

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)

胸苷酸合成酶基因多形性與轉移性大腸直腸癌使用氟尿嘧啶化學治療結果之關聯性

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫  
計畫編號：NSC 97-2314-B-039-020-MY3  
執行期間：97年8月1日至100年7月31日

計畫主持人：葉志清  
共同主持人：謝玲玲、唐瑞平、宋鴻樟  
計畫參與人員：賴慶興

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：中國醫藥大學

中華民國九十九年五月二十七日

## 第一章 背景

結腸直腸癌是台灣地區民眾第三常見的癌症，也是造成癌症死亡的第三個主要原因，就發生人數而言，在95年度結直腸癌首度超越肝癌，成為國人發生人數最多的癌症。結腸直腸病人在診斷發現時，超過50%已經有轉移的現象(第三期和第四期)。除了以手術切除之外，半數轉移的病人會接受化學治療。

氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 簡稱5-FU)作為結腸直腸癌化療的主要用藥已經超過40年，但是個體對這些藥物的反應和相關的副作用卻常見差異性。5-FU的細胞毒性作用受到乳清酸磷酸核糖轉移酶(Orotate phosphoribosyl transferase, 簡稱OPRT)的及二氫嘧啶脫氫酶(Dihydropyrimidine dehydrogenase, 簡稱DPD)調控，因此5-FU的療效受到OPRT及DPD活性的影響。臨床研究中指出，結腸直腸癌病患的OPRT與DPD表現量高低會影響5-FU化療後的存活率，當OPRT表現量較高時，患者存活時間較長，而DPD則有相反結果。在OPRT基因中存在一個基因多形性(638G→C; Gly213Ala)，這個變異型與5-FU代謝有關，帶有CC同型結合子的病患易對5-FU產生毒性副作用。目前已經有30個DPD基因型的變異被報導出來，有些研究顯示基因變異的頻率會隨著種族不同而有所差異，發現A1627G變異基因頻率較高(台灣人為28.3%)。

表皮生長因子受體蛋白(Epidermal growth factor receptor, 簡稱EGFR)可以調控多種細胞功能，當它受到活化後，會刺激下游基因的表現。相關研究指出，EGFR的過度表現會導致腫瘤組織侵犯性增加，以致病患有較差之預後情形，並且與放射治療的結果有關。外顯子17(exon 17)G→A，使得密碼子497(codon 497)的位置由精氨酸(arginine, Arg)置換成離氨酸(lysine, Lys)，帶有Lys基因型的EGFR與其配體(ligand)的結合力，比起帶有Arg者較差，因此活化下游基因的能力也就較差。由此可知，分析EGRF Arg497Lys基因多形性，或許可以協助預測病患使用化學藥物治療之效果。

這個研究第二年進行了一個活體內試驗以建立OPRT、DPD與EGFR基因型與結腸直腸癌化療病人存活率的關聯性。

我們的本年度的主要目標是：

1. 偵測OPRT、DPD與EGFR等基因的基因多形性。
2. 調查三種基因之基因多形性與結腸直腸癌病人接受5-FU化療結果的相關性。

關鍵字: 結腸直腸癌、乳清酸磷酸核糖轉移酶、二氫嘧啶脫氫酶、表皮生長因子受體蛋白、基因多形性、氟尿嘧啶、化療

## 第二章 材料與方法

### 第一節 研究對象及資料來源

#### 一、研究對象

本研究的研究對象為 1995 年 1 月至 2001 年 12 月至林口長庚醫院診斷為結腸直腸癌並接受手術切除腫瘤的病患共 2716 人，病患在手術前接受面談與提供 10c.c.血液樣本。排除非手術切除後接受以 5-FU 為基礎第一線化學治療(n=2128)、美國癌症聯合委員會(The American Joint Committee on Cancer, AJCC)分期為第一期(n=7)、遺傳性大腸腺性息肉症(Familial Adenomatous Polyposis, FAP)及遺傳性非息肉症大腸直腸癌(Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer, HNPCC)(n=35)、過去有結腸直腸癌病史(n=15), OPRT、DPD 與 OPRT 基因型皆無法鑑定(n=1)以及化學治療日期在手術日期之前的病人(n=31), 最後共有 499 人納入研究分析。

