# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 精胺酸添加對大腸直腸癌細胞引發血管新生作用之影響
## 研究成果報告(精簡版)

計 畫 類 別 ：個別型
計 畫 編 號 ：NSC 95-2314-B-041-004-
執 行 期 間 ：95 年 12 月 01 日至 96 年 07 月 31 日
執 行 單 位 ：嘉南藥理科技大學保健營養系

計 畫 主 持 人 ：葉秋莉

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理：杜詠馨

處 理 方 式 ：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 96 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

精胺酸添加對大腸直腸癌細胞引發血管新生作用之影響

計畫類別：■ 個別型計畫　　□ 整合型計畫
計畫編號：NSC　95－　2314　　－B　－041　　－004　　－
執行期間：　95　年　12　月　01　日至　96　年　7　月　31　日
計畫主持人：葉秋莉
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：

中　華　民　國　　96 年　10　　月 31　　日

(一) 前言

根據國內行政院衛生署的統計資料顯示，民國九十四年國人十大死因中惡性腫瘤排名第一，因惡性腫瘤而死亡的癌症種類中大腸直腸癌(colorectal cancer, CRC)的死亡率排名第三，CRC 主要為腺癌每年全球大約有 55 萬人死於 CRC，CRC 的預防及治療已成為公共健康所關注的問題。腫瘤的發展過程中，當其直徑大於 2mm 時會有缺乏氧氣及營養的現象發生，此時會引發體內的血管發生血管新生作用，產生新的血管組織供應腫瘤細胞生長（Folkman, 1990）。腫瘤所引起的血管新生作用中，最重要的步驟在於腫瘤細胞缺乏氧氣及營養素時會促進腫瘤細胞內 VEGF 基因表現(Kranenburg et al., 2004)。除了 VEGF 外還有其他血管新生促進因子 basic fibroblast growth factor (bFGF)、epidermal growth factor (EGF)、platelet-derived growth factor (PDGF)、angiopoietins-1 (Ang-1)、Ang-2 及 interleukin (IL)-8 (Ferrara , 2002)。而 MMPs 家族中 MMP-2 及 MMP-9 為最主要參與腫瘤細胞轉移及血管新生作用的酵素(Polette et al., 1993)

對於正常的人體而言 Arg 為非必需胺基酸，但對於成長中的幼小動物，由於身體合成量仍不足提供身體所需，故對於成長中的動物而言為半必需胺基酸(semi-essential)。Arg 在人體內的生理濃度會隨著飲食的不同而改變，正常生理濃度約為 100 μM (Daly et al.,1988)。在 Vissers 等人(2005)的研究發現，在不同的癌症病人如:乳癌、胰臟癌及大腸癌體內，Arg 濃度皆較控制組(癌細胞切除病人)低，此實驗認為癌症病人體內 Arg 的濃度降低，是因為癌細胞迅速將 Arg 分解，以避免 Arg 在體內所產生的 nitric oxide (NO)毒殺腫瘤細胞 (Porembska et al., 2003)。在 CRC 的研究上發現，iNOS 在大腸 adenoma 及 carcinoma 的表現較正常健康大腸組織高(Yagihashi et al., 2000)。NO 對腫瘤發展的研究有些顯示其具有腫瘤抑制的功能，但有研究卻發現 NO 具有促進腫瘤發生的能力，此兩種不同的結果主要依據 NO 濃度及不同種類之腫瘤細胞而定(Wink et al., 1998)。如給予患有腫瘤之老鼠不含 Arg 之飲食，其在切除腫瘤後死亡率及預後皆比給予 Arg 組差(Steffee et al.,1977)。在單獨 Arg 介入的癌症研究方面，切除胃腸道腫瘤的病人給予每天 25g Arg 之補充，其血中淋巴球及 CD4 T 細胞的量，比給予等氮量的控制組來得高（Daly et al.,1988）。目前許多市售的腸道營養配方中也添加各不同組合的特殊營養素，包括 Arg。

