性 (表二十三), 發現兩者之間有顯著相關性 ($p = 0.028$), 因此進一步的個別分析 S24 allele 或 F24 allele 與 ApoE 基因型之相關性 (表二十三), 結果顯示 ApoE 基因多型性與 F24 allele 之間在乳癌的罹患上有相關 ($p = 0.004$), 但是與 S24 allele 之間則無關 ($p = 0.508$, 表二十三), 而且帶有 e4 allele 及 F24 allele 比帶有 e3 allele 及 F24 allele 基因型的人, 顯著的增加罹患乳癌的危險性 ($p = 0.005$, 表二十四), 相同地, 若同時具有 e2 allele 及 F24 allele 也可顯著地增加罹患乳癌的危險性 ($p = 0.021$)。

另一方面, 針對 PPAR a V227A mutation 與 ApoE 基因多型性之

協同效應與罹患乳癌的相關性分析發現，兩者之間無明顯相關性存在 ($p = 0.09$, 表二十三)，但是進一步個別分析 V227 allele 或 A227 allele 與 ApoE 基因型之相關性，則是發現 ApoE 基因多型性與 V227 allele 之間在乳癌的罹患上有相關性 ($p = 0.012$, 表二十三)，但是與 A227 allele 之間則無關 ($p = 0.772$, 表二十三)，而且帶有 e4 allele 及 V227 allele 比帶有 e3 allele 及 V227 allele 基因型的人顯著地增加罹患乳癌的危險性 ($p = 0.006$, 表二十五)。

最後在乳癌的臨床診斷與雙基因協同效應之分析方面，若同時考慮 ApoE 與 S24F mutation 或 ApoE 與 V227A mutation 的協同效應與 HER-2/neu status 的相關性，結果顯示，以上兩種基因型的協同效應與 HER-2/neu status 有關 ($p = 0.003$ 及 $p = 0.042$, 表二十六)。其中 ApoE 與 F24 allele ($p = 0.003$) 及 ApoE 與 V227 allele 之間有顯著相關性 ($p = 0.004$, 表二十六)，進一步分析則是發現，e4 allele 與 F24 allele 兩者之間與 HER-2/neu status 是呈現負相關 ($p = 0.005$, 表二十七)，而 e4 allele 與 V227 allele 兩者之間與 HER-2/neu status 亦是呈現負相關 ($p = 0.003$, 表二十八)。另外 ApoE 與 S24F mutation 兩者之間的協同作用亦可見於 DCIS status 及 lymphatic invasion。在 DCIS status 方面，ApoE 與 S24F mutation 之間並無顯著的相關性 ($p = 0.072$)，但是進一步分析則是發現 ApoE 與 F24 allele 的協同效應

與 DCIS status 有顯著相關性 ($p = 0.019$, 表二十九), 經 logistic regression 分析則是發現 e4 與 F24 allele 兩者之間與 DCIS status 呈現顯著負相關 ($p = 0.023$, 表三十); 最後在 lymphatic invasion 方面則是發現 ApoE 與 S24F mutation 之間有顯著的相關 ($p = 0.03$), 其中 ApoE 與 F24 allele 之間有顯著相關性 ($p = 0.026$, 表三十一), 且發現 e2 與 lymphatic invasion 呈現正相關 ($p = 0.036$, 表三十二)。

