

炸油導致葡萄糖不耐研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 96-2320-B-039-039

執行期間：96年8月1日至 97年7月31日

計畫主持人：趙蓓敏

共同主持人：

計畫參與人員：蔣亞帆

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫
及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中國醫藥大學營養學系

中 華 民 國 97 年 10 月 15 日

摘要

摘要

油炸食物具獨特之酥、香、脆口味，廣受人們喜愛，也是各國常用烹調法。過去有關炸油安全性研究多集中於致癌及過氧化壓力，我們在一連串探討炸油對脂質代謝與脂肪細胞生合成(adipogenesis)作用之研究後，意外發現炸油雖然有顯著抗體脂堆積作用，卻會導致大小鼠葡萄糖不耐(glucose intolerance)，並與血清胰島素濃度降低有關。猜測炸油導致葡萄糖不耐之原因可能為胰臟小島受到氧化或發炎傷害，導致胰島素分泌不足。因此本研究打算建立胰臟小島(Pancreatic islets)分離技術，以便進行ex vivo study。三組C57BL/6J mice分別餵以正常含量(4%)新鮮油、20%新鮮油或20%炸油飼料，約2個月炸油組出現glucose intolerance及hypoinsulinemia現象，取胰臟小島在體外進行糖水培養實驗觀察胰島素分泌、分析肝臟及胰臟小島VitE含量與TBARS等過氧化指標。由於目前炸油攝取對葡萄糖代謝影響及胰島素分泌破壞所知甚少，我們的研究對於了解炸油攝食之安全性具有相當貢獻。

Abstract

Due to the unique crispy and aromatic nature, fried foods are popular and welcomed by consumers all over the world, and it is also a frequently used cooking method in many countries. The safety concerns about consumption of oxidized frying oil (OFO) were in major focus on the carcinogenesis and peroxidation stress. After a sequential of studies about the OFO effects on lipid and glucose metabolism, we found that a high OFO content diet is less adipogenic, but induces glucose intolerance in rodents. This seems to be associated with a significant reduction in serum insulin level. Therefore, we hypothesize that the glucose intolerance effect of oxidized frying oil might be associated with a peroxidative stress or an inflammatory response on pancreatic islets, which result in impairment of insulin secretion. In this study, we will establish the method for isolating pancreatic islets and an ex vivo study will be performed. C57BL/6J mice will be divided into three groups in which a 4% low fat (fresh soybean oil) or 20% high fat (fresh soybean oil or oxidized frying oil) diets were given respectively. About two weeks later, glucose intolerance and hypoinsulinemia will be observed in the oxidized frying oil group. The pancreatic islets in the three groups will be isolated and incubated with glucose water to test the insulin secretion ability. The VitE and TBARS content in liver and pancreas islets will be also measured in the three groups. Until now, there was no literature about dietary OFO consumption and glucose metabolism and insulin sensitivity. Therefore, this study is worth to be explored and will contribute to the understanding of the safety concerns about oxidized frying oil consumption.

Key words: Oxidized frying oil, Glucose intolerance, Pancreatic islet, Insulin, Vitamin E

前言

油炸食物因為具有特殊之色、香、味，廣為消費者所喜愛，其消費情形不論已開發或開發中國家均十分普遍，也是許多國家傳統常見烹調方式，基於此，1960~1980年代許多學者曾致力探討攝取炸油之安全性。歸納而言：經由日常飲食攝入之少量炸油認為是安全無虞(Artman, 1969)，但到目前為止，有關炸油安全性的研究大多集中探討致癌性及過氧化傷害。國際間對炸油與營養生理研究並不多，過去20年所知包括炸油誘發肝臟 cytochrome P450 解毒系統(Huang et al, 1988)、加速維生素 A 及 E 的代謝耗損(Liu and Huang, 1995; 湯 1994)。近年我們陸續發現炸油攝取影響體內脂質及葡萄糖代謝，首先證實炸油含有 PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor α) 活化物，可促進肝臟脂肪酸氧化代謝基因表現而降低血(肝)脂 (趙 2002; Chao et al, 2001; 2004; 2005)，其中的 PPAR α 活化物可能是 hydroxy-fatty acids (趙 2002; 徐 2003)。Eder 等人利用 microarray 同樣證實因攝取炸油而向上調節的基因概為 PPAR α 的下游基因(Sülzle et al, 2004)，除此外炸油也透過抑制 Sterol responsive element binding protein-2 (SREBP-2) 抑制內生性 Cholesterol 合成(Koch et al, 2007)。

