

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

維生素 B-6 及葉酸與大腸直腸息肉患者的基因多型性、抗氧化活性
及甲基化作用關係的探討

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 97-2320-040-031-MY3

執行期間：2008 年 8 月 1 日至 2011 年 7 月 31 日

執行機構及系所：中山醫學大學營養系

計畫主持人：黃怡嘉 教授

共同主持人：林俊哲 醫師、陳丹霞 醫師

計畫參與人員：陳芳霈 博士生

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

本計畫除繳交成果報告外，另須繳交以下出國心得報告：

赴國外出差或研習心得報告

赴大陸地區出差或研習心得報告

出席國際學術會議心得報告

國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除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

中 華 民 國 100 年 10 月 20 日

中文摘要

大腸直腸癌目前已為台灣十大癌症死亡的第三名。腺瘤性息肉已被認為是發生大腸直腸癌的前身。葉酸與維生素 B₆ 被認為在大腸直腸息肉形成中扮演重要角色。本計劃的主要目的為：1) 觀察及比較大腸直腸增殖性息肉及腺瘤性息肉受試者的維生素 B₆ 及葉酸的營養狀況、抗氧化酵素活性的差異性。2) 探討維生素 B₆ 及葉酸的營養狀況與大腸直腸息肉受試者的抗氧化酵素活性的關係。3) 探討維生素 B₆ 及葉酸的營養狀況與罹患大腸直腸息肉的危險對比值。4) 評估及比較給予大腸直腸腺瘤性息肉受試者單獨維生素 B₆ 或葉酸補充或合併補充後對抗氧化功能及 DNA 甲基化程度的差異及影響。

本研究設計方法是以醫院為基礎的橫斷面、病例-對照及隨機雙盲的補充劑介入試驗。本研究於中山醫學大學附設醫院肝膽胃腸科募集大腸直腸息肉受試者 (n = 48) 及經年齡-性別配對之後的健康受試者 (n = 96)，並進一步詢問息肉受試者是否參加介入研究。介入研究將於受試者接受息肉切除後且經臨床醫師評估同意後進行。最後有 24 位受試者接受 12 週介入研究，並隨機分成以下三組，：1) 100 mg/d 維生素 B₆，n = 9；2) 5 mg/d 葉酸，n = 9 及 3) 維生素 B₆ (100 mg/d) 合併葉酸 (5 mg/d)，n = 6。大腸直腸息肉受試者的血液採集將於接受息肉切除後採集。參加介入研究的受試者的空腹血液採集將於第 0、4、12 週進行，血液樣本將進行臨床血液生化值 (白蛋白、肌酸酐、鹼性磷酸酶和高敏感度 C-反應蛋白) 及生化檢驗值 (血漿與紅血球磷酸比哆醛、血清與紅血球葉酸、血清維生素 B₁₂ 及同半胱胺酸) 的分析，萃取 DNA 檢測 DNA 甲基化作用，及測定氧化壓力程度、脂質過氧化及抗氧化酵素活性。

在橫斷面試驗的部分，本研究發現血漿同半胱胺酸濃度對於大腸直腸息肉有顯著影響，在調整相關影響因子之後，影響依然顯著 (OR, 2.23; 95% CI, 1.23-4.03)。而 B-維生素營養狀況皆對罹患大腸直腸息肉無顯著影響。在不同型態的腺瘤性息肉或增生性息肉之間，兩組之臨床血液生化值、生化檢驗值、脂質過氧化、維生素 B₆ 營養狀況及抗氧化酵素活性皆無顯著差異。進行 12 週的介入試驗後，無論是接受 100 mg/d 維生素 B₆，5 mg/d 葉酸或兩者同時補充的受試者，在臨床生化值，生化檢驗值，脂質過氧化程度及抗氧化酵素活性，三組間皆無顯著差異。可能是因為樣本數太小無法觀察到顯著影響。

本研究認為，血漿同半胱胺酸為大腸直腸息肉的獨立危險因子。並且給予 5 mg 葉酸介入 12 週後，可顯著降低血漿同半胱胺酸濃度。

關鍵詞：大腸直腸息肉、維生素 B₆、葉酸、DNA 甲基化程度、抗氧化活性

英文摘要

Colorectal cancer is now the third leading cause of cancer mortality among men and women in Taiwan. Colorectal adenomas are considered precursors of colorectal cancer, prevention of colorectal adenomas may decrease the occurrence of colorectal cancer. Vitamin B₆ and folate may play a critical role in the colorectal polyps progression. The specific aims of this proposal are: 1) to compare folate and vitamin B₆ status between colorectal hyperplastic polyps adenomatous polyps; 2) to compare and evaluate folate and vitamin B₆ status in relation to oxidative stress, antioxidant activities; 3) to evaluate the effect of vitamin B₆ and folate status on the risk of colorectal polyps; 4) to evaluate whether folic acid and/or pyridoxine supplementation had a beneficial effect on reducing oxidative stress, increasing antioxidant function and DNAmethylation in patients with colorectal adenomas.

This study was an observational case-control design. Forty-eight participants with colorectal polyps [29 adenomatous polyps , 19 hyperplastic polyps (HP)] and 96 age-, sex-matched healthy participants who met the inclusion criteria were recruited from Chung Shan Medical University Hospital and Taichung General Veterans Hospital. Fasting blood was drawn from each participant to measure hematological and biochemical parameters (plasma and erythrocytes pyridoxal 5'-phosphate (PLP), serum and erythrocytes folate, serum vitamin B₁₂, and plasma homocysteine). Subjects with polyps were blinded and randomly assigned to either the 1) 100 mg/d vitamin B₆ (n = 9); 2) 5 mg/d folic acid group (n=9); or 3) vitamin B₆ (100 mg/d) plus folic acid (5 mg/d)(n=6) for 12 weeks.

Participants with AP and HP had significantly higher plasma homocysteine levels than did healthy participants. There was no significant difference in serum folate and vitamin B₁₂ and plasma PLP among the three groups. B-vitamins had no significant effect on the risk of developing colorectal polyps. However, participants with higher plasma homocysteine (OR, 2.23; 95% CI, 1.23-4.03) level exhibited significantly increased risk of developing colorectal polyps after adjusting for body mass index, diastolic blood pressure, total cholesterol and B-vitamins. There were no significant effect on DNA methylation, oxidative stress, antioxidant enzymatic activities, TBARS and oxidized low density lipoprotein levels among three groups after treated either vitamin B₆ or folic acid supplements. However, plasma homocysteine level has reduced by 14.2% in the folic acid group.

