

編號：CCMP96-RD-202

六君子湯對於非小細胞肺癌病人以化學治療後其免疫調控基因組表現及臨床預後之影響(2-2)

林孟志

高雄長庚醫院

摘 要

研究目的：

四君子湯有增強機體免疫力的作用。六君子湯已被證實可以改善胃腸，免疫及肺功能。本研究希望評估化療期間服用六君子湯是否可延長存活期，改善腫瘤的反應，改善生活品質，以及評估對化療相關毒性的影響。

研究方法：

利用隨機雙盲之臨床研究方法，預定將收集本院 34 例非小細胞肺癌病人(stag IIIB or IV)，將其隨機分為 17 例對照組(化療+安慰劑)，17 例治療組(化療+六君子湯)。每組在接受化療治療之間隔，接受六君子湯或安慰劑治療。在治療過程中，一方面觀察病人臨床反應，一方面在進行治療之前、中、後，共三次抽血，進一步利用全人類基因組表現晶片(whole genome assay, Human ref-8 beadchip)之分析方法鑑定出其免疫基因組表現。

結果與討論：

本計畫已完成 34 個病例收集資料建檔，其中已皆完成第一次抽血及基因晶片分析。部分病例已完成第二次抽血及基因晶片分析。根據第一次基因晶片(正常組與疾病組比較)分析比較，結果發現其中有兩倍差異之基因表現共有 142 個，五倍差異之基因表現共有七個基因，包括 histone cluster 1 H2ac (HIST1H2AC), defensin alpha 4 corticostatin (DEFA4), hemoglobin delta (HBD), hemoglobin gamma A (HBG1), hemoglobin gamma G (HBG2), elastase 2 neutrophil (ELA2)及 killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 2 (KIR3DL2)。其中有五種基因為第一次發現與肺癌相關。

本研究最後收納三十二名肺癌末期病人及二十名健康人，其中九名病人接受

兩種化療及六君子湯四個療程的治療，八名病人接受兩種化療的治療。我們將其白血球的全基因表現作以下的比較：肺癌比健康人有 547 個表現不同的基因，化療前後有 849 個表現不同的基因，第四期比三 b 期有 151 個表現不同的基因，化療加六君子湯有 206 個表現不同的基因，嗜中性白血球減少者比無減少者有 188 個表現不同的基因。肺癌和期別差異最相關的共同代謝途徑牽涉到 arachidonic acid 的產生，典型補體途徑，及經由 GP6 的血小板活化。化療和嗜中性白血球減少共同的最相關的代謝途徑牽涉到抗細胞凋零，轉譯因子 NF-Kb 及 Lymphotoxin-beta 受器的訊息傳遞。Prostaglandin-H2D-isomerase 是化療加六君子湯和嗜中性白血球減少唯一且共同的表現不同的基因。

關鍵詞：非小細胞肺癌、六君子湯、全人類基因組表現

Number: CCMP96-RD-202

Genomic Expressions and Outcomes in non Small Cell Lung Cancer Patients Treated with Combinations of Liu Jun Zi Tang (六君子湯) and Chemotherapy (2-2)

Meng-Chih Lin

Chang Gung Memorial Hospital, Kaohsiung

ABSTRACT

Aim:

The Chinese Medicine liu jun zi tang (六君子湯) has been thought to be able to improve gastrointestinal, immunological and pulmonary functions. We aim to determine whether liu jun zi tang (六君子湯) can reduce toxicity rate and increase response rate of chemotherapy for patients with NSCLC during chemotherapy. Furthermore, the mechanism of liu jun zi tang would be investigated through microarray gene expression analysis.

Method:

We plan to enroll about 34 patients with stage IIIB or IV advanced non-small cell lung cancer, and divide them into two groups: standard combination chemotherapy group (Cisplatin and Gemcitabine) or chemotherapy plus 六君子湯 group. Whole blood samples will be obtained before, during and after treatment. Total RNA from polymorphonuclear cells and mononuclear cells will be isolated respectively and analysed with microarray genomic expression and its software. Selective gene expression alterations in patients with chemotherapy alone or chemotherapy plus 六君子湯 will be determined.

Results & Discussion:

Thirty two patients with non-small cell lung cancers has been screened for preliminary survey and nine of them were excluded because of different treatment regimens and unwillingness of the patients. The first analysis have been done by the whole genome assay, Human ref-8 beadchip, from the Illumina Company. There are

142 genes with 2 folds different expression. 7 genes with 5 folds of different expression, including histone cluster 1 H2ac (HIST1H2AC), defensin alpha 4 corticostatin (DEFA4), hemoglobin delta (HBD), hemoglobin gamma A (HBG1), hemoglobin gamma G (HBG2), elastase 2 neutrophil (ELA2), killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 2 (KIR3DL2), were found.

This study aims to identify candidate genes for blood-based tumor diagnosis, and to investigate underlying mechanisms of medication-induced neutropenia by cDNA microarray method. Microarray was used to analyze expression patterns of 24,500 transcripts of blood leukocyte in 32 advanced non-small cell lung cancer patients, and 20 sex- and age-matched healthy subjects. Seventeen of the 32 patients were double-blindly randomized to receive 4 cycles of cisplatin and gemcitabine with or without daily use of liu jun zi tang (a Chinese medicine). Hierarchical clustering analysis failed to show significant segregation of patients. The following comparisons of gene expression data were made: lung cancer versus healthy subjects, stage 4 versus 3b, post CT versus baseline, post CT plus liu jun zi tang versus baseline, and neutropenia versus no neutropenia. The largest number of differentially expressed genes (DEGs), with fold change ≥ 2 and p-value < 0.05 , was found in post-CT versus baseline (849), with most of the genes being down-regulated in post-CT. The second largest group of DEGs originated from the comparison of the lung cancer versus healthy subjects (547), with most of the genes being up-regulated in lung cancer. The other comparisons resulted in a smaller numbers of DEGs (151, 206, 188). In the intersection of the first two comparisons, the mostly related pathways specific to lung cancer and stage involve arachidonic acid production, classical complement, and GP6-dependent platelet activation. In the intersection of the 3rd and 5th comparisons, the mostly related pathways specific to CT and neutropenia involve anti-apoptotic, NF- κ B, and Lymphotoxin-beta receptor signaling. Prostaglandin-H2D-isomerase is the only DEG in the intersection of 4th and 5th comparisons. This study revealed candidate genes and pathways that may contribute to a better understanding of the effects of lung cancer and its treatment on blood leukocytes, making it possible to find biomarkers for early diagnosing lung cancer and predicting medication-induced neutropenia.

Keywords: non small cell lung cancer, liu jun zi tang, microarray gene expression

壹、前言

肺癌在全世界一個主要死因，據估計每年的發生率超過 120 萬例，而死亡率超過 110 萬例。非小細胞癌佔了所有肺腫瘤的 80% 以上，而且將近三分之二的病人在診斷之初時就無法開刀。^{1,2}

在過去 20 年，許多研究的綜合分析證實，以 Cisplatin 為主的化學治療因此被視為是末期非小細胞肺癌的標準治療。^{3,4,5} 在另一個綜合分析發現加入另一個化療藥劑，(例如 Gemcitabine, Paclitaxel, Vinorelbine 或 Docetaxel) 可增加腫瘤反應率及存活率。^{6,7,8,9} 然而兩種化學治療藥劑比單一種有明顯增加的第三級和第四級的藥物毒性。常見的化學治療副作用包括噁心、嘔吐、血球減少，腹瀉、感染黏膜炎、腎毒性、耳毒性及神經毒性。不同的治療方式也會影響預後，兩種化學治療藥物併用比單一種藥物，可明顯增加腫瘤反應率及 1 年存活率。然而當加入第三種化學治療藥物時，雖然腫瘤反應率可提高，但 1 年存活率卻沒有增加，這可能是因為發生更多第三級和第四級的毒性。⁹ Cisplatin 屬鉑類藥物，其去毒性或去活化主要經由 Glutathione 的代謝途徑。Glutathione 與鉑類藥物結合的反應是由 glutathione-S-transferases 來催化。Glutathione 代謝系統基因的變異已知和這多癌症的存活和預後有關。研究 Glutathione 相關的代謝途徑將有助於瞭解六君子湯對減少化療相關副作用的可能機轉。¹⁰ 因此，以中藥方劑做為第三種治療藥劑，藉以提昇身體本身抗腫瘤的能力並減少化學治療藥劑的毒性，不失為一可行的策略。

肺癌屬於傳統中醫學肺積、咳嗽、或是咯血等範疇。其實肺癌患者長期肺氣不足，均可考慮是肺氣受損，所謂「金破則鳴」，或肺衛氣虛，反覆使外邪侵襲，或脾氣虛弱，健運失司，痰濁內生，阻抑肺氣，肺氣不宣所致。虛則補其母，治療補肺氣，根據五行學說母子相生理論，宜採「培土生金」法。六君子湯以黨參、白朮、茯苓和甘草補脾益氣治療肺氣虛。現代研究證實四君子湯有增強機體免疫力的作用；半夏、陳皮合茯苓、甘草即成二陳湯除濕化痰，一補其氣之不足，一瀉其痰之有餘以宣肺，預期有助於緩解肺癌之病情。¹¹