#### 二、基本資料及臨床診斷資料收集

個案基本資料及臨床診斷資料來自長庚醫院「結腸直腸癌登記檔(Registry of Colorectal Cancer)」, 內容包括：

- 個人資本資料, 如：出生年月日、診斷年齡、性別、教育程度、職業、生活飲食型態等。
- 臨床診斷資料, 如：癌症分期、腫瘤位置、治療方式、個人疾病史、手術日期、死亡日期、最後更新日期等。自診斷日起, 每三至六個月固定追蹤並更新個案資料至 2008 年 5 月止。

### 第二節 基因型實驗分析方法

收集到的血液, 經離心後取中間層的白血球衣(buffy coat), 以標準的(phenol-chloroform)方法抽取基因體(genomic DNA), 用已滅菌過二次水稀釋至 500ug/ml 濃度保存在-20°C。

OPRT 基因型利用即時聚合酶鏈鎖反應(Real-time polymerase chain reaction, RT-PCR)來分析。OPRT G638C(rs1801019)基因的 primers 和 TaqMan probes 購買自美商應用系統公司(Applied Biosystem)。使用的系統為 ABI Stepone Sequence Detection System。

DPD 及 EGFR 基因型鑑定, 是利用聚合酶連鎖反應-限制片段長度多形性

(Polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)方法將萃取出 genomic DNA 進行基因型分析。

### 第三節 資料處理與統計分析

#### 一、存活分析資料定義

本研究的存活分析是計算總存活率(overall survival, 簡稱 OS), 為觀察接受手術及化學治療的結腸直腸癌病人從被新診斷為癌症起至死於此疾病止的存活率, 時間變數定義如下:

事件(Event)	自診斷日起至死亡日期為止, 觀察到事件(死亡)發生的時間。
設限(censoring)	自診斷日起, 未死亡、失去聯絡者, 觀察到最後更新的時間。

#### 二、統計檢定

根據資料檔中的基本變項及臨床診斷資料進行一般的描述性分析, 連續變項(如: 年齡等)以 t-test 進行分析, 類別變項(如: 性別、癌症分期、基因頻率等)以卡方檢定 (Chi-square test)進行分析, 列聯表中若期望次數小於 5 的細格數超過 20%, 則使用費雪精確檢定(Fisher's exact test), 看各變項在性別、腫瘤位置以及腫瘤分期等分組間的分布是否有所不同。

再利用 Kaplan-Meier 存活曲線圖(survival curve)及 Log-rank test 比較不同基因型的病患存活的差別, 再進一步依照性別、腫瘤位置以及腫瘤分期等分層分析, 並利用 Cox's 迴歸模式(Cox's proportional hazard model)進行單變項及多變項分析, 比較不同基因型的病人的在各分組間的危險對比值及調整危險對比值。

所有統計檢定結果將會以危險對比值(Hazard ratio, HR)、95%信賴區間 (Confidence interval, 簡稱 CI)及 P 值表示。所有的檢定利用雙尾檢定, 且定義  $p < 0.05$  達到統計上顯著差異。研究中將利用 SAS 9.2 (Version 9.2 for Windows; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA)統計軟體進行資料的分析及繪圖。

### 第三章 結果

#### 第一節 研究對象之描述性統計分析

研究對象共有 499 位，平均年齡 58.6 歲；男性有 264 位，女性有 235 位；只有 24 位的研究對象有癌症多發性現象；有 35.3% 位研究對象有家族癌症史；腫瘤分期(TNM 分期)第二期、第三期及第四期的百分比分別為 14.8%、54.5% 及 30.7%；在腫瘤分化程度方面，有 78.4% 的研究對象為中等分化【Table 1】。進一步將研究對象依照腫瘤位置分成結腸癌與直腸癌兩組來比較，結腸癌病患的年齡較直腸癌小(57.2 歲 vs. 60.5 歲， $p=0.08$ )，但有較高比例為及癌症分期第四期(31.3% vs 29.9%， $p=0.001$ )，組織分化程度較差的比率也較高(12.3% vs. 5.2%， $p=0.01$ )。

OPRT、DPD 及 EGFR 的各種基因型分布列於【Table 2】。OPRT G638C G/G、G/C、C/C 基因頻率分別為 69.7%、27.5%、2.8%；DPD A1627G A/A、A/G、G/G 基因型頻率分別為 50.3%、44.1%、5.6%；EGFR R497K G/G、G/A、A/A 基因型頻率分別為 25.5%、50.4%、24.1%。將研究對象分成結腸癌與直腸癌比較，三基因之基因多形性分布在兩者之間無顯著差異。合併 OPRT G/C 與 C/C 基因型來看，直腸癌病人帶有 G/G 基因之比例為 73.9%，較結腸癌病人的 66.5% 來的高一些，但仍未達顯著差異 ( $p=0.08$ )。將 DPD 和 EGFR 之其中一個對偶基因為變異型者合併(DPD A/G+G/G、EGFR G/A+A/A)，其在結腸癌或直腸癌的分布比例皆未達顯著差異。