In conclusion, plasma homocysteine was a strong predictor for risk of developing colorectal polyps in subjects with adequate B-vitamins status. Treatment with 5 mg/d folic acid 12 weeks could significantly decrease plasma homocysteine level.

Keywords: colorectal polyps, vitamin B₆, folate, DNA methylation, antioxidant activities

前言

台灣的大腸直腸癌死亡率節節攀升，目前已是台灣地區男性及女性主要癌症死亡原因第三名。一般認為大腸直腸癌是由大腸的良性息肉，慢慢經年累月成長及癌化所造成。常見的大腸直腸息肉分別為增殖性息肉(hyperplastic polyps) 及腺瘤性息肉 (adenomatous polyps)。隨著息肉的變大，其發生癌化的比例也增加。大腸直腸息肉發生的原因雖然目前尚未十分清楚，不過可能與遺傳或營養素攝取有關，其中葉酸與維生素 B₆ 和大腸直腸息肉形成的關係是非常值得探討的課題。

維生素 B₆ 與葉酸缺乏被認為與許多癌症形成有顯著負相關，例如前列腺癌，肺癌，大腸直腸癌等 (Hartman et al., 2001; Wei et al., 2005; Larsson et al., 2005; Giovannucci et al., 1995; Choi & Mason, 2000)。Wei 等人 (2005) 在 Nurses' Health Study 的世代研究以鳥巢式病例對照 (nested case-control) 研究也觀察到高血漿磷酸比哆醇濃度與大腸直腸癌發生率呈顯著負相關 (RR, 0.42; 95% CI, 0.21 – 0.85)；即使調整葉酸，綜合維他命及甲硫胺酸 (methionine) 攝取量，顯著相關性依然存在 (RR, 0.38; 95% CI, 0.18 – 0.80)。葉酸在大腸直腸腫瘤生成占了相當重要的角色 (Mason & Choi, 2000; Eichholzer et al., 2001)，葉酸營養狀況也會影響大腸直腸腺瘤性息肉的形成及再發生。Kim 等人 (1998) 指出大腸直腸腺瘤性息肉患者的腸黏膜葉酸濃度顯著低於增殖性息肉的患者約 34% ($p = 0.006$)。Martinez 等人 (2004) 也發現若受試者有較高的葉酸攝取量 (4th quartile) 或血漿葉酸濃度 (4th quartile) 其大腸直腸腺瘤性息肉再發生的勝算比只有葉酸攝取較少或血漿葉酸濃度較低 (1st quartile) 的受試者的 0.61 倍 (OR, 0.61; 95% CI, 0.42 – 0.89; p for trend = 0.01) 及 0.66 倍 (OR, 0.66; 95% CI, 0.46 – 0.97; p for trend = 0.04)。因此，維生素 B₆ 及葉酸營養狀況可能在大腸直腸息肉形成過程中扮演相當重要角色。

維生素 B₆ 與葉酸在單碳代謝中也扮演重要角色。維生素 B₆ 在合成 5,10-亞甲基四氫葉酸時作為絲胺酸羥基甲基轉移酶 (serine hydroxymethyltransferase, SHMT) 的依賴性輔酶，而 5,10-亞甲基四氫葉酸則是合成核酸所必須，且亞甲基四氫葉酸轉變成的醛基葉酸 (10-formyl-tetrahydrofolate)，則被當成單碳分子的傳遞者 (圖 1)。以動物研究模式發現維生素 B₆ 缺乏會降低單碳代謝作用的進行 (Martinez et al., 2000; Scheer et al., 2005)。而 Kim 等人 (2001) 所執行的一項前瞻性研究，將 20 位接受幽門切除術後的腺瘤病人隨機分派到服用一年 5 mg/d 的葉酸補充劑或是安慰劑；分別在 6 個月及 1 年後發現服用葉酸補充劑的病人顯著增加 DNA 甲基化作用 ($p = 0.001$)。因此，若給予維生素 B₆ 及葉酸補充或許能改善大腸直腸息肉受試者體內甲基化作用。

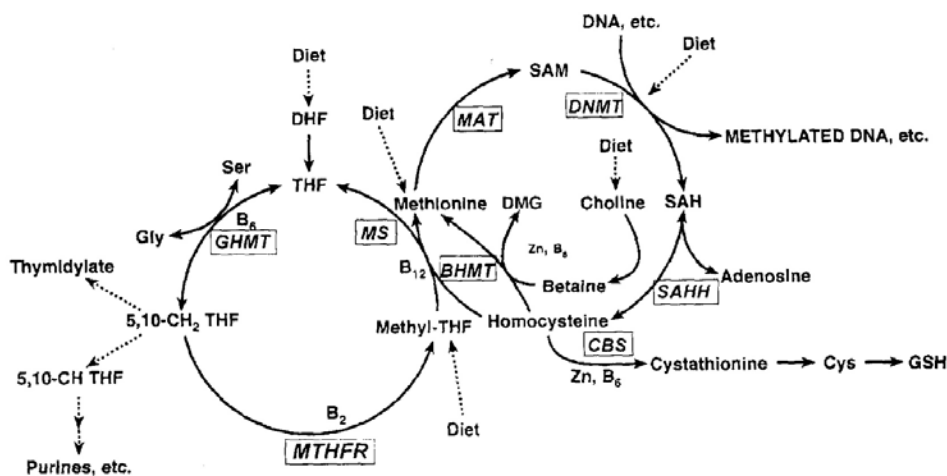


圖 1. Dietary factors, enzymes, and substrates involved in homocysteine and one-carbon metabolism. (Adapted from Davis & Uthus, 2004)