六君子湯在動物實驗證實可增強巨噬細胞的吞噬功能。另外，用於晚期肺癌及其他惡性腫瘤接受化療的患者，也發現可減少血液白血球及血小板之降低。^{12, 13, 14} 肺癌病人接受化學治療後，誘發嗜中性球減少的比例約為 24% 而且嗜中性球的數目是影響肺癌病人預後的獨立因子。另一方面，肺癌病人的週邊血液單核球的某些細胞發炎介質的基因表現會增強，而化療也

會影響細胞發炎介質產生的多寡¹⁵。到目前為止，並沒有任何研究以微矩陣基因表現來分析，肺癌病人接受化療之後，其嗜中性球及單核球的基因表現的變化。此外併用六君子湯後，白血球基因表現的變化，也沒有任何研究探討過。中醫藥是人類智慧的寶庫，其複雜的五行相生相剋的理論卻令現代人難以理解。若能以高科技微矩陣因表現來分析六君子湯在肺癌治療上扶正驅邪的可能機轉，那麼將可加速中醫藥的現代化及促進中西醫的相輔相成。

貳、材料與方法

研究主要將經人體實驗委員會同意後，經受測者充份了解本試驗並同意接受試驗並簽署同意書之下，利用隨機雙盲之臨床研究方法，預定將收集本院 34 例非小細胞肺癌病人 (stag IIIB or IV)，將其隨機分為 17 例對照組 (化療+安慰劑)，17 例治療組 (化療+六君子湯)。每組在接受化療治療之間隔，接受六君子湯或安慰劑治療。在治療過程中，一方面觀察病人臨床反應，一方面在進行治療之前、中、後，共三次抽血，因本院設有基因體核心實驗室，故於本院基因體核心實驗室內，直接將病人白血球之 mRNA 反轉錄至 cDNA，進一步利用全人類基因組表現晶片 (whole genome assay, Human ref-8 beadchip) 之分析方法鑑定出其免疫基因組表現。目前本年度最主要的工作為：

一、收集病人基本資料，建立資料庫：

- (一)針對第 IIIB/IV 期新診斷的非小細胞肺癌病人，經支氣管鏡、胸腔電腦斷層及經胸腔穿刺切片確定病理組織型態，並作腦部電腦斷層或核磁共振及骨頭掃描確定期別。
- (二)由醫師向病人及其家屬解釋化療的利弊得失及中藥湯劑六君子的效能或副作用。
- (三)在病人簽署受試者同意書後，正式納入研究。
- (四)紀錄病人之基本資料、病史及連絡方式

二、研究設計

- (一)IIIB/IV 期非小細胞肺癌患者，有意願接受化學治療，且符合納入的標準者，將參與個研究。
- (二)所有的病人將依標準的化療處方(Gemcitabine and Cisplatin)治療，同時給予最佳支持性照顧，並依雙盲隨機模式給予六君子湯或安慰劑。
- (三)所有的病人將依據其預後的因子隨機分層，以確保這些因子在這兩個分群裡平均的分佈。首要的分層因子是疾病的分期，亦即 IIIB 或 IV 期，以及活動力，亦即 ECOG PS 0 或 1。次要的分層因子包括 IIIB 期病人是否有肋膜或心包積水，以及 IV 期病人是否有腦轉移。
- (四)內部的分析將在三分之一的病人數收納入研究後執行。最後的分析將在第一個病人納入 24 個月執行。對每個病人，每 4 週評估腫瘤的反應。血球數及肝、腎功能每 4 週評估一次。
- (五)局部治療和支持性照顧可以包括放射治療、開刀、類固醇、抗生素、止痛藥、止吐藥、輸血等。

三、收案及排除標準：

(一)收案標準：

1. 經病理及影像學證實的第 IIIB 或 IV 期非小細胞肺癌(鱗狀細胞癌、腺癌、支氣管肺泡癌、大細胞肺癌、未分化或非特異性的非小細胞肺癌)，在隨機分配前兩個月內新診斷的病例。
2. 病人必須有 RECIST 所定義的可測量或不可測量疾病。
3. 病人的活動力為 ECOG PS 0、1或2，而且預期壽命大於 3 個月。
4. 在告知病人化學治療的益處和風險後，病人願意接受標準的化療。
5. 病人從未被診斷有其他的癌症，除了子宮頸原位癌之外。
6. 大於 18 歲。
7. 病人有能力及意願攝取食物，六君子湯或安慰劑。
8. 病人簽署受試者同意書而且可遵循研究的要求。

(二)排除標準：

1. 在隨機分配前兩週內有不正常的實驗室檢驗值。
肝：Dilirubin >1.5 倍的上限，AST 大於 2.5 倍的上限
腎：血清 creatinine 大於 1.5 倍的上限
骨髓：WBC \leq 4,000/ μ l；platlet \leq 100,000/ mm^3 ；neutnphil \leq 1,500/ mm^3
男性 Hb < 9g/dl；女性 Hb < 8.5g/dl
2. 無法解釋的體溫大於攝氏 38.5 度，連續 7 天；慢性腹瀉，每天三次連續 14 天。
3. 先前或目前正接受放射治療。放射治療必須在隨機分配之後才可施行。
4. 目前使用荷爾蒙治療或免疫調節藥物。
5. 顯著的心臟疾病：無法控制的高血壓、心绞痛、嚴重心衰竭，一年內有心肌梗塞，嚴重心律不整。
6. 女性病患不可有懷孕或哺乳。
7. 活動性急性感染症。
8. 已知對六君子湯方劑過敏。

四、隨機分配程序：

(一)分層因子：*活動力 ECOG PS 0,1,2

*疾病分期：

- .IIIB 期無肋膜或心包積水
- .IIIB 期有肋膜或心包積水
- .IV 期無腦轉移

.IV 期有腦轉移

(二)病人在隨機分配後 7 天內服用六君子湯或安慰劑

(三)服用六君子湯／安慰劑 7 天內開始化療

五、治療計畫及不良事件提報

(一)化學治療：劑量及劑量調整的標準是依據藥廠提供的準則及 Schiller 等學者的研究報告。

Gemcitabine 1000mg/m² day 1,8,15

Cisplatin 80 mg/m² day 15, 在 Gemcibabine 之後投予

時程：每三週一個循環，每個循環之間可間隔一週，病人若有進行性疾病則自研究中移除，完全反應、部份反應或穩定疾病的病人則持續化療到總共 6 個循環。醫師可選擇繼續 6 個之上循環的化療。

病人若有過度的毒性，則可自研究中移除。在投予 Cisplatin 前後各給予靜脈注射生理食鹽水各 1000c.c 以減少腎毒性。在投予 cisplatin 前施打 Dexamethasone 20mg 及 20 zofram 8mg 以減少噁心、嘔吐不適。

(二)六君子湯/安慰劑

1. 以膠囊 (500mg/capsule) 包裝，空腹時服用。
2. 早中晚各 10 顆，每次的劑量為 5 克。
3. 假如其毒性達到第三級或以上則中止服用。
4. 總共服用 25 週。
5. 若化學治療藥劑因本身的毒性而停止，六君子湯／安慰劑將繼續服用。
6. 若疾病惡化，六君子湯／安慰劑仍可繼續服用。

(三)不良事件的提報：

1. 安全性是依據理學檢查，病人及醫護人員描述，血液及生化檢驗結果來評估。不良事件的嚴重度是依據 NCI CTCAE Version 3.0 Toxicity Grading Scale 來決定。其時程及與治療的關係將在病例報告中紀錄
2. 安全性的定義：
 - * 貢獻度：不相干、不像、或許、可能、確定。
 - * 嚴重不良事件：導致死亡，危及生命，持續或顯著的殘障，住院或延長住院。
 - * 非預期的不良事件：在研究手冊中未提及的事件。
 - * 嚴重度：輕度、中度、嚴重、非常嚴重、致死。

3. 下列情況研究者必須通報主管機關：

* 嚴重的不良事件：第四和五級；預期或非預期的。

* 或許、可能、或確定的第二和三級非預期的不良事件。

(四)劑量調降或中止：

1.化療藥劑毒性：

(1)血液學：

顆粒球	血小板	Gemcitabine	Cisplatin
≥ 1,500/mm ³	≥ 75,000	100%	100%
1,000-1,500	50,000-75,000	75%	75%
<1,000	<50,000	延遲一週	延遲一週

註記：若前一個療程劑量已減少而顆粒球持續降低，則需使用 G-CSF。G-CSF 之使用依據 American society of clinical Oncology 的準則

(2)肝功能：

AST	Bilirubine (total)	Gemortabine
≤ 5 倍上限	≤ 2.5 倍上限	100%
>5 倍上限	>2.5 倍上限	延遲一週

(3)腎功能

血清 creatine	Gemcibabine	Cisplatin
<1.6	100%	100%
1.6-2.0	75%	50%
>2.0	延遲一週	延遲一週

(4)其他：第三或第四級毒性發生時，化療需暫直到病人完全恢復。此後化療劑量應減少 50%。若需延遲化療超過三週以上，則化療需停止。

2.六君子湯／安慰劑毒性：

(1)若有第四級毒性的貧血、嗜中性球降、肌炎、疲倦、頭痛、口腔潰瘍、口角炎、黏膜炎、吞嚥困難、噁心、嘔吐，直到恢復。

(2)視情況可輸血或使用 G-CSF。

(3)若第四級毒性在停藥後持續超過 50 天，則該湯劑需停用。

3.下列情況也需中止研究藥物的治療：

(1)病人或法定代理人拒絕進一步的治療或追蹤

(2)繼續參與將危及病人的健康狀況

(3)病人無法遵從研究的要求

(4)病人需要研究所不許可的其他治療

(5)病人有前述的藥物毒性

(6)病人病情惡化或復發

六、所需的臨床程序和實驗室測驗

(一)進入研究前

1. 受試者知情同意書
2. 病史
3. 血液學及生化檢查
4. 腫瘤測量：
 - * 胸腫電腦斷層
 - * 骨頭掃描
 - * 腦部電腦斷層或核磁共振(臨床上懷疑腦轉移者)
 - * 正子攝影掃描(選擇性)

