

乳癌重要疾病基因 *BRCA1*—台灣地區 93 例年輕原發性乳癌婦女的篩檢概況

丁先玲*

俞志誠**

沈志陽***

摘 要

本研究鑑於台灣地區的乳癌個案具有發病年齡較早，以及早發性癌症可能與遺傳性基因型有關等特性，而特別以發病年齡 ≤ 35 歲的年輕乳癌婦女為研究對象，藉由聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction) 及 DNA 直接定序分析 (sequence analysis) 方式，判讀出每一個案 *BRCA1* 之所有基因編碼外顯子 (coding exon) 以及其相鄰於各外顯子間的接合區域 (splice junctions) 的核苷酸序列，以進行乳癌重要疾病基因 *BRCA1* (breast cancer susceptibility gene-1) 的基因變異篩檢研究。研究結果顯示本研究個案中約有三分之一個案的發病年齡在 30 歲以下，其臨床診斷大多屬於第 I 期 (26.9%) 或第 II 期 (37.6%) 乳癌，有 22.6% 的個案發病時已經呈現淋巴轉移現象。在 *BRCA1* 基因型的 DNA 檢測方面，總共發現到 9 種 *BRCA1* 基因多型性 (polymorphism)。至於在 *BRCA1* 基因第 11 外顯子 (exon) 的位置所發現到的稀有基因突變型，則為從還未被發表在任何國際刊物上的基因突變型。由於該 *BRCA1* 基因突變個案本身為世代均居住台北地區的大家族成員，因此該突變有可能為台灣民眾所特有的家族性乳癌基因型態之一。因此，本研究成果除了可初步了解台灣族群的常見的 *BRCA1* 變異型態之外；至於新發現的 *BRCA1* 突變型，則對於日後台灣地區婦女罹患乳癌的相對危險性的研究探討，提供了重要線索。

關鍵詞：*BRCA1* 基因、乳癌、基因突變。

* 康寧醫護暨管理專科學校 護理科副教授

** 三軍總醫院 外科部主任

*** 中央研究院 生物醫學科學研究所研究員

電子郵件：slding@knjc.edu.tw

收稿日期：2007.11.10

修改日期：2008.5.8

接受日期：2008.5.8

Mutational Screening of *BRCA1* Gene on 93 Early-onset Breast Cancer Patients in Taiwan

Shian-ling Ding*

Jyh-Cherg Yu**

Chen-Yang Shen***

Abstract

Breast cancer in Taiwan is characterized by its early ages at tumor onset. This group of patients particularly displays high tumor grade and poor prognostic outcomes. To explore mutation of *BRCA1* (breast cancer susceptibility gene-1) underlying this particular group of tumors, the present study was conducted, and aimed at understanding the incidence of mutant *BRCA1* gene. The rationale underlying these aims is that *BRCA1* is the well-known the high-penetrant cancer predisposition gene, mutation of which has been found to be associated with early-onset breast cancer. In this study, 93 patients in Taiwan with early-onset breast cancer at age 35 years or less were screened for *BRCA1* mutations by sequencing PCR products spanning the coding region and partial intronic regions of the *BRCA1* gene. The results showed that nine genetic polymorphisms in coding region of *BRCA1* were detected in this investigation. In addition, one novel complex mutation of the *BRCA1* gene, showing to be a deletion of codon 1,318 and insertion of a cytosine before codon 1,320, was found in one patient with familial breast cancer. This mutation causes frameshift, leading to premature translational termination of *BRCA1* mRNA in codon 1,354. The frequency of *BRCA1* mutation was 1% in 93 early-onset breast tumors. Since the woman with the mutant *BRCA1* genotype belonged to a large clan in Taiwan, the mutant *BRCA1* might be a

* Associate professor, Department of Nursing, Kang-Ning Junior College of Medical Care and Management.

** MD; Director, Departments of Surgery, Tri-Service General Hospital.

*** PhD; Research Fellow, Institute of Biomedical Sciences, Academia Sinica.

specific genotype for Taiwan people. Our findings provide a better insight into exploring the relationship between breast cancer associated with *BRCA1* gene in the Taiwanese population.

Key Words : *BRCA1*, breast cancer, mutation.

壹、前言

2001年二月，美英等國宣佈完成了人類基因體定序及分析初稿，這項劃時代的重大成就的達成不但有助於理解人類特有疾病的發生與治療，也將人類醫學科技領域開展了後基因體的新紀元。在後基因體時代的今天，已發現有愈來愈多的疾病（譬如：乳癌）可能和基因的變異有關；就台灣地區而言，乳癌亦是我國婦女最常見的惡性腫瘤疾病之一，其每十萬人口發生率由1979年的6.2人、1986年的11.6人，持續增加至2003年的42.0人；顯示近20~30年間乳癌對於台灣婦女健康的威脅呈現著與日俱增的趨勢（行政院衛生署, 2007）。流行病學資料顯示，歐美婦女罹患乳癌的年齡大多是發生於更年期之後，而我國則約有百分之五十的乳癌個案的發病年齡是在50歲之前（行政院衛生署, 2007）。臨床研究顯示，台灣地區乳癌婦女的臨床癌症分期大多是第I期或第II期等較早期的腫瘤，但其發生淋巴轉移的比率卻比歐美的乳癌個案高（張, 1998, Chao, 2003）。根據Cheng等人的研究顯示（Cheng, 2000），罹患乳癌的台灣婦女具有年紀較輕、臨床表現惡性且預後較差之特色。整體而言，台灣地區婦女的乳癌發病率雖然不及歐美民眾高，但卻具有發病年齡較早及惡性度較高的特性（Cheng, 2000; Jemal, 2004; Lacey, 2002）。

