

東海大學食品科學研究所

Graduate Institute of Food Science

TUNGHAI UNIVERSITY

食品科技組

Food Technology Section

碩士論文

Master thesis

指導教授：盧錫祺博士

Advisor：Hsi-Chi Lu, Ph.D.

人類大腸癌中 Rab11、CA8 及 GLUT1/3 等相關基因表現

Expression of Rab11, CA8 and GLUT1/3 in human

colorectal cancer

研究生：劉羽庭撰

Graduate Student：Yu-Ting Liu

中華民國一百零七年六月

June, 2018

## 謝誌

研修碩士學位期間，感謝恩師盧錫祺博士於研究上給予建議感謝陳菟玲博士幫忙校閱初稿，使論文得以順利完成，在此敬上最深謝意。

論文口試期間，感謝張中和博士、陳春榮博士、趙偉廷博士及陳菟玲博士，細心審閱與詳細指正，給予許多寶貴意見，使本論文內容更加完整，且學生我獲益良多，在此表達萬分謝意。特別感謝系上淑瑜助教、怡君助教及柏逸助教，在大學與研究所期間的協助及鼓勵並給予許多行政上的幫忙，使研究得以順利進行且畢業，由衷感謝。

在研究期間，感謝本校生科系謝明麗博士及趙偉廷博士慷慨借用器材，且不吝幫忙，使研究順利進行。感謝彰基內科蘇維文主任、蘇培元醫師、林靜君個案管理師及林婉瑜個案管理師等醫護人員協助臨床內科及外科收案部份；感謝彰基外科黃玄遠醫師協助腫瘤開刀患者收案部分；感謝彰基病理部葉坤土主任及林淑惠主任協助病理切片部分；感謝台北榮總李偉平醫師，協助切片解讀的部分；感謝實驗室學長姐劉巧玲、黃健峰、湯儒碩、傅宥勝、姚佳伶、滕逸林從我專題生開始便不吝指導，傳承他們所學的實驗與知識；感謝夥伴田奕葶陪伴我這兩年半的時間，互相幫忙做實驗與帶實驗課的生活，曾無數次一起做研究到半夜三四點才回去休息，隔天又要早八上課或是實驗的辛苦日子；感謝畜產瓊瑛助教在生技實驗的幫忙；感謝專題生黃瀚傑及張毓麟陪我一起摸索新的實驗、一起跑彰基，一起完成那浩大的切片染色工程，在實驗後期穩定後，也感謝專題生吳佩庭及許喻蓉幫忙補充一些遺漏的數據；感謝實驗室成員黃湘儀、黃思瀚、賴縈潔、白文慧、馮郁涵及張嘉軒以及食科系同學顏琤綾、詹佳純、施映竹、張文彥、游佳茵、姚映臣、吳佳臻、呂仲雯、王仁宜、洪紹華、許恆毅及徐鄱殷在研究期間給予論文及實驗上的協助及這些年的互相鼓勵和陪伴。

最後，感謝父母同意我的任性，在攻讀碩士學位期間，給我最大的包容和支持，讓我能無後顧之憂下完成學業，將此論文獻給我最親愛的家人，一同分享我的成長及喜悅。

劉羽庭 謹致於  
東海大學食品科學系研究所科技組  
中華民國一百零七年六月二十一日

# 目錄

中文摘要 .....	1
Abstract.....	2
前言 .....	3
第一章、文獻回顧.....	4
1-1 大腸癌 .....	4
1-1-1 大腸癌簡介.....	4
1-1-1.1 形成 CRC 之風險因素.....	4
1-1-1.2 腫瘤主要形成模式.....	7
1-1-2 CRC 分期系統.....	7
1-1-3 CRC 之篩檢診斷.....	10
1-2 代謝症候群.....	13
1-2-1 CRC 與代謝症候群之關聯.....	14
1-3 代謝相關基因表現.....	17
1-3-1 細胞傳訊路徑.....	17
1-3-2 葡萄糖轉運蛋白(Glucose transporters, GLUTs) .....	18
1-3-3 碳酸酐酶相關蛋白 8 (Carbonic anhydrase related protein VIII, CA8) .....	19
1-3-4 拉布蛋白 11 (Rab11).....	20
1-4 腸道菌相與 CRC 之關聯.....	21
1-5 血清生化數值分析 .....	23
第二章、研究目的與實驗架構.....	24
2-1 研究目的.....	24
2-2 實驗架構.....	24
第三章、材料與方法 .....	25
3-1 實驗材料.....	25
3-1-1 臨床檢體來源及相關耗材.....	25
3-1-2 組織包埋切片染色 .....	25
3-1-3 西方轉漬法.....	26
3-1-4 主要儀器及設備 .....	27
3-2、實驗方法.....	28
3-2-1 樣品前處理.....	28
3-2-1.1 糞便.....	28
3-2-1.2 組織.....	28

3-2-2 石蠟包埋.....	28
3-2-3 切片 .....	28
3-2-4 蘇木素&伊紅染色(Hematoxylin & Eosin, H&E).....	29
3-2-5 免疫組織化學染色(Immunohistochemistry, IHC).....	29
3-2-5.1 IHC 染色評分(I Index scoring).....	30
3-2-6 西方轉漬法.....	30
3-2-6.1 新鮮組織.....	30
3-2-6.2 福馬林固定石蠟包埋組織(formalin-fixed, paraffin-embedded tissue, FFPE tissue) .....	30
3-2-6.3 蛋白質定量.....	31
3-2-6.4 西方轉漬法.....	31
3-2-7 微生物菌相分析(Metagenomics).....	31
3-2-8 問卷調查.....	32
3-2-9 血清生化數值分析項目.....	32
3-2-10 統計分析.....	32
第四章、結果與討論.....	33
4-1 患者基本資料.....	33
4-2 H&E 染色結果.....	33
4-3 IHC 染色結果.....	33
4-3.1 CRC 組織中 GLUT1/3、CA8、Rab11 的表現(澄清).....	34
4-3.2 CRC 組織中 GLUT1/3、CA8、Rab11 的比較(澄清).....	35
4-3.3 瘻肉組織中 GLUT1/3、CA8、Rab11 的表現(彰基).....	35
4-3.4 瘻肉組織與腫瘤組織與正常組織之比較.....	36
4-4 西方轉漬分析結果.....	36
4-5 微生物菌相分析結果.....	37
4-6 問卷調查結果.....	38
4-7 血清生化數值分析結果.....	39
第五章、討論.....	40
第六章、結論與未來展望.....	88
6-1 結論.....	88
6-1.1 IHC 染色分析蛋白質表現.....	88
6-1.2 西方轉漬分析蛋白質表現.....	88
6-1.3 微生物菌相分析.....	88
6-1.4 問卷分析.....	88
6-1.5 血清生化數值分析.....	89
6-2 未來展望.....	89
第七章、參考文獻.....	90
第八章、附錄.....	98

## 表目錄

表 1、澄清醫院患者基本資料.....	44
表 2、彰化基督教醫院患者基本資料 .....	45
表 3、CRC 組織中 GLUT1/3、CA8 與 Rab11 蛋白質的表現。 .....	53
表 4、瘻肉組織中 GLUT1/3、CA8 與 Rab11 蛋白質的表現。 .....	62
表 5、CRC 患者、瘻肉患者和健康受試者血液常規檢查的比較。 .....	85
表 6、CRC 患者、瘻肉患者和健康受試者肝/腎功能的比較。 .....	85
表 7、CRC 患者、瘻肉患者和健康受試者血清脂質的比較.....	86
表 8、CRC 患者、瘻肉患者和健康受試者血糖與凝血相關指數的比較。 ....	86
表 9、結直腸癌患者 CEA 指數。 .....	87



## 圖目錄

圖 1、H&E 染色圖(100×)。	46
圖 2、免疫組織化學染色模式 0~3 級(100×)。	47
圖 3、澄清檢體免疫組織化學染色模式(GLUT1-100×)。	49
圖 4、澄清檢體免疫組織化學染色模式(GLUT3-100×)。	50
圖 5、澄清檢體免疫組織化學染色模式(CA8-100×)。	51
圖 6、澄清檢體免疫組織化學染色模式(Rab11-100×)。	52
圖 7、澄清檢體各期比較(GLUT1-100×)。	54
圖 8、澄清檢體各期比較(GLUT3-100×)。	55
圖 9、澄清檢體各期比較(CA8-100×)。	56
圖 10、澄清檢體各期比較(Rab11-100×)。	57
圖 11、彰基檢體免疫組織化學染色模式(GLUT1-100×)。	58
圖 12、彰基檢體免疫組織化學染色模式(GLUT3-100×)。	59
圖 13、彰基檢體免疫組織化學染色模式(CA8-100×)。	60
圖 14、彰基檢體免疫組織化學染色模式(Rab11-100×)。	61
圖 15、免疫組織化學染色之 I 指數比較各基因於瘰肉、腫瘤及非腫瘤區域表現。	63
圖 16、澄清檢體 GLUT1 西方轉漬分析	64
圖 17、澄清檢體 GLUT3 西方轉漬分析。	65
圖 18、澄清檢體 CA8 西方轉漬分析。	66
圖 19、澄清檢體 Rab11 西方轉漬分析。	67
圖 20、澄清 FFPE 檢體西方轉漬之測試分析。	68
圖 21、澄清檢體西方轉漬分析-FFPE。	69
圖 22、澄清檢體西方轉漬分析-FFPE。	70
圖 23、菌相分析-Venn 圖。	71
圖 24、菌相分析-菌群分類分析。	72
圖 25、菌相分析-Alpha 多樣性分析 chao1 指數。	73
圖 26、菌相分析-Alpha 多樣性分析 shannon 指數。	74
圖 27、菌相分析-Beta 多樣性分析 PCoA 分析。	75
圖 28、菌相分析-Beta 多樣性分析 NMDS 分析。	76
圖 29、問卷調查-患者罹病率。	77
圖 30、問卷調查-飲食習慣。	78
圖 31、問卷調查-飲食偏好、問題。	79
圖 32、問卷調查-飲食選擇。	80
圖 33、問卷調查-運動勞動。	81
圖 34、問卷調查-抽菸、喝酒情況。	82
圖 35、問卷調查-精神壓力。	83
圖 36、問卷調查-健康意識。	84

## 附表目錄

附表 1、形成 CRC 之風險因素 .....	5
附表 2、錯配修補基因變異與 CRC 風險(Rahner et al., 2010).....	6
附表 3、CRC 其 TNM 系統的定義(American Joint Committee on Cancer, AJCC 第八版).....	8
附表 4、CRC 臨床及病理分期(Amin et al., 2017) .....	9
附表 5、CRC 篩檢診斷之優缺點(American Cancer Society: Colorectal Cancer Screening Tests. 2017) .....	12
附表 6、代謝症候群五項危險因子 .....	14
附表 7、身體質量指數(BMI)和腰圍的分類以及肥胖相關併發症的風險(Han & Lean, 2016).....	15



## 附圖目錄

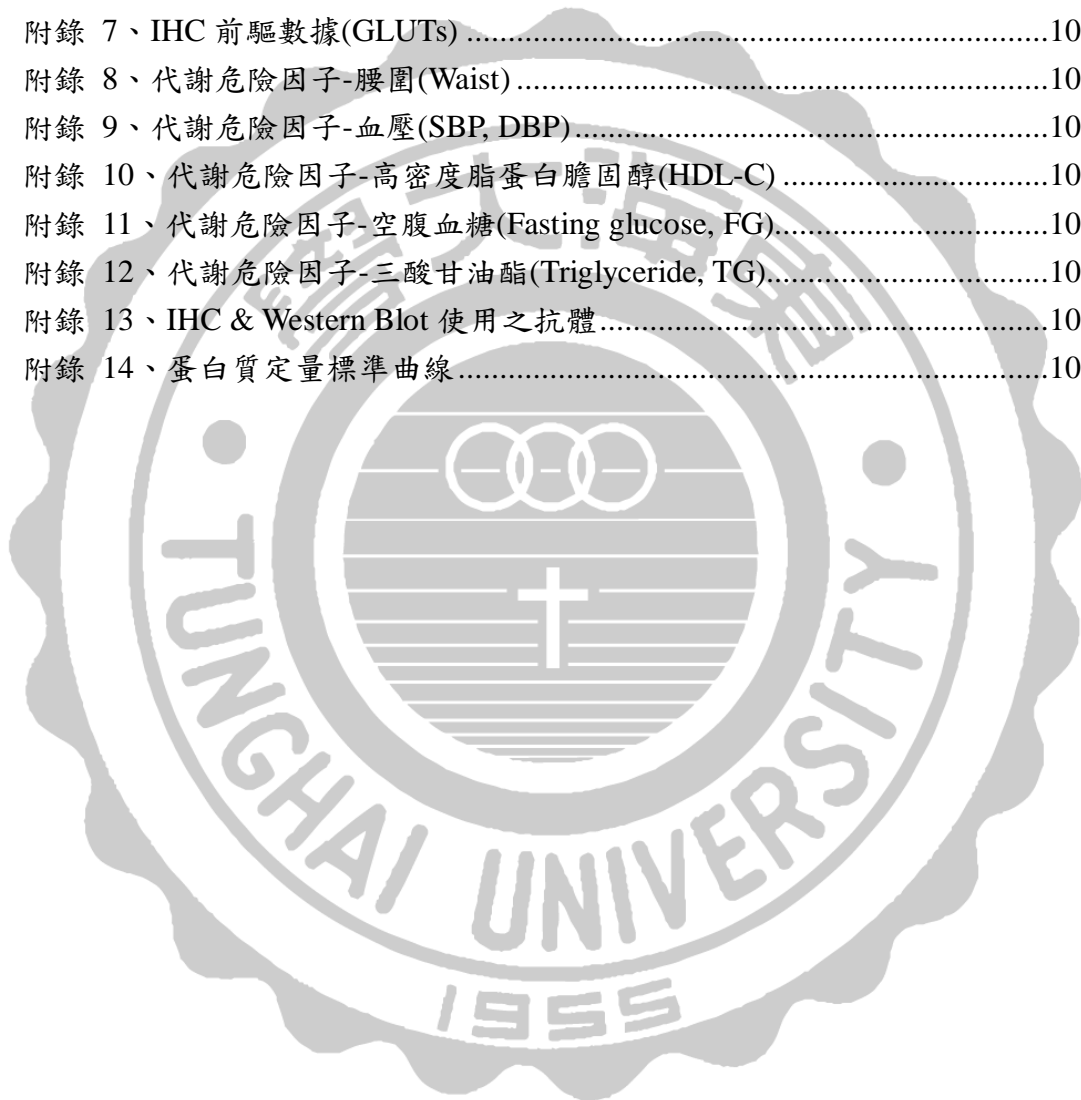
附圖 1、乙狀結腸鏡(上)&大腸鏡(下)示意圖(參考自 American Cancer Society: Colorectal Cancer Screening Tests. 2017).....	11
附圖 2、肥胖與發炎和 CRC 相關的潛在因素的機制總結(Bardou et al., 2013).....	16
附圖 3、目標蛋白關聯 .....	17
附圖 4、腸道菌相與多種疾病有高度關聯性(Thaiss et al., 2016).....	22
附圖 5、腸道菌相變化(蔡英傑, 2006).....	22
附圖 6、各個分析關聯分析圖.....	43





## 附錄目錄

附錄 1、PCR 引子序列及條件。 .....	98
附錄 2、菌相分析-六名患者之臨床資料。 .....	99
附錄 3、菌相分析-OTU 菌種。 .....	100
附錄 4、統整腫瘤&瘰肉好發部位。 .....	101
附錄 5、臨床資料連結代謝症候群。 .....	101
附錄 6、臨床資料連結代謝症候群 .....	102
附錄 7、IHC 前驅數據(GLUTs) .....	104
附錄 8、代謝危險因子-腰圍(Waist) .....	105
附錄 9、代謝危險因子-血壓(SBP, DBP) .....	106
附錄 10、代謝危險因子-高密度脂蛋白膽固醇(HDL-C) .....	107
附錄 11、代謝危險因子-空腹血糖(Fasting glucose, FG).....	108
附錄 12、代謝危險因子-三酸甘油酯(Triglyceride, TG).....	108
附錄 13、IHC & Western Blot 使用之抗體.....	109
附錄 14、蛋白質定量標準曲線.....	109



## 中文摘要

大腸癌自 2006 年起超越肝癌高居我國罹癌率之冠。國內外文獻均指出大腸癌的形成與飲食習慣有關，高動物性脂肪、過多紅肉的攝取、高蛋白質和低纖維的飲食習慣有可能增加患大腸癌的風險，此外，肥胖、缺乏運動、吸煙及飲酒亦為大腸癌之風險因子。本研究期望透過大腸癌患者之代謝相關基因分析，建立大腸癌與代謝症候群關聯。已有文獻指出 GLUT1 的表現與大腸癌有密切關係，以大腸癌患者檢體檢驗幾個常見的 GLUTs，發現以 GLUT1 與 GLUT3 表現較強，共軛焦顯微鏡分析進一步發現 GLUT1/3 有可能透過 Rab11 的運送表現在細胞膜上。而 CA8 能夠調節葡萄糖攝取、糖酵解活化，發現與 GLUT1 有直接的作用，也參與大腸癌形成，但目前尚不確定與 GLUT3 之作用。

本研究先後與臺中澄清醫院中港院區及彰化基督教醫院南郭總院合作，通過人體試驗委員會審核後收集檢體及臨床資料，其中彰基醫院除大腸癌患者外，另收集大腸直腸癌前瘻肉、週邊血液、糞便等檢體。在大腸直腸癌檢體中免疫組織化學染色藉由 Iindex 定量結果，初步證實 GLUT1/3、CA8、Rab11 在大腸癌患者的癌組織較鄰近非腫瘤組織顯著增加表現( $p < 0.01$ )。以西方轉漬評估蛋白質表現時，亦發現四基因在癌症後期於癌變檢體有較高表現，惟未呈現統計差異。文氏圖(Venn Diagram)顯示健康對照、瘻肉與腫瘤三族群之腸道菌相不同，但由於樣本數不多，此差異尚無統計明顯性。由患者問卷發現攝食過多紅肉、抽菸、飲酒及精神壓力與大腸癌具有正相關性。血清生化數值顯示血中三酸甘油在疾病組中濃度明顯較高，其餘參數並無統計差異。

關鍵詞：大腸直腸癌、免疫組織化學染色、CA8、Rab11、葡萄糖轉運蛋白 1/3

## Abstract

Colorectal cancer (CRC) has substituted hepatocellular carcinoma as the most prevalent cancer in Taiwan since 2006. Previous studies revealed that the formation of colorectal cancer is closely related to diet habits. Excess intake of animal fat and red meat, high protein and low fiber diet may increase the risk of colorectal cancer. Obesity, lack of exercise, smoking and alcohol consumption are also risk factors for colorectal cancer. Current study focused on the expression profiles of genes related to the process and regulation of metabolism in CRC patients, aiming to gain more insights to how CRC relates to metabolism. Expression of GLUT1 is known to be closely related to the formation of CRC. Preliminary results showed that GLUT1 and GLUT3, among several common GLUTs, were overexpression in CRC. Confocal microscopy further revealed that GLUT1/3 might be translocated to cell membrane via Rab11 transport. On the other hand, CA8 may regulate glucose uptake and glycolytic activities, while interacting with GLUT1, and is involved in the working model of colorectal cancer formation. Role of GLUT3 in CRC is still uncertain.

In current study, samples and clinical data were collected from Taichung Cheng Ching Hospital (Chung Kang Branch) and Changhua Christian Hospital (Nanguo Campus) after all the processes being reviewed by the Institutional Review Board (IRB). Clinical specimens including tissues dissected from colorectal cancer with adjacent nontumor counterpart, precancerous polyps, peripheral blood, and feces were transported to the THU laboratory. Protein quantification based on signal intensities in immunohistochemical staining were ranked by I index, and confirmed that GLUT1/3, CA8, Rab11 were all significantly ( $p < 0.01$ ) overexpression in CRC tissues as compared to that in adjacent nontumor counterparts. Western blotting analysis also revealed that in patients with the later stages of CRC, all the 4 genes expressed more profoundly in cancerous regions, though not statistically significant. After analysis the DNA sequence tags in fecal specimens, Venn Diagram showed diverse profiles of intestinal microflora in health controls and patients with polyps or CRC, though statistical differences could be established with current small sample size. Consumption of red meat and alcohol, smoking, and mental stress were found to be significantly correlated to CRC based on patient questionnaire. Serum biochemical analysis revealed TG concentrations to be significantly higher in disease groups.

**Keywords:** colorectal cancer, immunohistochemistry, CA8, Rab11, glucose transporter 1/3

# 前言

在現在忙碌的社會裏，飲食不當及速食是影響人們健康的一大問題。根據衛生署統計營養過剩或攝入過多脂肪等的誘因下，使大腸直腸癌的發生率急速增加，並已連續三年蟬聯十大癌症死因的第三位。代謝症候群為危險因子之群聚現象，包括腹部肥胖、高血糖、高血壓等，易導致心血管及糖尿病等慢性病。已知代謝症候群患者較易產生多發性大腸腺瘤性瘻肉，未來可預期有較高風險罹患大腸直腸癌。而代謝症候群和大腸直腸癌的危險因子高度重疊，如紅肉攝食過多、肥胖、運動不足等。

我國代謝症候群盛行率約 20%，平均每 5 人就有一人罹患。近期愈來愈多研究顯示代謝症候群與心血管疾病及癌症皆密切相關。在過去幾年當中，大腸直腸癌發生率及死亡率在臺灣與其他亞洲國家均明顯的上升，目前已高居我國男性與女性十大癌症死亡率第三位，並逐年遞增。根據衛福部與國家癌症中心統計，每年有超過一萬例新增大腸直腸癌個案，在所有癌症當中竄升率第一。其防治刻不容緩，需仰賴對其機制更多的瞭解。本研究旨在利用大腸瘻肉及大腸癌患者之檢體，探討相關基因表現與代謝狀況關聯，提供機制面及臨床之評估及建議。

# 第一章、文獻回顧

## 1-1 大腸癌

### 1-1-1 大腸癌簡介

自 2006 年以來，大腸直腸癌(Colorectal cancer, CRC)一直是臺灣最常見的癌症之一，在 2015 年其發生率的排名於男性為第 1 位、女性為第 2 位；死亡率的排名於男性及女性皆為第 3 位(衛生福利部國民健康署-健康監測與統計-台灣地區癌症登記年報. 2017.)。早期 CRC 篩查年齡為 50 歲以上，但近年來世界各國中，因飲食及環境風險因素導致 CRC 發病率年齡層具下降的趨勢 (Davis et al., 2011)，尤其 40 至 44 歲罹患 CRC 患者有顯著增加的趨勢，所以建議考慮從 40 歲開始進行結腸鏡檢查 (O'Connell, Maggard, Liu, & Etzioni, 2003)。

#### 1-1-1.1 形成 CRC 之風險因素

目前已知的風險由高到低排序為：結腸直腸癌家族史、大腸癌的個人史、家族性腺瘤性息肉病(Familial adenomatous polyposis, FAP)、林奇症候群(Lynch syndrome)、具有息肉、罕見的遺傳條件、缺乏運動、超重或肥胖、酒精、抽菸、高紅肉的飲食、加工肉類、低纖維飲食、久坐行為、發炎性腸道疾病(Inflammatory Bowel Disease, IBD)、糖尿病、阿什肯納茲猶太血統(Ashkenazi Jews)、乳腺癌及卵巢癌或子宮體癌的個人史、身材高大、接觸游離輻射等(附表 1, 2)。

附表 1、形成 CRC 之風險因素

風險因素	說明	參考文獻
結腸直腸癌 家族史	一位或多位近親患有結腸直腸癌。	(Canadian Cancer Society Risk Factors for Colorectal Cancer. 2017)
大腸癌個人史	有結腸直腸癌的人再次罹患的風險增加。	(Canadian Cancer Society Risk Factors for Colorectal Cancer. 2017)
FAP*	是一種罕見的遺傳疾病，通常由腺瘤性結腸瘻肉病(Adenomatous polyposis coli, APC)基因突變引起。	(Canadian Cancer Society Risk Factors for Colorectal Cancer. 2017)
Lynch 症候群	也稱遺傳性非瘻肉病性結腸直腸癌(Hereditary non-polyposis colorectal cancer, HNPCC)，特徵為微衛星區(Microsatellite regions)有突變現象，表示可能 DNA 錯配修補基因(DNA Mismatch Repair; MMR)發生缺陷(附表 2)。	(Rahner et al., 2010)
發現瘻肉	瘻肉越多，越有可能發生癌變。	(Canadian Cancer Society Risk Factors for Colorectal Cancer. 2017)
遺傳條件	Peutz-Jeghers 症候群，STK11 (LKB1)基因的突變引起或是 MUTYH 基因突變等。	(Canadian Cancer Society Risk Factors for Colorectal Cancer. 2017)
缺乏運動	身體活動越低，罹患 CRC 之機率上升。	(Friedenreich, 2001)
超重或肥胖	超重或肥胖者罹患直腸癌的發生率要高於健康體重者。	(Moghaddam, Woodward, & Huxley, 2007)
酒精	每天飲酒 50 克(約 3.5 杯)與不飲酒者相比，罹患結腸直腸癌的風險增加 1.5 倍。	(Giovannucci, Rimm, et al., 1995)
抽菸	香菸煙霧可透過各種機制引起心臟、肺、胃腸疾病以及癌症，為許多嚴重疾病的最大風險因素之一。	(Bak, Lee, & Lim, 2015)
高紅肉的飲食	紅肉攝入量及頻率與 CRC 成正相關。	(Baena & Salinas, 2015)
加工肉類	加工肉類是指通過煙燻、醃製或添加防腐劑(如硝酸鹽或亞硝酸鹽)保存的肉類。	(Canadian Cancer Society Risk Factors for Colorectal Cancer. 2017)

\*FAP 為家族性腺瘤性瘻肉病(Familial adenomatous polyposis)

附表 1 (續)、形成 CRC 之風險因素

風險因素	說明	參考文獻
低纖維飲食	蔬菜和纖維含量較低的飲食，可能會導致罹患 CRC 的風險增加。	(Slattery, 2000)
久坐行為	久坐時間增加與結直腸癌風險增加有關，特別是遠端結腸和直腸癌。	(Giovannucci, Ascherio, et al., 1995)
IBD*	風險隨著罹患 IBD 的時間長短以及 IBD 影響結腸範圍而增加。	(Canadian Cancer Society Risk Factors for Colorectal Cancer. 2017)
糖尿病	特別是肥胖的糖尿病患者，罹患結腸腺瘤的風險明顯較高。	(Elwing, Gao, Davidson, & Early, 2006)
Ashkenazi Jews	該血統往往在 APC 基因中有特定的突變，增加了風險。	(Canadian Cancer Society Risk Factors for Colorectal Cancer. 2017)
乳腺癌及卵巢癌 或子宮體癌個人史	Peutz-Jeghers 綜合症、德系猶太人祖先、Lynch 症候群或一些其他遺傳綜合症，可能增加患病率。	(Canadian Cancer Society Risk Factors for Colorectal Cancer. 2017)
身材高大	可能是受生長和青春期激素的影響。	(Canadian Cancer Society Risk Factors for Colorectal Cancer. 2017)
接觸游離輻射	曾接受放射治療的人罹患結直腸癌的風險增加。	(Canadian Cancer Society Risk Factors for Colorectal Cancer. 2017)

\*IBD 為發炎性腸道疾病(Inflammatory Bowel Disease)

附表 2、錯配修補基因變異與 CRC 風險 (Rahner et al., 2010)

Gene		Risk
MSH2	Male	68.7%
	Female	52%
MSH6	Male	22%
	Female	10%
MLH1	Male	68.7%
	Female	52%
PMS2	Male	20%
	Female	15%

### 1-1-1.2 腫瘤主要形成模式

從正常黏膜經腺瘤階段，再進行至癌症，是由一連串基因的改變累積而成，此為 CRC 腫瘤主要形成的模式，平均所需時間約十年才能從正常黏膜演變成腺性瘻肉，從腺性瘻肉轉變為 CRC 則約需五年左右。在診斷腺瘤同時發現其他部位也有腺瘤的比率約 50%，而即使在已切除瘻肉後的檢查中，不同部位的復發率也高達 30%。近年來經由內視鏡移除良性之腺瘤已證實可降低 CRC 的發生率甚至死亡率(國家衛生研究院-臺灣癌症臨床研究合作組織-大腸直腸癌診斷與治療之共識. 1998.10)。

### 1-1-2 CRC 分期系統

分期的主要類型為臨床分期及病理分期，臨床分期是根據體檢、影像學檢查(X 射線、CT 掃描等)和腫瘤活檢的結果估計癌症的程度。而病理分期則是依賴於前面提到的檢查和測試的結果，以及手術期間對癌症的了解。有時候，病理分期與臨床分期不同，例如手術發現癌症擴散超過想像。現有不同類型的分期系統，視醫師習慣或醫院規定來進行使用。但是對於大多數類型的癌症，最常見及有用的分期系統是 TNM 系統(American Cancer Society: Colorectal Cancer Stages. 2018)。

將常用之分期系統共通的情況列在附表 3。在診斷疾病與醫病溝通之間，必須先了解醫師是以那一種分期方法來說明，否則容易造成誤解。例如 Astler-Coller 的分期法，在少於四個淋巴轉移時為第二期，但以 Dukes 的分期法就會將其歸於第三期。

經過 TNM 系統中判斷後便可將癌症區分為 I 到 IV 期，而每階段亦會細分成 2 至 3 階段並使用小寫英文字母表示。原位癌在大多數癌症中被稱為 0 期，為腫瘤早期階段，若癌化便會衍生成腫瘤，有可能擴散至其他區域，並非所有癌症都有 0 期(American Cancer Society: Cancer Staging. 2015)。CRC 其 TNM 系統的定義於附表 3 (American Joint Committee on Cancer, AJCC 第八版)與臨床及病理分期於附表 4 (Amin et al., 2017)。



附表 3、CRC 其 TNM 系統的定義(American Joint Committee on Cancer, AJCC 第八版)

	Tx	無法評估的原發性腫瘤	
	T0	無跡象的原發性腫瘤	
原發性腫瘤	Tis	原位癌：上皮細胞層內或只侵犯到固有層(lamina propria)	
	T1	腫瘤侵犯到黏膜下層	
	T2	腫瘤侵犯到肌肉層	
	T3	腫瘤侵犯穿透肌肉層至漿膜層，或無腹膜覆蓋之大腸及直腸周圍組織	
	[T] T4	4a 腫瘤穿過腹膜的臟器層 4b 腫瘤直接侵犯至其他器官或結構	
	*Tis	包括癌細胞侷限於腺體的基底層或固有層而未穿透肌肉性黏膜層(Muscularis mucosae)至黏膜下層	
局部淋巴結	Nx	局部淋巴結無法評估	
	N0	無局部淋巴結之轉移	
	[N] N1	1a	有 1 個局部淋巴結轉移
		1b	有 2 到 3 個局部淋巴結轉移
		1c	腫瘤存在於漿膜下層或是非腹膜的大腸周邊或是直腸周邊組織，沒有看到周邊淋巴結的轉移
N2	2a 有 4 到 6 個局部淋巴結轉移 2b 有 7 個以上局部淋巴結轉移		
遠端轉移	Mx	未做評估	
	M0	無遠端轉移	
	[M] M1	1a	有單一器官遠端轉移，無腹膜轉移
		1b	超過一個器官轉移，無腹膜轉移
1c		腹膜轉移	

附表 4、CRC 臨床及病理分期 (Amin et al., 2017)

<b>Clinical &amp; Pathologic Stages</b>					
Group	T	N	M	Dukes	MAC
0	Tis	N0	M0	—	—
I	T1	N0	M0	A	A
	T2	N0	M0	A	B1
IIA	T3	N0	M0	B	B2
IIB	T4a	N0	M0	B	B2
IIC	T4b	N0	M0	B	B3
IIIA	T1-2	N1/N1c	M0	C	C1
	T1	N2a	M0	C	C1
IIIB	T3-4a	N1/N1c	M0	C	C2
	T2-3	N2a	M0	C	C1/C2
	T1-2	N2b	M0	C	C1
IIIC	T4a	N2a	M0	C	C2
	T3-4a	N2b	M0	C	C2
	T4b	N1-2	M0	C	C3
IVA	AnyT	AnyN	M1a	—	—
IVB	AnyT	AnyN	M1b	—	—
IVC	AnyT	AnyN	M1c	—	—

\*在 CRC 中，病理分期與臨床分期為相同標準。

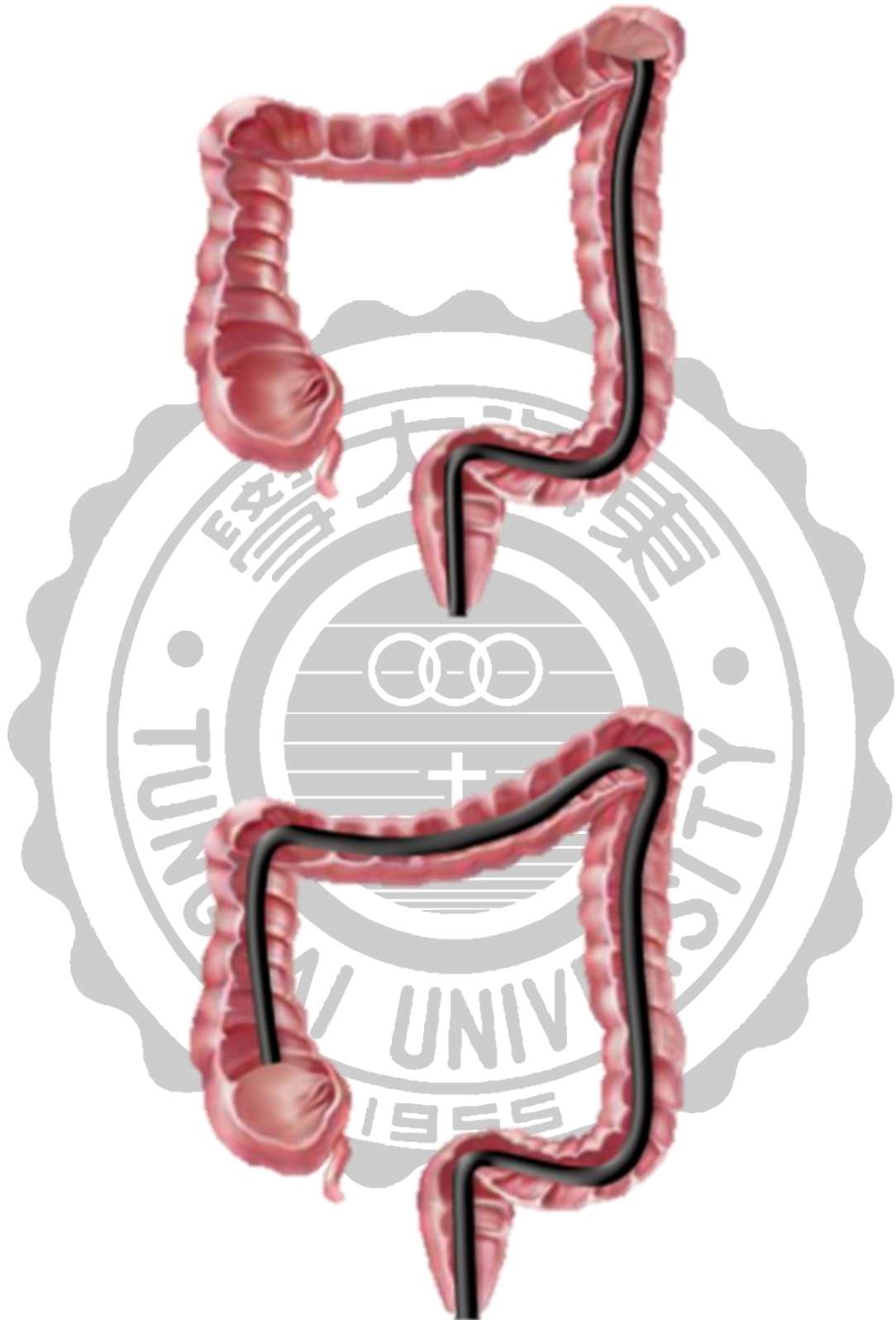
\*MAC 為 Astler-Coller 改良版

### 1-1-3 CRC 之篩檢診斷

篩檢(Screening)是在沒有症狀的人群中尋找疾病之過程，而監測(Surveillance)則是針對腫瘤病變的患者或某特定高危險群，如具有大腸癌的家族史或有潰瘍性結腸炎病史者須定期追蹤檢查(國家衛生研究院-臺灣癌症臨床研究合作組織-大腸直腸癌診斷與治療之共識，1998.10)。

大腸癌常見的檢查方法主要有內視鏡檢查、放射檢查以及糞便檢查，前兩者可以查看腸道結構，找出可能異常區域，後者侵入性較小且易於完成，但較不容易檢測到瘰肉(American Cancer Society: Colorectal Cancer Screening Tests, 2017)。內視鏡檢查分為乙狀結腸鏡及大腸鏡，將一小型攝影機接上手指粗細之軟管，觀察結腸和直腸的一部分，通過肛門進入直腸及結腸的下部，再藉由螢幕顯像。內視鏡檢查範圍如附圖 1 (American Cancer Society: Colorectal Cancer Screening Tests, 2017)；而放射檢查主要利用造影劑，配合 CT 或 X 光檢查；糞便檢查為尋找糞便中潛在的血液，較大的結腸直腸瘰肉或腫瘤的血管通常較為脆弱，容易因糞便通過而摩擦出血，但由於血液不多的關係，不易在糞便中用肉眼觀察到。所以需要透過化學反應來檢測糞便中之微量血液(糞便潛血)，但該測試無法分辨血液是來自結腸或消化道的其他部位。若糞便潛血結果為陽性，則需要再進行結腸鏡檢查以查明出血原因。上述檢查之整理列在附表 5。

值得注意的是，大腸、直腸癌雖同為「腸癌」，但治療方式卻截然不同。大腸癌的病灶主要發生於腹腔，治療方式是以手術切除為主，除了將包含腫瘤的腸道切除，更重要的是將附近相關的淋巴結群完全清理，切除後再將兩端腸子重新接回。但直腸是腸道的最末端，位於骨盆腔最深且狹窄的地方，其長度僅 12~15 公分，離肛門很近，主要作用為儲存糞便。因為直腸的生理構造與大腸不同，腫瘤局部的復發機率高，在治療時需兼顧保留肛門功能及降低局部復發的機率，因此直腸癌治療較大腸癌複雜許多 (Recio-Boiles & Babiker, 2018)。



附圖 1、乙狀結腸鏡(上)&大腸鏡(下)示意圖

(參考自 American Cancer Society: Colorectal Cancer Screening Tests. 2017)

附表 5、CRC 篩檢診斷之優缺點

(American Cancer Society: Colorectal Cancer Screening Tests. 2017)

診斷方式	優點	缺點
乙狀結腸鏡†	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.快速安全</li> <li>2.不使用鎮靜劑</li> <li>3.不需要專家</li> <li>4.每5年完成一次</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.可能會錯過小瘻肉</li> <li>2.可能會有些不適</li> <li>3.有出血、感染或腸撕裂的風險(較小)</li> </ol>
結腸鏡	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.可以看整個結腸</li> <li>2.可以活檢並去除瘻肉</li> <li>3.每10年完成一次</li> <li>4.可以幫助找到其他一些疾病</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.需要充分的腸道準備</li> <li>2.較昂貴</li> <li>3.通常需要鎮靜</li> <li>4.需有人照護</li> <li>5.有小出血、腸道泌液或感染的風險</li> </ol>
鋇劑灌腸造影†	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.可以看到整個結腸</li> <li>2.相對安全</li> <li>3.每5年完成一次</li> <li>4.不需要鎮靜劑</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.可能會錯過小瘻肉</li> <li>2.需要充分的腸道準備</li> <li>3.可能有假陽性結果</li> <li>4.無法去除瘻肉</li> </ol>
電腦斷層掃描**	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.快速安全</li> <li>2.可以看到整個結腸</li> <li>3.每5年完成一次</li> <li>4.不需要鎮靜劑</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.可能會錯過小瘻肉</li> <li>2.需要充分的腸道準備</li> <li>3.可能有假陽性結果</li> <li>4.無法去除瘻肉</li> </ol>
瘻創木脂測試†	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.沒有直接風險</li> <li>2.沒有腸道準備</li> <li>3.在家即可完成取樣</li> <li>4.便宜</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.可能會錯過許多瘻肉和一些腫瘤</li> <li>2.可能有假陽性結果</li> <li>3.需預先測試飲食變化</li> <li>4.每年都需要完成</li> </ol>
糞便免疫化學測試†	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.沒有直接風險</li> <li>2.沒有腸道準備</li> <li>3.不用預測試飲食的變化</li> <li>4.在家即可完成取樣</li> <li>5.相當便宜</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.可能會錯過許多瘻肉和一些腫瘤</li> <li>2.可能有假陽性結果</li> <li>3.每年都需要完成</li> </ol>
糞便 DNA 測試**†	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.沒有直接風險</li> <li>2.沒有腸道準備</li> <li>3.不用預測試飲食的變化</li> <li>4.在家即可完成取樣</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.可能會錯過許多瘻肉和一些腫瘤</li> <li>2.可能有假陽性結果</li> <li>3.每3年完成一次</li> </ol>

