



國立臺灣大學醫學院藥學系

學士班學生論文

Department of Pharmacy
College of Medicine

National Taiwan University

Bachelor's Thesis

以細胞及動物模型探討

大麻類藥物對大腸直腸癌的影響

Studying Effects of Cannabinoids on

Colorectal Cancer Using Cell and Animal Models

林文嶠

Wen-Yen Lin

指導教授：魏子堂 博士

Advisor: Tzu-Tang Wei, Ph.D.

中華民國110年4月

April 2021

國立臺灣大學學士班學生論文
口試委員會審定書



以細胞及動物模型探討

大麻類藥物對大腸直腸癌的影響

Studying Effects of Cannabinoids on

Colorectal Cancer Using Cell and Animal Models

本論文係林文崙（B05403044）在國立臺灣大學藥學系完成之學士班學生論文，於民國 110 年 04 月 16 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

魏子堯

（簽名）

（指導教授）

楊宗堯

蔡中倫


系主任：

沈麗娟

（簽名）

（是否須簽章依各院系規定）

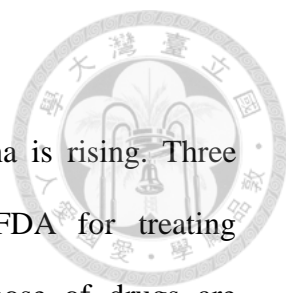
中文摘要



大麻在全球的使用逐漸增加，無論是作為醫療或是娛樂用途⁽¹⁾。臨床上，目前已有三種 FDA 核可的大麻類藥物被用來治療化療造成的噁心嘔吐，這三種藥物皆開發自大麻的主成分 Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC)，目前已知此類成分是透過 G-protein coupled cannabinoid receptors 之 CB1、CB2 而產生作用^(2,3)。雖然已有許多臨床研究在探討不同癌症風險與大麻使用頻率的相關性，然而現階段的證據強度仍不足。因此，人們仍不清楚大麻類成分是否與腫瘤細胞有交互作用，進而影響到腫瘤生長及治療。我們先是觀察到在大腸直腸癌中，不論是人類的資料或是我們所建立的小鼠模型皆表現較多的 CB1 及 CB2 受體，而在小鼠模型中更是觀察到處理 Δ^9 -THC 會使得腫瘤生長以及血管新生受到促進。接著我們在分析了大腸直腸癌細胞的 conditioned medium 發現到有五種 growth factors 會受到 Δ^9 -THC 的誘導而表現量上升，這使得 conditioned medium 能夠促進人類誘導性多功能幹細胞分化出的內皮細胞 (hiPSC-VECs) 的血管新生以及爬行能力。最後則透過這五種 growth factors 找尋到了上游的 STAT1。 Δ^9 -THC 能夠促進 STAT1 的入核來增加 growth factors 的表現量，更進一步導致腫瘤的生長以及血管新生。本次研究說明了大麻會促進大腸直腸癌的生長，未來臨床上我們可以透過抑制 STAT1 的方式來減少這種副作用的發生。

關鍵詞：大麻； Δ^9 -THC；大腸直腸癌；腫瘤生長和轉移；血管新生

英文摘要



Nowadays, the using of medical and recreational marijuana is rising. Three kinds of medical marijuana have been approved by the FDA for treating chemotherapy-induced nausea and vomiting, and anorexia. Those of drugs are developed from Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), active ingredient in marijuana, and display therapeutic effect through cannabinoid receptors, CB1 and CB2 receptors. Although there are lots of research discuss the association between marijuana and different cancer risk, it is still lack of evidence. Thus, it is unclear between the interaction between marijuana and tumor cells, which could influence tumor growth and treatment. Here we demonstrated the oncogenic role of cannabinoid receptors in colorectal cancer (CRC) by disclosing upregulation of CB1 and CB2 receptors in patients with CRC and mouse models. Δ^9 -THC induced tumor growth and angiogenesis in mouse models. A human growth factor antibody array indicated that Δ^9 -THC promoted the secretion of five growth factors in CRC cells, leading to the induction of tube formation and migration in human induced pluripotent stem cell-derived vascular endothelial cells (hiPSC-VECs). The nuclear translocation of STAT1 played important roles in Δ^9 -THC-induced angiogenesis and those effects would reverse after STAT1 inhibition. This study demonstrates that marijuana might increase the risk of CRC progression and that inhibition of STAT1 is a potential strategy for attenuating these adverse effects.

Key words: marijuana, Δ^9 -THC, CRC, tumor proliferation and metastasis, angiogenesis

目錄



口試委員會審定書.....	i
中文摘要.....	ii
英文摘要.....	iii
第一章前言.....	1
第二章文獻探討.....	2
第三章研究方法.....	4
第四章結果與討論.....	7
4.1 結果.....	7
4.2 討論.....	16
4.3 結論.....	17
參考文獻.....	18
研究相關發表.....	21

圖目錄

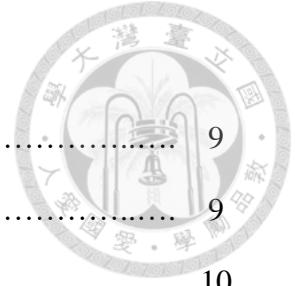


Figure 1.....	9
Figure 2.....	9
Figure 3.....	10
Figure 4.....	10
Figure 5.....	11
Figure 6.....	11
Figure 7.....	12
Figure 8.....	12
Figure 9.....	13
Figure 10	14
Figure 11	15
Figure 12	15

表目錄

Table 1.....	3
--------------	---

第一章前言

全球有超過兩百萬位大麻吸食者，美國已經有十個州能夠合法使用娛樂大麻，歐亞地區的使用者也逐漸增加，也因此大麻對於健康的衝擊便受到全世界的關注⁽⁴⁾。除了娛樂用途的大麻之外，臨床上也有三種 FDA 核可的合成大麻藥物，包括 Marinol[®] (dronabinol)、Syndros[®] (dronabinol)、Cesamet[®] (nabilone)，主要用途為緩解化療的噁心嘔吐以及促進 HIV 患者的食慾。這表示這些大麻藥物會運用在許多癌症病人的身上，其中大腸直腸癌便是常見會使用大麻藥物作為緩解治療的癌別^(5,6)。

Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) 為大麻的主成分，能透過大麻受體發揮其生理效果。大麻受體屬於 G protein coupled receptor (GPCR)，目前已知有 CB1 及 CB2 兩種受體，CB1 廣泛分布在大腦以及周邊組織（心血管系統、消化系統等），CB2 則主要分布在免疫細胞⁽⁷⁾。近年來有許多研究發現到在不同種類的腫瘤組織中，都能發現到大麻受體的過度表現⁽⁸⁾。

人類誘導性多功能幹細胞 (hiPSC) 能透過將四種 Yamanaka factors 送入體細胞 reprogramming 而來^(9,10)。除了保有良好的多能性外，相較於胚胎幹細胞也有較少倫理上的疑慮。hiPSC 目前已經廣泛被運用在藥物開發、疾病模式的領域，此外還可以製造出 patient-derived 之細胞株，因此是個很好的研究平台⁽¹¹⁾。

大腸直腸癌為全世界盛行率相當高的一種癌別，這使我們好奇大麻究竟對於大腸直腸癌如此重要的疾病有多少的影響。因此我們便想透過本篇研究來觀察大麻對於大腸直腸癌生長情況的直接影響，並更進一步探討腫瘤為環境以及分子機制。我們在 AOM/DSS 誘導大腸直腸癌以及肺轉移的小鼠模型中發現到 CB1 及 CB2 受體有過度表現的狀況，並在 in vivo 下觀察到 Δ^9 -THC 能夠促進腫瘤的生長以及血管新生。此外， Δ^9 -THC 處理的 HCT116 conditioned medium 能夠促進 hiPSC-VECs 的血管新生以及爬行能力。透過分析 conditioned medium 我們便找到了五種血管新生相關的 growth factors 會受到 Δ^9 -THC 的誘導，再利用免疫螢

光染色以及 ChIP assay 發現到 STAT1 的入核在其中扮演相當重要的角色。當我們給予 STAT1 antagonist (fludarabine) 以及 CRISPR-Cas9 knock out STAT1 之下， Δ^9 -THC 對於腫瘤的促進效果便顯著地被抑制。在本篇研究中，我們發現 Δ^9 -THC 會透過 STAT1 來調控腫瘤細胞以及內皮細胞間的 cross-talk，並進一步促進腫瘤生長以及血管新生，利用 STAT1 antagonist 來處理 Δ^9 -THC 促進腫瘤的效果便可做為臨床應用的參考。

