

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

探討中鏈脂肪合併琉璃苣油調控癌症惡病質骨骼肌肉耗損之功效及相關機制(第2年)

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：MOST 104-2320-B-040-008-MY2
執行期間：105年08月01日至106年07月31日
執行單位：中山醫學大學營養學系(所)

計畫主持人：劉凱莉

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理：林哲群
碩士班研究生-兼任助理：林雅婷
碩士班研究生-兼任助理：施采瑩
博士班研究生-兼任助理：巫玉琳

中華民國 106 年 10 月 31 日

中文摘要：文獻指出，高MCT的生酮飲食，可減少癌症惡病質病患的體重流失，但補充MCT是否可對抗癌症惡病質所誘發的肌肉萎縮仍是未知的。本實驗目的是探討補充MCT是否可抑制癌症惡病質所引起的肌肉流失。本實驗使用路易斯氏肺癌細胞 (Lewis lung carcinoma, LLC) 來誘發C57BL/6小鼠癌症及肌肉萎縮，評估相較於給予沙拉油的補充，補充MCT是否可減少肺癌細胞誘發小鼠後腿骨骼肌肉流失及相關機制。觀察到相較於給予沙拉油的補充，補充MCT可減少腫瘤小鼠體重、骨骼肌及脂肪組織的流失，以及降低腫瘤重量。使用ELISA kit檢測發現，補充MCT可減少腫瘤小鼠血漿中TNF- α 和IL-6的含量。以即時定量reverse transcription-polymerase chain reaction及西方墨點法分析腫瘤小鼠腓腸肌中肌肉蛋白指標myosin heavy chain (MyHC)的mRNA與蛋白質表現量發現，補充MCT可顯著抑制腫瘤小鼠腓腸肌MyHC的流失。此外，補充MCT可顯著抑制腫瘤小鼠肌肉中泛素-蛋白酶體途徑(ubiquitin-proteasome pathway)、自噬作用-溶酶體途徑(autophagy-lysosome pathway)相關途徑基因與蛋白質表現量以及降低cleavage caspase-3的蛋白質表現量。MCT的補充可顯著增加腫瘤小鼠肌肉細胞質內protein kinase B及forkhead box O transcription factors (FoxOs)磷酸化蛋白質表現，及抑制細胞核內的FoxOs表現量。補充MCT不影響腫瘤小鼠肌肉adenosine monophosphate-activated protein kinase、inhibitor κ B- α 及mitogen-activated protein kinases以及細胞核內CCAAT/enhancer binding protein β (C/EBP β)與nuclear factor- κ B (NF- κ B)蛋白質表現。另外，免疫組織染色亦發現補充MCT可顯著減少腫瘤小鼠肌肉細胞核內FoxOs表現但不影響細胞核C/EBP β 及NF- κ B的蛋白質表現。綜合以上可知，補充MCT可抑制腫瘤小鼠血漿中TNF- α 和IL-6的表，抑制發炎反應。此外，補充MCT可經由減少癌細胞所誘發FoxOs轉錄活性進而減少泛素-蛋白酶體及自噬作用-溶酶體途徑相關蛋白質表現，及抑制腫瘤小鼠肌肉中caspase-3的活化，減少癌細胞所誘發骨骼肌肉蛋白流失，改善癌症惡病質造成的肌肉萎縮現象。

中文關鍵詞：癌症惡病質、肌肉萎縮、中鏈三酸甘油酯、泛素化-蛋白酶體途徑、自噬作用-溶酶體途徑

英文摘要：In our study, we assessed the effect of MCTs on Lewis lung carcinoma cells (LLC) induced muscle wasting in C57BL/6 mice. We observed that MCT reduced the loss of body weight, muscle mass and adipose tissue, as well as decreased tumor mass in tumor-bearing mice compare with Soybean oil. Supplementation of MCT can reduce the content of plasma interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in tumor mice by ELISA kit. Data from real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction and western blot analysis showed that MCT supplementation could effectively inhibit ubiquitin-proteasome pathway (UPP) and autophagy-lysosome pathway (ALP) related protein expression as well as nuclear FoxOs (forkhead box O transcription factors) amount in