\*表示較新診斷方法，可能會有保險問題。†表示如有異常，需以結腸鏡檢查

## 1-2 代謝症候群

代謝症候群最早源自 1920 年瑞典 Kylin 醫師提出高血壓、高血糖、痛風會同時出現在一個人身上 (Kylin, 1923)。1947 年 Vague 醫師指出肥胖與糖尿病、心血管疾病有關係 (Vague, 1947)。後人將由血糖異常、高血脂、高血壓與肥胖等危險因子所造成之病態現象定義為代謝症候群，而這些危險因子的累積，會導致心血管疾病與糖尿病的危險性增加 (Eckel, Grundy, & Zimmet, 2005)。多重代謝性異常包括高血壓、三酸甘油酯(Triglyceride, TG)偏高、高密度脂蛋白膽固醇(High density lipoprotein cholesterol, HDL-C)偏低、脂質代謝異常、空腹血糖偏高、腹部肥胖、高尿酸與凝血因子的不正常等 (Hagland & Søreide, 2015)。凝血指標主要是凝血酶原時間(Prothrombin Time, PT)、國際標準化比值(International normalized ratio, INR)與部份活化酶原時間(Activated partial thromboplastin time, APTT)。若癌症患者的 PT/INR 比值若異常低，會導致更頻繁的瘀傷和出血。有些癌症患者可能會接受肝素治療，用來解決因癌症治療導致血小板減少的副作用 (UMN Comprehensive Cancer Center. Blood Tests. 2016)。所以凝血因子部分也會在後續臨床資料中觀察。近年來代謝症候群盛行是由於現在社會久坐的生活方式與飲食所造成，越來越多肥胖、第二型糖尿病、心臟疾病和胃腸道疾病等患者被診斷為代謝症候群。目前代謝症候群開始與 CRC 風險相關方面進行連結，發現被定義為代謝症候群的男性和女性，其罹患 CRC 風險顯著升高，相對風險(relative risk, RR)為 2.99 倍(Trevisan et al., 2001)。流行病學數據指出基於代謝症候群指標(腹部肥胖、缺乏運動)、臨床指標(第二型糖尿病、高血壓)與血漿或血清成分因素的研究(高血脂症、高血糖、低 HDL 膽固醇)證據所支持，具有代謝症候群的人罹患 CRC 與腺瘤的風險增加(Giovannucci, 2007)。血脂主要受總膽固醇(Total Cholesterol, TC)、TG、高密度脂蛋白膽固醇 HDL-C 與低密度脂蛋白膽固醇(Low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)影響。TG 是人體內含量最豐富的脂質之一，大多數組織利用來自 TG 水解產物的能量。在正常情況下，人體內脂質的儲存、運輸和交換維持在動態平衡狀態，當癌症發生時，脂質的生理平衡被破壞，導致脂質代謝紊亂。有研究指出 TG 水平與 CRC 的發生呈正相關(Yamada et al., 1998)。也有研究結果表明，血清 TG 越高，通常與直腸乙狀結腸中腺瘤的風險越高有關(Sun et al., 2011)。而 HDL-C 方面研究顯示與 CRC 風險呈負相關(Ahmed, Schmitz, Anderson, Rosamond, & Folsom, 2006)。

目前我國衛生福利部國民健康署將代謝症候群判定標準為腹部肥胖、血壓偏高、空腹血糖偏高、三酸甘油酯偏高、高密度脂蛋白膽固醇偏低以上五項組成因子(附表 6)，符合三項(含)以上即可判定為代謝症候群(衛生福利部國民健康署-健康主題-慢性病防治-代謝症候群. 2018.)。

附表 6、代謝症候群五項危險因子

Metabolic syndrome risk factor		
	Male	Female
Central obesity	Waist $\geq$ 90 cm	Waist $\geq$ 80 cm
HDL-C	<40 mg/dl	<50 mg/dl
Blood pressure	SBP $\geq$ 130 mmHg、DBP $\geq$ 85 mmHg	
Fasting glucose	FG $\geq$ 100 mg/dl	
Triglyceride	TG $\geq$ 150 mg/dl	

### 1-2-1 CRC 與代謝症候群之關聯

發生 CRC 的危險因素包括年齡、結腸瘻肉病史、CRC 病史與環境因素，如飲食、體重和一般生活方式。身體質量指數(Body Mass Index, BMI)和腰圍也是 CRC 的明確風險因素之一(附表 7)，但對這些參數與不同疾病亞群之間的聯繫知之甚少 (Cunningham et al., 2010)。

除上述危險因素外，運動頻率/強度也是其中之一，且通常與 CRC 呈負相關，有研究指出身體活動越低，罹患 CRC 之機率越高 (Friedenreich, 2001)，所以具有高水平的身体活動量被認為與降低 CRC 風險有關 (Slattery, 2000)。而肥胖是現代社會不當飲食使能量攝入超過支出的長期盈餘的結果，定義為 BMI  $\geq$  30 kg/m<sup>2</sup>。肥胖被認為與第二型糖尿病、高血壓和冠心病等的發病率呈正相關 (Larsson & Wolk, 2007)。除了心血管疾病和第二型糖尿病的風險增加之外，也有研究表明肥胖與 CRC、乳腺癌、子宮內膜癌與食道癌等皆具正相關性(Bianchini, Kaaks, & Vainio, 2002)。另有研究發現隨著身體質量指數增加，死亡率也有顯著增加的趨勢(Calle, Rodriguez, Walker Thurmond, & Thun, 2003)。先前研究發現尤其是肥胖的糖尿病患者，患結腸腺瘤的風險明顯較高(Elwing et al., 2006)。在另一項研究中發現在中國人群中，直腸乙狀結腸腺瘤患者的血糖濃度顯著高於無瘻肉對照者(Wang, Lin, Lai, Liu, & Sheu, 2005)。由於葡萄糖代謝的調節異常可能會導致細胞異常的生長和增殖，並最終演變成腫瘤(Lin et al., 2015)，因此後續實驗

也有檢測受試者血糖值。飲食方面有文獻指出高脂肪、高膽固醇和低纖維攝入與 CRC 具高度相關 (Järvinen, Knekt, Hakulinen, Rissanen, & Heliövaara, 2001; K. Liu et al., 1979)。也有文獻指出使用單因子分析肉類、家禽、麵包和糖果與 CRC 風險有關 (Peters, Pike, Garabrant, & Mack, 1992)。同樣地，發現西式飲食即肉類、精製穀物與醣類含量較高，而蔬菜和纖維含量較低的可能會導致 CRC 的風險增加，另外有數據支持攝入較多的鈣及葉酸可以降低 CRC 風險。據估計，CRC 中有 13% 可歸因於身體活動低下，12% 可歸因於西式飲食 (Slattery, 2000)。

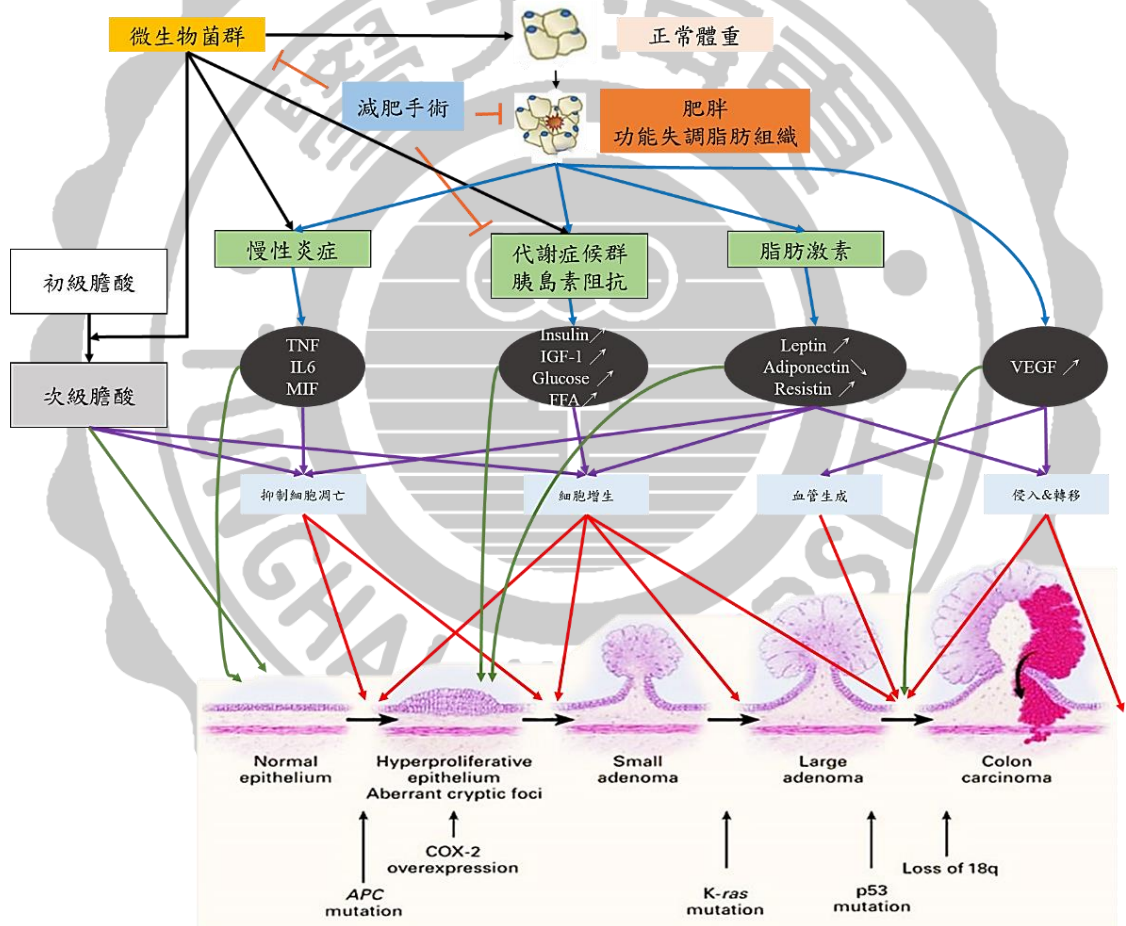
由於 CRC 容易轉移至肝臟，所以也檢查肝功能(American Cancer Society: Tests to Diagnose Colorectal Cancer. 2018)。肝指數包括天門冬胺酸轉胺酶(GOT/AST)以及丙胺酸轉胺酶(GPT/ALT)；腎指數則是血中尿素氮(Blood Urea nitrogen, BUN)、肌酸酐(Creatinine)以及腎絲球過濾率(estimated GFR, eGFR)。如果腎臟功能不正常或癌症患者接受某些可能導致腎臟損傷的化療藥物，血液中會有過量的尿素，導致 BUN 濃度升高。而肌酸酐是由身體產生的化合物，由腎臟處理並藉尿液排出，因此肌酸酐可用於監測腎功能，而一些癌症治療可能會導致腎臟損害(UMN Comprehensive Cancer Center. Blood Tests. 2016)。

附表 7、身體質量指數(BMI)和腰圍的分類以及肥胖相關併發症的風險 (Han & Lean, 2016)

Body mass index (BMI)			
Men and women	18.5-24.9 kg/m <sup>2</sup>	25-29.9 kg/m <sup>2</sup>	≥ 30 kg/m <sup>2</sup>
Classification	Normal weight	Overweight	Obese
Risk of co-morbidities	Low	Increased	High
Waist circumference			
Men	<94 cm	94-101.9 cm	≥ 102 cm
Women	<80 cm	80-87.9 cm	≥ 88 cm
Classification	Normal fat distribution	Moderate central fat accumulation	High central fat accumulation
Risk of co-morbidities	Low	Increased	High



附圖 2 為肥胖與發炎和 CRC 相關潛在因素的機制總結，藍色箭頭表示肥胖的代謝後果，黑色箭頭代表微生物菌群的可能影響結果，紫色箭頭表示與肥胖相關的代謝變化，紅色箭頭將這些變化局限在致癌過程中，綠色箭頭表示當不同的生物因子可能開始起作用時，正常上皮-癌之階段目標，橙色線表示減肥手術的一些潛在的有益效果(FFA，游離脂肪酸；IGF-1，胰島素樣生長因子 1；IL，介白素；MIF，巨噬細胞移動抑制因子；TNF，腫瘤壞死因子；VEGF，血管內皮生長因子；APC，腺瘤性瘻肉病；MSI，微衛星不穩定性；K-ras，Kirsten-大鼠肉瘤；Cox-2，環氧合酶-2；DCC (在 CRC 中缺失)；DPC4 (在胰腺癌中缺失) (Bardou, Barkun, & Martel, 2013)。

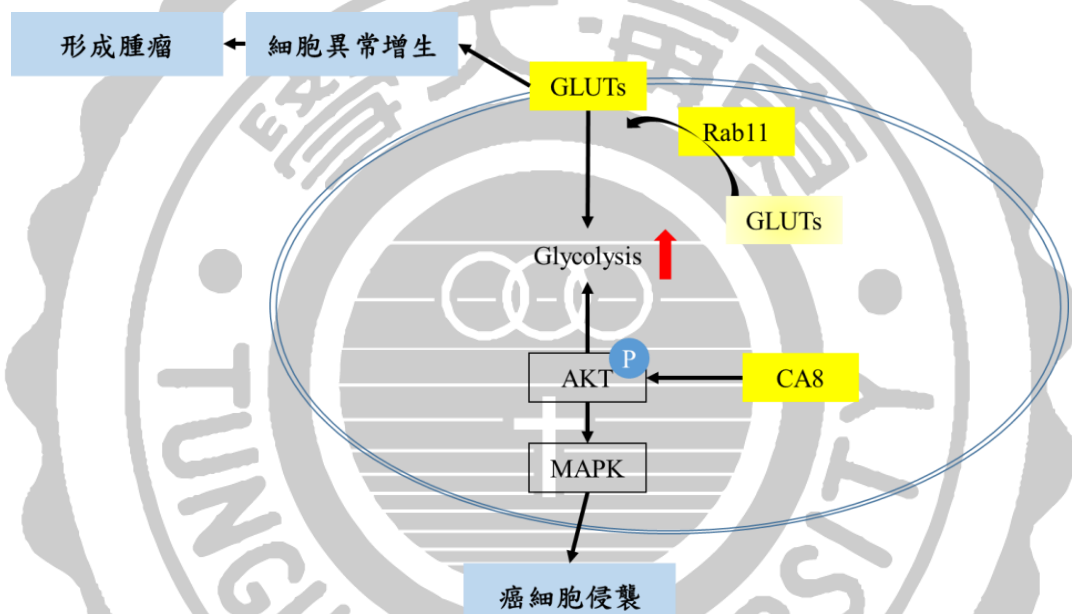


附圖 2、肥胖與發炎和 CRC 相關的潛在因素的機制總結 (Bardou et al., 2013)

## 1-3 代謝相關基因表現

### 1-3-1 細胞傳訊路徑

本次研究選用 Glucose transporters I/III (GLUT1/3)、Carbonic anhydrase related protein VIII (CA8)與 Rab11 作為目標基因，探討四個基因之間與 CRC 之關聯。附圖 3 為四個基因之間關聯機制圖，GLUT 1/3 主要是負責細胞的葡萄糖攝取，而癌細胞會利用糖酵解來產能。CA8 會透過磷酸化 AKT 刺激 MAPK 家族，從而使癌細胞產生侵襲。Rab11 為負責運送 GLUTs 之囊泡蛋白。



附圖 3、本研究重要關鍵基因與癌症推測之關聯。

碳水化合物如葡萄糖是細胞生長最重要的能量來源，快速增長的癌細胞比正常細胞有更高的碳水化合物需求量，這是癌症的一個標誌，稱為「Warburg effect」(Warburg, 1956)。依據 Warburg effect，無論氧氣供應是否充裕，癌細胞偏向依賴有氧糖酵解作用供能而非粒線體之有氧呼吸，所以需帶入大量葡萄糖，因此推測需要大幅增多葡萄糖轉運蛋白。研究亦指出 GLUT1 與缺氧誘導作用及癌症病程具相關性 (Carvalho et al., 2011)。而 GLUT3 原先被認為只在高耗能之神經細胞表現，後續研究證實 GLUT3 在多種組織中均為高效轉運蛋白。有研究以 D-(+)-glucose 和 2-deoxy-D-(+)-glucose (2-DG) 去刺激 CRC 細胞株 (SW480 和 SW620) 並觀察對細胞增殖是否有影響，結果顯示給予葡萄糖之 SW480 和 SW620 細胞株的增殖反應均顯著增加，而給予 2-DG 則是顯著抑制 SW480 和 SW620 細胞株的增

殖反應，表明糖酵解途徑和糖酵解相關基因可能在 CRC 的發展中起重要作用，但其分子機制尚需進一步研究來驗證 (Yeh et al., 2008)。

CA8 在近期癌症研究中被發現在 CRC 及非小細胞肺癌中大量表現，使用免疫組織化學染色發現，過度表現的 CA8 在 CRC 患者佔 78% (47/60) (Miyaji et al., 2003)、非小細胞肺癌佔 98% (54/55) (Akisawa et al., 2003)。另有研究表明，CA8 在結腸癌細胞株(LoVo)和分化腺瘤細胞株(PC9)中過度表現，發現相較於親代細胞，其侵襲能力更強 (Ishihara et al., 2006)。另外在人骨肉瘤細胞(human osteosarcoma cell, HOS)中剔除 CA8 後發現細胞侵襲的能力下降、Akt 活化減少，導致葡萄糖攝取顯著降低，證實與葡萄糖帶入量及糖解作用活性具正相關 (Wang et al., 2016)，且常發現於腫瘤浸潤邊緣會有過量表現，推測其在腫瘤侵襲中發揮一定作用 (Miyaji et al., 2003)。

Rab11 為一種負責膜蛋白內吞至細胞後再回到細胞膜上的運送蛋白，負責調控細胞內囊泡於胞內至胞膜之運輸，在過去的研究中發現 CRC 患者的黏膜細胞其 Rab11 的表現比正常組織還要高，並與 CRC 的發生有密切關係 (Xu et al., 2016)。其餘學者的研究中陸續證實，GLUT1 及 GLUT3 皆為 Rab11 運送的膜蛋白。有研究發現，透過免疫沉澱(Immunoprecipitation)的方式發現 Rab11 與 GLUT1/3 可以共同沉澱下來，表示 GLUT1 和 GLUT3 有可能透過 Rab11 運送表現在細胞膜上。雖然也有文獻指出 Rab11 可調控 GLUT4 的表現，並影響胰島素的吸收 (Larance et al., 2005)。但在我們前驅數據之組織染色中發現 GLUT4 的表現並不多，主要以 GLUT1/3 為主(附錄 7)。

### 1-3-2 葡萄糖轉運蛋白(Glucose transporters, GLUTs)

GLUT1 是 GLUT 家族的代表，並廣泛分佈於正常組織中。這種轉運蛋白在許多腫瘤中都有過度表現的現象，包括肝，胰腺，乳腺，食道，腦，腎，肺，皮膚，結腸直腸，子宮內膜癌，卵巢癌和子宮頸癌 (Medina & Owen, 2002)。研究表明，GLUT1 的表現與腫瘤發生和不良預後之間存在密切關係 (Carvalho et al., 2011)。先前研究證實在多種腫瘤類型，利用  $^{18}\text{F}$  去氧葡萄糖( $^{18}\text{F}$  2-fluoro-2-deoxy-D-glucose, FDG)的正子電腦斷層造影(Positron emission tomography, PET)顯示與鄰近的正常組織相比，腫瘤中葡萄糖攝取顯著增加 (Gambhir, 2002)。在 CRC 患者方面，GLUT1 染色強烈的患者(陽性細胞>50%)比 GLUT1 染色微弱的患者，其死亡風險高 2.3 倍 (Haber et al., 1998)。GLUT2 則是主要於肝臟、胰島細胞和視網膜中表現。而 GLUT3 也表現在許多癌細胞株中，且在缺氧期間負責增加葡萄糖攝取 (Airley & Mobasher, 2007)。許多研究也表明 GLUT3 在其他癌症中的

表現增加，如腦癌 (Boado, Black, & Pardridge, 1994)、乳腺癌 (Binder, Binder, Marx, Schauer, & Hiddemann, 1997)、胃癌 (Younes, Lechago, Somoano, Mosharaf, & Lechago, 1997)、肺癌 (Ito et al., 1998)、腦膜癌 (Glick, Unterman, & Lacson, 1993)、口腔鱗狀細胞癌 (Ayala et al., 2010)等。GLUT4 在乳癌及胃癌中被觀察到大量表現 (Binder et al., 1997; Noguchi et al., 1999)。GLUT5 觀察到在肝臟轉移性病變中，其表現顯著高於原發性肺腫瘤 (Kurata, Oguri, Isobe, Ishioka, & Yamakido, 1999)。

腫瘤經常表現出 GLUTs 的過度表現，尤其是缺氧反應性 GLUT1 和 GLUT3 蛋白。在葡萄糖利用方面，尤其是糖酵解代謝的增強是惡性細胞的普遍特徵，由此導致葡萄糖需求量大幅增加意味著需要增加通過質膜之葡萄糖轉運蛋白 (Haber et al., 1998)。研究表明 GLUT1 和 GLUT3 的過量表現可能與組織發育具密切相關，且癌細胞對葡萄糖攝取的增加可能來自於這兩種葡萄糖轉運蛋白表現的增加 (Yamamoto et al., 1990)。在人體研究中，GLUT1 過表現與許多腫瘤特徵相關，包括侵襲性增強、增殖活性上升與患者生存率下降 (Szablewski, 2013)。

### 1-3-3 碳酸酐酶相關蛋白 8 (Carbonic anhydrase related protein VIII, CA8)

人體中的氧氣是由血紅素運送，但二氧化碳則不盡相同，少於 10% 直接溶於血漿中、約莫 20% 則是由血紅素運送、剩下的 70% 則被轉成碳酸溶於血漿中運送。主要由紅血球中的碳酸酐酶( $\alpha$ -Carbonic anhydrase,  $\alpha$ -CAs)催化二氧化碳與水結合成碳酸，解離出氫離子及重碳酸根離子，氫離子會與血紅素結合，重碳酸根離子會離開紅血球而溶於血漿之中。碳酸酐酶存在體內許多部位，與身體細胞水分的移動及酸鹼平衡有相當大的關聯。而 CA8 是碳酸酐酶異構酶(Carbonic anhydrase related protein, CARP)其中之一，和 CAs 相較之下，CARPs 不具有  $Zn^{2+}$  離子結合的能力，因此無法催化二氧化碳水合反應 (紀黨皓, 2014)。在人體組織中，於胸腺、小腸、脾臟、前列腺、卵巢、結腸及睪丸中均可鑑定出陽性反應 (Lehtonen et al., 2004)。在人腦中有較高表現，尤其是在小腦部分，證實 CA8 對於運動控制非常重要 (Jiao et al., 2005)。目前已證實 CA8 可以調節 1,4,5-三磷酸肌醇(ITPR1)，再由 ITPR1 調節  $Ca^{2+}$  釋放，若 CA8 缺陷導致  $Ca^{2+}$  調節異常可能與中風及阿茲海默症相關 (Zhuang et al., 2015)。而在其他癌症研究中也發現 CA8 缺陷與 CRC 及肺癌之發展均有關聯，細胞內 CA8 表現被證實與葡萄糖攝入量及糖解作用活性有正比依存關係 (Miyaji et al., 2003)。根據研究 CA8 能促進結腸癌細胞生長和侵襲 (Nishikata et al., 2007)，也發現在 CRC 中，腫瘤浸潤邊界處發

現到 CA8 的過度表現 (Miyaji et al., 2003)。

### 1-3-4 拉布蛋白 11 (Rab11)

調控 GTP 酶家族(Regulatory GTPase superfamily)會出現在許多人體的生理反應，大致可分成三類：Heterotrimeric G protein、Ras superfamily 與調節蛋白質合成的因子(Elongation、Initiation 與 Termination)。Ras superfamily 為 oncogene(致癌基因)，因其分子量較小(20~40kDa)，又稱為 small G-protein，主要有 Rat sarcoma (Ras)、Ras homologous (Rho)、ADP-ribosylation factor (Arf)、Ras-like nuclear (Ran) 及 Ras-like proteins in brain (Rab)，其中 Ras 及 Rho 是負責細胞中訊息傳遞之過程，而 Arf、Ran 及 Rab 負責細胞內物質的運輸 (Lim, Chua, & Tang, 2011; Takahashi et al., 2011)。Ras 在身體中扮演訊息傳遞(signal transduction)的角色，Rho 是負責 actin 細胞骨架的組裝，Rab 負責調節體內的囊泡(vesicle)運輸，Ran 則負責調節蛋白進出細胞核的運輸。

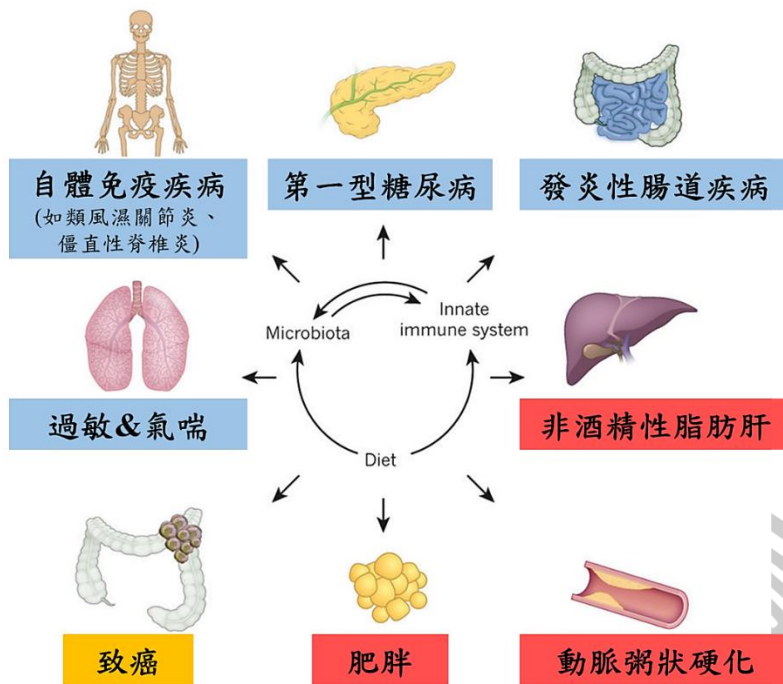
Rab 蛋白質在 small GTPase 家族屬於數量較多者，不同的 Rab GTPase 位於細胞內膜不同位置，負責調控內膜系統上的運輸、調節囊泡的形成及運輸、胞吞作用及胞噬作用 (Stenmark, 2009)。其中 Rab1、Rab2 及 Rab6 蛋白質可參與內質網到高基氏體間物質之運輸，Rab4、Rab5、Rab7、Rab9 及 Rab11 蛋白質參與高基氏體到溶體和細胞膜間的物质運輸，而 Rab8 蛋白質僅參與高基氏體到細胞膜間的物质運輸，Rab3 蛋白質參與液泡到細胞膜間物質的運輸 (S. Liu & Storrie, 2012; Mizuno-Yamasaki, Rivera-Molina, & Novick, 2012; Nielsen, Severin, Backer, Hyman, & Zerial, 1999)。

Rab11 是 Rab 小分子 GTP 酶家族的成員，為一種負責膜蛋白內吞進細胞後再回到細胞膜上的運送蛋白，調控細胞內囊泡之胞內至胞膜之運輸，在維持細胞表面上的受體、轉運蛋白和其他關鍵分子的膜穩定方面起關鍵作用，不同的 Rab 蛋白調節不同的囊泡和內體運輸途徑，在細胞模式中確認了 GLUT3 為 Rab11 運送蛋白質之一，發現若 Rab11 缺陷會導致 GLUT3 表現較低 (McClory et al., 2014)。先前研究證實 Rab11 與 EGFR 及 E-cadherin 此兩個重要癌細胞生物標記有關，代表 Rab 蛋白質與癌轉移相關 (Tang & Ng, 2009)。其餘學者的研究中陸續發現，GLUT1/3 皆為 Rab11 運送之膜蛋白 (Xu et al., 2016)。也有文獻指出 Rab11 可調控 GLUT4 的表現，並影響胰島素的吸收 (Larance et al., 2005)。最近研究中發現 CRC 病人的黏膜細胞其 Rab11 的表現比正常組織還高，推測與 CRC 的發生具密切關係 (Chung et al., 2016)。

## 1-4 腸道菌相與 CRC 之關聯

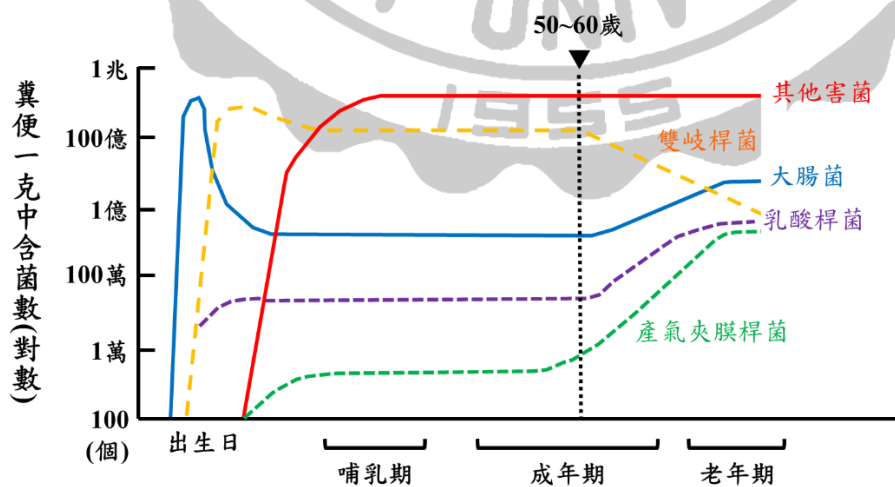
健康的人體至少含有比人體細胞多十倍的細菌細胞，而最豐富多樣的微生物群落位於腸道中。胃腸道迄今為止含有的微生物數量最多，估計約為 1 百兆，是我們體內所有體細胞和生殖細胞的 10 倍 (Turnbaugh et al., 2009)。幾項研究表明，胃腸道微生物群是「遺傳的」，並隨後通過飲食或暴露在整個生命期內進行修飾 (Biasucci, Benenati, Morelli, Bessi, & Boehm, 2008; Penders et al., 2006)。腸道微生物群與胃腸道細胞共生，儘管現有微生物群的精確種類和變異性未知，但人們普遍認為，腸道的核心微生物群是由變形桿菌、擬桿菌、厚壁菌門和放線菌組成 (Turnbaugh et al., 2009)。然而，判斷什麼是「好」與「壞」細菌相區分，以及微生物群如何影響人類健康是相當大的挑戰。據估計，全球大約 20% 的癌症與傳染性病原體相關，例如人類乳頭狀瘤病毒會誘導子宮頸癌、幽門螺桿菌引起的胃癌 (zur Hausen, 2009)。近幾年來有越來越多的數據支持 CRC 可能由細菌促進癌症發起的假說 (Tjalsma, Boleij, Marchesi, & Dutilh, 2012)。微生物對腸道癌症發展的影響機制包括促炎和抗炎信號的平衡，細菌腸毒素對黏膜細胞和細胞內途徑的直接影響，以及細菌在將致癌性飲食因素轉化為致癌物中的間接潛力 (Collins, Hogan, & Winter, 2011)。徹底了解這些過程將為未來的研究提供方向，並可能最終有助於開發 CRC 診斷和預防的新策略 (Boleij & Tjalsma, 2012)。

附圖 4 為微生物天然免疫系統相互作用涉及到多因子疾病的整理。許多炎症性疾病受先天免疫和微生物菌群串擾改變的影響，這些包括代謝(紅色框)、腫瘤(橙色框)和自身免疫性或自身炎症疾病(藍色框)，通過控制飲食來調節疾病的嚴重程度及其對微生物-免疫相互作用的影響為目前較新穎的研究領域。(Thaiss, Zmora, Levy, & Elinav, 2016)



附圖 4、腸道菌相與多種疾病有高度關聯性 (Thaiss et al., 2016)

附圖 5 為出生到死亡的腸道菌相變化，在完全無菌的子宮中生長的胎兒，從脫離子宮進入產道開始，就與無數細菌接觸，24 小時後糞便中的細菌數目就已達到每克 1 千億以上，1 週左右達到平衡，形成以雙歧桿菌為主的嬰兒型腸道菌相。進入老年期時，最顯著的變化就是雙歧桿菌大幅降低，而梭狀桿菌之類的壞菌則大幅上升。此現象稱為腸道老化，常見於生活不正常、工作緊張、飲食失衡的年輕人。許多人生理年齡也許只有 30~40 歲，而「腸道年齡」可能已經老化到 60~70 歲的程度 (蔡英傑, 2006)。



附圖 5、腸道菌相變化 (蔡英傑, 2006)

## 1-5 血清生化數值分析

血液常規檢查(Comeplete Blood Count, CBC)主要包含紅血球數目(Red blood cell, RBC)、白血球數目(White blood cell, WBC)、血球比容(Hematocrit, Hct)、血紅素(Hemoglobin, Hb)、平均血球容積(Mean corpuscular volume, MCV)、平均血球血紅素(Mean corpuscula hemoglobin, MCH)、平均血球血紅素濃度(Mean corpuscula-hemoglobin concentration, MCHC)、血小板(Platelet)、帶狀中性球(Neutrophil band)、分節中性球(Neutrophils segmented)、淋巴球(Lymphocytes)、單核球(Monocytes)、嗜酸性球(Eosinophils)、嗜鹼性球(Basophiles)等項目。這些項目可以顯示患者是否有貧血現象，因為有些 CRC 患者由於腫瘤關係長期流血導致貧血的產生(American Cancer Society: Tests to Diagnose Colorectal Cancer. 2018)。

癌症指數 CEA (Carcino-embryonic antigen, 癌胚抗原)異常升高也與 CRC 有關，正常值根據執行的實驗室不同而不同，但通常於 2.5-5 ng/mL 的範圍內，在有吸菸或發炎症狀之測試者中，CEA 指數升高，但很少超過 10 ng/mL (Fakih & Padmanabhan, 2006)。根據術前 CEA 指數評估患有 CRC II 期患者預後的結果，CEA <5 ng/mL 的患者有最好的預後結果，其次是 CEA 為 5~10 ng/mL 的患者，而 CEA > 10 ng/mL 的患者預後結果最差 (Harrison, 1997)。由於這類蛋白質的敏感性(Sensitivity)以及特異性(Specificity)均不高，因此並不適合用來做為癌症之篩檢或早期診斷癌症之用。早期 CRC 根據統計，其 CEA 濃度會升高的機率不到 10%，即使是末期患者，仍有兩成左右 CEA 濃度維持正常(<5 ng/ml)，因此 CEA 濃度的變化目前僅適合手術切除腫瘤後的追蹤。

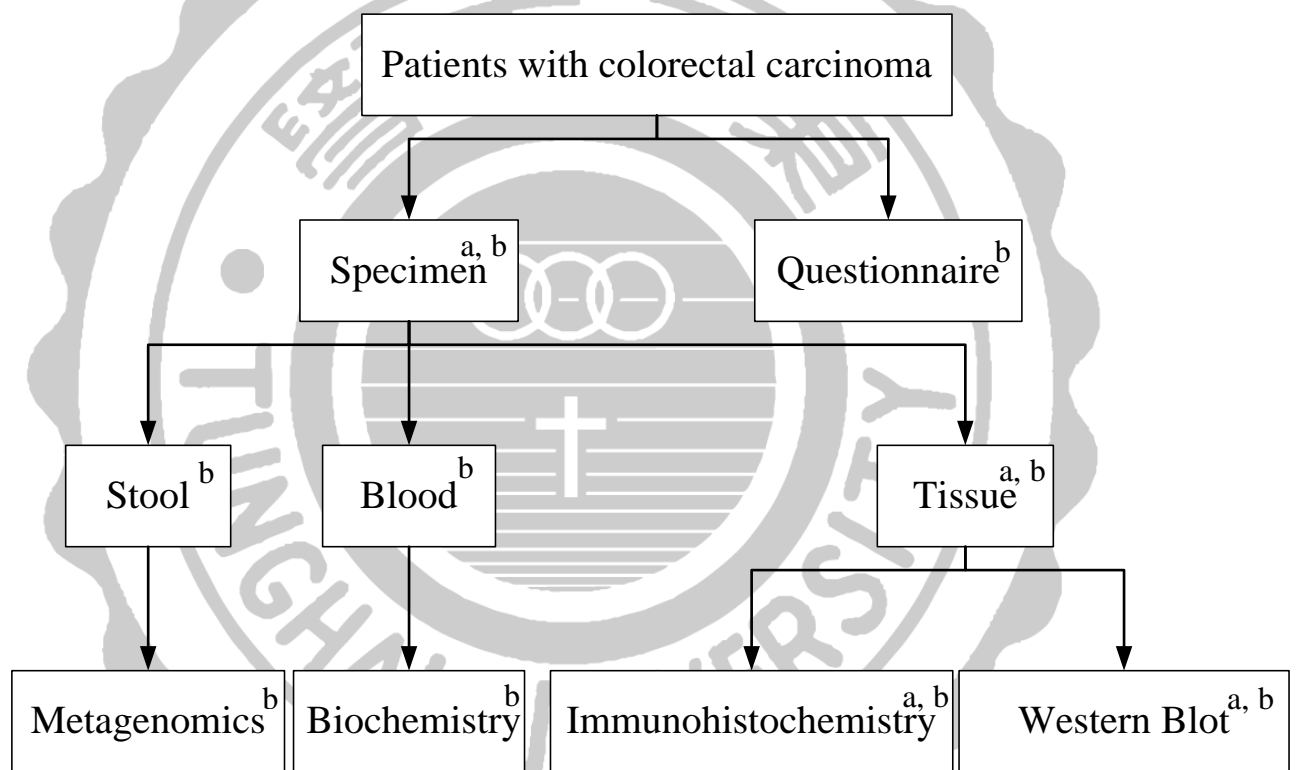


## 第二章、研究目的與實驗架構

### 2-1 研究目的

為了能更清楚界定能量代謝在人類 CRC 所扮演的角色，利用體外模式，進一步探討能量代謝與基因表現改變的相關性，本子計畫將結合東海大學與鄰近的彰化基督教醫院及臺中中港澄清醫院兩大醫院，共同合作探討可能與分子層次表現相關的臨床因素。

### 2-2 實驗架構



<sup>a</sup> 為臺中中港澄清醫院 <sup>b</sup> 為彰化基督教醫院

## 第三章、材料與方法

### 3-1 實驗材料

#### 3-1-1 臨床檢體來源及相關耗材

研究材料取自臺中中港澄清醫院及彰化基督教醫院，手術中所切除之大腸直腸的惡性腫瘤、大腸瘻肉、肝轉移病變處，目標三年內收案 150 例大腸瘻肉(50 例檢體小於 0.5 cm<sup>3</sup>、100 例檢體大於 0.5cm<sup>3</sup>)、150 例 CRC 腫瘤(均不小於 0.5 cm<sup>3</sup>) 及蒐集術前約 3 g 之糞便檢體與 8 mL 血液。

耗材	廠商
組織檢體盒	艾爾威生物科技有限公司(Taiwan)
糞便檢體盒	艾爾威生物科技有限公司(Taiwan)
EDTA 採血管(4 mL)	騰達行(BD, USA)
Heparin 採血管(4 mL)	騰達行(BD, USA)

#### 3-1-2 組織包埋切片染色

耗材、試劑	廠商
塑膠包埋盒	德全儀器(Leica, Germany)
不鏽鋼包埋盒	德全儀器(Leica, Germany)
載玻片(磨砂)	捷陞(FEA, USA)
蓋玻片 24×50 mm	捷陞(FEA, USA)
玻片保存盒	捷陞(FEA, USA)
不鏽鋼染色架 15 片	捷陞
染色壺方形 15 片	捷陞
染色壺圓形 10 片	捷陞
BLOCK 阻斷液	量子(Thermo, USA)
免疫組織化學染色套組	保吉生(Dako, USA)
蘇木素-伊紅染劑	德全儀器(Leica, Germany)

### 3-1-3 西方轉漬法

藥品、試劑	廠商
Ammonium persulfate (APS)	友和(Sigma, USA)
Ethylenediaminetetraaceticacid (EDTA)	友和(Riedel-de Haen, USA)
Hydrochloric acid	友和(Riedel-de Haen, USA)
Protease Inhibitor Cocktail	友和(Riedel-de Haen, USA)
Ponceau S	友和(Sigma, USA)
Potassium Phosphate	友和(Sigma, USA)
Sodium orthovanadate	友和(Riedel-de Haen, USA)
Sodium Fluoride	友和(Riedel-de Haen, USA)
N,N,N,N-Tetramethylenediamine (TEMED)	友和(Sigma, USA)
Sodium chloride (NaCl)	康芙(Panreac, Sprin)
Sodium Hydrogen Carbonate	康芙(Panreac, Spain)
Di-Sodium tetraborate	康芙(Merck, Germany)
Di-Sodium Hydrogen Phosphate	康芙(Panreac, Spain)
Tween-20	康芙(Panreac, Spain)
Tris	雷伯斯(Amresco, USA)
Methanol	雷伯斯(ECHO, Taiwan)
30% Acryamide-bis solution	正茂(Bio-rad, USA)
Coomassie Blue	正茂(Bio-Rad, USA)
HRP substrate kit	騰達行(Millipore, USA)
PMSF	騰達行(Merck, Germany)
Nonidet P-40 substitute (NP-40)	季勗(USB, USA)
BCA™ BSA Assay Kit	量子(Thermo, USA)
BSA	量子(Gibco, USA)
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	波仕特(Amresco, USA)
Glycine	百思維(GeneMark, Taiwan)
Potassium Chloride	林純藥(HANAWA, Japan)

### 3-1-4 主要儀器及設備

儀器、設備	型號
震盪機	Vortex-2 genie (Scientific Industries,USA)
乾浴槽	MC-01S (Major Science,Taiwan)
蛋白質電泳槽	Mini-PROTEAN (Bio-Rad, USA)
西方轉漬槽	Ctiterion™ Blotter (Bio-Rad, USA)
電源供應器	MP-250N (Major Science, Taiwan)
冷光儀	C-DiGit™ Blot Scanner (LI-COR,USA)
桌上型離心機	5415D (Eppendorf, Germany)
高速低溫離心機	5810R (Eppendorf, USA)
分光光度計	MRX II (Thermo, USA)
石蠟切片機	RM2125 RTS (Leica, Germany)
組織展開槽	Leica HI1210 (Leica, Germany)
烘片機	26025 (Lab-Line Instruments, USA)

## 3-2、實驗方法

### 3-2-1 樣品前處理

#### 3-2-1.1 糞便

糞便檢體以糞便採集盒進行取樣，取約 3 g (一湯匙) 之糞便，立刻放入 -80°C 存放，以利後續菌相分析檢測。

#### 3-2-1.2 組織

將切除後之新鮮組織於 -80°C 保存。染色前需將組織切成 0.5 cm<sup>3</sup> 之大小製作蠟塊；蛋白質分析需要先秤量 100 mg 之組織以液態氮在預冷之研鉢中進行物理破碎。

### 3-2-2 石蠟包埋

從 -80°C 冰箱拿取檢體後，將組織放在已滅菌之解剖盤上，並用已滅菌之手術刀將其切成約 0.5 cm<sup>3</sup> 之方塊，將切好之檢體放入 Paraformaldehyde (需蓋過檢體)，於室溫下靜置 30 分鐘，之後利用 Gradient Ethanol 濃度以 10%、20%、30%、50%、70%、95%、100% 依序進行脫水，各濃度為 15 分鐘，再利用 Xylene/100% Ethanol 以 1:3、1:1、3:1 之不同比例依序進行澄清，各比例為 30 分鐘，最後利用 Parafilm/Xylene 以 1:3、1:1、3:1 之不同比例依序進行滲蠟，各比例為 1 小時。

在滲蠟過程中預熱模型，滲蠟完畢後，先倒入一半全蠟之模型中，用溫熱鑷子將檢體置於模型中心位置，再倒入全蠟至全滿，約等 5 分鐘回溫，將模型取出凝固，隔天脫模。加水至水浴槽，加溫到 40°C，將蠟塊連同模型放入 -20°C 2 分鐘，取出後立刻放入水浴槽中 20 秒，即可脫模。

