RRPG94020118（32 .P）

計畫編號：DOH94-TD-F-113-027

行政院衛生署九十四年度科技研究計畫

保健食品預防大腸癌評估方法之研究

研 究 報 告

執行機構：台北醫學大學

計畫主持人：施純光 助理教授

研究人員：

執行期間：94 年 1 月 26 日至 94 年 12 月 31 日

＊本研究報告僅供參考，不代表本署意見，依合約之規定：如對媒體發布研究成果應事先徵求本署同意＊

目錄

目錄 …… 1
表次 …… 2
中文摘要 …… 3
英文摘要 …… 4
一、前言 …… 5
二、材料與方法 …… 7
三、結果 …… 9
四、討論 …… 21
五、結論與建議 …… 27
參考文獻 …… 28
九十四年度計畫重要研究成果及對本署之具體建議 …… 31

表次

表 1 高脂飼料對雄性 F344 鼠體重之影響…… 9
表 2 高脂飼料對雄性 F344 鼠飼料攝取量之影響…… 10
表 3 高脂飼料對雄性 F344 鼠餵食效率之影響…… 11
表 4 高脂飼料對雄性 F344 鼠結腸長度之影響…… 12
表 5 高脂飼料對雄性 F344 鼠結腸重量之影響…… 13
表 6 高脂飼料對雄性 F344 鼠大腸受 DMH 所誘發 ACF 之影響…… 14
表 7 高脂飼料對雄性 F344 鼠大腸受 DMH 所誘發各種大小 ACF 之影響 …… 15
表 8 高脂飼料對雄性 F344 鼠大腸受 DMH 所誘發 ACF 分布之影響… 16
表 9 高脂飼料對雄性 F344 鼠大腸受 DMH 所誘發大腸腫瘤發生率及多發性之影響 …… 17
表 10 高脂飼料對雄性 F344 鼠各段結腸受 DMH 所誘發大腸腫瘤發生率之影響 …… 18
表 11 高脂飼料對雄性 F344 鼠各段結腸受 DMH 所誘發大腸腫瘤多發性之影響 …… 19
表 12 高脂飼料對雄性 F344 鼠各段結腸受 DMH 所誘發大腸腫瘤體積之影響 …… 20

摘要

大腸癌是和膳食關係最密切的癌症，許多膳食因子可調節大腸癌的形成，透過膳食預防大腸癌為合理可行的方向。化學預防（Chemoprevention）是指利用天然物或藥物預防、逆轉或延遲癌症的發展，食品或其成分為相當熱門的化學預防劑（Chemopreventive agent），據統計目前已有百種以上的食品或其成分具有預防大腸癌的潛力，是研發保健食品的良好原料。自從我國健康食品管理法實施以來，衛生署陸續公布多種健康食品的保健功能評估方法，但迄今只有癌症相關保健功能的草案。本研究之目的為建立快速誘發型大腸癌之動物模式，作為保健食品預防大腸癌功能的評估方法，並探討此評估方法的可行性及應用性。以動物實驗比較兩種高脂飼料（20%玉米油及 20%混合油）對 1,2-dimethylhydrazine（DMH）所誘發大腸癌形成過程的影響，分析時間點為誘發 8 週、16 週及 25 週，分析項目包括大腸癌前期病變 Aberrant crypt foci (ACF)及大腸腫瘤。研究結果發現高脂飼料可增加大型 ACF 數、腫瘤發生率（Incidence）及多發性（Multiplicity），顯示具有促進大腸癌形成之作用，其中 20%混合油之效果優於 20%玉米油。本研究成果可提供大腸癌研究者更有效率的誘發型大腸癌動物模式，瞭解高脂飲食對大腸癌形成過程的影響，並可作為衛生署制定保健食品預防大腸癌功能評估方法的參考。

關鍵詞：保健食品、大腸癌、預防、評估方法

Abstract

Colorectal cancer is the form of cancer most closely associated with diet. Dietary factors play a role in colorectal carcinogenesis, and thus it may be possible to prevent the occurrence of this cancer by dietary modification. Chemoprevention refers to the use of natural or synthetic compounds to prevent, reverse, or delay the development of cancer. Food-derived products are highly interesting for developed as chemopreventive agents, and more than 100 dietary agents have been tested against colorectal cancer. The Department of Health has promulgated several assessment methods of health food on health care effects. However, only a draft assessed the preventive effect of health food on cancer. This study was designed to establish a fast assessment method of health food on prevention of colorectal cancer, and to evaluate the application of this method. The experiment was designed to compare two high-fat diets (20% corn oil and 20% mixed lipids) on 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colorectal carcinogenesis in rats. Colons were examined for preneoplastic aberrant crypt foci (ACF) and tumors after 8, 16, and 25 weeks of induction. The results showed that high-fat diets increased the number of large ACF and the incidence and multiplicity of colon tumors. The tumor-promoting effect of 20% mixed lipids was better than that of 20% corn oil. This study will contribute to provide an efficient animal model of chemically induced colorectal cancer, to elucidate the role of high-fat diets in colorectal carcinogenesis, and to establish a referential assessment method of health food on prevention of colorectal cancer.