gastrocnemius muscle of tumor-bearing mice compare with Soybean oil supplementation. However, MCT supplement does not affect tumor mouse muscle adenosine monophosphate-activated protein kinase, inhibitor-kappaB- α and mitogen-activated protein kinases as well as nuclear CCAAT/enhancer binding protein β (C/EBP β) and nuclear factor-kappa B (NF- κ B) protein expression. In addition, immunohistochemical staining was also found that MCT supplement can significantly reduce muscle nucleus FoxO3 but does not C/EBP β and NF- κ B in the muscle of tumor-bearing mice. summarily, MCT supplementation inhibit plasma TNF- α and IL-6 in tumor bearing mice. In addition, supplementary MCT through the decrease in FoxO3 transcriptional activity by cancer cell inhibited the UPP and ALP related protein expression, and activation of caspase-3, which resulted in prevention of cancer induced-skeletal muscle wasting.

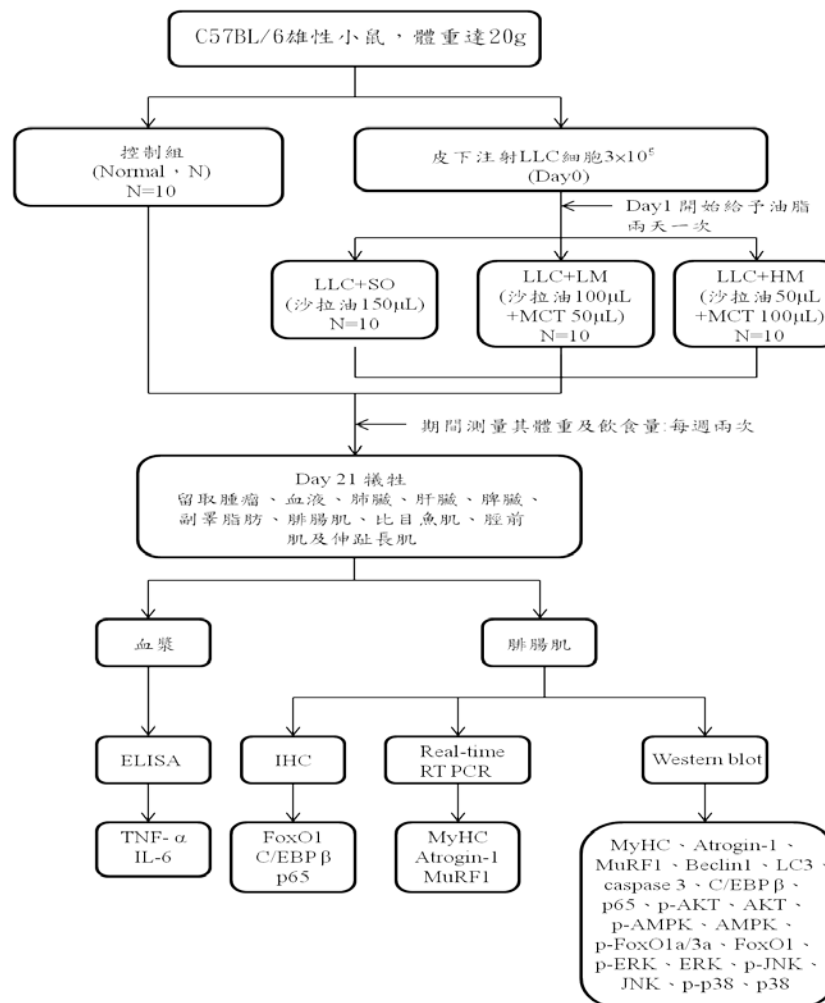
英文關鍵詞： cancer cachexia, muscle atrophy, Medium-chain triglycerides, ubiquitin-proteasome pathway, autophagy-lysosome pathway