第二章文獻探討

1. 臨床研究報導：吸食大麻與癌症的相關性⁽¹²⁾

隨著社會對大麻的接受度提高及大麻的合法化，使社會開始更關注大麻對健康的影響，也因此出現了許多篇關於大麻使用與癌症風險的相關報導。JAMA 期刊於 2019 年底發表了一篇 review 文章 (JAMA Netw Open. 2019 Nov 1;2(11):e1916318)，文章中收集了 25 篇相關的臨床研究來回顧目前發現到大麻使用頻率與不同癌症風險的相關性，當中提到吸食大麻的副作用與菸草類似，皆會造成氣管發炎及增加致癌風險，有研究指出大麻可能會增加致癌基因的表現；然而於其他研究中也有報導指出大麻可能會抑制腫瘤的生長及血管新生，這兩種截然不同的作用導致相反的結果，目前也尚未有一個定論，大麻對腫瘤的直接作用仍不清楚。

根據文章中整理的資料可發現，大麻確實會增加許多癌症發生的風險，包括肺癌、頭頸癌、鼻咽癌、睪丸癌、移行上皮細胞癌、攝護腺癌、子宮頸癌、卡波西氏肉瘤及膠質母細胞瘤，然而絕大部分的證據強度為不足，僅頭頸癌及睪丸癌的證據強度為低度相關。在這類的臨床研究中仍存在著許多限制，免不了存在著許多 bias，也缺乏長期暴露追蹤的研究。受試者的條件也相當的嚴苛，為了盡量排除其他因素對研究造成的影響，受試者應挑選只吸食大麻而不能同時吸食其他菸草類的物質，這使得很難收到更大的樣本數。因此，我們希望透過單純的細胞及動物實驗來釐清大麻類藥物對腫瘤本身或腫瘤微環境的影響。

2. 下表統整出不同文章發表關於大麻成分對於不同癌症之影響和文章當中所使用的 Δ^9 -THC 劑量：

Table 1. Δ^9 -THC 對於不同癌症的作用

Cancer type	Material	Δ^9 -THC dose	Effect ^b
Leukemia ⁽¹³⁾	Jurkat	10~75 μ M	抑制 proliferation
		40~75 μ M	促進 apoptosis
	MOLM13	10~75 μ M	抑制 proliferation
		35~75 μ M	促進 apoptosis
CRC ^{a(14)}	SW480	2.5~12.5 μ M	促進 apoptosis
	HCT-15		
	HT29		
	HCA7		
NSCLC ^{a(15)}	A549	5~15 μ M	促進 migration 促進 invasion
	SW1573	10 μ M	促進 migration
	SCID mice (A549)	5 mg/kg	抑制 proliferation
Breast cancer ⁽¹⁶⁾	BALB/c mice (4T1)	25 or 50 mg/kg	促進 proliferation 促進 migration
	SCID mice (4T1)	25 mg/kg	不影響 proliferation 不影響 migration
HNSCC (HPV ⁺) ^{a(17)}	UD-SCC-2	1 μ M	促進 proliferation 促進 migration
	UPCI:SCC090		
	UM-SCC-47		
	93VU147T		抑制 proliferation
	NU/J mice (UD-SCC-2)	3 mg/kg	促進 proliferation

a. Colorectal cancer (CRC) ; non-small cell lung cancer (NSCLC) ; head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) ; human papilloma virus (HPV)

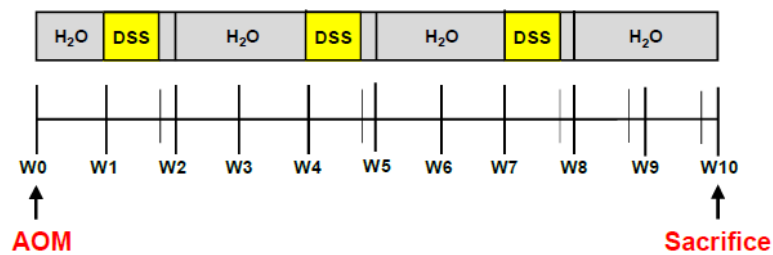
b. 利於腫瘤生長的以”紅色標示”；抑制腫瘤生長的以”藍色標示”；不太影響腫瘤生長的以”綠色標示”

上表整理了 PubMed 找到的五篇關於研究 Δ^9 -THC 對不同癌症影響的論文，

包含了 in vitro 及 in vivo 的實驗。我們發現， Δ^9 -THC 對於不同癌症的影響是不盡相同的，可以分別觀察到抑制及促進腫瘤生長的作用，然而抑制腫瘤的結果大多是在較高劑量的 Δ^9 -THC 所觀察到的。因此，本次研究我們將採用較低且符合臨床應用的 Δ^9 -THC 劑量來進行實驗。值得一提的是，在上表 Δ^9 -THC 對乳癌的影響的研究中發現到，CB1 及 CB2 在該種類的乳癌細胞中表現量非常低，但在免疫功能正常的小鼠上仍可觀察到 Δ^9 -THC 能促進癌細胞生長及轉移，而在免疫功能缺陷的小鼠上則無法見到此現象，藉此可以說明 Δ^9 -THC 對於腫瘤的影響除了透過 CB1 及 CB2，也可能透過影響免疫系統或腫瘤微環境來對腫瘤產生作用。

第三章研究方法

Animal models of AOM/DSS-induced CRC



實驗室已建立 AOM/DSS 誘導之大腸直腸癌小鼠模型：我們將小鼠腹腔注射 AOM 致癌物質(12.5 mg/kg)，之後於隔週提供含有 DSS 的水給小鼠持續操作 3 輪，於第 10 週犧牲小鼠，可觀察到小鼠大腸直腸癌腫瘤的生成。

MTT assay

在 96-well plate 中以低到高劑量的 Δ^9 -THC (0~20 μ M) 處理大腸直腸癌細胞株 (HCT116、SW480、RKO) 24 及 48 小時，接著加入 MTT reagent 反應 6 小時後並加入 DMSO 測量 550 nm 之吸光值，藉此找尋最佳的 Δ^9 -THC 研究劑量 (non-cytotoxic doses)。

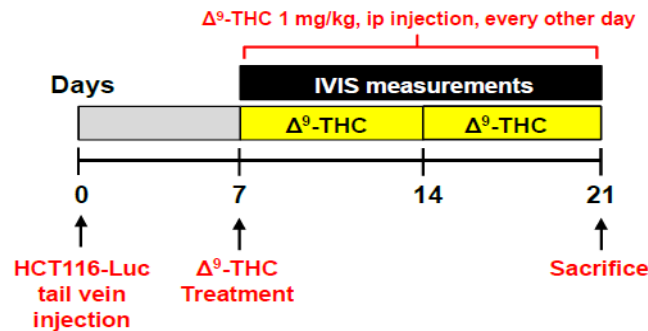
Transwell migration assay

在 24-well plate 的 insert 中以 5 μ M 及 10 μ M 的 Δ^9 -THC 處理培養在 serum-free medium 的大腸直腸癌細胞株 (HCT116、SW480、RKO) 24 小時，並在 well 中

加入 complete culture medium，接著用 1% formaldehyde 固定細胞 10 分鐘，再以 0.1% crystal violet 染色 10 分鐘，最後用顯微鏡拍攝並以 Image J 定量爬行的細胞數。藉此評估 Δ^9 -THC 是否影響大腸直腸癌細胞爬行的能力。