腸胃道，尤其是大腸直腸，因為內生性及外生性的物質來源，經常暴露於高的氧化壓力環境下 (Blau et al., 1999)。Reactive oxygen species (ROS) 為氧分子代謝後的產物，當細胞外過多的 ROS 形成過高的氧化壓力環境，則會造成基因調控失調及細胞傷害，因而導致細胞不正常的增生及癌細胞的形成 (Babbs, 1990)。研究指出大腸直腸癌患者組織的脂質過氧化程度，包括 lipid peroxides (2.78 ± 0.31 vs. 1.81 ± 0.29 nmol/mg) 及 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (0.86 ± 0.1 vs. 0.54 ± 0.08 nmol/mg) 的值均顯著高於健康受試者 (Rainis et al., 2007)。若能增加大腸直腸息肉受試者的抗氧化壓力能力，或許能預防或降低癌化的形成。同半胱氨酸 (homocysteine) 代謝中的轉硫作用經由胱硫醚 β 合成酶 (cystathionine β -synthase, CBS) 催化絲胺酸 (serine) 轉成胱硫醚 (cystathionine)，進而由胱硫醚分解酶 (cystathionase) 水解成半胱氨酸 (cysteine)。胱硫醚 β 合成酶需要磷酸吡哆醛做為輔酶 (coenzyme)，故為磷酸吡哆醛依賴型酵素。半胱氨酸轉化成穀胱甘肽 (glutathione, GSH)，而穀胱甘肽是麩胱甘肽硫轉移酶 (glutathione S-transferase, GST) 及麩胱甘肽過氧化酶 (glutathione peroxidase, GSH Px) 的重要輔因子 (cofactor)，此兩個酵素為人體重要的抗氧化酵素，其功能包括去除許多致腫瘤化合物的毒性及保護細胞免於氧化壓力的傷害 (Hayes & McLellan, 1999; Matsubara et al., 2003)。大腸直腸息肉受試者可能會因有較低的維生素 B₆ 營養狀況而影響 GSH 的合成，進而影響 GST 及 GSH Px 執行抗氧化壓力的能力。因此。若給予大腸直腸息肉患者維生素 B₆ 補充或許能增加大腸直腸腺瘤性息肉受試者的的抗氧化活性。

因此本研究分成以下兩部分進行探討

【第一部分】

研究目的

1. 觀察及比較大腸直腸增殖性息肉及腺瘤性息肉受試者的維生素 B₆ 及葉酸的營養狀況、抗氧化酵素活性的差異性。
2. 探討維生素 B₆ 及葉酸的營養狀況與大腸直腸息肉受試者的抗氧化酵素活性的關係。
3. 觀察及比較大腸直腸腺瘤性息肉受試者與年齡、性別配對後的健康受試者的維生素 B₆ 及葉酸的營養狀況、抗氧化酵素活性的差異性。
4. 探討維生素 B₆ 及葉酸的營養狀況與罹患大腸直腸息肉的危險對比值。

材料與方法

受試者

參與本研究之受試者是由中山醫學大學附設醫院胃腸科招募大腸直腸息肉受試者。納入條件為：1) 受試者須年滿 18 歲；且 2) 曾經接受大腸直腸鏡檢查並經過醫生診斷有大腸直腸息肉；且 3) 診斷條件為有一顆以上的腺瘤存在。病人若有以下條件將排除在本研究外：1) 大腸直腸癌患者；2) 曾經有大腸直腸癌病史；3) 家族性腺瘤性息肉症 (attenuated adenomatous polyposis coli)；3) 發炎性腸道疾病 (inflammatory bowel disease)；5) 代謝相關疾病 (如肝腎疾病)；6) 服用非固醇類抗發炎藥物或葉酸阻抗性藥物 (如：sulfasalazine, methotrexane)；7) 懷孕或哺乳；或 8) 貧血或維生素 B₁₂ 缺乏症 (血清維生素 B₁₂ < 200 pg/mL)。

資料收集

1) 基本資料

基本資料內容包括年齡、性別、抽菸習慣、酒精攝取量、家族病史及運動頻率。測量受試者的身高、體重、腰圍及臀圍，並計算受試者的身體質量指數 (body mass index, BMI; kg/m^2)。在受試者休息至少五分鐘後測量血壓。若血壓 $\geq 140/90$ mmHg 或者最近有服用抗高血壓藥物者則定義為高血壓。另外紀錄其息肉切片組織相關資料，包括：病史、位置、數目、大小及組織型態 (villous, tubular 或 tubulovillous)。

2) 飲食紀錄

所有受試者將在空腹抽血後以 24 小時飲食回憶問卷紀錄其飲食攝取狀況。若受試者有服用任何營養補充劑，將會記錄其品牌、種類、劑量、及攝取頻率，並併入營養素總攝取量。

臨床血液生化值

使用不含及含有抗凝血劑 (EDTA 或 sodium citrate) 之真空採血管 (Becton Dickinson, Rutherford, NJ) 採集每位受試者 20 mL 的空腹血液，進行下列各項生化分析：肌酸酐 (creatinine)，高敏感度 C-反應蛋白 (high sensitivity CRP, hs-CRP)，禁食血糖，總膽固醇 (Total cholesterol, TC)，三酸甘油脂 (Triglyceride, TG)，高密度脂蛋白膽固醇 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)，低密度脂蛋白膽固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)。

血漿磷酸比哆醛濃度

血漿 PLP 及紅血球 PLP 參考 Talwar 等人(2003)的方法以高效能液相層析 (high performance liquid chromatography, HPLC) 分析。

血清葉酸濃度

血清葉酸濃度利用免疫競爭法分析，於室溫下進行化學發光的技術 (immunochemiluminometric methods)，採用專門分析葉酸的 kit 分析 (Chiron Diagnostics ACS:180 Automated Chemiluminescence Systems; Chiron Diagnostics Corporation, East Walpole, MA, USA)。紅血球葉酸則是使用放射性葉酸測定 kit 進行分析 (Bio-Rad, New England Nuclear (NEN), and RIA Products)。

血清維生素 B₁₂ 濃度

血清維生素 B₁₂ 將蛋白質結合競爭性放射 kits 分析 (Chiron Diagnostics Corporation, East Walpole, MA, USA)。

血漿同半胱胺酸之濃度

參考 Araki 及 Sako (1987) 的方法，以 HPLC 來測量血漿同半胱胺酸的含量。

統計分析

所有的資料皆由 SAS statistical software (version 9.12; SAS Institute, Cary, NC, USA) 的統計軟體執行分析。利用 one way analysis of variance 或是 Kruskal-Wallis one way analysis

of variance on ranks 比較腺瘤性息肉組、增生性息肉組及控制組間之體位測量值、臨床血液生化值及生化檢測值之差異性。類別變相則是利用卡方檢定 (chi-square test) 分析。