Key words: Health food; Colorectal cancer; Prevention; Assessment method

一、前言

自民國 71 年至 93 年，癌症已連續 23 年高居我國十大死因之首，對國人的生命及健康構成極大威脅。在所有癌症之中，大腸癌是和膳食關係最密切的癌症（Drasar and Irving, 1973；Reddy, 2000）。許多膳食因子與大腸癌的形成有關，例如：高熱量、高脂肪、高肉類飲食與大腸癌的發生率或死亡率之間為正相關，而膳食纖維、鈣、維生素 D 則與大腸癌的發生率或死亡率之間為負相關（Burnstein, 1993；Kune, 1996；Lipkin *et al.*, 1999；Kono, 2004）。由此可知：透過膳食預防大腸癌為合理可行的方向。

化學預防（Chemoprevention）是指利用天然物（例如：食品成分）或合成物（例如：藥物）預防、逆轉或延遲癌症的發展（Swan and Ford, 1997），對於早期癌症患者或有癌症前期病變者而言非常重要（Reddy and Rao, 2003）。食品成分是熱門的化學預防劑（Chemopreventive agent），美國 National Cancer Institute（NCI）極力倡導以科學方法評估及開發具有化學預防潛力的食品成分（Kelloff *et al.*, 2000）。根據統計，目前已有百種以上的食品或其成分經過評估可能具有預防大腸癌的潛力（Parnaud *et al.*, 1999；Wargovich *et al.*, 2000；Corpet and Tache, 2002；Corpet and Pierre, 2003）。

目前學界評估大腸癌化學預防劑時多採用化學誘發動物模式（Chemically induced animal model），以致癌物誘發實驗動物產生大腸癌或

其前期病變，觀察化學預防劑的效果，已有研究證實此模式的實驗結果與人體介入性研究（Intervention study）的結果相當一致（Corpet and Pierre, 2005）。然而大腸癌的形成過程緩慢，誘發時間甚至長達一年以上，相當耗費時間、人力及金錢。有些學者嘗試改變動物飼料中油脂的種類及含量，發現可加速大腸癌或其前期病變 Aberrant crypt foci（ACF）的形成（Holt *et al.*, 1996；Rao *et al.*, 2001）。不過這些研究是以 Azoxymethane（AOM）誘發大腸癌形成，而 AOM 已停產，其替代品 1,2-dimethylhydrazine（DMH）至今尚未用於快速誘發型大腸癌的研究，極需進一步探討。

自從我國健康食品管理法實施以來，衛生署陸續公布多種健康食品的保健功能評估方法，包括：牙齒保健、改善骨質疏鬆、調節血脂、免疫調節、胃腸功能改善、護肝、調節血糖、抗疲勞、延緩衰老及輔助改善過敏體質等十項，但癌症相關保健功能的評估方法只有兩項草案，分別為「降低癌症發生率」及「減輕腫瘤放、化療毒副作用」。大腸癌和膳食的關係非常密切，透過膳食因子可調節大腸癌形成，因此發展保健食品預防大腸癌有其必要性，而建立保健食品預防大腸癌的評估方法亦有其需求。本研究擬建立保健食品預防大腸癌功效的評估方法，並探討此評估方法的可行性及應用性。研究完成後希望能有助於發展防癌保健食品，維護國人健康，並作為衛生署制定保健食品預防大腸癌評估方法時的參考。

二、材料與方法

（一）實驗材料

(1)動物：使用約 5 週齡之 F344 品系雄鼠。

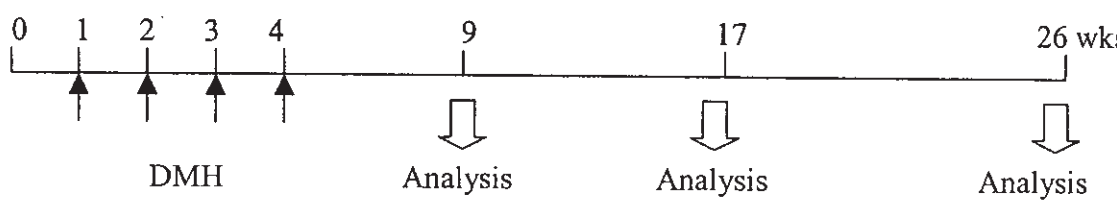
(2)飼料：以 AIN-76 diet 為基礎飼料，高脂組飼料由醣類扣除多出之百分比。

(3)藥品：以 DMH 誘發大腸癌。

（二）實驗設計

62 隻實驗動物經 1 週適應期後隨機分為 3 組，開始餵食實驗飼料。於實驗開始 1 週起，每週以腹腔注射方式給予 1 劑 DMH，劑量為 20 mg/kg，共注射 4 劑。分別於注射第 1 劑 DMH 後 8 週、16 週及 25 週時由每組隨機選擇 6 至 9 隻動物，取出大腸進行分析。

Group	Diet
1. Control	AIN-76 (5 % Corn oil)
2. High fat (1)	20 % Corn oil
3. High fat (2)	20 % Mixed lipids (American diet)



（三）ACF 分析法（Bird, 1998）

沿縱軸將結腸完全剪開並攤平，使其黏膜面向上，將結腸等切成 3 段（近端、中段、遠端），每段均夾在 2 片濾紙間，平坦置於已裝 10 % Buffered formalin 之培養皿中，固定 24 小時以上。觀察 ACF 時先將已固定的結腸組織浸於 0.2 % Methylene blue（以 PBS 作為溶劑），染色時間約 5 分鐘，再將已染色的結腸組織置於玻片上（黏膜面向上），以 40-100 倍的光學顯微鏡觀察 ACF。

（四）腫瘤分析法（Rao *et al.*, 1995）

將取出的結腸、盲腸、小腸及胃沿縱軸完全剪開，以 PBS 清洗後，攤平置於濾紙上，使其黏膜面向上。檢查腫瘤，記錄其位置及數目，以游標尺測量每個腫瘤的長度（Length, L）、寬度（Width, W）、深度（Depth, D），並由下列公式求得腫瘤體積（Volume, V）：$V = L \times W \times D \times \pi/6$ 。

三、結果

（一）動物攝食及生長狀況

如表 1 所示，各組動物之起始體重相同，均為 158 g。隨著飼養時間增長，體重逐漸增加，但無論於 9 週、17 週、26 週時各組體重均無顯著差異。

表 1 高脂飼料對雄性 F344 鼠體重之影響

Table 1. Effect of high-fat diets on body weight of male F344 rats[1,2]

Experimental group[3]	Body weight (g)			
	Week 0	Week 9	Week 17	Week 26
Control	158 ± 17	284 ± 27	347 ± 22	376 ± 20
High fat (1)	158 ± 17	293 ± 13	354 ± 17	384 ± 23
High fat (2)	158 ± 17	298 ± 24	355 ± 26	380 ± 26

[1] All values are mean ± SD (n = 20-21 at week 0 and 9, n = 14-15 at week 17, and n = 8-9 at week 26).