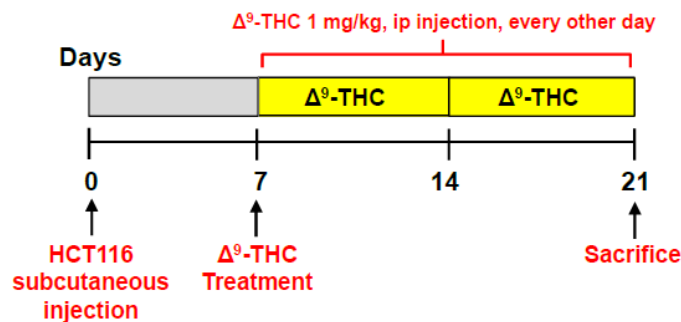


Lung metastasis mouse model treated Δ^9 -THC



實驗室已建立帶有冷光表現的 HCT116 細胞株 (HCT116-Luc)，我們後續會利用小鼠尾靜脈注射的方式，建立大腸直腸癌細胞肺臟轉移的動物模型，並於第 7 天開始每兩天以 1 mg/kg 劑量的 Δ^9 -THC 對小鼠進行腹腔注射持續兩週，同時利用 IVIS 儀器監測腫瘤的生長情況，最後於第 21 天進行犧牲。

Xenograft mouse model treated Δ^9 -THC



HCT116 在小鼠 (Male BALB/c nude mice) 背部進行皮下注射，於第 7 天開始每兩天以 1 mg/kg 劑量的 Δ^9 -THC 對小鼠進行腹腔注射持續兩週，同時測量腫瘤的大小，最後於第 21 天進行犧牲。

Differentiation of hiPSC-VECs

從 Taiwan Human Disease iPSC Service Consortium Resource Center 取得人類 iPSC，並在 Matrigel coating 的 dish 上使用 E8 及 ROCK inhibitor Y-27632 貼盤培養，當 iPSC 長至 85% 的滿度後開始分化。先使用 RPMI medium + B27 supplement without

insulin + CHIR99021 (6 $\mu\text{mol/L}$) 每兩天換一次 medium, 共四天。接著使用 EGM-2 medium + VEGF (20ng/ml) + FGF2 (10ng/ml) 每兩天換一次 medium, 共十二天。最後使用 anti-CD144 MicroBeads 做 sorting, 篩選出內皮細胞。



Tube formation assay

將細胞培養後加入藥劑, 48 小時後收下細胞並以 1×10^5 的細胞量種於 Matrigel basement membrane matrix, 12 小時後即可觀察、定量 tube formation 的現象。

Human growth factor antibody array

我們收集 Δ^9 -THC 處理下培養 HCT116 的 conditioned medium, 利用 Human Growth Factor Antibody Array (40 Targets) - Quantitative (ab197445) 分析不同 Δ^9 -THC 劑量處理下, 腫瘤細胞分泌出來的生長因子。使用 HRP-conjugated streptavidin 並以 UVP 做偵測及分析。

Chromatin immunoprecipitation and quantitative PCR (ChIP-qPCR) assay


將 HCT116 處理 5 μM Δ^9 -THC 12 小時, 加入 2% formaldehyde 15 分鐘進行 cross-linked, 接著將細胞收集至 PBS 中離心並加入 1 ml 含 protease inhibitor 的 IP buffer, 將得到的 nuclear pellet 震搖分散在 IP buffer 中。使用 control rabbit IgG 或 anti-STAT1 antibodies 進行 ChIP assays, 並利用 10% Chelex 萃取出 immunoprecipitated DNA 及 input DNA, 最後將之煮沸達到 reverse cross-linking 的效果, 以離心將 Chelex 移除。

Gene knockout using CRISPR/Cas9 system

CRISPR vectors 表現 Cas9 及 STAT1sgRNA 轉染到 HCT116 中, 能以偵測綠螢光來判斷 transfect 成功與否。最後挑選出有表現出綠色螢光的 monoclonal 來做培養放大。

第四章結果與討論


1. 結果



我們分析 NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) browser 當中關於 CB1 與 CB2 在各種癌症的數據中發現，在許多人類腫瘤組織或細胞中，CB1 及 CB2 的表現量相對於正常細胞有增加的趨勢，其中又以大腸直腸癌中 CB1 及 CB2 表現量增加最為突出。因此，我們預計以大腸直腸癌細胞株探討大麻類藥品對腫瘤細胞之影響。NCBI GEO database 顯示，不論是原位或轉移性大腸直腸癌組織，其 CB1 與 CB2 表現都比正常腸細胞有增加的趨勢 (**Figure 1**)。我們進一步分析 AOM/DSS 誘導大腸直腸癌的小鼠腸組織，以及利用 HCT116 大腸直腸癌尾靜脈注射所建立的肺轉移小鼠模型，也觀察到 CB1 與 CB2 都比正常細胞有表現量增加的趨勢(**Figure 2**)。這些結果顯示，CB1 和 CB2 可能在大腸直腸癌 tumorigenesis 過程中扮演重要角色。

於是我們進一步想探討 Δ^9 -THC 是否會影響大腸直腸癌細胞的增生。MTT 結果顯示，在生理劑量下 Δ^9 -THC 不會影響大腸直腸癌細胞的 cell viability (**Figure 3**)。經由 transwell migration assay 進一步發現，在不影響 cell viability 的 Δ^9 -THC 生理劑量之下， Δ^9 -THC 會明顯促進大腸直腸癌細胞爬行之能力 (**Figure 4**)。

接著我們想利用 xenograft mouse model 在 in vivo 中觀察 Δ^9 -THC 對腫瘤生長的影响。在 Δ^9 -THC 的處理下，我們發現到 Δ^9 -THC 能發揮已知增加食慾的效果使得小鼠的飲食及飲水皆增加。我們更發現到 Δ^9 -THC 會使得腫瘤生長得更好更大顆 (**Figure 5**)。我們將腫瘤組織切片染色分析後發現到 Δ^9 -THC 會促進血管新生的 marker (CD31、VEGF) 表現量增加，而 VEGF 的表現更與腫瘤的大小呈顯著的相關性 (**Figure 6**)。我們也在另一種動物模型 HCT116 大腸直腸癌尾靜脈注射所建立的肺轉移小鼠模型中觀察到一樣的現象， Δ^9 -THC 能夠促進腫瘤的生長、促進血管新生。從這裡的結果我們可以推論出 Δ^9 -THC 促進腫瘤生長與其促進血管新生的效果有關 (**Figure 7 & 8**)。