以 multiple linear regression analyses 分析血漿同半胱胺酸與/或 PLP、葉酸、及維生素 B₁₂ 對於大腸直腸息肉數目的影響，並進一步調整年齡及性別。以 conditional logistic regression model 分析血漿同半胱胺酸、PLP、葉酸、及維生素 B₁₂ 對罹患大腸直腸息肉的 odds ratio (ORs)，並計算信賴區間 (confidence intervals, CI) 表示相關強度及統計顯著性。

統計結果以 $p < 0.05$ 時具有統計上的意義。所有的資料將以 means \pm standard deviation (SD) 表示。

結果

本研究總共募集了 48 位大腸直腸息肉受試者 (12 女性, 36 位男性)。有 29 位受試者為腺瘤性息肉, 19 位受試者為增生性息肉。經過年齡性別配對後的控制組與息肉受試者之基本資料、體位測量等資料列於 Table 1。控制組的血壓顯著低於息肉受試者。

所有受試者的血液生化值、血漿同半胱胺酸濃度及 B-維生素營養狀況皆列於 Table 2。無論是腺瘤性息肉或增生性息肉受試者, 血脂情況皆較控制組差 (三較高的三酸甘油脂、總膽固醇及 LDL-C 濃度, 較低的 HDL-C 濃度)。此外, 相較於控制組, 息肉受試者罹患高同半胱胺酸血症的比例較高。然而, 血清 hs-CRP, 葉酸及維生素 B₁₂ 濃度在三組間皆無顯著差異。

由於腺瘤性息肉及增生性息肉兩組受試者之體位測量及健康狀況皆無顯著差異, 因此將兩組受試者合併為一組, 進一步分析血漿同半胱胺酸濃度, 抽菸情形, 及 B-維生素營養狀況與大腸直腸息肉數目之間的相關性。結果列於 Table 3。血漿同半胱胺酸濃度與抽菸情形與大腸直腸息肉數目有顯著正相關, 但是調整了相關影響因子後, 血漿同半胱胺酸濃度與息肉數目仍有顯著相關性, 反之, 抽菸情形與大腸直腸息肉數目的相關性則消失。血清葉酸、維生素 B₁₂ 及 PLP 濃度皆與息肉數目無關。

Table 4 則是呈現血漿同半胱胺酸濃度及 B-維生素營養狀況 (血清葉酸、維生素 B₁₂ 及 PLP 濃度) 對罹患大腸直腸息肉的影響。血漿同半胱胺酸濃度對於大腸直腸息肉有顯著影響, 在調整相關影響因子之後, 影響依然顯著。然而, B-維生素營養狀況皆對罹患大腸直腸息肉無顯著影響。

討論

過去的研究認為, B-維生素營養狀況如果處於正常的情況, 可以預防大腸直腸息肉的發展 (Ashktorab et al., 2007; Kim et al., 1998; Martínez et al., 2004; Scheppach et al., 1999; Wei et al., 2005; Martínez et al., 2006), 然而本研究結果則與上述研究相反, 血漿同半胱胺酸可能是較 B-維生素更為重要的影響因子。根據兩項大型的追蹤試驗結果顯示 (WBF and UDCA trials) (Martínez et al., 2006), 未服用綜合維生素補充劑的受試者, 血漿同半胱胺酸對於大腸直腸息肉復發有顯著影響, 但是服用綜合補充劑者則無。因此, 推論 B-維生素可能是透過降低血漿同半胱胺酸濃度進而降低了罹患大腸直腸息肉的風險。

許多研究證實抽菸與大腸直腸腺瘤性息肉有關 (Ulvik et al., 2001; Giovannucci & Martinez, 1996)。Ji 等人 (2006) 也認為, 抽菸者會增加大腸直腸腺瘤的發生。本研究也有觀察到相同結果, 但是若調整了血漿同半胱胺酸濃度之後, 則無顯著影響。推測抽菸是獨立於血漿同半胱胺酸的危險因子。因此, 本研究認為, 血漿同半胱胺酸為大腸直腸息肉的獨立危險因子。

Table 1. Characteristics of healthy participants and participants with colorectal polyps

| Characteristics | Colorectal polyps (n = 48) | | | | Healthy subjects (n = 96) | |
|--------------------------------------|--|------|---|------|------------------------------|------|
| | Adenomatous polyps (n = 29) | | Hyperplastic polyps (n = 19) | | mean | SD |
| | mean | SD | mean | SD | | |
| Age (y) | 53.9 | 10.5 | 55.4 | 7.2 | 54.5 | 9.4 |
| Gender (Female / Male) | 6 / 23 | | 6 / 13 | | 24 / 72 | |
| Height (cm) | 165.3 | 8.7 | 164.7 | 6.3 | 164.7 | 7.8 |
| Weight (kg) | 67.6 | 10.4 | 68.9 | 7.0 | 64.6 | 10.6 |
| Body mass index (kg/m ²) | 24.7 | 2.6 | 25.4 | 2.3 | 23.7 | 3.1 |
| Blood pressure (mmHg) | | | | | | |
| Systolic | 149.0 ^a | 16.4 | 133.3 ^a | 17.2 | 118.0 ^b | 17.3 |
| Diastolic | 95.8 ^a | 27.6 | 91.0 ^a | 13.0 | 74.1 ^b | 11.0 |
| Numbers of polyps (n, %) | 1 (n = 19, 65.5%) 2 (n = 5, 17.2%) 4 (n = 4, 13.8%) 17 (n = 1, 0.03%) | | 1 (n = 17, 89.5%) 2 (n = 1, 0.05%) 5 (n = 1, 0.05%) | | 0 (n = 96, 100%) | |
| Smoking (n, %) | 12 (41.4%) | | 4 (21.1%) | | 19 (19.8%) | |

Values with different superscript letter are significantly different among three groups; $p < 0.05$.