(二)進入研究當中之評估項目：

1. 基準線的評估，隨機分配後到開始服用湯劑前
 - * 疲倦問卷 MFI-20
 - * 生活品質問卷：QLQ-C30 和 QLQ-QC13
 - * 收集血液
2. 追蹤的時間：每個病人自隨機分配後，追蹤 3 年(156 週)以作存活分析。
 - * 比較兩組病人之存活時間
 - * 鑑定腫瘤對湯劑的反應，生活品質、湯劑的毒性，湯劑對化療相關毒性的影響
3. 在化療及湯劑治療三個療程後再一次收集血液

七、萃取 RNA(白血球)

(一)分離血液中的血漿

1. 抽 10 ml 全血到內含 Herparin 抗凝劑綠頭管內。
2. 離心 3000 rpm，10 分鐘。
3. 取上層血漿至 1.5 ml eppendorf 中，凍於-80°C 或測血漿中蛋白質濃度。
4. 用塑膠吸管取 500µl Buffy Coat 到 15 ml 離心管。
5. 加入 6 ml 1x ACK，混合均勻，等待 10 分鐘。
6. 離心 1500 rpm，5 分鐘。
7. 丟棄上清液。
8. 加入 1 ml PBS，用回溶細胞 pellet。
9. 轉換到 1.5 ml eppendorf 中，離心 3000 rpm，1 分鐘。
10. 丟棄上清液。
11. 以 Ficoll 分離出嗜中性球及單核球。
12. 加入 500µl Trizo(打破細胞膜)，以 pipette 均勻混合，進行 RNA

萃取。

(二) 萃取 RNA

1. 每管樣品加入 0.1 ml BCP，經 15 秒輕微充分震盪混合後，靜置 3 分鐘。
2. 在 4°C 下離心 14000 rpm，15 分鐘，從表面吸取上清液約 300 μ l 至另一 epp.。
3. 加入等體積 300 μ l isopropanol 均勻混合後，反轉 epp. 數次，隔夜暫存於 -20°C，讓 RNA 沉澱。
4. 在 4°C 下離心 14000 rpm，15 分鐘，將大部分上清液丟棄，只留下 pellet 和約 50 μ l 的上清液；預冷低溫真空濃縮機至 4°C。
5. 加入以 DEPC 水稀釋的 75% 酒精 500 μ l 清洗萃取物，在 4°C 下離心 14000rpm，5 分鐘，丟棄上清液。
6. 用低溫真空濃縮機將液體抽乾後，加入 DEPC 水 20 μ l，以 pipette 上下吸放數次，再用手輕彈管壁 3~4 次混合，並快速離心一下。
7. 冰凍 RNA 於 -80°C，或準備以 Agilent 2100 Bioanalyzer 測定所抽出的 RNA 質與量如何。

八、RNA 的定性與定量

(一) 清潔 Agilent 2100 Bioanalyzer 電極

1. 將電腦與儀器間的調節連接器轉向“2100 Bioanalyzer”，並開啟機器與電腦電源，點桌面的“2100 expert”圖示進入軟體。
2. 加 350 μ l RNaseZAP 到清潔晶片盤裡，將清潔晶片盤放入 Agilent 2100 Bioanalyzer 內，關上蓋子等待 1 分鐘。
3. 加入 350 μ l RNA-free water 到另一個清潔晶片盤裡，將清潔晶片盤置入儀器內，關上蓋子等待 10 秒。
4. 打開蓋子 10 秒，讓水氣逸散在蓋上。

(二) 配置膠

1. 吸取 550 μ l RNA 6000 gel matrix (red) 到另一個過濾離心管 (spin filter tube)。
2. 室溫下離心 4000 rpm，10 分鐘。
3. 將離心後的膠以 65 μ l 為一管，分裝到 0.5 ml RNAase-free microfuge tube (4°C 下可保存 4 週)。


(三) 配置 Gel-Dye Mix

1. 震盪 dye concentrate (blue) 10 秒，快速離心後室溫下避光，接著步驟 2 使用。
2. 取 1 μ l dye concentrate 到 65 μ l 的已過濾 gel matrix 內，震盪 10 秒，離心 13000 xg，10 分鐘，避光備用。


(四) 加入 Gel-Dye Mix

1. 取一新的 RNA 晶片放在 chip priming station 上，吸 9 μ l gel-dye matrix 到標示“G”(黑底白字)的孔中。
2. 關上 chip priming station，將柱塞往下壓至晶片，等待 30 秒後，將晶片由 priming Station 取出。
3. 取 9 μ l gel-dye matrix 到晶片上標示“G”(白字黑底)的孔中。

(五) 加入 RNA 6000 Nano Maker

取 5 μ l Maker (green)到晶片中標示“”及 12 個樣品孔中。

(六) 加入 Ladder 及 樣品

1. 取 1.2 μ l ladder 置於 safe-lock tubes 內，放入加熱槽中，以 72 $^{\circ}$ C 加熱 2 分鐘，之後至於冰上。
2. 取 1 μ l ladder 加到晶片中標示“”的孔中。
3. 取 1 μ l 樣品加到各樣品孔，不加樣品的樣品孔則各補上 1 μ l Maker。
4. 將樣品放入 IKA vortex mix 中，以 2400 rpm 震盪 1 分鐘。
5. 把此晶片放入 Agilent 2100 Bioanalyer 開始分析。

(七) 軟體操作

1. 進入軟體 2100 expert 中。
2. 按下 Assay，選擇 Eukayote Total RNA Naon Series II.xsy。
3. 按 Start 開始分析，整個過程約需 20 分鐘。
4. 以 PDF 檔案格式儲存結果並列印。

(八) 結果判讀方法

1. Ladder

- (1) 有一根 25nt maker；
- (2) 有六根 RNA，分別為：200、500、1000、4000、及 6000 nt；
- (3) 所有七根都能清楚的分開且螢光強度(Fu)值大於 2。

2. RNA

- (1) 其 ribosomal RNA (28S 和 18S)profile；
- (2) RIN(RNA Integrity Number)至少 8 以上；
- (3) 有一根 25 nt marker 出現，且 ladder 的螢光強度(Fu)值大於 2。

3. cRNA

- (1) 以 50 或 500 ng total RNA 轉出的 cDNA profile；
- (2) 有一根 25 nt marker 出現，且 ladder 的螢光強度(Fu)值大於 2；
- (3) 在 gel view 下，其分布介於 250 ~ 5500 nt，大部分落在 1000 ~ 1500 nt；
- (4) Illumina 晶片之樣品濃度要求：850 ng/11.3 μ l(每個樣品先計

算取 850 ng 的體積，再用 Nuclease-free water 補到 11.3 μ l；若樣品未能達到此濃度，但 cDNA 總量超過 850 ng，可以採真空離心濃縮方式，降低總體積以輔合要求)。

九、基因晶片資料統計分析

(一)所有資料先經 data normalization

(二)在經 Illumina custom software 處理後算出 differential expression algorithm

(三)所算出 $P \leq 0.001$ (adjusted by Benjamini and Hochberg false discovery rate)

(四)移除相關 X 及 Y 染色體的基因

參、結果

本計畫已完成 34 個病例收集資料建檔，其中男性 23 人，女性 11 人。年齡由 35 歲到 86 歲，平均 62.52 歲。癌症分期：第 IIIB 期非小細胞肺癌 18 人(鱗狀細胞癌 4 人、腺癌 11 人、支氣管肺泡癌 0 人、大細胞肺癌 0 人、未分化或非特異性的非小細胞肺癌 3 人，IIIB 期病人中有肋膜或心包積水 8 人)，第 IV 期非小細胞肺癌 16 人(鱗狀細胞癌 5 人、腺癌 9 人、支氣管肺泡癌 2 人、大細胞肺癌 0 人、未分化或非特異性的非小細胞肺癌 0 人，IV 期病人有腦轉移 4 人)。

本計畫已完成 34 個病例收集資料建檔，其中已皆完成第一次抽血及基因晶片分析。部分病例已完成第二次抽血及基因晶片分析。而正常組與疾病組皆經 duplication 處理 (figure 1,2)。

根據第一次基因晶片(正常組與疾病組比較)分析比較，結果發現其中有兩倍差異之基因表現共有 142 個 (figure 3): 其中疾病組表現較高的共有 67 個基因(table 1)，正常組表現較高的共有 75 個基因(table 2)。

五倍差異之基因表現共有七個基因(figure 4, table 3)，包括 histone cluster 1 H2AC (HIST1H2AC)，defensin alpha 4 corticostatin (DEFA4)，hemoglobin delta (HBD)，hemoglobin gamma A (HBG1)，hemoglobin gamma G (HBG2)，elastase 2 neutrophil (ELA2) 及 killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail,2 (KIR3DL2)。其中有五種基因為第一次發現與肺癌相關。這些表現五倍差異的基因將於完整研究結束後進行定量 PCR 確認。