### 3-2-3 切片

將未包覆之玻片塗佈 4% poly-lysine solution 做為前處理，才能使蠟片吸附在玻片上。而在切片之前需先加熱組織展開槽及烘片機至 40°C，蠟塊卡進切片機之固定架上，將蠟塊切成厚度為 5 μm 之蠟片，蠟片需先利用組織展開槽展開，再用已包覆之玻片將其撈起，於烘片機上烤乾後才能進行後續染色實驗。可先利用 HE 染色確認組織是否完整或是否為我們目標組織再進行後續實驗。

### 3-2-4 蘇木素&伊紅染色(Hematoxylin & Eosin, H&E)

將具有蠟片之玻片先置於 60°C 烘箱使蠟軟化，再利用 Xylene 清洗 3 次，每次 5 分鐘。接著依序 100% Ethanol、95% Ethanol 各浸泡 1 分鐘。結束 Ethanol 後換成二次水(DDW)浸泡 1 分鐘。將 Hematoxylin 滴至組織範圍，等待 4 分鐘後，以 DDW 流水清洗，再利用 Acid alcohol (2~3 drops Acetic acid 加上 500 mL 95% Ethanol)退染約 5 秒，以 DDW 流水清洗。再來用 Eosin 滴至組織範圍，等待 1 分鐘後，以 95% Ethanol 流動清洗。清洗掉多餘染劑後，用 95% 及 100% Ethanol 脫水，各洗兩次，每次 1 分鐘。接著泡入 Xylene 退蠟 3 次，每次 5 分鐘。最後利用 60% Glycerol 水溶性封片膠(10 g Gelatin、70 mL Glycerin、1 mL Phenol、60 mL DDW)進行封片。風乾後至光學顯微鏡下觀察組織型態並拍照記錄。

### 3-2-5 免疫組織化學染色(Immunohistochemistry, IHC)

將具有蠟片之玻片先置於 60°C 烘箱使蠟軟化，再利用 Xylene 清洗 3 次，每次 10 分鐘。接著以 100%、95%、80%、70%、50% Gradient Ethanol 依序各浸泡 3 分鐘。結束 Gradient Ethanol 後換成 DDW 浸泡 3 分鐘。將玻片泡入預熱之 Sodium citrate buffer 加熱 10 分鐘。室溫放涼 30 分鐘，以清洗液 PBST (0.05% Tween 20 in Phosphate buffer saline, PBST)清洗 2 次，每次 3 分鐘。使用 Immunity Staining Guard Pen (PHC02-20, Japan)圈組織，加 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 靜置 10 分鐘，以 PBST 清洗 2 次，每次 3 分鐘。加 Serum Blocking Solution (試劑 A)培養 30 分鐘，加入辨識目標蛋白之一級抗體(GLUT1、GLUT3、CA8、Rab11)於 wet box 放置 4°C 下靜置隔夜(14-16 小時)。隔日以 PBST 清洗 2 次，每次 3 分鐘，加 Broad Spectrum Antibody (試劑 B)培養 10 分鐘，以 PBST 清洗 2 次，每次 3 分鐘。加 HRP-Streptavidin (試劑 C)培養 15 分鐘，以 PBST 清洗 2 次，每次 3 分鐘。加 DAB Chromogen Solution (1 drop 試劑 D1、2 drops 試劑 D2、1 drop 試劑 D3 與 1 mL DDW 混合)反應 10 分鐘，以 PBST 清洗 2 次，每次 3 分鐘。以 Hematoxylin 復染 3 至 5 分鐘，以 PBST 清洗 2 次，每次 3 分鐘。利用 95% 及 100% Ethanol 脫水，每次 3 分鐘。接著泡入 Xylene 退蠟 3 次，每次 3 分鐘。最後利用 60% Glycerol 水溶性封片膠進行封片。風乾後至光學顯微鏡下觀察目標蛋白染色情況並拍照記錄。

### 3-2-5.1 IHC 染色評分(I Index scoring)

在光學顯微鏡下，由實驗操作人員評估目標蛋白染色，只評估腫瘤的浸潤部分。分為四類：0 為陰性，代表無可檢測之染色、1 為弱，但仍可檢測到染色、2 為中等，具明顯陽性但仍弱與 3 重度，染色顏色最深。使用以下公式考慮染色強度和陽性染色細胞的比例： $I = 0 * f_0 + 1 * f_1 + 2 * f_2 + 3 * f_3$

其中，I 是染色指數，f<sub>0</sub>-f<sub>3</sub> 是分別顯示切片中染色強度 0~3 分之範圍。理論上，指數可以在 0 到 3 之間變化(Elzagheid *et al.* 2006)。

### 3-2-6 西方轉漬法

#### 3-2-6.1 新鮮組織

在操作前，先將研磨組織的鉢、杵置於-80°C冰箱冷卻，再從-80°C冰箱取出來自臺中澄清醫院(中港院區)之新鮮組織，全程低溫環境下使用滅菌後手術刀將組織切成小塊，盡量去除脂肪部分，放入研鉢中，加入足夠的液態氮，利用物理研磨力量將組織磨成粉狀顆粒。將組織粉狀顆粒移入含有蛋白質裂解液(150 mM Sodium chloride、50 mM Tris-HCl pH 7.5、1% NP-40、2 mM Ethylenediaminetetraacetic acid、1 mM Sodium orthotitanate、10 mM Sodium fluoride、2 mM Phenylmethanesulfonyl fluoride、200× Protease Inhibitor)之 1.5 毫升離心管中，劇烈震盪或 Vortex 混勻，置於冰上 20 分鐘，離心 4°C/12000 rpm/25 mins，小心收集上清液，存放於-20°C用於後續蛋白質分析。

#### 3-2-6.2 福馬林固定石蠟包埋組織(formalin-fixed, paraffin-embedded tissue, FFPE tissue)

取 2~3 片(10~15 μm)蠟片，加 1 mL Xylene 溶解石蠟，接著加入 75 μL Methanol 進行復水，室溫離心 13000 rpm/3 mins，去除上清液，用 DDW 清洗組織，稍微離心去除上清液，小心不要去去除沉澱物。加入 FFPE Protein Extraction Kit (Bio Basic Inc.)之 Extraction Buffer，100°C加熱 20 分鐘，將沉澱物盡量磨碎，置於 60°C、100 rpm、2 小時，去除上清液，使用 RIPA buffer (50 mM Tris pH 7.4、150 mM NaCl、1% NP-40、0.1% SDS、0.5% Sodium deoxycholate)萃取蛋白質，離心 4°C/10000 rpm/10 mins，收集上清液，存放於-20°C用於後續蛋白質分析。

### 3-2-6.3 蛋白質定量

利用商業套組 BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit 進行定量。以 BSA 為標準蛋白質，並以去離子水將其稀釋為 2000 µg/mL、1500 µg/mL、1000 µg/mL、750 µg/mL、500 µg/mL、250 µg/mL、125 µg/mL 與 0 µg/mL 作為標準曲線。樣品部分取 10 µL 樣品(已使用 Lysis buffer 10 倍稀釋)與 200 µL 試劑(Reagent A : B=50 : 1)混合均勻，於 30°C 下反應 30 分鐘，以波長 570 nm 下偵測其吸光值，將得到之吸光值經 Microsoft Excel 計算標準曲線，再將樣品吸光值代入此標準曲線即可估算細胞中總蛋白濃度(µg/mL)。

### 3-2-6.4 西方轉漬法

取 30 µg 蛋白質樣品與 10× Sample buffer (0.15 g/mL Sodium dodecyl sulfate、0.45 g/mL Glycerol、0.4 mg/mL Tris、1.5 M β-mercaptoethanol、100% BPB)混合均勻，95°C 加熱 5 分鐘使蛋白變性，將 10× Running buffer (30 g/L Tris、144 g/L Glycine、10 g/L Sodium dodecyl sulfate)稀釋成 1× Running buffer 使用，以 10%、12% 的下層膠進行 SDS-PAGE，將蛋白質分離。隨後於 10 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> Transfer buffer 中，將電泳膠上蛋白質轉置 Polyvinylidene fluoride (PVDF)膜上。將膜置於 2 至 5% BSA-PBST 中，以 100~150 rpm 震盪 1 小時，加入辨識目標蛋白之一級抗體(GLUT1、GLUT3、CA8、Rab11)，於 4°C 下震盪 2~14 小時。將膜以 PBST 漂洗 15 分鐘 3 次，再加入二級抗體(Anti-rabbit、Anti-mouse)於室溫下震盪 1 小時，再以 PBST 漂洗 15 分鐘 3 次，最後於膜上加入 Chemiluminescent HRP Substrate 反應，將膜置於冷光儀上定量冷光強度。

### 3-2-7 微生物菌相分析(Metagenomics)

將糞便檢體從 -80°C 度冰箱取出，利用 QIAamp® Fast DNA Stool Mini (QIAGEN)萃取糞便 DNA。利用 NanoDrop 偵測 OD 260/280。每個樣品總量不少於 100 ng。接著委託源資國際生物科技股份有限公司進行 16S 多源基因體定序，使用 NuGEN Encore<sup>TM</sup> System，研究人員利用 16s rRNA V3-V4 region 引子(附錄 1)經由 PCR 擴增之片段建構 paired-end library，以 Illumina MiSeq 平台進行解序，將所得序列進行分析，以得到各檢體所含的菌種種類及菌叢分佈比例。由於不同種的真細菌與古細菌間的 16s rRNA 基因，是由高度保守區域與高度變異區域所組成，高度保守區域常被用於對各種生物進行系統發育學方面的研究，而高度變異區域則常應用於微生物多樣性的分析上。將原始數據之兩端數據合併(Merge)為



單一較長序列(Merge read)，過濾掉測序品質差的序列後，極為有效序列(Effective reads)，再將這些有效序列進行叢集(Cluster)，將序列相似的歸類為同一個 OTU (Operational Taxonomic Unit，操作分類單元)，最終再將所獲得之 OTU 進行菌種分類(Annotation reads)。

委外定序分為健康對照、瘰肉、腫瘤三組，每組從受試者中挑選兩人，共六例檢體(六人臨床資料於附錄 2)。健康對照組與瘰肉組其中一人特別挑選同時具有第二型糖尿病及代謝症候群之受試者，腫瘤組挑選兩名皆為 III 期之 CRC 患者。

### 3-2-8 問卷調查

請簽署過受試者同意書(Informed Consent Form, ICF)之患者填寫問卷，欲收集有關飲食、菸酒習慣、運動狀況及壓力等有關代謝症候群及癌症家族史之資訊。

### 3-2-9 血清生化數值分析項目

抽取加入彰化基督教醫院 IRB 計畫之患者，檢驗 CBC、肝/腎功能指數、血脂相關指數、血糖以及與凝血相關指數去進行分析，並整理出具有代謝症候群危險指標之患者。

### 3-2-10 統計分析

結果以平均值±標準偏差(Mean±SEM)表示，使用 SAS 9.3 統計軟體進行 ANOVA 分析，並以 Duncan's multiple-range test 及 Student's t-test 檢定數據間的差異性，並以小寫英文字母標記各組於統計上有顯著差異( $p<0.05$ )以及\*、\*\*、\*\*\* 標記於統計上有顯著差異( $p<0.05$ ,  $p<0.01$ ,  $p<0.005$ )。

## 第四章、結果與討論

### 4-1 患者基本資料

目前為止分別從臺中澄清醫院(中港院區)收集 88 名腫瘤患者(6 名患者資料缺失)，平均年齡為 65.0 歲，其中男性患者為 52 名，平均年齡為 65.9 歲；女性患者 30 名，平均年齡為 63.4 歲。本實驗收集的檢體分為癌化大腸組織(Tumor part)及正常大腸組織(Non-tumor part)，發病部位大多在升結腸(Ascending, 14.8%)、乙狀結腸(Sigmoid, 12.3%)、直腸乙狀結腸(Rectosigmoid, 16.0%)與直腸(Rectum, 30.9%)。將其詳細基本資料整理於表 1。所有受試者皆有簽屬受試者同意書(Informed consent form, ICF)。而彰化基督教醫院(南郭總院)則收集到 58 名糞便潛血患者，其中有 11 名患者沒有罹患 CRC，33 名具有瘰肉以及 14 名腫瘤患者。收集的檢體分為瘰肉組織(Polyp)、癌化大腸組織(Tumor part)、正常大腸組織(Non-tumor part)、8 mL 血與約 3 g 糞便。發病部位大多在升結腸(Ascending, 21.7%)、乙狀結腸(Sigmoid, 19.6%)與橫結腸(Transverse, 15.2%)將其詳細基本資料整理於表 2。所有受試者皆有簽屬受試者同意書(Informed consent form, ICF)。整理上述腫瘤與瘰肉好發部位於附錄 4。

### 4-2 H&E 染色結果

將石蠟包埋完成之蠟塊切片，待其切片風乾後，進行脫蠟、復水，利用 Hematoxylin 和 Eosin 染劑將組織染色，用以觀察組織的基本型態，判斷其檢體是否為本研究之目標組織。從圖 1A 可以看到正常組織為排列整齊且腺腔直徑正常，結構基本正常無明顯改變，細胞核大小正常。圖 1B 癌化組織型態較鬆散且為不規則狀，上皮層明顯增厚、間質細胞增多、細胞核增大、排列紊亂，已喪失組織正常結構。

### 4-3 IHC 染色結果

將樣品用石蠟經過包埋、切片、風乾後才能進行染色。而染色前須先脫蠟、復水、抗原修復，抗原修復若沒有修復完全可能會造成偽陰性之結果，且後續在使用 DAB 呈色階段，若放置時間過長也可能造成偽陽性之結果，可能會影響結果。當 IHC 染色完成、風乾照相後，依照 I Index 評分法，從所有圖片中判讀出具代表性 0~3 級之標準圖片，以利後續評分。如圖 2A 為 GLUT1 染色之標準圖、圖 2B 為 GLUT3 染色之標準圖、圖 2C 為 CA8 染色之標準圖、圖 2D 為 Rab11 染

色之標準圖。將分級標準圖確定後，後續評分依照圖 2 之分級進行給分，評分後利用 SigmaPlot 10.0 作量化結果圖。IHC 染色代表陽性細胞會呈現黃色、棕黃色、棕褐色，顏色會隨著陽性率增加而變深。

#### 4-3.1 CRC 組織中 GLUT1/3、CA8、Rab11 的表現(澄清)

臺中澄清醫院(中港院區)提供新鮮組織兩塊，分別是腫瘤部分(Tumor part)及非腫瘤部分(Non-Tumor part)，先將組織切成適當大小後，進行包埋、切片、染色的動作，待切片風乾拍照紀錄，隨即開始按照 I Index 評分標準進行評分。圖 3 染色目標抗體為 GLUT1。圖 3A 為 Non-Tumor part，其細胞排列整齊，腺腔直徑正常，結構基本正常無明顯改變。圖 3B 為 Tumor part，其型態較為不規則狀、細胞排列紊亂，已喪失組織正常結構，可以看出 GLUT1 含量 Tumor part 明顯高於 Non-Tumor part。圖 3C 為 GLUT1 用 I Index 評分量化之結果，可以看到 Tumor part ( $1.72\pm 0.08$ , N=82)分數顯著高於 Non-Tumor part ( $0.64\pm 0.07$ , N=61)。

圖 4 染色目標抗體為 GLUT3。圖 4A 為 Non-Tumor part，其細胞排列整齊，腺腔直徑正常，結構基本正常無明顯改變。圖 4B 為 Tumor part，其型態較為不規則狀、細胞排列紊亂，已喪失組織正常結構，可以看出 GLUT3 含量 Tumor part 明顯高於 Non-Tumor part。圖 4C 為 GLUT3 用 I Index 評分量化之結果，可以看到 Tumor part ( $0.90\pm 0.08$ , N=81)分數顯著高於 Non-Tumor part ( $0.41\pm 0.07$ , N=56)。

圖 5 染色目標抗體為 CA8。圖 5A 為 Non-Tumor part，其細胞排列整齊，腺腔直徑正常，結構基本正常無明顯改變。圖 5B 為 Tumor part，其型態較為不規則狀、細胞排列紊亂，已喪失組織正常結構，可以看出 GLUT3 含量 Tumor part 明顯高於 Non-Tumor part。圖 5C 為 CA8 用 I Index 評分量化之結果，可以看到 Tumor part ( $1.12\pm 0.06$ , N=80)分數顯著高於 Non-Tumor part ( $0.55\pm 0.07$ , N=57)。

圖 6 染色目標抗體為 Rab11。圖 6A 為 Non-Tumor part，其細胞排列整齊，腺腔直徑正常，結構基本正常無明顯改變。圖 6B 為 Tumor part，其型態較為不規則狀、細胞排列紊亂，已喪失組織正常結構，可以看出 Rab11 含量 Tumor part 明顯高於 Non-Tumor part。圖 6C 為 Rab11 用 I Index 評分量化之結果，可以看到 Tumor part ( $0.74\pm 0.06$ , N=76)分數顯著高於 Non-Tumor part ( $0.18\pm 0.03$ , N=61)。

Non-Tumor part 評分有的也有高於 Tumor part，所以我們另外計算中位數，將大於中位數之切片認定為陽性，整理於表 3，GLUT1 之中位數為 1.2，Non-Tumor part 具有 10 個(13.3%)，Tumor part 具有 65 個(86.7%)。而 GLUT3 之中位數為 0.5，Non-Tumor part 具有 17 個(23.6%)，Tumor part 具有 55 個(76.4%)。CA8

之中位數為 0.8，Non-Tumor part 具有 12 個(16.9%)，Tumor part 具有 59 個(83.1%)。Rab11 之中位數為 0.35，Non-Tumor part 具有 10 個(14.3%)，Tumor part 具有 60 個(85.7%)。從中位數來看，Tumor part 陽性率還是比 Non-Tumor part 高。

### 4-3.2 CRC 組織中 GLUT1/3、CA8、Rab11 的比較(澄清)

比較過全體 Non-Tumor part 與 Tumor part 後，有另外將期數分開來比較，理想狀態是希望染色的分數會隨著腫瘤嚴重程度增加，但結果顯示，不管哪個抗體都沒有這種趨勢，但 Tumor part 評分還是皆高於 Non-Tumor part。利用 SigmaPlot 10.0 及 GraphPad Prism 7.0 製作量化結果圖。圖 7 染色目標為 GLUT1。圖 8 染色目標為 GLUT3。圖 9 染色目標為 CA8。圖 10 染色目標為 Rab11。

在圖 7E 發現雖然 Tumor part 四期之間沒有差異，但分數有依照期數嚴重程度而稍微增加。圖 8E 中，第 I 期及第 IV 期皆沒有顯著差異，從圖 8A 及圖 8D 推測可能是腫瘤患者之間的個體差異太大，平均分布在各區，所以會拉大誤差導致結果不顯著。

### 4-3.3 瘻肉組織中 GLUT1/3、CA8、Rab11 的表現(彰基)

瘻肉部分切片由彰化基督教醫院(南郭總院)病理部所提供，僅有瘻肉部位切片，所以僅能就瘻肉部分來探討。瘻肉屬於 CRC 第 0 期，所以我們推測可能和臺中澄清醫院(中港院區)所提供腫瘤檢體配對之正常組織相似。圖 11 染色目標抗體為 GLUT1。圖 11A 可以看到腺腔直徑有些異常、腺體厚度不一，但結構基本無明顯改變。圖 11B 發現到結構開始有些變形，排列開始紊亂，由肉眼觀察圖 11B 的 GLUT1 含量高於圖 11A，因此可以推斷變形越嚴重的切片，其 GLUT1 含量會增加。

圖 12 染色目標抗體為 GLUT3。圖 12A 可以看出與正常組織相比，腺腔直徑有些異常，比起正常組織其直徑較大，但結構基本無明顯改變。圖 12B 發現結構有明顯變形現象，且排列開始紊亂，由肉眼觀察圖 12B 的 GLUT1 含量高於圖 12A，因此可以推斷變形越嚴重的切片其 GLUT3 含量會增加。

圖 13 染色目標抗體為 CA8。圖 13A 可以看出與正常組織相比，腺腔直徑有些異常，比起正常組織其直徑較大，但結構基本無明顯改變。圖 13B 發現結構有明顯變形現象，且排列開始紊亂，由肉眼觀察圖 13B 的 CA8 含量高於圖 13A，因此可以推斷變形越嚴重的切片，其 CA8 含量會增加，並且在 CA8 的染色中發現其蛋白較容易出現在腫瘤間質中。

圖 14 染色目標抗體為 Rab11。圖 14A 可以看出與正常組織相比，腺腔直徑

有些異常，比起正常組織其直徑較大，但結構基本無明顯改變。圖 14B 發現結構有明顯變形現象，且排列開始紊亂，由肉眼觀察圖 14B 的 Rab11 含量高於圖 14A，因此可以推斷變形越嚴重的切片，其 Rab11 含量會增加，並且發現染 Rab11 的時候，不管在腫瘤第幾期，Rab11 相較於其他三個抗體的染色評分較低。

瘻肉 GLUT1 之中位數為 0.425，在 20 個切片中有 10 個(50%)，陽性率佔一半。GLUT3 之中位數為 0.358，在 20 個切片中有 10 個(50%)，陽性率佔一半。CA8 之中位數為 0.256，在 20 個切片中有 10 個(50%)，陽性率佔一半。Rab11 之中位數為 0.0175，在 20 個切片中有 10 個(50%)，陽性率佔一半。可以發現到，瘻肉組的中位數皆明顯低於腫瘤組(表 4)。

#### 4-3.4 瘻肉組織與腫瘤組織與正常組織之比較

由於彰化基督教醫院(南郭總院)是由病理部提供切片，因此沒有 Normal part 可以做對照，因此將瘻肉(Polyps)、腫瘤(Tumor)與非腫瘤(Non-Tumor)做比較，發現瘻肉與腫瘤之正常對照差異不大。圖 15 為 Polyps、Non-Tumor、Tumor 組內各抗體比較的結果，圖 15D 將三組放在一起做組間的比較，很明顯 Polyps 和 Non-Tumor 分數並無顯著差異，但 Tumor 分數顯著高於 Polyps 和 Non-Tumor ( $p < 0.05$ )。依照 Polyps、Non-Tumor、Tumor 順序，GLUT1 分數平均為  $0.53 \pm 0.10$  (N=20)、 $0.64 \pm 0.07$  (N=61)、 $1.7 \pm 0.08$  (N=82)。GLUT3 分數平均為  $0.39 \pm 0.06$  (N=20)、 $0.41 \pm 0.07$  (N=56)、 $0.9 \pm 0.08$  (N=81)。CA8 分數平均為  $0.39 \pm 0.08$  (N=20)、 $0.55 \pm 0.07$  (N=57)、 $1.1 \pm 0.06$  (N=80)。Rab11 分數平均為  $0.19 \pm 0.08$  (N=20)、 $0.20 \pm 0.03$  (N=61)、 $0.8 \pm 0.07$  (N=64)。其中 Tumor 以 GLUT1 及 CA8 分數上升幅度較為明顯，而 GLUT3 及 Rab11 分數則略低一些，但皆與 Polyps 及 Non-Tumor 有顯著差異。

#### 4-4 西方轉漬分析結果

在組織蛋白質部分，得到的結果與 IHC 染色不一致。在 GLUT1、CA8 及 Rab11 基因使用 30 名 CRC 患者的檢體來測試，而 GLUT3 部分由於檢體不足，僅使用 28 名 CRC 患者的檢體來測試。分別為 I 期患者 4 人、II 期患者 8 人、III 期患者 13 人(GLUT3 少兩人)及 IV 期患者 5 人。圖 16 為 GLUT1 結果，圖 16A 為各期結果，圖 16B 為加總之結果。圖 17 為 GLUT3 結果，圖 17A 為各期結果，圖 17B 為加總之結果。圖 18 為 CA8 結果，圖 18A 為各期結果，圖 18B 為加總之結果。圖 19 為 Rab11 結果，圖 19A 為各期結果，圖 19B 為加總之結果。結果顯示不管在各期之間或是加總的部分皆無顯著差異，但能在癌症後期於癌變檢體有較高的表現。

其次在 FFPE 部分，圖 20A 為 FFPE 組織 Western Blot 結果，圖 20B 為測試 20 mM Tris-HCl 萃取之效果 (Shi, Liu, Balgley, Lee, & Taylor, 2006)，而圖 20C 為測試 300 mM Tris-HCl 萃取之效果 (Kawashima, Kodera, Singh, Matsumoto, & Matsumoto, 2014)。實驗測試結果為 300 mM Tris-HCl 抗原修復效果較佳，且蛋白質表現量有依切片數量增加而提升。後續 FFPE Western Blot 採用 300 mM Tris-HCl 作為抗原修復液。圖 21 為先前包埋之檢體 No.62 及 No.64 結果，可看出與先前 IHC 結果不符合，在 No.64T 部分其 CA8 數值異常高，推測是將間質所帶之 CA8 也合入計算而成，但在 IHC 中並沒有計算到間質的部分。其他抗體有些表現不清楚甚至幾乎沒有，所以又另作一批觀察成因是否為數量太少。在圖 22 中，使用手邊先前用剩之石蠟檢體，結果與使用新鮮組織萃取蛋白質結果幾乎一致，幾乎沒有顯著差異，唯一有顯著差異的為 CA8，但如上所述，CA8 也會染到間質的部分，因此數值較高為正常現象。其餘抗體可能被組織中的纖維或肌肉層影響到，使結果無 IHC 結果明顯。而最終以 IHC 染色結果為主，將 Western Blot 做輔助參考用。

#### 4-5 微生物菌相分析結果

將定序出的 DNA 序列進行分析，統計結果發現，在瘻肉組與健康對照組比較中，發現 OTU005、OTU027、OTU043、OTU046 之菌群在瘻肉組有顯著多於健康對照組，而在 OTU012、OTU013、OTU021、OTU041、OTU044 之菌群在瘻肉組則顯著少於健康對照組。在腫瘤組與健康對照組比較中，發現 OTU004、OTU008、OTU010、OTU019、OTU049、OTU052、OTU116、OTU125、OTU126、OTU212 之菌群在腫瘤組有顯著多於健康對照組，而在 OTU013、OTU015、OTU041、OTU062 之菌群在腫瘤組則顯著少於健康對照組。而比較瘻肉組及腫瘤組時，發現 OTU004、OTU008、OTU010、OTU019、OTU049、OTU052、OTU125、OTU155 之菌群在腫瘤組中顯著多於瘻肉組(菌種名稱詳見附錄 3)。在圖 23 為三組互相比較之 Venn 圖，在兩兩相比及三者之間比較 DNA 序列的歧異，組間相同的 DNA 序列不多，可以推測三種族群內的腸道菌相能夠被區分。接著比較檢體間的腸道菌相組成，發現公認好菌代表雙歧桿菌屬(*Bifidobacterium spp.*)在這次挑選之六例檢體中，僅在健康對照組發現有此菌屬，分別佔 1.59% 與 2.02%，也只在健康對照組中發現到普拉梭菌(*Faecalibacterium prausnitzii*, *F. prausnitzii*)，分別佔 2.11% 與 4.42%。圖 24 為菌屬之菌落比例分佈，從菌屬比例比較整體腸道菌落結構構成，發現六例檢體菌屬分佈不太一致，菌落構成未見明顯差異，但還是能看出腫瘤組相對於其他兩組之菌屬多樣性較低。

接著使用 Alpha diversity 分析，使用 chao1 指數進行菌種豐富度分析，在圖 25 可以看出三組間之菌種豐富度沒有太大的差異，另外使用 shannon 指數進行菌種多樣性分析。圖 26 為比較組別間的差距，發現健康對照組之菌種多樣性比其他兩組高，而在健康對照組中罹患第二型糖尿病之受試者，其菌種多樣性較低。另外也使用 Beta diversity 分析，其一為主座標分析(Principal Co-ordinates Analysis, PCoA)，在圖 27 中腫瘤組彼此間距離很小，表腫瘤組間差異很小。而瘻肉組 P-31 與健康對照組 H-21 比起各自的組別反而距離較近，推測可能都是第二型糖尿病患者而較為接近。而圖 28 與圖 27 分析法類似，使用的是非度量多維度分析(Non-metric Multidimensional Scaling, NMDS)統計，由於樣品數過少，分佈較散，但仍能看出健康對照與腫瘤分別佔據一角，僅瘻肉差距較大，推測可能為瘻肉組 P31 有第二型糖尿病，受健康對照組 T21 影響，而 P44 又與腫瘤組較接近，因而差距較大。

#### 4-6 問卷調查結果

問卷總共分為家族史、飲食習慣、飲食選擇、運動勞動、抽菸情況、喝酒情況、精神壓力以及健康意識八大項。家族史部分由於患者大部分年紀較大，大多不記得或不確定，甚至有患有失智症狀的病患回答前後不一致，因此優先以病患本身來做紀錄。目前 56 份有效問卷中，病患本人以具有高血壓居多，共 27 人(48.2%)，其次為患有第二型糖尿病 8 人(14.3%)，詳見圖 29。

第二項飲食習慣方面，在圖 30 中看到，無論為健康對照組、瘻肉組或腫瘤組，大部分病患皆每天吃早餐及不吃宵夜。從圖 31A 飲食偏好可以看出，除了腫瘤組的口味明顯比健康對照組及瘻肉組更重鹹，瘻肉組與腫瘤組皆比健康對照組偏好多油、煙燻、辛辣等重口食物。另外在自覺飲食問題中，圖 31B 顯示健康對照組僅有少部分有吃太快/慢之問題，而瘻肉組及腫瘤組自覺的問題較多且雜。

第三項飲食選擇方面，由圖 32A 中可以看出，健康對照組的水分攝取遠高於腫瘤組，而有關 CRC 之危險因子紅肉的部分，在圖 32B 中雖然健康對照組的分數較高，但健康對照組蔬菜水果分數也同樣較高，將數值比值後發現，因腫瘤組少吃蔬菜水果而顯得紅肉所佔的比例增加。CRC 危險因子也包括低纖維飲食，在問卷中可以看到吃紅肉且低纖維的趨勢在腫瘤組中明顯較高。

第四項運動勞動部分，在圖 33A 發現腫瘤組坐臥時間明顯高於健康對照組，而健康對照組數值較瘻肉組高的原因可能是工作時間較長所致，所以將上班時數也考慮進去，如圖 33B 所示，符合久坐為 CRC 危險因子的論點。而運動也因三組間的運動強度並沒有差異，皆為輕度運動，因此即使運動時間較長，可能也無

法改善久坐的危害。

第五、六項抽菸與喝酒的部分，圖 34A 為抽菸情況，健康對照組幾乎不抽菸，但有機率會吸到二手菸。圖 34B 為喝酒情況，健康對照組沒有像抽菸那樣排斥，屬於偶爾小酌的情況，但在圖 34C 看到癌肉組與腫瘤組之飲酒量皆高於健康對照組，也證實飲酒確實會增加罹患 CRC 的風險。

第七項精神壓力方面，壓力可能是造成 CRC 發生的因素之一，由圖 35 可以發現，腫瘤組的壓力與情緒部分高於其他兩組，也影響到其睡眠品質，但是依賴藥物的腫瘤組卻很少，反而是癌肉組較依賴藥物。

第八項健康意識方面，詢問患者是否擔心代謝症候群或癌症、食用益生菌或發酵乳、服用任何健康食品與願意藉飲食降低上述風險這四項。在圖 36A 中，三組皆有關心代謝症候群或癌症，但關心程度不高，推測是因不太了解代謝症候為何，而腫瘤組與健康對照組在食用益生菌/發酵乳部分遠高於癌肉組，在食用健康食品部分三組則是差不多水平。而圖 36B 為詢問是否願意藉飲食降低上述風險，在知道何種飲食能有效降低罹患大腸直腸癌之風險時，大部分的人都願意改變。

## 4-7 血清生化數值分析結果

在 CBC 檢驗中(表 5)，腫瘤組( $6.9\pm 0.6$ )與癌肉組( $6.7\pm 0.3$ )其白血球數目與健康對照( $6.2\pm 0.6$ )相比數量略多。而在紅血球部分也同樣是腫瘤組( $4.4\pm 0.1$ )與癌肉組( $4.7\pm 0.1$ )之血球數目與健康對照( $4.3\pm 0.1$ )相比數量略多。在貧血指標方面，Hb、Hct、MCV、MCH 與 MCHC 指數，腫瘤組與正常對照組比較數值皆較低。而在肝/腎功能指數方面(表 6)，肝功能檢測在 GPT (ALT)指數方面指數腫瘤組( $20.3\pm 3.8$ )較健康對照較高( $18.8\pm 1.5$ )，高約 11%。而腎功能檢測在 eGFR 腫瘤組( $78.4\pm 9.0$ )較健康對照( $85.6\pm 7.9$ )有較低的趨勢。血脂指數方面指數(表 7)，除 TG 部分腫瘤組相比健康對照上升約 29%較為明顯外，其餘指數皆相差不大。血糖及凝血方面(表 8)，癌肉組( $111.5\pm 8.1$ )的血糖明顯超過正常標準(100)。凝血指數 PT、INR，數值越高代表凝血所需時間越長，腫瘤組明顯凝血功能相較於正常值有較低的趨勢。將腫瘤組 CEA 指數整理於表 9。



## 第五章、討論

目前已有許多學者認為異常隱窩的出現為 CRC 發生的最早期事件，並把其作為 CRC 早期診斷的觀察指標之一 (Gupta & Schoen, 2009)。小腸隱窩細胞為具增殖潛能的未分化腸上皮幹細胞，為成熟上皮細胞的前身。正常隱窩和異常隱窩在形態學上具有很大的差異。與正常黏膜相比，異常的隱窩會增大變厚、排列紊亂、呈鋸齒狀、開口呈橢圓狀、上皮細胞層增生、細胞核有異型性 (Cheng & Lai, 2003)。在 HE 與 IHC 結果中可以看到，腫瘤切片的型態比起正常部位皆有排列不規則與腺腔變形等異狀，符合癌細胞基於不正常增生擠壓導致腺腔變形所致。而在 CRC 四期間的比較中發現，GLUT1 表現量隨著腸癌嚴重程度增加，其表現量也會跟著增加。有文獻指出大腸癌中 GLUT1 的過度表現與預後不良具相關性 (Shen, Arbman, Olsson, & Sun, 2011)。

在蛋白質表現部分，圖 16、17、18 與 19 中，結果顯示不管在各期之間還是在加總的部分皆無顯著差異，可能是因為組織中間質、纖維、肌肉甚至是脂肪干擾所導致。但能在癌症後期於癌變檢體有較高的表現。發現隨著腫瘤嚴重程度增加，各蛋白含量也隨之上升，GLUT1、GLUT3、CA8 以及 Rab11 第四期與第一期相比分別上升了 42%、60%、53% 以及 26%。另為克服上述影響及可能切到與切片不同的位置，嘗試從 FFPE 組織中萃取蛋白質，圖 21A 中可以明顯看出 Western Blot 與 IHC 兩者結果並不一致，而在圖 22 可以看到，除了 CA8 在腫瘤表現顯著較高以外，其他皆無顯著差異。CA8 數值異常高原因，推測是將間質所帶之 CA8 也合入計算而成，但在 IHC 中並沒有計算到間質的部分。也有文獻發現在 CRC 中，腫瘤浸潤邊界處相比於腫瘤中心，具有 CA8 的過度表現 (Miyaji et al., 2003)。

在腸道菌相方面，先前腸道菌相研究中發現普拉梭菌 (*Faecalibacterium prausnitzii*, *F. prausnitzii*) 是存在於健康人群腸道中最豐富的腸道微生物之一 (Arumugam et al., 2011)。*F. prausnitzii* 作為人類腸道共生菌之重要組成部分，對人類的健康發揮著重要的作用，為腸道中主要的丁酸鹽生產者之一 (Duncan, Hold, Harmsen, Stewart, & Flint, 2002)。丁酸鹽在腸道生理和宿主健康中起著至關重要的作用。它是結腸細胞的主要能量來源，具有抗 CRC 和發炎性腸病的保護性能 (Archer et al., 1998)。在結果中可以發現，僅在健康對照組發現此菌，而瘻肉及腫瘤疾病組中，並沒有發現到此菌。在圖 23 在其兩兩相比及三者之間比較 DNA 序列的歧異，組間相同的 DNA 序列不多，所以推測三種族群內的腸道菌相能夠被區分，但因目前測試人數較少，所以在圖 24 菌落的組成區別較不明顯。

使用 Alpha diversity 分析，主要分析每個樣本中微生物群落本身的多樣性，分為群落豐富度指數和多樣性指數。在圖 25 可以看到三組間的菌種豐富度沒有太大的差異。圖 26 發現健康對照組之菌種多樣性比其他兩組高，但若在健康對照組中患有第二型糖尿病，其多樣性又較另一人低許多。另外也使用 Beta diversity 分析，主要是分析各樣本的物種組成或物種間的進化關係及豐富度來計算樣品間距，尋找樣品間具有顯著性差異的微生物群落。其一為主座標分析(Principal Coordinates Analysis, PCoA)，是經由一系列的特徵值和特徵向量排序從多維資料中找出最主要的元素和結構。選取貢獻率最大的主座標進行作圖。若樣品距離越接近，表示物種組成結構越相似，因此群落結構相似度高的樣品會聚集在一起，反之則分開。在圖 27 可以看到腫瘤組彼此間差異很小。而瘻肉組 P-31 與健康對照組 H-21 推測可能都是第二型糖尿病患者而較為接近。而圖 28 與圖 27 分析法類似，使用的是非度量多維度分析(Non-metric Multidimensional Scaling, NMDS)統計，為一種適用於生態學研究的排序方法。目的為克服線性模型(PCoA)的缺點，基於 NMDS 是非線性模型，可充分反映生態學資料的非線性結構。根據樣品中包含的物種資訊，以點的形式反映在多維空間上，其差異程度則以點與點間的距離反映樣品的組間和組內差異。由於樣品數過少，樣品分佈較散，但仍可看出健康與腫瘤分別佔據一角，僅瘻肉差距較大，推測可能為瘻肉組 P31 有第二型糖尿病，受健康對照組 T21 影響，而 P44 又與腫瘤組較接近，因而差距較大。

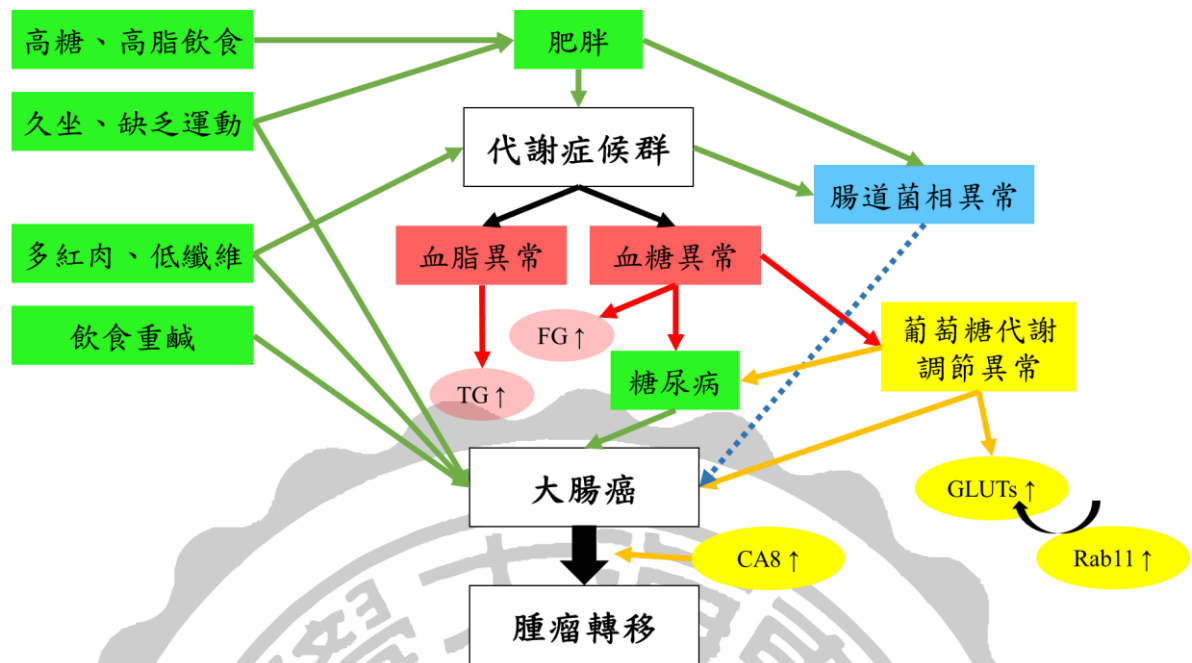
飲食、運動、抽菸、飲酒、精神壓力等皆為影響 CRC 的因素，其中有文獻提出定期的身體活動使風險降低 24%、紅肉攝入量及頻率、酒精對 CRC 呈正相關，而纖維與牛奶的攝取則與 CRC 成負相關 (Baena & Salinas, 2015)，皆與問卷調查結果相符，在圖 32 中，健康對照組的水分攝取遠高於腫瘤組，而有關 CRC 之危險因子紅肉的部分，雖然健康對照組的分數較高，但健康對照組蔬菜水果分數也同樣較高，因此另作紅肉與蔬菜水果之比值，發現腫瘤組因為少吃蔬菜水果，顯得紅肉所佔的比例增加，符合紅肉是 CRC 危險因子之推測 (Giovannucci et al., 1994; McKeown-Eyssen & Bright-See, 1985)。有文獻指出鹹味食物的偏好與 CRC 的風險呈正相關 (Hoshiyama, Sekine, & Sasaba, 1993)，亦與問卷調查結果相符，問卷調查結果顯示腫瘤組明顯比健康對照組及瘻肉組吃得更重鹹。瘻肉組與腫瘤組都比健康對照組偏好關於煙燻、辛辣等重口食物。圖 31 飲食問題方面，健康對照組僅有少部分有吃太快/慢之問題，而瘻肉組及腫瘤組自覺的問題較多且雜。研究指出長時間坐著主要和子宮內膜癌和 CRC 的風險增加有明顯的相關性，長期坐著的人患 CRC 的風險增加 24%、子宮內膜癌的風險增加 32% (Nilsen & Vatten, 2001)。而身體活動較低的族群容易罹患 CRC (Gerhardsson, Norell, Kiviranta,