探討中鏈脂肪合併琉璃苣油調控癌症惡病質骨骼肌肉耗損之功效及相關機制

Introduction

約 50~80%癌症病患會發生癌症惡病質，且 20~30%癌症病患的死亡與癌症惡病質有關。依癌症種類及嚴重程度，癌症惡病質的發生機率有所不同，臨床研究發現，肺癌、胃癌、胰臟癌、及大腸癌的病患易發生癌症惡病質 (Dodson et al., 2011)。癌細胞分泌的促蛋白質異化物質 (proteolysis inducing factor)及促發炎細胞激素 (proinflammatory cytokines)，可改變癌症病患神經傳導、內分泌分泌、及利用碳水化合物、脂類和蛋白質產生熱量的功效，導致癌症病患的體重減輕、肌肉和脂肪組織耗損、厭食、虛弱、及免疫系統受損等癌症惡病質症狀 (Morley et al., 2006)。癌症惡病質病患，因嚴重的肌肉組織耗損 (約 75%骨骼肌)，使病患虛弱無力、不活動 (immobility)、心肺衰竭，增加對化療毒性敏感性、及降低存活率 (Tisdale, 2010)。綜合以上可知，減緩癌症惡病質的肌肉耗損有助於改善癌症病患對疾病治療的耐受力、生活品質、及存活率。