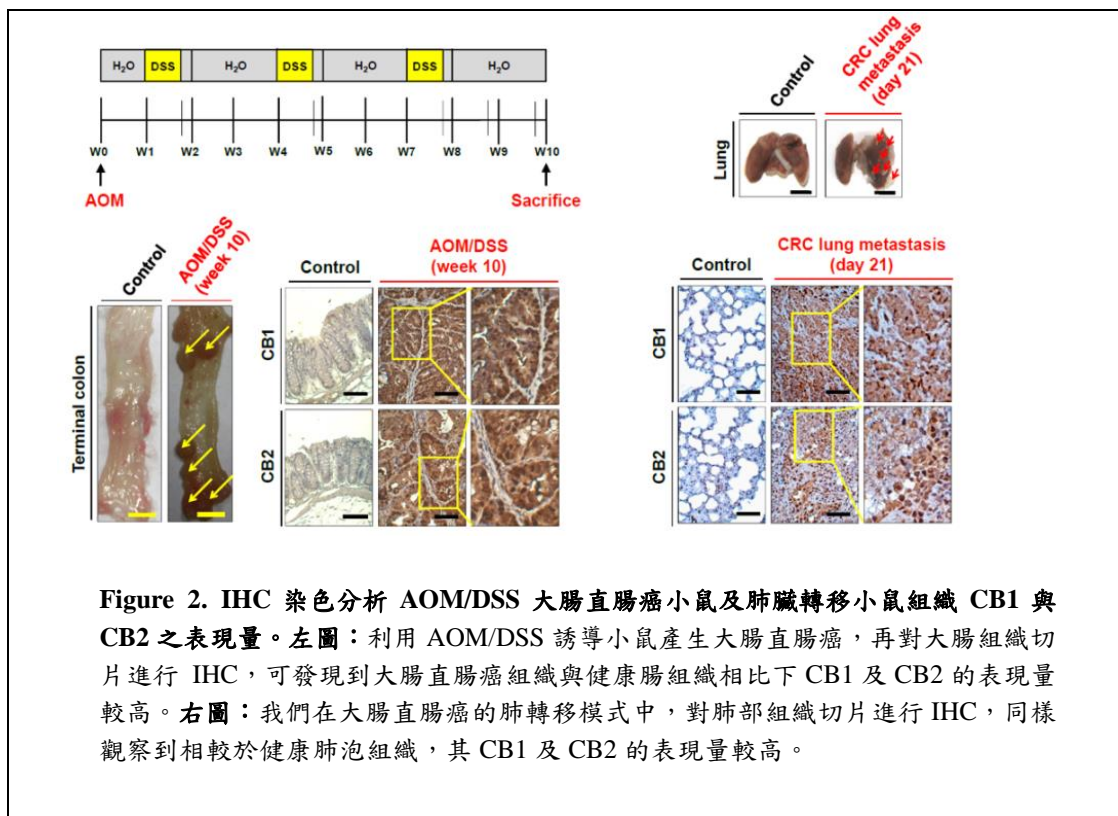
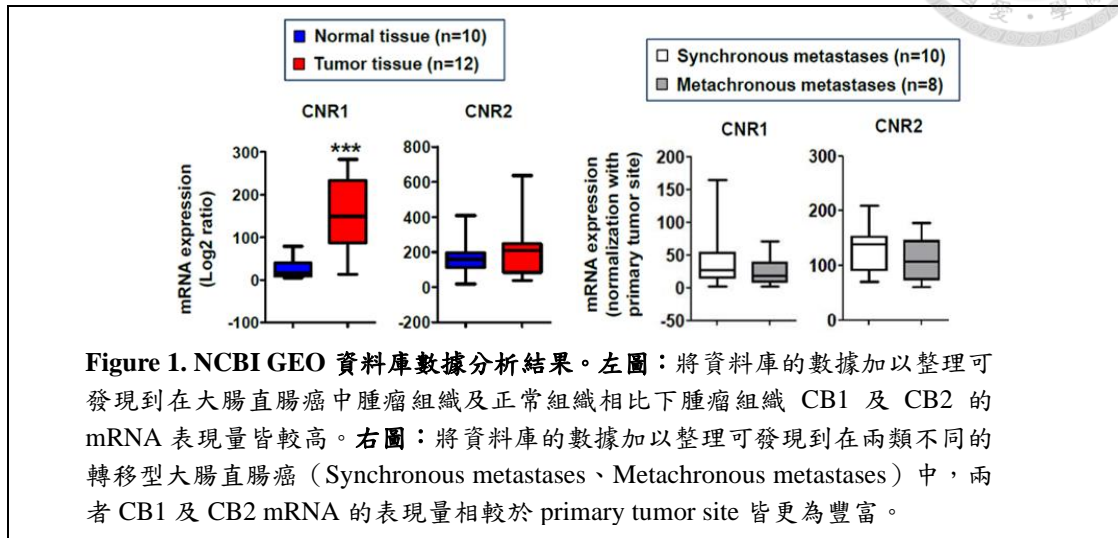


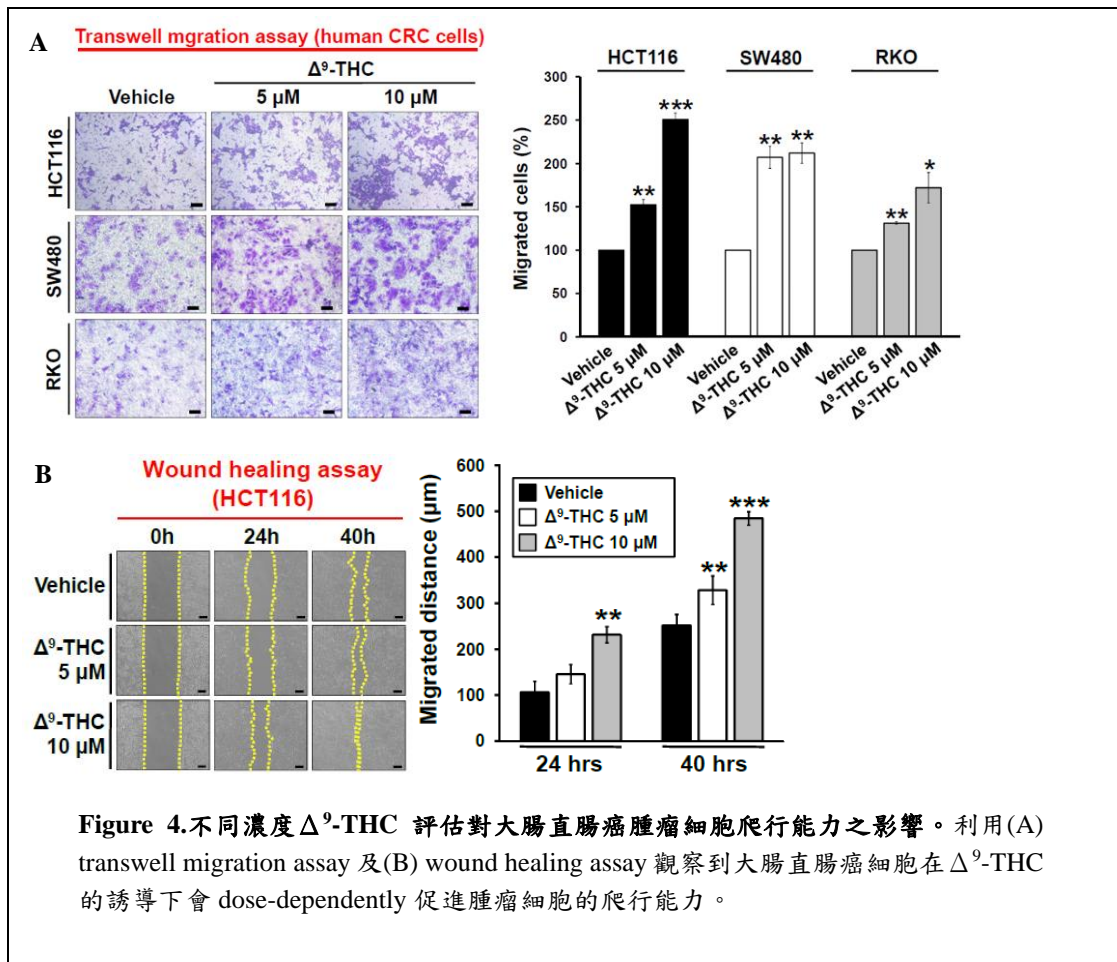
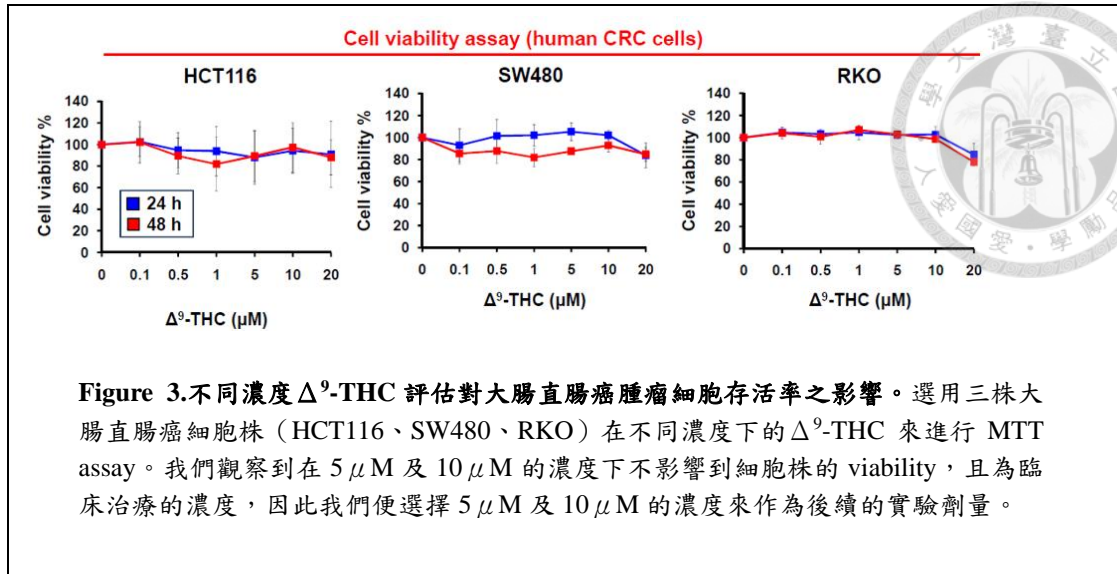
由於血管新生的作用來自於腫瘤細胞與內皮細胞交互作用的效果，進而促進腫瘤的生長，因此我們便想在 *in vitro* 下透過 hiPSC-VECs 來探討 Δ^9 -THC 如何去影響到 hiPSC-VECs 與大腸直腸癌細胞間的交互作用⁽¹⁸⁾。我們收集了 Δ^9 -THC 處理下的 HCT116 conditioned medium (HCT116 CM)，發現到若將 hiPSC-VECs 處理 HCT116 CM，內皮細胞的血管新生能力及爬行能力的明顯的增加了，因此推測 Δ^9 -THC 可能透過促進 HCT116 分泌 growth factor 來影響到內皮細胞的生長狀況。在分析了 HCT116 CM 後，我們發現到其中有五種 growth factors 的表現量明顯增加，分別為 GDNF、IGFBP6、IGF2、SCF、VEGFA，而這些 growth factors 也確實調控了許多與細胞增生、代謝相關的訊息傳遞路徑。我們再利用 UCSC Genome Browser 進行分析，發現到了這五種 growth factors 的 promoter regions 上有共同的十一種 transcription factor binding sites。我們實驗後也發現到 Δ^9 -THC 並不會影響到這十一種 transcription factors mRNA 的表現。在我們進一步探討 STAT1 時發現到，雖然 STAT1 的蛋白表現同樣不會受到 Δ^9 -THC 的影響，但在免疫螢光染色的結果卻發現到 STAT1 會受到 Δ^9 -THC 的誘導下而由細胞質移動到細胞核中並接合到這五種 growth factors 的 promoters 上 (**Figure 10**)。