Table 2. Hematological measurements and levels of homocysteine and B-vitamins in healthy participants and participants with colorectal polyps

| Characteristics | Colorectal polyps (n = 48) | | | | Healthy participants (n = 96) | |
|-----------------------------|--------------------------------|-------|---------------------------------|-------|----------------------------------|-------|
| | Adenomatous polyps (n = 29) | | Hyperplastic polyps (n = 19) | | | |
| | mean | SD | mean | SD | mean | SD |
| Lipid profiles | | | | | | |
| Triglycerides (mmol/L) | 2.2 ^a | 3.1 | 1.6 ^a | 0.6 | 1.2 ^b | 0.8 |
| Cholesterol (mmol/L) | | | | | | |
| Total | 5.4 ^a | 1.4 | 4.9 ^{a,b} | 0.7 | 4.8 ^b | 0.9 |
| LDL | 3.5 ^a | 0.9 | 3.4 ^a | 0.6 | 2.7 ^b | 0.9 |
| HDL | 1.1 ^a ± | 0.4 | 1.1 ^a | 0.3 | 1.6 ^b | 0.4 |
| Hs-CRP (mg/dL) | 0.2 | 0.4 | 0.3 | 1.0 | 0.1 | 0.3 |
| Serum glucose (mmol/L) | 5.9 ^a | 2.6 | 5.9 ^a | 2.7 | 5.5 ^b | 1.7 |
| Serum creatinine (μmol/L) | 83.5 ^{a,b} | 27.9 | 82.4 ^a | 2.7 | 94.9 ^b | 13.8 |
| Homocysteine (μmol/L) | 14.2 ^a | 5.5 | 14.5 ^a | 7.4 | 9.8 ^b | 2.1 |
| > 14 μmol/L (n, %) | 10, 34.5% | | 7, 36.8% | | 3, 0.03% | |
| Plasma PLP (nmol/L) | 111.0 | 101.2 | 141.9 | 149.0 | 135.3 | 118.4 |
| < 20 nmol/L (n, %) | 0, 0% | | 0, 0% | | 0, 0% | |
| Serum folate (nmol/L) | 23.9 | 17.2 | 18.6 | 9.0 | 19.7 | 11.0 |
| < 6.8 nmol/L (n, %) | 2, 6.9% | | 2, 10.5% | | 1, 1.0% | |
| Serum vitamin B-12 (pmol/L) | 333.6 | 188.9 | 354.6 | 162.1 | 373.0 | 205.4 |
| < 125.5 pmol/L (n, %) | 5, 17.2% | | 2, 10.5% | | 0, 0% | |

Values with different superscript letter are significantly different among three groups; $p < 0.05$.

Table 3. The associations between plasma homocysteine, B-vitamins and numbers of colorectal polyps

| | Numbers of colorectal polyps (No.) ¹ (n = 144) | Plasma homocysteine (μmol/L) ² (n = 144) |
|--|--|--|
| | <i>β</i> (p value) | |
| Plasma homocysteine (μmol/L) | | |
| Model 1 ³ | 0.05 (<0.001) | — |
| Model 2 ⁴ | 0.12 (<0.001) | — |
| Model 3 ⁵ | 0.11 (0.001) | — |
| Number of colorectal polyps (No.) | | |
| Model 1 | — | 0.86 (<0.001) |
| Model 2 | — | 0.81 (<0.001) |
| Model 3 | — | 0.72 (0.001) |
| Smoking (yes/no) | | |
| Model 1 | 0.43 (0.007) | 1.34 (0.109) |
| Model 2 | 0.68 (0.047) | 0.69 (0.435) |
| Model 4 ⁶ | 0.60 (0.065) | 0.25 (0.781) |
| Serum folate (nmol/L) | | |
| Model 1 | 0.01 (0.336) | -0.13 (0.056) |
| Model 2 | -0.03 (0.277) | -0.12 (0.078) |
| Model 4 | -0.01 (0.561) | — |
| Model 5 ⁷ | — | -0.08 (0.239) |
| Serum vitamin B ₁₂ (pmol/L) | | |
| Model 1 | -0.00 (0.309) | -0.00 (0.003) |
| Model 2 | -0.00 (0.080) | -0.00 (0.009) |
| Model 4 | -0.00 (0.299) | — |
| Model 5 | — | -0.00 (0.079) |
| Plasma PLP ⁸ (nmol/L) | | |
| Model 1 | -0.00 (0.570) | -0.00 (0.208) |
| Model 2 | -0.00 (0.503) | -0.00 (0.156) |
| Model 4 | -0.00 (0.768) | — |
| Model 5 | — | -0.00 (0.561) |

¹Multiple linear regression analysis with numbers of colorectal polyps as the dependent variable after adjusting potential confounders. *β*, regression coefficient.

²Multiple linear regression analysis with plasma homocysteine concentration as the dependent variable after adjusting potential confounders.

³No confounders were adjusted.

⁴Adjusted for age and gender, body mass index, diastolic blood pressure, serum total cholesterol and creatinine.

⁵As in model 2 and additionally adjusting for the three B-vitamins (i.e., folate, vitamin B₁₂ and PLP).

⁶As in model 2 and additionally adjusting for plasma homocysteine.

⁷As in model 2 and additionally adjusting for numbers of colorectal polyps and the other two B-vitamins.

⁸PLP, pyridoxal 5'-phosphate.

Table 4. The odds ratios (ORs) for risk of colorectal polyps

| | No adjusted | | | BMI-, DBP-, TC-, creatinine-, smoking and/or hcy-, folate-, PLP, vitamin B ₁₂ - adjusted | | |
|--|-------------|------------|----------|---|------------|----------|
| | OR | 95% CI | <i>P</i> | OR | 95% CI | <i>P</i> |
| Homocysteine (μmol/L) | 1.80 | 1.37, 2.38 | < 0.0001 | 1.87 | 1.13, 3.08 | 0.01 |
| Plasma PLP (nmol/L) | 1.00 | 1.00, 1.00 | 0.71 | 1.00 | 0.99, 1.01 | 0.45 |
| Serum folate (nmol/L) | 1.04 | 0.97, 1.11 | 0.30 | 1.07 | 0.91, 1.27 | 0.41 |
| Serum vitamin B ₁₂ (pmol/L) | 1.00 | 1.00, 1.00 | 0.63 | 1.00 | 0.99, 1.01 | 0.93 |

BMI, body mass index; DBP, diastolic blood pressure; TC, total cholesterol; hcy, homocysteine; PLP, pyridoxal 5'-phosphate.