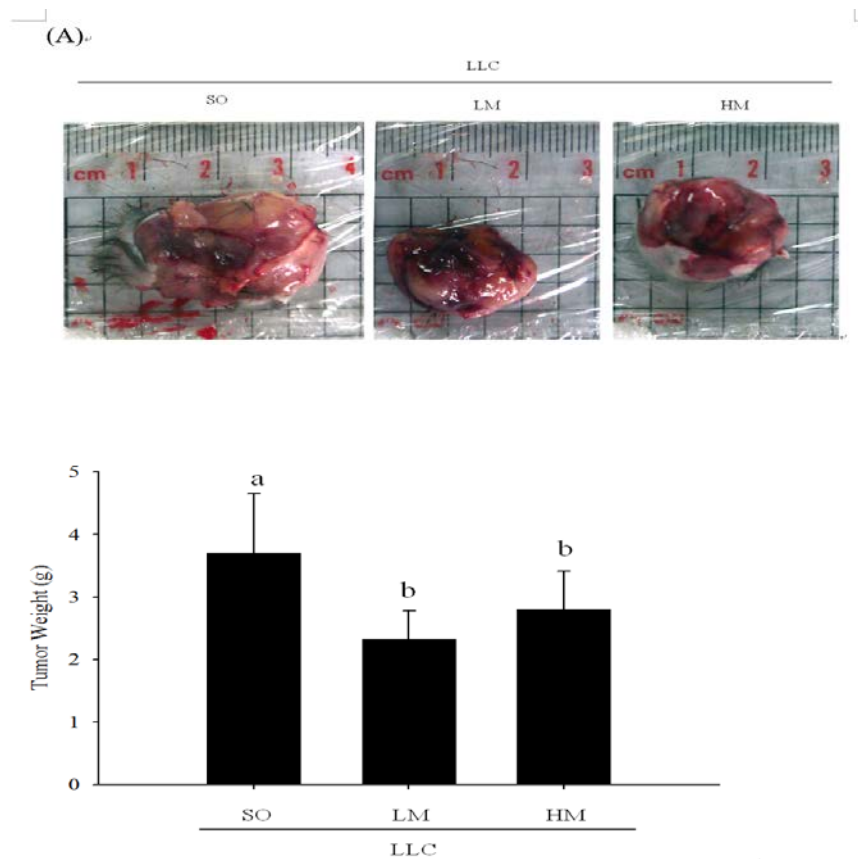
Method



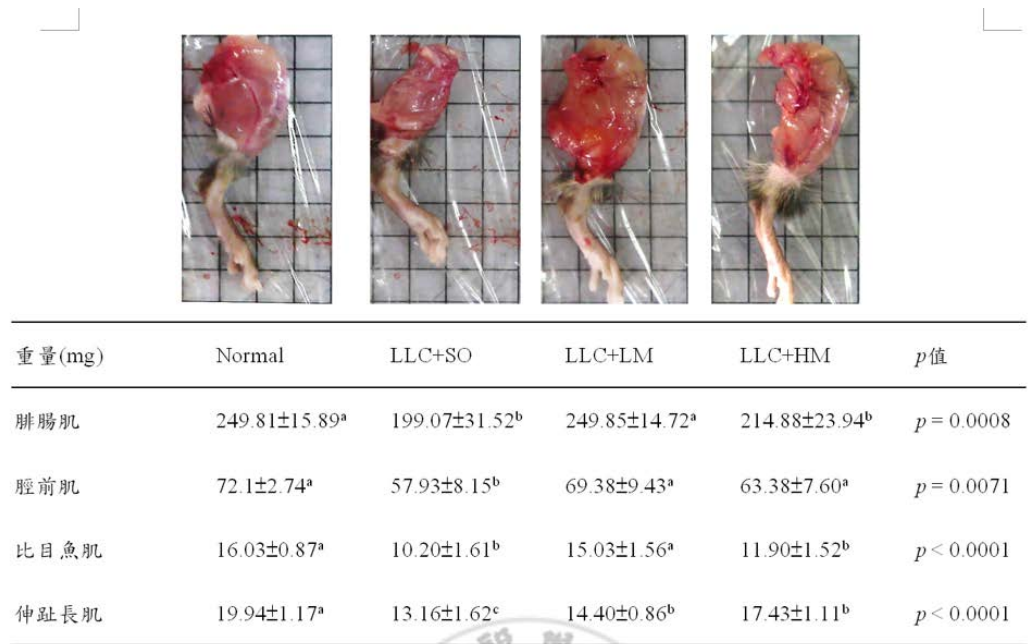
Result

表一、在路易斯氏肺癌細胞誘導小鼠肌肉萎縮模式下，中鏈三酸甘油酯對於腫瘤小鼠體重變化、進食量及臟器重量之影響

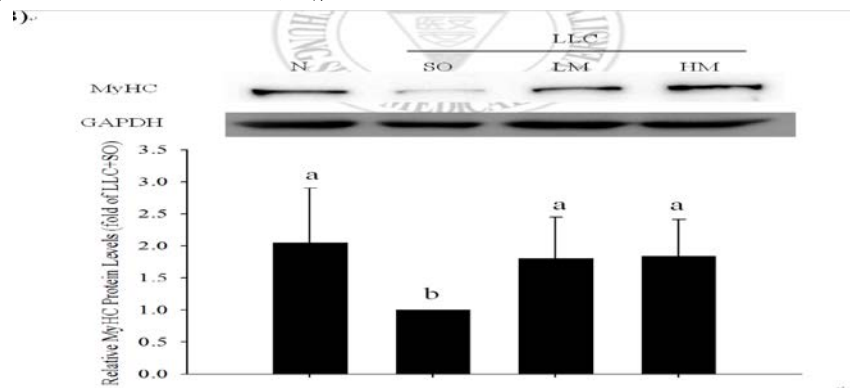
	Normal	LLC+SO	LLC+LM	LLC+HM	<i>p</i> 值
腫瘤注射後體重增加百分比(%)	8.66±1.23 ^a	-8.7±1.23 ^c	-0.43±1.73 ^b	-7.62±2.12 ^c	<i>p</i> < 0.0001
飲食量(g)	2.81±0.11 ^a	2.77±0.14 ^{ab}	2.51±0.14 ^b	2.67±0.13 ^{ab}	<i>p</i> = 0.0315
肺臟(mg)	166.59±11.79 ^c	244.42±13.31 ^a	206.17±14.49 ^b	217.62±14.71 ^b	<i>p</i> < 0.0001
肝臟(mg)	1155.09±70.84 ^a	1198.98±48.09 ^a	1168.54±30.55 ^a	1207.03±52.79 ^a	<i>p</i> = 0.2938
脾臟(mg)	77.88±5.97 ^c	168.63±23.14 ^a	135.66±18.82 ^b	178.25±14.87 ^a	<i>p</i> < 0.0001
副睪脂肪(mg)	337.27±24.81 ^a	193.33±47.02 ^c	263.60±26.08 ^b	198.27±14.38 ^c	<i>p</i> < 0.0001



