

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

台灣地區影響乳癌發生之相關因素之研究-探討 X 染色體不隨機不活化現象及 Xq25 區域發生 LOH 與乳癌發生的關聯性

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2320-B-018-002-

執行期間：93 年 08 月 01 日至 94 年 07 月 31 日

執行單位：國立彰化師範大學生物學系

計畫主持人：簡一治

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 10 月 31 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

(計畫名稱)

台灣地區影響乳癌發生之相關因素之研究-探討 X 染色體不隨機不活化
現象及 Xq25 區域發生 LOH 與乳癌發生的關聯性

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 93-2320-B-018-002

執行期間：93 年 8 月 1 日至 94 年 7 月 31 日

計畫主持人：簡一治

共同主持人：

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：國立彰化師範大學

中 華 民 國 94 年 8 月 1 日

【摘要】

本實驗共研究 79 位乳癌病患，針對其 Xq25 上 LOH 現象，及 X 染色體非隨機的不活化模式作探討。發現國人乳癌病患 Xq25 上發生 LOH 現象極高(佔 69.23%)，相較於其他癌症則較低($p=0.006$)，顯示 Xq25 上可能存在的腫瘤抑制基因對乳癌有直接的影響，但不直接影響肝癌或胃癌的發生，可推測 Xq25 上有抑制乳癌發生的專一基因存在，其中用來探測 Xq25 的缺失的微衛星標記，以 DXS1047 在區分對乳癌與其他癌症發生有無 LOH 的項度上最顯著($p=0.08$)。在探究 X 染色體不活化模式作方面，發現腫瘤組織 Xq25 上有 LOH，則其 X 染色體不活化現象傾向於非隨機的模式，若發生 LOH 及非隨機不活化的 X 染色體恰巧為同一條染色體，則此乳癌病患完全符合二次衝擊理論，則更能推斷 Xq25 處有腫瘤抑制基因的存在。另外在文獻 (Piao et al. 2002) 中指出 Xq25 上 DXS8098 區有 LOH 的現象時，乳癌患者臨床病徵較嚴重，且腋窩淋巴結轉移的機率也較高，但在研究國人 Xq25 區上有 LOH 的現象時，發現 DXS8098 發生 LOH 的現象不高(僅佔 28.2%)，反而是微衛星標記 DXS1047 發生 LOH 的現象較高(佔 47.3%)，且先前發現 DXS1047 有無 LOH 與乳癌發生有專一性，所以推測在 Xq25 鄰近 DXS1047 上極可能含有對乳癌發生直接影響的基因存在；再加入乳癌病患臨床病理檢驗結果，發現 DXS1047 有發生 LOH，其腫瘤分級較高，症狀較嚴重，所以可作為臨床上癒後的標記。但若能進一步搜尋鄰近 DXS1047 的微衛星標記，應更能精確夾擊出國人特异性的腫瘤抑制基因，且可作為偵測乳癌專一性的標記及癒後的標記。

關鍵詞: 乳癌；X 染色體非隨機不活化；LOH

【前言】

雄性的性染色體為 XY，而雌性的性染色體則為 XX，這是在雄性和雌性染色體組成上最主要的差異，為了消弭性染色體上的差異所造成基因表現量的不同，衍生出來的劑量補償作用則能夠確保 X 染色體上的基因在雄性和雌性具有相等的表現量。不過劑量補償作用在不同的生物體有不同的呈現機制：在果蠅 *Drosophila melanogaster* 中，雄果蠅的單一 X 染色體上的基因可以表現出兩倍的轉錄活性，相較於雌果蠅的兩條 X 染色體，則具有補償的作用，可以達到相等的表現量；然而在線蟲 *Caenorhabditis elegans* 中，減半屬於 XX 的個體其 X 染色體上基因的轉錄活性，亦可以達到補償的作用；另外在哺乳類動物中，使用的劑量補償機制則是作用在雌性的兩條 X 染色體上使其中的一條 X 染色體不活化，而另外一條活化的 X 染色體則經由有絲分裂不變地遺傳下去(Lyon et al.1961; Heard et al. 1997)。

在雌性的哺乳類動物中，造成其中一條 X 染色體不活化(X chromosome inactivation--XCI)的過程可以分為隨機(random)和刻印(imprinted)兩種方式，其中有袋類動物是屬於刻印的 X 染色體不活化現象，主要是來自於父親的 X 染色體會不活化(Sharman 1971; Takagi et al. 1975)；另外真獸類則是屬於隨機的 X 染色體不活化現象，也就是形成的組織是屬於鑲嵌型的，幾乎會有一半的細胞活化的 X 染色體來自於父親，另外一半的細胞則是來自於母親，其比值理論上等於 1:1，稱做 Lyonization (Brown 1996; Heard et al. 1997)。

至於促使其中一條 X 染色體不活化的現象主要是發生在胚胎發育的早期階段，而調控的機制，則是根據位在 X 染色體不活化中心(Xic)上的標記(Brown et al. 1991)，在 Xic 上的標記包括一個無法轉譯的順式調節基因 *Xist* (Brown et al. 1991) 以及在下流地區有它的反

義基因 *Tsix* (Lee et al. 1999)，而造成 X 染色體不活化就是因為這一條 X 染色體上有 *Xist* RNA 的累積，相對地，*Tsix* 的作用則是會抑制 *Xist* RNA 的累積所產生的不活化現象。不過，轉錄形成的 *Xist* RNA 只能說是啟動 X 染色體不活化的開端，至於將不活化的訊號傳遞至整條 X 染色體則是依賴 X 染色體上的 long interspersed element (LINE)-1(L1)，L1 elements 為哺乳類動物所特有的重複序列而且相較於其他常染色體，在 X 染色體上富含兩倍的 L1 elements，L1 elements 高度集中在 Xq13-Xq21，次要集中的區域為 Xq22, Xq24-Xq25 以及 Xq27，至於 L1 elements 的功能主要是促使並且推進轉錄形成的 *Xist* RNA 能夠有效地使整條 X 染色體處於不活化的狀態(Jeffrey et al. 2000)。Chao et al. (2001)提出較完整的調控模式，指出 *Tsix* 上的 DXPas34 為轉錄調節因子 CTCF 的結合區域，如果 CTCF 與 DXPas34 結合，則會促使 *Tsix* 的表現，進而抑制 *Xist* 的轉錄，此時不會形成 *Xist* RNA 的累積，所以這一條 X 染色體是活化的；相反地，如果 CTCF 無法與 DXPas34 結合，則 *Tsix* 就不會表現，也就是 *Xist* 會轉錄形成 RNA，而形成的 RNA 會累積、包裹在這一條 X 染色體上，造成該染色體的不活化。所以，在屬於刻印的 X 染色體不活化現象的有袋類動物中，個體在胚胎發育的早期階段應該會有一個“maternal protective factor”，使 CTCF 專門與來自於母親的 X 染色體結合，維持該染色體的活化，而另外一條來自於父親的 X 染色體上的 *Xist* 就會作用，轉錄形成的 RNA 會藉由 X 染色體上 L1 elements 的協助而累積在這一條染色體上使其不活化；相對地，屬於隨機的 X 染色體不活化模式的真獸類，則是在胚胎發育的早期階段應該會有一個“blocking factor”(Avner et al. 2001)，促使 CTCF 隨機地與任一條 X 染色體結合，進而維持這一條 X 染色體處於活化的狀態，至於另一條 X 染色體則會有 *Xist* RNA 的累積使其不活化。

不過真獸類的 X 染色體不活化模式，應該說幾乎是屬於隨機的方式，因為以人類來說，大部分的女性其 X 染色體不活化的模式是屬於隨機的，但是仍然有少部分的女性是屬於非隨機的 X 染色體不活化現象(也可以稱做歪斜或不等於 Lyonization)，舉例來說，Gale et al. (1991)針對英國婦女的研究，指出有 23 %的婦女屬於 X 染色體非隨機的不活化現象；Buller et al. (1999)指出在美國(愛阿華州)正常婦女有 33 %屬於 X 染色體非隨機的不活化現象；Naumova et al. (1996)亦針對美國(費城) 365 個正常婦女的研究指出當界定標準是以其中一個 allele 有 75 %的表現為歪斜現象的臨界值時，大約有 32 %的婦女屬於 X 染色體非隨機的不活化現象。至於 X 染色體非隨機的不活化現象目前廣泛地被研究，並指出 X 染色體非隨機不活化現象與 X-linked 的隱性疾病以及某些癌症的發生有關。

在一般情況下，X-linked 的隱性疾病主要是對男性有影響，但是根據一些研究指出屬於 X 染色體非隨機不活化現象的攜帶者婦女亦容易罹患 X-linked 的隱性疾病，Wiskott-Aldrich syndrome (Parolini et al. 1998)、Hunter's syndrome (Clarke et al. 1991)、hemophilia (Nisen et al. 1989)、Duchenne's muscular dystrophy (Azofeifa et al. 1995)、Borjeson-Forssman-Lehmann syndrome (Kubota et al. 1999)以及 Lesch-Nyhan syndrome(Aral et al. 1996)等 X-linked 的隱性疾病均有研究指出與 X 染色體非隨機的不活化現象有關。

根據 Knudson 提出的假設，癌症的發生必須符合二次衝擊理論(Knudson 1971; Knudson 1993)，針對遺傳性的癌症來看，第一次衝擊可能是遺傳到父親或母親突變的腫瘤抑制基因，而第二次衝擊則是相對的正常基因發生突變或是有 LOH 的現象；至於初發型的癌症，第一次衝擊可能是腫瘤抑制基因有 LOH 的現象或是發生突變，而第二次衝擊則是相對的正常基因再次突變，兩次衝擊發生的順序亦可顛倒，所以也就是指必須兩個對偶基因完全

喪失功能，才可能引發癌症。至於屬於 X 染色體非隨機不活化現象的婦女，可以說組織中幾乎所有的細胞活化的 X 染色體均來自於父親或母親，所以被認為與 LOH 具有相等的意義與功能；不管就遺傳性或初發型的癌症來看，屬於 X 染色體非隨機不活化現象的婦女，等於是已經有了一次的癌化衝擊，至於另外一次的衝擊在遺傳性的癌症可能是活化的 X 染色體上遺傳自父親或母親突變的腫瘤抑制基因，而在初發型的癌症，則是在活化的 X 染色體上的腫瘤抑制基因有 LOH 的現象或是發生突變；相對地，屬於 X 染色體隨機不活化現象的婦女，因為組織中幾乎有一半的細胞活化的 X 染色體來自於父親，另外一半的細胞活化的 X 染色體來自於母親，所以必須要有兩次的癌化衝擊，組織才會完全失去 X 染色體上腫瘤抑制基因的功能而引發癌症(Buller et al.1999)。