目前所有病例已完成化療及中藥療程，以 Beadstudio 及 Metacore 軟體分析之結果如表五到表十(依肺癌，腫瘤分期，病理，化療，化療加六君子湯及嗜中性球過少分群，比較所得最顯著差異的前十個基因)及圖十(肺癌、腫瘤分期和病理分群取交集之最相關基因及途徑)和圖十一(化療，化療加六君子湯及嗜中性球過少分群取交集之最相關基因及途徑)所示。

肆、討論

在五倍差異表現的基因中，正常組表現較高的為 histone cluster 1 H2AC (HIST1H2AC)，此基因位於第六對染色體 (figure 6)，負責產生組蛋白 (histone)，進而與 200 個左右鹼基對的 DNA 形成核小體 (Nucleosome)。目前已知其功能與基因轉譯及負責作用相關。目前無論文報導此一基因表現與肺癌有相關。本研究是第一個發現此基因與肺癌有相關。

在五倍差異表現的基因中，疾病組表現較高的為 defensin alpha 4 corticostatin (DEFA4)，hemoglobin delta (HBD)，hemoglobin gamma A (HBG1)，hemoglobin gamma G (HBG2)，elastase 2 neutrophil (ELA2) 及 killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail,2 (KIR3DL2)。這些基因可以分為兩大類：1. 免疫方面包括：defensin alpha 4 corticostatin (DEFA4)，elastase 2 neutrophil (ELA2) 及 killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail,2 (KIR3DL2)，共 3 個基因；2. 血液學方面包括：hemoglobin delta (HBD)，hemoglobin gamma A (HBG1)，hemoglobin gamma G (HBG2)，共 3 個基因。

在免疫學方面，達五倍差異表現的基因包括：

一、defensin alpha 4 corticostatin (DEFA4)

此基因位於第八對染色體 (figure 6)，此基因最早被發現在兔子的肺及人類血液中的中性球 (neutrophils) 中，目前已知其功能有抗細菌、抗病毒作用、抗 ATCH 作用、鈣離子通道阻斷作用以及使肥大細胞脫顆粒作用。2006 年 science 雜誌論文報導此一基因與乳癌及大腸癌有相關¹⁶，但目前無論文報導此一基因表現與肺癌有相關。本研究是第一個發現此基因與肺癌有相關。

二、elastase 2 neutrophil (ELA2)

此基因位於第十九對染色體 (figure 7)，此基因最早被發現在人類骨髓細胞的粒線體的內膜 (neutrophils) 中。目前人類基因中已發現 6 個 elastase 基因 (包括 elastase 1, 2, 2A, 2B, 3A, and 3B)。其中 elastase 2 是特別負責水解在中性球內的溶解體 (azurophil granules) 的蛋白質，以及從被激發的中性球釋放的細胞外基質蛋白質。因為 Elastase 2 會分解細胞外基質蛋白質的 collagen-IV 及 elastin，所以其在退化性及發炎性疾病佔有一定的重要角色。2005 年 chest 雜誌論文報導此一基因與肺癌預後有相關¹⁷，本研究是第二發現此基因與肺癌有相關，但詳細機轉並不清楚。

三、killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail,2 (KIR3DL2)

此基因位於第十九對染色體 (figure 8)，此基因是 Killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) 家族中的一部分。其最主要是位於自然

殺手細胞及 T 細胞表面的一種糖蛋白。其作用最主要負責細胞免疫功能。2003 年 *oncogene* 雜誌論文報導此一基因與肺癌浸潤有相關，本研究是第二發現此基因與肺癌有相關¹⁸，但詳細機轉並不清楚。

在血液學方面，達五倍差異表現的基因最主要為紅血球中的血紅素基因包括 hemoglobin delta (HBD)，hemoglobin gamma A (HBG1) 及 hemoglobin gamma G (HBG2) 等。此基因位於第十一對染色體 (figure 9)。在癌症病人中貧血是常見的問題，但在此研究中發現負責血紅素基因的 mRNA 上升，但詳細機轉並不清楚。目前此研究發現免疫方面基因，肺癌病人白血球中的基因表現，以中性球的表現最明顯，且部分資料與已發表在一流醫學期刊的發現相符合，是值得進一步研究的方向。

伍、結論與建議

因為近來健保給付標靶治療 Gefitinib (Iressa®)條件放寬，故許多病人改用標靶治療 Gefitinib (Iressa®)，使用傳統化療之病人減少，以至病例收集不易，且收案治療時間較易延後。本研究將繼續進行，以期收到夠多病例並能完成全部療程及分析。

誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會計畫編號CCMP96-RD-202提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

陸、參考文獻

1. Stroup DF, Berlin JA, Morton SC, et al. Meta-analysis of observational studies in epidemiology. JAMA. 2000;283:2008-12.
2. Alberg AJ, Brock MV, and Samet JM. Epidemiology of lung cancer: looking to the future. J Clin Oncol 2005;23:3175-85.
3. Alexander S, and David S E. Drug therapy: multidisciplinary management of lung cancer. NEJM 2004;350:379-92.
4. Schuchter LM, Hensley ML, Meropol NJ, et al. Update of recommendations for the use of chemotherapy and radiotherapy protectants: clinical practice guideline of the American Society of Clinical Oncology. J Clin Oncol 2002;20:2895.
5. Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomized clinical trials. BMJ 1995;311:899-909.
6. Ruckdeschel JC, Finkelstein DM, Mason BA, et al. Chemotherapy for metastatic non-small cell bronchogenic carcinoma: a randomized comparison of four cisplatin-based regimens. J Clin Oncol 1985;3:72-9.
7. Schiller JH, Hartrington D, Belani CP, et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small cell lung cancer. N Engl J Med 2002;346:92-8.
8. Sederholm C. Gemcitabine compared with gemcitabine plus carboplatin in advanced non-small cell lung cancer: a phase 3 study. Prog Proc Am Soc Clin Oncol 2002;21:291.
9. DElbaldo C, Michiels S, Syz N, et al. Benefits of adding a drug to a single-agent or a 2-agent chemotherapy regimen in advanced non-small-cell lung cancer. JAMA 2004;292:470-84.
10. Yang P, Ebbert JO, Sun Z, et al. Role of the glutathione metabolic pathway in lung cancer treatment and prognosis: a review. J Clin Oncol 2006; 24:1761-9.
11. 劉小平. 六君子湯治療慢性咳嗽 60 例報道. 甘肅中醫. 2001(6):15-16.
12. 張曉莉. 唐小云. 宋寶輝. 張紅軍. 劉亞威. 六君子湯上調小鼠免疫功能的機制. 細胞與分子免疫學雜誌. 2005: 784-785
13. 王進. 香砂六君子湯對化療不良反應的應用. 醫藥論譚雜誌. 2004(25): 60-61
14. 丁紀元. 孟昭琳. 黃氏四君子湯在晚期非小細胞肺癌化療中的應用. 浙

江中西醫結合雜誌. 2006(16): 28-29

15. Wislez M, Philippe C, Antoine M, et al. Upregulation of bronchioalveolar carcinoma-derived C-X-C chemokines by tumor infiltrating inflammatory cells. *Inflamm Res.*2004;53:4-12.
16. Tobias Sjöblom, Siân Jones, Laura D. Wood, et al. The Consensus Coding Sequences of Human Breast and Colorectal Cancers. *Science.*2006 Oct 13;314(5797)
17. Yang, P., Bamlet, W.R., Sun, Z., et al. Alpha1-antitrypsin and neutrophil elastase imbalance and lung cancer risk. *Chest.* 2005 Jul;128(1):445-52
18. Guillaume Dorothée, Hamid Echchakir, Béatrice Le Maux Chansac. et al. Functional and molecular characterization of a KIR3DL2/p140 expressing tumor-specific cytotoxic T lymphocyte clone infiltrating a human lung carcinoma. *Oncogene* (2003) 22, 7192–7198.