【第二部分】

研究目的

評估及比較給予大腸直腸腺瘤性息肉受試者單獨維生素 B₆ 或葉酸補充或合併補充後對抗氧化功能及 DNA 甲基化程度的差異及影響。

材料與方法

受試者

參加此研究的息肉受試者將詢問是否參加介入研究。受試者將會被隨機分派至以下四組，以雙盲試驗進行 16 週的介入研究：1) 100 mg 維生素 B₆ 組；2) 5 mg 葉酸組；3) 維生素 B₆ + 葉酸組：維生素 B₆ (100 mg/d) 與葉酸 (5 mg/d)。

資料收集

1) 基本資料

同第一年橫斷面研究的方法內容。

2) 飲食紀錄

於第 0、4、16 週回診時以 24 小時飲食回憶法紀錄飲食攝取狀況，以確定每一位受試者在實驗期間都有維持其日常飲食。其餘同第一年橫斷面研究的方法內容。

3) 血液樣本採集

使用不含及含有抗凝血劑 (EDTA) 之真空採血管 (Becton Dickinson, Rutherford, NJ) 採集每位受試者 20 mL 的空腹血液。血液採集將於在第 0、4、16 週進行。其餘同第一部分橫斷面研究的方法內容。

4) 生化分析方法

各項生化值檢驗方法如第一年橫斷面研究的方法內容。

脂質過氧化

參考 Jialal & Scaccini (1992) 的方法，利用 TBA (thiobarbituric acid) 與脂質過氧化產物-丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 於酸性高溫下會形成紅色復合物質，測定螢光值(excitation: 515 nm; emission: 553 nm)。

抗氧化酵素活性

麩胱甘肽過氧化酶 (glutathione peroxidase) 及胱甘肽硫轉移酶 (glutathione S-transferase) 活性是利用商業套組檢測 (Cayman Chemical Company, Michigan, USA)。

DNA 甲基化程度

DNA 純化是在血液抽取後以 DNA 純化 kit (Gentra System, Minneapolis, MN) 進行。白血球 DNA 所含的 methyl-cytosine 濃度將以高效能液相層析進行分析，偵測 2-Deoxycytidine (2-DC) 與 5-methyldeoxycytidine (5-MDC) 的濃度，並以 $5\text{-MDC}/(5\text{-MDC}+2\text{DC})\times 100\%$ 代表甲基化程度。紫外光-可見光偵測器之波長為 284 nm (Gehrke et al., 1984; Samlowski et al., 2005)。

統計分析

以 one-way analysis of variance (ANOVA) 或是 Kruskal-Wallis one-way analysis on ranks 計算各組之間第 0 (baseline)、4 及 16 週的差異。以 one-way repeated measures analysis of variance 或 Friedman repeated measures analysis of variance on ranks 比較各組內第 4 及 16 週的各項血液生化值濃度與 baseline (第 0 週) 時的差異。統計結果將以 $p < 0.05$ 時具有統計上的意義。所有的資料將以 means \pm standard deviation (SD) 表示。

結果

總共有 24 位大腸直腸息肉受試者參加介入研究。分別隨機分派到以下三組：1) 100 mg 維生素 B₆ 組；n = 9；2) 5 mg 葉酸組；n = 9；3) 維生素 B₆ + 葉酸組：維生素 B₆ (100 mg/d) 與葉酸 (5 mg/d)；n = 6。受試者之基本資料、體位測量等資料列於 Table 1。在年齡、性別、血壓等三組間皆無顯著差異。

進行 12 週的介入之後，所有受試者的血液生化值列於 Table 2。葉酸組在第 12 周血中總膽固醇及 LDL-c 濃度有顯著降低，維生素 B-6 組則是血中 LDL-c 濃度顯著降低。在發炎指標及血中肌酸酐濃度各組間無顯著差異。

血漿同半胱氨酸濃度及 B-維生素營養狀況在介入 12 週後的結果呈現在 Table 3。介入葉酸 12 週後，血清及紅血球葉酸濃度皆有顯著增加，血漿同半胱氨酸有顯著降低 14.2%。維生素 B-6 組在第 12 週的血清及紅血球葉酸濃度有顯著降低。無論介入維生素 B₆ 或葉酸，DNA 甲基化程度則無顯著變化。

抗氧化酵素及脂質過氧化程度的變化呈現於 Table 4。介入維生素 B₆ 或/及葉酸，血中 ox-LDL 及 TBARS 濃度都沒有顯著的改變。

討論

由於受試者參與研究的意願未如預期，導致未能達到預期人數，可能因為人數的關係而無法觀察到顯著的影響。無論如何，給予葉酸的介入 12 週後，仍可以顯著降低大腸直腸息肉患者的血漿同半胱氨酸濃度，或許可以幫助減少息肉復發的危險。另外，本研究之受試者，皆有完成全大腸鏡的檢查，介入期間順從度皆有達 80%，且完成所有生化數據分析。因此所得到的資料依然具其可信度，仍可嘗試撰寫文獻投稿至期刊。

Table 1. Characteristics of vitamin B-6 and folic acid supplement groups¹

| Characteristics | Vitamin B-6 group (n =9) | Folic acid group (n =9) | The combination group (n =6) |
|---|-----------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| Age (y) | 52.7 ± 3.8 | 50.6 ± 2.6 | 48.5 ± 10.3 |
| Gender (Female / Male) | 3/6 | 1/8 | 2/4 |
| Height (cm) | 166.9 ± 3.8 | 165.5 ± 2.2 | 166.3 ± 8.1 |
| Weight (kg) | 69.1 ± 4.6 | 68.0 ± 2.1 | 71.8 ± 16.8 |
| Body mass index (kg/m ²) | 24.5 ± 0.8 | 25.0 ± 1.0 | 24.5 ± 3.4 |
| Blood pressure (mmHg) | | | |
| Systolic | 149.8 ± 12.1 | 139.4 ± 7.519 | 129.8 ± 18.6 |
| Diastolic | 94.4 ± 3.2 | 94.2 ± 8.0 | 83.7 ± 10.4 |

¹Values are means ± standard deviation. Values with different superscript letter are significantly different among three groups; $p < 0.05$.