所以偵測女性個體 X 染色體不活化的模式是屬於隨機的或非隨機的現象，可能可以當作婦女是否容易罹患癌症或 X-linked 的隱性疾病的指標，因為不活化的 X 染色體具有異染色體的特色，包括高度甲基化、低乙酰化、染色體結構緊縮以及複製時間遲緩等現象(Migeon 1994; Willard et al. 1993)，在細胞遺傳學方面我們可以藉由偵測 X 染色體複製的時間來判斷染色體是否處於活化的狀態；至於在分子生物學方面，則可以藉由偵測 DNA 甲基化的情形，來區別活化與不活化的 X 染色體，不活化的 X 染色體有甲基化，相反地，活化的 X 染色體則沒有甲基化(Brown 1996)。也就是說能夠用來偵測 X 染色體不活化模式的指標必須具備兩種條件，第一個條件是必須能夠區分出哪一條是來自於父親的 X 染色體(Xp)或母親的 X 染色體(Xm)，所以必須在族群中具有高度的多型性，第二個條件是能夠區別出活化的 X 染色體(Xa)和不活化的 X 染色體(Xi)(Busque et al. 1996)。在 X 染色體上可以利用 DNA 甲基化的程度來區別活化的 X 染色體和不活化的 X 染色體的基因有 phosphoglycerate kinase (PGK)、hypoxanthine phosphoribosyl transferase(HPRT)、DXS255 (M27β)和 human androgen receptor (HUMARA)。這些基因均有相關研究用來偵測 X 染色體不活化的模式，不過以 HUMARA 廣泛被使用(Busque et al. 1996; Parolini et al. 1998; Buller et al. 1999; Uehara et al. 2001; Chuaqui et al. 2001)，因為 HUMARA 在 exon 1 的區域有 CAG 的重複序列，在相異的個體其重複次數不盡相等，是具有高度多型性的基因(90 % heterozygosity)；而且在 CAG 重複序列上游有甲基化敏感限制內切酵素 *HhaI* 的辨識區域 GCGC，所以可以根據 GCGC 是否有甲基化的現象，判斷 X 染色體的活化與不活化的情形。

至於偵測 X 染色體不活化的模式在目前學術界的研究常被用來判斷腫瘤的來源是屬於 polyclonality 或 monoclonality 的情形(Fey et al. 1992; Kattar et al. 1997; Walsh et al. 1998)，因為如果腫瘤的形成是由一個細胞癌化之後不斷地增生而形成腫瘤，該腫瘤的所有細胞其活化的 X 染色體則均來自於父親或母親，所以被認為 X 染色體不活化的模式一定屬於非隨機的情形，但是如果腫瘤是由兩個以上不同的細胞受到癌化之後不斷地增生而形成腫瘤，該腫瘤的所有細胞其活化的 X 染色體就有可能平均來自於父親與母親，所以被認為 X 染色體不活化的模式一定是屬於隨機的情形。也就是說如果是屬於隨機的不活化模式則表示腫瘤的來源是屬於 polyclonality，而屬於非隨機的不活化模式則表示腫瘤的來源是屬於 monoclonality，不過這是針對在相對的正常組織是屬於 X 染色體隨機的不活化情形時所做的解釋。但是當相對的正常組織是屬於 X 染色體非隨機的不活化情形時，作者並沒有辦法針對腫瘤組織 clonality 的情形做出正確的解釋，也就是說事實上正常組織是屬於 polyclonality 的情形，但是偵測出的 X 染色體不活化模式卻是屬於非隨機的情形，這是在觀念上兩相衝突的事實，所以也有可能相衝突的事實會發生在腫瘤組織的偵測上，所以對

於是否適合利用 X 染色體不活化的模式來判斷腫瘤組織是屬於 polyclonality 或 monoclonality 的情形則是存有質疑的。除此之外，因為 X 染色體非隨機的不活化現象相對於隨機的情形，根據癌症發生的二次衝擊理論，確實會有較高的機率造成癌症的發生，所以除了先天性屬於 X 染色體非隨機不活化現象的個體有較高的機率罹患癌症之外，後天的刺激而造成個體(組織)X 染色體不活化的模式轉變成非隨機的情形是否也有較高的可能性會造成癌症的發活化的模式並且與鄰近的正常組織做比較，不過則是往 X 染色體不活化的模式與腫瘤形成的關係做探討。

因此，本計劃擬就此分兩部分探討，第一部份的目的是想瞭解 X 染色體非隨機的不活化現象與乳癌的發生是否相關以及進一步確認是否可以直接從血液中偵測罹患乳癌的危險性，實驗方式則是比較乳癌患者與正常對照組其血液 DNA 的 X 染色體非隨機的不活化現象是否有顯著差異；第二部分則是要尋求 X 染色體非隨機的不活化現象與乳癌腫瘤的形成是否有關，並進一步與其他癌症(肝癌、胃癌)比較，瞭解 X 染色體非隨機的不活化現象在乳癌和其他癌症間的影響力，實驗方式則是比較乳癌患者腫瘤組織和鄰近正常組織其 X 染色體不活化的模式，並且與其他癌症比較是否有顯著差異。

已知乳癌是女性最常見的惡性腫瘤之一，經統計每經過一分鐘，全球就多了一位乳癌患者，所以針對乳癌的相關研究將日趨重要。研究乳癌發生的相關文獻中也指出腫瘤細胞染色體中 1q,6q,7q,8p,9q,11p,13q,17q,18q 發生 LOH 的現象，顯示出該處發生 LOH 的染色體位置上有腫瘤抑制基因的存在。(reviewed in Devilee et al.,1994; Kerangueven et al., 1997)。

至於在 X 染色體上是否有腫瘤抑制基因的存在，最近幾年均有針對 X 染色體上是否有 LOH 現象的研究發表：Choi et al. (1997)指出在卵巢癌患者中 X 染色體上的 Xq25-q26.1 有 LOH 的現象；Choi et al. (1998)在針對乳癌的研究中發現 30 % 的患者在 Xp22.2-p22.13 以及 23.1 % 的患者在 Xq26.1-q27.1 有 LOH 的現象；Buekers et al. (2000)在卵巢癌的患者中發現有 40 % 在 Xp22.3-p23 有 LOH 的現象，且此 LOH 似乎於 germline *BRCA1* 的突變有關；而 Piao et al. (2002)發現在乳癌患者中在 Xq25 有高頻率的 LOH 的情形(其中在 DXS8098 的 LOH 更高達 52.4%)，這些研究結果均指出 X 染色體上應該有一個或一個以上的腫瘤抑制基因存在。

Piao et al. (2002) 提出能藉由偵測 Xq25 上 DXS8098 區有無 LOH，來斷定乳癌病患其未來腫瘤可能的情形(包括腫瘤大小、腫瘤組織型態分級、腋窩淋巴結轉移的機率)，即能藉由偵測 Xq25 上 DXS8098 區有無 LOH，來斷定乳癌病患其未來腫瘤可能的情形(包括腫瘤大小、腫瘤組織型態分級、腋窩淋巴結轉移的機率)，也就是說 Xq25 上 DXS8098 是很好的癒後標記。

這便提供國人乳癌病人一項極好的訊息，若能藉由偵測 Xq25 上 DXS8098 區有無 LOH，將病患腫瘤轉移機率做為區分，則可依其情形做出正確的癒後治療，腫瘤轉移機率高的能做較密集的追蹤及治療，宜免其癌症復發的危機；腫瘤轉移機率極低的，則可不需受較多治療的痛苦及煎熬。這可說是乳癌病患的一項福音，但回頭想想這篇報告的研究對象，完全是以外國人為檢體，他的這項研究真能運用在國人身上嗎?是否因為種族的基因差異而有所不同呢?或是我國人 X 染色體上腫瘤抑制基因的位置並非在 Xq25 上 DXS8098 區，而是有所偏移而在其附近呢?這種種的疑問促使我想研究國人乳癌病患 Xq25 上 DXS8098 或附近區域其 LOH 的機率是否真實偏高，及有 LOH 現象時是否與腫瘤的轉移及增生有關，並分析其作為國人乳癌癒後標記的可行性。此外，值得一問的是此 Xq25 上

之 LOH 現象是否於 X 染色體非隨機的不活化現象有相關性及其缺失的是否就是活化的 allele，若是則可進一步證明 X 染色體非隨機的不活化現象與乳癌腫瘤的形成是否有關。

因此，就此本計劃擬進一步探討國人乳癌病患 Xq25 上 DXS809 或附近區域其腫瘤 LOH 的頻率，進而分析此 LOH 與 X 染色體非隨機的不活化現象。

【實驗動機及目的】

根據 89 年度，衛生署統計台灣婦女癌症發病率的報告，顯示乳癌已躍居第二位；而在過去，許多與家族性乳癌的相關研究也紛紛問世，並且均報導其發病的原因主要與 Breast Cancer gene *BRCA1*、*BRCA2* 的突變有關 (Miki et al., 1994; Couch et al., 1996)；根據 Breast Cancer Linkage Consortium 針對 237 breast-ovarian cancer families 的研究結果，也顯示其中 57% 與 *BRCA1*、32% 與 *BRCA2* 有關 (Ford et al., 1998)。不過最近的研究報導卻指出家族性乳癌與 *BRCA1* gene、*BRCA2* gene 的相關性也許並沒有當初所認定的如此相關。舉例來說，在芬蘭地區，針對家族性乳癌患者的研究，僅發現乳癌的引發 10% 與 *BRCA1*、11% 與 *BRCA2* 的突變有關 (Vehmanen et al., 1997)；同樣地，在瑞典南部的研究報告也指出與 *BRCA1*、*BRCA2* 的相關性也僅佔 23% 及 11% (Hakansson et al., 1997)；在台灣，Chen et al. (2003) 曾針對中部地區 56 個乳癌病人，包含 young breast cancer (23 samples) 的腫瘤組織與鄰近正常組織、bilateral breast cancer (7 samples) 的血液、familial breast cancer (26 samples) 的血液進行研究，利用 PCR、定序的方式尋找 *BRCA1* 的突變情形，結果僅有一個 mutation (2845Asn→Ile) 發現於一位病患中且為攜帶者 (占 1.8%) 以及兩個病患有 LOH 的現象 (占 3.6%)，針對這樣的結果，初步推論則認為台灣中部地區乳癌的引發與 *BRCA1* 基因變異的相關性不大。Li et al. (1999) 用 SSCP 的方法針對南台灣的乳癌病人尋找 *BRCA1* 的突變也僅找到 2 個突變 (16%)。此外，Shen et al. (2000) 針對台灣地區乳癌組織作全面性基因體 LOH 的分析發現 LOH 頻率發生最高處在於一些已知的腫瘤抑制基因，例如 p53 (17p12-13), E-cadherin (16q22.1), and ATM (11q22-23)，而 *BRCA1* 的 LOH 頻率則是中度或低度，所以綜合以上三篇研究報告，*BRCA1* coding region 的突變對於台灣族群乳癌的發生不論是初發型及遺傳型的貢獻是不多的。所以，由這些研究報告似乎說明了一件事「用來解釋家族性乳癌的起因，不應該只是侷限於兩個主要的基因 *BRCA1*、*BRCA2*」；所以對於找尋其他相關的 breast cancer susceptibility gene 是目前相當重要的目標之一。

為了想進一步瞭解乳癌發生的機制，試圖探討乳癌病患腫瘤組織的基因上是否有的共同突變，進而導致此癌症之發生，統計數字顯示乳癌患者通常以女性為多，而男女基因上唯一不同的是性染色體，所以想針對女性的 X 染色體作為研究題材。