柒、圖、表

Table 1

GENE SYMBOL	CYTOBAND	DEFINITION
C1QA	1p36.12a	Homo sapiens complement component 1, q subcomponent, A chain (C1QA), mRNA.
GBP5	1p22.2c	Homo sapiens guanylate binding protein 5 (GBP5), mRNA.
IFI44L	1p31.1e	Homo sapiens interferon-induced protein 44-like (IFI44L), mRNA.
RGS1	1q31.2b	Homo sapiens regulator of G-protein signalling 1 (RGS1), mRNA.
SH2D2A	1q23.1a	Homo sapiens SH2 domain protein 2A (SH2D2A), mRNA.
FARSLB	2q36.1c	Homo sapiens phenylalanine-tRNA synthetase-like, beta subunit (FARSLB), mRNA.
IL8RA	2q35e	Homo sapiens interleukin 8 receptor, alpha (IL8RA), mRNA.
CAMP	3p21.31f	Homo sapiens cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP), mRNA.
EOMES	3p24.1c	Homo sapiens eomesodermin homolog (<i>Xenopus laevis</i>) (EOMES), mRNA.
CD38	4p15.32d	Homo sapiens CD38 molecule (CD38), mRNA.
FGFBP2	4p15.32d	Homo sapiens fibroblast growth factor binding protein 2 (FGFBP2), mRNA.
S100P	4p16.1f	Homo sapiens S100 calcium binding protein P (S100P), mRNA.
CYFIP2	5q33.3a-q33.3b	Homo sapiens cytoplasmic FMR1 interacting protein 2 (CYFIP2), transcript variant 3, mRNA.
PDGFRB	5q33.1c	Homo sapiens platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide (PDGFRB), mRNA.
CLIC1	6p21.33a	Homo sapiens chloride intracellular channel 1 (CLIC1), mRNA.
LTB	6p21.33a	Homo sapiens lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3) (LTB), transcript variant 2, mRNA.
NCR3	6p21.33a	Homo sapiens natural cytotoxicity triggering receptor 3 (NCR3), mRNA.
TUBB2A	6p25.2b	Homo sapiens tubulin, beta 2A (TUBB2A), mRNA.
CARD11	7p22.2b	Homo sapiens caspase recruitment domain family, member 11 (CARD11), mRNA.
PDK4	7q21.3b	Homo sapiens pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4 (PDK4), mRNA.
TMEM176A	7q36.1c	Homo sapiens transmembrane protein 176A (TMEM176A), mRNA.
DEFA4	8p23.1f	Homo sapiens defensin, alpha 4, corticostatin (DEFA4), mRNA.
CLIC3	9q34.3e	Homo sapiens chloride intracellular channel 3 (CLIC3), mRNA.
PTGDS	9q34.3e	Homo sapiens prostaglandin D2 synthase 21kDa (brain) (PTGDS), mRNA.
RALGDS	9q34.2a	Homo sapiens ral guanine nucleotide dissociation stimulator (RALGDS), transcript variant 1, mRNA.
TTC16	9q34.11a	Homo sapiens tetratricopeptide repeat domain 16 (TTC16), mRNA.
AKR1C3	10p15.1c	Homo sapiens aldo-keto reductase family 1, member C3 (3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type II) (AKR1C3), mRNA.
IFIT1	10q23.31b	Homo sapiens interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1 (IFIT1), transcript variant 2, mRNA.
GANAB	11q12.3a	Homo sapiens glucosidase, alpha; neutral AB (GANAB), transcript variant 2, mRNA.
HBD	11p15.4c	Homo sapiens hemoglobin, delta (HBD), mRNA.
HBG1	11p15.4c	Homo sapiens hemoglobin, gamma A (HBG1), mRNA.
HBG2	11p15.4c	Homo sapiens hemoglobin, gamma G (HBG2), mRNA.
NDUFV1	11q13.2a	Homo sapiens NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 1, 51kDa (NDUFV1), mRNA.
FKBP11	12q13.12a	Homo sapiens FK506 binding protein 11, 19 kDa (FKBP11), mRNA.
IFNG	12q15a	Homo sapiens interferon, gamma (IFNG), mRNA.
LAG3	12p13.31d	Homo sapiens lymphocyte-activation gene 3 (LAG3), mRNA.
BATF	14q24.3b	Homo sapiens basic leucine zipper transcription factor, ATF-like (BATF), mRNA.
GZMB	14q12a	Homo sapiens granzyme B (granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1) (GZMB), mRNA.
RNASE3	14q11.2c	Homo sapiens ribonuclease, RNase A family, 3 (eosinophil cationic protein) (RNASE3), mRNA.
TINF2	14q12a	Homo sapiens TERF1 (TRF1)-interacting nuclear factor 2 (TINF2), mRNA.
NUSAP1	15q15.1c	Homo sapiens nucleolar and spindle associated protein 1 (NUSAP1), transcript variant 2, mRNA.
GPR114	16q13c-q13d	Homo sapiens G protein-coupled receptor 114 (GPR114), mRNA.

HBA2	16p13.3f	Homo sapiens hemoglobin, alpha 2 (HBA2), mRNA.
MAF	16q23.1e	Homo sapiens v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian) (MAF), transcript variant 2, mRNA.
CCL4L2	17q12b	Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 4-like 2 (CCL4L2), mRNA.
FN3KRP	17q25.3h	Homo sapiens fructosamine-3-kinase-related protein (FN3KRP), mRNA.
MPO	17q22d	Homo sapiens myeloperoxidase (MPO), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.
RNF213	17q25.3e	Homo sapiens ring finger protein 213 (RNF213), mRNA.
ZNF18	17p12d	Homo sapiens zinc finger protein 18 (ZNF18), mRNA.
TYMS	18p11.32c	Homo sapiens thymidylate synthetase (TYMS), mRNA.
CEACAM8	19q13.2c	Homo sapiens carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8 (CEACAM8), mRNA.
ELA2	19p13.3i	Homo sapiens elastase 2, neutrophil (ELA2), mRNA.
GZMM	19p13.3j	Homo sapiens granzyme M (lymphocyte met-ase 1) (GZMM), mRNA.
KIR2DL3	19q13.42b	Homo sapiens killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 3 (KIR2DL3), transcript variant 1, mRNA.
KIR2DL4		Homo sapiens killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 4 (KIR2DL4), mRNA.
KIR2DS5		Homo sapiens killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 5 (KIR2DS5), mRNA.
KIR3DL2	19q13.42b	Homo sapiens killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 2 (KIR3DL2), mRNA.
NKG7	19q13.33d	Homo sapiens natural killer cell group 7 sequence (NKG7), mRNA.
RETN	19p13.2e	Homo sapiens resistin (RETN), mRNA.
BPI	20q11.23c	Homo sapiens bactericidal/permeability-increasing protein (BPI), mRNA.
CST7	20p11.21a	Homo sapiens cystatin F (leukocystatin) (CST7), mRNA.
C21ORF81	21q11.2b-q11.2c	Homo sapiens chromosome 21 open reading frame 81 (C21orf81), mRNA.
MX1	21q22.3a	Homo sapiens myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse) (MX1), mRNA.
APOBEC3G	22q13.1c	Homo sapiens apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G), mRNA.
APOBEC3H	22q13.1c	Homo sapiens apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3H (APOBEC3H), mRNA.
LGALS2	22q13.1a	Homo sapiens lectin, galactoside-binding, soluble, 2 (LGALS2), mRNA.
SH3BP1	22q13.1a	Homo sapiens SH3-domain binding protein 1 (SH3BP1), mRNA.

Table 2

GENE SYMBOL	CYTOBAND	DEFINITION
CLIC4	1p36.11c	Homo sapiens chloride intracellular channel 4 (CLIC4), mRNA.
CSF3R	1p34.3d	Homo sapiens colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte) (CSF3R), transcript variant 2, mRNA.
HIST2H2BE	1q21.2a	Homo sapiens histone cluster 2, H2be (HIST2H2BE), mRNA.
HIST2H3C	1q21.2a	Homo sapiens histone cluster 2, H3c (HIST2H3C), mRNA.
MPL	1p34.2a	Homo sapiens myeloproliferative leukemia virus oncogene (MPL), mRNA.
OPN3	1q43e	Homo sapiens opsin 3 (encephalopsin, panopsin) (OPN3), mRNA.
RGS18	1q31.2a	Homo sapiens regulator of G-protein signalling 18 (RGS18), mRNA.
RNF11	1p32.3e	Homo sapiens ring finger protein 11 (RNF11), mRNA.
TAGLN2	1q23.2c	Homo sapiens transgelin 2 (TAGLN2), mRNA.
CDC42EP3	2p22.2a	Homo sapiens CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3 (CDC42EP3), mRNA.
CYP1B1	2p22.2a	Homo sapiens cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1 (CYP1B1), mRNA.
FKSG30	2q21.1d	Homo sapiens actin-like protein (FKSG30), mRNA.
LIMS1	2q12.3c-q13a	Homo sapiens LIM and senescent cell antigen-like domains 1 (LIMS1), mRNA.
MOBK1B	2p13.1b	Homo sapiens MOB1, Mps One Binder kinase activator-like 1B (yeast) (MOBK1B), mRNA.
SDPR	2q32.3a	Homo sapiens serum deprivation response (phosphatidylserine binding protein) (SDPR), mRNA.
CRTAP	3p22.3c	Homo sapiens cartilage associated protein (CRTAP), mRNA.
FSTL1	3q13.33b	Homo sapiens follistatin-like 1 (FSTL1), mRNA.
HGD		Homo sapiens homogentisate 1,2-dioxygenase (homogentisate oxidase) (HGD), mRNA.
LTF	3p21.31i	Homo sapiens lactotransferrin (LTF), mRNA.
DAPP1	4q23b	Homo sapiens dual adaptor of phosphotyrosine and 3-phosphoinositides (DAPP1), mRNA.
PDE5A	4q27a	Homo sapiens phosphodiesterase 5A, cGMP-specific (PDE5A), transcript variant 1, mRNA.
PF4V1	4q13.3d	Homo sapiens platelet factor 4 variant 1 (PF4V1), mRNA.
PPBP	4q13.3d	Homo sapiens pro-platelet basic protein (chemokine (C-X-C motif) ligand 7) (PPBP), mRNA.
ELOVL7	5q12.1b	Homo sapiens ELOVL family member 7, elongation of long chain fatty acids (yeast) (ELOVL7), mRNA.
POLR3G	5q14.3g	Homo sapiens polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide G (32kD) (POLR3G), mRNA.
RUFY1	5q35.3d	Homo sapiens RUN and FYVE domain containing 1 (RUFY1), mRNA.
SPARC	5q33.1d	Homo sapiens secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin) (SPARC), mRNA.
CCDC90A	6p23b	Homo sapiens coiled-coil domain containing 90A (CCDC90A), mRNA.
DKFZP686I15217	6p25.2b	Homo sapiens hypothetical protein DKFZp686I15217 (DKFZp686I15217), mRNA.
HIST1H2AC	6p22.1d	Homo sapiens histone cluster 1, H2ac (HIST1H2AC), mRNA.
HIST1H2AD	6p22.1d	Homo sapiens histone cluster 1, H2ad (HIST1H2AD), mRNA.
HIST1H2AG	6p22.1c	Homo sapiens histone cluster 1, H2ag (HIST1H2AG), mRNA.
HIST1H2BH	6p22.1d	Homo sapiens histone cluster 1, H2bh (HIST1H2BH), mRNA.
HIST1H2BJ	6p22.1c	Homo sapiens histone cluster 1, H2bj (HIST1H2BJ), mRNA.
HIST1H3F	6p22.1d	Homo sapiens histone cluster 1, H3f (HIST1H3F), mRNA.
HIST1H3H	6p22.1c	Homo sapiens histone cluster 1, H3h (HIST1H3H), mRNA.
HLA-DRB1	6p21.32b	Homo sapiens major histocompatibility complex, class II, DR beta 1 (HLA-DRB1), mRNA.
HLA-DRB5	6p21.32b	Homo sapiens major histocompatibility complex, class II, DR beta 5 (HLA-DRB5), mRNA.
LOC401233	6p25.2b	Homo sapiens similar to HIV TAT specific factor 1; cofactor required for Tat activation of HIV-1 transcription (LOC401233), mRNA.
GNG11	7q21.3a	Homo sapiens guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 11 (GNG11), mRNA.
NT5C3	7p14.3c-p14.3b	Homo sapiens 5'-nucleotidase, cytosolic III (NT5C3), transcript variant 1, mRNA.

