

中國醫藥大學營養學系碩士班

碩士論文

苦瓜籽油不易生成體脂肪之研究

Studies on the anti-adiposity effect of
bitter melon seed oil

研究生：陳佩璇 撰 Pei-Husan Chen

指導教授：趙蓓敏 博士 Pei-Min Chao, Ph. D

中華民國 99 年 7 月

July, 2010

目錄

目錄.....	i
圖目錄.....	iv
表目錄.....	vii
中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
第一章 前言.....	1
第二章 文獻回顧.....	2
一. 肥胖.....	2
(一) 肥胖的盛行率.....	2
(二) 肥胖的健康風險.....	2
(三) 國人成人肥胖定義.....	3
(四) 行政院衛生署核可降體脂功效健康食品.....	4
二. 脂肪細胞生理.....	6
(一) 脂肪細胞分化 (Adipocyte differentiation).....	6
(二) 脂肪油滴 (Lipid Droplets).....	7
(三) 脂質生合成(Lipogenesis).....	8
(四) 脂質水解(Lipolysis).....	9
(五) 脂肪細胞發炎與死亡 (Adipocyte inflammation and death).....	11
三. Conjugated linoleic acid (CLA)降體脂功效與機制.....	15
四. 苦瓜籽油生理功能研究.....	17
(一) 降血脂.....	17
(二) 抗癌.....	18

(三) 降體脂.....	19
(四) c9,t11,t13-CLN 的代謝.....	20
五. 能量代謝相關傳訊	21
(一) AMP-activated protein kinase (AMPK).....	21
(二) Protein kinase A / cAMP-dependent protein kinase (PKA).....	23
(三) Leptin signaling.....	26
第三章 材料與方法.....	27
一. 實驗設計與假說	27
二. 苦瓜籽油的製備	30
三. 苦瓜籽油脂肪酸組成分析.....	30
四. 試驗飼料配製	31
五. 動物飼養.....	32
六. 腸道脂質吸收率測定	36
七. 體溫測定.....	37
八. 血糖分析.....	37
九. 血清胰島素含量測定	38
十. 血清 Leptin 含量測定	40
十一. 血清脂質分析	41
十二. 肝臟脂質分析	45
十三. 脂肪組織 TNF- α 含量測定	48
十四. 脂肪組織切片	49
十五. 蛋白質定量.....	50
十六. 西方墨點法 (Western blot)	51
十七. 抽取 RNA 及 cDNA 的製備.....	55

十八. Real time polymerase chain reaction (同步定量 PCR ; qRT-PCR).....	60
十九. 統計分析.....	64
第四章 結果	65
第五章 討論	109
第六章 結論	121
第七章 參考文獻.....	123



圖目錄

圖 2-1 描述脂肪組織 Lipogenesis 與 Lipolysis.....	10
圖 2-2 Proposed model for role of adipocyte apoptosis in metabolic complications of obesity.	13
圖 2-3 Structure and regulation of AMPK	21
圖 2-4 General overview of protein kinase A signaling	23
圖 2-5 The role of cAMP and insulin in regulation of energy expenditure in brown and brown-like adipocytes.....	24
圖 2-6 Regulation of acetyl-CoA carboxylase by allosteric effectors (green) and protein phosphorylation (red).....	25
圖 3-1 實驗一實驗設計示意圖	28
圖 3-2 實驗一實驗設計示意圖	29
圖 4-1 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 5 週之禁食血清瘦體素(leptin)含量	73
圖 4-2 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 5 週之副睪脂內脂質含量	74
圖 4-3 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 5 週之副睪脂脂肪組織切片	75
圖 4-4 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 5 週之禁食血糖	76
圖 4-5 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 4 週之飽食血清胰島素(insulin)含量	77
圖 4-6 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 5 週以 qRT-PCR 定量腹膜後脂肪(RE)中與體脂堆積量相關基因表現	79
圖 4-7 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 5 週以 qRT-PCR 定量腹膜後脂肪(RE)中與脂質生合成相關基因表現	80