BRCA1（Breast cancer susceptibility gene-1）是最早被發現的乳癌重要抑癌基因（Hall, 1990；Friedman, 1994）；該基因定位於第十七號染色體上（17q21），基因全長約100kb，含有24個外顯子（其中22個具有編碼功能），其mRNA長度為7.8kb，編碼1863個氨基酸，分子量為220kda的蛋白質（Miki, 1994）。當*BRCA1*基因表現正常時，其轉譯作用所產生的*BRCA1*蛋白質可以抑制乳腺細胞之不正常生長及避免乳癌生成（Holt, 1996; Thompson, 1995）。然而迄今為止各族群*BRCA1*基因突變（mutation）和多型性（polymorphism）已達1,500多種，突變方式有鹼基發生取代、插入、刪除、缺失而造成錯義突變、無義突變、缺失突變、插入突變等，其中無義和缺失突變常會產生鹼基序列發生改變（密碼子亦發生改變）並形成變異的蛋白質或轉譯的蛋白質不完整，使*BRCA1*功能缺失，而導致乳癌發生（Boulton, 2006）。透過*BRCA1*基因檢測，可發現攜帶*BRCA1*基因突變的乳癌高危險群，有利於乳癌的早期發現、早期診斷和早期治療，使病患獲得更好的治療效果。

研究文獻顯示約有5~10%的乳癌係來自遺傳，這些家族性乳癌患者大多在40歲前就罹患乳癌，相較一般女性在四十歲前罹患乳癌之機率只有5%的情形而言，這些家族性乳癌患者罹患乳癌之平均年齡比一般婦女大約提早了十年左右（Fitzgerald, 1996; Langston, 1996; Peto, 1999）；女性若具有遺傳性*BRCA1*基因之突變，則約有80%的機會在70歲前罹患乳癌（Futreal, 1994; Easton, 1993; Neuhausen, 1994）。Mary-Claire King在一項針對1,008位罹患侵襲性乳癌猶太（Ashkenazi Jews）婦女進行*BRCA1*基因之研究，發現共有67位（6.6%）帶有*BRCA1*基因之突變，其中42位（4.2%）為185delAG，25位（2.5%）為5382insC。此外，首次懷孕時愈年輕則乳癌發生率愈低，而曾經懷孕以及21歲時體重適中（未肥胖）等變項可延緩乳癌發生，而可能對乳癌具有保護（protective）效應（King, 2003）。

由於具有*BRCA1*基因突變之婦女為罹患乳癌的高危險群，因此乳癌基因檢驗確有其必要性。然而台灣地區每年持續新增超過4,000位的乳癌患者，其中究竟有多少比例的台灣乳癌婦女帶有*BRCA1*基因的突變？可能屬於台灣族群的*BRCA1*基因突變型態為何？這些迄今尚無完整答案的重要議題都亟需我們不斷努力探究，以逐步探索出事實的真相。本研究基於台灣地區婦女罹患乳癌年輕化和*BRCA1*乳癌突變基因高致病率的特性，而特別選擇台灣地區發病年齡小於35歲的年輕乳癌婦女為乳癌重要基因篩檢的研究對象，以初步探討台灣地區年輕乳癌婦女的*BRCA1*基因序列多型性和突變種類，以及各基因分型頻率的分布概況。

貳、方法

一、研究對象

本研究所指的台灣地區年輕原發性乳癌婦女之操作性定義是指 93 例分別由三軍總醫院、馬偕紀念醫院及耕莘醫院病理科醫師初次確診之乳癌新個案，並且其發病年齡 ≤ 35 歲之年輕婦女。在徵詢個案同意後進行標準化問卷訪談，之後並在臨床醫師的協助下進行病患血液檢體的採集。乳癌重要疾病基因*BRCA1*篩檢之操作性定義則是指個案血液檢體中所萃取之DNA，經由聚合酶

素連鎖反應 (polymerase chain reaction ; 簡稱 PCR) 及 DNA 直接定序分析 (sequence analysis) 方式, 所判讀出 *BRCA1* 之各基因編碼外顯子 (coding exon) 以及其相鄰於各外顯子間的接合區域 (splice junctions) 有變異的核苷酸序列。

二、DNA 萃取流程

本實驗以鹽析法 (salting-out method) 萃取 DNA。首先將全血以每分鐘 2,000 轉離心 5 分鐘, 移出上層溶液以保留血球界面黃層 (buffy coat) 與紅血球。加入等體積的紅血球溶解緩衝溶液, 充分混合後以每分鐘 2,000 轉離心 10 分鐘, 小心移出上層溶液, 保留黏著於試管底部的有核細胞。再加入 5ml 紅血球溶解緩衝溶液充分混合洗滌後, 以每分鐘 2,000 轉離心 10 分鐘, 小心移出上層溶液。如此重複數次, 直到紅血球完全洗淨後, 加入 3.2 ml 白血球溶解緩衝溶液, 充分混合後於 55°C 水浴中作用, 直到血球細胞核內的 DNA 完全溶出為止。再加入 1.2 ml 蛋白質沉澱緩衝溶液及 1.2 ml 二氧化矽懸浮液, 充分混合均勻後, 以每分鐘 3,500 轉離心 30 分鐘。吸取離心後的上清液至 15ml 離心管中, 加入 2 倍體積的冷凍無水酒精, 經充分混合均勻後即可使沉澱析出血液檢體中的 DNA。此時可以直接將無水酒精中的 DNA 團塊取出, 置放於 1.5ml 小管中, 加入 1ml 70% 酒精充分搖晃洗滌後, 在 4°C 下, 以每分鐘 12,000 轉離心 5 分鐘, 完全吸乾上液後, 以真空乾燥處理 5 分鐘, 再將 DNA 乾塊充分溶解於適量二次水中, 以 75°C 乾浴 10 分鐘來除去 DNA 分解酵素的能力後, 即可萃出 DNA。將該 DNA 檢體稀釋 10 倍, 以分光光度計 (spectrophotometer) 測量濃度, 然後將 DNA 檢體一律配製成 100 ng/μl 之操作溶液, 儲存於 4°C 冰箱中備用。