Pedersen, & Ahlbom, 1986)。圖 33 顯示腫瘤組久坐的比例確實比健康對照組還要高，但在身體活動方面，三組間的運動強度皆為輕度或極輕度，因此即使腫瘤組運動時間較長可能也無法避免久坐的影響。在吸菸、飲酒部分同樣有文獻指出，飲酒與罹患 CRC 的風險具密切相關，已知香菸煙霧引起心臟、肺和胃腸疾病以及包括癌症在內的許多其他嚴重疾病之最大風險因素之一 (Bak et al., 2015)。圖 34A 可以看到健康對照組幾乎不抽菸，但有機率吸到二手菸，因尼古丁是香菸煙霧中許多有毒物質中之主要成分，若吸入過多二手菸會促進癌症的發生和發展 (Chu, H Cho, & Y Shin, 2013)。同樣地，酒精也是影響 CRC 的危險因素 (Marmot et al., 2007)，與 CRC 風險增加有關，尤其是有 CRC 家族史的人群 (Cho, Lee, Rimm, Fuchs, & Giovannucci, 2012)。圖 34C 腫瘤組飲酒量明顯較高。壓力與 CRC 風險顯著相關 (Kikuchi et al., 2017)，圖 35 發現腫瘤組的壓力與情緒部分高於其他兩組，也影響到其睡眠品質，但是瘰肉組較腫瘤組依賴藥物。由於抽菸飲酒分數高的同時壓力的分數也高，因而推測壓力與抽菸飲酒具正相關性，壓力大的情況下可能將抽菸飲酒作為紓壓的方式。健康意識方面，圖 36A 中，三組皆有關心代謝症候群或癌症，但關心程度不高，可能是不太了解代謝症候群為何。而圖 36B 結果發現在知道何種飲食能有效降低 CRC 風險時，多數人都願意改變。

血清生化數值方面，有研究指出 TG 水平與 CRC 的發生呈正相關 (Yamada et al., 1998)。也有其他結果表明，血清 TG 越高，通常與直腸乙狀結腸中腺瘤的風險越高有關 (Sun et al., 2011)。而 HDL-C 方面研究顯示與 CRC 風險呈負相關 (Ahmed, Schmitz, Anderson, Rosamond, & Folsom, 2006)。在表 7 發現，腫瘤組與瘰肉組其 TG 含量相較於健康對照組上升了 29% 與 62%。在 HDL-C 含量腫瘤組與瘰肉組則是分別下降了 3% 與 15%，符合先前研究。高血糖可能與糖尿病有關，而糖尿病與某些癌症如肝臟、胰腺、子宮內膜、結腸直腸、乳房和膀胱癌之風險增加有關 (Giovannucci et al., 2010)。表 8 發現瘰肉組與健康對照組相比，其血糖值高約 15% 左右，平均也超過血糖正常值，符合高血糖可能與糖尿病有關。

將臨床資料與代謝症候群之連結整理於附錄 5。雖然腫瘤組患有代謝症候群的人數為零，但大多具有兩項危險因子，且未檢測空腹血糖，推測需多參考一項因子之結果，因此目前沒有人可以被稱為具有代謝症候群。

綜上所述，將其統整繪成下方附圖：



附圖 6、各個分析關聯分析圖

推定 IHC (黃色)、問卷調查(綠色)、生化數值(紅色)及腸道菌相(藍色)與代謝症候群及大腸癌之關聯。

本研究主要探討代謝症候群與 CRC 之間的關聯。GLUT 1/3 主要是負責細胞的葡萄糖攝取，也是糖酵解的前置步驟，而癌細胞會利用糖酵解來產能，CA8 則與腫瘤轉移有高度相關，Rab11 負責運送 GLUTs 之囊泡蛋白。首先由 IHC 染色確認 GLUT 1/3、CA8 及 Rab11 於腫瘤切片之表現皆顯著高於正常對照部分。繼而在患者與健康對照者之間卷調查中發現 CRC 危險因子包括攝取較多紅肉、飲食口味重鹹、運動強度較低/時間較少、久坐時間過長、肥胖、罹患第二型糖尿病等。其中肥胖公認與 CRC 及代謝症候群皆具正相關，由高脂高糖飲食及少動所造成，而代謝症候群分別在高血脂(Yamada et al., 1998)、高血糖(Bianchini, Kaaks, & Vainio, 2002)等被發現與 CRC 高度相關。另外，我們發現健康對照、癌肉與腫瘤三族群之腸道菌相不同，前人研究曾推測可能有若干特定菌群會導致 CRC (Tjalsma, Boleij, Marchesi, & Dutilh, 2012)，微生物對腸道癌症發展的影響機制包括促炎和抗炎信號的平衡，細菌腸毒素對黏膜細胞和細胞內途徑的直接影響，以及細菌在將致癌性飲食因素轉化為致癌物中的間接潛力 (Collins, Hogan, & Winter, 2011)。徹底了解這些過程將為未來的研究提供方向，並可能最終有助於開發 CRC 診斷和預防的新策略 (Boleij & Tjalsma, 2012)。

表 1、澄清醫院患者基本資料

Table 1. Basic information of patient in Cheng-Ching General Hospital

<b>Cheng-Ching General Hospital Sample=83</b>			
<b>Information</b>	<b>Classification</b>	<b>No.</b>	<b>Percentage (%)</b>
Sex	Male	53	63.9%
	Female	30	36.1%
Age	< 50	5	6.0%
	50-59	25	30.1%
	60-69	18	21.7%
	70-79	28	33.7%
	> 80	7	8.4%
Stage	I	15	18.1%
	II	21	25.3%
	III	37	44.6%
	IV	10	12.0%
Location	Cecum	3	3.7%
	Ascending	13	15.9%
	Hepatic Flexure	4	4.9%
	Transverse	8	9.8%
	Splenic Flexure	2	2.4%
	Descending	4	4.9%
	Sigmoid	10	12.2%
	Rectosigmoid	13	15.9%
Rectum	25	30.5%	

\*肝彎(Hepatic Flexure)：肝臟下緣直角區、脾彎(Splenic Flexure)：脾的下方直角區。

表 2、彰化基督教醫院患者基本資料

Table 2. Basic information of patient in Changhua Christian Hospital

<b>Changhua Christian Hospital Sample=47</b>			
<b>Information</b>	<b>Classification</b>	<b>No.</b>	<b>Percentage (%)</b>
Sex	Male	25	53.2%
	Female	22	46.8%
Age	< 50	3	6.4%
	50-59	13	27.7%
	60-69	19	40.4%
	70-79	9	19.1%
	> 80	3	6.4%
Stage	0	33	70.2%
	I	4	8.5%
	II	3	6.4%
	III	7	14.9%
	IV	0	0%
Location	Cecum	4	8.7%
	Ascending	10	21.7%
	Hepatic Flexure	1	2.2%
	Transverse	7	15.2%
	Splenic Flexure	0	0.0%
	Descending	5	10.7%
	Sigmoid	9	19.6%
	Rectosigmoid	4	8.7%
	Rectum	6	13.0%

\*肝彎(Hepatic Flexure)：肝臟下緣直角區、脾彎(Splenic Flexure)：脾的下方直角區。

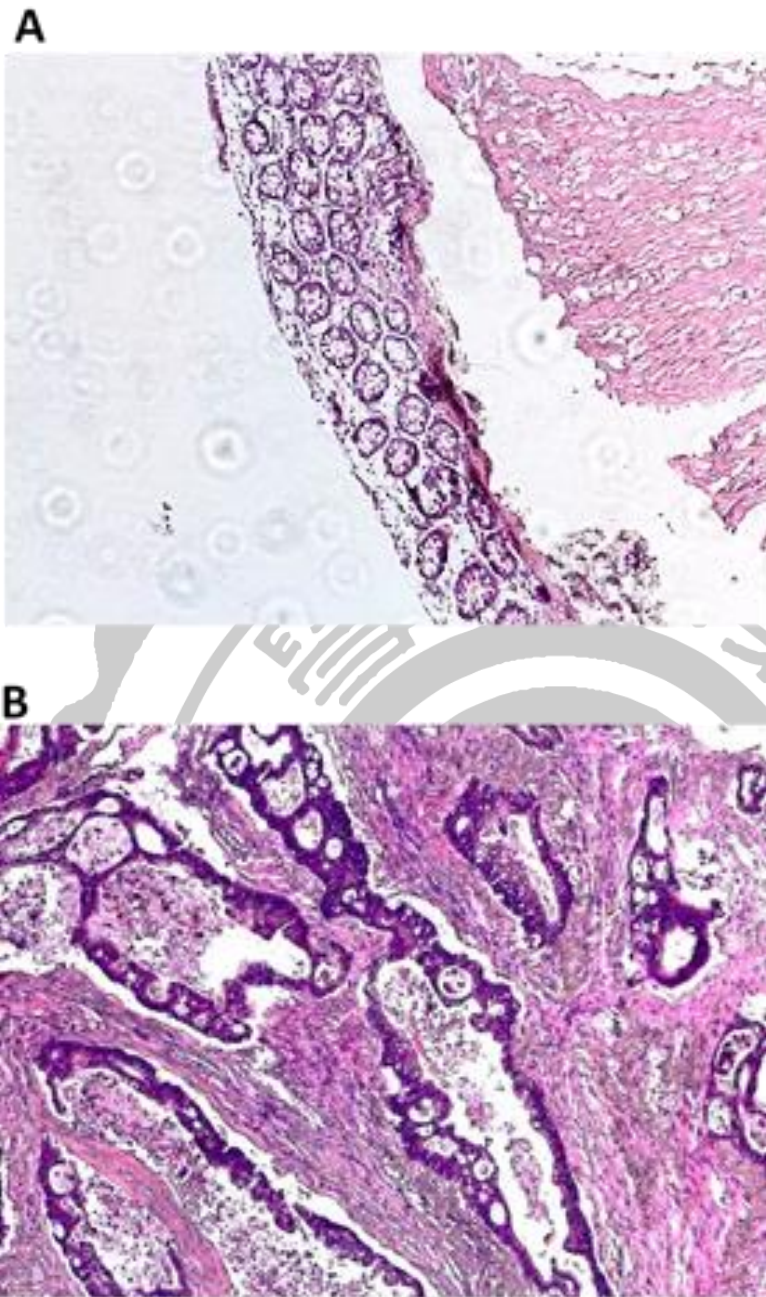


圖 1、H&E 染色圖(100×)。

Fig 1. H&E Stain (100×).

A 為正常組織檢體。B 為癌化組織檢體。

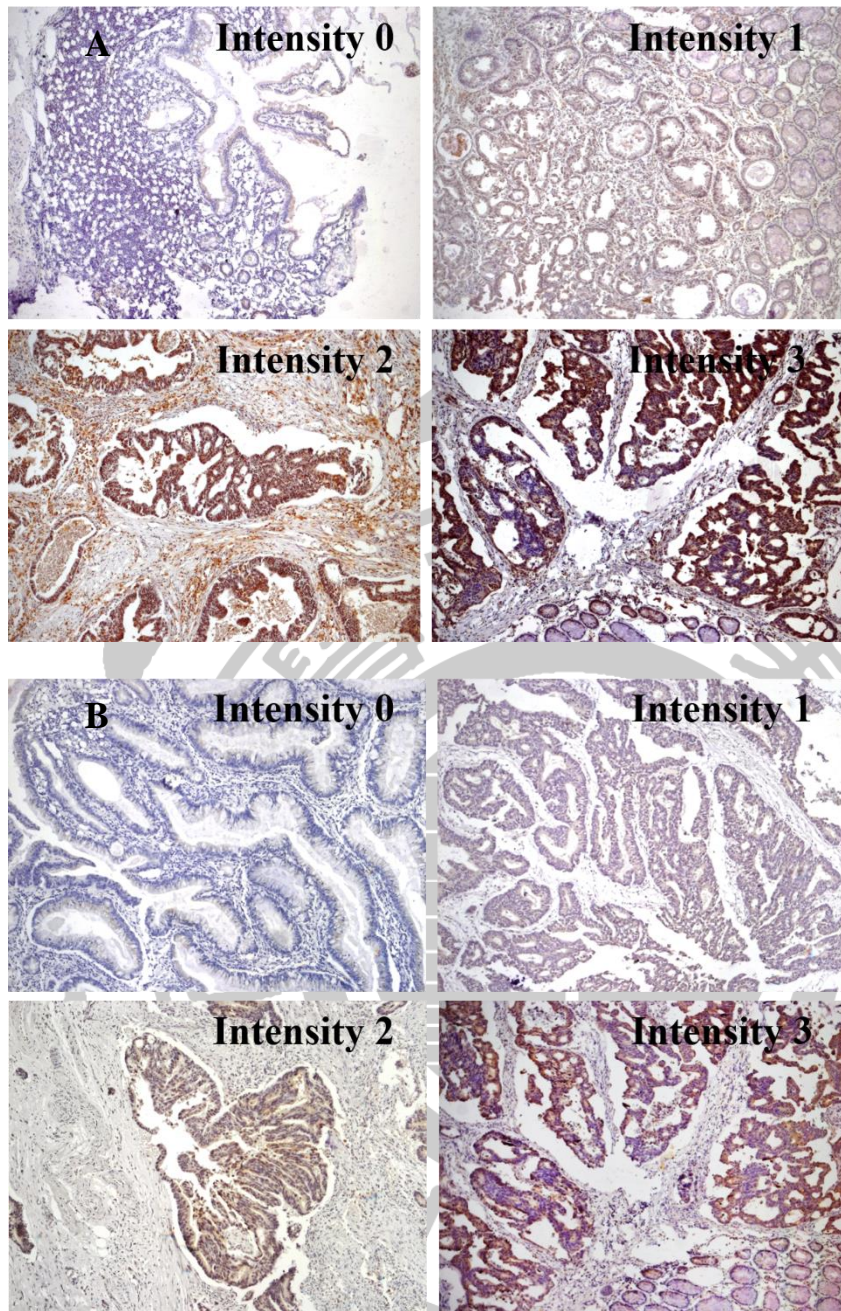


圖 2、免疫組織化學染色模式 0~3 級(100×)。

Fig 2. Immunohistochemistry stain of 0~3 stage (100×).

A 為 GLUT1 染色之標準圖。B 為 GLUT3 染色之標準圖。



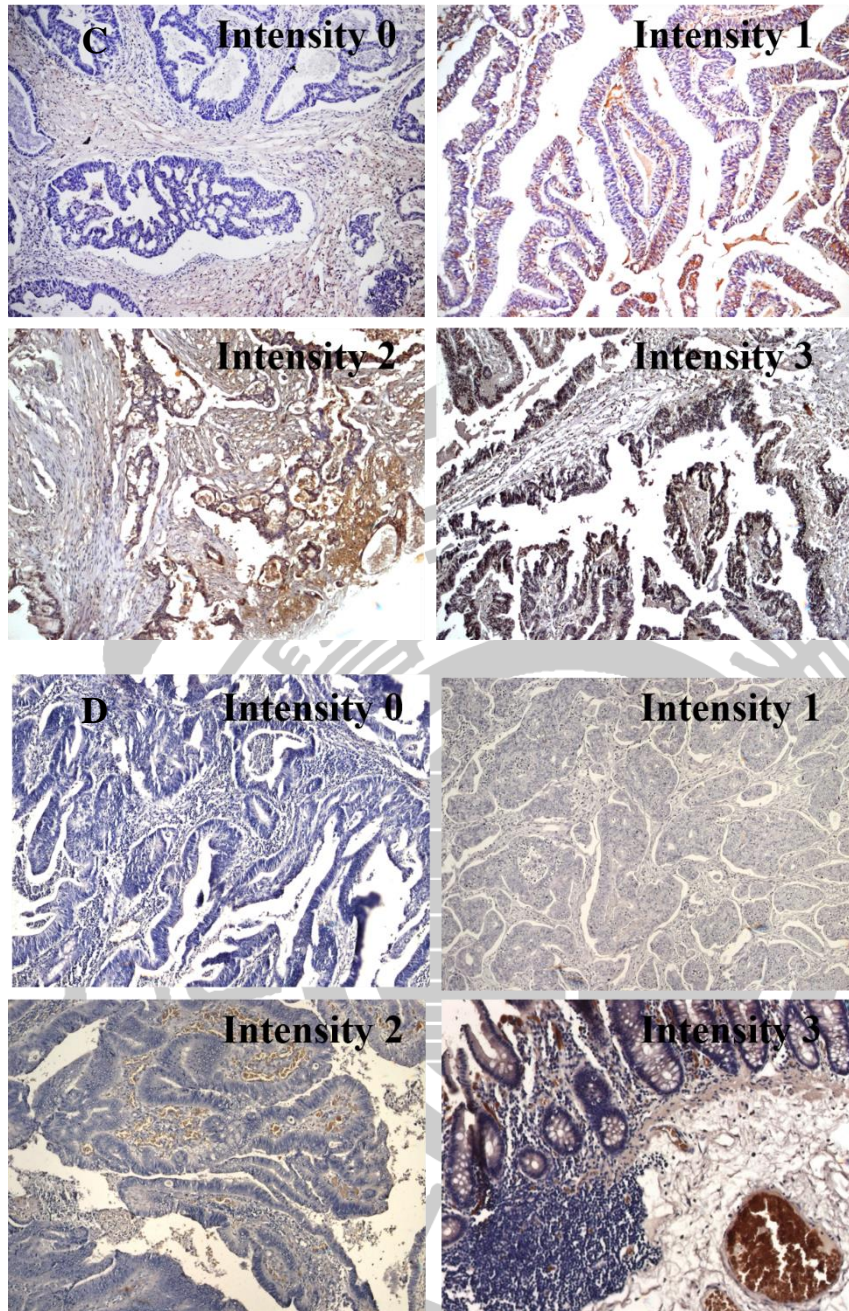


圖 2 (續)、免疫組織化學染色模式 0~3 級(100×)。

Fig 2 (cont.). Immunohistochemistry stain of 0~3 stage (100×).

C 為 CA8 染色之標準圖。D 為 Rab11 染色之標準圖。

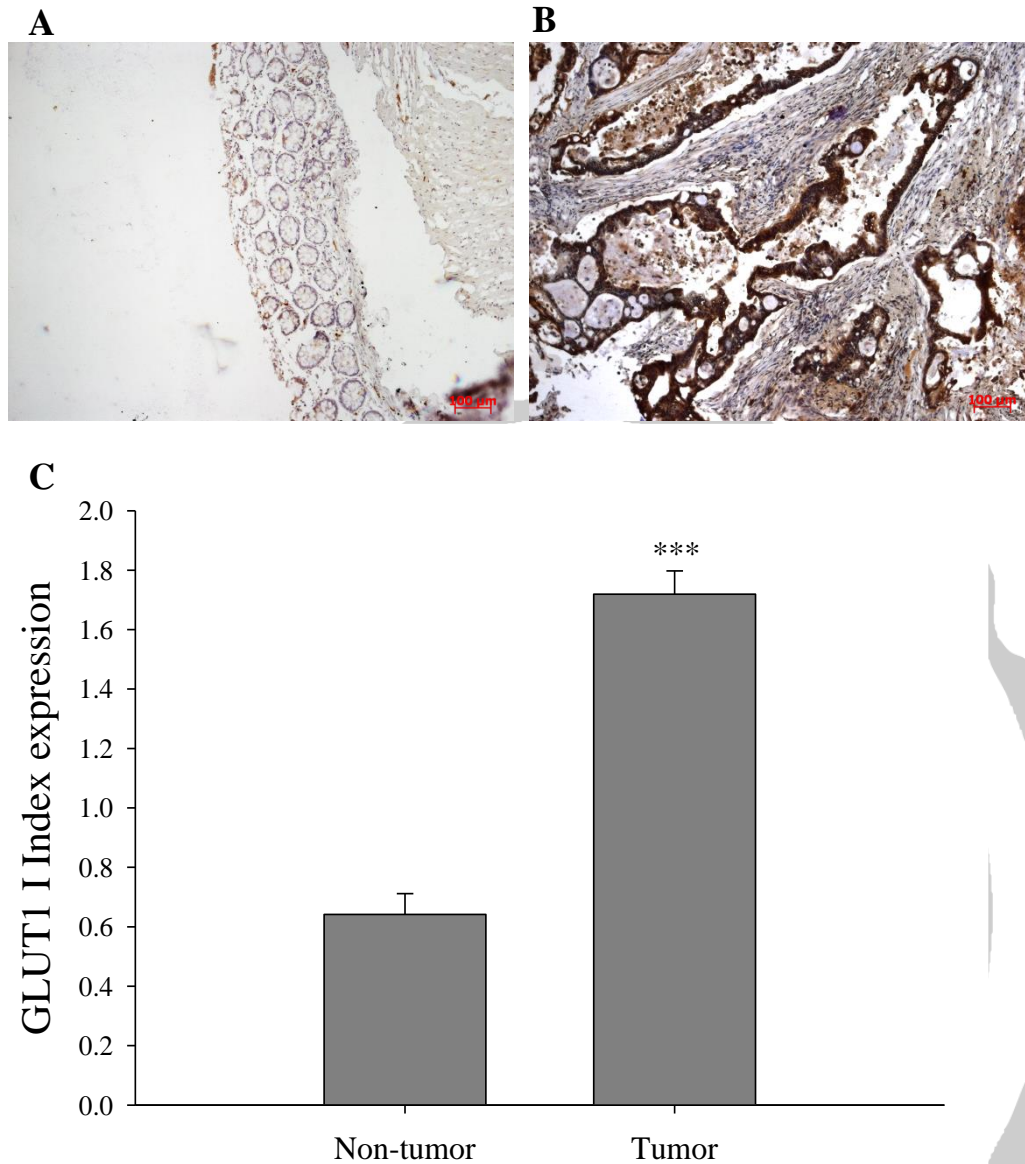


圖 3、澄清檢體免疫組織化學染色模式(Glut1-100x)。

Fig 3. Immunohistochemistry stain of GLUT1 (100x). (Cheng-Ching General Hospital). 染色目標為 GLUT1。A 為 Non-Tumor part。B 為 Tumor part。C 為 I Index 評分量化之結果，Non-tumor N=61；Tumor N=82 (\*\*\*)  $p < 0.005$ 。

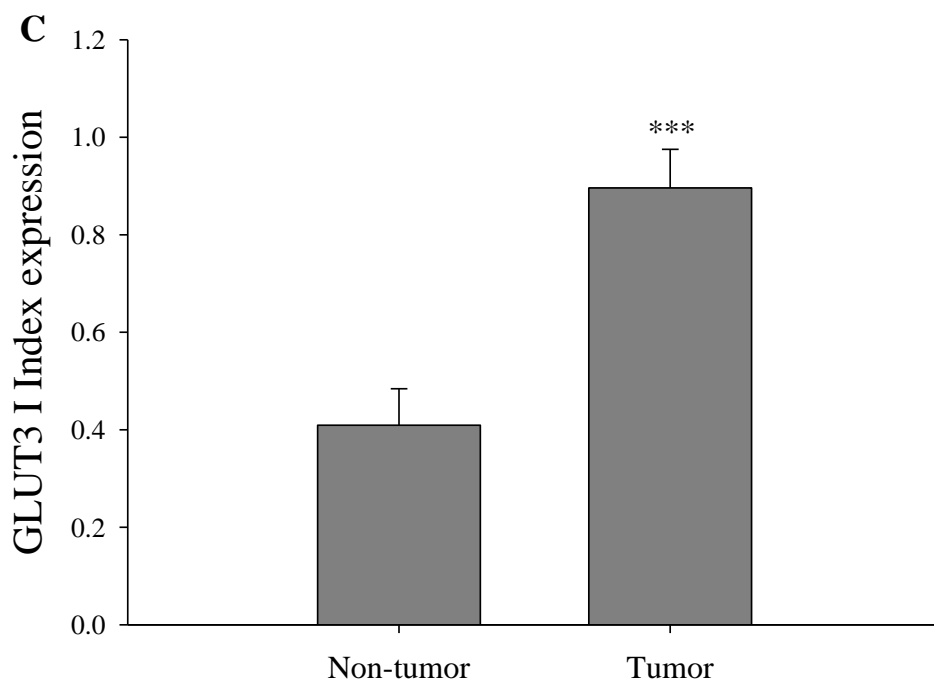
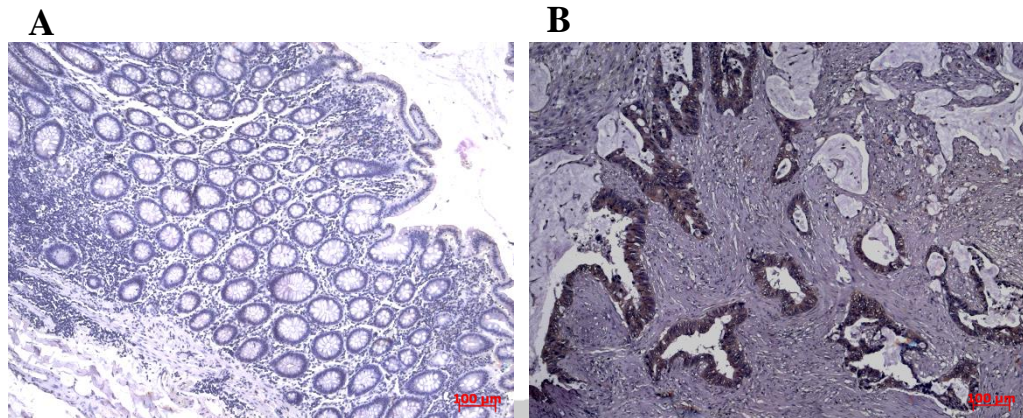


圖 4、澄清檢體免疫組織化學染色模式(Glut3-100×)。

Fig 4. Immunohistochemistry stain of GLUT3 (100×) (Cheng-Ching General Hospital).

染色目標為 GLUT3。A 為 Non-Tumor part。B 為 Tumor part。C 為 I Index 評分量化之結果，Non-tumor N=56；Tumor N=81 (\*\*\*)  $p < 0.005$ 。

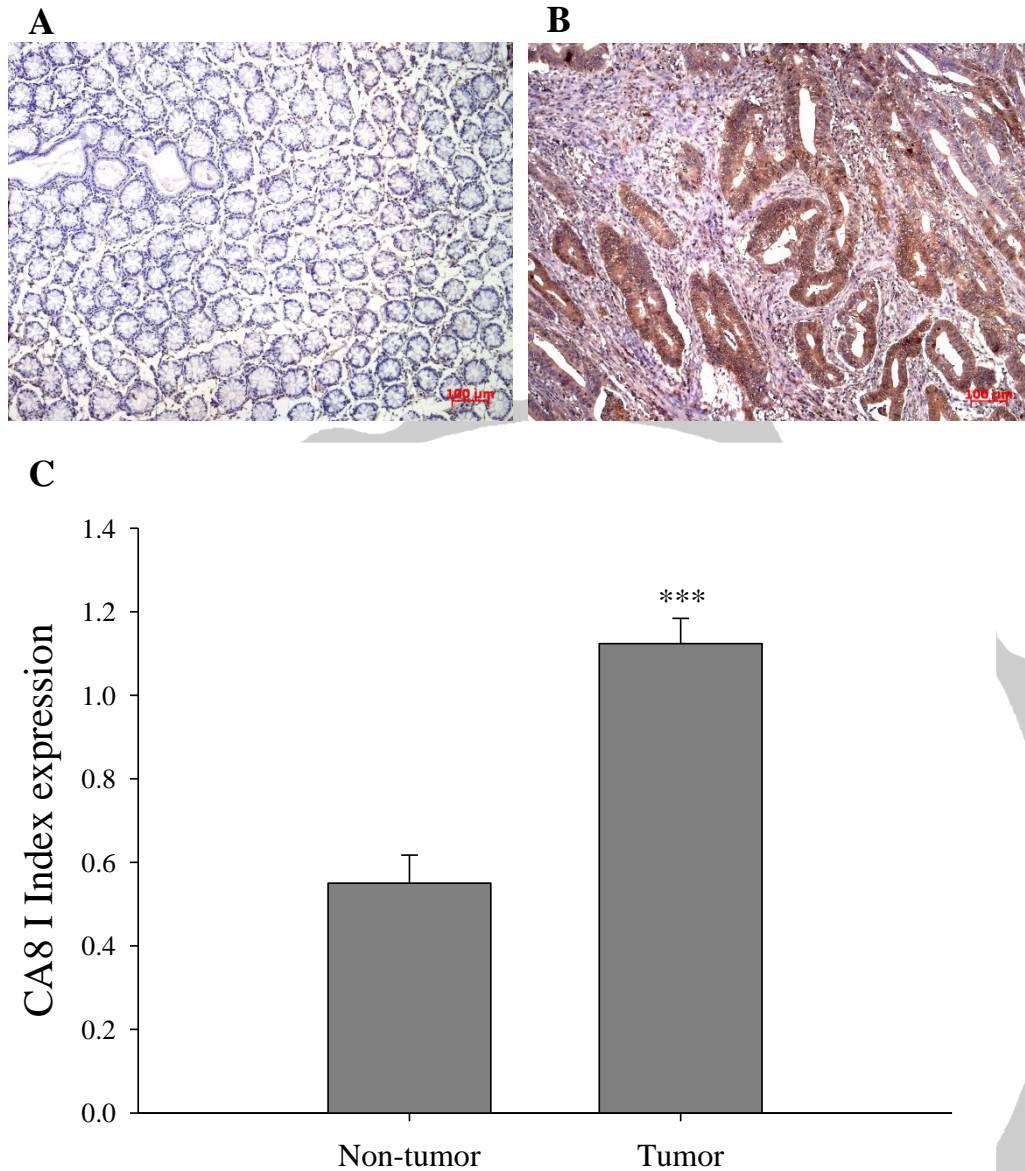


圖 5、澄清檢體免疫組織化學染色模式(CA8-100x)。

Fig 5. Immunohistochemistry stain of CA8 (100x) (Cheng-Ching General Hospital).

染色目標為 CA8。A 為 Non-Tumor part。B 為 Tumor part。C 為 I Index 評分量化之結果，Non-tumor N=57；Tumor N=80 (\*\*\*)  $p < 0.005$ 。

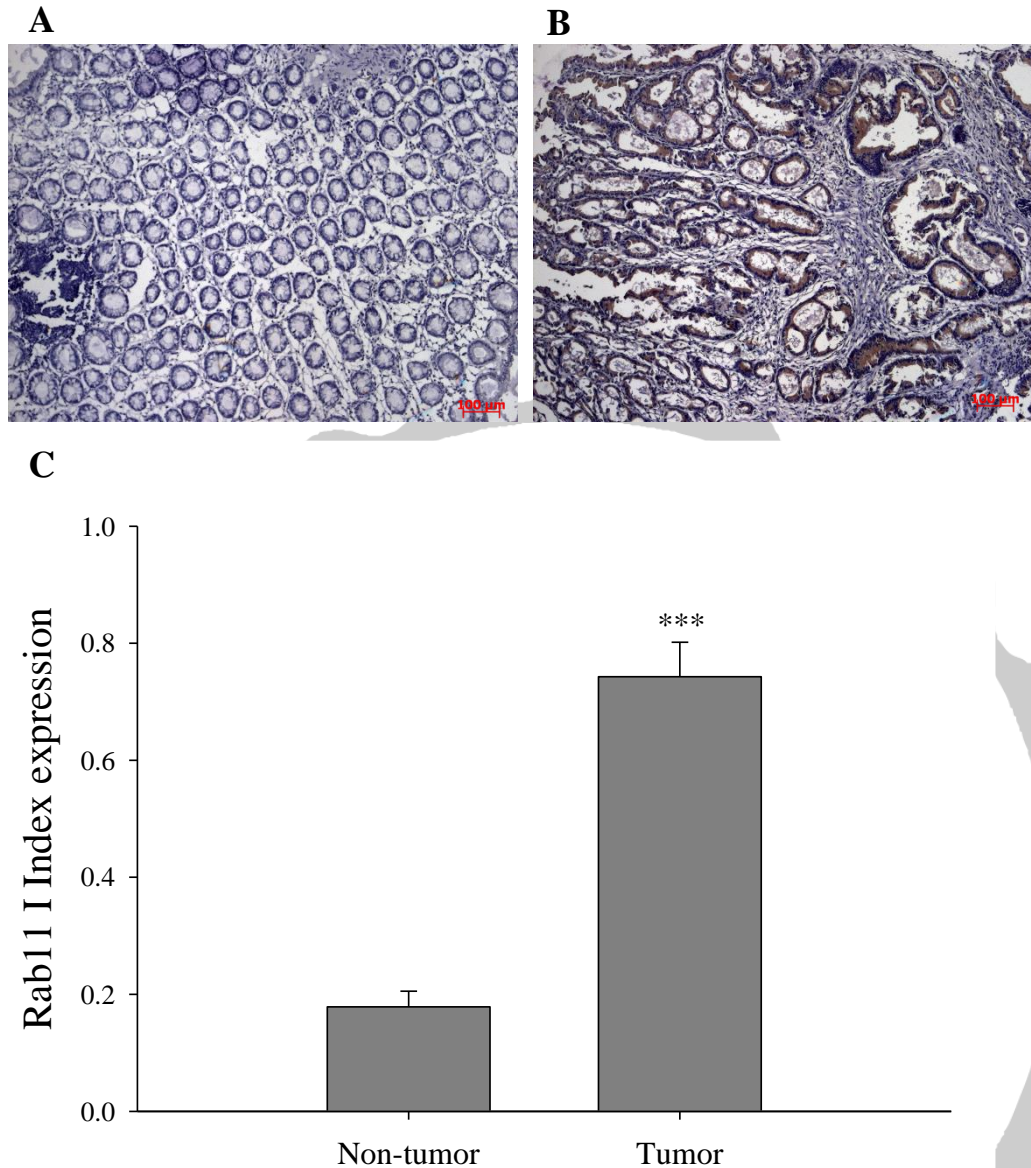


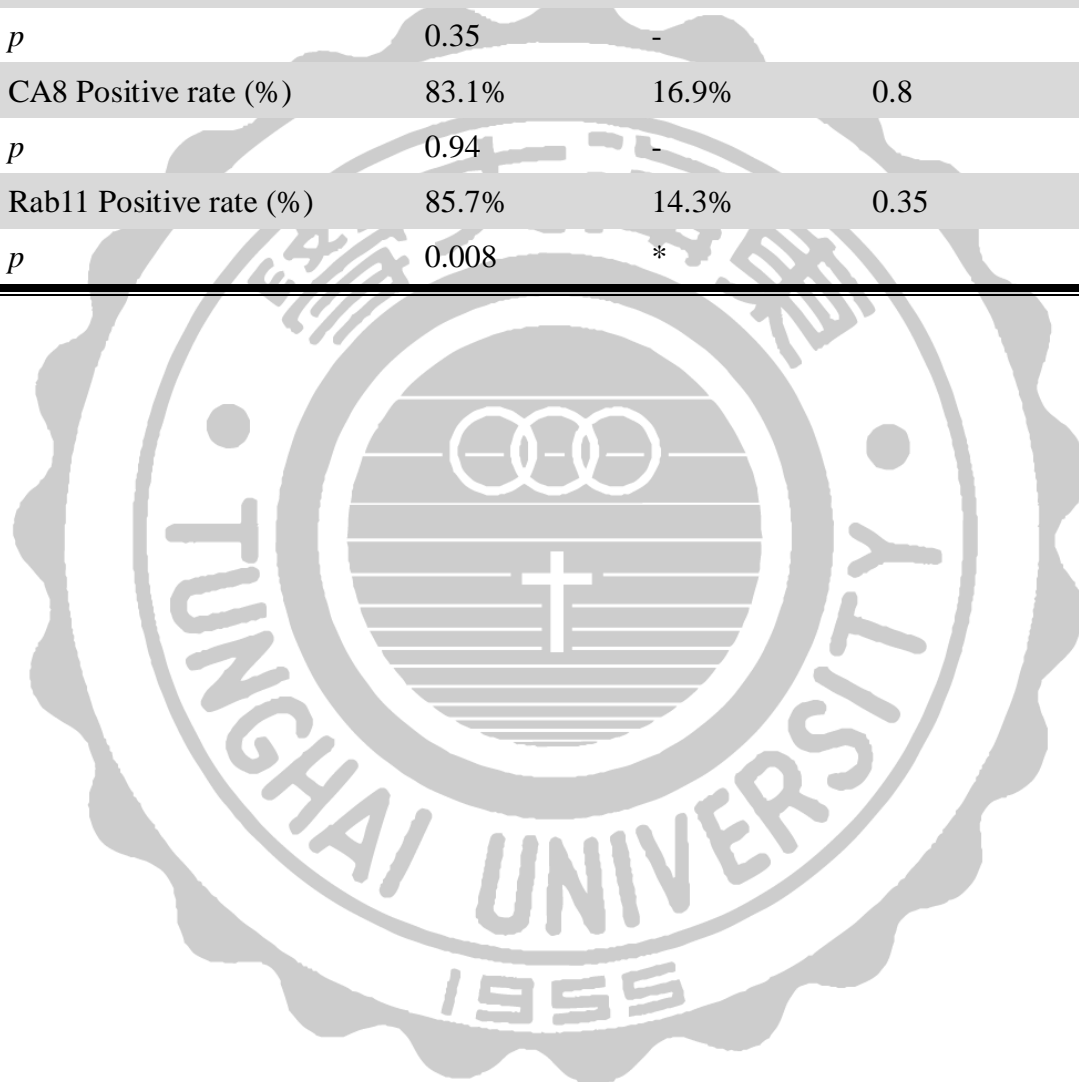
圖 6、澄清檢體免疫組織化學染色模式(Rab11-100x)。

Fig 6. Immunohistochemistry stain of Rab11 (100×) (Cheng-Ching General Hospital). 染色目標為 Rab11。A 為 Non-Tumor part。B 為 Tumor part。C 為 I Index 評分量化之結果，Non-tumor N=61；Tumor N=76 (\*\*\*)  $p < 0.005$ 。

表 3、CRC 組織中 GLUT1/3、CA8 與 Rab11 蛋白質的表現。

Table 3. Expression of GLUT1/3, CA8 and Rab11 Proteins in Colorectal Cancer.

Tissue part	Tumor	Non-Tumor	Median
GLUT1 Positive rate (%)	86.7%	13.3%	1.2
<i>p</i>	0.02	*	
GLUT3 Positive rate (%)	76.4%	23.6%	0.5
<i>p</i>	0.35	-	
CA8 Positive rate (%)	83.1%	16.9%	0.8
<i>p</i>	0.94	-	
Rab11 Positive rate (%)	85.7%	14.3%	0.35
<i>p</i>	0.008	*	



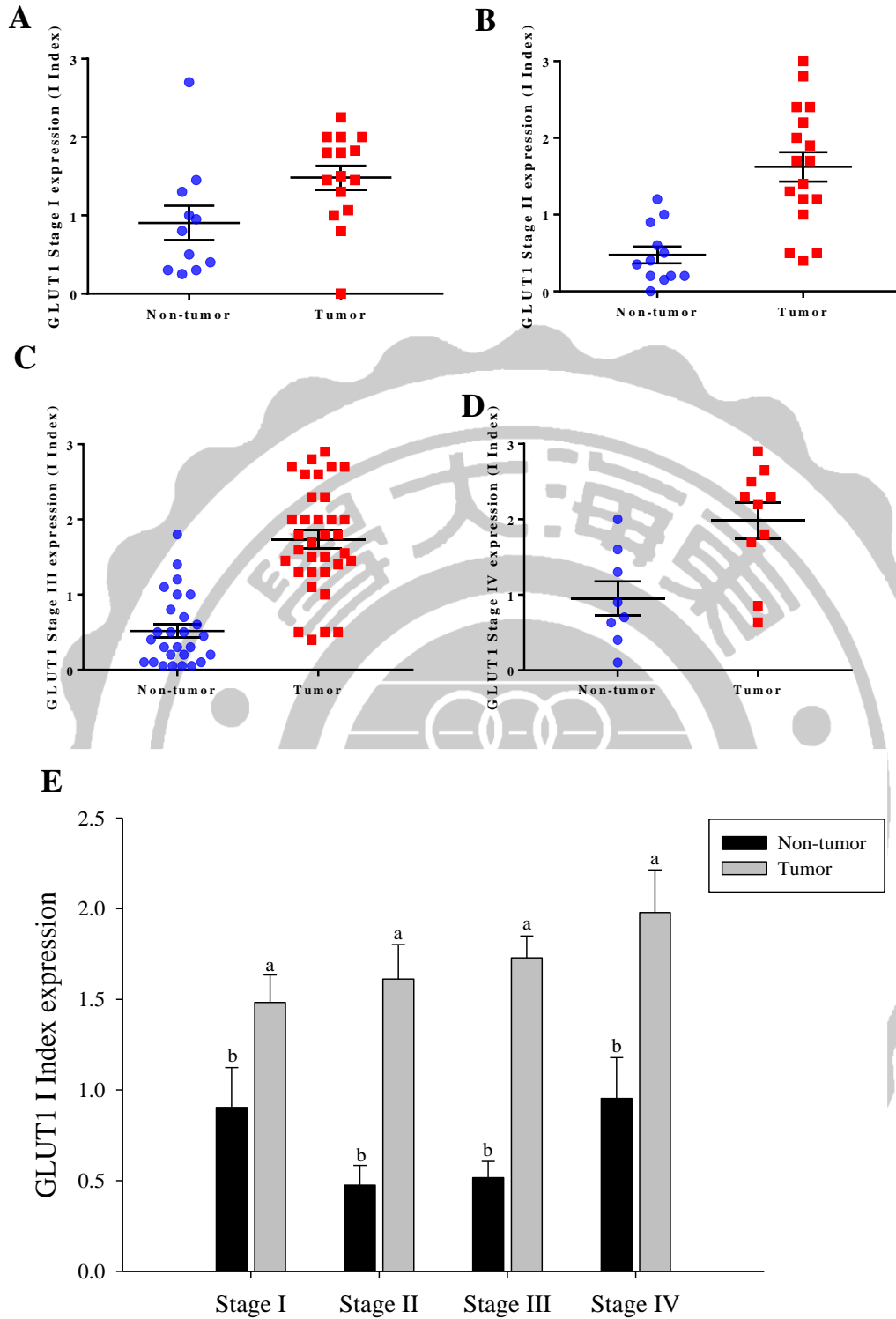


圖 7、澄清檢體各期比較(Glut1-100x)。

Fig 7. Each stage comparison of GLUT1 (100x) (Cheng-Ching General Hospital).