圖 4-8 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 5 週以 qRT-PCR 定量腹膜後脂肪(RE)中與脂質生合成相關基因表現	81
圖 4-9 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 5 週以 qRT-PCR 定量腹膜後脂肪(RE)中與脂肪油滴脂解相關基因表現	82
圖 4-10 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 5 週以 Real-Time PCR 定量腹膜後脂肪 (RE) Uncoupling protein 2 (UCP2)的表現.....	83
圖 4-11 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 11 週之體型(A)、腹部解剖圖(B) 和副睪脂與鼠鱈脂肪(C).....	92
圖 4-12 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 11 週之 Lee's index	93
圖 4-13 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 4 和 11 週之禁食血清瘦體素(leptin)含量	95
圖 4-14 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 11 週以 qRT-PCR 定量副睪脂 leptin mRNA 的表現	96
圖 4-15 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 11 週之副睪脂脂肪組織切片與脂肪細胞平均直徑	97
圖 4-16 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 11 週之禁食血糖及血清胰島素	98
圖 4-17 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 11 週之肝臟組織 TG 和 TC 含量	100
圖 4-18 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 11 週以西方墨點法偵測副睪脂 PKA、ACC、AMPK 及 STAT3 磷酸化蛋白質含量.....	101
圖 4-19 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 11 週以西方墨點法偵測肝臟 PKA、ACC 及 AMPK 磷酸化蛋白質含量	102
圖 4-20 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 10 週暴露於 4°C 0 與 1 小時之體溫.....	103
圖 4-21 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 11 週之副睪脂組織 crown-like structure 與	

TNF- α 蛋白質含量	104
圖 4-22 C57BL/6J 小鼠餵食高劑量 BMSO 11 週後利用 TUNEL 觀察脂肪細胞凋 亡情形	105
圖 4-23 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 11 週以 qRT-PCR 定量副睪脂 β 3-adrenergic receptor 和 perilipin mRNA 含量	106
圖 4-24 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 11 週以 qRT-PCR 定量副睪脂 CPT-1、 PGC1- α 和 UCP2 mRNA 含量	107
圖 4-25 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 11 週之肝臟內基因表現	108
圖 5-1 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 11 週之肝臟 ACO 酵素活性	116



表目錄

表 2-1 國人成人肥胖定義.....	4
表 3-1 奶油、大豆油和苦瓜籽油之脂肪酸組成.....	33
表 3-2 實驗一高脂飼料組成.....	34
表 3-3 實驗二高脂飼料組成.....	35
表 3-4 免疫染色使用抗體.....	55
表 3-5 SYBR [®] Green 系統使用 Primer 序列.....	62
表 3-6 TaqMan [®] 系統使用 Primer&Probe (inventory from ABI).....	64
表 4-1 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 5 週之初始體重、最終體重、攝食量及能量 攝取.....	70
表 4-2 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 5 週之絕對組織重.....	71
表 4-3 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 5 週之相對組織重.....	72
表 4-4 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 5 週之禁食血液生化值.....	78
表 4-5 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 11 週之初始體重、最終體重、攝食量及能量 攝取.....	91
表 4-6 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 11 週之絕對及相對體脂重.....	94
表 4-7 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 11 週之禁食血液生化值.....	99

摘要

苦瓜 (Bitter melon ; *Momordica Charantia*) 在亞洲地區是一種日常食用蔬菜，也被拿來當作藥物使用。先前本實驗室證實苦瓜全果凍乾粉如同治療糖尿病藥物 TZD 可減輕高脂飲食誘發大鼠之高胰島素血症，卻沒有 TZD 的肥胖副作用。相對的苦瓜可降低腹部脂肪重量、脂肪細胞大小並抑制脂肪組織脂質合成基因表現。另外本實驗室在細胞實驗中，利用 3T3-L1 前脂肪細胞模式發現苦瓜籽中富含的特殊脂肪酸 *cis9, trans11, trans13-conjugated linolenic acid (c9, t11, t13-CLN)* 可抑制前脂肪細胞增生、分化，並促進分化前(中)脂肪細胞凋亡。為進一步探討苦瓜降體脂潛能，本研究擬利用動物實驗補充富含 *c9, t11, t13-CLN* 之苦瓜籽油(BMSO)觀察：(1)是否有降體脂功效、(2)所需劑量、(3)作用機制。