三、基因定序分析 (Direct sequence analysis)

研究過程是先將配製好的 20μl PCR 反應溶液 (包括 100 ng/μl DNA template 1μl, 5 pmole/μl Forward primers 1μl, 5pmole/μl Reverse primers 1μl, 2.5mM dNTP mix solution 1μl, 2.5mM MgCl₂ 1μl, 10X PCR buffer 2μl, 5unit/μl AmpliTaq Gold 0.05μl, bidistilled water 12.95μl) 置於聚合酵素連鎖反應儀器中, 依據不同標的產物所需要的溫度、時間進行 hot start: 95°C, 10 分鐘, 1

個循環。之後以 94°C，40 秒；52~60°C，30 秒；72°C，1 分鐘。進行 40 個循環 (Friedman, 1994) (附錄 1)。然後，再以 72°C，10 分鐘，進行 1 個循環。所得到聚合酵素連鎖反應的產物，利用聚合酵素連鎖反應產物在 2% (w/v) 的瓊脂凝膠 (agarose gel) 介質中移動距離與聚合酵素連鎖反應產物分子量數值成反比的電泳分析原理，判斷是否已經成功複製出所需用的 DNA 片段。對於聚合酵素連鎖反應已複製成功的標的產物進行 DNA 純化反應，以去除離子、鹽類及多餘的引子，然後利用 377 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) 的儀器執行該 DNA 片段的核苷酸序列分析。所發現的基因突變的位點再進一步利用 TOPO TA Cloning® Kit 將同時含有正常及突變 DNA 片段單獨分離出來，以作出最終之單股 DNA 序列的正確判讀。

附錄 1 *BRCA1* 基因聚合酵素連鎖反應的引子序列一覽表

| Exon | Upstream primer (5'→3') Downstream primer (3'→5') | Annealing temperature (°C) | Product sized (bp) |
|------|--|----------------------------------|--------------------------|
| 1 | TAGCCCTTGGTTTCCGTG TCACAACGCCTTACGCCTC | 55 | 315 |
| 2 | GAAGTTGTCATTTTATAAACCTTT TGTCTTTTCTTCCCTAGTATGT | 60 | 250 |
| 3 | CCTGACACAGCAGACATTTA TTGGATTTTCGTTCTCACTTA | 60 | 300 |
| 5 | CTCTTAAGGGCAGTTGTGAG TTCCTACTGTGGTTGCTTCC | 60 | 200 |
| 6 | CTTATTTTAGTGCCTTAAAAGG TTTCATGGACAGCACTTGAGTG | 55 | 200 |
| 7 | CACAACAAAGAGCATACATAGGG TCGGGTTCACTCTGTAGAAG | 55 | 250 |
| 8 | TGTTAGCTGACTGATGATGGT ATCCAGCAATTATTATTAATAAC | 60 | 220 |
| 9 | CCACAGTAGATGCTCAGTAAATA TAGGAAAATACCAGCTTCATAGA | 60 | 200 |
| 10 | TGGTCAGCTTTCTGTAATCG GTATCTACCCACTCTCTTCTTCAG | 60 | 220 |
| 11A1 | GGAATTAAATGAAAGAGTATGAGC CTTCCAGCCCATCTGTTATGTTG | 55 | 301 |
| 11A | AACACCACTGAGAAGCGTGCAG CTCACACAGGGGATCAGCATTC | 55 | 309 |
| 11B | CAACATAACAGATGGGCTGGAAG ACGTCCAATACATCAGCTACTTTGG | 55 | 300 |
| 11C | GGTTCTGATGACTCACATGATGGG TCTGTGGCTCAGTAACAAATGCTC | 55 | 295 |
| 11D | GAAAACCTATCGGAAGAAGGCAAG TCATCACTTGACCATTCTGCTCC | 55 | 254 |