[2] Values with the same letter in a column are not significantly different from one another as determined by Duncan's multiple range test, $P < 0.05$.

[3] Control: AIN-76 diet; High fat (1): 20% corn oil; High fat (2): 20% mixed lipids.

表 2 為飼料攝取量。各組動物之飼料攝取量均隨飼養週數之增加而增加，其中實驗中期（第 9-17 週）顯著大於實驗前期（第 0-9 週）（$P < 0.05$），而實驗後期（第 17-26 週）與實驗中期（第 9-17 週）間無顯著差異。無論在任何時期，飼料攝取量均為高脂組顯著小於對照組（$P < 0.05$），而餵食

高脂的 2 組間無顯著差異。

表 2 高脂飼料對雄性 F344 鼠飼料攝取量之影響

Table 2. Effect of high-fat diets on feed intake of male F344 rats[1,2,3]

Experimental group[4]	Feed intake (g/d)			
	Week 0-9	Week 9-17	Week 17-26	Total
Control	$13.2 \pm 0.5^{a,y}$	$16.8 \pm 0.6^{a,x}$	$17.4 \pm 0.1^{a,x}$	15.7 ± 0.2^{a}
High fat (1)	$11.1 \pm 0.3^{b,y}$	$14.7 \pm 0.4^{b,x}$	$14.8 \pm 0.4^{b,x}$	13.5 ± 0.2^{b}
High fat (2)	$11.4 \pm 0.6^{b,y}$	$14.9 \pm 0.8^{b,x}$	$15.2 \pm 0.2^{b,x}$	13.8 ± 0.4^{b}

[1] All values are mean ± SD (n = 20-21 during week 0 and 9, n = 14-15 during week 9 and 17, and n = 8-9 during week 17 and 26).

[2] Values with the same letter (a, b, or c) in a column are not significantly different from one another as determined by Duncan's multiple range test, $P < 0.05$.

[3] Values with the same letter (x, y, or z) in a row are not significantly different from one another as determined by Duncan's multiple range test, $P < 0.05$.

[4] Control: AIN-76 diet; High fat (1): 20% corn oil; High fat (2): 20% mixed lipids.

表 3 為餵食效率。各組動物之餵食效率均隨飼養週數之增加而降低，其中實驗中期（第 9-17 週）顯著小於實驗前期（第 0-9 週）（$P<0.05$），且實驗後期（第 17-26 週）顯著小於實驗中期（第 9-17 週）（$P<0.05$）。實驗前期（第 0-9 週）、實驗中期（第 9-17 週）及全程之餵食效率均為高脂組顯著大於對照組（$P<0.05$），而餵食高脂的 2 組間無顯著差異。

表 3 高脂飼料對雄性 F344 鼠餵食效率之影響

Table 3. Effect of high-fat diets on feed efficiency of male F344 rats[1,2,3]

Experimental group[4]	Feed efficiency (%)[5]			
	Week 0-9	Week 9-17	Week 17-26	Total
Control	$14.5 \pm 2.8^{b,x}$	$6.0 \pm 0.8^{b,y}$	2.9 ± 0.6^{z}	7.5 ± 0.5^{b}
High fat (1)	$18.4 \pm 2.1^{a,x}$	$7.5 \pm 1.4^{a,y}$	3.4 ± 0.7^{z}	9.0 ± 1.0^{a}
High fat (2)	$18.6 \pm 2.6^{a,x}$	$6.9 \pm 1.5^{a,y}$	3.2 ± 1.4^{z}	9.1 ± 0.6^{a}

[1] All values are mean ± SD (n = 20-21 during week 0 and 9, n = 14-15 during week 9 and 17, and n = 8-9 during week 17 and 26).

[2] Values with the same letter (a, b, or c) in a column are not significantly different from one another as determined by Duncan's multiple range test, $P < 0.05$.

[3] Values with the same letter (x, y, or z) in a row are not significantly different from one another as determined by Duncan's multiple range test, $P < 0.05$.

[4] Control: AIN-76 diet; High fat (1): 20% corn oil; High fat (2): 20% mixed lipids.

[5] Body weight gain/feed intake × 100%.

（二）結腸長度及重量

表 4 為結腸長度。各組動物之結腸長度隨飼養週數之增加而增加，但各組間並無顯著差異。對照組及 20%混合油組之相對結腸長度不受飼養週數之影響，而 20%玉米油組之相對結腸長度隨飼養週數之增加而降低。

表 4 高脂飼料對雄性 F344 鼠結腸長度之影響

Table 4. Effect of high-fat diets on colon length of male F344 rats[1,2,3]

Experimental group[4]	Colon length (cm)			Relative colon length (%)[5]		
	Week 9	Week 17	Week 26	Week 9	Week 17	Week 26
Control	15.3±1.9^{z}	18.1±2.4^{y}	20.8±1.5^{x}	5.7±0.5^{x}	5.3±0.4^{x}	5.6±0.6^{x}
High fat (1)	16.6±1.0^{y}	19.0±1.6^{x,y}	19.2±2.8^{x}	6.1±0.6^{x}	5.4±0.4^{x,y}	5.1±0.7^{y}
High fat (2)	16.6±1.5^{y}	19.9±0.8^{x}	21.0±1.5^{x}	6.0±0.9^{x}	5.6±0.4^{x}	5.6±0.4^{x}

[1] All values are mean ± SD (n = 6 at week 9 and 17 and n = 8-9 at week 26).