染色目標為 GLUT1。A 為 I 期 Non-Tumor 與 Tumor 之比較。B 為 II 期 Non-Tumor 與 Tumor 之比較。C 為 III 期 Non-Tumor 與 Tumor 之比較。D 為 IV 期 Non-Tumor 與 Tumor 之比較。E 為 I-IV 期 Non-Tumor 與 Tumor 之比較( $p < 0.05$ )。

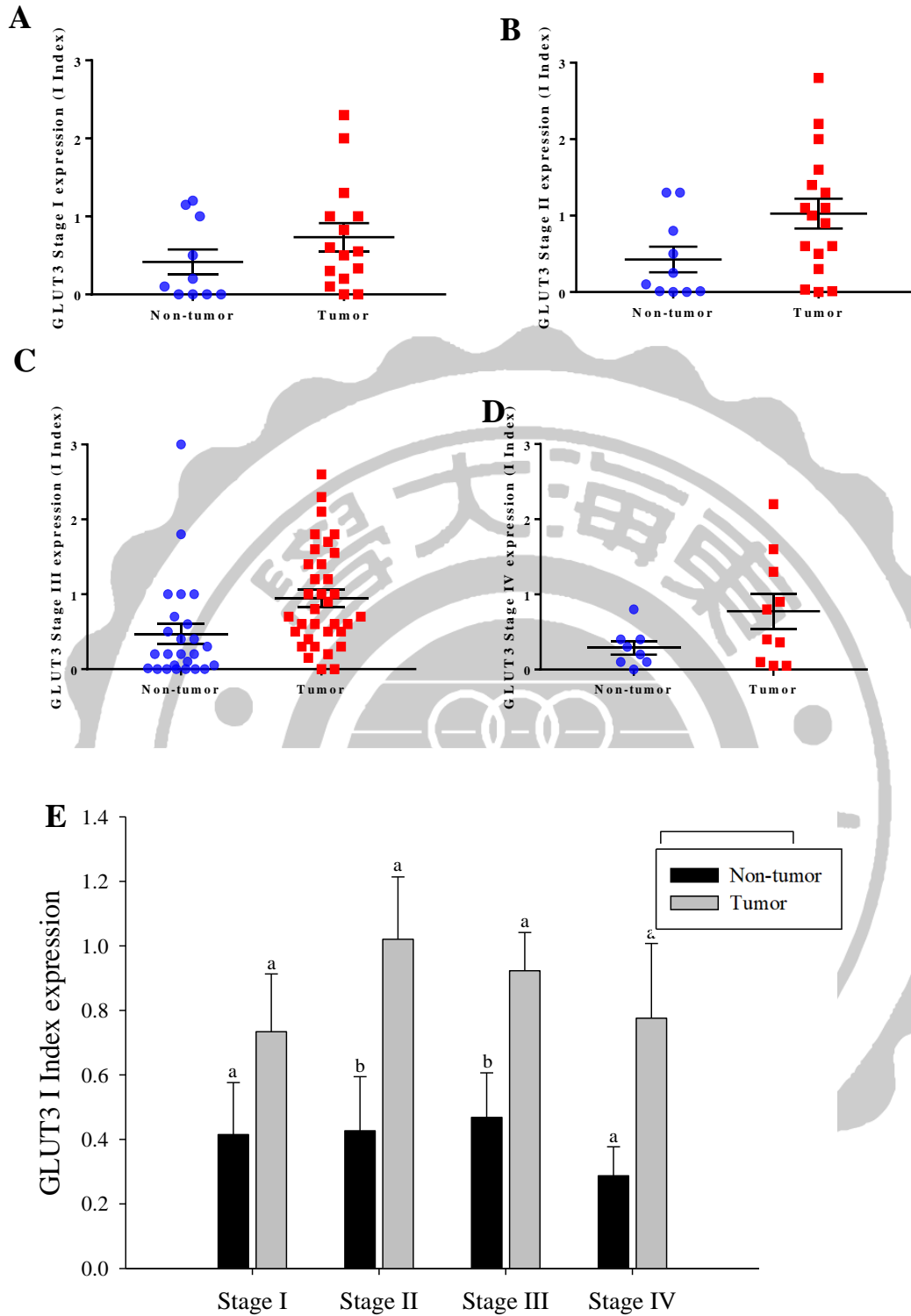


圖 8、澄清檢體各期比較(Glut3-100x)。

Fig 8. Each stage comparison of GLUT3 (100x) (Cheng-Ching General Hospital).

染色目標為 GLUT3。A 為 I 期 Non-Tumor 與 Tumor 之比較。B 為 II 期 Non-Tumor 與 Tumor 之比較。C 為 III 期 Non-Tumor 與 Tumor 之比較。D 為 IV 期 Non-Tumor 與 Tumor 之比較。E 為 I~IV 期 Non-Tumor 與 Tumor 之比較( $p < 0.05$ )。



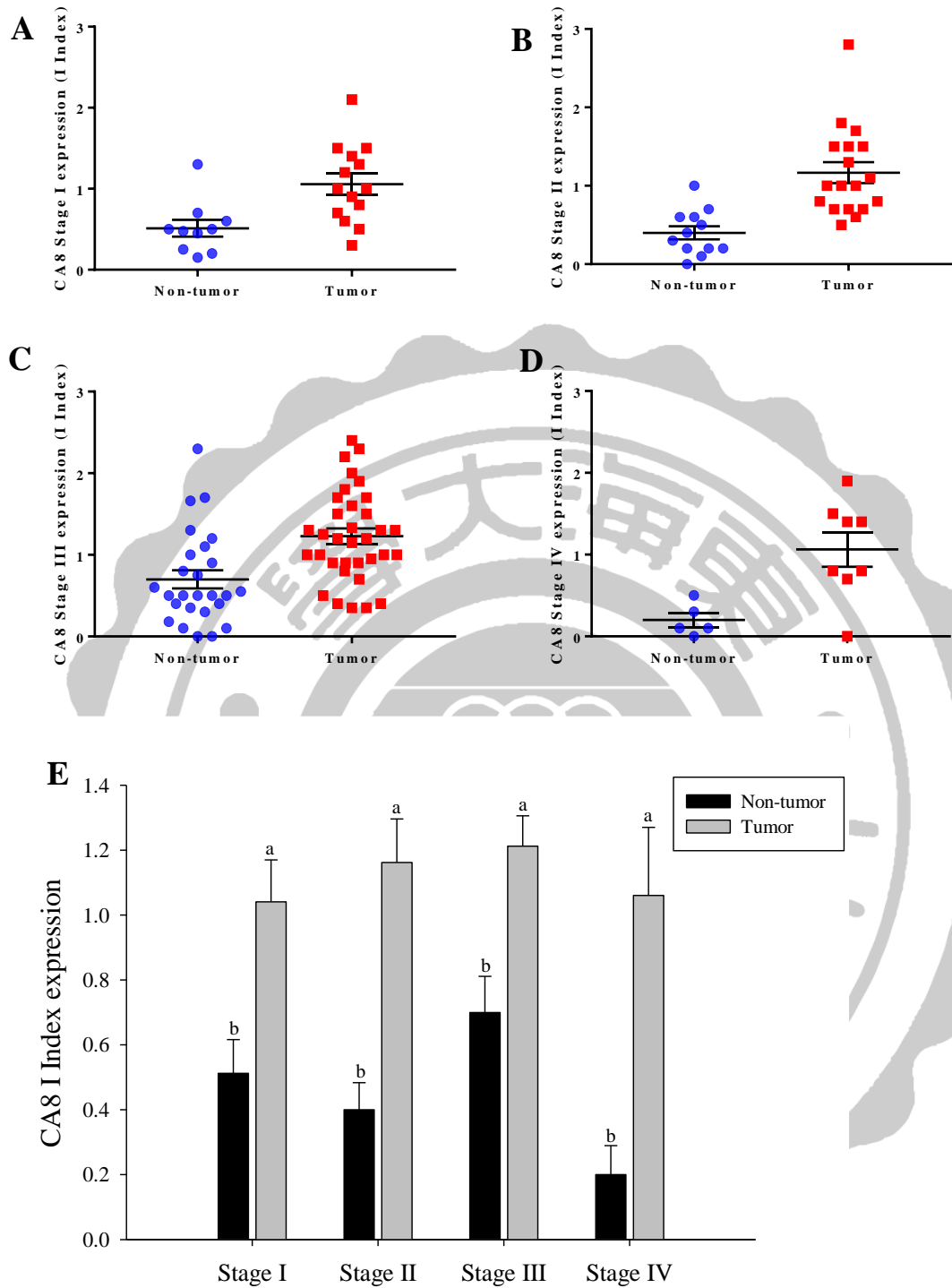


圖 9、澄清檢體各期比較(CA8-100x)。

Fig 9. Each stage comparison of CA8 (100x) (Cheng-Ching General Hospital).

染色目標為 CA8。A 為 I 期 Non-Tumor 與 Tumor 之比較。B 為 II 期 Non-Tumor 與 Tumor 之比較。C 為 III 期 Non-Tumor 與 Tumor 之比較。D 為 IV 期 Non-Tumor 與 Tumor 之比較。E 為 I~IV 期 Non-Tumor 與 Tumor 之比較( $p < 0.05$ )。

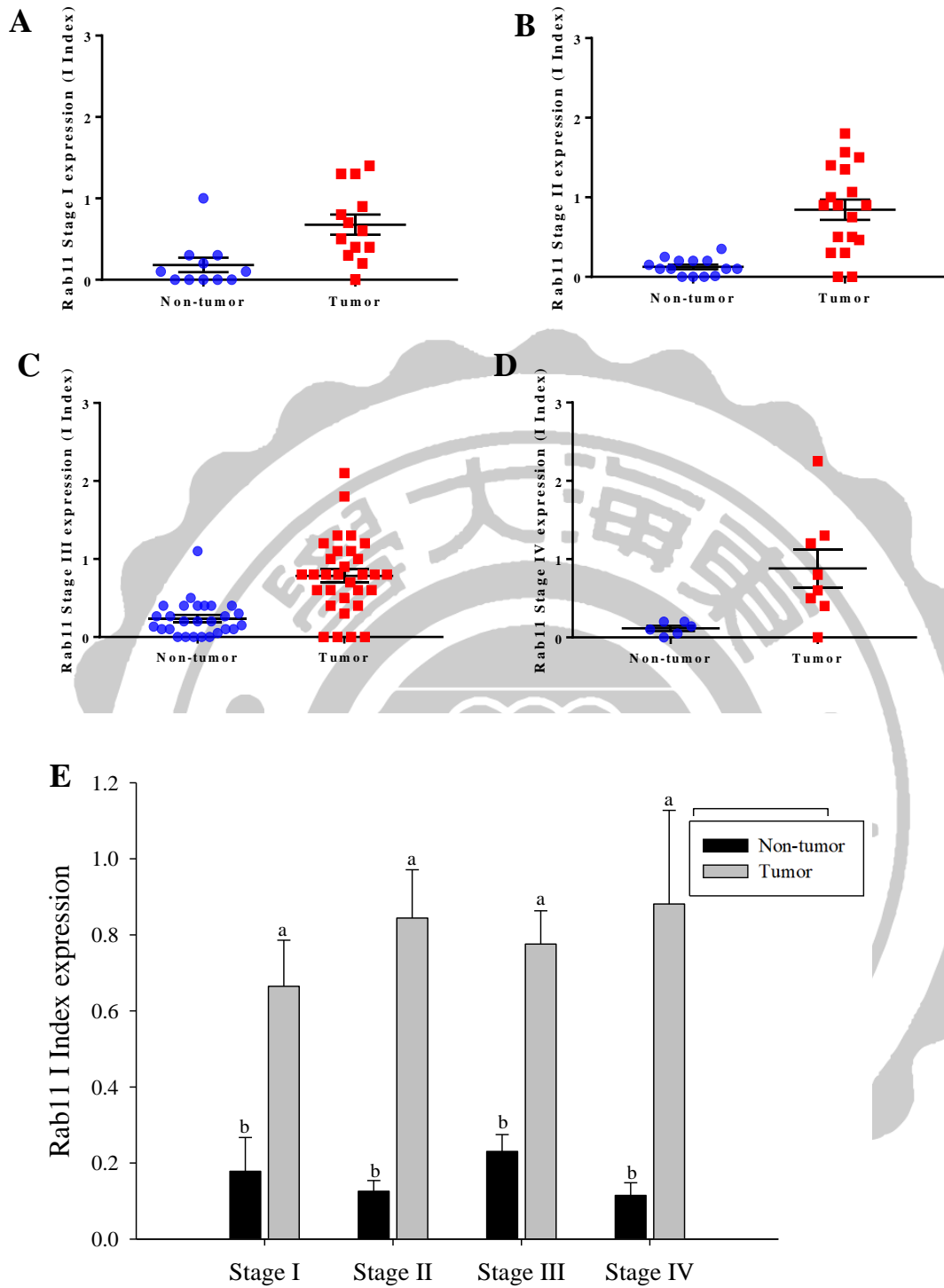
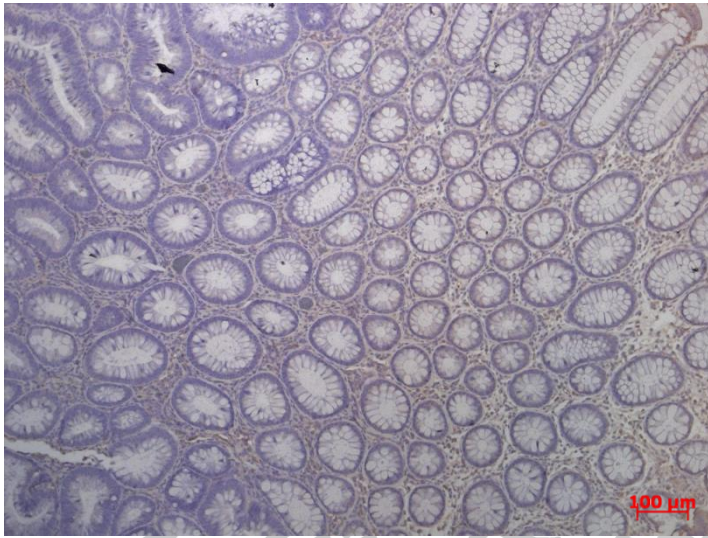


圖 10、澄清檢體各期比較(Rab11-100 $\times$ )。

Fig 10. Each stage comparison of Rab11 (100 $\times$ ) (Cheng-Ching General Hospital).

染色目標為 Rab11。A 為 I 期 Non-Tumor 與 Tumor 之比較。B 為 II 期 Non-Tumor 與 Tumor 之比較。C 為 III 期 Non-Tumor 與 Tumor 之比較。D 為 IV 期 Non-Tumor 與 Tumor 之比較。E 為 I~IV 期 Non-Tumor 與 Tumor 之比較( $p < 0.05$ )。

A



B

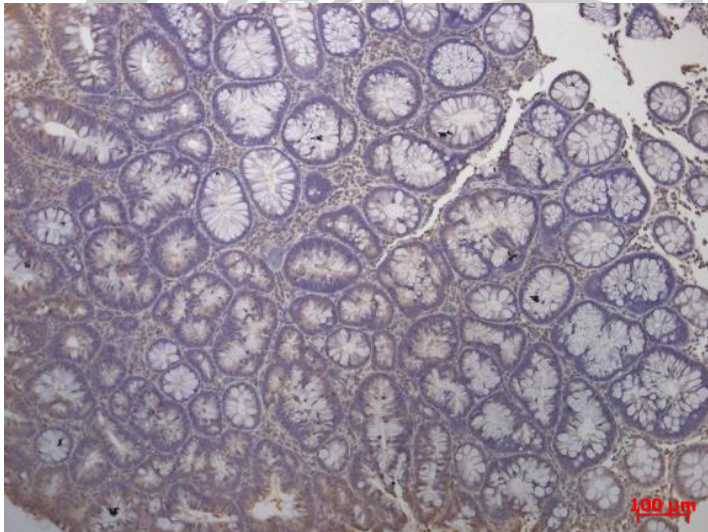
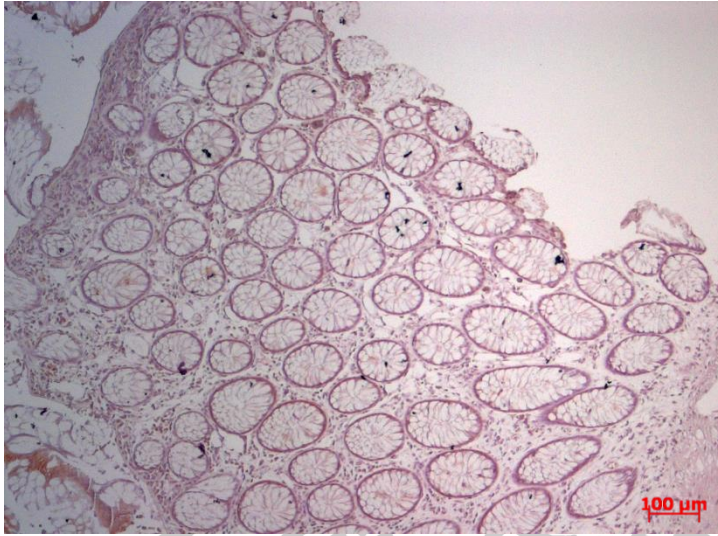


圖 11、彰基檢體免疫組織化學染色模式(Glut1-100x)。

Fig 11. Immunohistochemistry stain of GLUT1 (100×) (Changhua Christian Hospital).

染色目標為 GLUT1。A 為正常部位，可以看出與正常組織相比，腺腔直徑有些異常、腺體厚度不一，但結構基本無明顯改變。B 為癌肉部位，發現結構有變形現象，且排列漸趨紊亂。

A



B

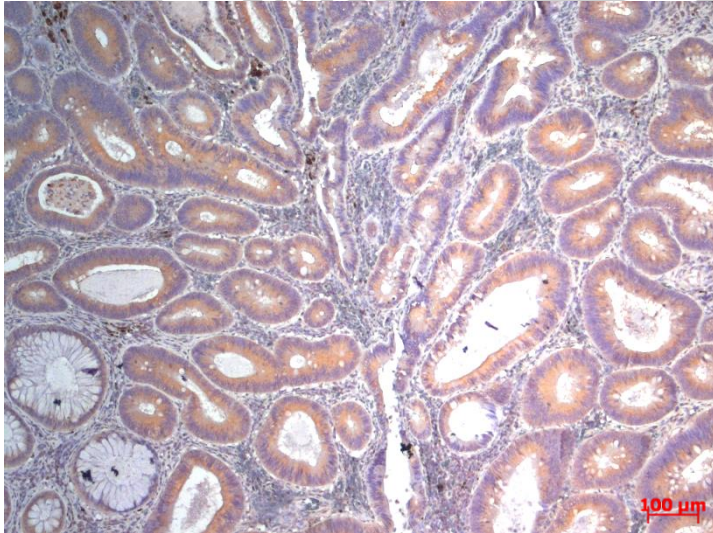


圖 12、彰基檢體免疫組織化學染色模式(Glut3-100x)。

Fig 12. Immunohistochemistry stain of GLUT3 (100×) (Changhua Christian Hospital).

染色目標為 GLUT3。A 為正常部位，可以看出與正常組織相比，腺腔直徑有些異常，比起正常組織其直徑較大，但結構基本無明顯改變。B 癌肉部位，發現結構有明顯變形現象，且排列漸趨紊亂。

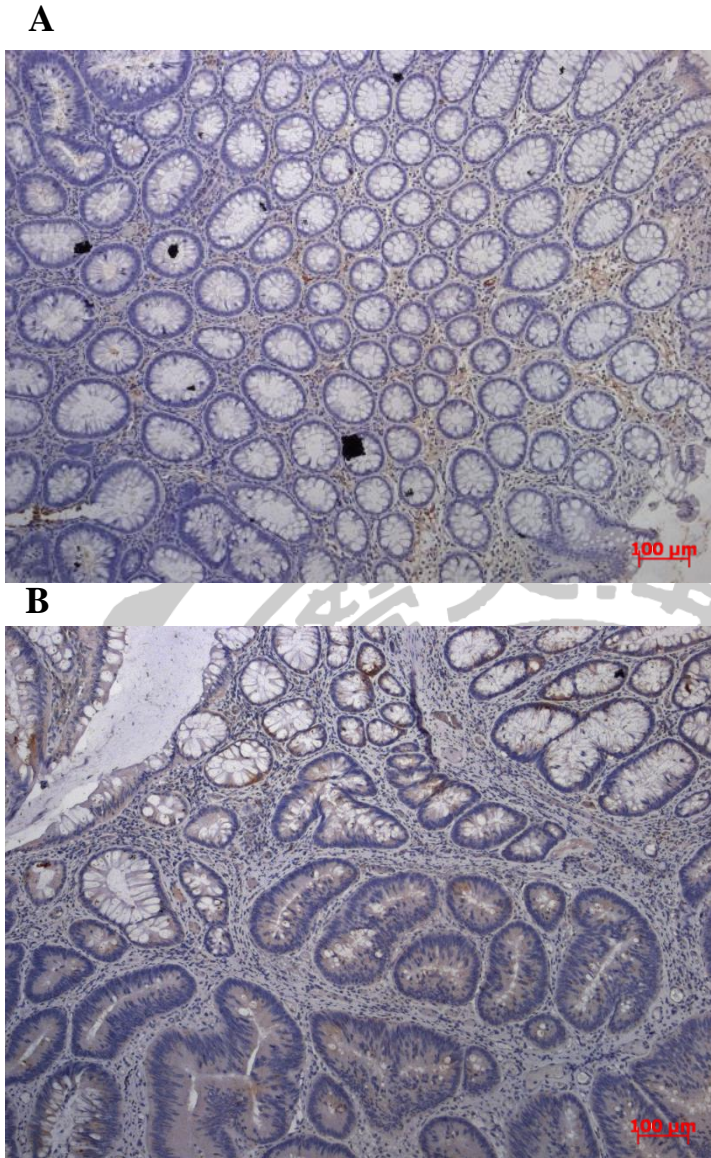
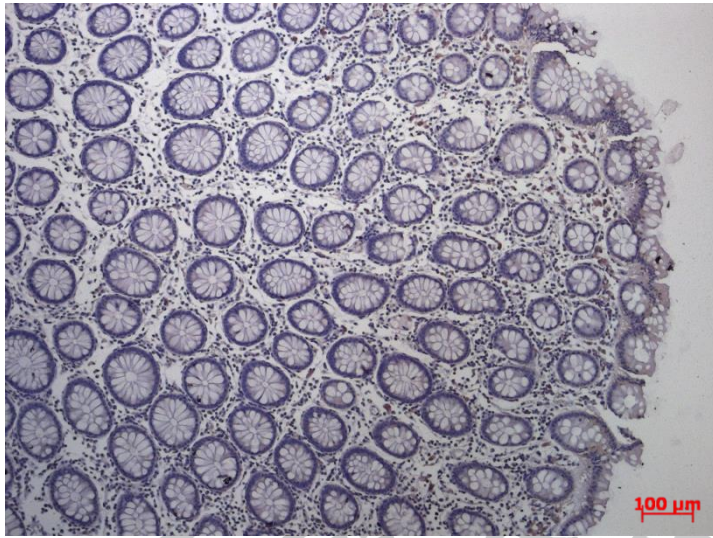


圖 13、彰基檢體免疫組織化學染色模式(CA8-100×)。

Fig 13. Immunohistochemistry stain of CA8 (100×) (Changhua Christian Hospital).

染色目標為 CA8。A 為正常部位，可以看出與正常組織相比，腺腔直徑有些異常，比起正常組織其直徑較大，但結構基本無明顯改變。B 為癌肉部位，發現結構有明顯變形現象，且排列漸趨紊亂。

A



B

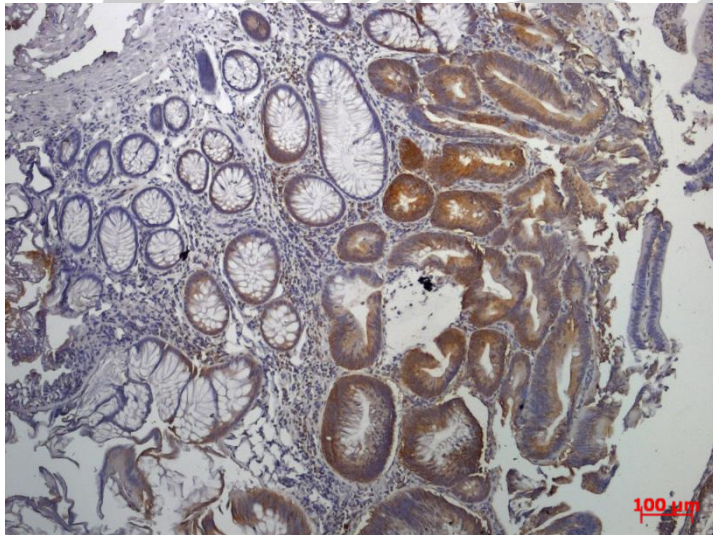


圖 14、彰基檢體免疫組織化學染色模式(Rab11-100×)。

Fig 14. Immunohistochemistry stain of Rab11 (100×) (Changhua Christian Hospital).

染色目標為 Rab11。A 為正常部位，可以看出與正常組織相比，腺腔直徑有些異常，比起正常組織其直徑略大，但結構基本無明顯改變。B 為癌肉部位，發現結構有明顯變形現象，且排列漸趨紊亂。

表 4、瘰肉組織中 GLUT1/3、CA8 與 Rab11 蛋白質的表現。

Table 4. Expression of GLUT1/3, CA8 and Rab11 Proteins in Polyps.

Tissue part	Polyp	Median
GLUT1 Positive rate (%)	50%	0.425
GLUT3 Positive rate (%)	50%	0.358
CA8 Positive rate (%)	50%	0.256
Rab11 Positive rate (%)	50%	0.0175



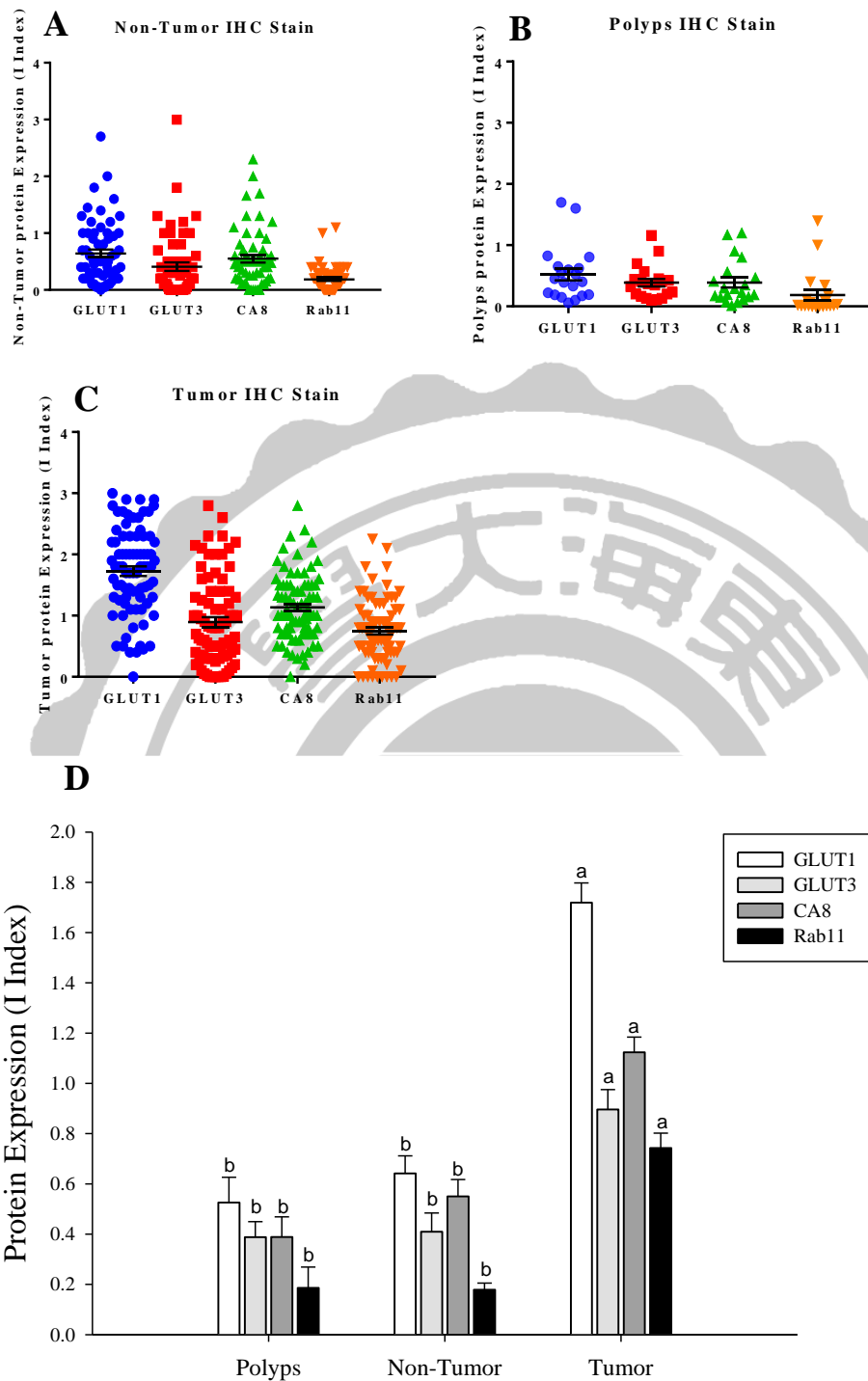


圖 15、免疫組織化學染色之 I 指數比較各基因於瘻肉、腫瘤及非腫瘤區域表現。  
 Fig 15. Comparison of gene expressions in non-tumor, polyps and tumor parts according to I index of IHC stain.

A 為正常對照組。B 為瘻肉組。C 為腫瘤組。D 合併比較各組。(p<0.05)。



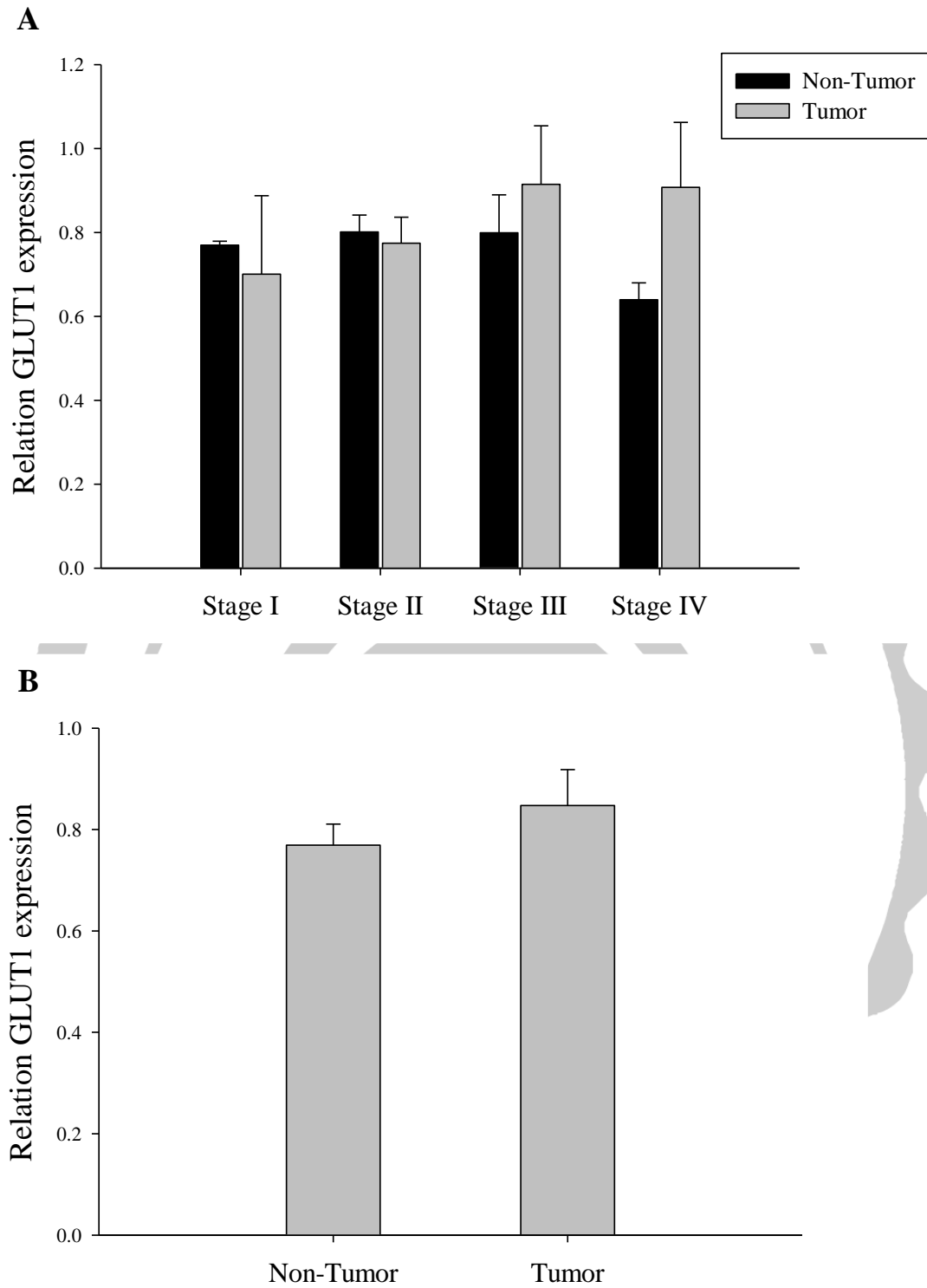


圖 16、澄清檢體 GLUT1 西方轉漬分析

Fig 16. Western blot analysis of GLUT1 (Cheng-Ching General Hospital).

圖 A 為各期結果。圖 B 為加總結果。

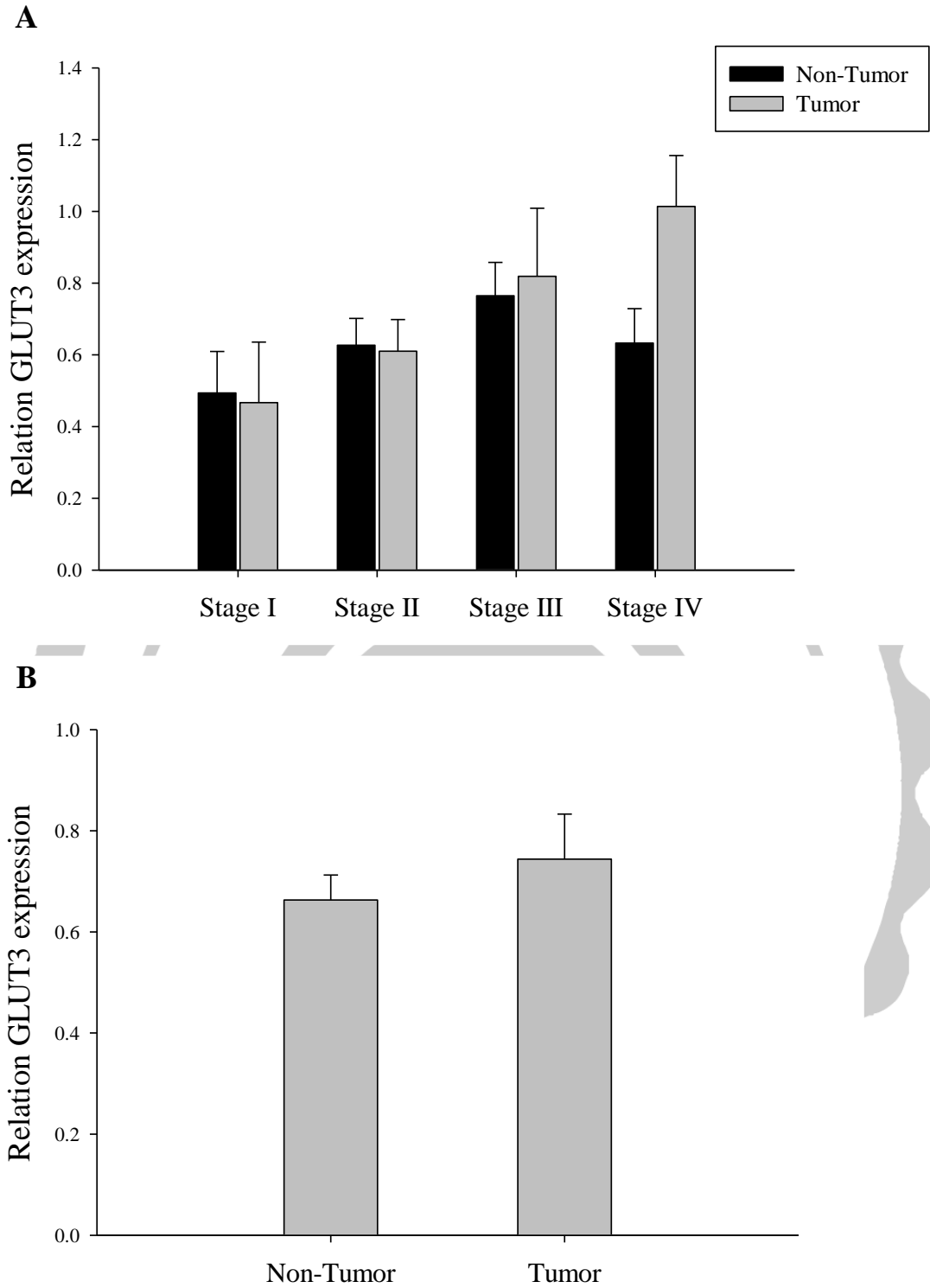


圖 17、澄清檢體 GLUT3 西方轉漬分析。

Fig 17. Western blot analysis of GLUT3 (Cheng-Ching General Hospital).

圖 A 為各期結果。圖 B 為加總結果。

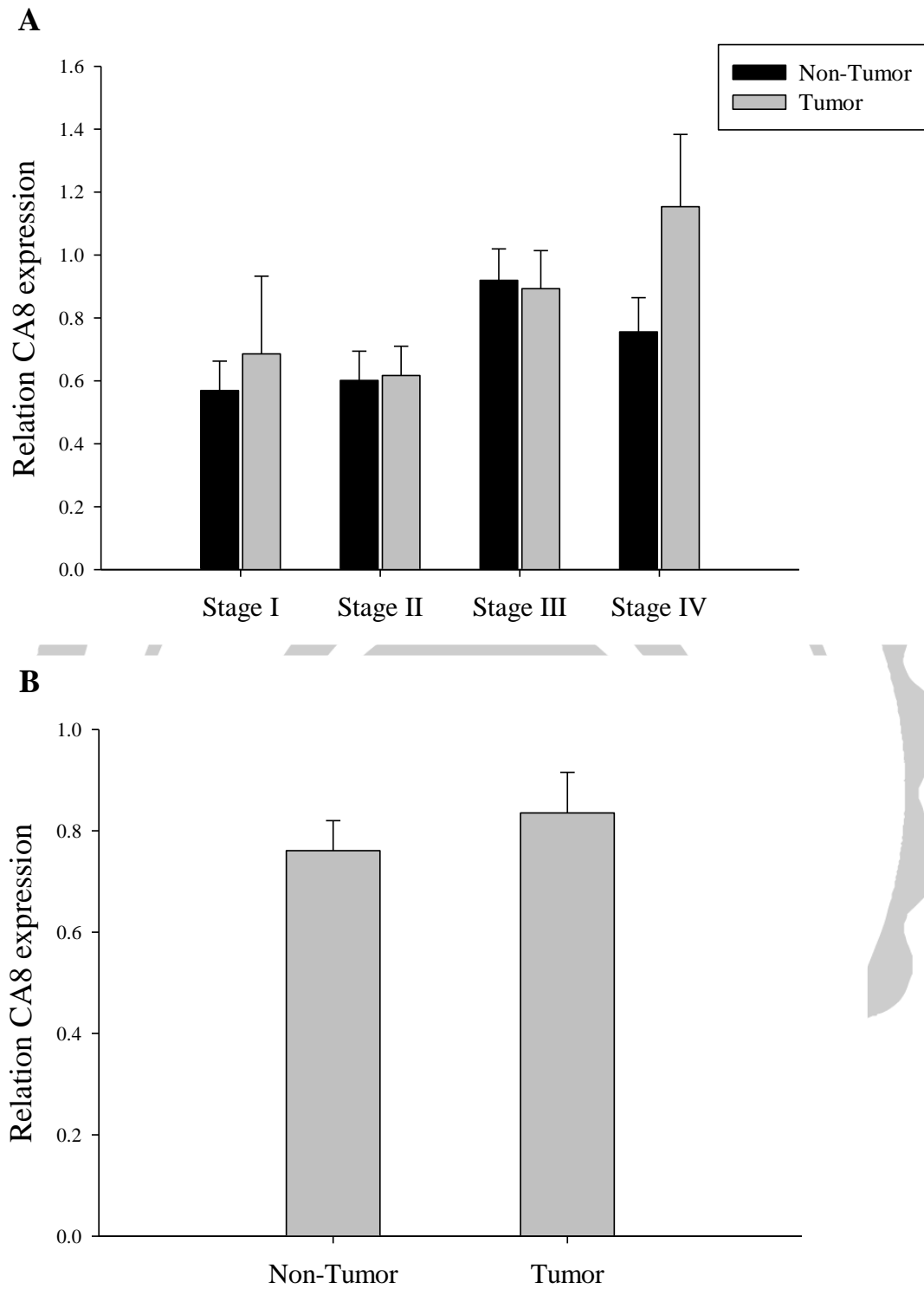


圖 18、澄清檢體 CA8 西方轉漬分析。

Fig 18. Western blot analysis of CA8 (Cheng-Ching General Hospital).