#### 第二節 OPRT、DPD 及 EGFR 基因多形性與結腸直腸癌化療病人之存活關係

【Table 3】是針對 OPRT、DPD 及 EGFR 三種基因多形性在性別、腫瘤位置與腫瘤分期上的總存活分析。全部對象來看，研究對象帶有 OPRT G/G、G/C+C/C、DPD A/A、A/G+G/G、EGFR G/G、G/A+A/A 的存活年中位數分別為 4.0 年、4.2 年、4.2 年、3.9 年、4.7 年、4.0 年，OPRT 基因型為 G/C+C/C 的患者比起 G/G 死亡危險比為 0.84(95% CI=0.65 to 1.10)，DPD A/G+G/G 基因型者較 A/A 死亡危險比為 1.03(95% CI=0.81 to 1.30)，EGFR G/A+A/A 比起 G/G 死亡危險比則為 1.15(95% CI=0.87 to 1.52)，皆無統計上顯著相關。

將研究對象分為結腸癌及直腸癌兩組進行分析，結果顯示結腸癌病人帶有 OPRT G/G 及 G/C+C/C 基因型的存活年中位數分別為 3.9 年及 4.3 年，G/C+C/C 基因型在死亡風險較 G/G 基因型低(HR=0.71，95% CI=0.50 to 1.01)，已達顯著邊緣。DPD 及 EGFR

基因多形性與存活風險，在腫瘤位置上皆無顯著相關，死亡危險比從 0.89 到 1.28 之間。病患以性別分組，結果顯示 EGFR G/A+A/A 在兩性之存活年中位數皆為 4.0 年，較 A/A 男性 4.2 年、女性 4.8 年低，死亡危險比分別為 1.07 與 1.23，但皆未達統計上顯著。OPRT 和 DPD 之基因多形性，在性別分組中亦無觀察到有顯著不同。進一步將研究對象依照 TNM 癌症期別分為 II+III 及 IV 兩組進行分析，腫瘤為 II+III 期且帶有 OPRT G/C+C/C 基因型的人較 G/G 基因型的人有顯著較低的死亡風險(HR=0.62, 95% CI=0.41 to 0.94)，然而，在其他兩個基因方面，無論腫瘤期別為何，皆無統計學上顯著差異。

【Table 4】是研究對象依照腫瘤位置與腫瘤期別分層，將年齡、性別、OPRT、DPD 及 EGFR 進行多變項 Cox 迴歸分析。第二、三期結腸癌的研究對象，年齡和 OPRT 是重要的危險因子，年齡越大的人有顯著較高的死亡風險(HR=1.61, 95% CI=1.12 to 2.32)，OPRT G/C+C/C 基因型較 G/G 基因型有較低的死亡風險(HR=0.46, 95% CI=0.25 to 0.83)，其他因子則無顯著差異。第四期結腸癌的病患中，年齡、性別與三種基因型，對於死亡風險，都沒有統計上顯著影響。多變項 Cox 迴歸分析結果顯示，II+III 期直腸癌的研究對象，年齡亦是最重要的危險因子，年齡的死亡風險為 1.90 (95% CI=1.19 to 3.06)，EGFR G/A+A/A 基因型較 G/G 死亡風險為 1.57 倍，但仍未達統計顯著性，然而 OPRT 與 DPD 基因型對病人的存活率皆沒有顯著影響。IV 期直腸癌的研究對象，五項因子之死亡風險從 0.83 至 1.37，皆未達統計上顯著差異。

## 第四章 討論與結論

許多研究指出，腫瘤中 OPRT 及 EGFR mRNA 和蛋白質表現會有很大的差異，這些差異與 5-FU 為基礎的化學治療的預後有很大的相關性。一些先前的體內或體外試驗研究也證明了 OPRT 與 EGFR 基因型與 RNA 轉錄及蛋白轉譯之間的關聯性，所以基因多形性可以當作一個腫瘤內表現量的預測因子，更進一步評估以 5-FU 為基礎化學治療的結腸直腸癌病人，其臨床反應及存活狀況。