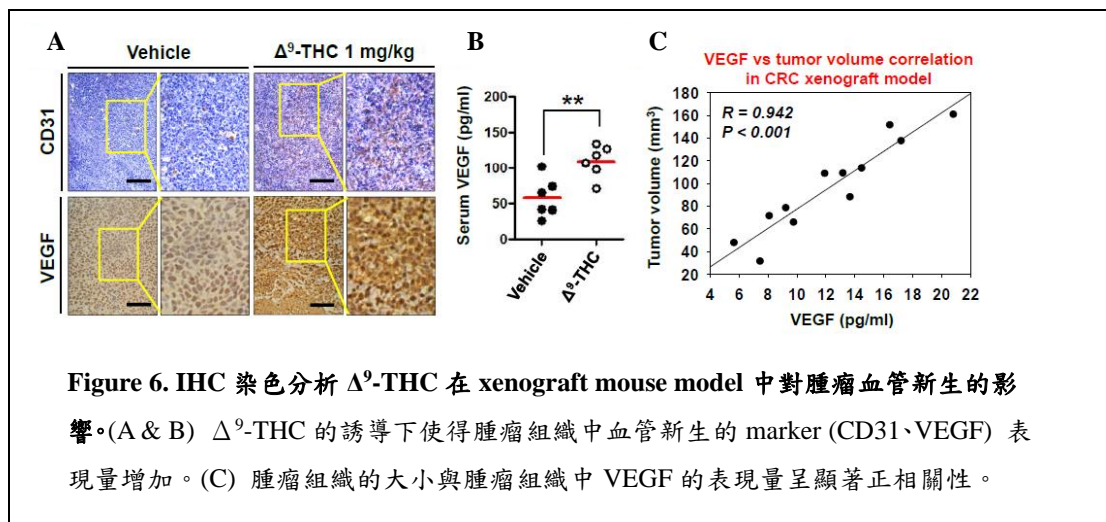
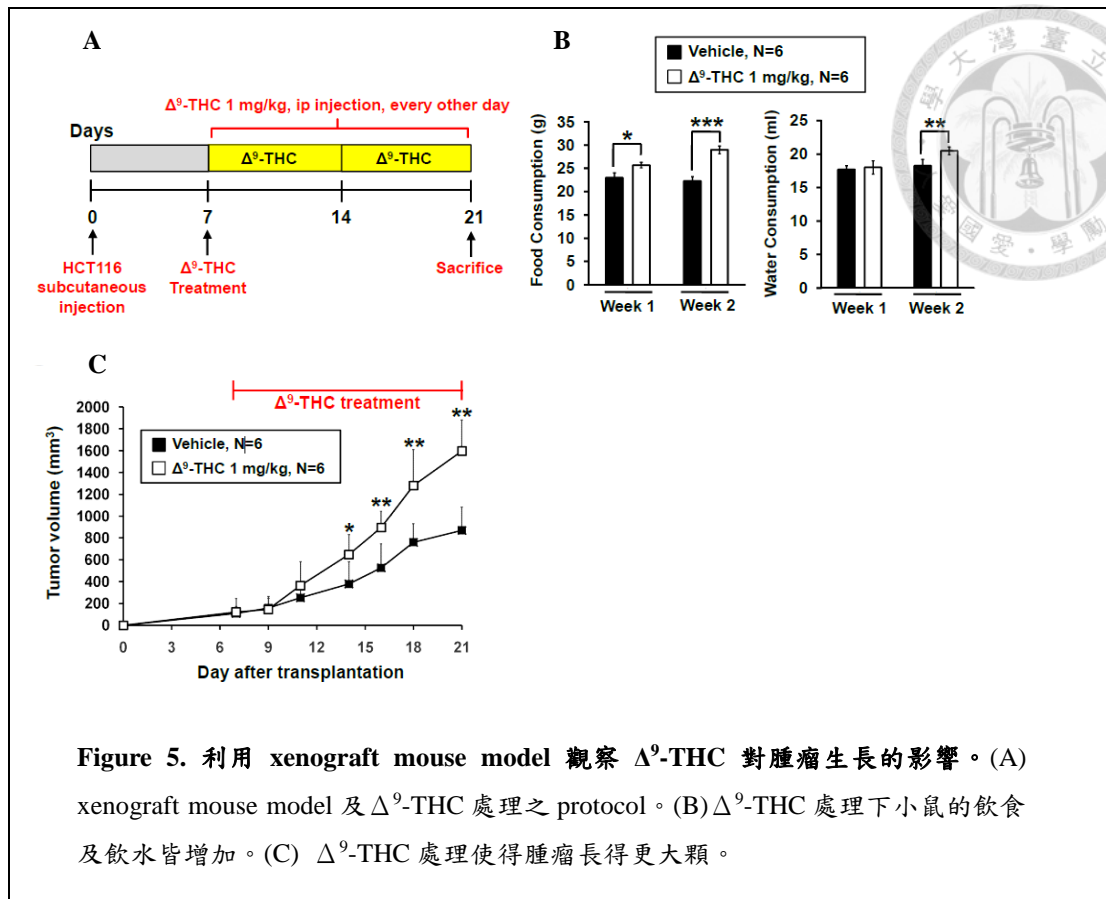
為了確定 Δ^9 -THC 是透過 STAT1 來對這五種 growth factors 進行調控，我們分別使用了 STAT1 antagonists (fludarabine) 以及 CRISPR/Cas9 的技術抑制 STAT1 的作用，來觀察這五種 growth factors 的變化。在兩種的實驗方法下我們都觀察到了 STAT1 受到抑制下，這五種 growth factors 的表現量即使在 Δ^9 -THC 處理後也沒有顯著的提升。這便說明了 Δ^9 -THC 能透過 STAT1 來調控這五種 growth factors 的表現 (**Figure 11**)。