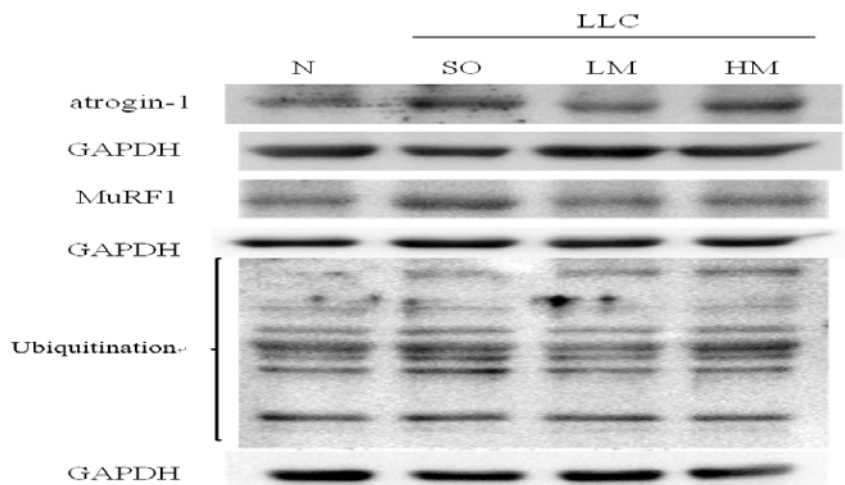
圖一、在路易斯氏肺癌細胞誘導小鼠肌肉萎縮模式下，中鏈三酸甘油酯對於腫瘤小鼠腫瘤大小及重量之影響