附錄 1 (續) *BRCA1* 基因聚合酵素連鎖反應的引子序列一覽表

| Exon | Upstream primer (5'→3') Downstream primer (3'→5') | Annealing temperature (°C) | Product sized (bp) |
|------|---|----------------------------|--------------------|
| 11E | ATCAGGGA ACTAACCAAACGGAG CGCATGAATATGCCTGGTAGAAG | 55 | 269 |
| 11F | AGGCTGAGGAGGAAGTCTTCTACC CAGCTCTGGGAAAGTATCGCTG | 55 | 273 |
| 11G | GCAACTGGAGCCAAGAAGAGTAAC CCTGAGTGCCATAATCAGTACCAGG | 55 | 319 |
| 11H | CAGCGATACTTTCCCAGAGCTG TCTGTTTTTGCCTTCCCTAGAGTG | 55 | 312 |
| 11I | GCACTCTAGGGAAGGCAAAAACAG CATTCCTCTTCTGCATTTCTGG | 55 | 280 |
| 11J | GCCAGTCATTTGCTCCGTTTTIC CGTTGCCTCTGAACTGAGATGATAG | 55 | 288 |
| 11K | TGCAGGCTTTCCTGTGGTTG GGCTAATTGTGCTCACTGTACTTGG | 55 | 305 |
| 11L | GCAACGAAACTGGACTCATTACTC AGCCCGTTCCTCTTTCTTCATC | 55 | 270 |
| 11M | TTGAATGCTATGCTTAGATTAGGGG GACGCTTTTGCTAAAAACAGCAG | 55 | 270 |
| 11O | GAGTCCTAGCCCTTTCACCCARAC GTGATGTTCCCTGAGATGCCTTTG | 55 | 289 |
| 11P | CGTTGCTACCGAGTGTCTGTCTAAG AGCCCGTTCCTCTTTCTTCATC | 55 | 314 |
| 11Pi | AAAGCCAGGGAGTTGGTCTGAG GTGCTCCCAAAGCATAAA | 55 | 200 |
| 12 | GTCCTGCCAATGAGAAGAAA TGTCAGCAAACCTAAGAATGT | 60 | 220 |
| 13 | AATGGAAAGCTTCTCAAAGTA ATGTTGGAGCTAGGTCCTTAC | 60 | 280 |

附錄 1 (續) *BRCA1* 基因聚合酵素連鎖反應的引子序列一覽表

| Exon | Upstream primer (5'→3') Downstream primer (3'→5') | Annealing temperature (°C) | Product sized (bp) |
|------|--|----------------------------------|--------------------------|
| 14 | CTAACCTGAATTATCACTATCA GTGTATAAATGCCTGTATGCA | 60 | 250 |
| 15 | TGGCTGCCCAGGAAGTATG AACCAGAATATCTTTATGTAGGA | 60 | 250 |
| 16 | AATTCTTAACAGAGACCAGAAC AAAACCTCTTTCCAGAATGTTGT | 60 | 375 |
| 17 | GTGTAGAACGTGCAGGATTG TCGCCTCATGTGGTTTTA | 60 | 350 |
| 18 | GGCTCTTTAGCTTCTTAGGAC GAGACCATTTCCAGCATC | 60 | 350 |
| 19 | CTGTCATTCTTCTTCCTGTGCTC CATTGTAAAGGAAAGTGGTGC | 60 | 220 |
| 20 | ATATGACGTGTCTGCTCCAC GGGAATCCAAATTACACAGC | 60 | 220 |
| 21 | AAGCTCTTCCTTTTTGAAAGTC GTAGAGAAATAGAATAGCCTCT | 60 | 275 |
| 22 | TCCATTGAGAGGTCTTGCT GAGAAGACTTCTGAGGCTAC | 60 | 275 |
| 23 | CAGAGCAAGACCCTGTCTC ACTGTGCTACTCAAGCACCA | 60 | 250 |
| 24 | ATGAATTGACACTAATCTCTGC GTAGCCAGGACAGTAGAAGGA | 60 | 275 |

(資料摘自 Friedman, 1994)

叁、結果

一、早發性乳癌的人口學及病理表現特徵

93 例年輕乳癌的婦女中，約有三分之一左右個案的發病年齡是在 30 歲以下，另外三分之二個案的發病年齡是在 31~35 歲之間。這群年輕的乳癌個案，雖然大部分屬於臨床第 I 期或第 II 期的早期乳癌，但是這其中卻有 22.6% 的個案呈現淋巴轉移，此外多位乳癌婦女亦呈現乳腺管形成 (tubular formation) 不足、細胞核多形性 (pleomorphism) 的比例較高或細胞核分裂數目較多等的高惡性度乳癌的特性。在病理型態方面，74 例 (79.5%) 為浸潤性乳腺管癌 (infiltrating ductal carcinoma)，4 例 (4.3%) 浸潤性小葉癌 (infiltrating lobular carcinoma)，5 例 (5.4%) 黏液性腺癌 (mucinous carcinoma)，4 例 (4.3%) 髓質癌 (medullary carcinoma)，3 例 (3.2%) 乳頭癌 (papillary carcinoma)，2 例 (2.2%) 分泌型癌 (secretory carcinoma) 及 1 例 (1.1%) 化生癌 (metaplastic carcinoma) (表一)。

表一 93 例年輕 (≤35 歲) 乳癌婦女的人口學及臨床病理表現特徵

| 變項 | n | 百分比 (%) |
|------------|----|---------|
| 發病年齡 (歲) | | |
| ≤ 20 | 3 | 3.2 |
| 21- 25 | 5 | 5.4 |
| 26- 30 | 24 | 25.8 |
| 31- 35 | 61 | 65.6 |
| 病理型態 | | |
| 浸潤性乳腺管癌 | 74 | 79.5 |
| 浸潤性小葉癌 | 4 | 4.3 |
| 黏液性腺癌 | 5 | 5.4 |
| 髓質癌 | 4 | 4.3 |
| 乳頭癌 | 3 | 3.2 |
| 分泌型癌 | 2 | 2.2 |
| 化生癌 | 1 | 1.1 |
| 癌症分期 | | |
| I | 25 | 26.9 |
| II | 35 | 37.6 |
| III | 6 | 6.5 |
| IV | 2 | 2.1 |
| 未知 | 25 | 26.9 |