相對於炸油對脂質代謝影響的研究，炸油對葡萄糖代謝影響所知並不多，我們在 2007 年首度發表攝食炸油不論大鼠或小鼠雖然體脂肪顯著降低，但會出現葡萄糖不耐(Chao et al, 2007)。進一步研究發現葡萄糖不耐原因為胰島素分泌不足，並非胰島素阻抗(Liao et al, 2008)。由於過去已證實老鼠攝取炸油會造成維生素 E 缺乏及部分組織發炎反應，因此我們懷疑炸油可能經由氧化傷害或發炎反應破壞胰臟小島 β 細胞。

已知肥胖常伴隨第 2 型糖尿病(T2DM)，通常減重或降體脂(尤其是內臟脂肪)是預防或治療重要一環(Despres 2006)，然而在落後國家如印度、中國、非洲常見 lean type DM，有報告指出在印度有 1/4 的 T2DM 患者其 BMI $<$ 19，且非營養不良(Das 1999)。2005 年在南非舉辦的國際營養大會也特別呼籲營養學家注意 lean type DM 在這些國家的高發生率，但目前有關 lean type DM 病因並不清楚。油炸食物在印度、中國是普遍烹調法，但油脂品質(氧化酸敗)可能缺乏良好管控，加上其他抗氧化營養素可能攝取不足。我們在動物實驗觀察到的現象不禁令人懷疑此種 lean type DM 是否與過度攝取品質不良炸油導致的組織過氧化傷害有關。由於過去從未有關於炸油攝取與葡萄糖代謝、胰島素敏感性之研究，因此本計劃希望就炸油導致葡萄糖不耐原因與機制做深入探討。希望藉此對油炸食物之食用安全性更添認識，此成果或許可部分解釋 lean type DM。

材料方法

7 週大 C57BL/6J mice (male, n=30, 每組 10 隻) 分為三組，分別給予 AIN-93M 正常低脂飼料(含 4% 新鮮黃豆油)或高脂飼料(含 20% 新鮮黃豆油或 20% 炸油)，見表一。前兩者分別為低脂對照與高脂對照，第三組為實驗組；根據過去經驗只有實驗組會發生葡萄糖不耐。餵食 8 週。飼養期間測定 OGTT，確定炸油組發生葡萄糖不耐，並加測 insulin 確定 hypoinsulinemia 發生。犧牲後取胰臟組織，分離胰

臟小島進行糖水培養實驗觀察胰島素分泌，分析胰臟 VitE、Glutathione 含量與 TBARS 等過氧化指標。

- 炸油製備

炸油製備方式如前述(Chao et al, 2001; 2004)，為新鮮黃豆油在鐵鍋經 205°C 油炸麵片非連續 24 小時(6 hr/day×4 days)所得。所得炸油測定 AV, UV₂₃₃ 確定氧化程度。

- OGTT

測定前禁食，先取 0hr 尾巴血，給予 2.5 M-glucose solution (1.5 g/kg body weight) 後每 30, 60, 90, and 120 min 取尾巴血，分離血清以 glucose oxidase 測定葡萄糖含量。

- 胰臟小島分離

小鼠麻醉，將膽管近十二指腸處用動脈夾掛住，由膽管注入 collagenase solution。將 pancreas 取出於 37°C 水浴反應 25-30 分鐘，接著加入 HBSS 中止反應。然後用 1000 rpm、90 sec 離心，重複三遍，用 RPMI-1640 使 pellet 回溶並用孔徑 400 μm 的濾網過濾至事先加好的 Histopaque，接著以 400 g 30 min 離心，islet 會分佈在兩層溶液界面處，洗去殘留的 Histopaque。洗淨後的 islet 用加有 10% FCS、1% 三合一抗生素、10mM HEPES、葡萄糖濃度為 2.5 mM(45 mg/dL) 的 RPMI-1640 medium 回溶並吸取至 24 well，取適量顆數放入培養箱培養 24 小時後再進行糖水試驗。其餘 islets 收集冷凍-80°C 待其它生化指標測定。

- 血清與糖水培養實驗 insulin 測定

將在 RPMI solution 中的 islet(40 顆 islet 為一組，三重複，挑選時盡量挑選相似大小)給予高(20 mM; 360 mg/dL)、低劑量(2.5 mM; 45mg/dL)的葡萄糖一毫升，給予後放入 5%CO₂、37°C 環境中反應兩小時，反應期間定時取少量懸浮液，用 insulin ELISA kit (Linco)測定 insulin 含量。