圖 A 為各期結果。圖 B 為加總結果。

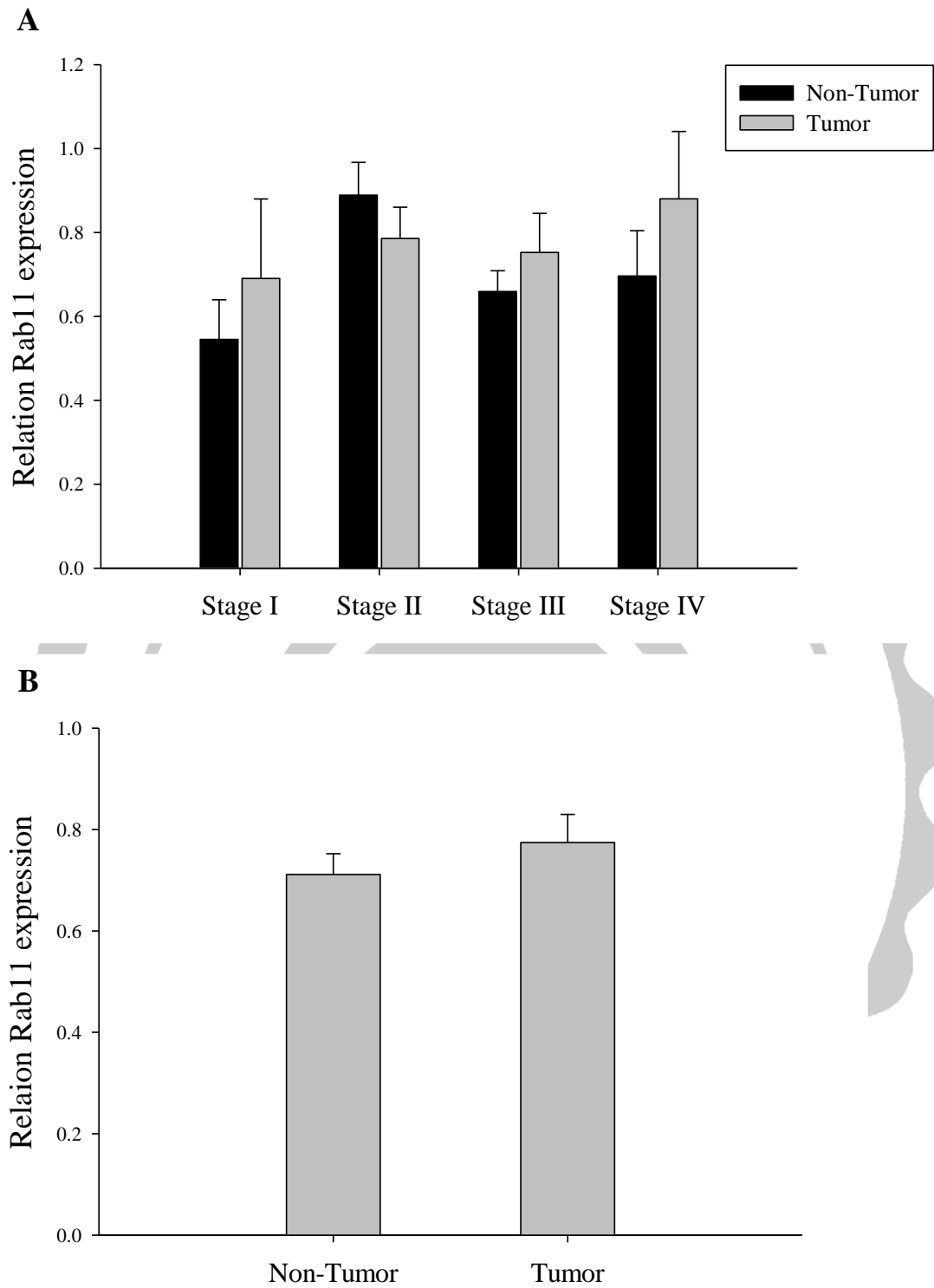


圖 19、澄清檢體 Rab11 西方轉漬分析。

Fig 19. Western blot analysis of Rab11 (Cheng-Ching General Hospital).

圖 A 為各期結果。圖 B 為加總結果。

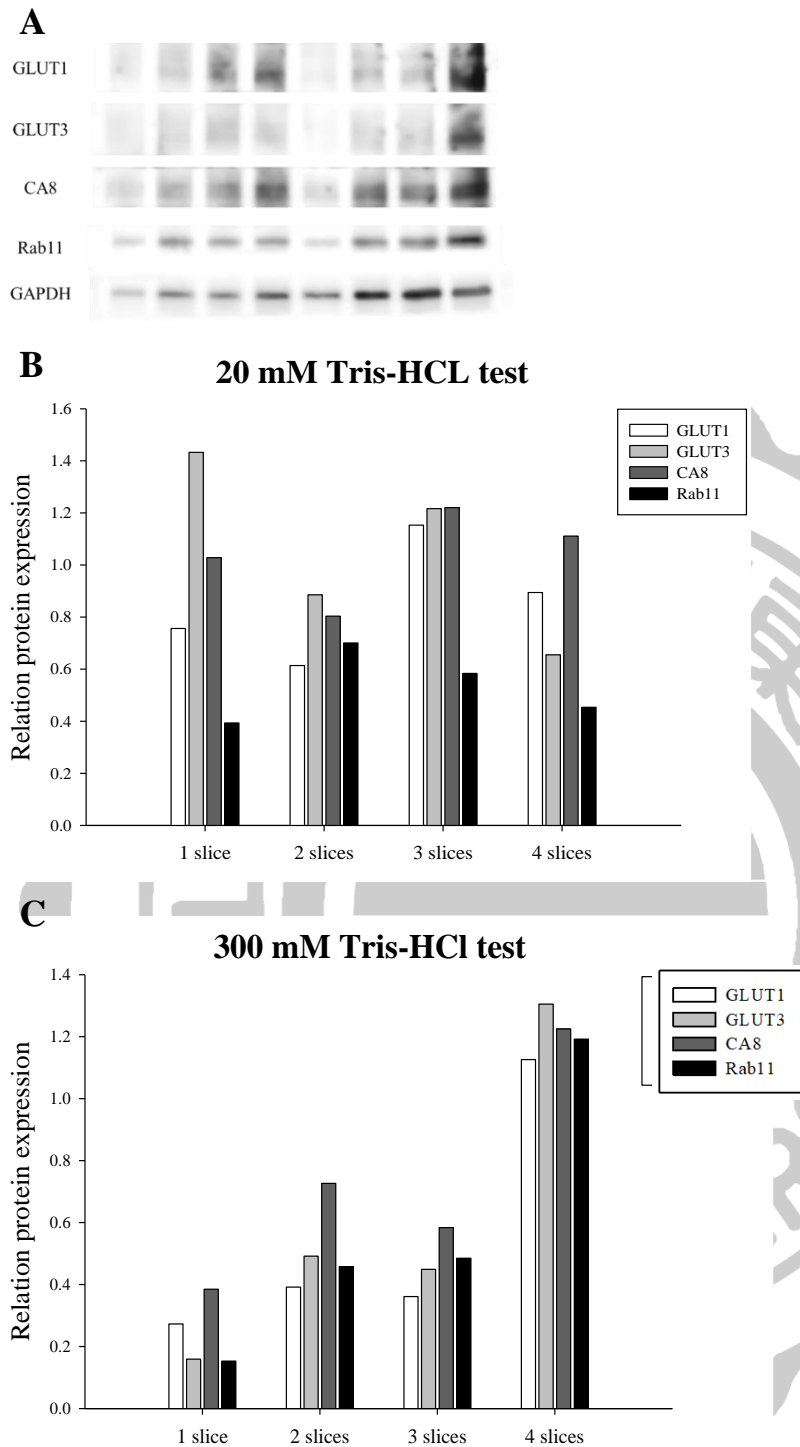


圖 20、澄清 FFPE 檢體西方轉漬之測試分析。

Fig 20. Western blot trial analyses of FFPE tissue (Cheng-Ching General Hospital).

圖 A 為 FFPE 組織 Western Blot 分析，前四道為測試 20 mM Tris-HCl 萃取效果，分別為 1、2、3 及 4 片 15  $\mu$ m 石蠟切片。後四道為測試 300 mM Tris-HCl 萃取效果，分別為 1、2、3 及 4 片 15  $\mu$ m 石蠟切片。圖 B 為前四道 20 mM Tris-HCl 測試之量化結果。圖 C 為後四道 300 mM Tris-HCl 測試之量化結果。

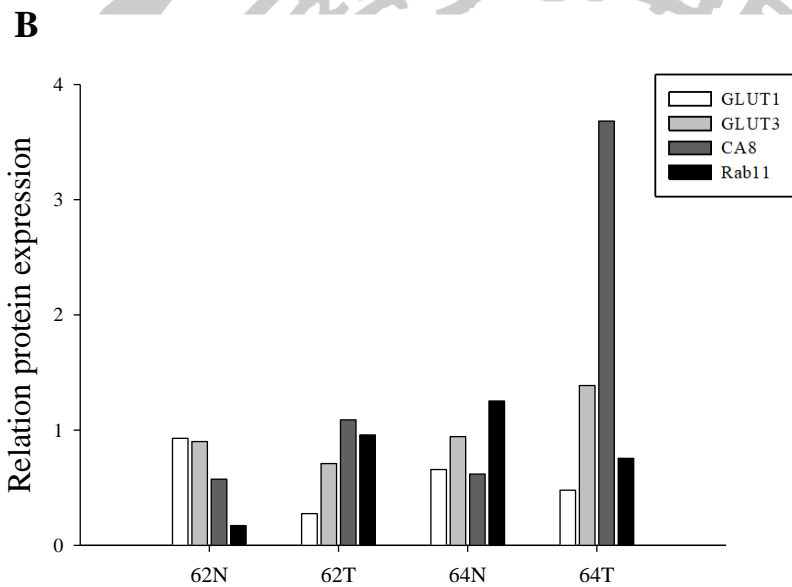
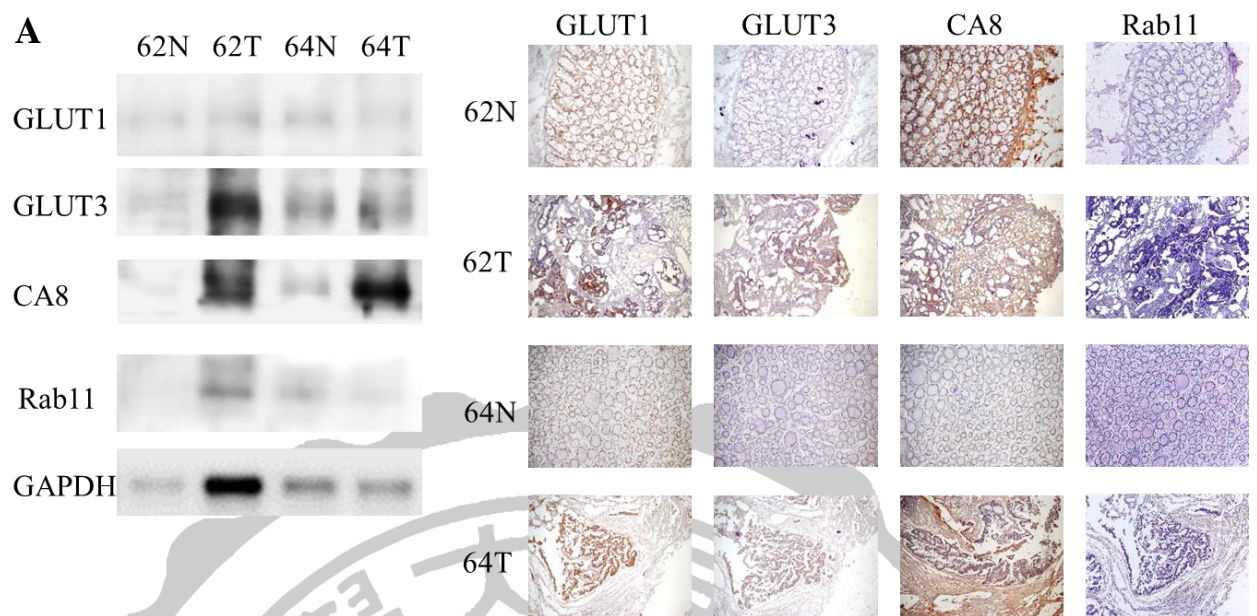


圖 21、澄清檢體西方轉漬分析- FFPE。

Fig 21. Western blot analysis of FFPE tissues (Cheng-Ching General Hospital).

圖 A 左側為 Western Blot 分析圖，右側為其對應之 IHC 染色圖。圖 B 為 Western Blot 量化之結果。

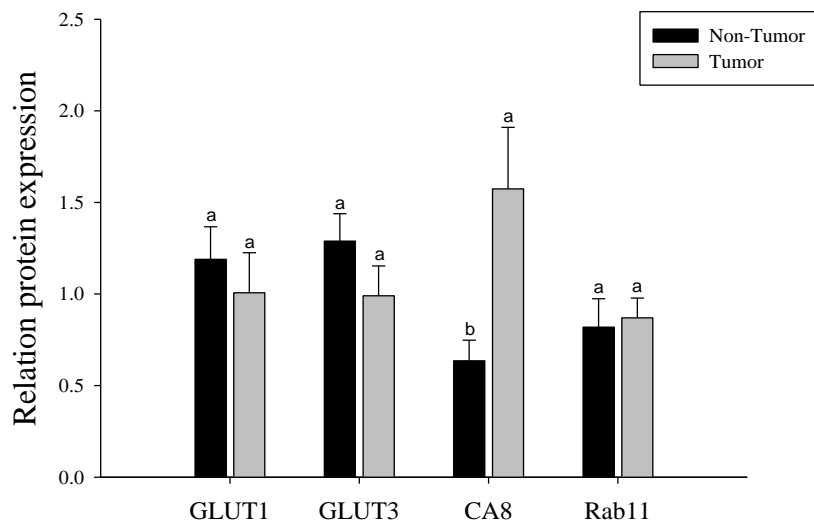


圖 22、澄清檢體西方轉漬分析-FFPE。

Fig 22. Western Blot of FFPE tissue (Cheng-Ching General Hospital).

Non-Tumor 部分按照 GLUT1/3、CA8 與 Rab11 順序，分別是 13、12、14 與 16 人。Tumor 部分則分別是 16、16、18 與 18 人。

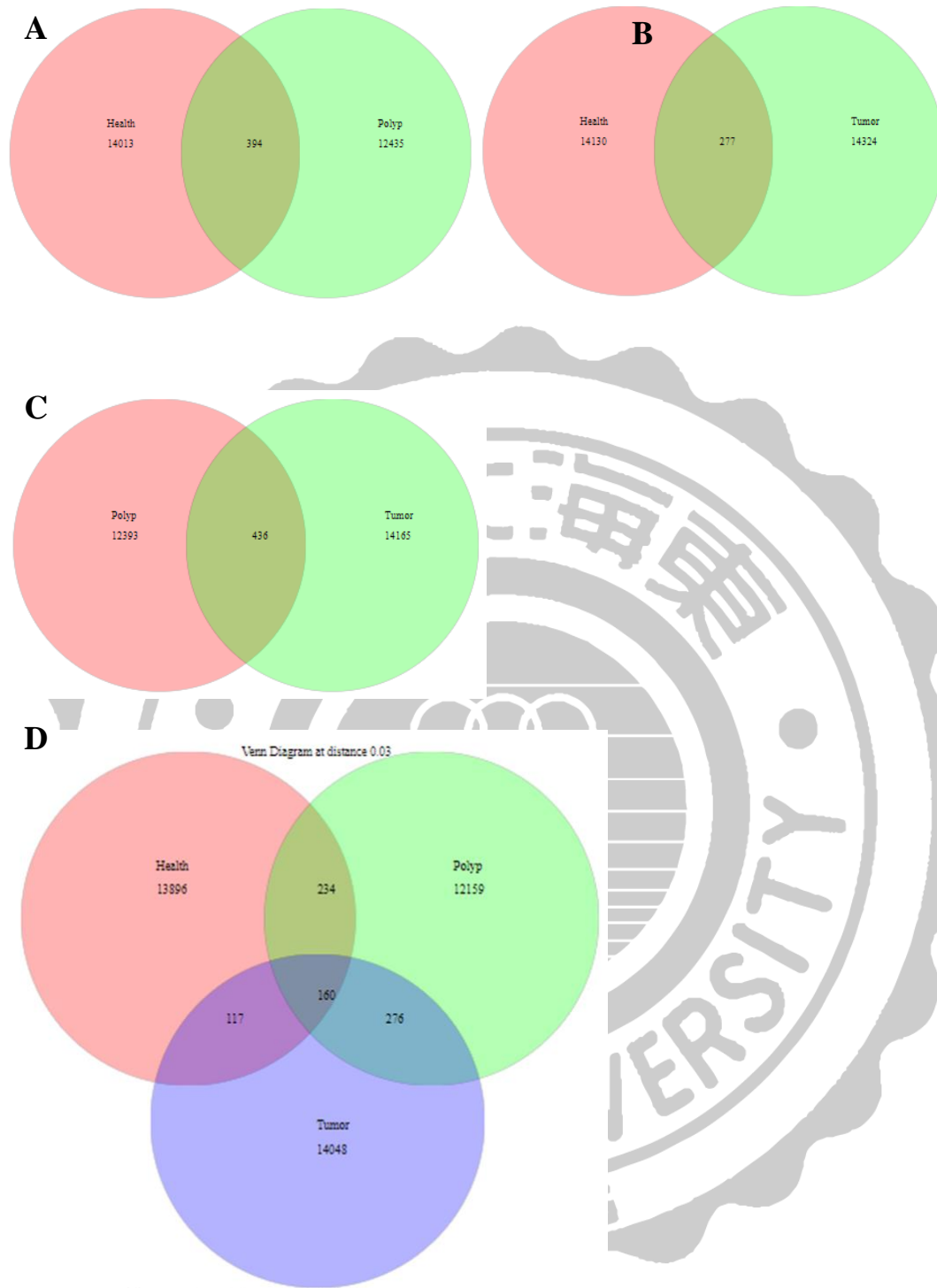


圖 23、菌相分析-Venn 圖。

Fig 23. Metagenomics - Venn Diagram.

A 為健康對照組-瘻肉組，中間共同的部分佔 1.47% (394 條序列)。B 為健康對照組-腫瘤組，中間共同的部分佔 0.96% (277 條序列)。C 為瘻肉組-腫瘤組，中間共同的部分佔 1.62% (436 條序列)。D 為三組之間的比較，中間共同的部分佔 0.39% (160 條序列)。



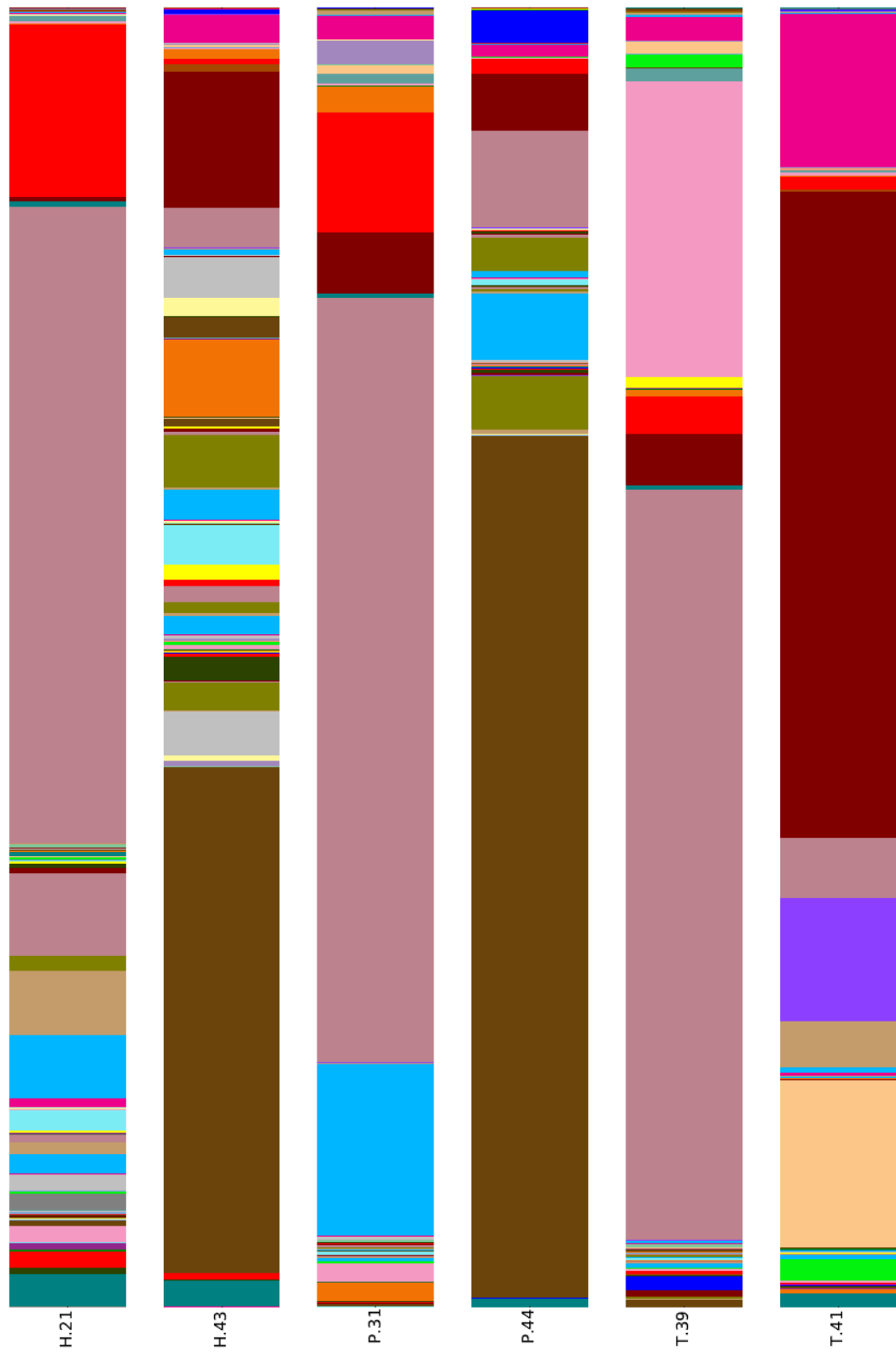
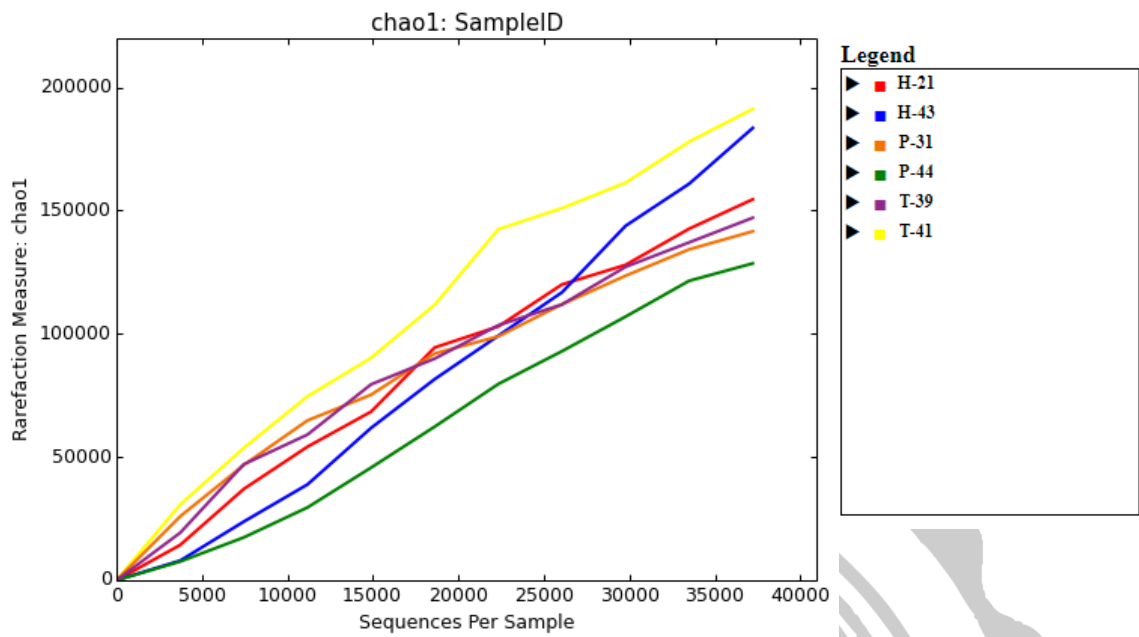


圖 24、菌相分析-菌群分類分析。

Fig 24. Metagenomics – Taxonomy profiling.

圖為菌群之菌屬的分佈，H 為健康對照，P 為瘰肉，T 為腫瘤。

**A**



**B**

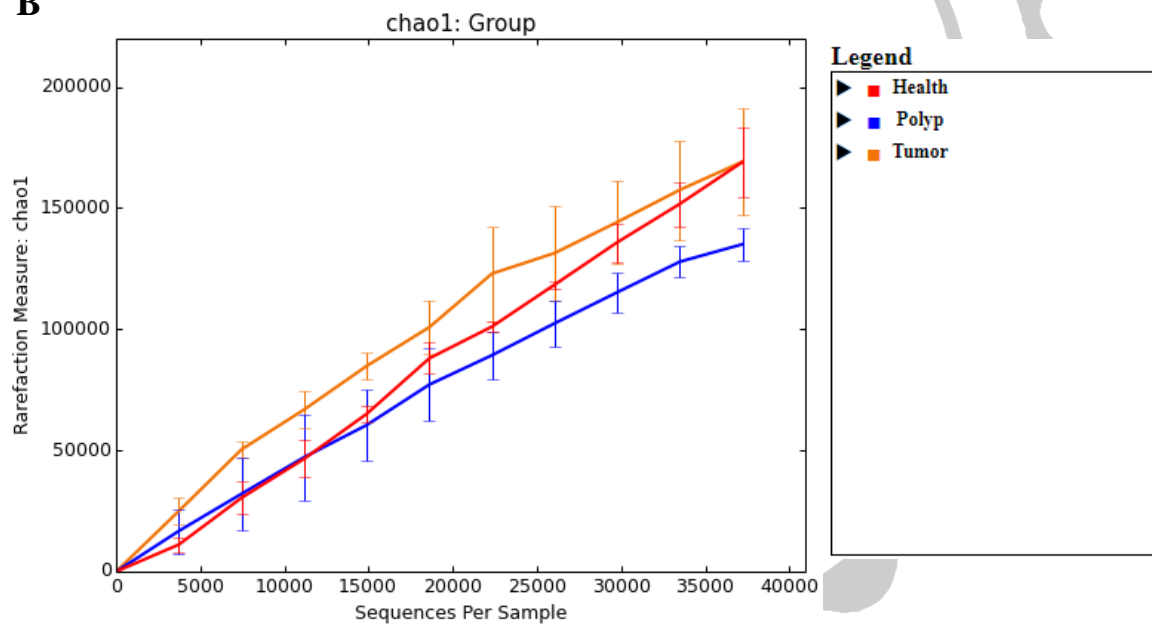


圖 25、菌相分析-Alpha 多樣性分析 chao1 指數。

Fig 25. Metagenomics – Alpha diversity analysis for chao1 index.

A 為六人彼此間差異。B 為組間差異。H: Health; P: Polyp; T: Tumor。

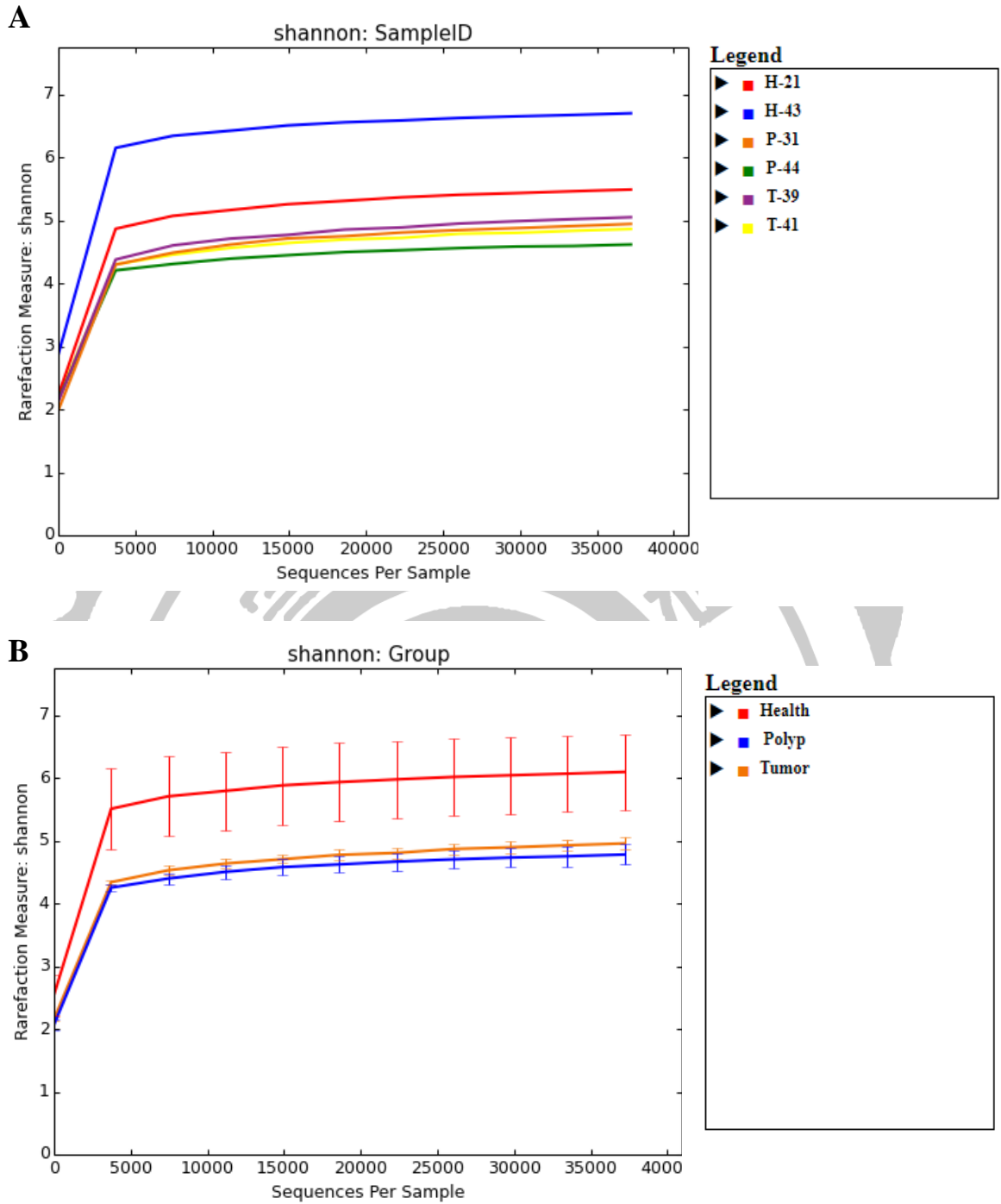


圖 26、菌相分析-Alpha 多樣性分析 shannon 指數。

Fig 26. Metagenomics – Alpha diversity analysis for Shannon index.

A 為六人彼此間差異。B 為組間差異。H: Health; P: Polyp; T: Tumor。

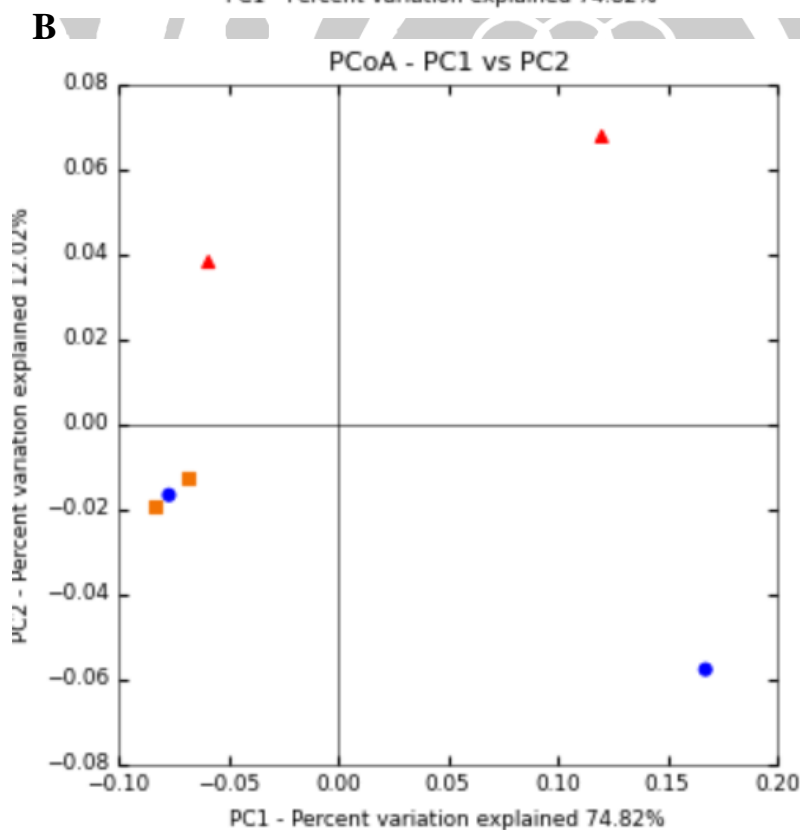
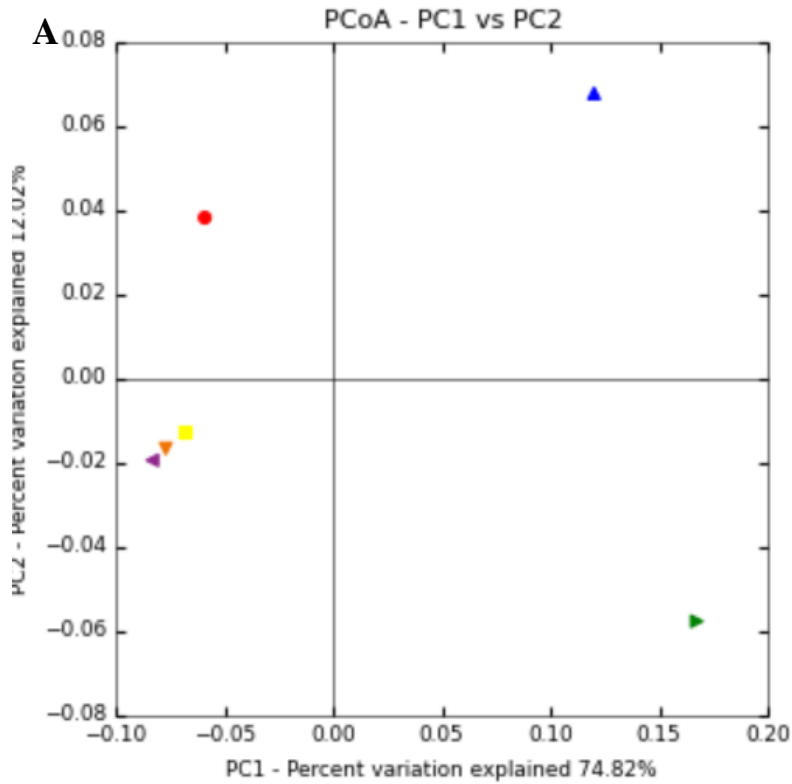


圖 27、菌相分析-Beta 多樣性分析 PCoA 分析。

Fig 27. Metagenomics – Beta diversity analysis for PCoA.

圖 A 為各自檢體，▲ 為 H-43、● 為 H-21、■ 為 T-41、▼ 為 P-31、◄ 為 T-39、► 為 T-39。

圖 B 為分組，▲ 為健康對照組，● 為癌肉組，■ 為腫瘤組。

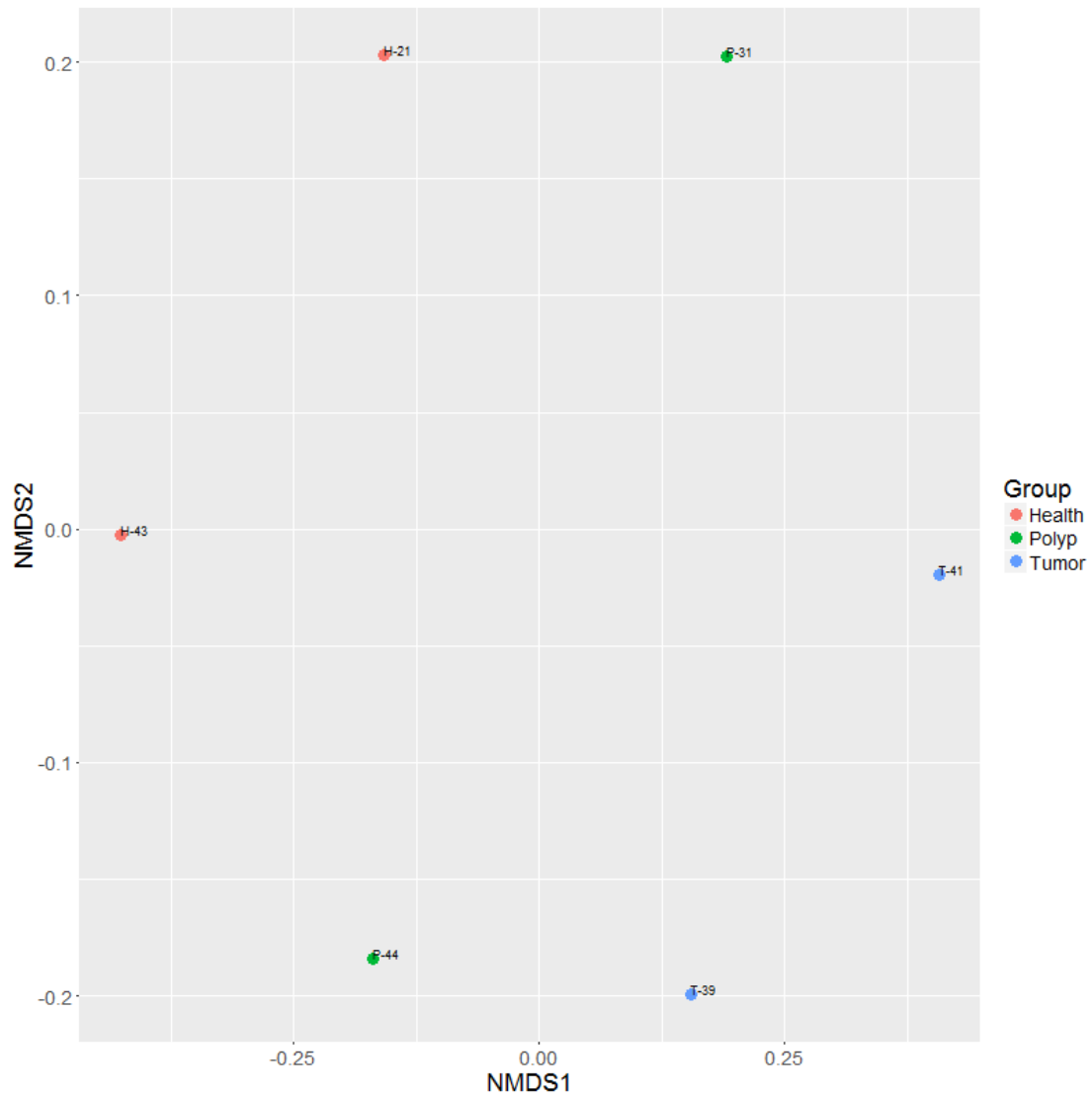


圖 28、菌相分析-Beta 多樣性分析 NMDS 分析。

Fig 28. Metagenomics – Beta diversity analysis for NMDS.

\*stress value = 0.071，一般建議在 0.2 以下，越小越好

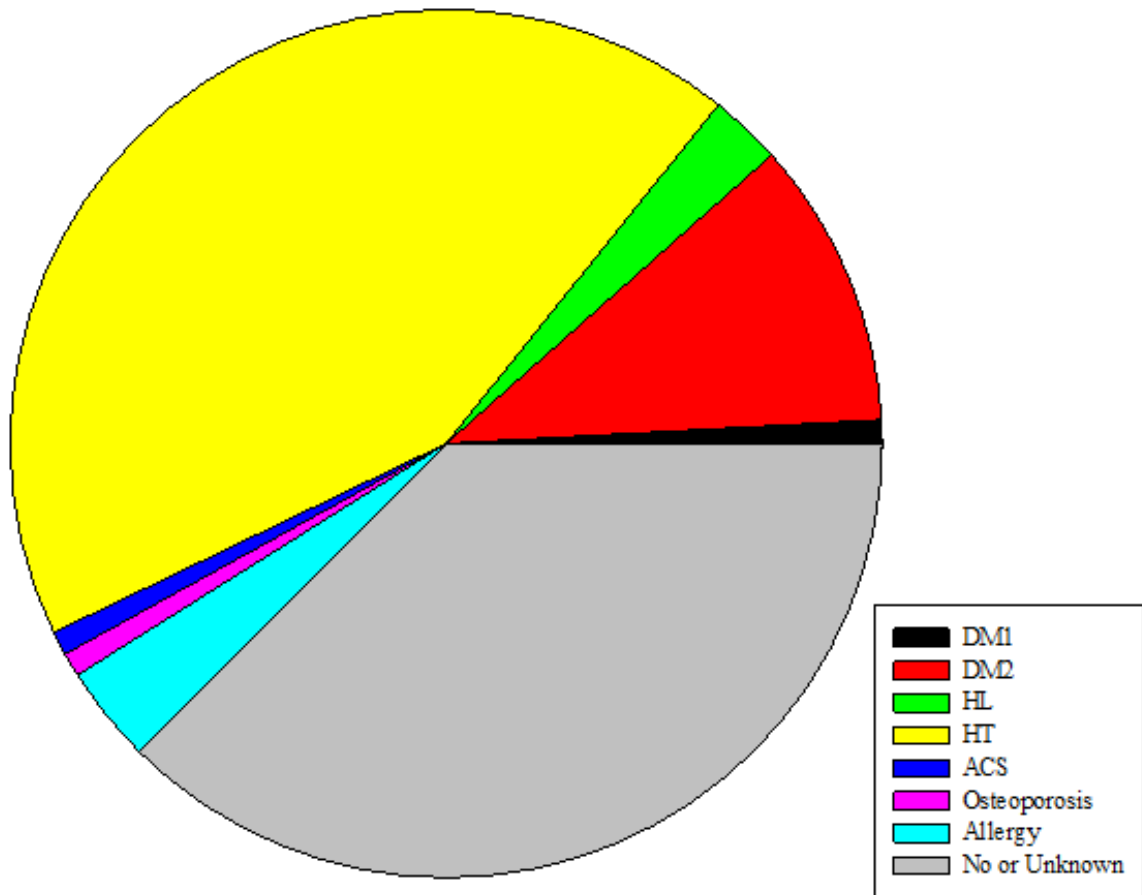


圖 29、問卷調查-患者罹病率。

Fig 29. Questionnaires – The proportion of patients with disease.