表一(續) 93例年輕 (≤35歲) 乳癌婦女的人口學及臨床病理表現特徵

| | n | 百分比 (%) |
|-------------------------------------|----|---------|
| 腫瘤大小 | | |
| T1 | 30 | 32.3 |
| T2 | 34 | 36.6 |
| T3 | 4 | 4.3 |
| T4 | 0 | 0.0 |
| 未知 | 25 | 26.9 |
| 淋巴轉移 | | |
| 無 | 45 | 48.4 |
| 有 | 21 | 22.6 |
| 未知 | 27 | 29.0 |
| 病理分級 | | |
| 乳腺管形成的程度 (tubular formation) | | |
| 乳腺管構造大於 75% | 4 | 4.3 |
| 乳腺管構造介於 10-75%之間 | 38 | 40.9 |
| 乳腺管構造小於 10% | 47 | 50.5 |
| 未知 | 4 | 4.3 |
| 細胞核多形性的程度 (pleomorphism) | | |
| 核形狀大小與正常細胞相似 | 8 | 8.6 |
| 核的形狀稍大，且形狀亦略有改變 | 61 | 65.6 |
| 細胞核多形性明顯，且差異很大 | 20 | 21.5 |
| 未知 | 4 | 4.3 |
| 細胞核分裂數目 (mitotic count, per 10 hpf) | | |
| 0-9 | 38 | 40.9 |
| 10-19 | 24 | 25.8 |
| >20 | 27 | 29.0 |
| 未知 | 4 | 4.3 |

二、年輕乳癌婦女的 *BRCA1* 基因變異種類

93 位年輕乳癌婦女的 *BRCA1* 基因序列中所發現的基因序列之變異，總共包括 9 個位於外顯子上的單一核苷酸的多型性變異 (single nucleotide polymorphism; 簡稱 SNP); 該 9 個單一核苷酸的多型性之中，共有 5 個發生頻率各不相同的基因序列變異分型的位點會造成胺基酸組成上的改變，而可能影響蛋白質的結構和功能，進而導致個人體質傾向不同的乳癌易感受性；其中 Ser 187 Phe、Tyr 856 His 及 Leu 871 Pro 等三個位置是由於 T (thymine) 取代 C (cytosine) 或 C 取代 T 的單一核苷酸多型性的變異，至於 Glu 1038 Gly 和 Lys 1183 Arg 等二個位置是 A (adenine) 取代 G (guanine) 的單一核苷酸多型性的變異 (表二)。此外，本研究尚在 *BRCA1* 基因第 11 外顯子 (exon) 的位置發現到 1 個會導致 *BRCA1* 的蛋白質合成作用提前終止的複合式的突變 (complex mutation)，此突變經由 TA cloning 的單股核苷酸定序的方式 (圖一) 証實所發現的 *BRCA1* 突變的 DNA 序列是屬於丟失位於 *BRCA1* 基因第 11 外顯子 codon 1318 之後，又同時在 codon 1320 之前額外多插入了一個胞嘧啶的突變；此位置的多重核苷酸序列的改變不但會造成 *BRCA1* 錯誤的胺基酸轉譯，並且使整個基因轉譯作用的停止密碼 (stop codon) 提前在 *BRCA1* 的 codon 1354 位置出現；換言之，帶有此突變 *BRCA1* 基因的個案不但在第 11 外顯子 codon 1318 的位置開始產生一連串錯誤的胺基酸序列，並且所轉譯出的產物亦比正常具有 1,863 個胺基酸的 *BRCA1* 蛋白質產物短少了 510 個胺基酸。

表二 93 例早發性乳癌個案的 *BRCA1* 基因變異分布概況

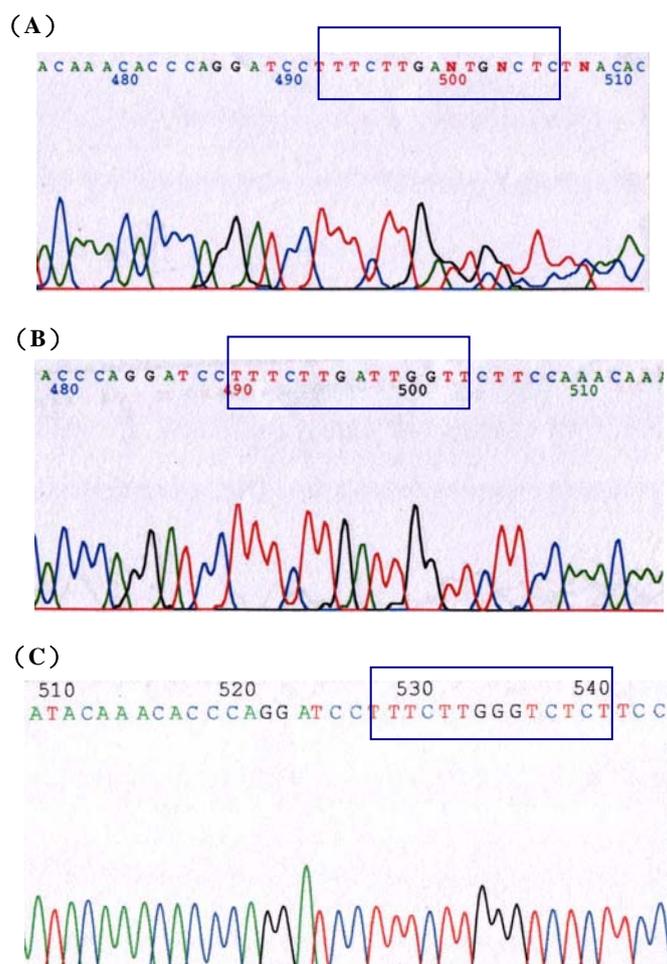
| <i>BRCA1</i> 基因 | | | 同質野生型 (%) | 同質變異型 (%) | 異質基因型 (%) |
|-----------------|---|----------|--------------|--------------|--------------|
| 編碼區域 | 胺基酸位置 | 遺傳密碼子 | | | |
| Exon 3 | Lys 38 Lys | AAG /AAA | 93.8 | 0.0 | 6.2 |
| Exon 9 | Ser 187 Phe | TCT /TTT | 98.5 | 0.0 | 1.5 |
| Exon 11 | Ser 265 Ser | TCT /TCC | 96.9 | 0.0 | 3.1 |
| Exon 11 | Ser 694 Ser | AGC/AGT | 30.6 | 25.8 | 43.5 |
| Exon 11 | Leu 771 Leu | TTG /CTG | 29.7 | 25.0 | 45.3 |
| Exon 11 | Tyr 856 His | TAT /CAT | 92.3 | 0.0 | 7.7 |
| Exon 11 | Leu 871 Pro | CCG/CTG | 28.8 | 27.3 | 43.9 |
| Exon 11 | Glu 1038 Gly | GAA /GGA | 29.6 | 22.5 | 47.9 |
| Exon 11 | Lys 1183 Arg | AAA /AGA | 29.7 | 25.0 | 45.3 |
| Exon 11 | Del codon1318, insert C before codon 1320 | | 98.5 | 0.0 | 1.5 |