- 小島 VitE 與 TBARS 測定

VitE 以 HPLC 測定，TBARS 採用 Oteiza *et al* 方法。

結果與討論

為建立胰臟小島體外葡萄糖刺激胰島素分泌(Glucose stimulated insulin secretion; GSIS)方法，首先利用小鼠注射 STZ 破壞胰臟小島β細胞與正常小鼠比較胰臟小島之 GSIS，如果注射 STZ 小鼠之 GSIS 明顯低於對照表示方法建立成功。注射 STZ 期間追蹤血糖以確定小島破壞成功，結果顯示 STZ 給予 130 mg/kg BW,連續 16 天後禁食血糖將近 300 mg/dL，表示已發展為 T1DM，體重也出現明顯的消瘦情形(表二)。因此與相同鼠齡之對照同時犧牲，取 pancreas 分離小島，給予高葡萄糖(20 mM)刺激 1, 3, 5hr 後分析胰島素分泌(圖一)。結果顯示 STZ 小鼠胰臟小島各時間點之 GSIS 皆明顯低於對照，表示 GSIS 方法建立成功，確實可反映小島β細胞破壞。

正式展開炸油實驗後在餵食第四週進行 OGTT，如過去經驗炸油組 HO 給糖 2hr 後血糖值持續高於其他二組(圖二)，計算血糖值變化曲線下面積 AUC 顯示 HO 組較高(圖三)，表示攝食炸油造成小鼠 glucose intolerance。另分析禁食血清胰島素顯示 HO 組血清胰島素濃度降低(圖四)。在第 12 週將小鼠犧牲，表三

顯示各組小鼠之初始體重、最終體重、攝食量、能量攝取、飼料效率及能量效率。雖然動物為 pair-fed，但 HO 組有最低的終體重及飼料效率或能量效率。這些結果均與過去結果一致。

比較三組小鼠胰臟小島之 GSIS，證實 HO 組有最低的 GSIS(圖五)，胰島素分泌不論在 phase I (10 min)或 phase II(60 min)均低於它組，此結果支持我們的假設，炸油攝取導致的葡萄糖不耐及低血清胰島素與胰臟小島之葡萄糖刺激胰島素分泌能力降低有關。

圖六、圖七及圖八顯示肝臟 TBARS、vitE 及 glutathione 濃度，結果 HO 組有顯著較低的肝臟 vitE 濃度，較高的 TBARS，表示炸油組小鼠體內承受較大氧化壓力，但出乎意外發現 HO 組也有最高的 glutathione 濃度，因此此次觀察到炸油組肝臟 glutathione 上升其原因及意義值得探討。

另外也分析胰臟小島抗氧化指標看炸油組是否胰臟小島受到氧化破壞，結果顯示 HO 組胰臟小島之 total antioxidant ability 有降低傾向(表四)，由於分離小島所得 sample 量極有限，因此我們後續將再繼續收集餵食炸油或新鮮油之小鼠胰臟小島，陸續進行其它抗氧化指標及其它分析。

近年我們發現炸油的攝取會影響體內脂質及葡萄糖代謝，已有許多研究探討炸油影響脂質代謝，而關於炸油對葡萄糖代謝影響所知極為有限，在我們先前的研究發現，攝食炸油會讓大鼠和小鼠的體脂肪都顯著降低。通常降體脂有助於增加胰島素的敏感性，但我們的研究卻意外發現：攝食炸油的大鼠與小鼠都產生葡萄糖不耐現象，oral glucose tolerance (OGTT)曲線下面積顯著增加，從 insulin tolerance test (ITT)結果得知葡萄糖不耐原因並非胰島素阻抗(黃 Chao et al, 2007)，進一步追蹤 OGTT 初期胰島素與 C-peptide 濃度發現炸油組顯著低於新鮮油組，顯示胰島素分泌不足是造成葡萄糖不耐的原因(Liao et al, 2008)。

已知在油炸過程中多數 VitE 會被破壞(Liu & Huang, 1995)，餵食炸油也會導致營養素如維生素 A、E 之耗損(湯 1994; Liu & Huang, 1995; 1996)，除了抑制 VitE 吸收，還會加速此維生素 turn over (Liu & Huang, 1996)。此外，炸油誘發部份的 cytochrome P450 酵素也會參與這些營養素代謝(湯 1994, 林 2002)。其他文獻証明了攝取氧化炸油會增加動物體內氧化壓力(Izaki et al, 1984; Brandsch & Eder 2004)。