但也有一些多研究分析(Meta-analysis)的結果顯示，免疫調節配方對不穩定的重症病人，並不能降低感染率反而可能會增加死亡率(Heyland et al, 2001)。免疫調節配方用於癌症及重症病人仍有一些爭議。

(二) 材料與方法

**Arg 對人類大腸直腸癌細胞與 HUVEC co-culture 後促血管新生作用因子分泌之影響**

(A)實驗方法

(1) 培養人類大腸直腸腺癌細胞株(human colorectal adenocarcinoma cell line)：

大腸直腸腺癌細胞株 SW-480 及 SW-620，SW-480 細胞為源發於大腸部位的癌細胞，而 SW-620 則為由原發部位轉移至淋巴結的癌細胞，此兩株細胞會常態表現 iNOS，但對 Arg 的利用產生 NO 的能力為 SW-480 高於 SW-620(SW)，細胞株皆培養於 L-15 中，添加 10%的 FBS 及 0.5%抗生素以 37℃，5%$CO_2$之環境下培養。

(2) 取人類臍帶靜脈血管內皮細胞：

將人類臍帶靜脈血管內皮細胞分離後(Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)培養則於 RPMI-1640 加入 20% FCS 及 porcine intestinal heparin 培養液培養之，經過 2-3 次繼代培養後供實驗備用。

(3) HUVEC 與人類大腸直腸腺癌細胞株共同培養

參考 Tsujii 等人的方法利用 transwell 的裝置來研究細胞共同培養後的變化，個別將 SW-480 及 SW-620 (2 x $10^5$ 個細胞)培養於 transwell 裝置中，將 HUVEC 培養於含不同濃度 Arg 培養液(包含 10% Fetal calf serum , FCS)中以 37℃，5%$CO_2$環境下培養 24 小時，詳細分組如下:

| 組別 | Arg (μM) |
|---|---|
| 1 | 0 |
| 2 | 50 |
| 3 | 100 |

| | |
|---|---|
| 4 | 1000 |

而 HUVEC (2 x $10^5$ 個細胞)則培養於 transwell 裝置上層，具有 fibronectin 之 Insert (其孔徑大小為 4μm)中，換過上述組別培養液中(包含 10% Fetal calf serum , FCS)中以 37℃，5%$CO_2$ 環境下培養 24 小時。將培養於不同培養液的細胞株及 HUVEC 換過不同濃度的培養液(不含 FBS)並將 insert 放入鋪滿人類大腸直腸腺癌細胞株（2 x $10^5$ 個細胞）的 transwell 下層裝置中。

(B)分析項目

(1) insert 上層液體：

(i) VEGF、MMP-2 及 $PGE_2$ 均為血管新生促進因子，$PGE_2$ 則為 COX 之產物。均以商業試劑組使用 ELISA 方式分析之。

(ii)分析 NO 濃度：以市售 ELISA kit 使用 Griess reagent 分析之。

**統計分析**

實驗結果使用 SAS 統計軟體進行分析，不同組間之差異採用變異係數分析(analysis of variance, ANOVA)中 one-way ANOVA 並加上 Scheffe's test 分析。