會縮小範圍在 Xq25 是因在前人的研究中發現癌症病患中，X 染色體上常有缺失。包括 Choi et al. 發現 Xq25 的缺失與卵巢癌有關 (Choi et al. 1997)；另外 Piao et al. (2002) 提出的報告，也發現乳癌病患中 52.4% 的人 Xq25 上 DXS8098 都有 LOH 的現象。因而選定 Xq25 區域更小的七個微衛星位點，來確定並縮小 LOH 的範圍，並希望找出其中包括腫瘤抑制基因，找出作為乳癌提早偵測及癒後的標記。

Piao et al. (2002) 實驗提出能藉由偵測 Xq25 上 DXS8098 區有無 LOH，來斷定乳癌病患其未來腫瘤可能的情形 (包括腫瘤大小、腫瘤組織型態分級、腋窩淋巴結轉移的機率)，也就是說 Xq25 上 DXS8098 是很好的癒後標記。這便提供國人乳癌病人一項極好的訊息，

若能藉由偵測 Xq25 上 DXS8098 區有無 LOH，將病患腫瘤轉移機率做為區分，則可依其情形做出正確的癒後治療，腫瘤轉移機率高的能做較密集的追蹤及治療，宜免其癌症復發的危機；腫瘤轉移機率極低的，則可不需受較多治療的痛苦及煎熬。這可說是乳癌病患的一項福音，但這項研究真能運用在國人身上嗎？是否因為種族的基因差異而有所不同呢？

或是我國人 X 染色體上腫瘤抑制基因的位置並非在 Xq25 上 DXS8098 區，而是有所偏移而在其附近呢？這種種的疑問促使我想研究我國人乳癌病患 Xq25 上 DXS8098 區其 LOH 的機率是否真實偏高，及有 LOH 現象時是否與腫瘤的轉移及增生有關，並分析其作為國人乳癌癒後標記的可行性。

另外，依據 Kundson 提出癌症的二次衝擊理論，衍生出想法若乳癌病患某一條 X 染色體 Xq25 發生 LOH 的現象，又恰巧此染色體為活化的 X 染色體，則此乳癌病患完全符合二次衝擊理論，如此便更能加以推斷 Xq25 處有腫瘤抑制基因的存在。

【實驗材料與方法】

一、 研究對象

本實驗共研究 79 位乳癌病患，年齡範圍為 27~74 歲，平均年齡 51.92±8.93 歲，其組織樣本是取自於彰化基督教醫院。而其他癌症病人共研究 28 位，其中肝癌病患佔 10 位、胃癌病患佔 11 位及肺癌病患佔 7 位，其組織樣本在彰化基督教醫院及台中榮民總醫院蒐集而得。在病人接受手術開刀後，取得其切除的腫瘤組織和相同部位的正常組織，組織在取得後立即保存於 -70 °C 或液態氮之中。

二、 萃取組織的 DNA

1. 每 50~100 g 的組織需加入 1 ml 的 GenoMaker(GenoPure)，完全均質（將組織加入液態氮中，等到完全冰凍後，再加以研碎磨碎，將碎屑刮下至微離心管中，加入適當的 GenoMaker，再以研碎棒磨充分磨碎混合）後，靜置於室溫下 3~5 分鐘。
2. 加入 500 μ l chloroform 上下混合均勻後，離心 5 分鐘(12,000 x g 室溫)
3. 離心之後混分成上下兩層，吸取上層液轉移至新的微離心管，加入 1 volume 的 isopropanol (~0.8 μ l)，混合均勻後在 12,000 x g、室溫下離心 5 分鐘。
4. 倒掉上清液，加入 1 ml 70% 酒精清洗兩次，真空乾燥，加入 100 μ l ddH₂O 溶解。

三、 偵測我國人 Xq25 上有無 LOH 的現象

1. 微衛星 DNA 標記分析

本實驗選擇 X 染色體上 Xq25 的微衛星標記 (microsatellite marker)，微衛星不穩定性也代表了腫瘤細胞在形成過程中基因組不穩定的現象之一。故可利用微衛星 DNA 片段長度的變異，當作偵測腫瘤細胞的標記 (marker)。選擇良好的微衛星 DNA 標記：應先取得微衛星相關的資料包括引子 (Primer) 序列，能從基因資料庫 (The Genome Database 網址 <http://gdbwww.gdb.org>) 中取得。

- (1) primer 在其中一股 5' 端加上螢光標記，可以使用 FAM、HEX、NED 任一種。
- (2) 在 Xq25 區域上，選擇其上十一個微位星區域分析 LOH，其 primer 序列可參照(表一)。

2. 進行聚合酵素連鎖反應 (PCR)，及微衛星分析

將取自同一病人的腫瘤組織 DNA、正常組織 DNA、分別進行聚合酵素連鎖反應(PCR)，總體積 20 μ l，包括下列成分：100 ng template DNA、0.5 unit AmpliTag Gold DNA 聚合酵素(Perkin-Elmer, Roche Molecular System, Inc.)、50 mM 的 KCl、2 mM 的 MgCl₂、10 mM 的 Tris-HCl(pH8.3)、200 μ M 的 dNTP 及 15 pmole 的個股 primer。PCR 反應是在 9600 thermal

cycler (Perkin-Elmer/Cetus) 儀器中進行。

週期數及反應時間為：95 °C 維持 10 分鐘；在 96 °C 進行 denaturation 10 秒鐘，在 55 °C 進行 annealing 30 秒，在 70 °C 進行 extension 1 分鐘，以此進行 30 個循環；之後維持在 70 °C 10 分鐘，保持於 4 °C。

3. 進行毛細管電泳分析

將從同一癌症病人的腫瘤組織 DNA、正常組織 DNA 所增量後的 PCR 產物先以 2% 的 agarose gel 進行電泳分離，經 ethidium bromide 浸染後，以 UV 光照射，並以影像處理軟體 (Scientific Imaging Systems, Kodak Digital Science™) 分析增量後之 PCR 產物，進行初步的定量。再調整腫瘤組織 DNA、正常組織 DNA PCR 產物之體積，使兩者間的 PCR 產量約略相等，在 96 孔盤中分別加入各種不同的 PCR 產物混合液，並於每個孔中加入 12 μl 的 Hi-Di Formamide 和 0.25 μl 的 internal size standard (Applied Biosystems)，此 standard 是使用 ROX 螢光標記的 GeneScan-350 「ROX」。將含有混合溶液的 96 孔盤置於 GeneAmp PCR System 2700 或 9600 thermal cycler (Perkin-Elmer/Cetus) 儀中，於 95 °C 下加熱 3 分鐘後，立即置於冰上 5 分鐘，再以 ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Corp.)，進行毛細管電泳，以自動化雷射掃描的方式去偵測 DNA 片段的螢光強度。

4. 定量分析

使用 GeneScan 自動化 DNA 片段分析軟體 Abl PRISM 3100 GeneScan 3.1 software (Applied Biosystems Corp.) 進行分析。比較腫瘤組織及正常組織中的微衛星 DNA 片段的波峰 (peak) 出現的位置及相對的螢光強度是否相同，internal size standard 可提供 GeneScan 軟體做最正確的 DNA 片段大小判讀，以了解腫瘤組織是否具有微衛星不穩定性或對偶基因異結合型的缺失。

而根據 peak 高度 (相對螢光強度) 的數據，即可分別計算出對偶基因異結合型病人的正常組織和腫瘤組織的對偶基因比例 (allele ratio)。其計算方法為 $\text{allele ratio} = \text{peak height of the smaller allele} / \text{peak height of the larger allele}$ ，得到正常組織和腫瘤組織的對偶基因比例數值之後，即可計算 Q^{LOH} 值，其計算方法為 $Q^{\text{LOH}} = \text{tumor allele ratio} / \text{normal allele ratio}$ ，即 $Q^{\text{LOH}} = (T_1/T_2) / (N_1/N_2)$ 。其中， T_1 、 N_1 分別代表在腫瘤 DNA 和正常組織 DNA 中微衛星片段較小的對偶基因之 peak 高度； T_2 、 N_2 分別代表在腫瘤 DNA 和正常組織 DNA 中微衛星片段較大的對偶基因之 peak 高度，如果 Q^{LOH} 數值 ≤ 0.75 或 ≥ 1.33 ，則界定為腫瘤 DNA 具有 LOH 的現象。

四、偵測 X 染色體不活化現象的方法指標

1. HUMARA 基因標記分析

本實驗選擇 X 染色體上的 androgen receptor (HUMARA) gene 當作偵測 X 染色體不活化模式的指標，因為在 HUMARA exon1 的區域有 CAG 的重複序列，而重複的次數在不同個體中不盡相同，所以可以用來區別哪一條是來自於父親的 X 染色體或母親的 X 染色體；另外在 CAG 重複序列的上游有甲基化敏感限制內切酵素 *HhaI* 的辨識區域 GCGC，因為甲基化的現象會影響 HUMARA gene 的表現，也就是說如果有甲基化的情形，就表示 HUMARA gene 無法被轉錄出來，而這一條 X 染色體就是處於不活化的狀態；相反地，如果沒有甲基化的現象，HUMARA gene 就能夠被轉錄出來，所以 X 染色體是處於活化的狀

態。由此我們可以經由測試 HUMARA gene 上的 GCGC 是否有甲基化的情形，來判斷 X 染色體是處於活化還是不活化的狀態。

首先進行限制內切酵素的處理，限制內切酵素 *HhaI* (GCGC)，此酵素可以辨認甲基化敏感區域 (GCGC) 在沒有甲基化的情況下可進行切割。針對每一個測試的樣本取 200 ng 的 DNA 和 10 U 的 *HhaI* 在 37 °C 下處理 12 小時，再放到 95 °C、10 分鐘以終止反應；最後經由 MultiScreen-PCR (96-Well Filtration System, MILLIPORE) 純化 DNA，再以 20 μl distilled water 溶解 DNA。同時每一個測試的樣本都有一個自身的對照組，也就是在沒有加入 *HhaI* 的情況下經過相同的處理。

2. 聚合酵素連鎖反應 (PCR)

20 μl 的 PCR 反應包含 5 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM NaCl, 0.01 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 5% glycerol, 0.1 % Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂, 0.25 mM dNTP, 4 picomoles of primers, 10 μl digested-purified DNA or undigested-purified DNA, and 0.5 units of Ampli-Taq Gold DNA polymerase。PCR 的反應進行則於 GeneAmp PCR System 2700 or 9600 thermal cyclers (Perkin-Elmer/Cetus)，反應條件同上。

Primer 名稱	序列	標定
A R-F	5'-TCC AGA ATC TGT TCC AGA GCG TGC-3'	Ned
A R-R	5'-GCT GTG AAG GTT GCT GTT CCT CAT-3'	

3. 進行毛細管電泳分析 同上

4. 定量分析

選擇屬於 heterozygote 的婦女，經由計算 HUMARA amplicon peak 的 area 比例，以判定 X 染色體的不活化情形是屬於隨機的或非隨機的。根據的公式為：

$$\text{Modified allelic cleavage ratio (CR)} = \frac{\text{smaller peak area ratio (digested/undigested)}}{\text{larger peak area ratio (digested/undigested)}}$$