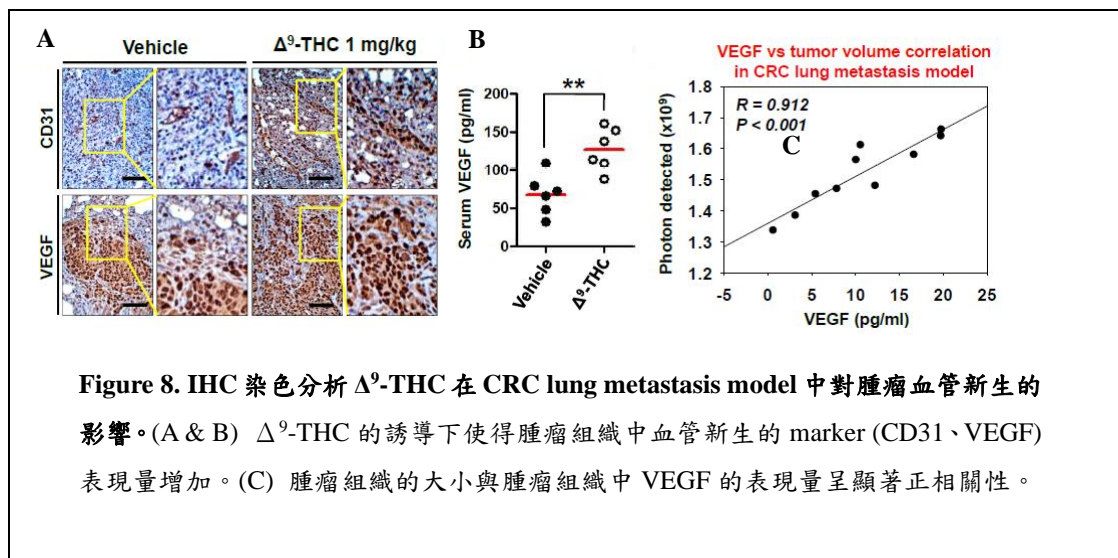
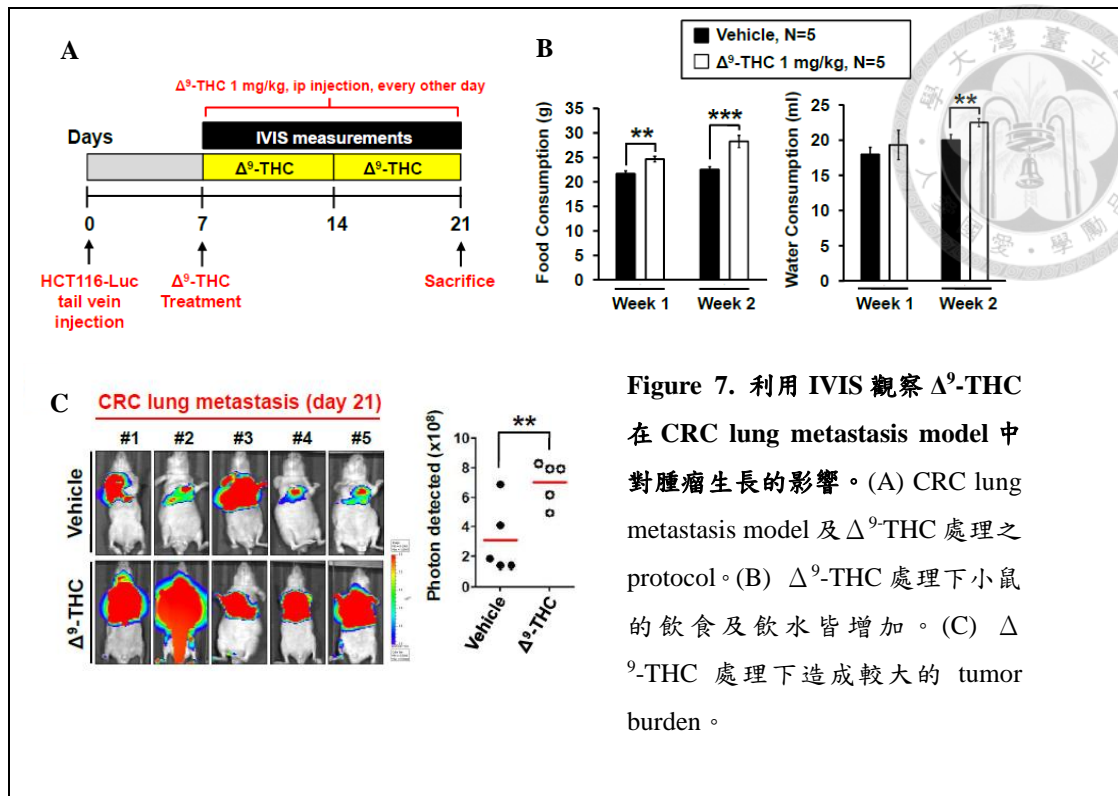
最後，我們想確定 Δ^9 -THC 是否是透過 STAT1 來對腫瘤細胞造成影響。我們選擇了 xenograft mouse model 來進行 *in vivo* 的觀察，我們將 STAT1 wild type 以及 STAT1 knock out 的 HCT116 分別種在同一隻小鼠背部的兩側。在處理 Δ^9 -THC 之下，我們發現到在 STAT1 knock out 的腫瘤，腫瘤生長的現象非常明顯

的被抑制了。因此從本實驗我們推論 Δ^9 -THC 能透過 STAT1 來促進腫瘤的生長 (Figure 12)。根據以上的結果所述，我們的結論為 Δ^9 -THC 能夠透過 STAT1 的調控來促進血管新生以及腫瘤的生長。