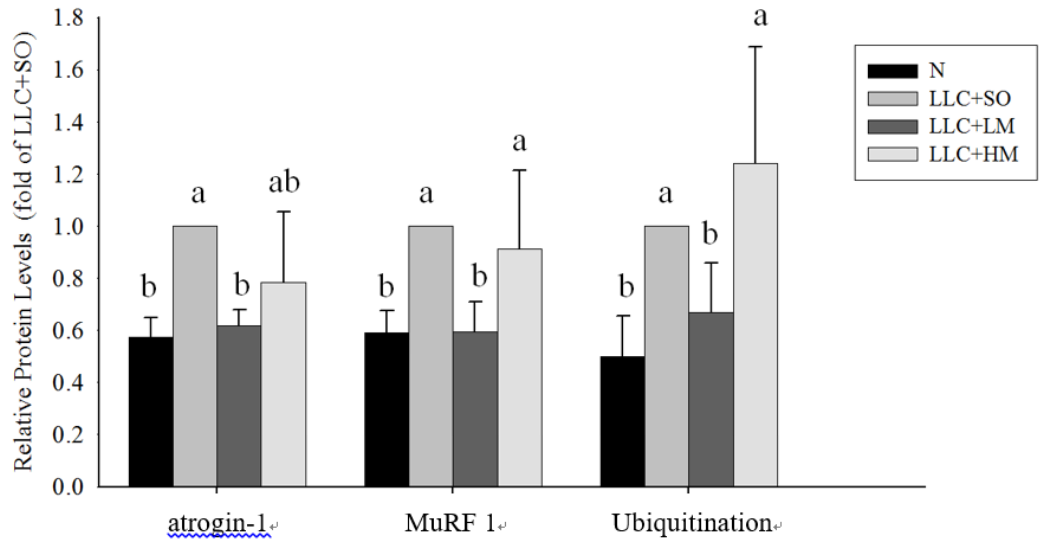


圖二、在路易斯氏肺癌細胞誘導小鼠肌肉萎縮模式下，中鏈三酸甘油酯對於腫瘤小鼠骨骼肌大小及重量之影響

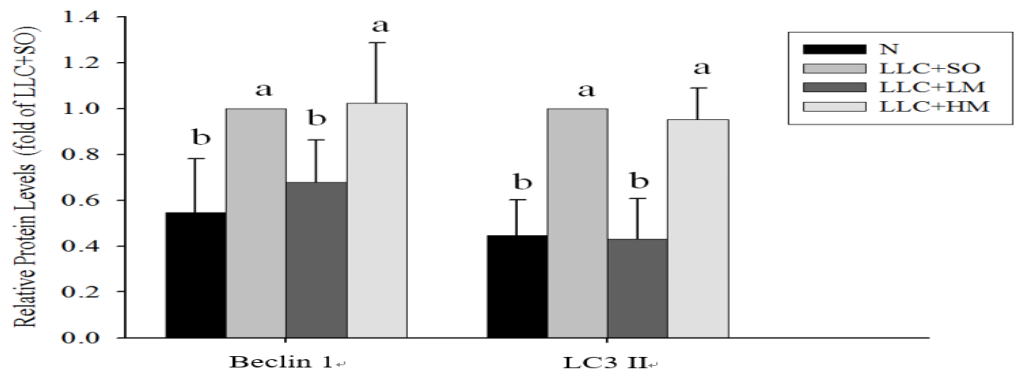
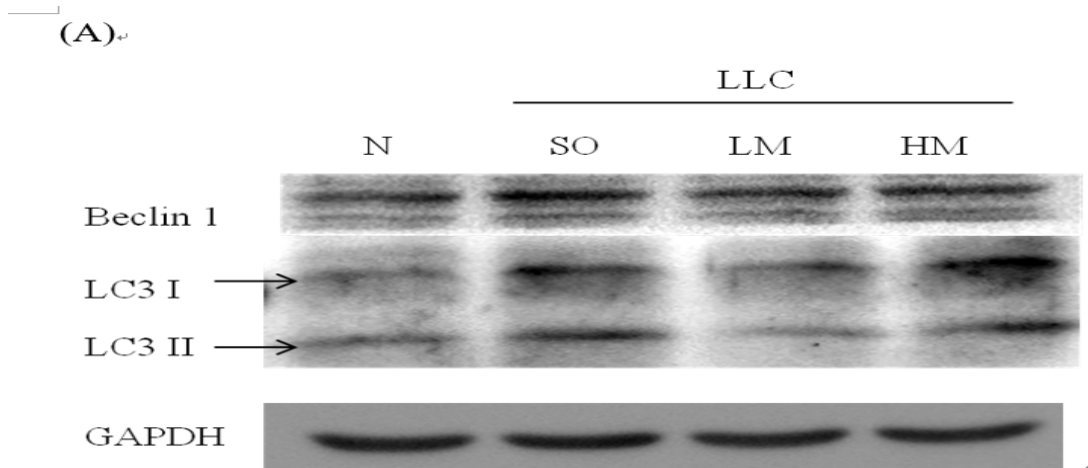