Table 2. Hematological measurements of vitamin B-6 and folic acid supplement groups ¹

| Characteristics | Vitamin B-6 group (n =9) | | Folic acid group (n =9) | | The combination group (n =6) | |
|-----------------------------|-----------------------------|--------------|----------------------------|---------------|---------------------------------|---------------|
| | Week 0 | Week 12 | Week 0 | Week 12 | Week 0 | Week 12 |
| Lipid profiles | | | | | | |
| Triglycerides (mg/dL) | 161.8 ± 27.7 | 158.1 ± 29.3 | 170.1 ± 61.0 | 201.8 ± 69.8 | 133.2 ± 65.6 | 121.5 ± 80.5 |
| Cholesterol (mg/dL) | | | | | | |
| Total | 191.2 ± 9.9 | 159.1 ± 4.9 | 213.7 ± 26.6 | 172.6 ± 17.7* | 183.8 ± 31.1 | 188.5 ± 20.4 |
| LDL | 138.1 ± 11.9 | 91.4 ± 7.8* | 141.6 ± 18.9 | 99.5 ± 11.5* | 121.6 ± 36.9 | 112.0 ± 19.6 |
| HDL | 43.0 ± 5.4 | 49.1 ± 6.6 | 49.1 ± 6.6 | 38.8 ± 3.3 | 43.2 ± 11.9 | 52.2 ± 14.0 |
| Hs-CRP (mg/dL) | 0.3 ± 0.1 | 0.2 ± 0.1 | 0.3 ± 0.2 | 0.3 ± 0.1 | 0.1 ± 0.1 | 0.1 ± 0.1 |
| Serum creatinine (mg/dL) | 1.0 ± 0.1 | 0.9 ± 0.1 | 0.9 ± 0.1 | 1.1 ± 0.0 | 0.920 ± 0.228 | 0.967 ± 0.186 |

¹Values are means ± standard deviation.

*Values with superscript letter are significantly different among weeks; $p < 0.05$. LDL, low-density lipoprotein. HDL, high-density lipoprotein. Hs-CRP, high sensitive C-reactive protein

Table 3. Response of plasma PLP and serum folate to vitamin B-6 and folic acid supplement at week 0, week 4 and week 12¹

¹Values are means \pm standard deviation. Values with different superscript letter are significantly different among three groups; $p < 0.05$.

| Colorectal polyp risk factors | Vitamin B-6 group (<i>n</i> = 9) | | | Folic acid group (<i>n</i> = 9) | | | The combination group (<i>n</i> = 6) | | |
|------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--|--------------------------------|--------------------------------|
| | Week 0 | Week 4 | Week 12 | Week 0 | Week 4 | Week 12 | Week 0 | Week 4 | Week 12 |
| Homocysteine ($\mu\text{mol/L}$) | 12.6 \pm 0.6 | 15.3 \pm 3.4 | 14.0 \pm 1.0 | 14.7 \pm 1.5 ^a | 12.5 \pm 3.5 ^b | 12.6 \pm 1.2 ^b | 14.5 \pm 4.5 | 14.5 \pm 5.1 | 14.8 \pm 3.7 |
| Plasma PLP (nmol/L) | 97.7 \pm 17.9 ^a | 340.5 \pm 157.9 ^b | 434.3 \pm 92.3 ^b | 88.1 \pm 19.3 ^a | 45.6 \pm 25.1 ^b | 55.1 \pm 10.8 ^b | 176.0 \pm 183.8 | 176.9 \pm 164.2 | 264.5 \pm 179.7 |
| Serum folate (ng/mL) | 9.8 \pm 1.7 ^a | 8.8 \pm 5.8 ^{a,b} | 6.7 \pm 1.3 ^b | 6.7 \pm 0.8 ^a | 69.1 \pm 77.6 ^b | 35.3 \pm 11.9 ^b | 8.3 \pm 4.5 ^a | 16.4 \pm 3.0 ^{a,b} | 44.3 \pm 33.0 ^b |
| RBC folate (ng/mL) | 529.9 \pm 133.7 ^a | 485.2 \pm 142.8 ^{ab} | 439.6 \pm 116.8 ^b | 398.9 \pm 76.2 ^a | 537.2 \pm 249.0 ^{ab} | 719.5 \pm 305.2 ^b | 578.4 \pm 149.3 ^a | 666.4 \pm 173.2 ^a | 862.8 \pm 173.8 ^b |
| Vitamin B ₁₂ (pmol/mL) | 514.6 \pm 136.1 | 480.8 \pm 160.1 | 847.9 \pm 1489.4 | 462.9 \pm 152.1 | 401.3 \pm 123.8 | 362.4 \pm 156.2 | 309.6 \pm 320.4 | 175.8 \pm 127.5 | 356.2 \pm 267.8 |
| DNA methylation (%) | 7.1 \pm 3.3 ^a | - | 15.5 \pm 1.9 ^a | 9.6 \pm 9.7 ^{ab} | - | 17.0 \pm 4.3 ^b | 19.3 \pm 11.1 ^b | - | 14.5 \pm 7.1 ^b |

^{a,b,c}Values with superscript letter are significantly different among weeks; $p < 0.05$. PLP, pyridoxal 5'-phosphate

Table 4. Response of lipid oxidation and antioxidant enzymes to vitamin B-6 and folic acid supplement at week 0, week 4 and week 12¹

| Colorectal polyp risk factors | Vitamin B-6 group (n = 9) | | | Folic acid group (n = 9) | | | The combination group (n = 6) | | |
|-------------------------------|------------------------------|-------------|-------------|-----------------------------|-------------|-------------|----------------------------------|-------------|-------------|
| | Week 0 | Week 4 | Week 12 | Week 0 | Week 4 | Week 12 | Week 0 | Week 4 | Week 12 |
| TBARS (μM) | 0.7 ± 0.2 | 0.7 ± 0.1 | 0.7 ± 0.2 | 0.7 ± 0.2 | 0.7 ± 0.1 | 0.8 ± 0.2 | 0.8 ± 0.1 | 0.7 ± 0.1 | 0.7 ± 0.1 |
| Ox-LDL (U/L) | 39.0 ± 9.9 | 12.0 ± 6.6 | 31.5 ± 13.4 | 45.4 ± 23.6 | 11.2 ± 3.5 | 37.4 ± 12.7 | 36.9 ± 15.3 | 12.4 ± 1.7 | 39.0 ± 15.1 |
| GST activity (nmol/min/mL) | 3.6 ± 1.0 | 6.8 ± 11.3 | 8.2 ± 12.6 | 5.2 ± 3.1 | 3.4 ± 1.8 | 7.0 ± 7.2 | 7.8 ± 9.9 | 10.9 ± 5.1 | 14.0 ± 4.5 |
| GPX activity (nmol/min/mL) | 86.9 ± 18.1 | 80.3 ± 19.7 | 68.3 ± 20.9 | 94.1 ± 18.2 | 88.5 ± 17.9 | 70.0 ± 34.0 | 84.9 ± 57.3 | 55.5 ± 17.8 | 65.1 ± 18.1 |
| SOD (U/mL) | 8.9 ± 4.2 | 38.1 ± 5.5 | 13.6 ± 9.9 | 9.9 ± 3.2 | 37.1 ± 11.1 | 14.2 ± 6.1 | 13.9 ± 6.3 | 36.4 ± 13.1 | 11.1 ± 1.9 |

¹Values are means ± standard deviation. Values with different superscript letter are significantly different among three groups; p < 0.05. TBARS, thiobarbituric acid reactive substances. Ox-LDL, oxidative low density lipoprotein. GST, glutathione S-transferase. GPX, glutathione peroxidase. SOD, *superoxide dismutase*.