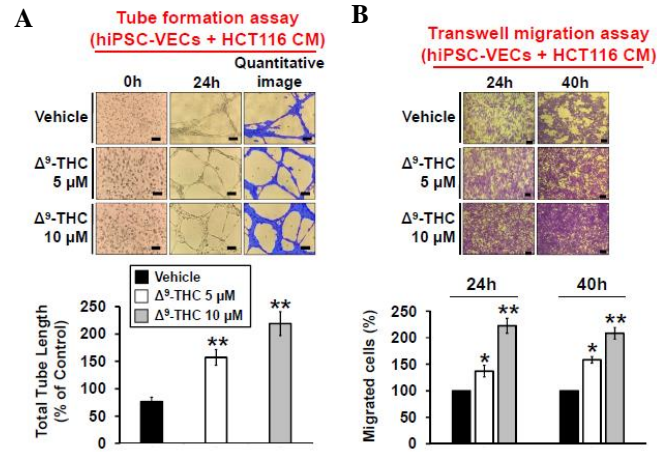
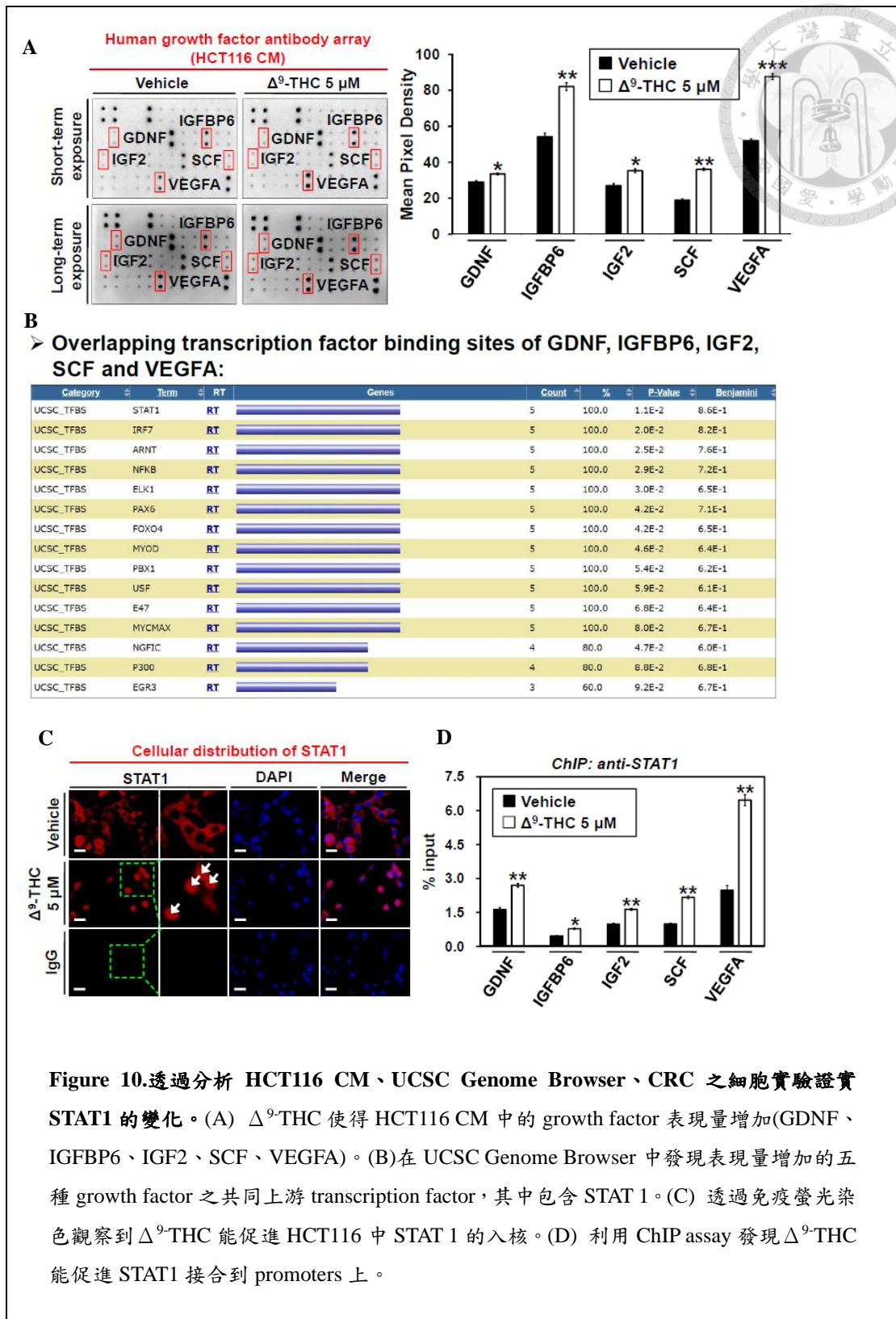
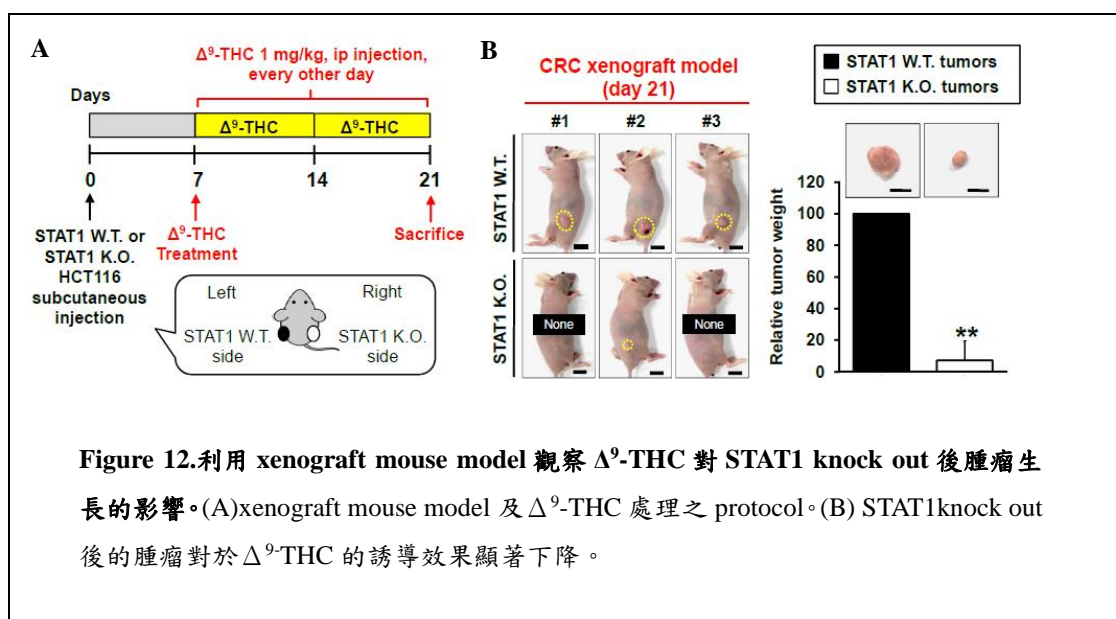
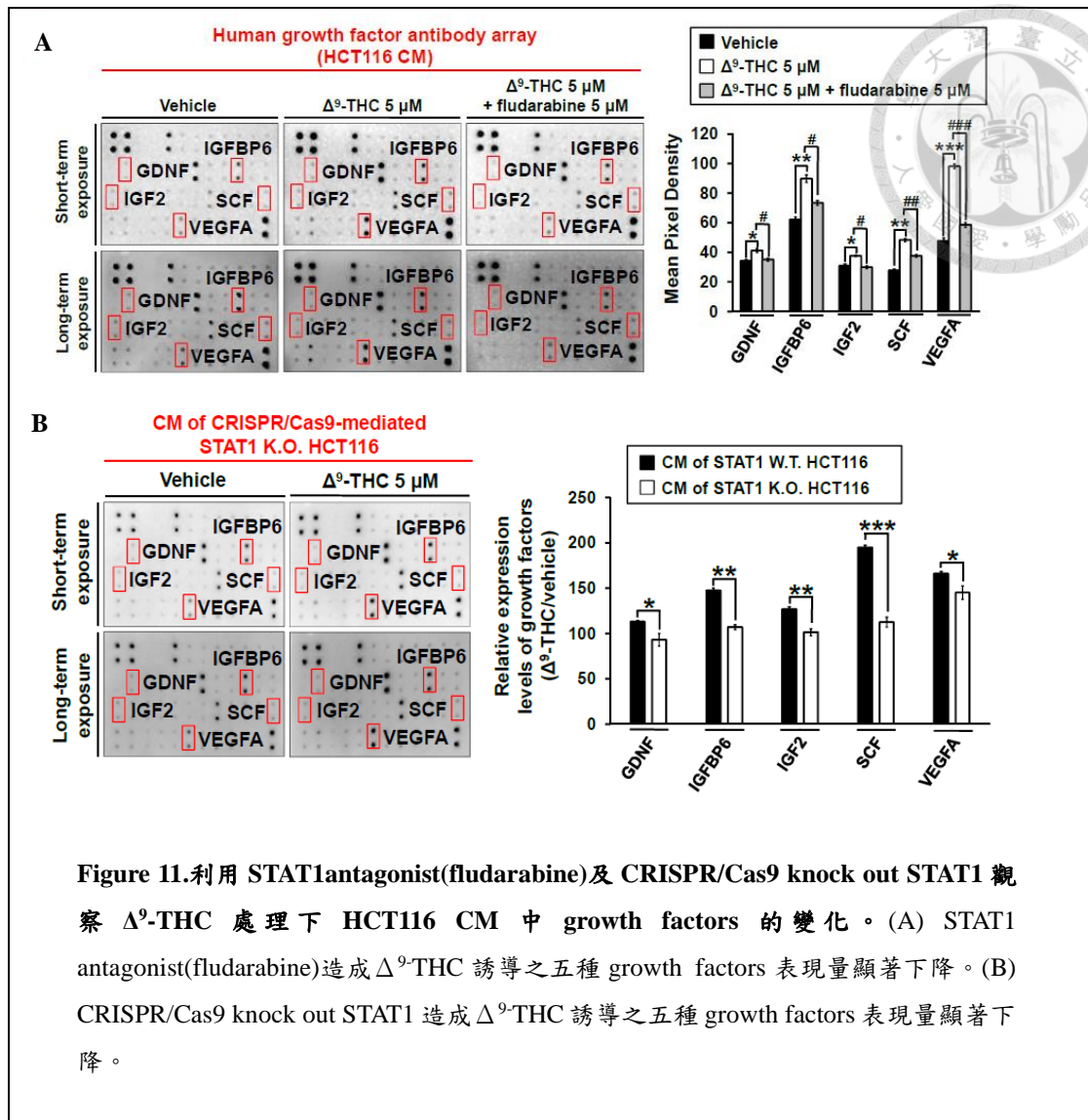


Figure 9. 觀察 Δ^9 -THC 處理下的 HCT116 CM 對 hiPSC-VEC 血管新生及爬行的影響。(A) Δ^9 -THC 使得 HCT116 CM 促進 hiPSC-VEC 血管新生的效果更顯著。(B) Δ^9 -THC 使得 HCT116 CM 促進 hiPSC-VEC 爬行的能力更顯著。





2. 討論

大麻是現在全世界最普遍使用的娛樂性物質之一，也有越來越多的國家在推動娛樂大麻的合法化。此外，合成的大麻藥物也是國外臨床上時常用來處理化療導致的噁心嘔吐或用來增加 HIV 患者食慾的藥物。隨著使用量的增加，也有更多的流行病學研究大麻可能會增加許多癌症的風險，包括肺癌、頭頸癌、睪丸癌等⁽¹²⁾。然而我們對於大麻對於腫瘤直接的影響並不是那麼了解，因此便希望透過本研究來探討大麻與腫瘤以及腫瘤微環境的交互作用。本研究中，我們選擇了大麻的主成分 Δ^9 -THC 來進行研究，我們先是發現到了 Δ^9 -THC 會促進大腸直腸癌細胞的生長，也觀察到血管新生的現象受到促進，最後更找到了 STAT1 的調控在其中扮演關鍵性的角色。