圖三、在路易斯氏肺癌細胞誘導小鼠肌肉萎縮模式下，中鏈三酸甘油酯對於腫瘤小鼠肌肉內 MyHC 表現之影響

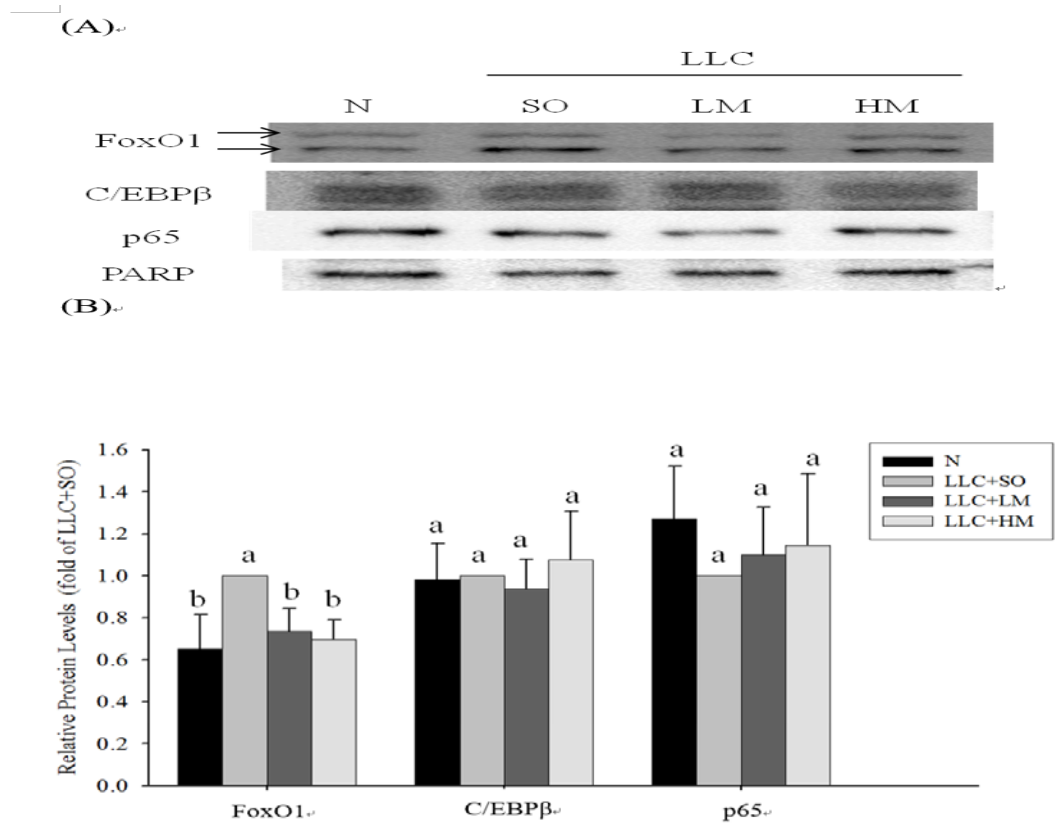




圖四、在路易斯氏肺癌細胞誘導小鼠肌肉萎縮模式下，中鏈三酸甘油酯對於腫瘤小鼠肌肉內 UPP 路徑之影響



圖五、在路易斯氏肺癌細胞誘導小鼠肌肉萎縮模式下，中鏈三酸甘油酯對於腫瘤小鼠肌肉內 ALP 路徑之影響



圖六、在路易斯氏肺癌細胞誘導小鼠肌肉萎縮模式下，中鏈三酸甘油酯對於腫瘤小鼠肌肉細胞核內轉錄因子之影響

Discussion

文獻指出，高 MCT 的生酮飲食，可減少癌症惡病質病患的體重流失，但補充 MCT 是否可對抗癌症惡病質所誘發的肌肉萎縮仍是未知的。本實驗目的是探討補充 MCT 是否可抑制癌症惡病質所引起的肌肉流失。本實驗使用路易斯氏肺癌細胞 (Lewis lung carcinoma, LLC) 來誘發 C57BL/6 小鼠癌症及肌肉萎縮，評估相較於給予沙拉油的補充，補充 MCT 是否可減少肺癌細胞誘發小鼠後腿骨骼肌肉流失及相關機制。觀察到相較於給予沙拉油的補充，補充 MCT 可減少腫瘤小鼠體重、骨骼肌及脂肪組織的流失，以及降低腫瘤重量。使用 ELISA kit 檢測發現，補充 MCT 可減少腫瘤小鼠血漿中 TNF- α 和 IL-6 的含量。以即時定量 reverse transcription-polymerase chain reaction 及西方墨點法分析腫瘤小鼠腓腸肌中肌肉蛋白指標 myosin heavy chain (MyHC) 的 mRNA 與蛋白質表現量發現，補充 MCT 可顯著抑制腫瘤小鼠腓腸肌 MyHC 的流失。此外，補充 MCT 可顯著抑制腫瘤小鼠肌肉中泛素-蛋白酶體路徑(ubiquitin- proteasome pathway)、自噬作用-溶酶體途徑(autophagy-lysosome pathway)相關路徑基因與蛋白質表現量以及降低 cleavage caspase-3 的蛋白質表現量。MCT 的補充可顯著增加腫瘤小鼠肌肉細胞質內 protein kinase B 及 forkhead box O transcription

factors (FoxOs)磷酸化蛋白質表現，及抑制細胞核內的 FoxOs 表現量。補充 MCT 不影響腫瘤小鼠肌肉 adenosine monophosphate-activated protein kinase、inhibitor -kappa B- α 及 mitogen-activated protein kinases 以及細胞核內 CCAAT/enhancer binding protein β (C/EBP β)與 nuclear factor-kappa B (NF- κ B)蛋白質表現。另外，免疫組織染色亦發現補充 MCT 可顯著減少腫瘤小鼠肌肉細胞核內 FoxOs 表現但不影響細胞核 C/EBP β 及 NF- κ B 的蛋白質表現。