[2] Values with the same letter (a, b, or c) in a column are not significantly different from one another as determined by Duncan's multiple range test, $P < 0.05$.

[3] Values with the same letter (x, y, or z) in a row are not significantly different from one another as determined by Duncan's multiple range test, $P < 0.05$.

[4] Control: AIN-76 diet; High fat (1): 20% corn oil; High fat (2): 20% mixed lipids.

[5] Colon length/body weight × 100%.

表 5 為結腸重量。對照組及 20%混合油組之結腸重量隨飼養週數之增加而增加，20%玉米油組則不受飼養週數之影響。無論在任何時期，各組之結腸重量均無顯著差異。20%玉米油組之相對結腸重量隨飼養週數之增加而降低，對照組及 20%混合油組之相對結腸重量則不受飼養週數之影響。

表 5 高脂飼料對雄性 F344 鼠結腸重量之影響

Table 5. Effect of high-fat diets on colon weight of male F344 rats[1,2,3]

Experimental group[4]	Colon weight (g)			Relative colon weight (%)[5]		
	Week 9	Week 17	Week 26	Week 9	Week 17	Week 26
Control	1.26±0.14^{y}	1.45±0.29^{y}	1.69±0.18^{x}	0.47±0.04^{x}	0.43±0.06^{x}	0.45±0.06^{x}
High fat (1)	1.40±0.14^{x}	1.56±0.27^{x}	1.53±0.22^{x}	0.51±0.04^{x}	0.45±0.07^{x,y}	0.40±0.05^{y}
High fat (2)	1.37±0.19^{y}	1.41±0.12^{y}	1.69±0.21^{x}	0.49±0.10^{x}	0.40±0.04^{y}	0.45±0.07^{x,y}

[1] All values are mean ± SD (n = 6 at week 9 and 17 and n = 8-9 at week 26).

[2] Values with the same letter (a, b, or c) in a column are not significantly different from one another as determined by Duncan's multiple range test, $P < 0.05$.

[3] Values with the same letter (x, y, or z) in a row are not significantly different from one another as determined by Duncan's multiple range test, $P < 0.05$.

[4] Control: AIN-76 diet; High fat (1): 20% corn oil; High fat (2): 20% mixed lipids.

[5] Colon weight/body weight × 100%.

（三）大腸 ACF

實驗滿 9 週時各組大腸癌前期病變 ACF 之發生率、數目及腺窩多發性如表 6 所示。所有動物於注射 DMH 8 週後均產生 ACF，各組 ACF 發生率均為 100%。ACF 數、異常腺窩數及腺窩多發性在各組間無顯著差異。

表 6 高脂飼料對雄性 F344 鼠大腸受 DMH 所誘發 ACF 之影響

Table 6. Effect of high-fat diets on DMH-induced ACF in the colon of male F344 rats[1,2]

Experimental group[3]	Incidence (number of rats with ACF/total rats)	Number of ACF/colon	Number of aberrant crypts/colon	Crypt multiplicity (number of aberrant crypts/focus)
Control	6/6	70 ± 35	155 ± 80	2.2 ± 0.2
High fat (1)	6/6	77 ± 29	177 ± 77	2.2 ± 0.3
High fat (2)	6/6	86 ± 25	209 ± 63	2.4 ± 0.2

[1] All values except for incidence are mean ± SD (n = 6).

[2] Values with the same letter in a column are not significantly different from one another as determined by Duncan's multiple range test, $P < 0.05$.

[3] Control: AIN-76 diet; High fat (1): 20% corn oil; High fat (2): 20% mixed lipids.

ACF 生長情形如表 7 所示。各組均以帶有 2 個異常腺窩的 ACF 數目最多。餵食高脂飼料之 2 組其帶有 3 個異常腺窩之 ACF 數略高於對照組（$P = 0.0959$），其餘大小之 ACF 數在各組間無顯著差異。

表 7 高脂飼料對雄性 F344 鼠大腸受 DMH 所誘發各種大小 ACF 之影響

Table 7. Effect of high-fat diets on the number of DMH-induced ACF according to the various number of crypts in the colon of male F344 rats[1,2]

Experimental group[3]	Number of foci containing			
	1 crypt	2 crypts	3 crypts	4 crypts or more
Control	19 ± 7	30 ± 20	14 ± 7	8 ± 5
High fat (1)	22 ± 7	26 ± 11	19 ± 10	11 ± 6
High fat (2)	17 ± 5	32 ± 12	24 ± 10	12 ± 4

[1] All values are mean ± SD (n = 6).

[2] Values with the same letter in a column are not significantly different from one another as determined by Duncan's multiple range test, $P < 0.05$.

[3] Control: AIN-76 diet; High fat (1): 20% corn oil; High fat (2): 20% mixed lipids.