圖為 56 份有效問卷中，患者本人之疾病分佈。DM1：第一型糖尿病(0.9%)；DM2：第二型糖尿病(10.7%)；HL：高血脂(2.7%)；HT：高血壓(42.9%)；ACS：冠心病(0.9%)；Osteoporosis：骨質疏鬆(0.9%)；Allergy：過敏(3.6%)。

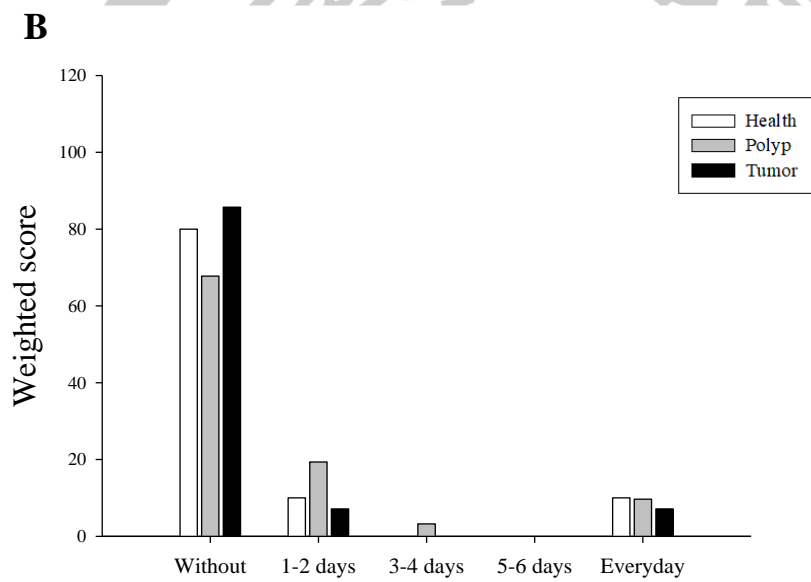
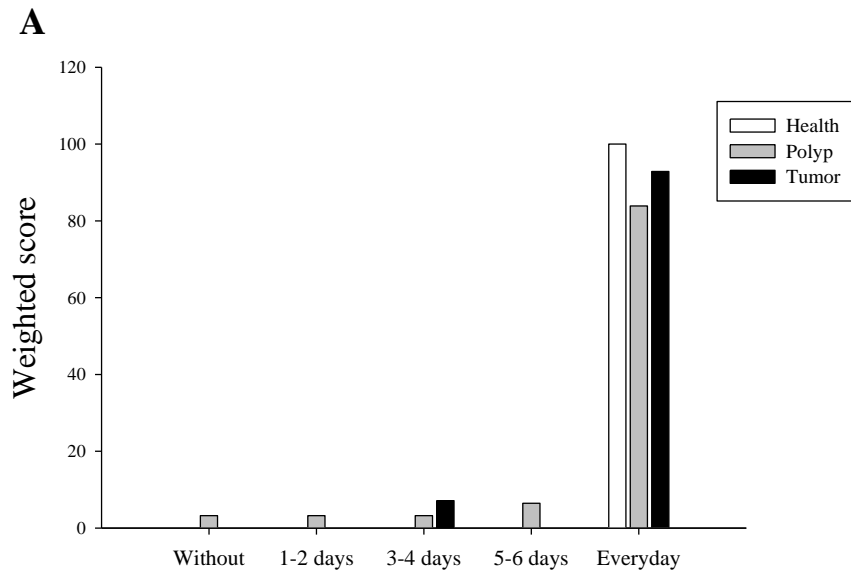


圖 30、問卷調查-飲食習慣。

Fig 30. Questionnaires – Dietary habit.

圖 A 為吃早餐之頻率。圖 B 為吃宵夜之頻率。

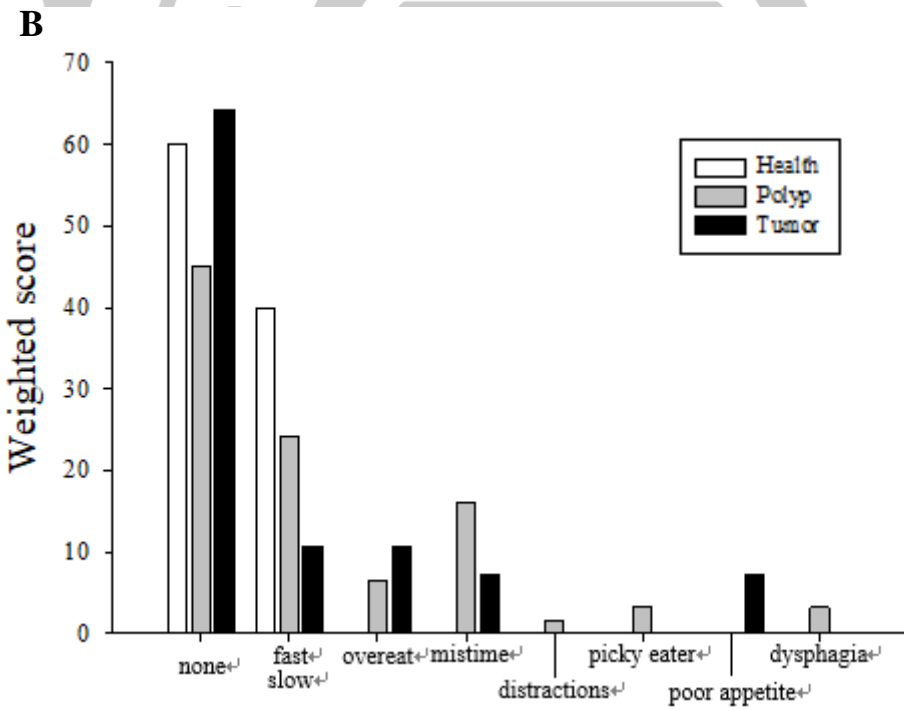
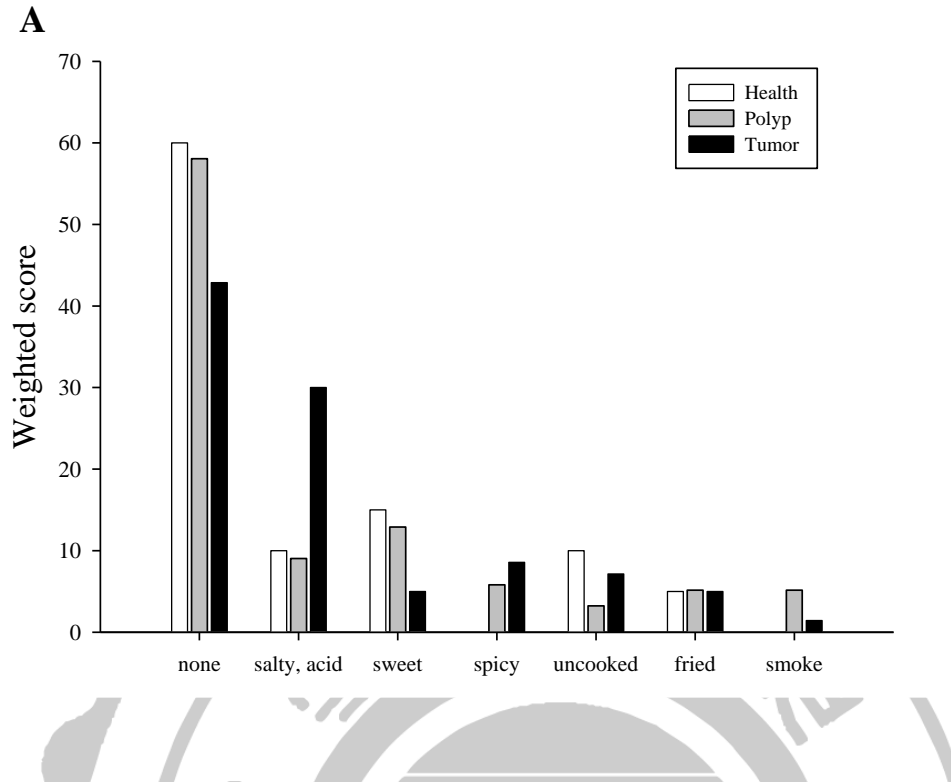


圖 31、問卷調查-飲食偏好、問題。

Fig 31. Questionnaires – Dietary preference and Diet problems.

A 為飲食偏好。B 為飲食問題。



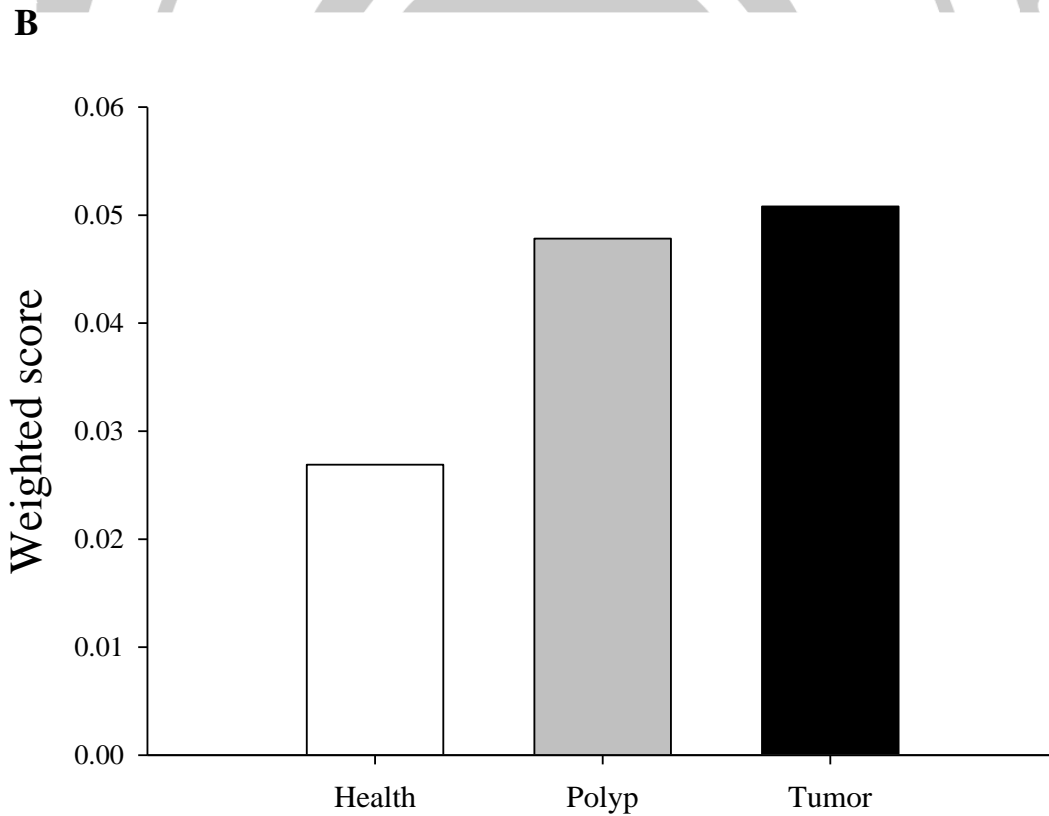
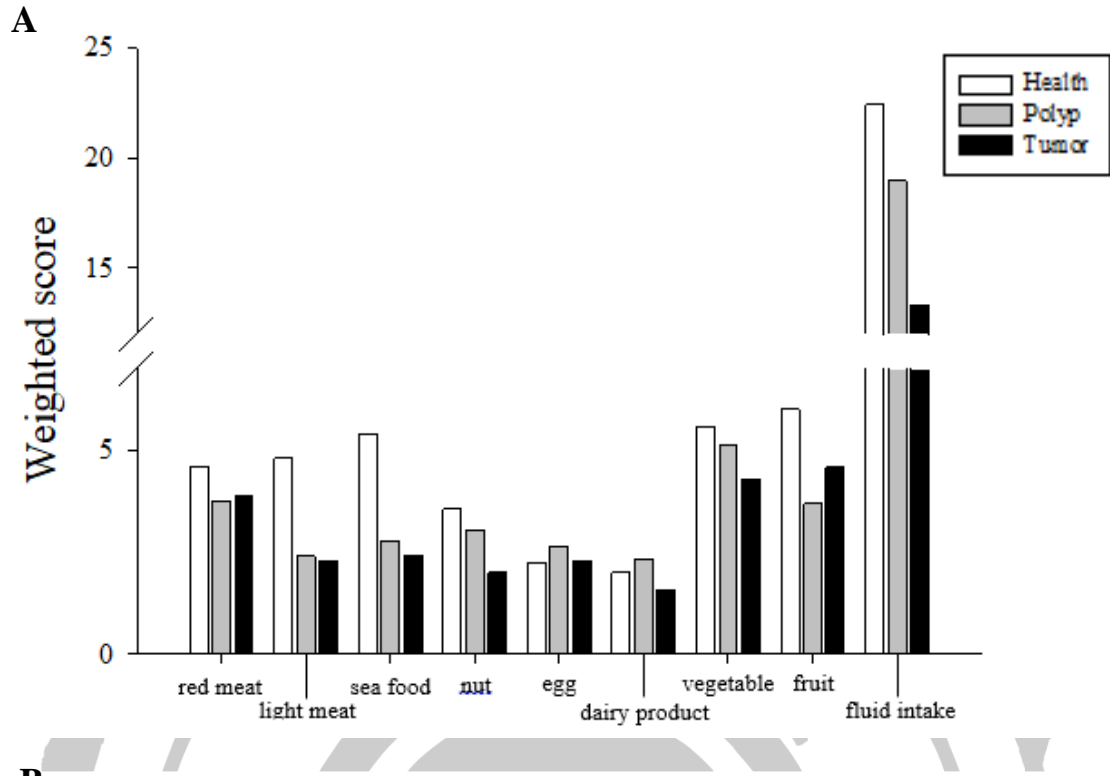


圖 32、問卷調查-飲食選擇。

Fig 32. Questionnaires – Dietary choice.

A 為飲食選擇。B 為紅肉與蔬菜水果之比值，補足圖 A 不足之處。

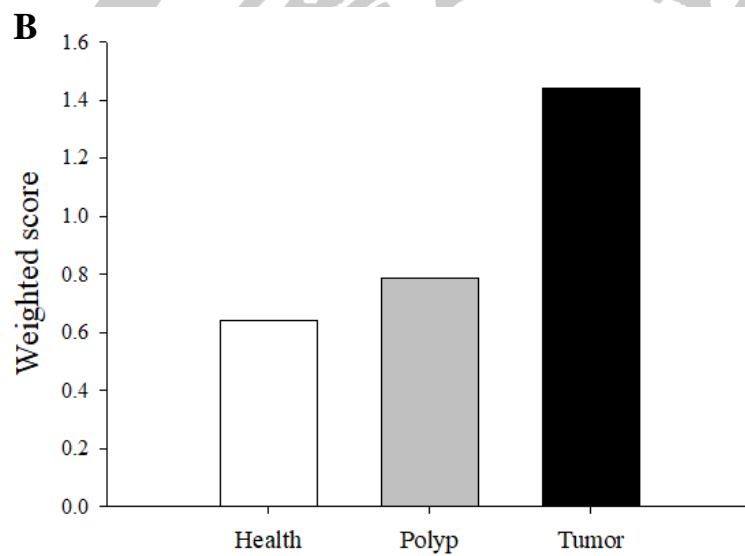
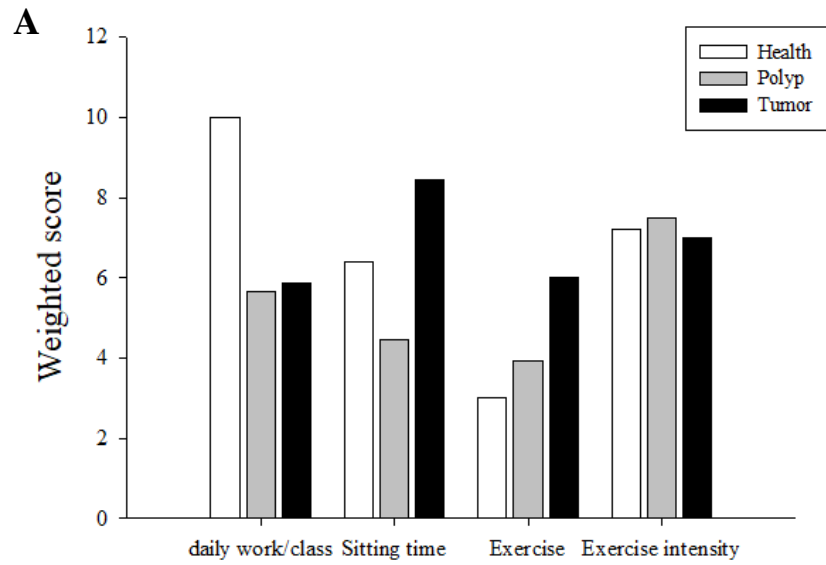


圖 33、問卷調查-運動勞動。

Fig 33. Questionnaires – Exercise & labor.

A 為運動勞動問卷加權結果。B 為將久坐與上班時間作比值處理

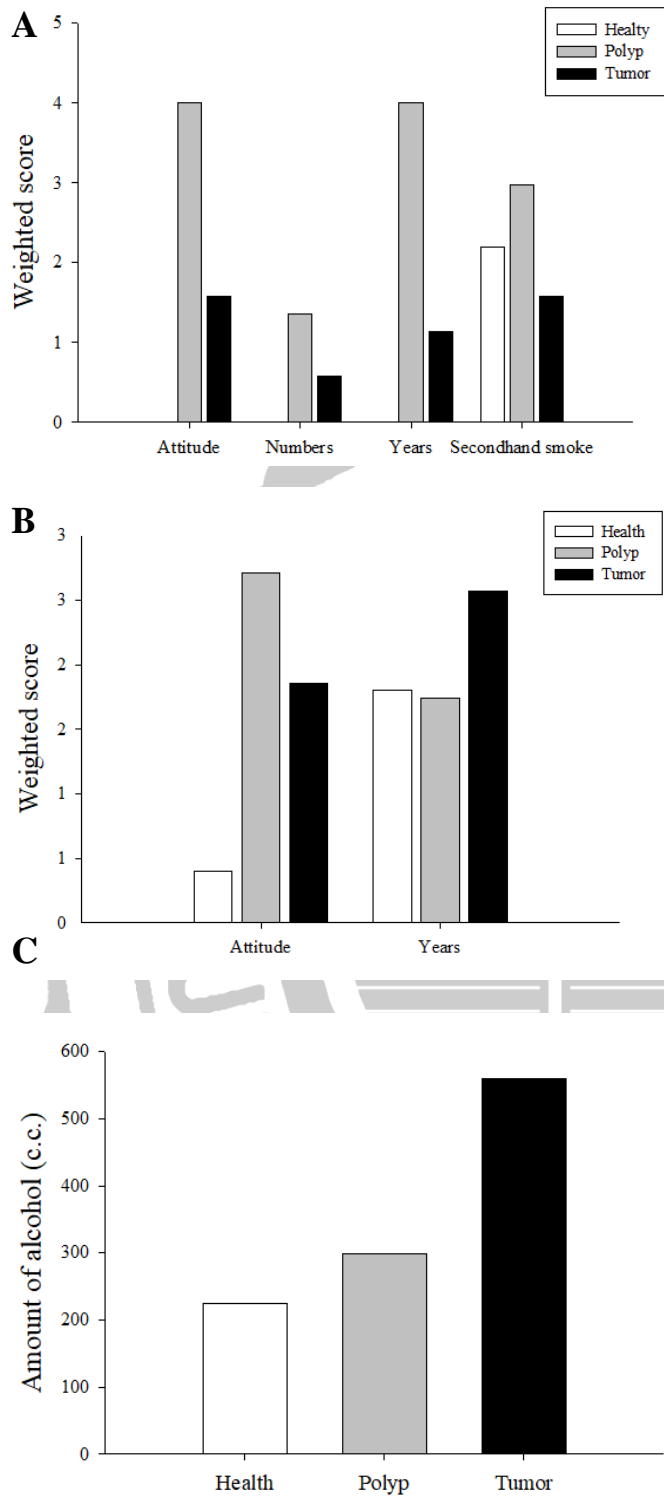


圖 34、問卷調查-抽菸、喝酒情況。

Fig 34. Questionnaires – Smoking and drinking.

A 為抽菸情況，詢問對吸菸的態度、抽菸數量、抽菸年數以及吸到二手菸的頻率。

B 為喝酒情況，詢問對喝酒的態度、喝酒年數。C 為平均喝酒量。

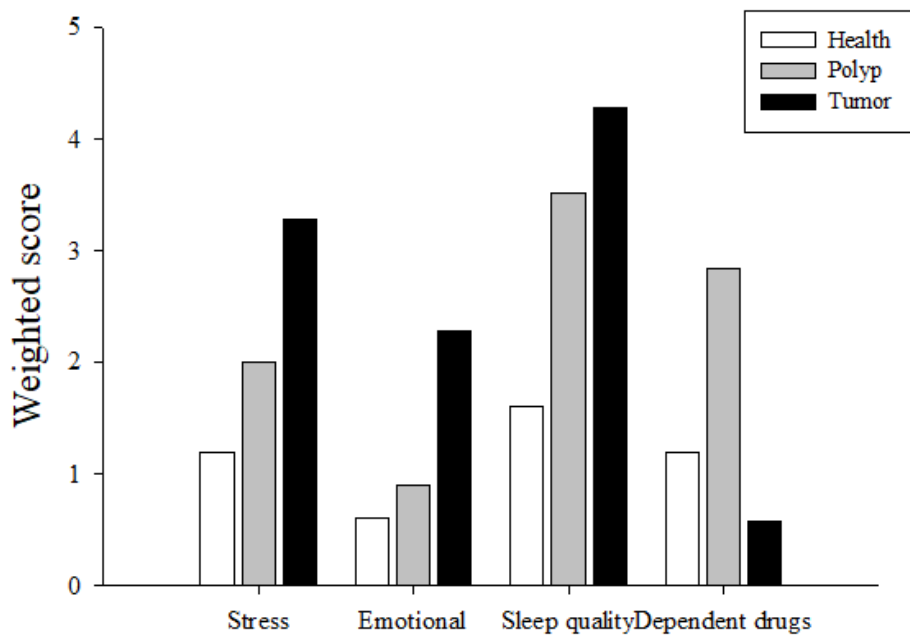


圖 35、問卷調查-精神壓力。

Fig 35. Questionnaires – Stress.

分別詢問自覺壓力情況、情緒對生活影響、壓力情緒是否影響睡眠與是否依賴藥物。

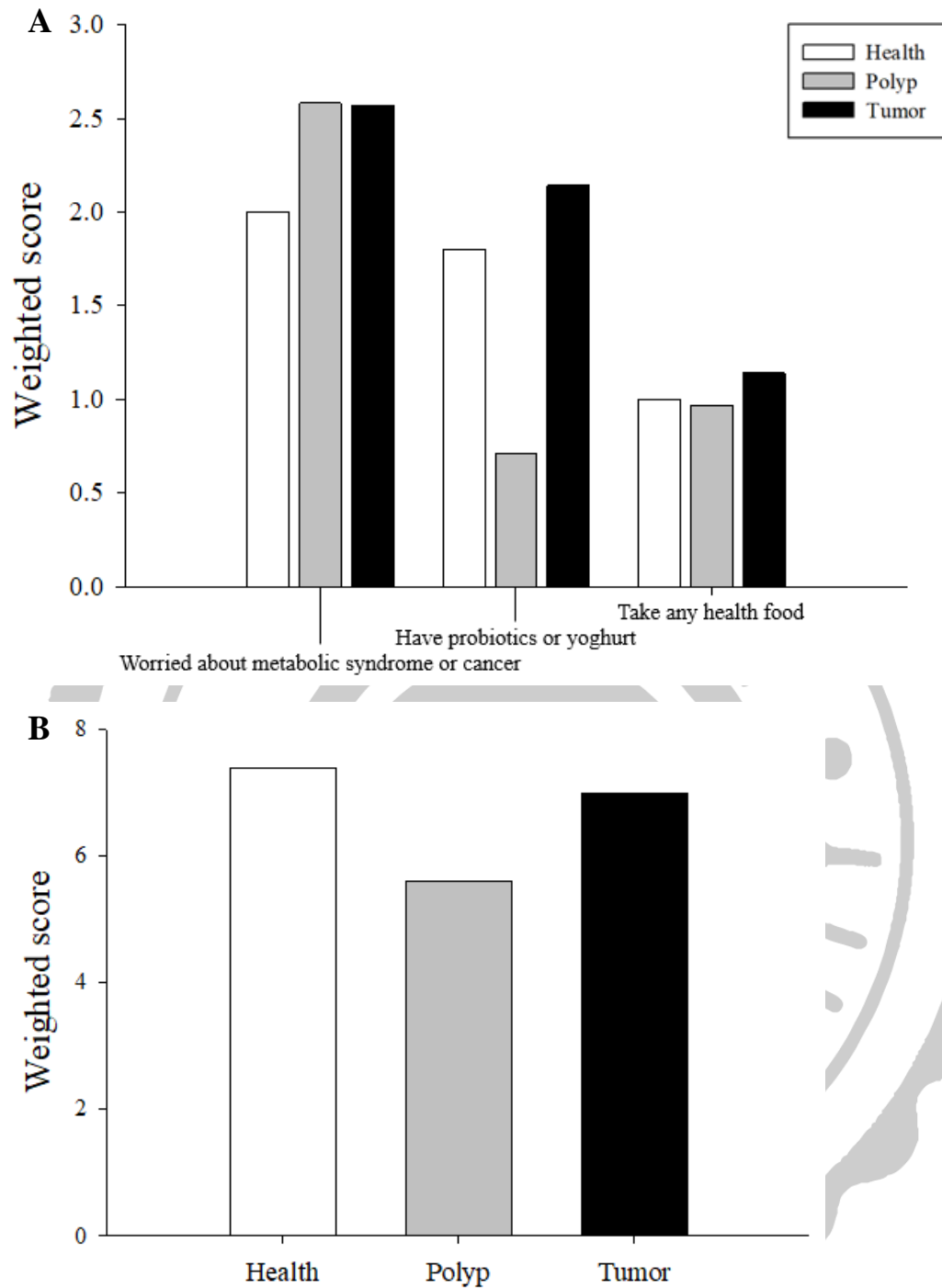


圖 36、問卷調查-健康意識。

Fig 36. Questionnaires – Health awareness.

A 問卷分別詢問是否擔心代謝症候群或癌症、是否食用益生菌或發酵乳與是否服用任何健康食品。B 為詢問是否願意藉飲食降低上述風險。

表 5、CRC 患者、瘻肉患者和健康受試者血液常規檢查的比較。

Table 5. Comparison of CBC in patients with colorectal cancer, patients with polyps and healthy participants.

Items	Health	Polyps	Tumor
WBC ( $10^3/\mu\text{L}$ )	6.2±0.6	6.7±0.3	6.9±0.8
RBC ( $10^6/\mu\text{L}$ )	4.3±0.1	4.7±0.1	4.4±0.1
Hb (g/dL)	13.5±0.2	14.1±0.3	12.8±0.5
Hct (%)	40.0±0.7	42.0±1.0	39.0±1.6
MCV (fL)	93.9±0.8	90.5±1.3	87.8±2.4
MCH (pg)	31.8±0.3	30.3±0.5	28.9±0.9
MCHC (g/dL)	33.9±0.2	33.4±0.2	32.9±0.2
Platelet ( $10^3/\mu\text{L}$ )	239.5±20.4	210±12.2	220.1±18.5

\*WBC 標準  $3.5-9.1 \times 10^3/\mu\text{L}$  ; RBC 標準男性  $4.3-5.7 \times 10^6/\mu\text{L}$  ; 女性  $3.8-4.9 \times 10^6/\mu\text{L}$  ; Hb 標準男性 14.0-17.0 g/dL ; 女性 12.0-15.0 g/dL ; Hct 標準男性 40.0-50.0% ; 女性 35.0-44.0% ; MCV 標準 83.8-98.0 fL ; MCH 標準 28.4-33.8 pg ; MCHC 標準 33.4-35.2 g/dL ; Platelet 標準  $157-377 \times 10^3/\mu\text{L}$  。

表 6、CRC 患者、瘻肉患者和健康受試者肝/腎功能的比較。

Table 6. Comparison of liver and kidney function in patients with colorectal cancer, patients with polyps and healthy participants.

Items	Health	Polyps	Tumor
Liver			
GOT (AST) (U/L)	33.7±7.2	31.1±3.3	22.9±3.0
GPT (ALT) (U/L)	18.8±1.5	24.5±2.8	20.3±3.8
Kidney			
UN (mg/dL)	-	-	14.1±1.7
Creatinine (mg/dL)	0.8±0.1	0.9±0.0	0.9±0.1
eGFR (mL/min)	85.6±7.9	88.3±5.1	78.4±9.0

\*GOT (AST)標準 15-41 U/L ; GPT (ALT)標準 11-40 U/L ; UN 標準 8-20 mg/dL ; Creatinine 標準 0.7-1.2 mg/dL ; eGFR 標準 90-120 mL/min ; -未檢測。

表 7、CRC 患者、瘻肉患者和健康受試者血清脂質的比較

Table 7. Comparison of serum lipid levels in patients with colorectal cancer, patients with polyps and healthy participants.

Items	Health	Polyps	Tumor
TC (mg/dL)	186.6±11.3	191.1±6.9	179.8±16.1
TG (mg/dL)	80.4±14.2	130.4±14.5	103.8±19.2
HDL-C (mg/dL)	55.4±4.4	48.0±1.9	54.0±9.2
LDL-C (mg/dL)	114.1±9.0	119.2±6.5	115±13.2
TC/HDL-C	3.5±0.2	4.2±0.2	3.6±0.3

\*TC 標準<220 mg/dL ; TG 標準<150 mg/dL ; HDL-C 標準>40 mg/dL ; LDL-C 標準<160 mg/dL ; TC/HDL-C 一般建議比例<5 較為理想，若超過為心血管疾病之高危險群。

表 8、CRC 患者、瘻肉患者和健康受試者血糖與凝血相關指數的比較。

Table 8. Comparison of blood sugar, PT, APTT in patients with colorectal cancer, patients with polyps and healthy participants.

Items	Health	Polyps	Tumor
Glucose (AC) (mg/dL)	96.9±4.8	111.5±8.1	-
Glucose (Random) (mg/dL)	-	-	103.5±4.1
PT (sec)	-	-	11.4±0.3
INR (U/mL)	-	-	1.0±0.0
APTT (sec)	-	-	30.1±0.7

\*Glucose (AC)標準 70-100 mg/dL ; Glucose (Random)標準<140 mg/dL ; PT 標準 9.9-12.0 secs ; INR 標準 0.3-0.7 U/mL ; APTT 標準 30.7-40.5 secs ; -未檢測。

表 9、結直腸癌患者 CEA 指數。

Table 9. CEA in patients with colorectal cancer.

No.	SEX	CEA (ng/mL)
2	1	1.4
33	2	2.7
34	2	11.8
37	1	7.4
38	2	0.5
39	1	2.7
41	2	3.5
42	2	2.9
47	1	4.1
48	1	5.1
49	1	2
54	2	2.5
57	2	1.9



## 第六章、結論與未來展望

### 6-1 結論

#### 6-1.1 IHC 染色分析蛋白質表現

主要收案的患者來自臺中中港澄清醫院(中港院區)，在 IHC 染色部分皆為腫瘤部分表現顯著高於非腫瘤部分，以目標 GLUT1/3 部分表現出腫瘤會增加葡萄糖攝取，而 Rab11 會將 GLUTs 轉運至細胞膜上，所以當 GLUTs 增多，Rab11 也同樣會增多，而 CA8 在細胞實驗中被證實與葡萄糖帶入量及糖解作用活性有正比依存關係，故在增加 GLUTs 的表現後，CA8 的表現也會上升。

#### 6-1.2 西方轉漬分析蛋白質表現

同上，主要收案檢體來自臺中中港澄清醫院(中港院區)。西方轉漬分析在癌症末期上述基因表現有上升趨勢，其餘則未能完全呈現上述 IHC 之觀察。主因為檢體均經福馬林固定及石蠟包埋，可能在變性過程中因蛋白構形改變而未能完全於後續抗原修復中復原，影響抗體辨認結合；亦有可能是提供蛋白質之切片組織中參雜著脂肪、間質、纖維及肌肉層，並非完全來自腸道細胞；而 IHC 則是透過直接染色鏡檢，得以避開上述來源干擾。鏡檢中可見腫瘤檢體在切片中仍具纖維或是肌肉層，IHC 能以肉眼區分並僅計算腫瘤區域的染色，而在西方轉漬則因將組織打碎後取得總蛋白進行分析，使腸道細胞之差異被非腸道細胞稀釋，難以呈現顯著差異。

#### 6-1.3 微生物菌相分析

腸道菌群分析對象為彰化基督教醫院收案者之糞便。三組初步先各挑選 2 人委外檢測分析。代表性益生菌雙歧桿菌屬(*Bifidobacterium spp.*)在本次六個檢體中，僅發現於健康人體內。以 Alpha diversity 分析發現，健康人體內的菌相是較多樣性的，而患者體內的菌相皆相對單一。比較特別的是，健康個體和瘻肉患者在皆具有第二型糖尿病的情況下，其體內菌相較為相似。

#### 6-1.4 問卷分析

問卷調查主要收案的患者來自彰化基督教醫院，將收案分為：健康對照、瘻肉與腫瘤三組，一年(2017.07~2018.06)以來以患有瘻肉居多。分別就罹病家族史、飲食選擇、飲食習慣、運動勞動、吸菸情況、飲酒情況、壓力情緒與健康意識等

面向，了解其健康狀況。目前數據看出，罹病家族史與飲食習慣未見明確差異，而在飲食選擇上，CRC 患者動物性食品攝取較多，而水分及纖維攝取則較少。在運動勞動方面，CRC 患者有久坐的情形發生。CRC 患者相對於健康對照較常接觸菸酒，壓力重且容易影響生活。健康對照者相對於 CRC 患者，其飲食選擇較均勻，少接觸菸酒，雖壓力較重，但不影響生活。將繼續蒐集參與者之調查問卷，增加可信度。

### 6-1.5 血清生化數值分析

疾病組在週邊血液白血球數目(WBC)、GPT (ALT)、三酸甘油酯(TG)與血糖顯著高於健康對照組，而與代謝症候群危險因子做連結可以發現，疾病組具有代謝症候群的機率較健康對照組高。

### 6-2 未來展望

初步確認腫瘤部分之 GLUT1/3、CA8 及 Rab11 表現皆顯著高於非腫瘤部分，糞便微生物菌相可見大腸癌、息肉患者與非病者能有分群區分，健康問卷在飲食選擇及生活習慣上發現患者與非患者具有明顯差異。由於臨床收案會因個體差異造成很大的誤差，未來可進一步擴大收案人數，增加問卷調查的可信度，而增加腸道菌相送檢數預期將更能呈現患者與健康對照間各指標菌屬分佈之差異。

## 第七章、參考文獻

- Ahmed, R. L., Schmitz, K. H., Anderson, K. E., Rosamond, W. D., & Folsom, A. R. (2006). The metabolic syndrome and risk of incident colorectal cancer. *Cancer*, *107*(1), 28-36.
- Airley, R. E., & Mobasher, A. (2007). Hypoxic regulation of glucose transport, anaerobic metabolism and angiogenesis in cancer: novel pathways and targets for anticancer therapeutics. *Chemotherapy*, *53*(4), 233-256.
- Akisawa, Y., Nishimori, I., Taniuchi, K., Okamoto, N., Takeuchi, T., Sonobe, H., . . . Onishi, S. (2003). Expression of carbonic anhydrase-related protein CA-RP VIII in non-small cell lung cancer. *Virchows Archiv*, *442*(1), 66-70.
- Amin, M. B., Greene, F. L., Edge, S. B., Compton, C. C., Gershenwald, J. E., Brookland, R. K., . . . Winchester, D. P. (2017). The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA: a cancer journal for clinicians*, *67*(2), 93-99.
- Archer, S., Meng, S., Wu, J., Johnson, J., Tang, R., & Hodin, R. (1998). Butyrate inhibits colon carcinoma cell growth through two distinct pathways. *Surgery*, *124*(2), 248-253.
- Ayala, F. R. R., Rocha, R. M., Carvalho, K. C., Carvalho, A. L., Da Cunha, I. W., Lourenço, S. V., & Soares, F. A. (2010). GLUT1 and GLUT3 as potential prognostic markers for oral squamous cell carcinoma. *Molecules*, *15*(4), 2374-2387.
- Baena, R., & Salinas, P. (2015). Diet and colorectal cancer. *Maturitas*, *80*(3), 258-264.
- Bak, J. H., Lee, S. M., & Lim, H. B. (2015). Safety assessment of mainstream smoke of herbal cigarette. *Toxicological research*, *31*(1), 41.
- Bardou, M., Barkun, A. N., & Martel, M. (2013). Obesity and colorectal cancer. *Gut*, *62*(6), 933-947.
- Bianchini, F., Kaaks, R., & Vainio, H. (2002). Overweight, obesity, and cancer risk. *The lancet oncology*, *3*(9), 565-574.
- Biasucci, G., Benenati, B., Morelli, L., Bessi, E., & Boehm, G. (2008). Cesarean delivery may affect the early biodiversity of intestinal bacteria. *The Journal of nutrition*, *138*(9), 1796S-1800S.
- Binder, C., Binder, L., Marx, D., Schauer, A., & Hiddemann, W. (1997). Deregulated simultaneous expression of multiple glucose transporter isoforms in malignant cells and tissues. *Anticancer research*, *17*(6D), 4299-4304.
- Boado, R. J., Black, K. L., & Pardridge, W. M. (1994). Gene expression of GLUT3 and GLUT1 glucose transporters in human brain tumors. *Molecular brain*

research, 27(1), 51-57.

- Boleij, A., & Tjalsma, H. (2012). Gut bacteria in health and disease: a survey on the interface between intestinal microbiology and colorectal cancer. *Biological Reviews*, 87(3), 701-730.
- Calle, E. E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K., & Thun, M. J. (2003). Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of US adults. *New England Journal of Medicine*, 348(17), 1625-1638.
- Carvalho, K. C., Cunha, I. W., Rocha, R. M., Ayala, F. R., Cajaíba, M. M., Begnami, M. D., . . . Soares, F. A. (2011). GLUT1 expression in malignant tumors and its use as an immunodiagnostic marker. *Clinics*, 66(6), 965-972.
- Cheng, L., & Lai, M.-D. (2003). Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. *World journal of gastroenterology: WJG*, 9(12), 2642.
- Cho, E., Lee, J. E., Rimm, E. B., Fuchs, C. S., & Giovannucci, E. L. (2012). Alcohol consumption and the risk of colon cancer by family history of colorectal cancer-. *The American journal of clinical nutrition*, 95(2), 413-419.
- Chu, K. M., H Cho, C., & Y Shin, V. (2013). Nicotine and gastrointestinal disorders: its role in ulceration and cancer development. *Current pharmaceutical design*, 19(1), 5-10.
- Chung, Y. C., Wei, W. C., Hung, C. N., Kuo, J. F., Hsu, C. P., Chang, K. J., & Chao, W. T. (2016). Rab11 collaborates E-cadherin to promote collective cell migration and indicates a poor prognosis in colorectal carcinoma. *European journal of clinical investigation*, 46(12), 1002-1011.
- Collins, D., Hogan, A. M., & Winter, D. C. (2011). Microbial and viral pathogens in colorectal cancer. *The lancet oncology*, 12(5), 504-512.
- Cunningham, D., Atkin, W., Lenz, H. J., Lynch, H. T., Minsky, B., Nordlinger, B., & Starling, N. (2010). Colorectal cancer. *Colorectal cancer: lancet*, 375, 1030-1047.
- Davis, D. M., Marcet, J. E., Frattini, J. C., Prather, A. D., Mateka, J. J., & Nfonso, V. N. (2011). Is it time to lower the recommended screening age for colorectal cancer? *Journal of the American College of Surgeons*, 213(3), 352-361.
- Duncan, S. H., Hold, G. L., Harmsen, H. J., Stewart, C. S., & Flint, H. J. (2002). Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(6), 2141-2146.
- Eckel, R. H., Grundy, S. M., & Zimmet, P. Z. (2005). The metabolic syndrome. *The lancet*, 365(9468), 1415-1428.
- Elwing, J. E., Gao, F., Davidson, N. O., & Early, D. S. (2006). Type 2 diabetes mellitus: the impact on colorectal adenoma risk in women. *Am J*

*Gastroenterol*, 101(8), 1866.

- Fakih, M. G., & Padmanabhan, A. (2006). CEA monitoring in colorectal cancer. *ONCOLOGY-WILLISTON PARK THEN HUNTINGTON THE MELVILLE NEW YORK-*, 20(6), 579.
- Friedenreich, C. M. (2001). Physical activity and cancer prevention: from observational to intervention research. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 10(4), 287-301.
- Gambhir, S. S. (2002). Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nature Reviews Cancer*, 2(9), 683.
- Gerhardsson, M., Norell, S. E., Kiviranta, H., Pedersen, N. L., & Ahlbom, A. (1986). Sedentary jobs and colon cancer. *American Journal of Epidemiology*, 123(5), 775-780.
- Giovannucci, E. (2007). Metabolic syndrome, hyperinsulinemia, and colon cancer: a review-. *The American journal of clinical nutrition*, 86(3), 836S-842S.
- Giovannucci, E., Ascherio, A., Rimm, E. B., Colditz, G. A., Stampfer, M. J., & Willett, W. C. (1995). Physical activity, obesity, and risk for colon cancer and adenoma in men. *Annals of internal medicine*, 122(5), 327-334.
- Giovannucci, E., Harlan, D. M., Archer, M. C., Bergenstal, R. M., Gapstur, S. M., Habel, L. A., . . . Yee, D. (2010). Diabetes and cancer: a consensus report. *CA: a cancer journal for clinicians*, 60(4), 207-221.
- Giovannucci, E., Rimm, E. B., Ascherio, A., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., & Willett, W. C. (1995). Alcohol, low-methionine-low-folate diets, and risk of colon cancer in men. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 87(4), 265-273.
- Giovannucci, E., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Ascherio, A., & Willett, W. C. (1994). Intake of fat, meat, and fiber in relation to risk of colon cancer in men. *Cancer research*, 54(9), 2390-2397.
- Glick, R. P., Unterman, T. G., & Lacson, R. (1993). Identification of insulin-like growth factor (IGF) and glucose transporter-1 and-3 mRNA in CNS tumors. *Regulatory peptides*, 48(1-2), 251-256.
- Gupta, A. K., & Schoen, R. E. (2009). Aberrant crypt foci: are they intermediate endpoints of colon carcinogenesis in humans? *Current opinion in gastroenterology*, 25(1), 59-65.
- Haber, R. S., Rathan, A., Weiser, K. R., Pritsker, A., Itzkowitz, S. H., Bodian, C., . . . Burstein, D. E. (1998). Glut1 glucose transporter expression in colorectal carcinoma. *Cancer*, 83(1), 34-40.
- Hagland, H. R., & Sørdeide, K. (2015). Cellular metabolism in colorectal carcinogenesis: Influence of lifestyle, gut microbiome and metabolic pathways. *Cancer Lett*, 356(2), 273-280.