(三) 結果與討論

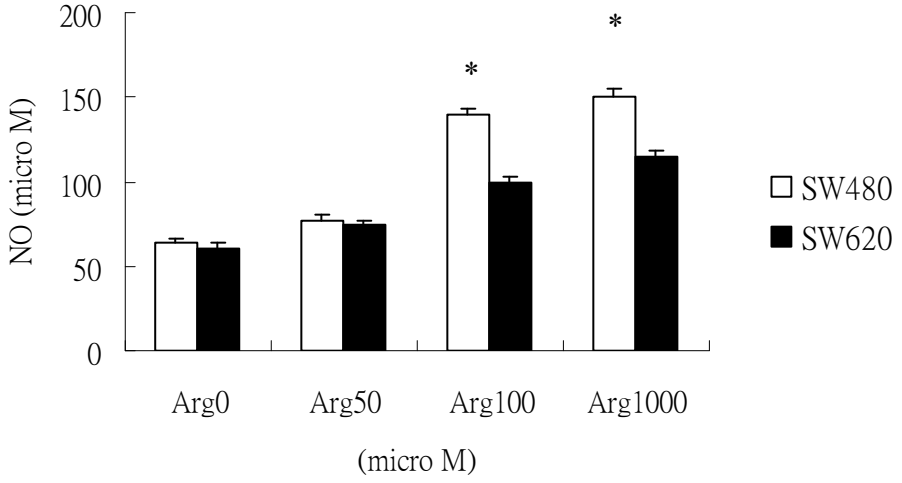
本實驗結果顯示，NO 濃度在 SW480 刺激後在 Arg 濃度為 100 及 1000uM 明顯高於其他各組且較受到 SW620 刺激後 NO 表現量較高(圖一)，主要因為 SW480 對於 Arginine 轉變為 NO 效率明顯高於 SW620 又因 Arginine 為 NO 的前驅物質，故 Arginine 濃度越高 NO 的濃度則越高。在 SW480 細胞刺激下 HUVEC 表現 MMP-2 的濃度明顯低於受到 SW620 刺激所表現的濃度，且在 arginine 濃度為 1000 uM 時 HUVEC 受到 SW480 刺激所表現的 MMP-2 明顯較低(圖二)，MMP-2 在血管新生作用扮演重要角色，過去研究發現 MMP-2 可將基底組織分解加速血管新生作用，在本實驗發現 HUVEC 受到 SW620 細胞刺激後 MMP-2 大量表現，因 SW620 為非原位發生之癌細胞其轉移能力較 SW480 大之故，但同樣在 SW620 刺激後 Arg 濃度越高其 MMP-2 濃度則較低，推測此結果可能與 NO 有關。在 VEGF 的濃度方面，在 Arginine 濃度為 100 及 1000uM 組 HUVEC 受到 SW480

刺激後 VEGF 濃度明顯低於受 SW620 刺激所表現的濃度，因 SW620 其發生轉移的能力較 SW480 高，但同樣在 SW620 組給予高濃度 Arg 後 VEGF 的表現則降低。HUVEC 受到癌細胞刺激後 $PGE_2$ 的表現在各組之間則無明顯差異(表一)。

(四) 結論

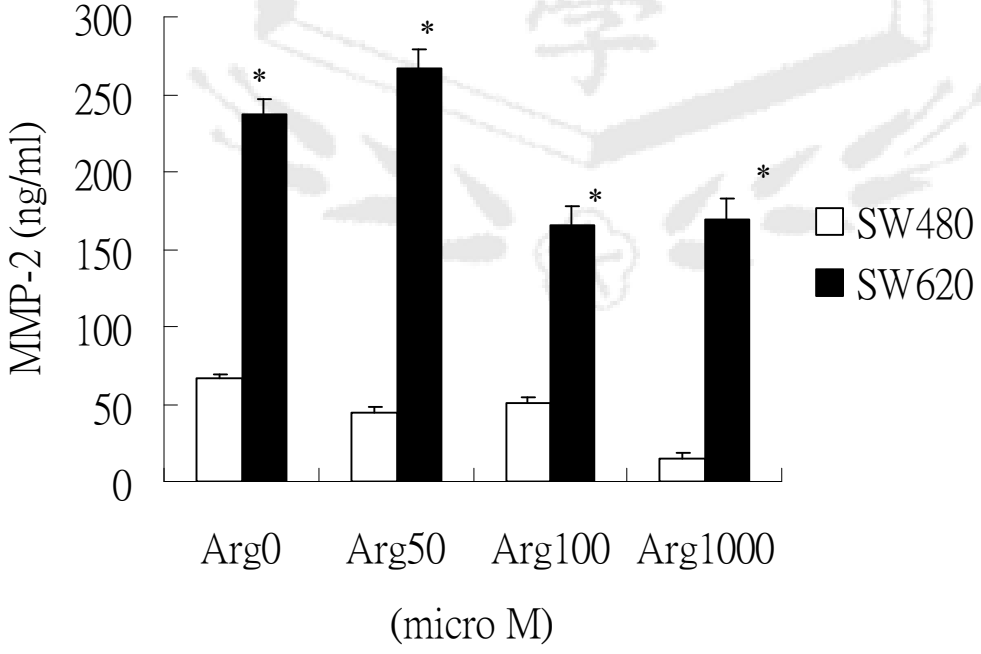
給予 HUVEC 高濃度 Arg(100 及 1000 $\mu$M)培養可降低經癌細胞刺激後血管新生促進因子 MMP-2 及 VEGF 的分泌，可能藉由 NO 來調節此一現象。