出現大小不一的二個 peak 代表 HUMARA 的二個 alleles，如果 X 染色體的不活化現象是隨機的，根據 Lyon hypothesis，計算出來的比值(CR)應該是 1.0，所以如果比值(CR)大於 1 或小於 1 就表示 X 染色體不是屬於隨機的不活化現象(圖 1a，藍色 peak 為限制酵素切除前的二個 alleles；綠色 peak 為限制酵素切除後的二個 alleles)，不過根據一些研究指出，多少會有程度不等的歪斜現象產生(Buller et al. 1999)，所以設定比值(CR)大於 3 或小於 0.33 為臨界值是目前廣泛被接受的標準，可以用來確定 X 染色體是屬於非隨機的不活化現象(圖 1b，藍色 peak 為限制酵素切除前的二個 alleles；綠色 peak 為限制酵素切除後的二個 alleles)。

五、統計分析

以上資料皆使用卡方考驗分析(Chi-square test)、費雪正確機率考驗(Fisher's exact probability test)及耶慈氏校正(Yate's correction for continuity)進行統計分析。

【實驗結果與討論】

一、微衛星標記的異結合型比例

本實驗選擇使用在 Xq25 上的七組含二個核苷酸重複的微衛星標記進行分析，由於 X 染色體其對偶基因之微衛星標記核苷酸重複次數可能會相等，稱為同結合型，此時經過以 ABI3100 autosequencer (GeneScan Analysis software)偵測，兩條 X 染色體出現的微衛星 DNA

片段的波峰 (peak) 出現的位置相同，因此螢光強度相互覆蓋，因此無法利用此微衛星標記無法區分並比較出兩條 X 染色體的不同，無法進行 LOH 分析 (如：圖一中的 c 圖)。所以必須在個體中呈現異結合同型 (圖一的 a 圖及 b 圖)，才能進行 LOH 的分析。

經實驗結果得知這十一組微衛星標記 **DXS8067**、**DXS1001**、**DXS8059**、**DXS8098**、**DXS8009**、**DXS8068**、**DXS1047**、**DXS8078**、**DXS8071**、**DXS8041**、**DXS8074** 在台灣族群中的異結合同型比例(圖二)，發現 **DXS8067**、**DXS8078**、**DXS8071** 異結合同型比例的太低，分別為 44.6%、33.9%、22.4%，在台灣不適合用來當做尋找 LOH 的偵測標記，應另行尋找鄰近的微衛星標記作進一步的確認，以尋求是否有腫瘤抑制基因。

另外微衛星標記 **DXS1001**、**DXS8098**、**DXS8009**、**DXS8068**、**DXS1047**、**DXS8041** 其異結合同型比例則是超過 70%，算是有相當高的偵測率，因此可利用這七組微衛星標記進一步分析其在乳癌中發生 LOH 現象的比例。

二、 微衛星標記在乳癌腫瘤組織發生 LOH 的比例

選擇個體中呈現異結合同型 (圖一的 a 圖及 b 圖) 進行 LOH 的分析。而根據 peak 高度 (相對螢光強度) 的數據，比較腫瘤組織及正常組織中的微衛星 DNA 片段的波峰 (peak) 出現的位置及相對的螢光強度是否相同，(由 GeneScan 軟體判讀)，根據 peak 高度 (相對螢光強度) 的數據，即可分別計算出對偶基因異結合同型病人的正常組織和腫瘤組織的對偶基因比例 (allele ratio)，之後設定臨界值 Q^{LOH} 數值 ≤ 0.75 或 ≥ 1.33 ，界定為腫瘤 DNA 具有 LOH 的現象。例如(圖一)的 a 圖，樣本 B40 的 Q^{LOH} 數值等於 1.20，則不具有 LOH 的現象；而 b 圖樣本 B44 的 Q^{LOH} 數值等於 1.86，則具有 LOH 的現象。

本實驗用來偵測 Xq25 是否有缺失，所使用的十一組微衛星 DNA 標記(圖三)，在分析 36 位乳癌病患後所呈現的結果(圖四)。可以發現有五位乳癌病患(B44、B129、B307、B320、B323)，用此十一組微衛星標記偵測，扣除白色色塊(代表此微衛星標記呈現同結合同型無法分析)，只要是呈現異結合同型者皆有 LOH 的現象發生，代表這五位乳癌病患整條 Xq25 區域皆缺失，其他 40 位病患則在 Xq25 上有局部缺失，20 位乳癌病患 Xq25 的七組微衛星標記呈現異結合同型者，皆無偵測到 LOH 的現象發生。

在乳癌病患腫瘤組織和正常組織中，利用這十一組微衛星標記進行 LOH 的分析 (圖四)，最右邊縱軸代表此微衛星 DNA 標記，在乳癌病患腫瘤組織具有 LOH 現象的百分比，為腫瘤組織具有 LOH 現象的病患人數除以在該微衛星 DNA 標記呈現異結合同型的肝癌病患人數，經統計分析得知各個微衛星標記，在我國人乳癌患者腫瘤組織中 X 染色體 Xq25 上發生 LOH 現象極高，尤其以 DXS1047 最高有 47.2%，DXS8067 次之佔 44.83%，但由於 DXS8067 異結合同型比例在本研究中的乳癌病患中比例極低，所以可能造成統計上的誤差。本研究乳癌患者 X 染色體 Xq25 使用的十一種為衛星標誌並能有效夾擊到此腫瘤抑制基因 DXS1047 附近，找出國人特異性的 X 染色體的 LOH。

三、 十一組微衛星標記在乳癌及其他癌症腫瘤組織發生 LOH 的比

運用此十一組微衛星標記針測乳癌病患腫瘤組織中 Xq25 上發生 LOH 的比例，發現 LOH 的比例相當高幾乎均大於 30%，其中又以 DXS1047 最高有 47.2%，DXS1001 次之佔 44.83%；相較於其他癌症的研究中所使用的微衛星標記其 LOH 比例幾乎均小於 32%(圖三)，顯示這些微衛星標記附近的基因和肝、胃癌的發生並沒有非常高的關聯性，其中 LOH 比例超過 32% 的有 DXS8009 為 37.5%。

在我國人乳癌患者腫瘤組織中 Xq25 上發生 LOH 現象極高，68 位乳癌患者樣本中有

45 位偵測到 Xq25 有 LOH 的現象，佔 69% (圖三)，代表 Xq25 有 LOH 的現象可能與乳癌腫瘤的形成有關，也就是在 X 染色體上可能有一個或一個以上的腫瘤抑制基因存在。為了進一步了解 Xq25 上發生 LOH 現象是否也會影響其他癌症腫瘤的形成，以及在 X 染色體上可能存在的腫瘤抑制基因對乳癌和其他癌症的影響力，因而分析比較 Xq25 上發生 LOH 現象，而針測其他 25 位癌症病患(肝癌、胃癌)樣本中有 12 位到偵測 Xq25 的 LOH 現象佔 48%。結果顯示 Xq25 上發生 LOH 現象對其他癌症腫瘤的形成影響較小以及這些可能存在的腫瘤抑制基因對乳癌有直接的影響，但卻不是肝癌或胃癌的直接影響基因(P=) (表三)，可推測 Xq25 上可能有抑制乳癌發生的基因存在，而其中 DXS1047 此微衛星標記在區分對乳癌與其他癌症發生的項度上也有差異，所以推測在 Xq25 鄰近 DXS1047 上可能對乳癌有直接發生的影響的基因存在(表四)。

四、腫瘤組織和鄰近正常組織其 X 染色體不活化的模式

關於在女性中偵測到的 X 染色體不活化的模式主要可以分為隨機和非隨機兩種情形，(圖五)紅色 peak 代表的是腫瘤組織、藍色 peak 代表的是正常組織。分別有加限制內切酵素 *HhaI* 處理的結果(*HhaI*)及未加入限制內切酵素 *HhaI* 處理的結果(Control)。計算 CR 值是以較小的 peak area ratio (digested/undigested)除以較大的 peak area ratio (digested/undigested)，當比值大於 1 或小於 1 就表示 X 染色體不是屬於隨機不活化現象，不過一些研究指出，多少會有程度不等的歪斜現象產生(Buller et al. 1999)，所以設定 CR 值大於 3 或小於 0.33 為臨界值是目前廣泛被接受的標準，可以用來確定 X 染色體是屬於非隨機的不活化現象。

在圖五之 a 圖樣本 B101 腫瘤組織的 CR 值為 1.4，正常組織的 CR 值為 0.9 皆屬於隨機的 X 染色體不活化現象(RR)；b 圖樣本 B135 腫瘤組織的 CR 值等於 0.22，屬於非隨機的 X 染色體不活化現象，正常組織的 CR 值等於 0.74 屬於隨機的 X 染色體不活化現象(NR)；c 圖樣本 B146 腫瘤組織的 CR 值等於 6.05，常組織的 CR 值等於 0.27，皆屬於非隨機的 X 染色體不活化現象(NN)。

偵測 63 位乳癌病人，其中 57 位 HUMARA alleles 屬 heterozygotes，以 CR 值大於 3 或小於 0.33 為臨界值(圖六)，發現有 13 位腫瘤組織和鄰近正常組織 DNA 都是屬於 X 染色體不活化的模式，佔 22.8%；另外，有 21 位腫瘤組織是屬於非隨機的不活化現象、鄰近正常組織是屬於隨機的不活化現象，佔 36.8%，剩下的 23 人則是腫瘤組織和鄰近正常組織均屬於隨機的 X 染色體不活化現象，佔 40.3%。

另外，針對 20 位其他癌症(胃癌、肝癌)的病人，分析其 X 染色體不活化的模式，發現其中有 17 位屬於 heterozygotes，而在腫瘤組織和鄰近正常組織都是屬於非隨機的不活化現象的有 3 位，佔 18%；同樣地也有 3 位在腫瘤組織是屬於非隨機的不活化現象，但在鄰近的正常組織卻是隨機的情形，佔 18%；剩下的 11 位則是在腫瘤組織和鄰近正常組織都是屬於隨機的不活化現象，佔 65% (圖七)。

五、乳癌及其他癌症腫瘤組織 X 染色體不活化模式的關係(圖六.圖七)

針對腫瘤組織發生非隨機的不活化現象，在 79 位乳癌病患中有 37 位，佔全部乳癌病人的 49.8%；在 21 位其他癌症的病人方面有 6 位腫瘤組織發生非隨機的不活化現象，佔 28.0%(圖六.圖七)。發現腫瘤組織發生非隨機的不活化現象在乳癌中的發生率顯著高於其他癌症的病人($p=0.047$)，結果顯示 X 染色體非隨機的不活化現象對其他癌症的影響較小以及這些可能存在的腫瘤抑制基因對乳癌有直接的影響，但卻不是肝癌或胃癌的直接影響基因($p=0.047$)。同樣地證據在 Buller et al. (1999)針對卵巢癌的研究也指出 X 染色體非隨機的不

活化現象與惡性卵巢癌的發生有關。

再度呼應偵測 LOH 時的想法，也就是在 X 染色體上可能有一個或一個以上的腫瘤抑制基因存在，且這可能存在的腫瘤抑制基因對乳癌有直接的影響，但卻不是肝癌或胃癌的直接影響基因，因而可能為引發乳癌專一性的基因。另外在本實驗中發現 51 位屬於 heterozygotes 的乳癌病人中有 20 位病人(39.2%)在 HUMARA 的區域有 LOH 的現象，為 X 染色體上應該有腫瘤抑制基因存在的說法提供另一項直接的證據。