多變項 Cox 迴歸分析結果更顯示，第 II+III 的結腸癌病患中，OPRT 638C 對偶基因有較佳的存活率。因此 OPRT G638C 基因多形性可能當作第二期和第三期結腸癌化學治療後存活風險的預測因子。DPYD A1627G 基因型中帶有 G 對偶基因者就存活中位年數而言與 A/A 基因型者無顯著上的差異；近一步依照性別、腫瘤位置和腫瘤期別進行分層分析，亦未發現顯著差異；EGFR R497K 基因型中帶有 A allele 就存活中位年數而言與 G/G 基因型者無顯著上的差異，EGFR 基因型與性別、腫瘤位置和癌症期別亦無統計顯著差異。整體而言，DPYD A1627G 及 EGFR R497K 基因型與接受 5-FU 治療後之存活率無顯著相關。

本研究第二年的結果顯示，OPRT 基因多形性與 5-FU 為基礎化學治療的結腸直腸癌病人之存活有相關性，OPRT 基因可能可以當作預測化學治療病人預後的預測因子；就我們所知，本研究是針對 OPRT、DPD 與 EGFR 基因多形性來評估結腸直腸癌化療病人的預後，近年來有愈來愈多的研究者將焦點放在「個人化醫療」，利用生物標記的方法來幫助臨床上的治療(例如基因檢測)，提供病人適當、正確的醫療，以達到最佳療效與最低副作用，提升病人的存活率。

## 第五章 未來進度

1. 對 TS 基因進行基因定序，搜尋 TS 基因未知的基因多形性。
2. 判定 TS 基因型和單體型與 mRNA 或蛋白質表現量的相關性。
3. 調查 TS 基因多形性和表現型與結腸直腸癌病人接受 5-FU 化療結果的相關性。
4. 分析 TS 基因與其他相關基因(MTHFE、OPRT、DPD 和 EGFR)間的交互作用對存活率的影響。

Table 1. Distribution of clinicopathological characteristics of colorectal cancer patients by tumor site

Variable	Total N (%)	Colon N (%)	Rectum N (%)	p-value*
Age	58.6 ± 12.4	57.2 ± 12.9	60.5 ± 11.5	0.08
Sex				0.13
Male	264 (52.9)	144 (50.0)	120 (56.9)	
Female	235 (47.1)	144 (50.0)	91 (43.1)	
Multiplicity				0.14
No	475 (95.2)	253 (87.8)	194 (91.9)	
Yes	24 (4.8)	35 (12.2)	17 (8.1)	
Family history of cancer				0.92
No	311 (64.7)	179 (64.9)	132 (64.4)	
Yes	170 (35.3)	97 (35.1)	73 (35.6)	
Missing = 21				
TNM stage				0.001
II	74 (14.8)	56 (19.4)	18 (8.5)	
III	272 (54.5)	142 (49.3)	130 (61.6)	
IV	153 (30.7)	90 (31.3)	63 (29.9)	
Histological grade				0.01
Well differentiated	61 (12.3)	39 (13.7)	22 (10.5)	
Moderately differentiated	388 (78.4)	211 (74.0)	177 (84.3)	
Poorly differentiated	46 (9.3)	35 (12.3)	11 (5.2)	
Missing = 4				
Carcinoembryonic antigen (CEA)				0.09
< 5 ng/ml	224 (46.7)	120 (43.3)	104 (51.2)	
≥ 5 ng/ml	256 (53.3)	157 (56.7)	99 (48.8)	
Missing = 19				

\* Chi-square test or t-test



Table 2. Distribution of OPRT, DPD, and EGFR polymorphisms of colorectal cancer patients by tumor site

Variable	Total N (%)	Colon N (%)	Rectum N (%)	p-value*
OPRT G638C				0.17
G/G	347 (69.7)	191 (66.5)	156 (73.9)	
G/C	137 (27.5)	86 (30.0)	51 (24.2)	
C/C	14 (2.8)	10 (3.5)	4 (1.9)	
Missing = 1				
G/G	347(69.7)	191(66.5)	156 (73.9)	0.08
G/C +C/C	151(30.3)	96(33.5)	55(26.1)	
DPD A1627G				0.81
A/A	251 (50.3)	148 (51.4)	103 (48.8)	
A/G	220 (44.1)	125 (43.4)	95 (45.0)	
G/G	28 (5.6)	15 (5.2)	13 (6.2)	
A/A	251(50.3)	148(51.4)	103 (48.8)	0.57
A/G +G/G	248(49.7)	140(48.6)	108(51.2)	
EGFR R497K				0.88
G/G	126(25.5)	72(25.4)	54(25.6)	
G/A	249(50.4)	145(51.2)	104(49.3)	
A/A	119(24.1)	66(23.3)	53(25.1)	
Missing=5				
G/G	126(25.5)	72(25.4)	54(25.6)	0.97
G/A+A/A	368(74.5)	211(74.5)	157(74.4)	