- Han, T. S., & Lean, M. E. (2016). A clinical perspective of obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *JRSM cardiovascular disease*, 5, 2048004016633371.
- Harrison, L. (1997). Preoperative carcinoembryonic antigen predicts outcome in node negative colon cancer patients: a multivariate analysis of 572 patients. *J Am Coll Surg*, 42, 921-929.
- Hoshiyama, Y., Sekine, T., & Sasaba, T. (1993). A case-control study of colorectal cancer and its relation to diet, cigarettes, and alcohol consumption in Saitama Prefecture, Japan. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 171(2), 153-165.
- Ishihara, T., Takeuchi, T., Nishimori, I., Adachi, Y., Minakuchi, T., Fujita, J., . . . Onishi, S. (2006). Carbonic anhydrase-related protein VIII increases invasiveness of non-small cell lung adenocarcinoma. *Virchows Archiv*, 448(6), 830-837.
- Ito, T., Noguchi, Y., Satoh, S., Hayashi, H., Inayama, Y., & Kitamura, H. (1998). Expression of facilitative glucose transporter isoforms in lung carcinomas: its relation to histologic type, differentiation grade, and tumor stage. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 11(5), 437-443.
- Järvinen, R., Knekt, P., Hakulinen, T., Rissanen, H., & Heliövaara, M. (2001). Dietary fat, cholesterol and colorectal cancer in a prospective study. *British journal of cancer*, 85(3), 357.
- Jiao, Y., Yan, J., Zhao, Y., Donahue, L. R., Beamer, W. G., Li, X., . . . Gu, W. (2005). Carbonic anhydrase-related protein VIII deficiency is associated with a distinctive lifelong gait disorder in waddles mice. *Genetics*, 171(3), 1239-1246.
- Kawashima, Y., Kodera, Y., Singh, A., Matsumoto, M., & Matsumoto, H. (2014). Efficient extraction of proteins from formalin-fixed paraffin-embedded tissues requires higher concentration of tris (hydroxymethyl) aminomethane. *Clinical proteomics*, 11(1), 4.
- Kikuchi, N., Nishiyama, T., Sawada, T., Wang, C., Lin, Y., Watanabe, Y., . . . Kikuchi, S. (2017). Perceived Stress and Colorectal Cancer Incidence: The Japan Collaborative Cohort Study. *Scientific reports*, 7, 40363.
- Kurata, T., Oguri, T., Isobe, T., Ishioka, S. i., & Yamakido, M. (1999). Differential expression of facilitative glucose transporter (GLUT) genes in primary lung cancers and their liver metastases. *Cancer Science*, 90(11), 1238-1243.
- Kylin, E. (1923). Studien ueber das Hypertonie-Hyperglyka" mie-Hyperurika" miesyndrom. *Zentralblatt für innere Medizin*, 44, 105-127.
- Larance, M., Ramm, G., Stöckli, J., van Dam, E. M., Winata, S., Wasinger, V., . . .

- Guilhaus, M. (2005). Characterization of the role of the Rab GTPase-activating protein AS160 in insulin-regulated GLUT4 trafficking. *Journal of Biological Chemistry*, 280(45), 37803-37813.
- Larsson, S. C., & Wolk, A. (2007). Obesity and colon and rectal cancer risk: a meta-analysis of prospective studies-. *The American journal of clinical nutrition*, 86(3), 556-565.
- Lehtonen, J., Shen, B., Vihinen, M., Casini, A., Scozzafava, A., Supuran, C. T., . . . Waheed, A. (2004). Characterization of CA XIII, a novel member of the carbonic anhydrase isozyme family. *Journal of Biological Chemistry*, 279(4), 2719-2727.
- Lim, Y. S., Chua, C. E. L., & Tang, B. L. (2011). Rabs and other small GTPases in ciliary transport. *Biology of the Cell*, 103(5), 209-221.
- Lin, C.-Y., Lee, C.-H., Huang, C.-C., Lee, S.-T., Guo, H.-R., & Su, S.-B. (2015). Impact of high glucose on metastasis of colon cancer cells. *World journal of gastroenterology: WJG*, 21(7), 2047.
- Liu, K., Moss, D., Persky, V., Stamler, J., Garside, D., & Soltero, I. (1979). Dietary cholesterol, fat, and fibre, and colon-cancer mortality: An analysis of international data. *The lancet*, 314(8146), 782-785.
- Liu, S., & Storrie, B. (2012). Are Rab proteins the link between Golgi organization and membrane trafficking? *Cellular and molecular life sciences*, 69(24), 4093-4106.
- Marmot, M., Atinmo, T., Byers, T., Chen, J., Hirohata, T., Jackson, A., . . . Leitzmann, C. (2007). Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective.
- McClory, H., Williams, D., Sapp, E., Gatune, L. W., Wang, P., DiFiglia, M., & Li, X. (2014). Glucose transporter 3 is a rab11-dependent trafficking cargo and its transport to the cell surface is reduced in neurons of CAG140 Huntington's disease mice. *Acta neuropathologica communications*, 2(1), 179.
- McKeown-Eyssen, G. E., & Bright-See, E. (1985). Dietary factors in colon cancer: international relationships.
- Medina, R. A., & Owen, G. I. (2002). Glucose transporters: expression, regulation and cancer. *Biological research*, 35(1), 9-26.
- Miyaji, E., Nishimori, I., Taniuchi, K., Takeuchi, T., Ohtsuki, Y., & Onishi, S. (2003). Overexpression of carbonic anhydrase-related protein VIII in human colorectal cancer. *The Journal of pathology*, 201(1), 37-45.
- Mizuno-Yamasaki, E., Rivera-Molina, F., & Novick, P. (2012). GTPase networks in membrane traffic. *Annual review of biochemistry*, 81, 637-659.
- Moghaddam, A. A., Woodward, M., & Huxley, R. (2007). Obesity and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of 31 studies with 70,000 events. *Cancer*

- Nielsen, E., Severin, F., Backer, J. M., Hyman, A. A., & Zerial, M. (1999). Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nature cell biology*, 1(6), 376.
- Nilsen, T. L., & Vatten, L. (2001). Prospective study of colorectal cancer risk and physical activity, diabetes, blood glucose and BMI: exploring the hyperinsulinaemia hypothesis. *British journal of cancer*, 84(3), 417.
- Nishikata, M., Nishimori, I., Taniuchi, K., Takeuchi, T., Minakuchi, T., Kohsaki, T., . . . Onishi, S. (2007). Carbonic anhydrase-related protein VIII promotes colon cancer cell growth. *Molecular carcinogenesis*, 46(3), 208-214.
- Noguchi, Y., Marat, D., Saito, A., Yoshikawa, T., Doi, C., Fukuzawa, K., . . . Ito, T. (1999). Expression of facilitative glucose transporters in gastric tumors. *Hepato-gastroenterology*, 46(28), 2683-2689.
- O'Connell, J. B., Maggard, M. A., Liu, J. H., & Etzioni, D. A. (2003). Rates of colon and rectal cancers are increasing in young adults. *The American surgeon*, 69(10), 866.
- Penders, J., Thijs, C., Vink, C., Stelma, F. F., Snijders, B., Kummeling, I., . . . Stobberingh, E. E. (2006). Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*, 118(2), 511-521.
- Peters, R. K., Pike, M. C., Garabrant, D., & Mack, T. M. (1992). Diet and colon cancer in Los Angeles county, California. *Cancer Causes & Control*, 3(5), 457-473.
- Rahner, N., Steinke, V., Schlegelberger, B., Olschwang, S., Eisinger, F., & Hutter, P. (2010). Clinical utility gene card for: Lynch syndrome (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2). *European Journal of Human Genetics*, 18(9).
- Recio-Boiles, A., & Babiker, H. (2018). Cancer, Rectal (Rectum).
- Shen, Y. M., Arbman, G., Olsson, B., & Sun, X. F. (2011). Overexpression of GLUT1 in colorectal cancer is independently associated with poor prognosis. *The International journal of biological markers*, 26(3), 166-172.
- Shi, S. R., Liu, C., Balgley, B. M., Lee, C., & Taylor, C. R. (2006). Protein extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections: quality evaluation by mass spectrometry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 54(6), 739-743.
- Slattery, M. (2000). *Diet, lifestyle, and colon cancer*: Paper presented at the Seminars in gastrointestinal disease.
- Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10(8), 513.
- Sun, Z. J., Huang, Y. H., Wu, J. S., Yang, Y. C., Chang, Y. F., Lu, F. H., & Chang, C. J.



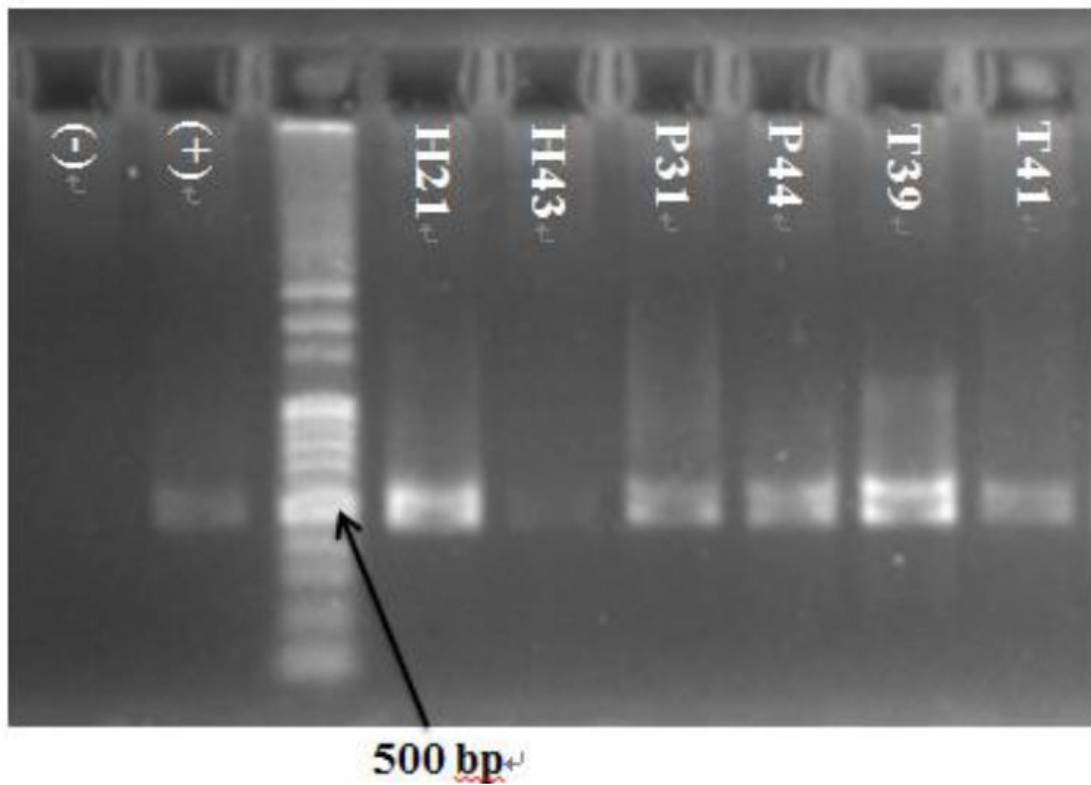
- (2011). The association of serum lipids with the histological pattern of rectosigmoid adenoma in Taiwanese adults. *BMC gastroenterology*, 11(1), 54.
- Szablewski, L. (2013). Expression of glucose transporters in cancers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1835(2), 164-169.
- Takahashi, S., Takei, T., Koga, H., Takatsu, H., Shin, H. W., & Nakayama, K. (2011). Distinct roles of Rab11 and Arf6 in the regulation of Rab11-FIP3/Arfophilin-1 localization in mitotic cells. *Genes to Cells*, 16(9), 938-950.
- Tang, B. L., & Ng, E. L. (2009). Rabs and cancer cell motility. *Cytoskeleton*, 66(7), 365-370.
- Thaiss, C. A., Zmora, N., Levy, M., & Elinav, E. (2016). The microbiome and innate immunity. *nature*, 535(7610), 65.
- Tjalsma, H., Boleij, A., Marchesi, J. R., & Dutilh, B. E. (2012). A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nature Reviews Microbiology*, 10(8), 575.
- Trevisan, M., Liu, J., Muti, P., Misciagna, G., Menotti, A., & Fucci, F. (2001). Markers of insulin resistance and colorectal cancer mortality. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 10(9), 937-941.
- Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., . . . Affourtit, J. P. (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *nature*, 457(7228), 480.
- Vague, J. (1947). Côte lombaire simulant un calcul du col de la vésicule. *Archives des maladies de l'appareil digestif et des maladies de la nutrition*, 36(5-6), 299.
- Wang, T. K., Lin, Y. M., Lo, C. M., Tang, C. H., Teng, C. L. J., Chao, W. T., . . . Hsieh, M. (2016). Oncogenic roles of carbonic anhydrase 8 in human osteosarcoma cells. *Tumor Biology*, 37(6), 7989-8005.
- Wang, Y. Y., Lin, S. Y., Lai, W. A., Liu, P. H., & Sheu, W. H. H. (2005). Association between adenomas of rectosigmoid colon and metabolic syndrome features in a Chinese population. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 20(9), 1410-1415.
- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*, 123(3191), 309-314.
- Xu, C. L., Wang, J. Z., Xia, X. P., Pan, C. W., Shao, X. X., Xia, S. L., . . . Zheng, B. (2016). Rab11-FIP2 promotes colorectal cancer migration and invasion by regulating PI3K/AKT/MMP7 signaling pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, 470(2), 397-404.
- Yamada, K., Araki, S., Tamura, M., Sakai, I., Takahashi, Y., Kashihara, H., & Kono, S. (1998). Relation of serum total cholesterol, serum triglycerides and fasting plasma glucose to colorectal carcinoma in situ. *International journal of epidemiology*, 27(5), 794-798.

- Yamamoto, T., Seino, Y., Fukumoto, H., Koh, G., Yano, H., Inagaki, N., . . . Imura, H. (1990). Over-expression of facilitative glucose transporter genes in human cancer. *Biochemical and biophysical research communications*, 170(1), 223-230.
- Yeh, C. S., Wang, J. Y., Chung, F. Y., Lee, S. C., Huang, M. Y., Kuo, C. W., . . . Lin, S. R. (2008). Significance of the glycolytic pathway and glycolysis related-genes in tumorigenesis of human colorectal cancers. *Oncology reports*, 19(1), 81-91.
- Younes, M., Lechago, L., Somoano, J., Mosharaf, M., & Lechago, J. (1997). Immunohistochemical detection of Glut3 in human tumors and normal tissues. *Anticancer research*, 17(4A), 2747-2750.
- Zhuang, G. Z., Keeler, B., Grant, J., Bianchi, L., Fu, E. S., Zhang, Y. P., . . . Li, Q. (2015). Carbonic anhydrase-8 regulates inflammatory pain by inhibiting the ITPR1-cytosolic free calcium pathway. *PLoS One*, 10(3), e0118273.
- zur Hausen, H. (2009). The search for infectious causes of human cancers: where and why. *Virology*, 392(1), 1-10.
- 紀黨皓. (2014). 碳酸酐酶蛋白八對於骨肉瘤細胞癌形成的作用.
- 蔡英傑. (2006). 健康人生始於腸道保健. *科學月刊*, 卷(37), 2.
- 國家衛生研究院-臺灣癌症臨床研究合作組織-大腸直腸癌診斷與治療之共識. 1998.10
- 衛生福利部國民健康署-健康監測與統計-台灣地區癌症登記年報. 2017.
- 衛生福利部國民健康署-健康主題-慢性病防治-代謝症候群. 2018.
- American Cancer Society: Cancer Staging. 2015.  
<https://www.cancer.org/treatment/understanding-your-diagnosis/staging.html>
- American Cancer Society: Colorectal Cancer Screening Tests. 2017.  
<https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/screening-tests-used.html>
- American Cancer Society: Colorectal Cancer Stages. 2018.  
<https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/staged.html>
- American Cancer Society: Tests to Diagnose Colorectal Cancer. 2018.  
<https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/how-diagnosed.html>
- American Joint Committee on Cancer, AJCC 第八版
- UMN Comprehensive Cancer Center. Blood Tests. 2016.  
<http://cancer.unm.edu/cancer/cancer-info/types-of-cancer/prostate-cancer/testing-overview-prostate/diagnostics-monitoring-tests-prostate/blood-tests-prostate/>

## 第八章、附錄

附錄 1、PCR 引子序列及條件。

PCR condition			
Initiation	95°C	3 min	
Denaturation	98°C	20 sec	
Annealing	57.5°C	20 sec	25 cycles
Extension	72°C	20 sec	
Final extension	72°C	3 min	
16s rRNA V3-V4 region	341F 805R	CCTACGGGNGGCWGCAG GACTACHVGGGTATCTAATCC	465 bp



附錄 2、菌相分析-六名患者之臨床資料。

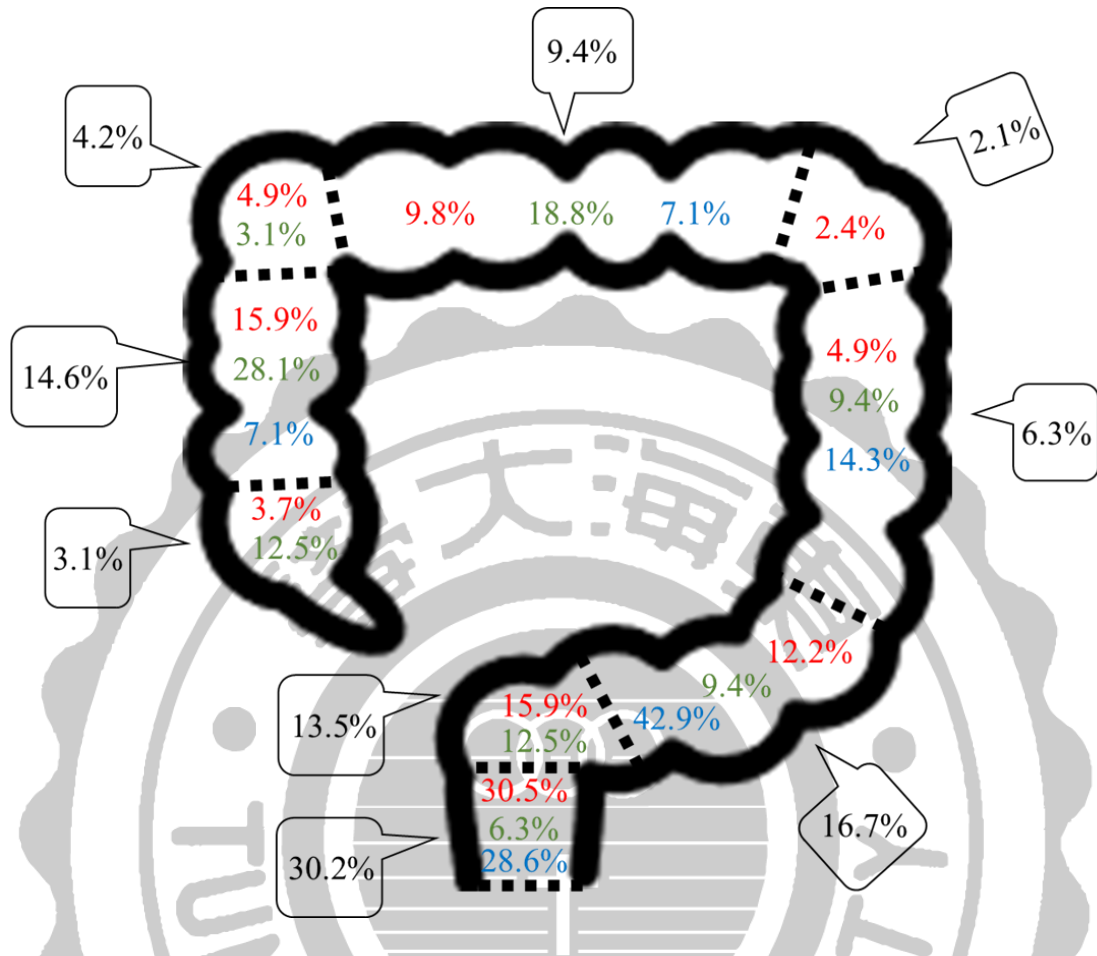
NO.	SEX	BMI	AGE	Stage	Location	Other
H-21	1	27.5	70	-	-	T2D Metabolic syndrome
H-43	2	22.6	37	-	-	-
P-31	2	20.1	73	0	Sigmoid colon (1 polyp)	T2D Metabolic syndrome
P-44	2	23.9	62	0	Transverse colon (1 polyp) Sigmoid colon (2 polyps)	Hypertension
T-39	1	24.1	85	III	Rectum colon	-
T-41	2	19.9	40	III	Rectum colon	-

\*H 為健康；P 為瘻肉；T 為腫瘤。性別 1 代表男性，2 代表女性。H21 糞便為液狀，疑為拉肚子；T39 及 T41 糞便顏色為綠色，CEA 指數分別為 2.9 ng/mL 與 3.5 ng/mL。

附錄 3、菌相分析-OTU 菌種。

ID	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species
004	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Morganella	morganii
005	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Citrobacter	unclassified
008	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Veillonellaceae	Veillonella	dispar
010	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Edwardsiella	unclassified
012	Fusobacteria	Fusobacteriia	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium	unclassified
013	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Ruminococcus	unclassified
015	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Gemmiger	formicilis
019	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Cronobacter	dublinensis
021	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	Desulfovibrio	unclassified
025	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	Enterococcus	casseliflavus
026	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	Enterococcus	unclassified
027	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Salmonella	enterica
041	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Christensenellaceae	unclassified	unclassified
043	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	reuteri
044	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Gemmiger	formicilis
046	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Enterobacter	unclassified
049	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Proteus	unclassified
052	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Enterobacter	asburiae
062	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Subdoligranulum	variabile
116	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Providencia	unclassified
155	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	S24-7	unclassified	unclassified
212	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	S24-7	unclassified	unclassified

附錄 4、統整腫瘤&瘻肉好發部位。



\*紅字為臺中中港澄清醫院腫瘤。綠字為彰化基督教醫院瘻肉。藍字為彰化基督教醫院腫瘤。黑字為腫瘤統整比例。發現腫瘤主要發生在直腸部分 (30.2%)，而瘻肉主要發生在升結腸部分 (28.1%)。

附錄 5、臨床資料連結代謝症候群。

Items	Health		Polyps		Tumor	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Waist	90.3	78.7	86.4	87.0	90.8	79.0
BP	SBP	132.2		133.9		133.0
	DBP	77.2		79.0		83.8
HDL-C	51.0	57.3	45.0	52.4	49	55
Fasting glucose	96.9			111.5		-
Triglyceride	80.4			130.4		103.8

\*健康對照有 18% (2/11) 機率具有代謝症候群；瘻肉組有 36% (12/33) 機率具有代謝症候群；腫瘤組有 0% (0/14) 機率具有代謝症候群。

附錄 6、臨床資料連結代謝症候群

編號	性別	腰圍	SBP	DBP	HDL-C	Fasting glucose	Triglyceride
健康對照							
4	2	75	-	-	67	89	74
9	2	72	137†	84	59	86	67
18	2	83†	134†	75	66	70	63
20	1	82			70	97	51
21*	1	94†	140†	68	42	123†	150
27	2	93†			53	108†	137
32	1	95†	124	81	41	92	33
35	2	-	-	-	43†	113†	-
43	2	75	-	-	-	-	-
59	2	66	126	78	75	89	37
61*	2	87†	-	-	38†	102†	112
瘰肉							
1	2	68	116	71	50†	-	95
3	1	89	-	-	28†	69	186†
5*	1	80	-	-	40†	106†	230†
7*	1	89	133†	78	33†	101†	254†
8*	1	93†	141†	88†	35†	91	145
10	1	84	125	87†	59	87	86
11*	2	82†	157†	94†	38	114	118
13	1	89	115	60	49	75	68
14	1	92.5†	120	80	64	97	49
15	2	85†	141†	85†	72	81	56
16	2	121†	128	84	52	86	130
17*	2	106†	179†	111†	54	292†	79
19	1	71	97	68	40†	207†	39
22	2	90†	121	76	56	101†	49
23*	1	90†	145†	86†	51	96	223†
24	1	86	-	-	39†	114†	116
25	1	81	118	73	39†	74	114
26	1	86	-	-	30†	126†	86
28*	2	80†	-	-	43†	101†	104
29	1	83	-	-	45	93	47
30*	2	87†	106	51	37†	178†	78
31*	2	80†	160†	75	47†	143†	144
36	2	86†	-	-	-	-	-

附錄 6 (續)、臨床資料連結代謝症候群

編號	性別	腰圍	SBP	DBP	HDL-C	Fasting glucose	Triglyceride
癭肉							
40	1	96.5†	-	-	44	99	418†
44	2	84†	187†	102†	54	93	130.4
45*	1	91†	130†	80	48	89	213†
50	2	76	129	75	60	84	56
51*	1	90†	138†	86†	45	94	184†
52*	1	99.06†	135†	83	42	163†	256†
53	2	80†	129	72	63	94	91
55	1	71.12	152†	62	58	119†	71
56	2	93†	-	-	55	96	171†
62	1	81	111	69	66	95	86
腫瘤							
2	1	79.5	130†	90†	-	-	-
33	2	-	-	-	98	-	59
34	2	97.5†	-	-	36†	-	134
37	1	-	-	-	-	-	-
38	2	82†	-	-	52	-	149
39	1	-	126	71	-	-	-
41	2	-	-	-	50†	-	51
42	2	73.7	-	-	39†	-	154†
47	1	96.5†	-	-	-	-	-
48	1	96.5†	135†	90†	49	-	76
49	1	-	134†	88†	-	-	-
54	2	83.82†	-	-	-	-	-
57	2	60.96	142†	80	-	-	-
58	2	76.2	-	-	-	-	-

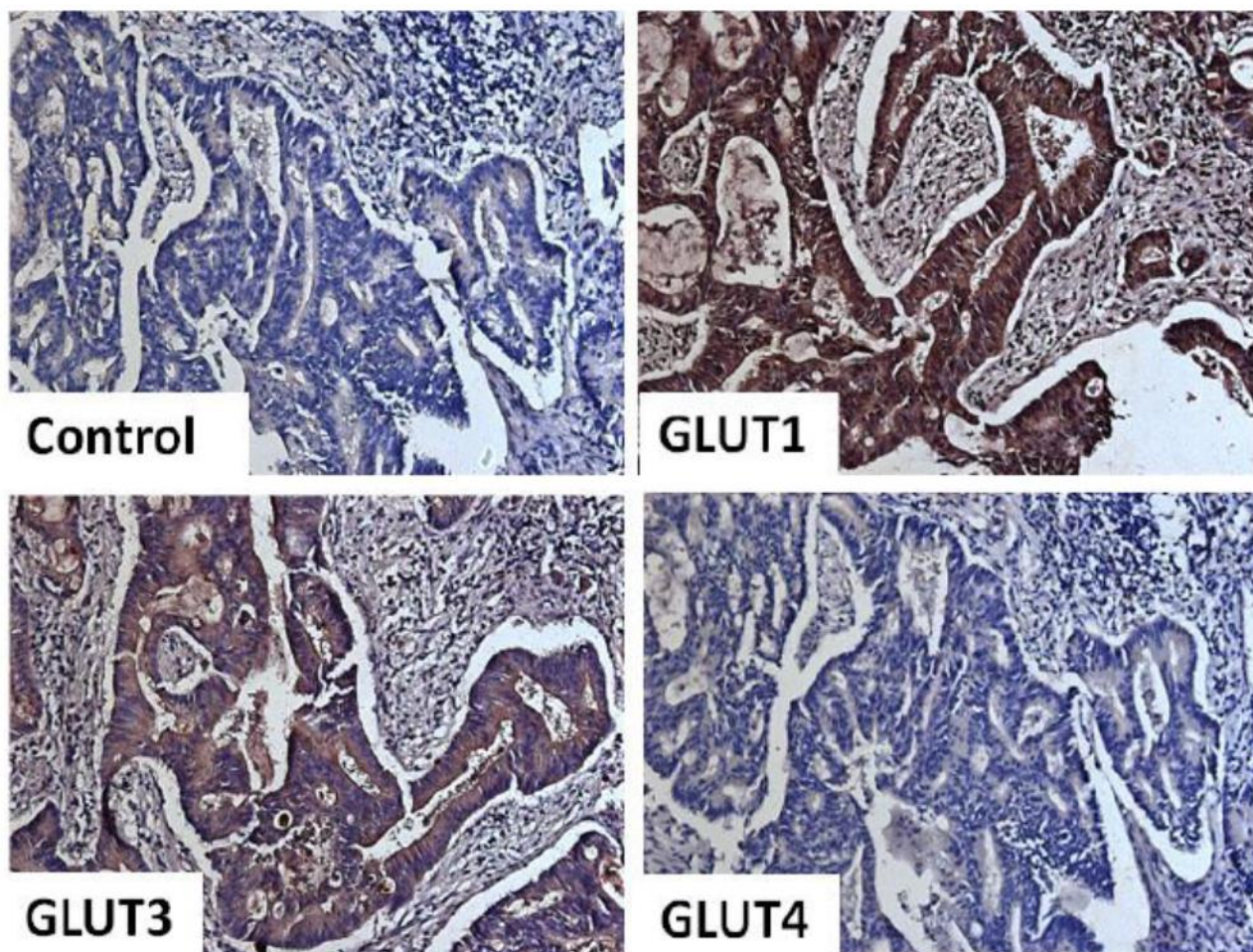
\*表示符合三項危險因子，可被稱為具有代謝症候群

†表示異常數值

性別 1 為男性 2 為女性

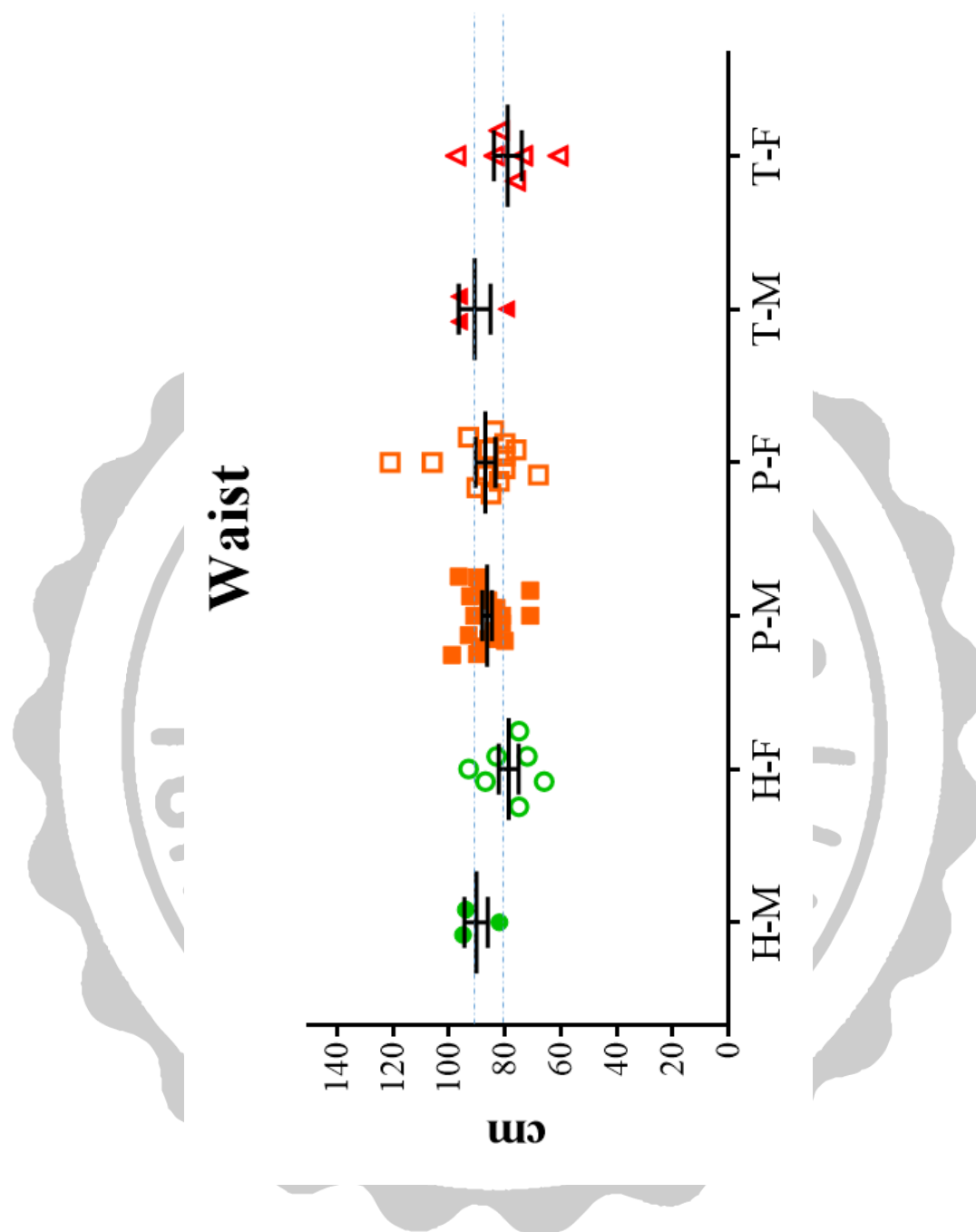


附錄 7、IHC 前驅數據 (GLUTs)



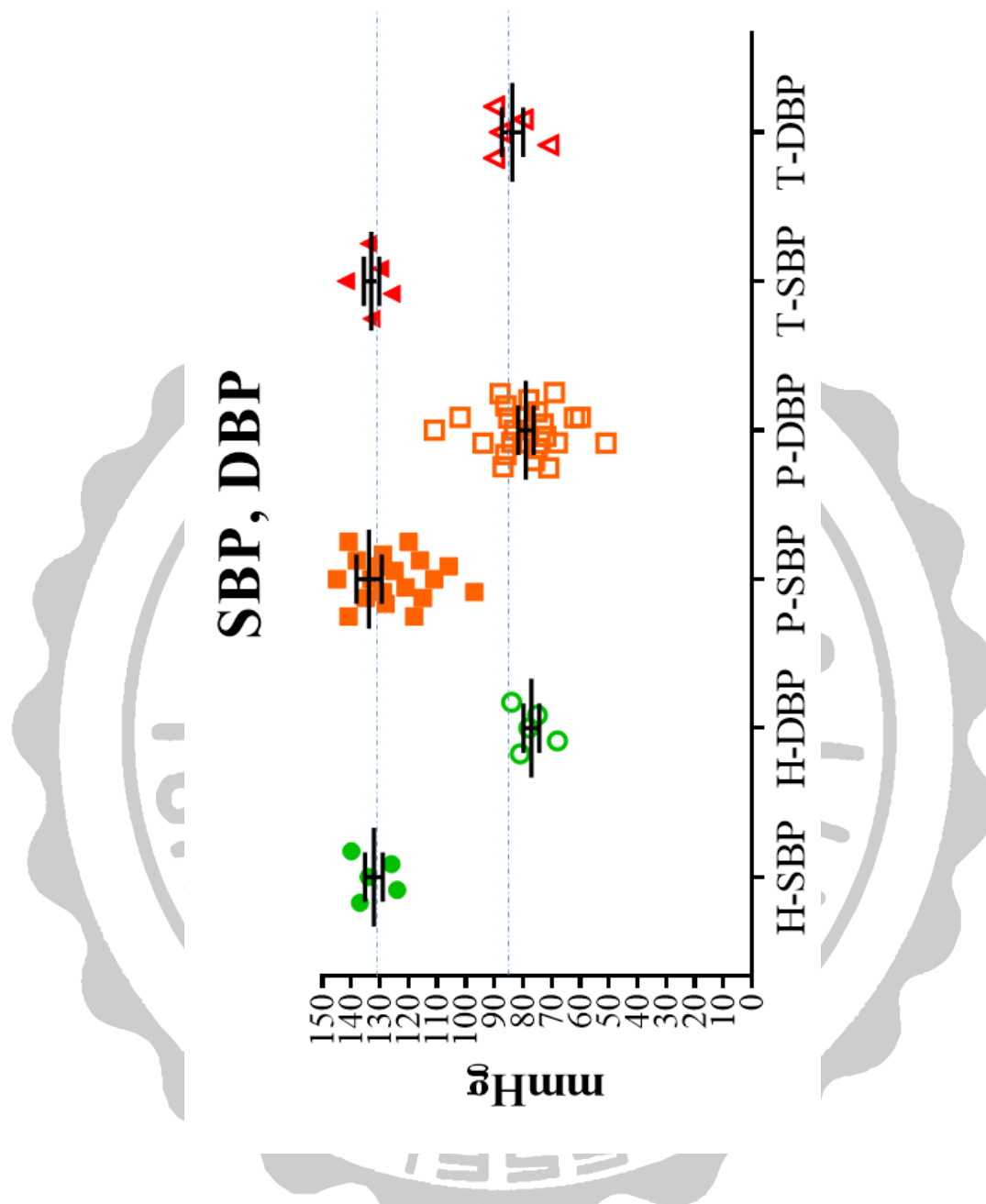
\*於大腸癌患者切片分別使用 GLUT1、GLUT3 及 GLUT4 之表現量，發現 GLUT1/3 表現量較多，所以後續實驗使用 GLUT1/3。

附錄 8、代謝危險因子-腰圍 (Waist)



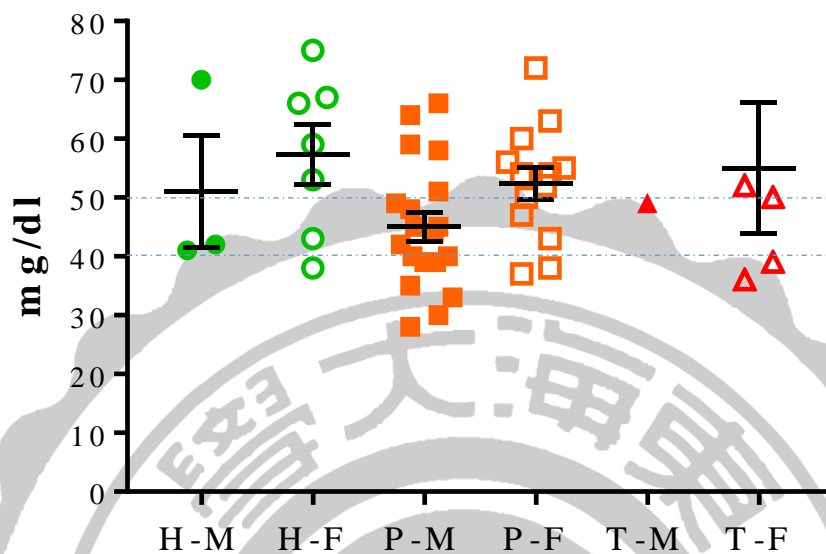
\*H-M 為健康對照組男性，H-F 為健康對照組女性。P-M 為癌肉組男性，P-F 為癌肉組女性。T-M 為腫瘤組男性，T-F 為腫瘤組女性。男性腰圍  $\geq 90$  cm、女性腰圍  $\geq 80$  cm 即為異常。

附錄 9、代謝危險因子-血壓 (SBP, DBP)



\*H-SBP 為健康對照組收縮壓，H-DBP 為健康對照組舒張壓。P-SBP 為癒肉組收縮壓，P-DBP 為癒肉組舒張壓。T-SBP 為腫瘤組收縮壓，T-DBP 為腫瘤組舒張壓。收縮壓  $\geq 130$  mmHg、舒張壓  $\geq 85$  mmHg 即為異常。

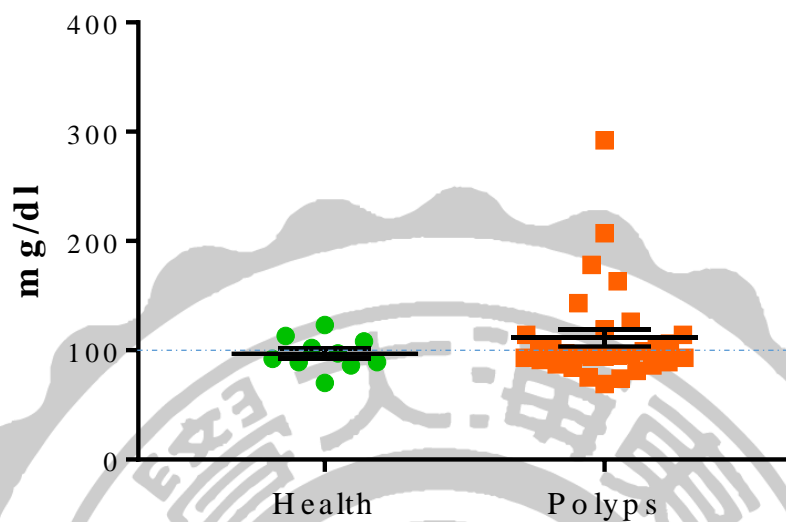
## HDL-C



\*H-M 為健康對照組男性，H-F 為健康對照組女性。P-M 為癌肉組男性，P-F 為癌肉組女性。T-M 為腫瘤組男性，T-F 為腫瘤組女性。男性 HDL-C  $< 40\text{ mg/dl}$ 、女性 HDL-C  $< 50\text{ mg/dl}$  即為異常。

附錄 11、代謝危險因子-空腹血糖 (Fasting glucose, FG)

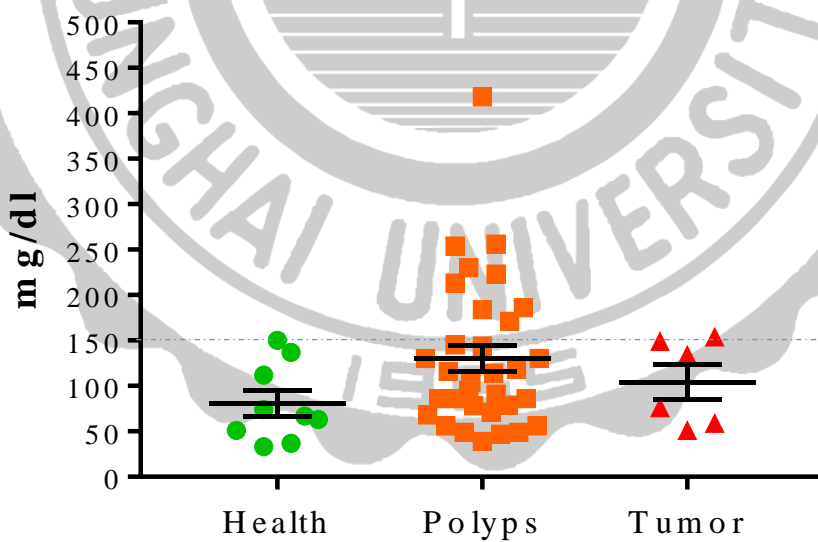
### FG



\*FG  $\geq$  100 mg/dl 即為異常。

附錄 12、代謝危險因子-三酸甘油酯 (Triglyceride, TG)

### TG



\* TG  $\geq$  150 mg/dl 即為異常。

附錄 13、IHC & Western Blot 使用之抗體

抗體	廠牌	分子量
GLUT1	novus	55 kDa
GLUT3	abcam	45-47 kDa
CA8	SANTA CRUZ	33 kDa
Rab11	BD	24 kDa
GAPDH	GeneTex	36 kDa
Anti-rabbit IgG HRP-linked antibody	Millipore	
Anti-mouse IgG HRP-linked antibody	Cell signaling	

附錄 14、蛋白質定量標準曲線