實驗一將 C57BL/6J 小鼠分為高飽和油脂飲食(30% g/g butter)誘發肥胖及低脂對照組(LF)，18 週後高飽和油脂組再分為四組，分別給予含 30% butter (HFB)、30% soybean oil (HFS)或 15% soybean oil+15% BMSO (HFSC_H 及 HFSC_L)飲食，其中 BMSO 來自兩種品系高及低 CLN 含量苦瓜籽油(分別含 56 及 19% *c9, t11, t13-CLN*)，五周後犧牲，分析體脂肪量、脂肪細胞大小、血脂質、脂肪組織脂質代謝相關基因表現。結果顯示雖然 BMSO 與 soybean oil 均為 PUFA rich oil，但 BMSO 相較於 soybean oil 有較強能力可降低奶油飲食誘發之肥胖，證據包括體脂肪重量、脂肪細胞大小及 leptin levels 之降低，不論高及低 CLN 之 BMSO 均有效；並觀察到高及低 CLN 之 BMSO 組脂肪組織 fatty acid synthase (FAS)及 uncoupling protein-2 (UCP-2) mRNA 表現分別降低或增加，推測 BMSO 可能活化脂肪組織 AMPK(AMP-activated protein kinase) 途徑及 leptin signaling。

為更進一步就 BMSO 降體脂作用機制之探討及了解 BMSO 所需劑量，實驗

二將 C57BL/6J 小鼠分為四組給予高脂(30% fat)飲食，油脂來源分別為 30% soybean oil (HS)、5% BMSO +25% soybean oil (L)、10% BMSO + 20% soybean oil (M)、15%BMSO + 15% soybean oil (H)，其中 BMSO 含 50% CLN。長期餵食(11 周)再次肯定 BMSO 降體脂功效，隨著 BMSO 給予劑量增加，小鼠體重、體脂肪(包括皮下及內臟)量及脂肪細胞大小降低程度愈大(vs. HS, $P<0.005$)。在低劑量 BMSO 組發現脂肪組織及肝臟 PKA (cAMP-dependent protein kinase)活化 (vs. HS, $P<0.05$)，磷酸化 acetyl CoA carboxylase (ACC)增加，可能因此減少脂肪酸生合成，並伴隨脂肪及肝臟脂肪堆積減少；AMPK 磷酸化雖有增加傾向但未達統計差異。另外 補充 BMSO 也活化脂肪組織中 STAT3，增加 Leptin sensivity，並有增加生熱作用的趨勢。在高劑量 BMSO 組則發現脂肪組織出現 crown-like structure 且 TNF α 增加，表示脂肪組織有發炎及巨噬細胞侵入現象，加上 TUNEL 偵測到細胞凋亡，類似已知 *trans10, cis12-conjugated linoleic acid* (*t10, c12-CLA*)在小鼠引起的 lipodystrophy，因此推測高劑量 CLN 本身或代謝成類似 *t10, c12-CLA* 物可導致脂肪細胞死亡，但高劑量 BMSO 卻無 lipodystrophy 常見副作用--胰島素阻抗及肝脂堆積。

本研究首度肯定 BMSO 確實有降體脂功能，在 30%高油飲食下其中 5%以 BMSO 取代大豆油可見成效，其降體脂功能在低劑量長期使用下與活化 PKA 有關，高劑量長期使用則會造成脂肪細胞死亡。以上可作為開發 BMSO 作為降體脂功能保健食品之基礎。