在 2005 年有日本學者(Tsujinaka et al, 2005)探討富含 hydroperoxide (LPO)伴隨 VitE 缺乏飼料，證實導致 glucose intolerance，他們在攝食 LPO 鼠同樣觀察到 OGTT 時血糖曲線下面積增加、血清胰島素曲線下面積降低，SSBG 增加、肌肉組織 insulin receptor substrate-1 (IRS-1)蛋白減少，表示葡萄糖不耐原因同時包含胰島素分泌不足及週邊胰島素阻抗。他們還發現 LPO 鼠胰臟 β -cells 細胞核出現 NF- κ B-p50 蛋白，推測可能是過度的氧化壓力在胰臟小島活化了 NF- κ B，已知 NF- κ B 轉錄因子調控與發炎有關的 cytokines 基因表現，可能因此損及胰島素分泌。此研究顯示來自飲食的過氧化壓力(過氧化物過多或抗氧化不足)的確可能傷害 glucose metabolism and homeostasis。儘管我們實驗所使用的炸油與日本學者使

用的 high hydroperoxide 飼料不同 (我們的炸油製備模擬真實油炸食物條件, 相似於人類經由油炸食物攝取之炸油), 但相同的是, 均會導致氧化壓力增加及 VitE 缺乏。

自從胰臟 β -cells 因抗氧化酵素含量較少, 被認為易受氧化壓力影響後 (Grankvist et al, 1981; Lenzen et al., 1996), 氧化壓力對 β -cells 的傷害成為探討糖尿病形成的新焦點 (Oberley, 1988; Evans et al, 2003)。已有研究證實, β -cells 會因細胞內 ROS 或發炎因子的增加, 造成 β -cells 損傷而減少胰島素的生成。這些損傷可因抗氧化酵素的過度表現而減緩 (Lortz et al, 2000; Moriscot et al, 2003)。

綜合言之, 我們的結果證實造成攝食炸油老鼠的血清胰島素降低及葡萄糖不耐可能原因之一為胰臟小島過氧化壓力增加 (或抗氧化力不足), 導致胰臟 β -cells 受損, 葡萄糖刺激胰島素分泌能力降低。

Reference

- 湯雅理。炸油餵食對老鼠肝中維生素 A 含量及肝微粒體 Cytochrome P-450 酵素活性之影響。台大農化所碩士論文, 1994。
- 徐晉。炸油活化 PPAR α 之成分分析。台大農化所碩士論文, 2003。
- 趙蓓敏。氧化炸油活化 PPAR α 之探討。台大農化所博士論文, 2002。
- Artman, N. (1969) The chemical and biological properties of heated and oxidized fats. *Adv. Lipids Res.* 7: 245-330.
- Chao, P. M., Chao, C. Y., Lin, F. J and Huang, C. J. (2001) Oxidized frying oil up-regulates hepatic acyl-CoA oxidase and cytochrome P450 4A1 genes in rats and activates PPAR α . *J. Nutr.* 131: 3166-3174.
- Chao, P. M., Hsu, S. C., Lin, F. J., Li, Y. J. and Huang, C. J. (2004) The up-regulation of hepatic acyl-CoA oxidase and cytochrome P450 4A1 mRNA expression by dietary oxidized frying oil is comparable between male and female rats. *Lipids.* 39: 233-238.
- Chao, P. M., Yang, M. F., Tseng, Y. N., Chang K. M., Lu, K. S., and Huang, C. J. (2005) Peroxisome proliferation in liver of rats fed oxidized frying oil. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 51:361-368.
- Chao, P. M., Huang, H. L., Liao, C. H., Huang, S. T. and Huang, C. J. (2007) A high oxidized frying oil content diet is less adipogenic, but induces glucose intolerance in rodents. *Br J Nutr.* 98: 63-71.
- Chun-Huei Liao, Huey-Mei Shaw, Pei-Min Chao* (2008) The impairment of glucose metabolism in mice induced by dietary oxidized frying oil is different from that induced by conjugated linoleic acid. *Nutrition* 24: 744-752.
- Das, S. (1999) Low bodyweight type 2 diabetes mellitus. *J. Nutr. Environ. Med.* 9:

229-239.