第六章 討論

本實驗主要是探討 PPAR a 在乳房組織中表現情形，乳癌臨床診斷與 PPAR a 及 ApoE 基因多型性之關連性，ApoE 基因多型性及 PPAR a polymorphism 與乳癌的相關性。所得到的結果如下，(a) 台灣乳癌患者其年齡層分佈較歐美國家低；(b) PPAR a 蛋白質在乳癌患者的乳房組織癌化部位有明顯的表現；(c) 在乳癌病患 PPAR a 基因中發現二個單點突變，分別是 S24F 及 V227A mutation；(d) S24F, L162V 及 V227A mutation 與台灣人乳癌的罹患沒有關連性；(e) S24F, L162V 及 V227A mutation 與台灣人乳癌的臨床診斷沒有關連性；(f) 台灣人其 ApoE 基因型的 e4 對偶基因會增加罹患乳癌的風險；(g) e4 對偶基因與 HER-2/neu 的表現是呈現負相關；(h) ApoE 基因型與 HER-2/neu 之外的臨床診斷沒有關連性；(i) PPAR a 的 S24F 及 V227A mutation 兩者之間在罹患乳癌方面沒有協同效應存在；(j) ApoE 之 e2 或 e4 allele 與 PPAR a F24 allele 的協同效應可增加罹患乳癌的危險性；(k) ApoE 之 e4 allele 與 PPAR a V227 allele 的協同效應可增加罹患乳癌的危險性；(l) ApoE 之 e4 allele 與 PPAR a F24 或 V227 allele 之間的協同效應均與 HER-2/neu 的表現呈現負相關；(m) ApoE 之 e4 allele 與 PPAR a F24 allele 之間的協同效應會降低罹患 DCIS 的風險；(n) ApoE 之 e2 allele 與 PPAR

a F24 allele 之間的協同效應會增加 lymphatic invasion 的風險。

在我們的乳癌病患臨床數據資料庫中，發現到乳癌患者其年齡層分佈較歐美國家低些，平均發現年齡大約 48 歲，最年輕者 28 歲即發現罹患乳癌，此外 50 歲以前罹患乳癌者大約佔 65.9%，超過 50 歲以上罹患乳癌者僅佔 34.1%。另外所收集的病患其所罹患乳癌類型以 ductal carcinomas 佔最大比率宗，佔 87.3% 左右。

我們發現 PPAR α 蛋白質在乳癌患者的癌化乳房組織部位有明顯的表現量，這與 PPAR α 在先前學者的研究中指出，在老鼠癌化組織中 PPAR α 表現量高達正常組織表現量之 12 倍之多，且在乳癌細胞株 MDA-MB-231 內可發現到 PPAR α 表現量較高 [64, 67] 的結果是一樣的。因此，PPAR α 基因的表現量與乳癌的罹患是不可忽視的，至於透過何種機制來調控，目前並不是很清楚。而在 PPAR γ 有關乳癌的研究方面有指出，PPAR γ 在乳癌細胞上有表現，而且若添加 TZDs 讓 PPAR γ 活化，則會使得乳癌細胞產生增殖抑制及促進分化的現象 [16, 17]，但是若以 ligand 搭配不同的物質如維生素 A 同時誘導 PPAR γ ，則會使得乳癌細胞出現生長抑制及細胞凋亡的現象出現 [17]，因此倘若添加不同的 PPAR α ligand 來活化 PPAR α 是否會有相似或不同的情況出現，將是我們下一步要探討的課題。

目前已知 S24F mutation 之所在位置為 PPAR α 蛋白質結構上的

A/B domain; L162V mutation 之所在位置為 PPAR α 蛋白質結構上的 C domain (即 DNA binding domain); V227A mutation 所在位置則是 D domain。因此在結構上也許會因 L162V mutation 而導致影響 PPAR α 與 PPARE 結合的能力,或因 V227A mutation 影響到 PPAR α 與 ligand 或 DNA 結合的能力,最後使得 PPAR α 在活化或調控功能上受到影響,而進一步影響其調控基因轉錄的功能。也有可能藉由磷酸化 PPAR α 的第 24 個氨基酸 serine,而進一步由 Ligand-independent pathway 來活化 PPAR α [92]來影響 PPAR α 調控功能。

然而,在 PPAR α polymorphism 分析中,我們發現 S24F mutation 與乳癌罹患並無顯著的相關性,但是 S24F mutation 在乳癌病患之 T-allele frequency 為 0.791,而健康人之 T-allele frequency 為 0.775,而且不論罹患乳癌與否大部分人的表現型為 F/F 或 S/F 而非 S/S,其對偶基因分佈情形並不符合 Hardy-Weinberg law,因此這個現象的產生可能與人種的差異性有關。