ACF 分布情形如**表 8** 所示。ACF 主要出現於遠端結腸，其次為中段結腸，較少出現於近端結腸。各組間 ACF 分布情形無顯著差異。

表 8 高脂飼料對雄性 F344 鼠大腸受 DMH 所誘發 ACF 分布之影響

Table 8. Effect of high-fat diets on the distribution of DMH-induced ACF in the colon of male F344 rats[1,2,3]

Experimental group[4]	ACF distribution		
	Proximal colon	Middle colon	Distal colon
Control	1.2 ± 0.8 (2%)	25 ± 13 (39%)	44 ± 32 (59%)
High fat (1)	2.5 ± 2.7 (3%)	30 ± 13 (39%)	45 ± 20 (58%)
High fat (2)	2.8 ± 1.6 (3%)	36 ± 18 (42%)	47 ± 18 (55%)

[1] All values are mean ± SD (n = 6).

[2] Values with the same letter in a column are not significantly different from one another as determined by Duncan's multiple range test, $P < 0.05$.

[3] Values in parentheses are percentage of ACF on a particular site.

[4] Control: AIN-76 diet; High fat (1): 20% corn oil; High fat (2): 20% mixed lipids.

（四）大腸腫瘤

表 9 為各時期大腸腫瘤之發生率及多發性。20%混合油組在 17 週時即出現大腸腫瘤，其餘 2 組在 26 週時出現大腸腫瘤。與第 9 週時相比，26 週時 20%混合油組腫瘤發生率顯著較高（$P < 0.05$），20%玉米油組腫瘤發生率亦略高（$P = 0.0565$）。各組間腫瘤發生率並無顯著差異。第 17 週時僅 20%混合油組出現大腸腫瘤，其腫瘤多發性顯著高於其它 2 組（$P < 0.05$）。第 26 週時各組腫瘤多發性無顯著差異。

表 9 高脂飼料對雄性 F344 鼠大腸受 DMH 所誘發大腸腫瘤發生率及多發性之影響

Table 9. Effect of high-fat diets on the incidence and multiplicity of DMH-induced colon tumors in male F344 rats[1,2]

Experimental group[3]	Tumor incidence (% of animals with tumors)			Tumor multiplicity (tumors/tumor-bearing animal)		
	Week 9	Week 17	Week 26	Week 9	Week 17	Week 26
Control	0%	0%	22%	0	0^b	1.5 ± 0.7
High fat (1)	0%	0%	44%[4]	0	0^b	1.8 ± 1.0
High fat (2)	0%	33%	50%[5]	0	1 ± 0^a	1.8 ± 1.0

[1] Values in tumor incidence are the percentage of animals with tumors (n = 8-9); values in tumor multiplicity are mean ± SD (n = 8-9).

[2] Values with the same letter in a column are not significantly different from one another as determined by Duncan's multiple range test, $P < 0.05$.

[3] Control: AIN-76 diet; High fat (1): 20% corn oil; High fat (2): 20% mixed lipids.

[4] Slightly different from that at week 9 and 17, $P = 0.0565$.

[5] Significantly different from that at week 9, $P < 0.05$.

表 10 為 26 週時各段結腸之腫瘤發生率。20%混合油組之中段結腸腫瘤生率顯著高於對照組（$P < 0.05$），近端及遠端結腸之腫瘤發生率在各組間則無顯著差異。

表 10 高脂飼料對雄性 F344 鼠各段結腸受 DMH 所誘發大腸腫瘤發生率之影響

Table 10. Effect of high-fat diets on the incidence of DMH-induced tumors in the proximal, middle, and distal colon of male F344 rats[1]

Experimental group[2]	Tumor incidence (% of animals with tumors)		
	Proximal colon	Middle colon	Distal colon
Control	11%	0%	11%
High fat (1)	11%	11%	33%
High fat (2)	25%	38%[3]	25%

[1] Values are the percentage of animals with tumors (n = 8-9)

[2] Control: AIN-76 diet; High fat (1): 20% corn oil; High fat (2): 20% mixed lipids.

[3] Significantly different from that in control group, $P < 0.05$.

表 11 為 26 週時各段結腸之腫瘤多發性。高脂組之中段結腸腫瘤多發性顯著高於對照組（$P < 0.05$），近端及遠端結腸之腫瘤多發性在各組間則則無顯著差異。

表 11 高脂飼料對雄性 F344 鼠各段結腸受 DMH 所誘發大腸腫瘤多發性之影響

Table 11. Effect of high-fat diets on the multiplicity of DMH-induced tumors in the proximal, middle, and distal colon of male F344 rats[1,2]

Experimental group[3]	Tumor multiplicity (tumors/tumor-bearing animal)		
	Proximal colon	Middle colon	Distal colon
Control	1	0^b	2
High fat (1)	1	1^a	1.7 ± 1.2
High fat (2)	1 ± 0	1 ± 0^a	1 ± 0

[1] All values are mean ± SD (n = 8-9).

[2] Values with the same letter in a column are not significantly different from one another as determined by Duncan's multiple range test, $P < 0.05$.

[3] Control: AIN-76 diet; High fat (1): 20% corn oil; High fat (2): 20% mixed lipids.

表 12 為 26 週時各段結腸之腫瘤體積。對照組之遠端結腸腫瘤體積顯著大於 20%混合油組（$P < 0.05$），而近端及中段結腸之腫瘤體積在各組間並無顯著差異。

表 12 高脂飼料對雄性 F344 鼠各段結腸受 DMH 所誘發大腸腫瘤體積之影響

Table 12. Effect of high-fat diets on the volume of DMH-induced colon tumors in male F344 rats[1,2]

Experimental group[3]	Tumor volume (mm^3)			
	Total	Proximal colon	Middle colon	Distal colon
Control	21 ± 15	9	0	27 ± 15^{a}
High fat (1)	15 ± 9	9	27	$14 \pm 9^{a,b}$
High fat (2)	12 ± 8	12 ± 2	18 ± 8	3 ± 2^{b}

[1] All values are mean ± SD (n = 8-9).