- Despres, J. P. (2006) Intra-abdominal obesity: An untreated risk factor for type 2 diabetes and cardiovascular disease. *J. Endocrinol. Invest.* 29: 77S-82S.
- Huang, C. J., Cheung, N. S. and Lu, V. R. (1988) Effects of deteriorated frying oil and dietary protein levels on liver microsomal enzymes in rats. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65: 1796-1803.
- Izaki, Y., Yoshikawa, S. and Uchiyama, M. (1984) Effect of ingestion of thermally oxidized frying oil on peroxidative criteria in rats. *Lipids* 19: 324-331.
- Koch, A., König, B., Spielmann, J., Leitner, A., Stangl, G. I., and Eder K (2007) Thermally oxidized oil increases the expression of insulin-induced genes and inhibits activation of sterol regulatory element-binding protein-2 in rat liver. *J. Nutr.* 137: 2018-2023.
- Liu, J. F and Huang, C. J. (1995) Tissue alpha-tocopherol retention in male rats is compromised by feeding diets containing oxidized frying oil. *J Nutr* 125: 3071-3080.
- Liu, J. F., and Huang, C. J. (1996) Dietary oxidized frying oil enhances tissue alpha-tocopherol depletion and radioisotope tracer excretion in vitamin E-deficient rats. *J. Nutr.* 126: 2227-2235.
- Sülzle, A., Hirche, F., and Eder K. (2004) Thermally Oxidized Dietary Fat Upregulates the Expression of Target Genes of PPAR α in Rat Liver *J. Nutr.* 134:1375-1383.
- Tsujinaka, K., Nakamura, T., Maegawa, H., Fujimiya, M., Nishio, Y., Kudo, M., and Kashiwagi, A. (2005) Diet high in lipid hydroperoxide by vitamin E deficiency induces insulin resistance and impaired insulin secretion in normal rats. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 67: 99-109.

表一 小鼠實驗飼料組成

飼料組成	LF	HF	HO
	g/ kg diet		
Corn starch	620.692	414.692	414.692
Sucrose	100	100	100
Casein	140	167	167
Oxidized frying oil	-	-	200
Fresh soybean oil	40	200	-
Fiber	50	60	60
Mineral mixture (AIN93)	35	42	42
Vitamin mixture (AIN-93M)	10	12	12
L- Cystine (ICN)	1.8	1.8	1.8
Choline bitartrate (SIGMA)	2.5	2.5	2.5
tert-Butylhydroquinone (SIGMA)	0.008	0.008	0.008
Calorie density (kcal/ g)	3.8	4.53	4.53
Protein / total calorie (g/ 100 kcal)	3.68	3.68	3.68
Vitamin / total calorie (g/ 100 kcal)	0.26	0.26	0.26
Mineral / total calorie (g/ 100 kcal)	0.92	0.92	0.92
Fiber / total calorie (g/ 100 kcal)	1.32	1.32	1.32

表二 注射 STZ (130 mg/kg BW,連續 16 天)小鼠與對照之體重與禁食血糖

	Initial body weight	Final body weight	Body weight gain	Fasting serum glucose
Control	16.4 g	29.2 g	12.8 g	114.8 mg/ dL
STZ	16.9 g	16.8 g	-0.1 g	292.1 mg/ dL

表三 C57BL/6J 小鼠採用對飼育餵食試驗十二週之初始體重、最終體重、攝食量、能量攝取、飼料效率及能量效率。

	Initial body weight	Final body weight	Body weight gain	Food intake	Energy intake	Feed efficiency	Energy efficiency
	(g)	(g)	(g / d)	(g / d)	(kcal / d)	(g gain / g feed)	(g gain / kcal feed)
LF (n = 8)	20.88 ± 1.48	30 ± 2.42	0.11 ± 0.02	4.57 ± 0.39	17.36 ± 1.48	0.024 ± 0.004	0.006 ± 0.001
HF (n = 10)	20.68 ± 1.27	31.69 ± 3.3	0.13 ± 0.03	3.74 ± 0.41	16.96 ± 1.88	0.036 ± 0.008	0.008 ± 0.002