註：Exon = 基因外顯子，Arg = arginine (精胺酸)，His = histidine (組胺酸)，
Glu = glutamic acid (麩胺酸)，

Gly = glycine (甘胺酸)，Leu = leucine (白胺酸)，Lys = lysine (離胺酸)，
Phe = phenylalanine (苯丙胺酸)，

Pro = proline (脯胺酸)，Ser = serine (絲胺酸)，Tyr = tyrosine (酪胺酸)。

圖一 *BRCA1*基因突變的核苷酸序列分析。(A) 377 Genetic Analyzer (ABI PRISM™) 儀器分析*BRCA1*突變之對偶基因 (alleles) 的DNA序列結果，發現該個案在codon 1318處開始呈現核苷酸序列異常現象；(B) TA cloning所測得其一 allele之*BRCA1*正常基因型；(C) TA cloning所測得之另一 allele的突變基因型，證實此個案*BRCA1*的DNA序列不但短少了codon 1318之ATT三個核苷酸，且在codon 1320之前又額外多插入了一個C（胞嘧啶）。

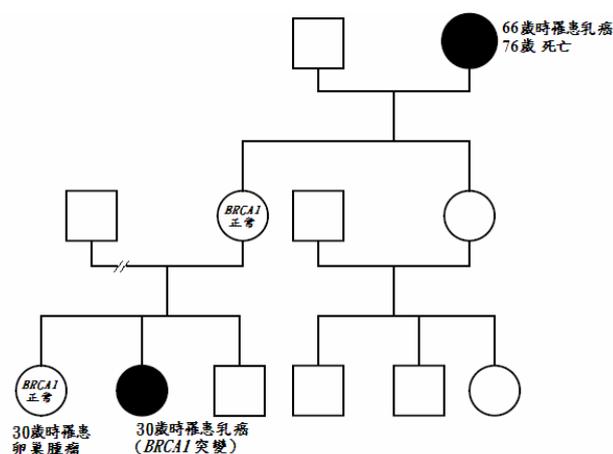


三、*BRCA1* 基因突變的個案分析

在 *BRCA1* 基因第 11 外顯子上所發現的基因突變攜帶者，是一位具有家族性乳癌病史的 30 歲未婚女性，由於該突變迄今均未被刊載發表在國際醫學文獻或任何乳癌相關資訊中心網站中，因而使該 *BRCA1* 基因突變有可能是台灣族群之家族性乳癌所特有的基因突變位點。

該 *BRCA1* 基因突變個案的父母親，均乃世代長期居住於大台北地區，且其家族姓氏為台灣相當普遍的大姓。在家族相關病史方面，已知其外祖母於 66 歲時罹患乳癌，並且已經於 76 歲辭世；姊姊於 30 歲左右曾罹患過卵巢腫瘤。然而個案的母親（外祖母有乳癌病史）與姊姊（有卵巢腫瘤病史）在接受 *BRCA1* 基因檢測後，發現該二人均屬於正常 *BRCA1* 基因型，顯示個案的 *BRCA1* 突變基因應該不是來自於曾經罹患過乳癌的外祖母之母系血親（圖二）。個案的父親與母親早年離異，自從其父親再婚另組家庭後即甚少與個案互動。因此，除了無法自個案處獲得其父親方面詳盡家族疾病史之資料外，也無從取得父親血親方面成員的 DNA 檢體，進行個案父系成員的 *BRCA1* 基因檢測，以確認個案 *BRCA1* 基因突變的根源。在醫院中的臨床病理報告顯示，該 *BRCA1* 基因突變的乳癌個案的腫瘤是屬於高惡性度、腫瘤體積小、沒有淋巴轉移及遠端轉移的第 I 期浸潤性乳腺管癌。在分子生物學檢查方面，則發現其腫瘤細胞沒有出現 *BRCA1* 基因失去異合質現象（loss of heterozygosity；簡稱 LOH），但 *BRCA1* 蛋白卻有明顯表現降低情況。至於個案腫瘤細胞中的 *p53* 基因，則同時出現基因失去異合質及蛋白異常表現的現象。