PRKAR2B	7q22.3b	Homo sapiens protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta (PRKAR2B), mRNA.
PTPN12	7q11.23g	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 12 (PTPN12), mRNA.
YWHAG	7q11.23e-q11.23f	Homo sapiens tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, gamma polypeptide (YWHAG), mRNA.
ZNF679	7q11.21c	Homo sapiens zinc finger protein 679 (ZNF679), mRNA.
CA2	8q21.2b	Homo sapiens carbonic anhydrase II (CA2), mRNA.
TCEA1	8q11.23d	Homo sapiens transcription elongation factor A (SII), 1 (TCEA1), transcript variant 1, mRNA.
GNAQ	9q21.2a-q21.2b	Homo sapiens guanine nucleotide binding protein (G protein), q polypeptide (GNAQ), mRNA.
PTGS1	9q33.2b	Homo sapiens prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase) (PTGS1), transcript variant 1, mRNA.
PGAM1	10q24.1b	Homo sapiens phosphoglycerate mutase 1 (brain) (PGAM1), mRNA.
JAM3	11q25d	Homo sapiens junctional adhesion molecule 3 (JAM3), mRNA.
NRGN	11q24.2a	Homo sapiens neurogranin (protein kinase C substrate, RC3) (NRGN), mRNA.
ACRBP	12p13.31d	Homo sapiens acrosin binding protein (ACRBP), mRNA.
DUSP6	12q21.33a	Homo sapiens dual specificity phosphatase 6 (DUSP6), transcript variant 1, mRNA.
RPLP0	12q24.31a	Homo sapiens ribosomal protein, large, P0 (RPLP0), transcript variant 1, mRNA.
TSPAN9	12p13.33a-p13.32b	Homo sapiens tetraspanin 9 (TSPAN9), mRNA.
VWF	12p13.31e	Homo sapiens von Willebrand factor (VWF), mRNA.
TSC22D1	13q14.11e	Homo sapiens TSC22 domain family, member 1 (TSC22D1), transcript variant 2, mRNA.
CHURC1	14q23.3a	Homo sapiens churchill domain containing 1 (CHURC1), mRNA.
ADAM10	15q22.1b	Homo sapiens ADAM metallopeptidase domain 10 (ADAM10), mRNA.
SNURF	15q11.2e	Homo sapiens SNRPN upstream reading frame (SNURF), transcript variant 1, mRNA.
THBS1	15q14d	Homo sapiens thrombospondin 1 (THBS1), mRNA.
NOMO1	16p13.11b	Homo sapiens NODAL modulator 1 (NOMO1), mRNA.
ABCC3	17q21.33b	Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3 (ABCC3), transcript variant MRP3B, mRNA.
ACTG1	17q25.3f	Homo sapiens actin, gamma 1 (ACTG1), mRNA.
MMD	17q22b	Homo sapiens monocyte to macrophage differentiation-associated (MMD), mRNA.
CABP5	19q13.32c	Homo sapiens calcium binding protein 5 (CABP5), mRNA.
CD93	20p11.21c	Homo sapiens CD93 molecule (CD93), mRNA.
SLC24A3	20p11.23c-p11.23b	Homo sapiens solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 3 (SLC24A3), mRNA.
TNNC2	20q13.12b	Homo sapiens troponin C type 2 (fast) (TNNC2), mRNA.
TUBB1	20q13.32b	Homo sapiens tubulin, beta 1 (TUBB1), mRNA.
C21ORF7	21q21.3c	Homo sapiens chromosome 21 open reading frame 7 (C21orf7), mRNA.
WRB	21q22.2b	Homo sapiens tryptophan rich basic protein (WRB), mRNA.
GNAZ	22q11.22b	Homo sapiens guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha z polypeptide (GNAZ), mRNA.
PVALB	22q12.3d	Homo sapiens parvalbumin (PVALB), mRNA.

Table 3

GENE SYMBOL	CYTOBAND	DEFINITION
HIST1H2AC	6p22.1d	Homo sapiens histone cluster 1, H2ac (HIST1H2AC), mRNA.
DEFA4	8p23.1f	Homo sapiens defensin, alpha 4, corticostatin (DEFA4), mRNA.
HBD	11p15.4c	Homo sapiens hemoglobin, delta (HBD), mRNA.
HBG1	11p15.4c	Homo sapiens hemoglobin, gamma A (HBG1), mRNA.
HBG2	11p15.4c	Homo sapiens hemoglobin, gamma G (HBG2), mRNA.
ELA2	19p13.3i	Homo sapiens elastase 2, neutrophil (ELA2), mRNA.
KIR3DL2	19q13.42b	Homo sapiens killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 2 (KIR3DL2), mRNA.

Table 4 Microarray gene expression significantly altered in leukocytes of patients with lung cancer

Gene	Chromosome	Mean expression		Fold change	p value	q value
		Lung cancer, n = 32	Healthy subjects, n = 20			
Up-regulated						
IFNB1	9	209.1	14.7	14.22	0.0021	0.0031
JOSD2		111.7	16.6	6.73	0.0002	<0.0001
KIT		91.9	13.9	6.55	0.0025	0.0032
C20orf149	20	123.6	19.7	6.37	0.0008	0.0018
IRBDC3	1	142.4	22.7	6.27	<0.0001	<0.0001
TRIM4	7	820.8	133.6	6.14	<0.0002	<0.0001
PRKAR2B	7	91.7	15.1	6.07	0.0046	0.0051
PLOD2	3	54.9	9.1	6.03	0.0082	0.0082
FAM100A		136.4	24.6	5.54	0.0021	0.0031
IMPG2	3	80.6	16.7	4.82	0.0001	0.0001

Table 5 Microarray gene expression significantly altered in leukocytes of lung cancer patients staged 4 versus 3b

Gene	Chromosome	Mean expression		Fold change	P value	q value
		Stage 4, n = 17	Stage 3b, n = 15			
Up-regulated						
DDEF2	2	136.9	33.8	4.05	0.0085	0.0085
MMD	17	3390.6	912	3.72	0.0084	0.0085
FPRL2	19	67.6	18.6	3.63	0.0002	0.001
C21ORF7	21	4917.8	1521.7	3.23	0.0072	0.0085
PPM1A	14	46.4	18.8	2.46	0.0038	0.0076
MS4A3	11	166.5	68.3	2.43	0.0068	0.0085
TMEM51	1	113	46.6	2.42	0.0059	0.0085
Down-regulated						
BIK	22	18.2	49.8	2.73	0.0024	0.006
AEBP1	7	24.8	63.9	2.57	0.0019	0.006
WNT10A	2	22.7	51.8	2.28	0.0002	0.001

Table 6 Microarray gene expression significant altered in leukocytes of lung cancer patients developing neutropenia after chemotherapy with cisplatin and gemcitabine

Gene	Chromosome	Mean expression		Fold change	p value	q value
		Neutropenia n = 8	No neutropenia n = 9			
Up-regulated						
C1orf187	1	51.3	14.4	3.56	0.0048	0.0094
PODN	1	107.4	45	2.38	0.0003	0.003
Down-regulated						
FLJ90757	17	18.7	69.1	3.69	0.0088	0.0094
ARL6IP4	12	36.6	119.3	3.25	0.0094	0.0094
ANKRD50	4	37.4	114	3.04	0.0021	0.007
ANKFY1		21.6	62.8	2.9	0.0015	0.007
ATP2B1	12	47	132.6	2.82	0.0094	0.0094
RBM16	6	132.1	337.9	2.55	0.0094	0.0094
FLJ20186	16	35.9	87.4	2.43	0.0033	0.0082
SLC2A5	1	23.8	57.6	2.42	0.0088	0.0094