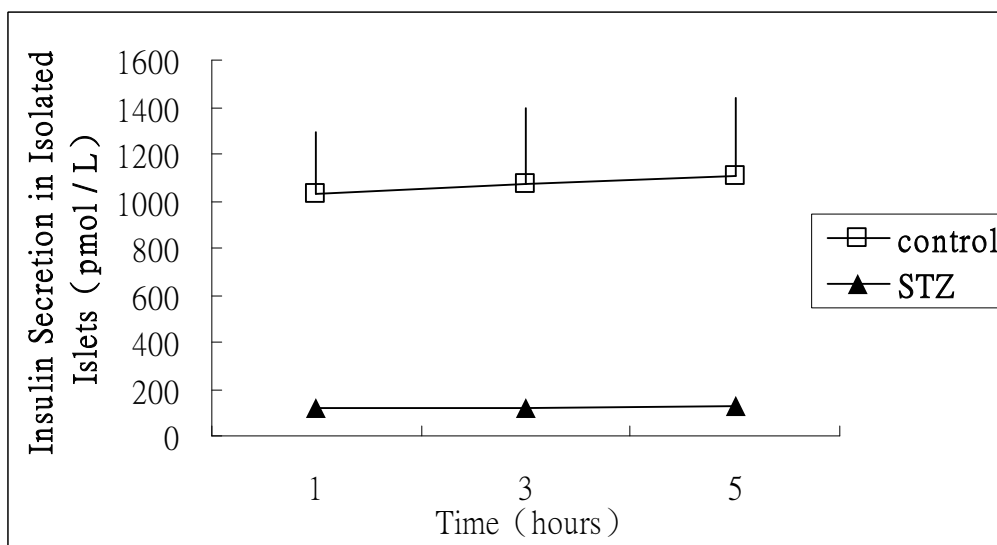
HO (n= 20.78 ± 1.42 26.19 ± 1.12 0.07 ± 0.01 3.83 ± 0.29 17.36 ± 1.32 0.017 ± 0.004 0.004 ± 0.001
9)

表四、C57BL/6J 小鼠餵食炸油 12 週胰臟小島之總抗氧化能力

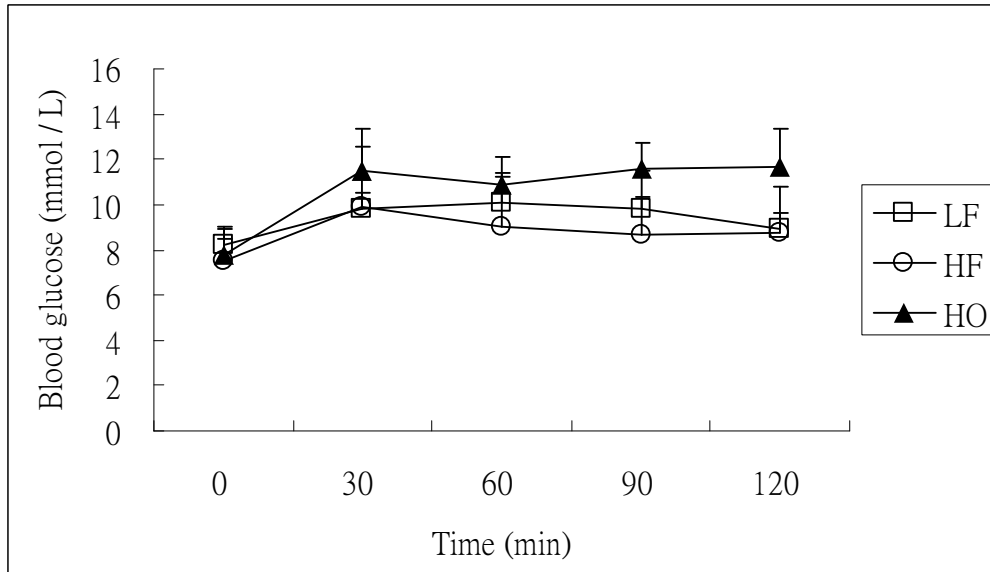
The Total antioxidant Ability (Trolox Equevalent) in the cytosol of Islet cell