因而可以強烈證實 X 染色體這可能存在的腫瘤抑制基因，應該對女性專有的癌症(乳癌、卵巢癌)比較具有影響力。

六、腫瘤組織 DNA 有無 LOH 現象與 X 染色體不活化的模式及臨床病理檢驗的關係

由本實驗中所分析的癌症病患其病理資料分析，在比較腫瘤組織 DNA 偵測 LOH 現象的結果與臨床病理檢驗的結果，經費雪正確機率考驗 (Fisher's exact probability test) 的統計分析後，顯示病患的腫瘤臨床分期 (stage)、腫瘤的大小、腫瘤組織細胞核的等級 (grade) 的相關性。

首先針對 Xq25 上的七組微衛星標誌有無 LOH 與 X 染色體不活化的模式來看(表四)，發現 Xq25 上此七組微衛星標誌有 LOH 者，其 X 染色體不活化的模式傾向非隨機方式表現，運用法方分析得 $p=0.047$ ，雖然經費雪正確機率考驗 (Fisher's exact probability test) 的統計分析後 $p=0.071$ ，未達顯著差異，但是已有傾向性，也就是顯示 Xq25 上此七組微衛星標誌有 LOH 則其 X 染色體不活化現象傾向於非隨機的 mode。

此分析的差異可能因為人數太少所致，因此如果再增加病患的分析人數，也許可以更加證實此推論。至於在分析 Xq25 上此七組微衛星標誌有 LOH 與臨床病徵方面則無顯著相關性。

可以推想乳癌病患某一條 X 染色體 Xq25 發生 LOH 的現象，又恰巧此染色體為活化的 X 染色體，則此乳癌病患完全符合二次衝擊理論，如此便更能加以推斷 Xq25 處有腫瘤抑制基因的存在，所以未來可繼續分析 Xq25 發生 LOH 是否便是活化的 X 染色體，更能映證 Xq25 處有腫瘤抑制基因的推論。

接下來分析本次實驗 Xq25 發生 LOH 現象最顯著的微衛星標記 DXS1047(表五)與臨床病理檢驗的關係，DXS1047 發生 LOH 與否和腫瘤分級有傾向有關係($p=0.065$)，也就是 DXS1047 沒有發生 LOH，其腫瘤分級較低，症狀較輕微。

分析本實驗 Xq25 發生 LOH 現象次多的微衛星標記 DXS1001 (表六)，發現 DXS1001 發生 LOH 與 X 染色體不活化的模式及臨床病理檢驗的關係都無顯著相關性，所以可以推論雖然乳癌病患 DXS1001 發生 LOH 較高，但可能腫瘤抑制基因不非存在此處，若有腫瘤抑制基因的存在，也不能作為癒後偵測的標記。

最後分析 Xq25 上的衛星標誌 DXS8098 有無 LOH 與臨床病理檢驗的關係(表七)，發現 Xq25 上 DXS8098 有無 LOH，僅與腫瘤大小有關($p=0.041$)，DXS8098 有 LOH 腫瘤較大(> 3 cm)，至於在其他臨床病徵方面則無顯著相關性。至於 Piao et al.(2002)以韓國乳癌病患作為研究，提出 DXS8098 區有 LOH 的現象時，其腫瘤較大 (> 3 cm) ($p = 0.048$)，且有較高得腫瘤組織型態分級($p = 0.036$)，及腋窩淋巴結轉移的機率也較高 ($p = 0.020$)，可能暗示 Xq25 上 DXS8098 可能存有腫瘤抑制基因。而其功能可能與腫瘤的轉移及增生有關。Piao et al. (2002)。可是在台灣族群，若想以 DXS8098 癒後標記是較不恰當的，因為由研究結果發現，在 Xq25 上是有種族的基因差異的，在國人乳癌病患身上發生 LOH 現象極不高僅

28.24%，但 DXS8098 有 LOH 時腫瘤較大(> 3 cm)。

而我們發現另一項契機，在台灣乳癌病患微衛星標記 DXS1047 發生 LOH 現象極高，高達 47.23%，而 DXS1047 發生 LOH 則腫瘤分級傾向較高，且結合型比例為 84.6%，相當適合作為微衛星標記，但若作為國人偵測乳癌專一性的標記或癒後標記尚言之過早，因為 DXS1047 在蒐尋範圍 Xq25 的正下方，目前使用的七組微衛星標記並未夾擊出可能的腫瘤抑制基因，但依據多方驗證可十分卻信此腫瘤抑制基因已相當接近 DXS1047，我們只要在進一步稍微往下，找尋求鄰近 DXS1047 的微衛星標記，應該便能夾擊出可能的腫瘤抑制基因，且可作為偵測乳癌專一性的標記及癒後的標記。

但分析的病患人數太少，因此如果再增加病患的分析人數及更周詳的病理資料，也許可以得到更客觀的比較。

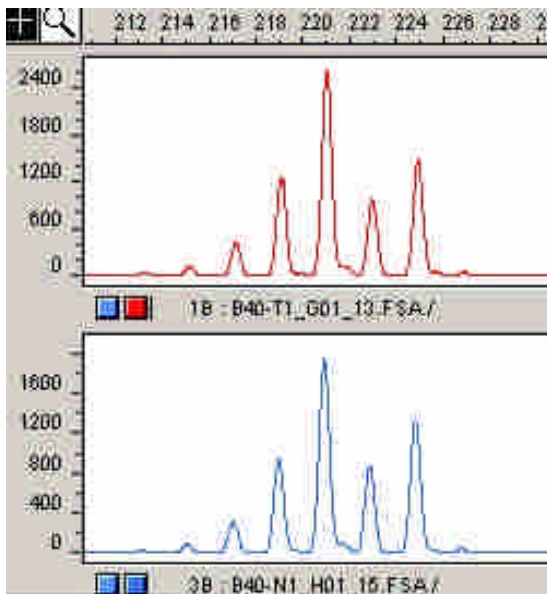
【參考文獻】

- Aral B, de Saint Basile G, Al-Garawi S, Kamoun P, Ceballos-Picot I (1996) Novel nonsense mutation in the hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase gene and nonrandom X-inactivation causing Lesch-Nyhan syndrome in a female patient. *Hum Mutant* 7: 52-58
- Avner P, Heard E (2001) X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nature Rev Genet* 2: 59-67
- Azofeifa J, Voit T, Hubner C, Cremer M (1995) X chromosome methylation in manifesting and healthy carriers of dystrophinopathies: concordance of activation ratios among first degree female relatives and skewed inactivation as cause of the affected phenotypes. *Hum Genet* 96: 167-176
- Brown CJ, Lafreniere RG, Powers VE, Sebastio G, Ballabio A, Pettigrew AL, Ledbetter DH, Levy E, Craig IW, Willard HF (1991) Localization of the X inactivation centre on the human X chromosome in Xq13. *Nature* 349:82-4
- Brown CJ (1996) Role of the X chromosome in cancer. *J Natl Cancer Inst* 88: 480-482
- Buekers TE, Lallas TA, Buller RE (2000) Xq22.2-3 loss of heterozygosity is associated with germline BRCA1 mutation in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 76: 418-422
- Buller RE, Sood AK, Lallas T, Buekers T, Skilling JS (1999) Associated between nonrandom X-chromosome inactivation and BRCA1 mutation in germline DNA of patients with ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 91: 339-346
- Busque L, Mio R, Mattioli J, Brais E, Blais N, Lalonde Y, Maragh M, Gilliland DG (1996) Nonrandom X-inactivation patterns in normal females: Lyonization ratios vary with age. *Blood* 88: 59-65
- Chao W, Huynh KD, Spencer RJ, Davidow LS, Lee JT (2001) CTCF, a candidate trans-acting factor for X-inactivation Choice. *Science* 6: 1-3
- Chen ST, Chen RA, Kuo SJ, Chien YC (2003) Mutational screening of breast cancer susceptibility gene 1 from early onset, bi-lateral, and familial breast cancer patients in Taiwan. *Breast Cancer Res Treat.* 77:133-143
- Choi C, Cho S, Horikawa I, Berchuck A, Wang N, Cedrone E, Jhung SW, Lee JB, Kerr J, Chenevix-Trench G, Kim S, Barrett JC, Koi M (1997) Loss of heterozygosity at chromosome segment Xq25-26.1 in advanced human ovarian carcinomas. *Genes*

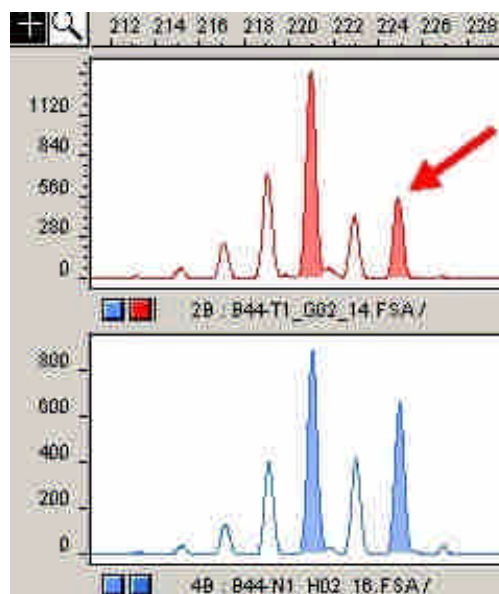
- Choi C, Kim MH, Juhng SW (1998) Loss of heterozygosity on chromosome Xp22.2-p22.13 and Xq26.1-q27.1 in human breast carcinomas. *J Korean Med Sci* 13: 311-316
- Chuaqui R, Silva M, Emmert-Buck M (2001) Allelic deletion mapping on chromosome 6q and X chromosome inactivation clonality patterns in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Gynecol Oncol* 80: 364-371
- Clarke JT, Greer WJ, Strasberg PM, Pearce RD, Skomorowski MA, Ray PN (1991) Hunter disease (mucopolysaccharidosis type II) associated with unbalanced inactivation of the X chromosome in a karyotypically normal girl. *Am J Hum Genet* 49: 289-297
- Clarke JT, Greer WJ, Strasberg PM, Pearce RD, Skomorowski MA, Ray PN (1991) Hunter disease (mucopolysaccharidosis type II) associated with unbalanced inactivation of the X chromosome in a karyotypically normal girl. *Am J Hum Genet* 49: 289-297
- Couch FJ, Weber BL, and the Breast Cancer Information Core (BIC) (1996) Mutations and polymorphisms in the families early onset breast cancer (BRCA1) gene. *Hum Mutat* 8: 8-18.
- Devilee, P., Cleton-Jansen, A.M., and Cornelisse, C.J. (2001) Ever since Knudson. *Trends Genet.* **17**: 569-573.
- Fey MF, Peter HJ, Hinds HL, Zimmermann A, Liechti-Gallati S, Gerber H, Studer H, Tobler A (1992) Clonal analysis of human tumors with M27 beta, a highly informative polymorphic X chromosomal probe. *J Clin Invest* 89: 1438-1444
- Gale RE, Wheadon H, Linch DC (1991) X-chromosome inactivation patterns using HPRT and PGK polymorphisms in haematologically normal and post-chemotherapy females. *B J Haematol* 79: 193-197
- Hakansson S, Johansson O, Johansson U, Sellberg G, Loman N, Gerdes A-M, Holmberg E, Dahl N, Pandis N, Kristoffersson U (1997) Moderate frequency of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations in Scandinavian familial breast cancer. *Am J Hum Genet* 60: 1068-1078.
- Heard E, Clerc P, Avner P (1997) X-chromosome inactivation in mammals. *Annu Rev Genet* 31: 571-610
- Kattar MM, Kupsky WJ, Shimoyama PK, Vo TD, Olson MW, Bargar GR, Sarkar FH (1997) Clonal analysis of gliomas. *Hum Pathol* 28: 1166-1179
- Kerangueven F, Noguchi T, Coulier F, Allione F, Wargniez V, Simony- Lafontaine J, Longy M, Jacquemier J, Sobol H, Eisinger F, Birnbaum D.(1997) Genome-wide search for loss of heterozygosity shows extensive genetic diversity of human breast carcinomas. *Cancer Res.* 1997 Dec 15;57(24):5469-74
- Knudson AG Jr. (1971) Mutation and Cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 68: 820-823
- Knudson AG Jr. (1993) Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10914-10921
- Kubota T, Oga S, Ohashi H, Iwamoto Y, Fukushima Y (1999) Borjeson-Forsman-Lehmann syndrome in a woman with skewed X-chromosome inactivation. *Am J Med Genet* 26:

- Li SS-L, Tseng H-M, Yang T-P, Liu C-H, Teng S-J, Huang H-W, Chen L-M, Kao H-W, Chen JH, Tseng J-N, Chen A, Hou M-F, Huang T-J, Chang H-T, Mok K-T, Tasi J-H (1999) Molecular characterization of germline mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes from breast cancer families in Taiwan. *Hum Genet* 104: 201-204
- Migeon BR (1994) X-chromosome inactivation: molecular mechanisms and genetic consequences. *Trends Genet* 10: 230-235
- Miki Y, Swensen J, Sattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, Bell R, Rosenthal J, Hussey C, Tran T, McClure M, Frye C, Hattier T, Phelps R, Haugen-Strano A, Katcher H, Yakumo K, Gholami Z, Shaffer D, Stone S, Bayer S, Wray C, Bogden R, Dayananth P, Ward J, Tonin P, Narod S, Brustow PK, Norris FH, Helvering L, Morrison P, Rosteck P, Lai M, Barrett JC, Lewis C, Neuhausen S, Cannon-Albright L, Goldgar D, Wiseman R, Kamb A, Skolnick MH (1994) A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266: 66-71.
- Naumova AK, Plenge RM, Bird LM, Leppert M, Morgan K, Willard HF, Sapienza C (1996) Heritability of X chromosome-inactivation phenotype in a large family. *Am J Hum Genet* 58: 1111-1119
- Nisen PD, Waber PG (1989) Nonrandom X chromosome DNA methylation patterns in hemophiliac females. *J Clin Invest* 83: 1400-1403
- Parolini O, Ressmann G, Hass OA, Pawlowsky J, Gadner H, Knapp W, Holter W (1998) X-linked Wiskott-Aldrich syndrome in a girl. *N Engl J Med* 338: 291-295
- Piao Z, Malkhosyan SR (2002) Frequent loss Xq25 on the inactive X chromosome in primary breast carcinomas is associated with tumor grade and axillary lymph node metastasis. *Genes Chromosome Cancers* 33: 262-269
- Shan L, Yang Q, Nakamura M, Nakamura Y, Mori I, Sakurai T, Kakudo K (2000) Active allele loss of the androgen receptor gene contributes to loss of androgen receptor expression in female breast cancers. *Biochem Biophys Res Commun* 275: 488-492
- Uehara S, Hashiyada M, Sato K, Sato Y, Fujimori K, Okamura J (2001) Preferential X-chromosome inactivation in women with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Fertility and Sterility* 76: 908-914
- Vehmanen P, Friedman LS, Eerola H, McClure M, Ward B, Sarantaus L, Kainu T, Syrjakoski K, Pyrhonen S, Kallioniemi O-P (1997) Low proportion of BRCA1 and BRCA2 mutations in Finnish breast cancer families: evidence for additional susceptibility genes. *Hum Mol Genet* 6: 2309-2315.
- Walsh DS, Peacocke M, Harrington A, James WD, Tsou HC (1998) Patterns of X chromosome inactivation in sporadic basal cell carcinomas: evidence for clonality. *J Am Acad Dermatol* 38: 49-55
- Willard HF, Brown CJ, Carrel L, Hendrich B, Miller AP (1993) Epigenetic and chromosome control of gene expression: molecular and genetic analysis of X chromosome inactivation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 58: 315-322.

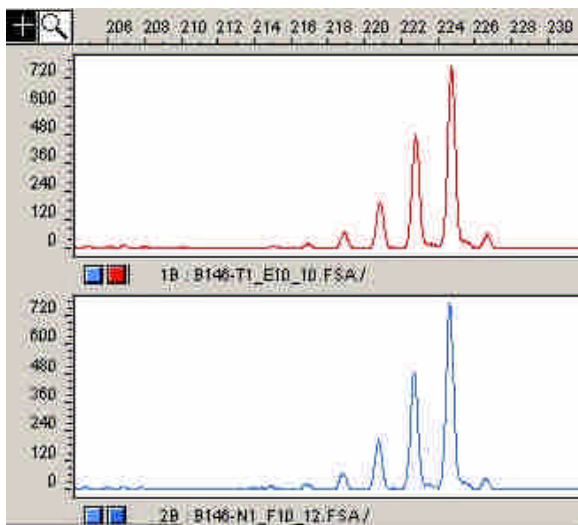
【附圖】



(a)



(b)



(c)

圖一：偵測 Xq25 之 LOH 現象

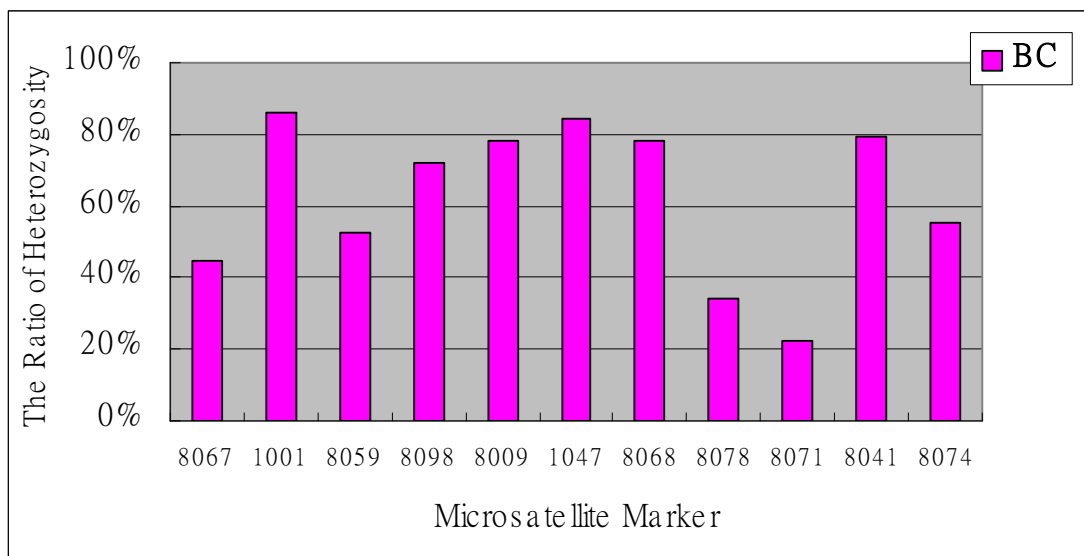
(微衛星標記 DXS8067 作為例)

以 ABI3100 autosequencer (GeneScan Analysis software)偵測腫瘤組織樣本中 X 染色體發生 LOH 的情形，圖中紅色 peak 代表的是腫瘤組織、藍色 peak 代表的是正常組織。

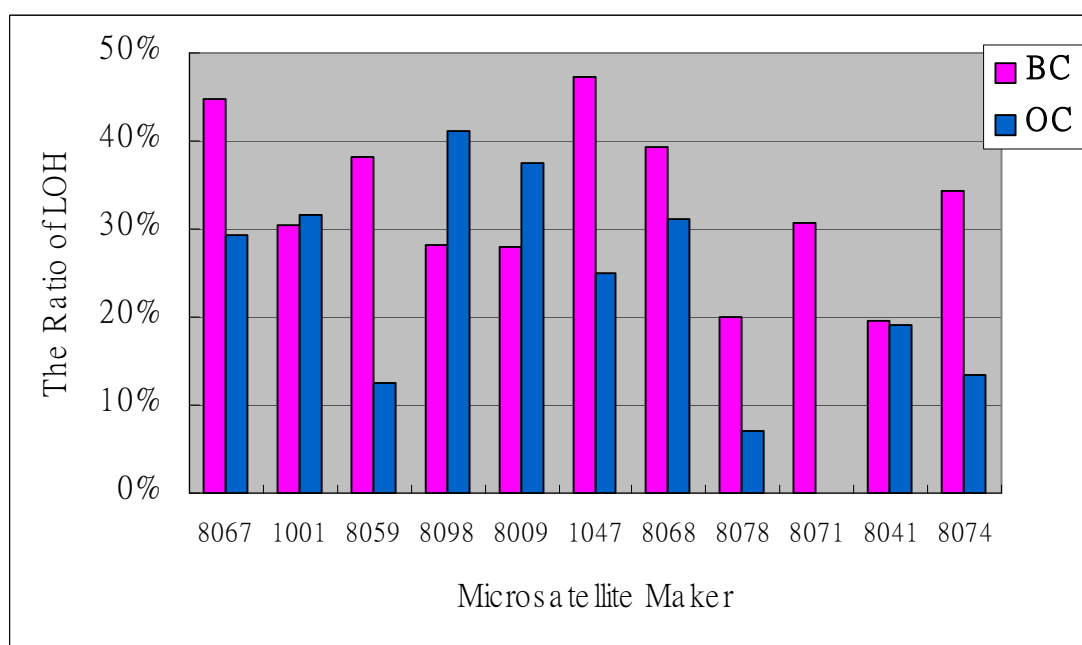
(a) 樣本 B40 的 Q^{LOH} 數值等於 1.20，不具有 LOH 的現象