此外 L162V mutation 在我們的實驗中明顯看到在整個研究族群裡,C-allele frequency 為 1.0 而 G-allele frequency 為 0,意即表現型全都是 L/L,所以我們無法針對 L162V mutation 來探討其與乳癌罹患及乳癌臨床診斷之間的相關性。另一方面,V227A mutation 其 T-allele frequency 在乳癌病患中為 0.964 而在健康人中則為 0.96,意

即大部分的人其 V227A 之表現型為 V/V 或 V/A。V227A mutation 在我們的研究中沒有發現到與乳癌的罹患或者是任一臨床診斷數據有關連性。但是 V227A 對血脂質的影響卻是相當有意義的，在日本的一項研究中指出，對女性而言，攜帶 A227 allele 的女性其血液中總膽固醇和三酸甘油脂的平均濃度較未攜帶 A227 allele 的人來得顯著地降低，且低密度脂蛋白膽固醇平均濃度亦較未攜帶 A227 allele 的人來得顯著地降低 [87]。目前已知三酸甘油脂可能是一造成乳癌發生的危險因子 [91]，所以就前面所言是否攜帶 V227 allele 就會增加乳癌的罹患機率呢？從我們的研究中發現 PPAR α V227A mutation 與乳癌的罹患並無顯著地相關 ($p = 0.703$)，也許這是因為即使所攜帶的是 V227 allele，其血液中的血脂質濃度也並非一定會有不正常的升高，而導致其他疾病的產生。因此 PPAR α polymorphism 對乳癌的影響可能不是一種 direct risk factor，所以我們進一步考慮 S24F mutation 與 ApoE 或 V227A mutation 與 ApoE 雙基因的協同效應對於乳癌的影響。

至於在 ApoE 方面，我們由卡方分析得知 ApoE 與罹患乳癌有關係，此外藉 logistic regression 分析我們更進一步的瞭解是 e4 allele 與乳癌的罹患有著正相關，這與先前學者所提的 e4 allele 會增加罹患乳癌的風險不謀而合 [76]，此外在 e4 allele 之所以會增加罹患乳

癌的風險的學說方面，學者們是認為，是因為 e4 allele 會造成血液中三酸甘油酯濃度上升，且三酸甘油酯本身就是造成乳癌發生的危險因子 [91]。

再者，HER-2/neu 本身是一個 oncogene，會促進癌細胞的增生並且會造成乳癌病人的預後不佳，如乳癌病人本身有出現 HER-2/neu 的 gene amplification 現象，則該病人即使在治癒之後，五年內乳癌再度復發的機率是很高的 [59]。根據我們的分析，發現到 ApoE 與 HER-2/neu 的存在有關係，藉 logistic regression 分析則是發現 e4 allele 與 HER-2/neu 的表現是成負相關的關係。這是一件有趣的事情，e4 allele 因為會造成血中三酸甘油酯濃度的上升而使得罹患乳癌的風險上升 [76]，但是因與 HER-2/neu 的表現成負相關，所以在 HER-2/neu 不表現的情況下，可能使得乳癌復發的機率降低。

在探討基因與基因的關連性方面，我們發現到 ApoE 之 e2 和 e4 與 PPAR a F24 allele 在乳癌的罹患上有協同效應存在，此外 ApoE 之 e4 與 PPAR a V227 allele 在乳癌的罹患上有協同效應存在。意即在 ApoE 與 S24F mutation 方面，發現到若攜帶的是 F24 allele，則攜帶 e2 或 e4 基因型的人較容易罹患乳癌，而正常 PPAR a 基因型的第 24 胺基酸 serine 是磷酸化的位置，因此是否經由單點突變改變成 phenylalanine 而造成蛋白質結構或活性的改變，而影響 PPAR a 調控