	LF	HF	HO
Trolox (mmol/g protein)	346±109 ^a	268±102 ^{ab}	210±47 ^b
(n)	5	6	6

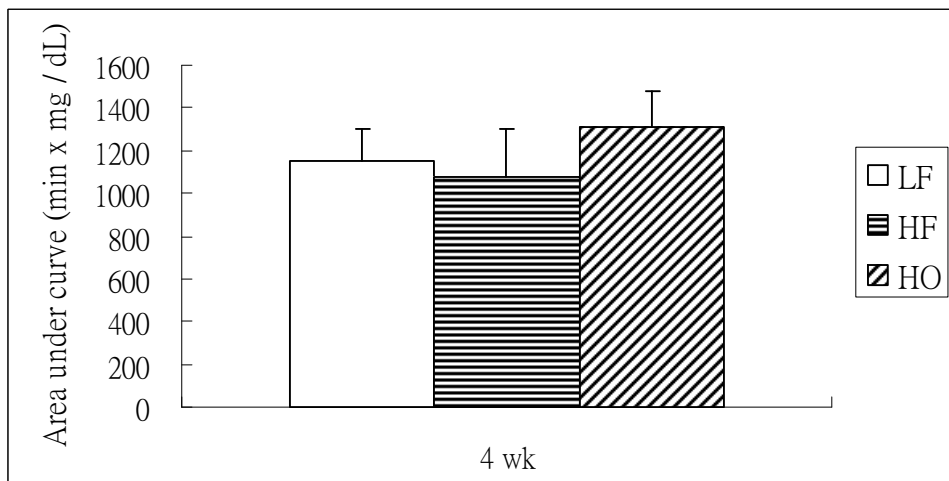
P=0.0736



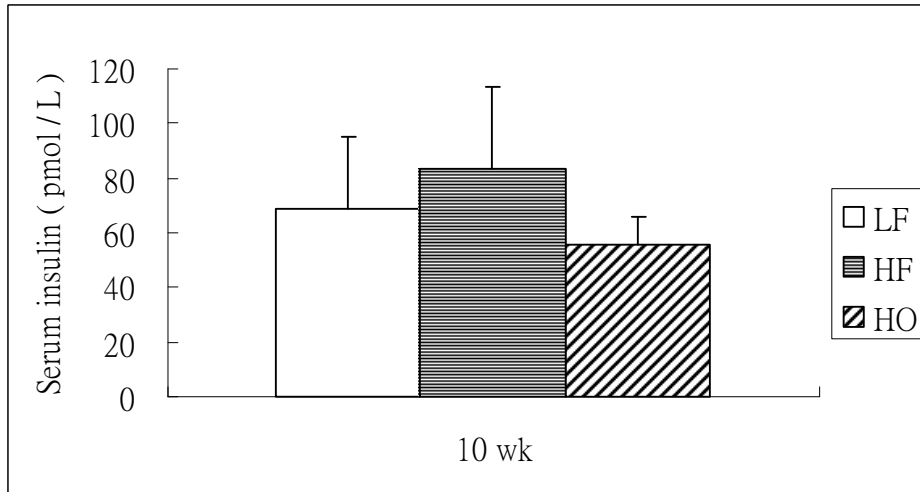
圖一 注射 STZ (130 mg/kg BW,連續 16 天)小鼠與對照之葡萄糖刺激胰島素分泌(GSIS)



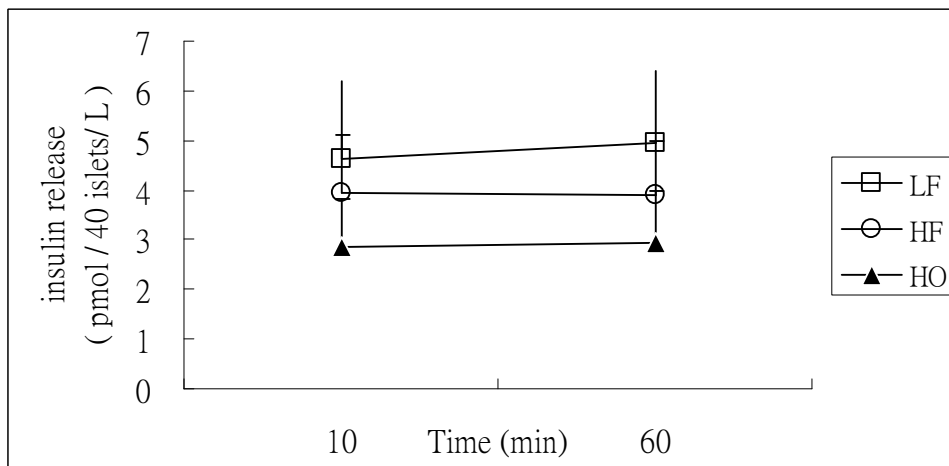
圖二 C57BL/6J 小鼠餵食炸油第四週進行口服葡萄糖耐受試驗 (OGTT) 120 分鐘內之血糖曲線變化