(b) 樣本 B44 的 Q^{LOH} 數值等於 1.86，則具有 LOH 的現象。

(c) 樣本 B146 為同結合型無法進行 LOH 分析。紅色箭頭所指位置表示在腫瘤組織所失去的 allele



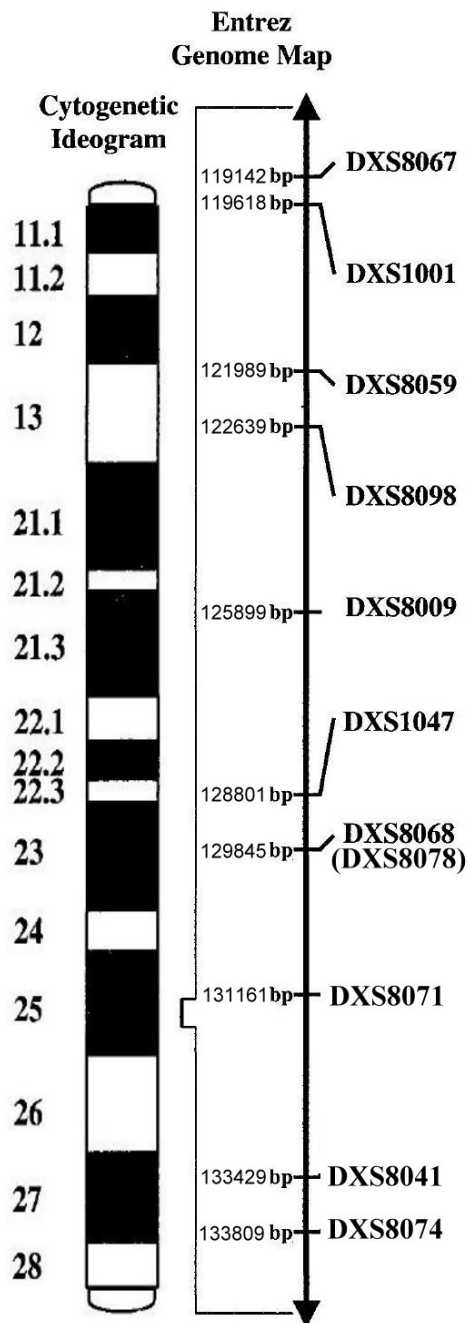
圖二：本實驗所使用的七組微衛星 DNA 標記在分析的乳癌病患中呈現異結合型的比例，詳細數字參照(表二)。



圖三：本實驗所使用的七組微衛星 DNA 標記在分析乳癌病患的腫瘤組織(BC)及其他癌症(OC)中，各微衛星 DNA 標記具有 LOH 現象的比例。縱軸代表在病患腫瘤組織具有 LOH 現象的百分比，為腫瘤組織具有 LOH 現象的病患人數除以在該微衛星 DNA 標記呈現異結合型的病患人數，詳細數字參照(表三)。

Locus Case No.	8067	1001	8059	8098	8009	1047	8068	8078	8071	8041	8074
B307	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
B323	Red	Red	White	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
B44	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
B113	Red	Red	Red	White	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Blue
B129	Red	Red	White	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
B130	Red	Red	White	Red	Red	Red	Red	Blue	Blue	Red	Red
B320	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
B19	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Blue	Red	Red	Blue	Blue
B30	Red	Red	White	Red	Blue	Red	White	Red	Red	Red	Red
B303	Red	Blue	White	Red	Blue	Red	Red	Red	Red	Red	Red
B322	Red	White	Red	White	Red	White	Red	Red	Red	Red	Red
B74	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Blue	Blue
B99	Red	Red	White	Red	Blue	Red	Blue	Red	Red	Blue	Red
B127	Red	Red	Red	Red	White	Blue	White	White	Red	Blue	Red
B23	Red	Red	White	Red	Red	Red	White	White	Red	Red	Red
B314	Red	White	Red	Red	White	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Blue
B325	Blue	Blue	White	Red	Blue	White	Red	Blue	Red	Red	Red
B326	White	Red	Red	Blue	White	Blue	Red	Red	Red	Red	Red
B146	White	Red	Blue	Blue	Red	Blue	White	White	White	Blue	Red
B149	White	Red	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	White	Blue	Red
B306	Red	Red	White	White	White	Blue	Red	White	White	White	Red
B327	Red	White	Red	White	White	White	White	White	White	Blue	Red

圖四



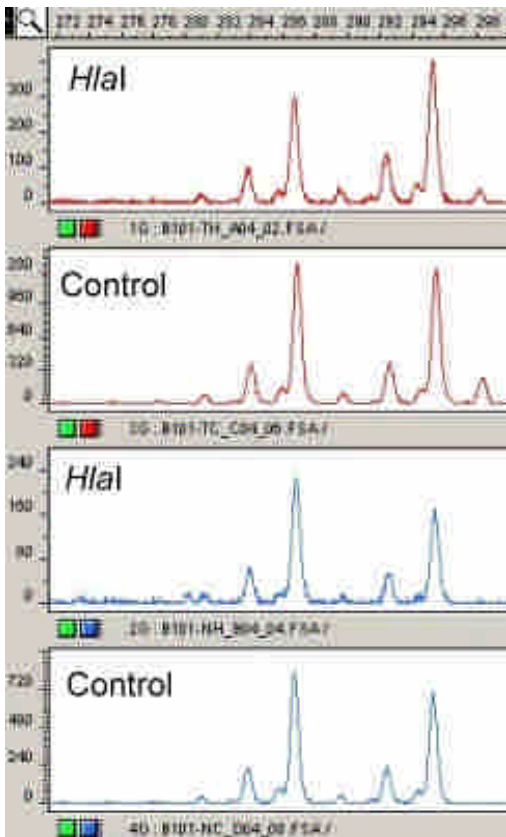
圖四之二

圖四：本實驗使用的微衛星標記及其從 GDB(Genome Data Base)搜尋得到之相關資料

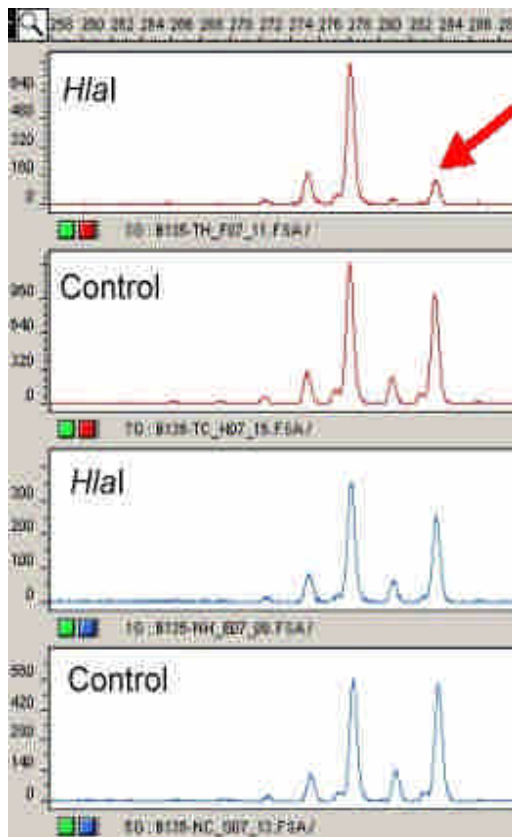
圖：圖中顯示本實驗用來偵測 Xq25 是否有缺失，所使用的十一組微衛星 DNA 標記，在分析 22 位乳癌病患後所呈現的結果。中央方格部分，左邊縱軸為乳癌病患代碼，縱軸對應此十一組微衛星標記，偵測結果以色塊表示，白色色塊代表此微衛星標記呈現同結合型(無法分析)；有顏色色塊代表此微衛星標記呈現異結合型(可進行 LOH 的分析)，其中紅色色塊代表的是有 LOH、藍色色塊代表的是沒有 LOH。最右邊橫軸代表此微衛星標記，在乳癌病患腫瘤組織具有 LOH 現象的百分比，為腫瘤組織具有 LOH 現象的病病人數除以在該微衛星標記呈現異結合型的肝癌病人數。

左邊圖四之二：

為 Xq25 圖譜，沿 X 染色體的位置(in Mbp)，將七組微衛星標記定位出來(從 Entrez/NCBI Human Genome Database 取得資料)。



(a)



(b)

圖五：偵測 X 染色體不活化現象

(HUMARA 基因標記作為分析)

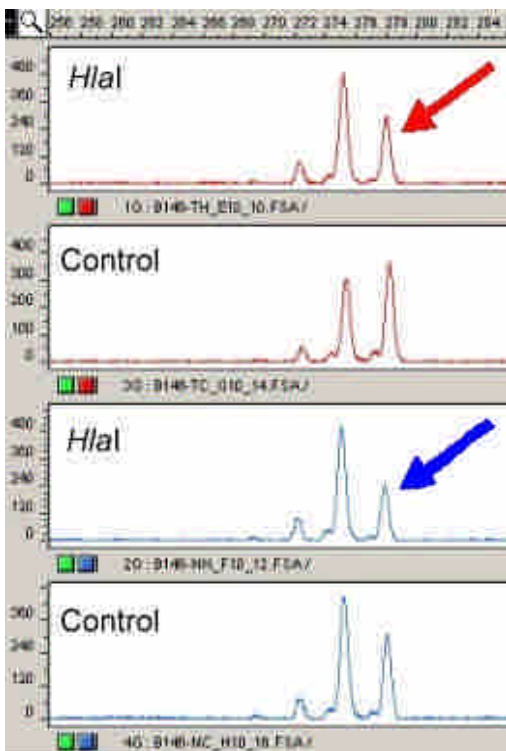
以 ABI3100 autosequencer (GeneScan Analysis software)偵測樣本 X 染色體不活化的模式，圖中紅色 peak 代表的是腫瘤組織、藍色 peak 代表的是正常組織。分別有加 *HhaI* 處理的結果(*HhaI*)，及未加入 *HhaI* 處理的結果(Control)。

(d) 樣本 B101 腫瘤組織與正常組織，皆屬於隨機的 X 染色體不活化現象(RR)。

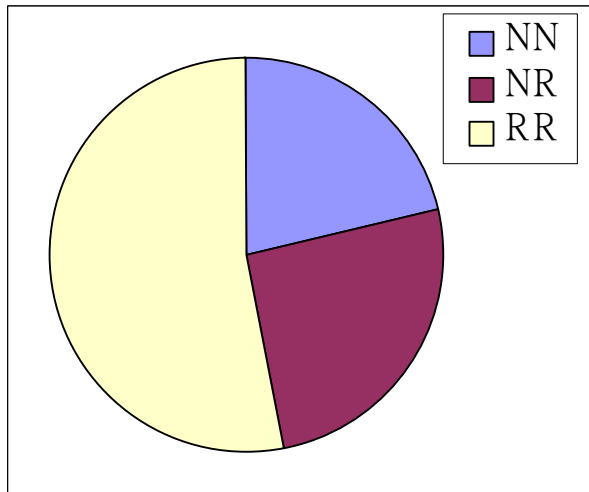
(e) 樣本 B135 腫瘤組織屬於非隨機的 X 染色體不活化現象，正常組織屬於隨機的 X 染色體不活化現象(NR)。

(f) 樣本 B146 腫瘤組織與正常組織，皆屬於非隨機 X 染色體不活化現象(NN)。

紅色箭頭所指位置表示在腫瘤組織被切除的(活化的)allele，而藍色箭頭所指的位置表示在正常組織中被切除的(活的)allele。



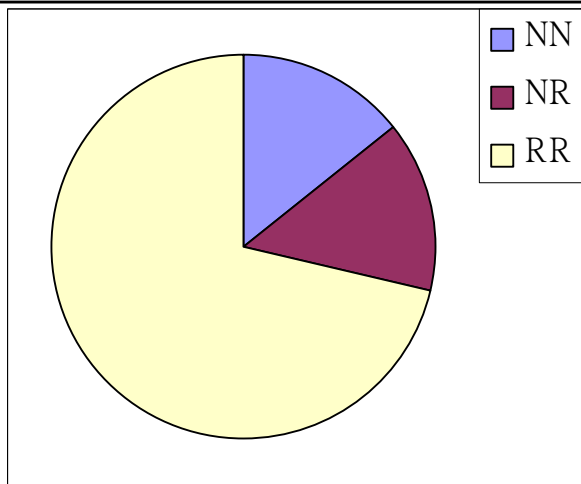
(c)