[2] Values with the same letter in a column are not significantly different from one another as determined by Duncan's multiple range test, $P < 0.05$.

[3] Control: AIN-76 diet; High fat (1): 20% corn oil; High fat (2): 20% mixed lipids.

四、討論

學界使用化學誘發動物模式研究大腸癌已有數十年歷史，此模式廣泛用於篩選化學預防劑與研究致癌及化學預防機制，已證實其實驗結果與人體實驗之結果一致性良好（Corpet and Pierre, 2005）。然而大腸癌的形成過程緩慢，需長時間誘發，不符經濟效益。已知 20%高油飲食可增加大腸腫瘤表現（McIntosh *et al.*, 2001），玉米油可促進大腸癌形成（Wu *et al.*, 2004），而模擬西方飲食之混合油（富含飽和脂肪及ω-6 多元不飽和脂肪酸）亦有促進大腸癌形成之效果（Rao *et al.*, 2001），因此本研究採用 20%玉米油及混合油作為促進劑，擬建立一套快速誘發型大腸癌之動物模式。

（一）高脂飼料對動物攝食及生長狀況之影響

本研究中所有實驗動物均接受注射大腸癌特異性致癌物 DMH，動物在注射後會有一短暫期出現攝食量減少、體重增加遲緩的現象，推測是由於 DMH 之毒性所造成。度過此一時期後，動物之攝食及生長狀況即恢復正常。

實驗前期（第 0-9 週）時動物正處於快速生長期，體重增幅大（表 1），但攝食量不大（表 2），所以此階段的餵食效率最高（表 3）。隨著飼養週數增加，體重增幅趨緩，但攝食量漸增，因此實驗中期（第 9-17 週）及後期（第 17-26 週）的餵食效率持續下降（表 3）。

高脂飼料於實驗全程 26 週期間對動物體重無顯著影響，但造成飼料攝取量較低，以致於餵食效率較高。此顯示高脂飼料雖因油膩且易有飽足感而使動物攝食少，然而其熱量密度高，在攝食較少之情況下仍與對照組飼料具有相當增重作用。

（二）高脂飼料對大腸 ACF 之影響

ACF 存在於以致癌物處理之鼠大腸及大腸癌高危險群之人類大腸中，是大腸癌前期病變（Bird, 1995）。本研究結果顯示實驗動物以 4 劑 DMH（每劑 20 mg/kg）誘發後均能產生 ACF，平均 ACF 數目達 70 以上，且腺窩多發性達 2.2 以上，顯示誘發效果良好（表 6）。高脂飼料雖對 ACF 數目、異常腺窩總數及腺窩多發性無顯著影響，但仍可發現：餵食高脂飼料之動物其較大型 ACF（帶有 3 個或 4 個以上異常腺窩之 ACF）之數目仍有較多的趨勢（表 7）。

ACF 之生長可用分裂機制（Fission mechanism）說明（Tsukamoto *et al.*, 1999）。首先單一腺窩（Single crypt）因增生而於底部產生 V 型裂縫（V-shaped cleft），形成分叉腺窩（Bifurcating crypt），進而轉變成 2 個腺窩，這 2 個腺窩會繼續分叉而轉變成帶有更多個腺窩之 ACF。由此可知，ACF 所含的腺窩數越多，代表其生長程度越大。高脂飼料造成較大型之 ACF 數目增加，顯示其介入 ACF 生長過程，促進 ACF 發展。

Bird（1995；1998）曾進行一系列動物實驗，發現給予致癌物後遠端結腸 ACF 的出現比近端結腸早且迅速：在早期，ACF 主要出現在遠端結腸；隨時間進行，ACF 開始出現在近端結腸，且部分 ACF 逐漸顯現病灶擴張（Focal expansion）而含更多異常腺窩。由表 2 得知高脂飼料雖對近端、中段、遠端三段結腸 ACF 之數目或百分比無顯著影響，但以促進效力（Potency）觀點（Corpet and Tache, 2002）可看出：高脂飼料對近端結腸 ACF 之促進效果最大（20%玉米油組：2.5 vs. 1.2，比值為 2.1；20%混合油組：2.8 vs. 1.2，比值為 2.3），其次為中段結腸 ACF（20%玉米油組：30 vs. 25，比值為 1.2；20%混合油組：36 vs. 25，比值為 1.4），對遠端結腸 ACF 之促進效果最小（20%玉米油組：45 vs. 44，比值為 1.0；20%混合油組：47 vs. 44，比值為 1.1）。高脂飼料對近端及中段結腸 ACF 之促進效果似乎顯示油脂所介入之 ACF 生長過程並非在起始期（Initiation phase），而可能如同 Rao 等（2001）所述是在後起始期（Post-initiation phase）。

（三）高脂飼料對大腸腫瘤之影響

實驗動物注射化學致癌物後出現第一個大腸腫瘤的時間點約為 20 週（Reddy, 1998），也有學者認為此模式下大腸腫瘤的形成約需 35 週（Roy *et al.*, 2001），事實上許多研究的實驗期往往長達接近一年甚至一年以上

（Corpet and Tache, 2002）。餵食 20%混合油使實驗動物在第 17 週時即出現大腸腫瘤，平均每隻荷瘤動物之腫瘤數目為 1 個（表 9），顯示此種高脂飼料確實有促進大腸腫瘤發展的作用。