圖二 *BRCA1* 基因突變個案之相關家族疾病史



肆、討論

後基因體時代的今天，世人日漸體認癌症有其遺傳因素，而使得基因檢測在醫學研究上已日漸受到人們的重視。基因變異通常包括基因DNA核苷酸序列中的一個核苷酸被另一個核苷酸取代，或是一個或幾個核苷酸的插入或缺失。當基因變異剛好存在於具有特殊性狀的基因位置附近或密碼傳譯區域內，可能直接影響蛋白質功能，而使不同的基因分型對疾病易感受性造成差異。此外，遺傳物質的差異對於疾病的臨床過程，以及對不同治療的反應程度亦將有相當程度的影響。以台灣每年超過四千例新個案的乳癌為例，其發生率不但已經躍升為我國女性惡性腫瘤之冠，且其好發年齡大約較歐美乳癌婦女提早約十歲左右，顯示國人的乳癌與遺傳的密切關聯性（行政院衛生署, 2007）。因此，儘早釐清重要遺傳基因在台灣婦女發生乳癌上所扮演的角色，將有助於乳癌的早期發現、早期治療、及有效提高存活率。

鑑於*BRCA1*基因約100kb及mRNA 7.8kb的長度，使得檢測完整*BRCA1*基因的核酸序列比對工作極為繁瑣耗時，且費用高昂，所以即使是乳癌高發生率的歐美國家亦只能建議具有乳癌家族病史或發病年齡較早的年輕乳癌患者等*BRCA1*基因突變的高危險群，進行乳癌基因檢驗。至於一般民眾則通常是針對某些特定的重要突變位點，進行簡易的篩檢。因此，儘早建立完成台灣地區民眾的*BRCA1*基因型資料庫，是落實此項篩檢工作的重要前提。歷年來，台灣地區有關乳癌與*BRCA1*基因的相關研究，包括Li等人（1999）針對曾出現多位乳癌病例的18個家族成員進行*BRCA1*基因方面的研究，結果發現其中有2個家族的病例被檢測出在*BRCA1*內含子7（intron 7）的位置具有丟失10個鹼基，而導致*BRCA1*在外顯子8處即提前終止轉譯作用的突變。Hou等人（2000）評估台灣家族性乳癌與非家族性乳癌，其病理生物特性及存活率差異性的研究中，發現2例*BRCA1*基因遺傳性突變的乳癌病例的乳癌婦女具有發病年齡較輕（ $p=0.04$ ）及乳癌分期較低（ $p=0.03$ ）的特性。Chen等人（2003）曾經針對23例年齡小於35歲的年輕乳癌婦女及26例家族性乳癌個案進行*BRCA1*基因篩檢研究，結果在密碼傳譯區域內總共發現到8種單一核苷酸的多型性變異及1種位於exon 11的2,845核苷酸位置的單一鹼基出現了T取代A的突變型。本研究在93例年齡小於35歲的年輕乳癌個案中，發現9個位於密碼傳譯區域之外顯子上的

單一核苷酸的多型性變異，該9個單一核苷酸的多型性之中有5個基因序列變異的位點會造成胺基酸組成上的改變，其各基因分型對於國人乳癌易感受性的影響，值得日後參考國內外相關研究資料後再作進一步探討評估。至於本研究位於*BRCA1*頗為重要的第11外顯子位置所發現的罕見基因突變型，則迄今仍尚未曾在國際文獻中被發表過；此突變型不但在DNA序列上同時出現“丟失三個核苷酸”及“插入一個核苷酸”的雙重複合式的突變（complex mutation），使*BRCA1*所轉譯的蛋白質無法保存其原有羧基端具有啟動轉錄和RNA聚合酶相互作用的BRCT區域（Koonin, 1996），而使得其在細胞生長的週期中不能扮演正常的檢查控制及DNA修補角色，進而可能導致乳癌的發生（Bork, 1997; Levy-Lahad, 2007）。此外，本研究也曾針對此*BRCA1*突變的個案進行其他分子生物學檢查方面，發現該個案腫瘤細胞沒有出現*BRCA1*基因失去異合質現象，但*BRCA1*蛋白卻有明顯表現降低情況。此外，組織中的*p53*則同時出現基因失去異合質及*p53*蛋白異常表現等現象，符合*BRCA1*“管家”型（caretaker）基因突變後可能增加的基因體不穩定，當同時重要調控細胞生長的*p53*“守門”型（gatekeeper）基因也陸續失去活性後，造成組織細胞不正常過度增生及產生癌症的理論（Kinzler, 1997; Esteller, 2000）。由於本研究所發現*BRCA1*基因突變的個案是屬於世代居住台北地區的大家族成員，而這樣的*BRCA1*突變是否即為台灣族群所特有的*BRCA1*基因突變之一，值得後續相關研究再予以驗證。此外，該*BRCA1*突變型在整個台灣族群的實際發生率及該*BRCA1*突變對於台灣地區婦女罹患乳癌的易感受性是否具有決定性的重要影響等，亦是日後台灣族群的乳癌流行病學研究可以進一步探究的重要線索。

誌謝

本年輕型乳癌婦女的研究期間，多次承蒙馬偕紀念醫院一般外科楊圳隆主任、病理科陳碧芳主任、及耕莘醫院病理部呂福江主任的鼎力協助方得以順利完成，在此特別謹致上由衷感謝。

參考文獻

中文部分

行政院衛生署 (2007)。中華民國九十二年癌症登記報告。台北，台灣：行政院衛生署出版。

張金堅、沈志陽 (1998)。台灣地區乳癌成因研究簡介。生命科學簡訊，12(1)，3-5。

英文部分

Bork, P., Hofmann, K., Bucher, P., Neuwald, A.F., Altschul, S.F., Koonin, E.V. (1997). A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *The Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology*, 11(1), 68-76.