參考文獻

- Araki A, Sako Y. Determination of free and total homocysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr* 1987;422:43-52.
- Ashktorab H, Begum R, Akhgar A, Smoot DT, Elbedawi M, Daremipouran M, Zhao A, Momen B, Giardiello FM. Folate status and risk of colorectal polyps in African Americans. *Dig Dis Sci* 2007;52:1462-70.
- Babbs CF. Oxygen radicals in ulcerative colitis. *Free Rad Biol Med* 1992;13:169-81.
- Blau S, Rubinstein A, Bass P, Singaram C, Kohen R. Differences in the reducing power along the rat GI tract: Lower antioxidant capacity of the colon. *Molec Cell Biochem* 1999;194:185-91.
- Choi SW, Mason JB. Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J Nutr* 2000;130:129-32.
- Eichholzer M, Luthy J, Moser U, Fowler B. Folate and the risk of colorectal, breast and cervix cancer: the epidemiological evidence. *Swiss Med Wkly* 2001;131:539-49.
- Giovannucci E, Rimm EB, Ascherio A, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. Alcohol, low-methionine-low-folate diets, and risk of colon cancer in men. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:265-73.
- Giovannucci E & Martinez ME. Tobacco, colorectal cancer, and adenomas: a review of the evidence. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1717-30.
- Hartman TJ, Woodson K, Stolzenberg-Solomon R, Virtamo J, Selhub J, Barrett MJ, Albanes D. Association of the B-vitamins pyridoxal 5'-phosphate (B₆), B₁₂, and folate with lung cancer risk in older men. *Am J Epidemiol* 2001;153:688-94.
- Hayes JD, McLellan LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defense against oxidative stress. *Free Radic Res* 1999;31:273-300.
- Ji BT, Weissfeld JL, Chow WH, Huang WY, Schoen RE, Hayes RB. (2006) Tobacco smoking and colorectal hyperplastic and adenomatous polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 897-901.
- Kim YI, Fawaz K, Knox T, Lee YM, Vorton R, Arora S, Paiva L, Mason JB. Colonic mucosal concentrations of folate correlate well with blood measurements of folate status in persons with colorectal polyps. *Am J Clin Nutr* 1998;68:866-72.
- Kim YI, Fawaz K, Knox T, Lee YM, Norton R, Arora S, Paiva L, Mason JB. Colonic mucosal concentrations of folate correlate well with blood measurements of folate status in persons with colorectal polyps. *Am J Clin Nutr* 1998; 68: 866-72.
- Kim YI, Baik HW, Fawaz K, Knox T, Lee YM, Norton R, Libby E, Mason JB. Effects of folate supplementation on two provisional molecular markers of colon cancer: a prospective, randomized trial. *Am J Gastroenterol* 2001;96:184-95.
- Larsson SC, Giovannucci E, Wolk A. Vitamin B₆ intake, alcohol consumption, and colorectal cancer: a longitudinal population-based cohort of women. *Gastroenterology* 2005;128:1830-7.
- Martinez M, Cuskelly GJ, Williamson J, Toth JP, Gregory JF III. Vitamin B-6 deficiency in rats reduces hepatic serine hydroxymethyltransferase and cystathionine beta-synthase activities and rates of in vivo protein turnover, homocysteine remethylation and transsulfuration. *J Nutr* 2000;130:1115-23.
- Martinez ME, Henning SM, Alberts DS. Folate and colorectal neoplasia: relation between plasma and dietary markers of folate and adenoma recurrence. *Am J Clin Nutr* 2004;79:691-7.
- Mason JB, Choi SW. Folate and carcinogenesis: developing a unifying hypothesis. *Adv Enzyme Regul* 2000;40: 127-41.
- Matsubara K, Komatsu S, Oka T, Kato N. Vitamin B₆-mediated suppression of colon tumorigenesis, cell proliferation, and angiogenesis (review). *J Nutr Biochem* 2003;14: 246-50.
- Martinez ME, Henning SM, Alberts DS. Folate and colorectal neoplasia: relation between plasma and dietary markers of folate and adenoma recurrence. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 691-7.

- Martínez ME, Giovannucci E, Jiang R, Henning SM, Jacobs ET, Thompson P, Smith-Warner SA, Alberts DS. Folate fortification, plasma folate, homocysteine and colorectal adenoma recurrence. *Int J Cancer* 2006; 119: 1440-6.
- Rainis T, Maor I, Lanir A, Shnizer S, Lavy A. Enhanced oxidative stress and leucocyte activation in neoplastic tissues of the colon. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 526-30.
- Scheppach W, Bingham S, Boutron-Ruault MC, Gerhardsson de Verdier M, Moreno V, Nagengast FM, Reifen R, Riboli E, Seitz HK, Wahrendorf J. WHO consensus statement on the role of nutrition in colorectal cancer. *Eur J Cancer Prev* 1999; 8: 57-62.
- Scheer JB, Mackey AD, Gregory JF III. Activities of hepatic cytosolic and mitochondrial forms of serine hydroxymethyltransferase and hepatic glycine concentration are affected by vitamin B-6 intake in rats. *J Nutr* 2005; 135: 233-8.
- Talwar D, Quasim T, McMillan DC, Kinsella J, Williamson C, O'Reilly DS. Optimisation and validation of a sensitive high-performance liquid chromatography assay for routine measurement of pyridoxal 5-phosphate in human plasma and red cells using pre-column semicarbazide derivatisation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003; 792: 333-43.
- Ulrich CM, Kampman E, Bigler J, Schwartz SM, Chen C, Bostick R, Fosdick L, Beresford SA, Yasui Y, Potter JD. Colorectal adenomas and the C677T MTHFR polymorphism: evidence for gene-environment interaction? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8: 659-68.
- Wei EK, Giovannucci E, Selhub J, Fuchs CS, Hankinson SE, Ma J. Plasma vitamin B₆ and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 684-92.