本研究所使用的混合油乃模擬美式飲食中的脂肪組成，其中氫化大豆油佔 30%、玉米油佔 27%、牛油（Beef tallow）佔 16%、奶油（Butter fat）佔 12%、豬油佔 10%、花生油佔 5%，其飽和脂肪酸、ω-7/9 單元不飽和脂肪酸、ω-6 多元不飽和脂肪酸分別為 45%、24%、28%（Rao *et al.*, 2001）。已知富含ω-6 多元不飽和脂肪酸及飽和脂肪之高脂飲食可促進大腸癌形成（Weber *et al.*, 2000），其作用機制包括：增加結腸膽酸濃度、改變膜上磷脂質代謝、由磷脂質釋出花生四烯酸（Arachidonic acid）、藉環氧酶（Cyclooxygenase）影響前列腺素（Prostaglandin）合成（Rao *et al.*, 2001）。本研究所使用的混合油中飽和脂肪酸及ω-6 多元不飽和脂肪酸之總和高達 73%，此為促進大腸癌發展之原因。

餵食 5%（對照組）或 20%玉米油皆於 26 週時出現大腸腫瘤，20%玉米油組腫瘤發生率雖為對照組的 2 倍（44% vs. 22%），但可能受樣本數小（n = 9）之影響而未達統計上顯著差異。玉米油富含ω-6 多元不飽和脂肪酸，除了上述促進大腸腫瘤發展的機制外，近年來也有學者發現其作用機制與抑制粒線體依存性凋亡有關（Wu *et al.*, 2004）。事實上，20%玉米油

及 20%混合油這兩種高脂飼料對 26 週時大腸腫瘤之發生率、多發性、體積方面均顯現相同的趨勢（表 9 及表 12），顯示二者對大腸腫瘤之促進效果相似。

（四）快速誘發型大腸癌動物模式之可行性及應用性

基於傳統方法誘發鼠大腸癌的時間過長，本研究嘗試以調整飼料油脂方式加速大腸癌發展，擬建立一套快速誘發型大腸癌之動物模式。研究結果發現：無論以 20%玉米油或 20%混合油餵食 9、17、26 週，對實驗動物之生長並無影響，除大腸癌相關病變外亦未產生任何其它病變，全程實驗期中並無動物死亡，顯示此方法無安全上之顧慮。

以高脂飼料餵食 9 週後，所有動物均出現大腸癌前期病變 ACF，其數目為 77-86，腺窩多發性為 2.2-2.4，且出現 ACF，顯示誘發效果良好。ACF 數目、生長特質、分布情形雖在各組間無顯著差異，但仍可看出高脂飼料略有促進大型及近端與中段 ACF 生長之趨勢。餵食 17 週後，20%混合油組已出現大腸腫瘤，顯示此飼料確實可達快速誘發大腸腫瘤之目的。餵食 26 週後，高脂飼料組之大腸腫瘤發生率與多發性皆有較高的趨勢，但受限於樣本數不夠大而未達統計上顯著差異，因此適度增大樣本數有其必要性。整體而言，兩種高脂飼料皆能促進大腸癌前期病變 ACF 及大腸腫瘤形成，而 20%混合油對大腸腫瘤的促進效果優於 20%玉米油。

食品的攝取量大於藥品，因此食品中的成分會影響誘發模式的選擇，實際應用此快速誘發模式評估保健食品預防大腸癌功能時需考慮食品的種類。不含油脂或油脂含量極少之食品（例如：精製穀類、蔬菜、水果、藻類、菇類、香辛料等）可採用 20%混合油加速大腸癌形成；油脂含量中等(食品添加於飼料時來自食品之油脂未超過飼料重量之 20%)之食品(例如：全穀類、黃豆產品、肉類、魚貝類、蛋類、奶類等）可採用 20%玉米油加速大腸癌形成；油脂含量過高（食品添加於飼料時來自食品之油脂超過飼料重量之 20%）之食品不適用本研究之模式。

五、結論與建議

化學誘發動物模式廣泛應用於評估大腸癌的化學預防劑，但因大腸癌形成過程緩慢，往往相當費時費力。本研究初步建立一套快速誘發型大腸癌動物模式，以高脂飼料餵食實驗動物，配合大腸癌特異性致癌物 DMH，成功地加速大腸腫瘤形成，縮短實驗時間。

癌症為我國十大死因之首，癌症當中又以大腸癌和膳食的關係最密切，發展保健食品預防大腸癌有其必要性，而建立保健食品預防大腸癌的評估方法亦有其需求。衛生署已公布健康食品「降低癌症發生率」及「減輕腫瘤放療、化療毒副作用」兩項與癌症相關之功能評估方法草案，其中「降低癌症發生率」即為預防癌症的一種表示法。由於動物誘發性腫瘤與人類腫瘤最為接近，因此建議在「健康食品降低腫瘤發生率功能評估方法」中將「誘發性腫瘤實驗」列為必做之實驗，而將「動物移植性腫瘤實驗」與「體外抑制腫瘤細胞實驗」列為搭配選做之實驗。此外，由於各種腫瘤的形成原因及機制不同，評估方法及條件亦不同，建議每一種癌症應有一項獨立的評估方法。

參考文獻

Bird, R.P. 1995. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. Cancer Lett. 93:55-71.

Bird, R.P. 1998. Aberrant crypt foci system to study cancer preventive agents in the colon. In *Tumor Marker Protocols,* M. Hanausek and Z. Walaszek (Ed), p465-474, Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Burnstein, M.J. 1993. Dietary factors related to colorectal neoplasms. Surg. Clin. North Am. 73:13-29.

Corpet, D.E. and Pierre, F. 2003. Point: from animal models to prevention of colon cancer. Systematic review of chemoprevention in min mice and choice of the model system. Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. 12:391-400.

Corpet, D.E. and Pierre, F. 2005. How good are rodent models of carcinogenesis in predicting dfficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men. Eur. J. Cancer 41:1911-1922.

Corpet, D.E. and Tache, S. 2002. Most effective colon cancer chemopreventive agents in rats: a systematic review of aberrant crypt foci and tumor data, ranked by potency. Nutr. Cancer 43:1-21.