關鍵字：c9, t11, t13-CLN、苦瓜籽油(BMSO)、降體脂

Abstract

Bitter melon (*Momordica Charantia*) is a vegetable commonly used in the Asia countries. We had previously shown that the lyophilized bitter melon whole fruit is as effective as antidiabetic TZD-class drug in reducing high fat diet-induced hyperinsulinemia, but has no TZD side effect of obesity. Moreover, bitter melon successfully inhibits abdominal fat accumulation, adipocyte size and down-regulates adipose tissue lipogenic genes expression in diet-induced obesity rats. In an in vitro study using 3T3-L1 as an adipogenic model, *cis9*, *trans11*, *trans13*-conjugated linolenic acid (*c9*, *t11*, *t13*-CLN), a fatty acid presents at high levels in bitter melon EA extract, was found to inhibit proliferation and differentiation of preadipocytes and induce apoptosis of cells before or during differentiation. For further exploring the anti-adiposity potential of bitter melon, two animal studies were conducted in the present study to test: (1) anti-adiposity effect, (2) dose required, (3) working mechanism of bitter melon seed oil (BMSO), a natural source of *c9*, *t11*, *t13*-CLN.

In *Experiment I*, C57BL/6J mice were divided into high fat group (30% butter) to induce obesity and low fat control group (LF). Twenty weeks later, animals in the high fat group were further separated into four groups to receive 30% butter (HFB), 30% soybean oil (HFS), and 15% soybean oil+15%BMSO (HFSC_H and HFSC_L) diets, respectively. The BMSO was prepared from two strains of bitter melon, with high or low CLN content (*c9*, *t11*, *t13*-CLN covers 56 and 19% of total fatty acids respectively). After five weeks, metabolic parameters including body fat weight, adipocyte cell size, serum lipids, liver lipids and mRNA levels of genes associated with lipid metabolism in adipose tissue were measured. Results showed BMSO was more potent than soybean oil

in attenuating body fat accumulation in diet-induced obesity mice. The reductions of body fat weight, adipocyte cell size and serum leptin levels were observed in BMSO-treated animals, regardless of CLN levels. Since the mRNA levels of fatty acid synthase (FAS) and uncoupling protein-2 (UCP-2) in the adipose tissue were reduced and increased respectively in BMSO supplemented groups, we hypothesized the BMSO mediated anti-adiposity effect might associated with activations of AMP-activated protein kinase (AMPK) pathway and leptin signaling.

Next, *Experiment II* was conducted to test the minimum dose required and the underlying mechanism of BMSO-mediated anti-adiposity effect. C57BL/6J mice was separated into four groups to receive high fat diets (30% fat) with different ratio of soybean oil plus BMSO (with CLN covers 50 % of total fatty acids): 30% soybean oil (HS), 5% BMSO +25% soybean oil (L), 10% BMSO + 20% soybean oil (M) and 15% BMSO + 15% soybean oil (H), respectively. The adiposity effect of BMSO was reconfirmed in this chronically feeding (11 wk) study. The body weigh, fat mass weigh (including visceral and subcutaneous fats), and adipocyte size were reduced by BMSO supplementation in a dose-dependent manner. In the low BMSO group, activation of cAMP-dependent protein kinase (PKA) and phosphorylation of acetyl CoA carboxylase (ACC) in adipose and liver were observed and postulated to contribute to suppression of lipogenesis. This provides an explanation for the reductions of adipose and liver lipid observed in BMSO groups. The AMPK phosphorylation in BMSO groups tended to be higher but failed to reach statistic significances. An activation of STAT3 was also observed in adipose tissue of BMSO-supplemented groups, which is an index for leptin sensisivity. In accordance with this, an increased

thermogenesis was seen in BMSO-supplemented groups. In the high BMSO group, crown-like structure and increased TNF- α production in adipose tissue were detected, indicating an increased inflammatory response accompanied with macrophage infiltration was developed. TUNEL assay detected apoptotic nuclei in high BMSO adipose, which appears like the well-known lipodystrophy occurred in *t10*, *c12*-CLA-treated mice. This effect might come directly from high dose of CLN or indirectly from metabolites of CLN with *t10*, *c12*-CLA-like properties. Noticeably, the insulin resistance and liver steatosis commonly seen in lipodystrophy were not present in the high BMSO group.

The present study is the first to confirm the anti-adiposity function of BMSO. Replacement of 5% of soybean oil with BMSO in 30% high fat diet is enough to show the benefit. The anti-adiposity effect of BMSO at low levels is associated with PKA activation, while at high levels, is associated with adipocyte apoptosis. These results provide a basis for developing BMSO as a functional food for fighting obesity.