	人數	比例
NN	17/79	21.52%
NR	20/79	25.32%
RR	42/79	53.16%

	人數	比例
腫瘤 N	37/79	46.9%
腫瘤 R	42/79	53.1%

圖六： 腫瘤組織和鄰近正常組織其X染色體不活化的模式(RR、NR or NN)在乳癌病人(79人)中分佈的情形。屬於NN的有17人，占21.52%；屬於NR的有20人，占25.32%，剩下的則是屬於RR的有42人，占53.16%。(以N表示非隨機，以R表示隨機，至於RR表示在腫瘤組織和鄰近的正常組織其X染色體不活化的模式都是屬於隨機的方式；NR表示在腫瘤組織是屬於非隨機的X染色體不活化現象，但是在正常組織則是屬於隨機的不活化方式；NN表示在腫瘤組織和鄰近的正常組織都是屬於非隨機的X染色體不活化現象)。



	人數	比例
NN	3/21	14%
NR	3/21	14%
RR	15/21	71%

	人數	比例
腫瘤 N	6/17	28%
腫瘤 R	11/17	71%

圖七： 腫瘤組織和鄰近正常組織其 X 染色體不活化的模式(RR、NR or NN)在其他癌症病人(21人)中分佈的情形。屬於NN的有3人，占14%；屬於NR的有3人，占14%，剩下的則是屬於RR的有15人，占71%。(以N表示非隨機，以R表示隨機，至於RR表示在腫瘤組織和鄰近的正常組織其X染色體不活化的模式都是屬於隨機的方式；NR表示在腫瘤組織是屬於非隨機的X染色體不活化現象，但是在正常組織則是屬於隨機的不活化方式；NN表示在腫瘤組織和鄰近的正常組織都是屬於非隨機的X染色體不活化現象)。

【附表】

Primer 名稱	序列	標定
DXS8067F	5' CAGGAGTCCAAGGCTGCT3'	FAM
DXS8067R	5' CACAGAGTGATACCCTGTCTCTAAA3'	
DXS1001F	5' TACAAGTAACCCTCGTGACA 3'	HEX
DXS1001R	5' GTTATGGAATCAATCCAAGTG 3'	
DXS8059F	5' TTCCAGGTGCCACCAAG 3'	NED
DXS8059R	5' CAGTGCATTCCAGCCAGATAC 3'	
DXS8098F	5' CAGAGGCATTTACCAAGC 3'	NED
DXS8098R	5' CCCCTGGAGCAAAGAC 3'	
DXS8009F	5' AGCCTTCGTCCTCTATATATTTC 3'	FAM
DXS8009R	5' GCAATTCAAAAGATTCTGATTAATT 3'	
DXS8068F	5' ACTTAGCATAATGTCCTCCAG 3'	HEX
DXS8068R	5' CCTCTGTAAAGAACCTGCAC 3'	
DXS1047F	5' CCGGCTACAAGTGATGTCTA 3'	HEX
DXS1047R	5' CCTAGGTAACATAGTGAGACCTTG 3'	
DXS8071 F	5' CACAATAACCAAGATGTGGA3'	NED
DXS8071 R	5' CATAATGCCATCAAGTTTCA3'	
DXS8041 F	5' GCAAGACTCCGTCTCAAATAATAAC 3'	NED
DXS8041 R	5' TTCCTGCTACCTGCAATTCC 3'	
DXS8074 F	5' ATAAATTAGCCAGAGGTGTTG 3'	FAM
DXS8074 R	5' CTAGGTGTGTCTGTAAAGGTAGG 3'	
DXS8078 F	5' TGCATCCCCATAGTAATTGGT3'	HEX
DXS8078 R	5' CAAATGGCAGGATTTCCC 3'	

表一：本實驗所使用的七組微衛星 DNA 標記序列

Primer	Sequence	Label
AR-F	5'-TCC AGA ATC TGT TCC AGA GCG TGC-3'	NED
AR-R	5'-GCT GTG AAG GTT GCT GTT CCT CAT-3'	

表二：本實驗用以偵測，XCI的標記——*HUMARA* 基因的序列

病患 標記	乳癌病患(BC ^a)	
	Heterozygosity ^b /No. of BC	Heterozygosity %
DXS8067	29/65	44.6%
DXS1001	56/65	86.2%
DXS8059	34/65	52.3%
DXS8098	46/64	71.9%
DXS8009	50/64	78.1%
DXS1047	55/65	84.6%
DXS8068	49/65	78.5%
DXS8078	20/59	33.9%
DXS8071	13/58	22.4%
DXS8041	46/58	79.3%
DXS8074	32/58	55.2%

表三：使用的十一組微衛星 DNA 標記在分析的乳癌病患中呈現異結合型的比例，詳細數字參照表。

a. BC：指乳癌病患

b. Heterozygosity：在某微衛星標記呈現異結合型的病患人數

病患 標記	乳癌病患(BC)		其他癌症病患(OC)		P 值
	LOH/informative ^a	LOH ^b %	LOH/informative	LOH %	
DXS8067	13/29	44.83%	5/17	29.4%	0.122
DXS1001	17/65	30.36%	6/19	31.6%	0.232
DXS8059	13/34	38.24%	1/8	12.5%	0.280
DXS8098	13/46	28.24%	7/17	14.1%	0.775
DXS8009	14/50	28.00%	6/16	37.5%	0.766
DXS1047	26/55	47.23%	5/20	25.0%	0.457
DXS8068	20/49	39.22%	5/16	31.2%	0.059
DXS8078	4/20	20.00%	1/11	7.1%	0.775
DXS8071	4/13	30.77%	0/14	0.0%	0.766
DXS8041	9/37	19.57%	4/21	19.0%	0.457
DXS8074	11/32	34.38%	2/15	13.5%	
Xq25	45/65	69.2%	12/25	48.0%	0.006

表三：本實驗所使用的七組微衛星 DNA 標記在分析乳癌病患的腫瘤組織(BC)及其他癌症(OC)中，各微衛星 DNA 標記具有 LOH 現象的比例。

a. informative：在某微衛星標記呈現異結合型的病患人數

b. LOH %：指腫瘤組織具有 LOH 現象的病患人數除以在該微衛星 DNA 標記呈現異結合型的病患人數

七組微衛星標記全無偵測到 LOH			七組微衛星標記中有偵測到 LOH			P 值
	人數	%		人數	%	
R^a	11/15	73.3%	R	20/36	55.56%	
N^b	4/15	26.7%	N	16/36	44.44%	
Tumor Grade 1.2	15/19	78.9%	Tumor Grade 1.2	30/44	68.18%	
Tumor Grade 3	4/19	21.1%	Tumor Grade 3	14/44	31.82%	
LNM ^c +	13/19	68.4%	LNM+	22/45	48.89%	
LNM ^d -	6/19	31.6%	LNM-	23/45	51.11%	
腫瘤大小(<3cm)	8/17	47.1%	腫瘤大小(<3cm)	22/45	48.89%	
腫瘤大小(>3cm)	9/17	52.9%	腫瘤大小(>3cm)	23/45	51.11%	

表四：此七微衛星標誌有無 LOH 與 X 染色體不活化的模式、Tumor Grade、淋巴結轉移、腫瘤大小間的關係

a. N：表示在腫瘤組織的 X 染色體不活化的模式是非隨機的模式

b. R：表示在腫瘤組織的 X 染色體不活化的模式是隨機的模式

c. LNM+：(lymph node metastases) 表具有淋巴結轉移

d. LNM-：(lymph node metastases) 表具無淋巴結轉移

針對 DXS1047 微衛星標記偵測 LOH 現象與臨床病理檢驗的關係

DXS1047 標記無偵測到 LOH			DXS1047 標記有偵測到 LOH			P ^c 值
	人數	%		人數	%	
R	14/24	58.3%	R	10/20	50%	
N	10/24	41.7%	N	10/20	50%	
Tumor Grade 1.2	22/28	78.6%	Tumor Grade 1.2	15/25	60%	
Tumor Grade 3	6/28	21.4%	Tumor Grade 3	10/25	40%	
LNM+	17/28	60.7%	LNM+	12/28	42.9%	
LNM-	11/28	39.2%	LNM-	14/28	57.1%	
腫瘤大小(<3cm)	11/28	39.3%	腫瘤大小(<3cm)	14/26	53.8%	
腫瘤大小(>3cm)	17/28	60.7%	腫瘤大小(>3cm)	12/26	46.2%	

表五:DXS1047 微衛星標誌有無 LOH 與 X 染色體不活化的模式、Tumor Grade、淋巴結轉移、腫瘤大小間的關係

針對 DXS1001 微衛星標記偵測 LOH 現象與臨床病理檢驗的關係

DXS1001 標記無偵測到 LOH			DXS1001 標記有偵測到 LOH			P 值
	人數	%		人數	%	
R	23/33	69.7%	R	7/13	53.8%	
N	10/33	30.3%	N	6/13	46.2%	
Tumor Grade 1.2	27/38	71.1%	Tumor Grade 1.2	10/16	62.5%	
Tumor Grade 3	11/38	28.9%	Tumor Grade 3	6/16	37.5%	
LNM+	20/38	52.6%	LNM+	9/17	52.9%	
LNM-	18/38	47.4%	LNM-	8/17	47.1%	
腫瘤大小(<3cm)	20/38	52.6%	腫瘤大小(<3cm)	9/17	52.9%	
腫瘤大小(>3cm)	18/38	47.4%	腫瘤大小(>3cm)	8/17	47.1%	

表六:DXS1001 微衛星標誌有無 LOH 與 X 染色體不活化的模式、Tumor Grade、淋巴結轉移、腫瘤大小間的關係

DXS8098 標記無偵測到 LOH			DXS8098 標記有偵測到 LOH			P 值
	人數	%		人數	%	
R^a	18/27	66.7%	R	8/12	66.7%	
N^b	9/27	33.3%	N	4/12	33.3%	
Tumor Grade 1.2	22/32	68.8%	Tumor Grade 1.2	11/13	84.6%	
Tumor Grade 3	10/32	31.2%	Tumor Grade 3	2/13	15.4%	
LNM ^c +	17/32	53.1%	LNM+	7/13	83.8%	
LNM-	15/32	46.9%	LNM-	6/13	46.2%	
腫瘤大小(<3cm)	22/32	68.8%	腫瘤大小(<3cm)	11/13	84.6%	
腫瘤大小(>3cm)	10/32	31.2%	腫瘤大小(>3cm)	2/13	15.4%	

表七:不同年齡族群腫瘤組織 X 染色體不活化模式與淋巴結轉移的關係

- N: 表示在腫瘤組織其 X 染色體不活化的模式是非隨機的模式
- R: 表示在腫瘤組織其 X 染色體不活化的模式是隨機的模式
- LNM^c+: (lymph node metastases) 表具有淋巴結轉移
- LNM-: (lymph node metastases) 表具無淋巴結轉移