Boulton, S.J. (2006). Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins. *Biochemical Society Transactions*, 34(5), 633-645.

Chao, T.C., Chen, M.F., Wang, C.S., Jan, Y.Y., Hwang, T.L., Chen, S.C. (2003). Small invasive breast carcinomas in Taiwanese women. *Annals of Surgical Oncology*, 10(7), 740-747.

Chen, S.T., Chen, R.A., Kuo, S.J., Chien, Y.C. (2003). Mutational screening of breast cancer susceptibility gene 1 from early onset, bi-lateral, and familial breast cancer patients in Taiwan. *Breast Cancer Research and Treatment*, 77(2), 133-143.

Cheng, S.H., Tsou, M.H., Liu, M.C., Jian, J.J., Cheng, J.C., Leu, S.Y., et al. (2000). Unique features of breast cancer in Taiwan. *Breast Cancer Research and Treatment*, 63(3), 213-223.

Easton, D.F., Ford, D., Bishop, D.T. (1995). Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. The Breast Cancer Linkage Consortium. *American Journal of Human Genetics*, 56(1), 265-271.

Esteller, M., Silva, J.M., Dominguez, G., Bonilla, F., Matias-Guiu, X., Lerma, E., et al. (2000) Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *Journal of the National Cancer Institute* 92(7),

564-569.

- FitzGerald, M.G., MacDonald, D.J., Krainer, M., Hoover, I., O'Neil, E., Unsal, H., et al. (1996). Germ-line BRCA1 mutations in Jewish and non-Jewish women with early-onset breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 334(3), 143-149.
- Friedman, L.S., Ostermeyer, E.A., Szabo, C.I., Dowd, P., Lynch, E.D., Rowell, S.E., et al. (1994). Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. *Nature Genetics*, 8(4), 399-404.
- Futreal, P.A., Liu, Q., Shattuck-Eidens, D., Cochran, C., Harshman, K., Tavtigian, S., et al. (1994), BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinoma. *Science*, 266(5182), 120-122.
- Hall, J.M., Lee MK, Newman, B., Morrow, J.E., Anderson, L.A., Huey, B., et al. (1990). Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science*, 250(4988), 1684-1689.
- Holt, J.T., Thompson, M.E., Szabo, C., Robinson-Benion, C., Arteaga, C.L., King, M.C., et al. (1996). Growth retardation and tumor inhibition by BRCA1. *Nature Genetics*, 12(3), 298-302.
- Hou, M.F., Tsai, K.B., Fan, H.M., Wang, C.Y., Lin, W.C., Liu, C.S., et al. (2000). Familial breast cancer in southern Taiwan. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 16(8), 414-421.
- Jemal, A., Tiwari, R.C., Murray, T., Ghafour, A., Samuels, A., Ward, E., et al. (2004). American Cancer Society: Cancer statistics, 2004 CA: Cancer Journal for Clinicians, 54(1), 8-29.
- King, M.C., Marks, J.H., Mandell, J.B., New York Breast Cancer Study Group. (2003). Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutation in BRCA 1 and BRCA 2. *Science*, 302(5645), 643-646.
- Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1997), Cancer-susceptibility genes: Gatekeepers and caretakers. *Nature*, 386(6627), 761-763.

- Koonin, E.V., Altschul, S.F., Bork, P. (1996). BRCA1 protein products: Functional motifs... *Nature Genetics*, 13(3), 266-268.
- Lacey, J.V. Jr., Devesa, S.S., Brinton, L.A. (2002). Recent trends in breast cancer incidence and mortality. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 39(2-3), 82-88.
- Langston, A.A., Malone, K.E., Thompson, J.D., Daling, J.R., Ostrander, E.A. (1996). BRCA1 mutations in a population-based sample of young women with breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 334(3), 137-142.
- Levy-Lahad, E., Friefman, E. (2007). Cancer risks among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *British Journal of Cancer*, 96(1), 11-15.
- Li, S.S., Tseng, H.M., Yang, T.P., Liu, C.H., Teng, S.J., Huang, H.W., et al. (1999). Molecular characterization of germline mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes from breast cancer families in Taiwan. *Human Genetics*, 104(3), 201-204.
- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K. Tavtigian, S., et al. (1994) . A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 266(5182), 66-71.
- Neuhausen, S.L., Marshall, C.J. (1994). Loss of heterozygosity in familial tumors from three BRCA1-linked kindreds. *Cancer Research*, 54(23), 6069-6072.
- Peto, J., Collins, N., Barfoot, R., Seal, S., Warren, W., Rahman, N., et al. (1999). Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(11), 943-949.
- Thompson, M., Jensen, R., Obermiller, P., Page, D., Holt, J. (1995). Decreased expression of BRCA1 accelerates growth and is often present during sporadic breast cancer progression. *Nature Genetics*, 9(4), 444-450.