嘉南大學




圖一、HUVEC 經癌細胞刺激後在不同濃度 Arg 組 NO 的產生量

*:兩組間有統計上之差異




圖二、HUVEC 經癌細胞刺激後在不同濃度 Arg 組 MMP-2 的產生量

*:兩組間有統計上之差異

表一、HUVEC 經癌細胞刺激後在不同濃度 Arg 組 VEGF 及 $PGE_2$ 的產生量

| | VEGF | $PGE_2$ |
|---|---|---|
| | (Pg/ml) | |
| Arg 0 μM | | |
| SW480 | 117±15.6 | 745±12.4 |
| SW620 | 160±22.0 | 719±14.8 |
| Arg 50 μM | | |
| SW480 | 113±10.4 | 758±20.4 |
| SW620 | 140±14.2 | 733±14 |
| Arg 100 μM | | |
| SW480 | 79±2.9* | 750±10.6 |
| SW620 | 119±4.6 | 754±12.8 |
| Arg 1000 μM | | |
| SW480 | 74±2.6* | 813±17.4 |
| SW620 | 100±3.2 | 751±22.6 |

*:兩組間有統計上之差異

(五) 參考資料

328:105-111

Daly JM, Redomski MW and Thom A(1988) Immune and metabolic effects of arginine in the surgical patient. Ann Surg 208:512-523.

Ferrara N (2002) VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. Nat Rev Cancer 2:795-803.

Folkman J (1990) What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? J Natl Cancer Inst 82:4-6.

Kranenburg O, Gebbink MF and Voest EE (2004) Stimulation of angiogenesis by Ras proteins. Biochimica et Biophysica Acta 1654:23-37.

Polette M, Clavel C, Cockett M, Girod de Bentzmann S, Murphy G and Birembaut P (1993) Detection and localization of mRNAs encoding matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor in human breast pathology. Invasion Metastasis 13:31-37

Porembska Z, Luboinski G, Chrzanowska A, Mielczarek M, Magnuska J and Baranczyk-Kuzma A (2003) Arginase in patients with breast cancer. Clin Chim Acta

Vissers YL, Dejong CH, Luiking YC, Fearon KC, von Meyenfeldt MF and Deutz NE (2005) Plasma arginine concentrations are reduced in cancer patients: evidence for arginine deficiency? Am J Clin Nutr 81:1142-1146

Yagihashi N, Kasajima H, Sugai S, Matsumoto K, Ebina Y, Morita T, Murakami T and Yagihashi S (2000) Increased in situ expression of nitric oxide synthase in human colorectal cancer. Virch Arch 436:109-114.

Wink DA, Vodovotz Y, Laval J, Laval F, Dewhirst MW and Mitchell JB (1998) The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. Carcinogenesis 19: 711-721.
Steffee WP (1977) Cancer and protein malnutrition. Compr Ther. 3:9-15.
Heyland DK, Novak F, Drover JW, Minto J, Su X and Suchner U (2001) Should immunonutrition become routine in critically ill patients? JAMA 286:22~29

計畫成果自評

本計畫在實行的過程中由於實驗的技術繁雜且困難度高，當中有一株細胞在台灣購買不到故也無法進行實驗故在設計上做了些微的調整，將一些組別去除，其餘的實驗部分接照實驗計畫完成。