Table 7 Microarray gene expression significantly altered in leukocytes after chemotherapy with Cisplatin and Gemcitabin for patients with advanced lung cancer

Gene	Chromosome	Mean expression		Fold change	p value	q value
		After C/T, n = 8	Before C/T, n = 8			
Up-regulated						
HMMR	5	81.1	10.9	7.44	0.0006	0.0024
Down-regulated						
PRH1	12	0.6	19.6	32.66	0.003	0.0033
SLC16A11	17	2.4	39	16.25	0.0004	0.0024
C17orf65	17	4.7	75	15.95	0.0028	0.0033
BPIL3	20	0.9	12.5	13.88	0.0033	0.0033
CIZ1	9	3.7	48.5	13.1	0.0022	0.0031
C16orf46	16	1.8	19.1	10.61	0.0008	0.0024
PLK3	1	6.4	65.3	10.2	0.001	0.0024
CAMTA2	17	8.4	52.7	6.27	0.0012	0.0024
CNP	17	2.6	15	5.76	0.0017	0.0028

Table 8 Microarray gene expression significantly altered in leukocytes after chemotherapy with cisplatin and gemcitabin plus Chinese Medicine (liu jun zi tang) for patients with advanced stage lung cancer

Gene	Chromosome	Mean expression		Fold change	p value	q value
		After treatment, n = 9	Before treatment, n = 9			
Upregulated						
CA1	8	1294.7	198.1	6.53	0.0078	0.0091
OR52A4	11	47.2	17.6	2.68	0.0092	0.0092
Down-regulated						
ADCY9	16	26.5	88	3.32	0.0016	0.009
MGC52282	16	73.8	214.8	2.91	0.0074	0.009
KIR3DL1		78.4	226.9	2.89	0.0081	0.009
LTBP4		64.6	182.6	2.82	0.0046	0.009
CLDND2	19	28	78.2	2.79	0.0027	0.009
MMP23A	1	58.6	154.6	2.63	0.0077	0.009
B3GAT3	11	46.2	118.1	2.55	0.0072	0.009
INTS5	11	52.5	123	2.34	0.008	0.009

Table 9 Microarray gene expression significantly altered in leukocytes after adding Chinese Medicine (liu jun zi tang) for patients with advanced stage lung cancer treated with chemotherapy(C/T) of cisplatin and gemcitabin

Gene	Chromosome	Mean expression		Fold change	p value	q value
		C/T plus CM, n = 9	C/T alone, n = 8			
Up-regulated						
C15orf26		109.1	23	4.74	0.0158	0.049
PBPMS2	15	724.6	181	4.0	0.0459	0.049
DAB2		515.3	178.3	2.89	0.0287	0.049
SCGB1C1		123.3	47.8	2.57	0.0434	0.049
CREB5	7	190.8	80.7	2.36	0.039	0.049
PGAP1	2	47.9	20.8	2.3	0.0193	0.049
Down-regulated						
BLK	8	71.5	202	2.82	0.049	0.049
VPREB3	22	185.7	444.2	2.39	0.0183	0.049
LAIR2	19	638.2	1515.8	2.37	0.0331	0.049
PDZD4		86.4	202.3	2.34	0.0392	0.049