Drasar, B.S. and Irving, D. 1973. Environmental factors and cancer of the colon and breast. Br. J. Cancer 27:167-172.

Holt, P.R., Mokuolu, A.O., Distler, P., Liu, T., and Reddy, B.S. 1996. Regional distribution of carcinogen-induced colonic neoplasia in the rat. Nutr. Cancer 125:129-135.

Kelloff, G.J., Crowell, J.A., Steele, V.E., Lubet, R.A., Malone, W.A., Boone, C.W., Kopelovich, L., Hawk, E.T., Lieberman, R., Lawrence, J.A., Ali, I., Viner, J.L., and Sigman, C.C. 2000. Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents. J. Nutr. 130:467S-471S.

Kono, S. 2004. Secular trend of colon cancer incidence and mortality in relation to fat and meat intake in Japan. Eur. J. Cancer Prev. 13:127-132.

Kune, G.A. 1996. *Causes and Control of Colorectal Cancer.* Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA.

Lipkin, M., Reddy, B., Newmark, H., and Lamprecht, A. 1999. Dietary factors in human colorectal cancer. Ann. Rev. Nutr. 19:545-586.

McIntosh, G.H., Royle, P.J., and Pointing, G. 2001. Wheat aleurone flour increases cecal β -glucuronidase activity and butyrate concentration and reduces colon adenoma burden in azoxymethane-treated rats. J. Nutr. 131:127-131.

Parnaud, G., Tache, S., Peiffer, G., and Corpet, D.E. 1999. Polyethylene-glycol suppresses colon cancer and causes dose-dependent regression of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in rats. Cancer Res. 59:5143-5147.

Rao, C.V., Hirose, Y., Indranie, C. and Reddy, B.S. 2001. Modulation of experimental colon tumorigenesis by types and amounts of dietary fatty acids. Cancer Res. 61:1927-1933.

Rao, C.V., Rivenson, A., Simi, B., and Reddy, B.S. 1995. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary curcumin, a naturally occurring plant phenolic compound. Cancer Res. 55:259-266.

Reddy, B.S. 1998. Colon carcinogenesis models for chemoprevention studies. Hematol. Oncol. Clin. North Am. 12:963-973.

Reddy, B.S. 2000. Novel approaches to the prevention of colon cancer by nutritional manipulation and chemoprevention. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 9:239-247.

Reddy, B.S. and Rao, C.V. 2003. Role of synthetic and naturally occurring cyclooxygenase inhibitors in colon cancer prevention. In *COX-2 blockade in Cancer Prevention and Therapy*, R.E. Harris (Ed), p71-83, Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Roy, H.K., Karolski, W.J., and Ratashak, A. 2001. Distal bowel selsctivity in the chemoprevention of experimental colon carcinogenesis by the non-steroidal anti-inflammatory drug nabumetone. Int. J. Cancer 92:609-615.

Shih, C.-K., Chiang, W., and Kuo, M.-L. 2004. Effects of adlay on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. Food Chem. Toxicol. 42:1339-1347.

Swan, D.K. and Ford, B. 1997. Chemoprevention of cancer: Review of the literature. Oncol. Nurs. Forum 24:719-727.

Tsukamoto, T., Kozaki, K-I., Nishikawa, Y., Yamamoto M., Fukami, H., Inoue, M., Wakabayashi, K., and Tatematsu, M. 1999. Development and distribution of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*]-pyridine (PhIP)-induced aberrant crypt foci in the rat large intestine. Jpn. J. Cancer Res. 90:720-725.

Wargovich, M.J., Jimenez, A., McKee, K., Steele, V.E., Velasco, M., Woods, J., Price, R., Gray, K., and Kelloff, G.J. 2000. Efficacy of potential chemopreventive agents on rat colon aberrant crypt formation and progression. Carcinogenesis 21:1149-1155.

Weber, R.V., Stein, D.E., Scholes, J., and Kral, J.G. 2000. Obesity potentiates AOM-induced colon cancer. Dig. Dis. Sci. 45:890-895.

Wu, B., Iwakiri, R., Ootani, A., Tsunada, S., Fujise, T., Sakata, Y., Sakata, H., Toda, S., and Fujimoto, K. 2004. Dietary corn oil promotes colon cancer by inhibiting mitochondria-dependent apoptosis in azoxymethane-treated rats. Exp. Biol. Med. 229:1017-1025.

九十四年度計畫重要研究成果及對本署之具體建議

（本資料須另附乙份於成果報告中）

計畫名稱：**保健食品預防大腸癌評估方法之研究**

主 持 人：**施純光**　　計畫編號：DOH94-TD-F-113-027

1.本計畫之新發現或新發明

本研究初步建立一套快速誘發型大腸癌動物模式，以高脂飼料餵食實驗動物，配合大腸癌特異性致癌物 DMH，成功地加速大腸腫瘤形成，縮短實驗時間，並可節省人力及金錢。本模式可作為保健食品預防大腸癌功能評估方法。

2.本計畫對民眾具教育宣導之成果

(1) 大腸癌同時受膳食脂肪種類與含量之影響。

(2) 攝取高脂飲食會促進大腸腫瘤形成。

(3) 富含飽和脂肪酸及ω-6 多元不飽和脂肪酸之飲食會促進大腸腫瘤形成。

3.本計畫對醫藥衛生政策之具體建議

(1) 於「健康食品降低腫瘤發生率功能評估方法」中，將「誘發性腫瘤實驗」列為必做之實驗。

(2)「健康食品降低腫瘤發生率功能評估方法」中，每一種癌症應有一項獨立的評估方法。