脂質代謝的相關基因的表現,值得進一步再探討。在 ApoE 與 V227A mutation 方面,若所攜帶的基因是 e4 及 V227 allele 的人有較高的機會罹患乳癌,但是若所攜帶的基因非 V227 allele 而是 A227 allele 則不管 ApoE 基因型為何均不會對罹患乳癌的風險上有任何差異,因此若搭配前述有關 V227A mutation 與血脂質的研究來看,此現象是否是因為 A227 allele 所造成的血脂質較低的效應與 ApoE e4 所造成的血脂質較高的效應相抵銷,而使得罹患乳癌的風險沒有顯著上的差異,相信這仍有繼續討論的空間。目前已知在 PPAR α 所調控的基因方面,PPAR α 會調控轉錄負責將脂蛋白中之脂肪酸進行分離的酵素 Lipoprotein lipase (LPL) [88]、負責將脂肪酸從細胞外轉送至細胞內的 FABP [90] 負責將被送進細胞內的脂肪酸輸送至進行脂肪酸氧化的胞器如 peroxisome 或 mitochondria 等的 FATP [89]及在 peroxisome 進行 β -oxidation 所需之酵素如 ACO、enoyl-CoA hydratase/dehydrogenase multifunctional enzyme 及 keto-acyl-CoA thiolase enzymes 等 [34, 37, 53, 54]。此外活化 PPAR α 的 natural ligand 如 palmitic acid、oleic acid、linoleic acid 及 arachidonic acid [42-44]等,則是需由以上所述與脂肪酸代謝有關的蛋白質作用才能從血液中送至細胞內。因此若前述之 S24F 及 V227A 之突變影響到 PPAR α 的調控轉錄功能,那麼將可預期血脂質濃度會隨著 PPAR α

的活性改變而改變。

最後在臨床診斷與雙基因效應方面，我們發現 ApoE 之 e4 與 PPAR a F24 或 V227 allele 跟 HER-2/neu negative status 成正相關，意即攜帶 F24 或 V227 allele 之乳癌患者，若其亦攜帶 e4 allele 則會較不易表現 HER-2/neu 這 oncogene。此外，攜帶 F24 allele 及 e4 allele 之乳癌患者有較低的機率所罹患的乳癌類型為管道原位癌；而攜帶 F24 allele 及 e2 allele 之乳癌患者則是較易發生 lymphatic invasion 的現象。目前尚未有文獻指出 ApoE 或 PPAR a 基因多型性會影響所罹患之乳癌類型及 lymphatic invasion，所以在這方面仍有許多的研究空間。

第七章 結論與建議

在臨床診斷資料庫中我們發現台灣乳癌患者其年齡層分佈較歐美國家低。而且 PPAR α 蛋白質在乳癌患者的乳房組織癌化部位有明顯的表現量，但是所發現的 PPAR α 基因二個單點突變 S24F 及 V227A 與乳癌均無相關性。此外我們發現 ApoE 基因型的 e4 對偶基因會增加罹患乳癌的風險，且與 HER-2/neu 的表現則是呈現負相關。另外在基因的協同效應方面，我們發現攜帶 PPAR α F24 allele 且攜帶 ApoE e2 或 e4 基因型或者攜帶 PPAR α V227 allele 及 ApoE e4 基因型的人其罹患乳癌的風險均較高；而攜帶 F24 或 V227 allele 之乳癌患者，且攜帶 e4 allele 則會較不易表現 HER-2/neu；攜帶 F24 allele 及 e4 allele 之乳癌患者有較低的機率所罹患的乳癌類型為管道原位癌；攜帶 F24 allele 及 e2 allele 之乳癌患者則是較易發生 lymphatic invasion 的現象。綜合此次實驗的結果，我們推論 apoE polymorphism 可能是一個罹患乳癌的危險因子，而且 ApoE4 與 PPAR α 的 V227 allele 及 F24 allele 之間的協同效應會增加罹患乳癌的風險且影響所罹患之乳癌類型。

在建議方面，我們認為在台灣地區 ApoE4 與 PPAR α 的 V227 allele 和 F24 allele 之間有著協同效應存在，所以在乳癌篩檢上，或

許可以針對這兩個基因而將之當成篩檢乳癌的一種 tumor marker。

另外在乳癌的治療上,我們認為可以先針對會持續且大量表現 PPAR a 的乳癌細胞株如 MDA-MB-231 進行藥物實驗,而瞭解何種類型的藥物可以透過 PPAR a 而促進乳癌細胞的生長或促進死亡,並瞭解其調控機制,進一步發展出透過 PPAR a 治療乳癌的新型治療方式。