Conclusion

根據實驗結果及相關文獻，證實 MCT 可藉由調控細胞內 AKT/FoxO 路徑抑制 LLC 腫瘤小鼠誘發的 UPP 及 ALP 路徑，且 MCT 也可抑制細胞凋亡以及促發炎物質的表現。綜合以上，因此 MCT 可延緩肌肉蛋白降解速率，增加癌症患者的預後及存活率。

104年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：劉凱莉		計畫編號：104-2320-B-040-008-MY2				
計畫名稱：探討中鏈脂肪合併琉璃苣油調控癌症惡病質骨骼肌肉耗損之功效及相關機制						
成果項目		量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)		
國內	學術性論文	期刊論文	0			
		研討會論文	2	篇	2014營養年會Gamma-Linolenic Acid Effectively Attenuates Skeletal Muscle Wasting in Lewis Lung Carcinoma- Induced Cachexia in Male C57BL/6 Mice 2015營養年會Effect of medium-chain triglycerides on cancer cachexia-induced muscle wasting in male C57BL/6 mice	
		專書	2	本	碩士論文：Medium-chain triglycerides effectively reduce muscle wasting in tumor-bearing C57BL/6 mice, 2015, July 博士論文：Health beneficial effects of gamma linolenic acid on improvements of muscle atrophy and insulin resistance in skeletal muscle, 2016, June	
		專書論文	0	章		
		技術報告	0	篇		
		其他	0	篇		
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	
				已獲得	0	
				新型/設計專利	0	
		商標權		0		
		營業秘密		0	件	
		積體電路電路布局權		0		
著作權			0			
品種權			0			
其他			0			
技術移轉	件數		0	件		
	收入		0	千元		
國外	學術性論文	期刊論文	0	篇		
		研討會論文	0			
		專書	0	本		

		專書論文		0	章	
		技術報告		0	篇	
		其他		0	篇	
智慧財產權 及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件	
			已獲得	0		
		新型/設計專利	0			
		商標權	0			
		營業秘密	0			
		積體電路電路布局權	0			
		著作權	0			
		品種權	0			
		其他	0			
技術移轉	件數	0	件			
	收入	0	千元			
參與計畫人力	本國籍	大專生	0	人次	對於參與之工作人員，預期可獲之訓練 (一)、癌細胞培養與以癌細胞誘發小鼠癌症惡病質的動物模式。 (二)、西方墨點法、即時定量反轉錄聚合酶鏈鎖反應，及EMSA assay。 一、C2C12肌纖維母細胞分化成為肌纖維細胞及製備含癌細胞培養基的conditioned media。 二、西方墨點法、即時定量反轉錄聚合酶鏈鎖反應、EMSA assay、及reporter gene Assay。	
		碩士生	4			
		博士生	1			
		博士後研究員	0			
		專任助理	0			
	非本國籍	大專生	0			
		碩士生	0			
		博士生	0			
		博士後研究員	0			
		專任助理	0			
其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)						

科技部補助專題研究計畫成果自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現（簡要敘述成果是否具有政策應用參考價值及具影響公共利益之重大發現）或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以100字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形（請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊）

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以200字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，以500字為限）

給予營養不良病患營養支持的管灌配方常以MCTs取代部份LCTs，以增加病患利用脂肪作為熱量來源的效率。本計畫研究結果，有助於了解高MCTs飲食調控癌症惡病質小鼠骨骼肌耗損的功效。此外，本計畫探討MCTs/LCTs飲食合併補充琉璃苣調控癌症惡病質小鼠骨骼肌耗損的功效，除可增加對癌症惡病質飲食介入的接受性外，亦可以增加癌症惡病質以脂肪作為熱量來源的效率和提升GLA改善癌症惡病質的功效。據本研究結果，修改飲食或管灌配方中脂肪的種類及含量，可改善癌症惡病質骨骼肌肉耗損，有助於提升癌症病患對疾病治療的耐受力、生活品質及存活率

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值： 否 是，建議提供機關

（勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關）

本研究具影響公共利益之重大發現： 否 是

說明：（以150字為限）