文獻探討的過程中我們發現到 Δ^9 -THC 對於腫瘤生長的效應是有爭議的，分別可以觀察到抑制及促進腫瘤生長的現象，然而我們觀察到抑制腫瘤生長的結果大多是在處理較高劑量的 Δ^9 -THC 時所觀察到的，而高劑量的 Δ^9 -THC 將可能直接導致細胞凋亡，如此將不利於我們對於結果進行推論。因此在本研究中，我們選擇不影響腫瘤細胞 viability 且符合生理劑量的濃度來進行實驗，藉此達到更接近實際結果的推論，最後我們便發現到 Δ^9 -THC 在生理劑量下將促進大腸直腸癌細胞的生長。

STAT1 能夠調控許多與細胞生長相關的訊息傳遞路徑，過去的研究認為 STAT1 為一個 tumor suppressor，然而近年來也有更多的證據指出 SAT1 也可能為一個 tumor promoter^(19, 20)。儘管 STAT1-STAT1 homodimers 或 STAT1-STAT2 heterodimers 堆積在細胞核內具有使腫瘤細胞生長停滯及細胞凋亡的效果，但在許多癌症中能夠觀察到異常的 STAT1 活化，包括乳癌、間皮瘤、頭頸癌、淋巴瘤等。在其他研究中更是看到腫瘤細胞中若表現更多 STAT1 和/或 phospho-STAT1 將導致較差的預後^(21, 22)。在本次的研究中，我們則觀察到了 Δ^9 -THC 能透過調控 STAT1 的入核來促進大腸直腸癌細胞的生長及血管新生，而

在我們給予 STAT1 antagonist 下則觀察到 Δ^9 -THC 對於腫瘤細胞的誘導效果便明顯受到抑制，這表示了 STAT1 在 Δ^9 -THC 對於腫瘤細胞的誘導效應中非常重要。

3. 結論

本研究發現到 Δ^9 -THC 能透過調控 STAT1 的入核來促進大腸直腸癌細胞的生長及血管新生。我們也能透過給予 STAT1 antagonist 來減少 Δ^9 -THC 對於 growth factors 的誘導效果，便更進一步阻斷腫瘤細胞與內皮細胞間的交互作用。我們的研究成果能夠建議臨床上在使用大麻類藥物時若能併用 STAT1 antagonist，則可減少掉大麻類藥物造成腫瘤生長以及血管新生的負面效果。

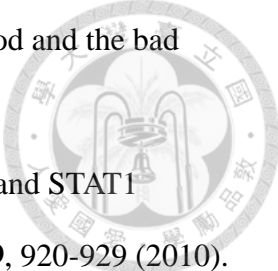
參考文獻



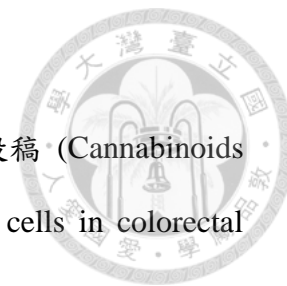
1. C. Bakshi, A. M. Barrett, Impact of recreational and medicinal marijuana on surgical patients: A review. *Am J Surg***217**, 783-786 (2019).
2. M.-T. Samson *et al.*, Differential Roles of CB1 and CB2 Cannabinoid Receptors in Mast Cells. *The Journal of Immunology***170**, 4953-4962 (2003).
3. J. L. Kramer, Medical marijuana for cancer. *CA Cancer J Clin***65**, 109-122 (2015).
4. G. Thomas, R. A. Kloner, S. Rezkalla, Adverse cardiovascular, cerebrovascular, and peripheral vascular effects of marijuana inhalation: what cardiologists need to know. *Am J Cardiol***113**, 187-190 (2014).
5. S. A. Pergam *et al.*, Cannabis use among patients at a comprehensive cancer center in a state with legalized medicinal and recreational use. *Cancer***123**, 4488-4497 (2017).
6. S. L. Calcaterra *et al.*, A population-based survey to assess the association between cannabis and quality of life among colorectal cancer survivors. *BMC Cancer***20**, 373 (2020).
7. G. Turu, L. Hunyady, Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. *J Mol Endocrinol***44**, 75-85 (2010).
8. M. Bifulco, V. Di Marzo, Targeting the endocannabinoid system in cancer therapy: a call for further research. *Nat Med***8**, 547-550 (2002).
9. I. Wilmut, The first direct reprogramming of adult human fibroblasts. *Cell Stem Cell***1**, 593-594 (2007).
10. K. Takahashi *et al.*, Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell***131**, 861-872 (2007).
11. S. Jang, A. Collin de l'Hortet, A. Soto-Gutierrez, Induced Pluripotent Stem

Cell-Derived Endothelial Cells: Overview, Current Advances, Applications, and Future Directions. *Am J Pathol***189**, 502-512 (2019).

12. M. Ghasemiesfe, B. Barrow, S. Leonard, S. Keyhani, D. Korenstein, Association Between Marijuana Use and Risk of Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Netw Open***2**, e1916318-e1916318 (2019).
13. K. M. Kampa-Schittenhelm *et al.*, Dronabinol has preferential antileukemic activity in acute lymphoblastic and myeloid leukemia with lymphoid differentiation patterns. *BMC Cancer***16**, 25-25 (2016).
14. A. Greenhough, H. A. Patsos, A. C. Williams, C. Paraskeva, The cannabinoid delta(9)-tetrahydrocannabinol inhibits RAS-MAPK and PI3K-AKT survival signalling and induces BAD-mediated apoptosis in colorectal cancer cells. *Int J Cancer***121**, 2172-2180 (2007).
15. A. Preet, R. K. Ganju, J. E. Groopman, Delta9-Tetrahydrocannabinol inhibits epithelial growth factor-induced lung cancer cell migration in vitro as well as its growth and metastasis in vivo. *Oncogene***27**, 339-346 (2008).
16. R. J. McKallip, M. Nagarkatti, P. S. Nagarkatti, Delta-9-tetrahydrocannabinol enhances breast cancer growth and metastasis by suppression of the antitumor immune response. *J Immunol***174**, 3281-3289 (2005).
17. C. Liu *et al.*, Cannabinoids promote progression of HPV positive head and neck squamous cell carcinoma via p38 MAPK activation. *Clin Cancer Res* 10.1158/1078-0432.CCR-18-3301, clincanres.3301.2018 (2020).
18. L. Lamalice, F. Le Boeuf, J. Huot, Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res***100**, 782-794 (2007).
19. N. N. Khodarev, B. Roizman, R. R. Weichselbaum, Molecular pathways: interferon/stat1 pathway: role in the tumor resistance to genotoxic stress and aggressive growth. *Clin Cancer Res***18**, 3015-3021 (2012).

- 
20. K. Meissl, S. Macho-Maschler, M. Müller, B. Strobl, The good and the bad faces of STAT1 in solid tumours. *Cytokine***89**, 12-20 (2017).
21. N. Khodarev *et al.*, Cooperativity of the MUC1 oncoprotein and STAT1 pathway in poor prognosis human breast cancer. *Oncogene***29**, 920-929 (2010).
22. M. A. Zimmerman *et al.*, Unphosphorylated STAT1 promotes sarcoma development through repressing expression of Fas and bad and conferring apoptotic resistance. *Cancer Res***72**, 4724-4732 (2012).

研究相關發表



1. **期刊論文**：本研究目前已經撰寫成 manuscript 進行投稿 (Cannabinoids orchestrate cross-talk between cancer cells and endothelial cells in colorectal cancer, Manuscript under revision), 共同作者。
2. **研討會論文**：大麻相關研究成果於 2020 年 11 月 8 日由「台灣藥學會/台灣臨床藥學會」舉辦的『第二屆台灣藥學聯合學術研討年會』獲選口頭報告 (口頭報告編號：#0131), 報告人：林文峻。
3. **科普文章**：於「台大景福醫訊」發表參與『第二屆台灣藥學聯合學術研討會』口頭報告之心得與研究感想 (台大景福醫訊 2021 年 2 月號), 文章作者：林文峻。