\*Chi-square test

Table 3. Univariate Cox proportional hazard models of overall survival according to OPRT, DPD, and EGFR polymorphisms by tumor site, gender, and tumor stage

Variable	OPRT G638C		DPD A1627G		EGFR R497K	
	G/G	G/C+C/C	A/A	A/G+G/G	G/G	G/A+A/A
Total						
SY	4.0	4.2	4.2	3.9	4.7	4.0
HR (95% CI)	1 (reference)	0.84 (0.65 to 1.10)	1 (reference)	1.03 (0.81 to 1.30)	1 (reference)	1.15 (0.87 to 1.52)
Colon						
SY	3.9	4.3	4.2	3.7	4.5	4.0
HR(95% CI)	1 (reference)	0.71 (0.50 to 1.01)	1 (reference)	1.13 (0.82 to 1.54)	1 (reference)	1.06 (0.73 to 1.53)
Rectum						
SY	4.1	3.7	4.1	4.1	4.8	4.1
HR(95% CI)	1 (reference)	1.08 (0.72 to 1.63)	1 (reference)	0.89 (0.62 to 1.28)	1 (reference)	1.28 (0.83 to 1.98)
Male						
SY	4.0	4.0	4.0	3.9	4.2	4.0
HR(95% CI)	1 (reference)	0.88 (0.61 to 1.07)	1 (reference)	0.92 (0.67 to 1.27)	1 (reference)	1.07 (0.73 to 1.57)
Female						
SY	4.1	4.3	4.7	3.9	4.8	4.0
HR(95% CI)	1 (reference)	0.81 (0.55 to 1.19)	1 (reference)	1.16 (0.81 to 1.65)	1 (reference)	1.23 (0.82 to 1.86)
Stage II+III						
SY	4.9	5.0	5.0	4.9	5.1	4.9
HR(95% CI)	1 (reference)	0.62 (0.41 to 0.94) <sup>  </sup>	1 (reference)	1.00 (0.71 to 1.40)	1 (reference)	1.24 (0.83 to 1.85)
Stage IV						
SY	1.5	1.7	1.6	1.6	1.4	1.6
HR(95% CI)	1 (reference)	1.00 (0.70 to 1.42)	1 (reference)	1.04 (0.75 to 1.45)	1 (reference)	0.75 (0.51 to 1.12)

Abbreviations: HR, hazard ratio; 95% CI, 95% confidence interval; SY, median survival years

<sup>||</sup> $P < .05$

Table 4. Multivariate Cox proportional hazard models of overall survival by tumor site and tumor stage

Variable	Colon		Rectum	
	II+III	IV	II+III	IV
	HR (95% CI)	HR (95% CI)	HR (95% CI)	HR (95% CI)
Age	1.61 (1.12 to 2.32) <sup>  </sup>	1.08 (0.78 to 1.49)	1.90 (1.19 to 3.06) <sup>  </sup>	1.13 (0.79 to 1.63)
Sex				
Female	1 (reference)	1 (reference)	1 (reference)	1 (reference)
Male	0.91 (0.57 to 1.46)	0.94 (0.60 to 1.48)	1.01 (0.60 to 1.70)	0.83 (0.47 to 1.47)
OPRT G638C				
G/G	1 (reference)	1 (reference)	1 (reference)	1 (reference)
G/C +C/C	0.46 (0.25 to 0.83) <sup>  </sup>	0.71 (0.44 to 1.14)	1.01 (0.56 to 1.82)	1.37 (0.74 to 2.56)
DPD A1627G				
A/A	1 (reference)	1 (reference)	1 (reference)	1 (reference)
A/G +G/G	1.12 (0.70 to 1.80)	0.86 (0.55 to 1.36)	0.87 (0.51 to 1.47)	1.08 (0.63 to 1.86)
EGFR R497K				
G/G	1 (reference)	1 (reference)	1 (reference)	1 (reference)
G/A+A/A	0.95 (0.56 to 1.61)	0.94 (0.55 to 1.62)	1.57 (0.82 to 3.00)	0.69 (0.35 to 1.34)

Abbreviations: HR, hazard ratio; 95% CI, 95% confidence interval

$P < .05$