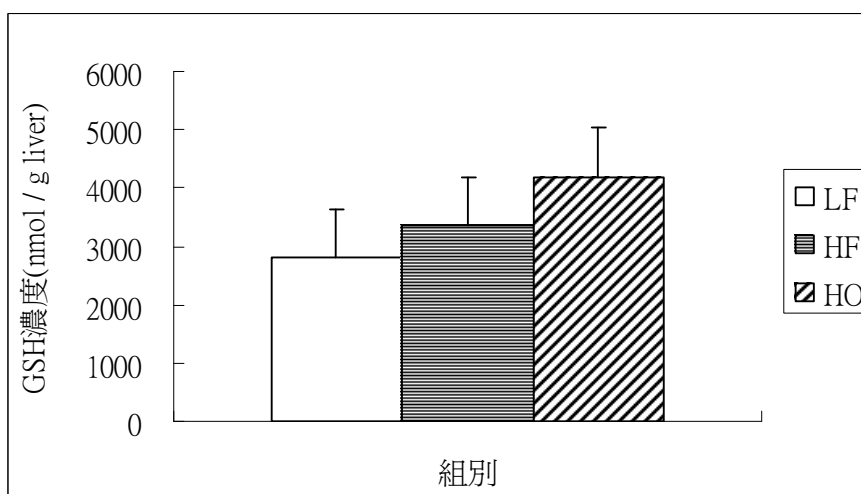
圖三 C57BL/6J 小鼠餵食炸油第四週進行口服葡萄糖耐受試驗 (OGTT) 兩小時內血糖變化之曲線下面積



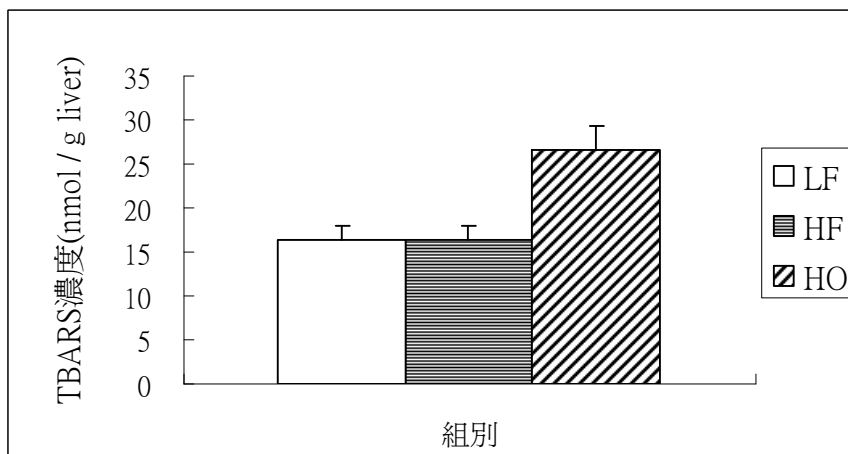
圖四 C57BL/6J 小鼠餵食炸油第十週禁食血清胰島素濃度



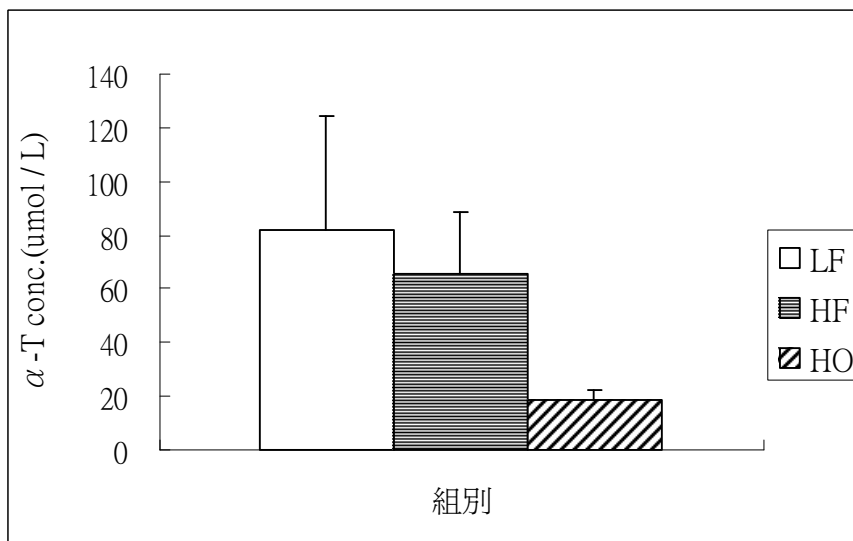
圖五 C57BL/6J 小鼠餵食炸油十二週之葡萄糖刺激胰島素分泌(GSIS)



圖六 C57BL/6J 小鼠餵食炸油十二週之肝臟 GSH 含量



圖七 C57BL/6J 小鼠採用對飼育餵食試驗十二週之肝臟 TBARS 含量



圖八 C57BL/6J 小鼠採用對飼育餵食試驗十二週之肝臟維生素 E 含量