Figure 1

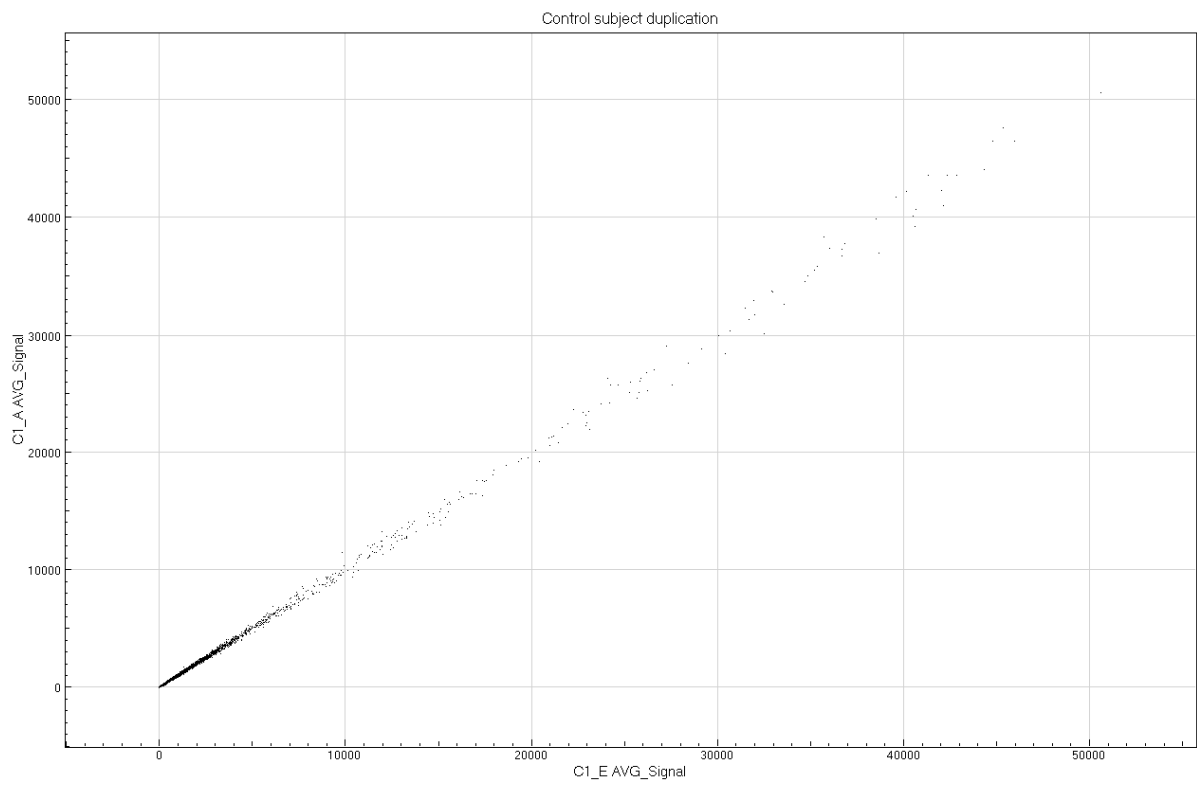


Figure 2

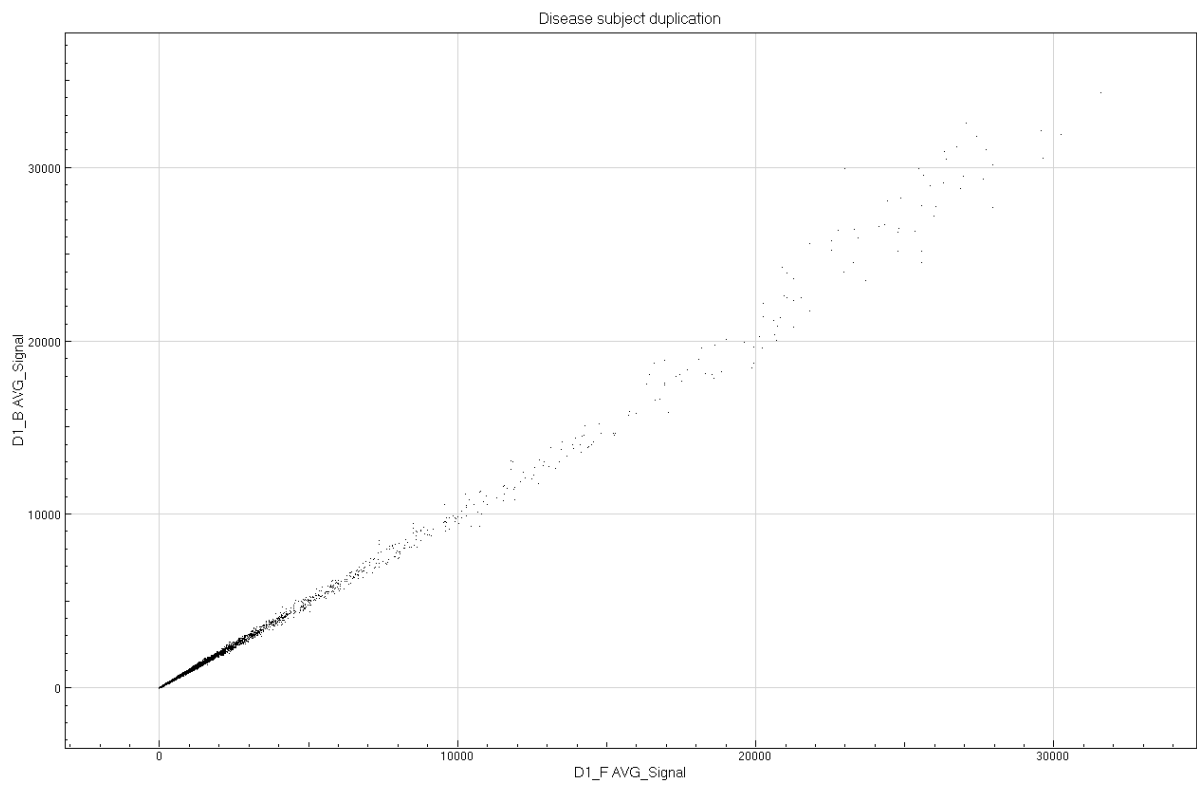


Figure 3

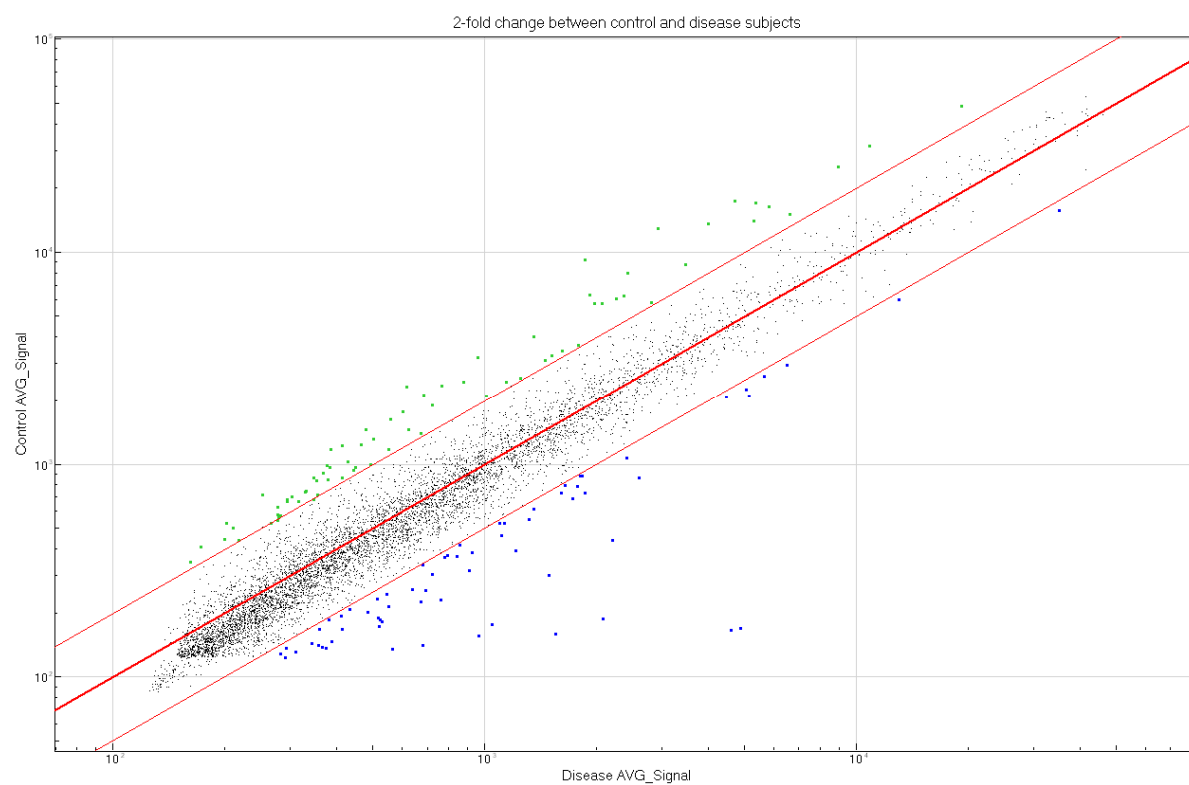


Figure 4

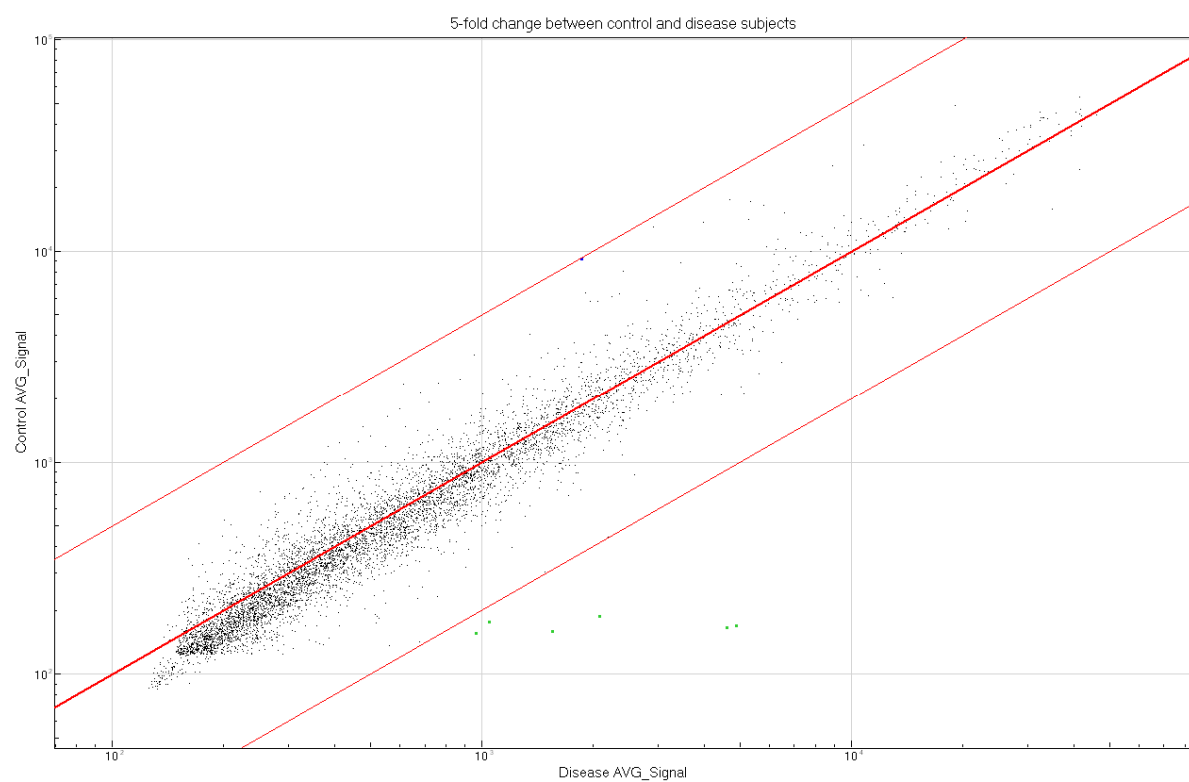


Figure 5

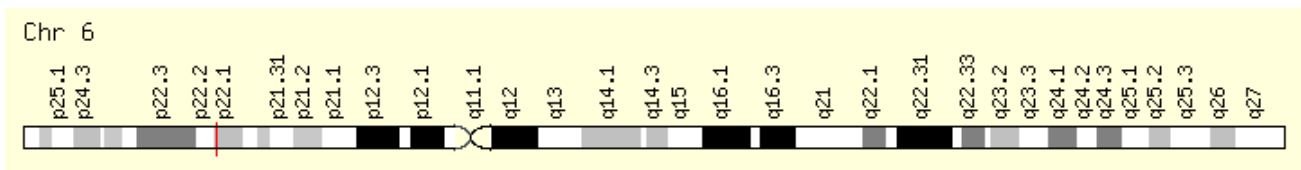


Figure 6

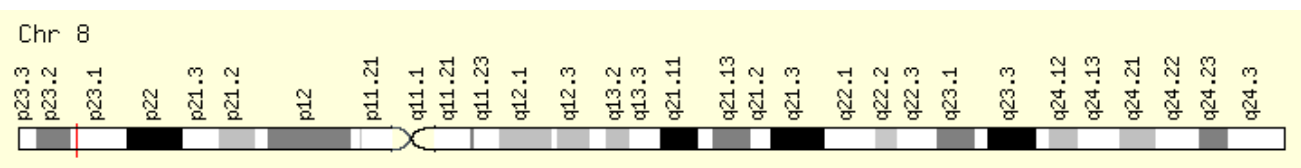


Figure 7

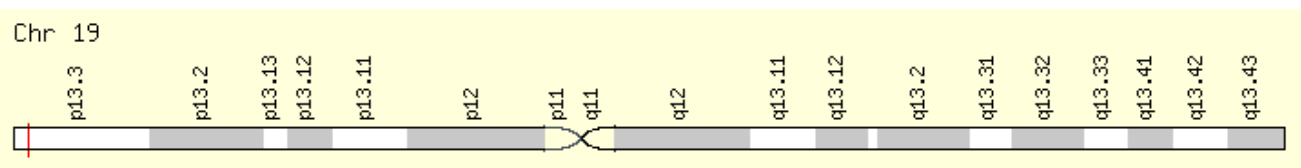


Figure 8

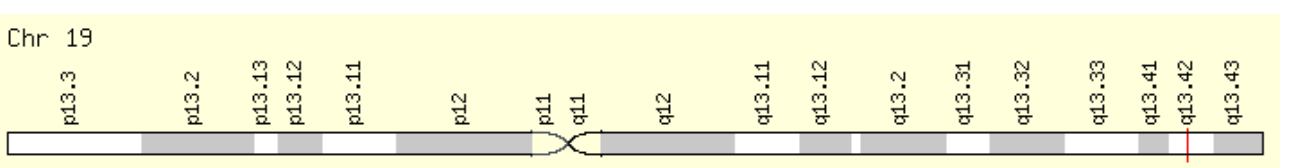


Figure 9