Key words: *Cis9*, *trans11*, *trans13*-conjugated linolenic acid (*c9*, *t11*, *t13*-CLN), Bitter melon seed oil (BMSO), Anti-adiposity

第一章 前言

肥胖是影響健康的重要因素，肥胖者罹患高血壓、糖尿病、脂質異常、高尿酸血症/痛風等代謝相關症候及其他肥胖相關疾病的風險大幅增高，國人前五大死因中癌症、腦中風、心臟病、糖尿病、以及其他許多種慢性疾病和肥胖都有密切關係。因此肥胖問題已成為全民問題，而減重也成為全民運動，積極開發具有降體脂功能成分之健康食品，不論在疾病預防或市場商機均有其重要性。

苦瓜 (*Momordica charantia*) 是常被用做藥物使用的植物之一。苦瓜 (*Momordica Charantia*) 在亞洲地區是一種日常食用蔬菜，已知生理功效包括降血糖、降血脂、抗病毒、抗腫瘤，近來降體脂功能陸續被報導。在 2003 年香港大學首度證實了苦瓜汁可抑制腹部脂肪的堆積(1)，而在本實驗室也證實山苦瓜凍乾粉在大鼠可同時抑制高脂飲食誘發的腹部體脂堆積和高胰島素血症(2)，但苦瓜降體脂的功能成分目前尚未清楚。已知苦瓜含共軛次亞麻油酸 *c9,t11,t13-CLN*(Conjugated linolenic acid)，雖然共軛亞麻油酸 Conjugated linoleic acid (CLA)降體脂功能已獲證實並已公開販售，但 CLN 是否也如 CLA 可降體脂並不清楚。本實驗室先前利用 3T3-L1 前脂肪細胞株發現 CLN 可抑制前脂肪細胞的增生、分化並促進分化前或分化中脂肪細胞凋亡(3) (paper in submit)，此體外實驗觀察到之 anti-adipogenic effect 可能貢獻於降體脂。因此本論文擬利用動物實驗餵食富含 CLN 的苦瓜籽油，觀察苦瓜籽油是否有降體脂功效，如果有效再進一步探討所需劑量及可能作用機制。

第二章 文獻回顧

一. 肥胖

(一) 肥胖的盛行率

肥胖在許多國家已視為公共健康問題，依據 WHO 統計全球有十億以上成人體重過重，其中 3 億人為臨床定義肥胖；從 1980 年到現在全球的肥胖人口增加 3 倍(數據收集自北美、英國、東歐、中東、太平洋群島、澳洲及中國)，導致肥胖問題在各國的醫療支出比重日益增加。

在台灣以第一次國民營養健康狀況變遷調查 1993-1996 所得的資料推算，身體質量指數 24 和 27 為國人過重和肥胖之切點，則男性和女性過重的人口分別為 23%和 20%，肥胖的人口男性約 11%，女性有 13%(4)。而第二次國民營養健康狀況變遷 2005-2008 調查之肥胖盛行率(5)與 1993-1996 調查相比，男性不管是過重、輕度肥胖、中重度肥胖的比例都升高，分別由 1993-1996 的 22.9%、8.1%、2.4%上升到 2005-2008 的 32%、13%、6%，女性過重的比例雖有降低，由 20.3%下降為 19.3%，但值得注意的是輕度肥胖的比例卻提高了，由 1993-1996 的 7.6%上升為 10.5%。顯示台灣人的肥胖盛行率也逐年增加，是個警訊。

(二) 肥胖的健康風險

肥胖並非只是一般的身材臃腫，它是一種可以危害人體健康的病症，當能量的攝取與消耗失去平衡，這些額外吸收的能量儲存於體內，轉化為脂肪，就會導致肥胖，而額外的體脂肪與各種疾病如糖尿病、心臟病，以及早死有密切

的關係。肥胖的成因有很多種，可能有遺傳的因素、熱量吸收太多、熱量消耗過少、疾病和飲食習慣等。依據世界衛生組織肥胖指南(World Health Organization)的資料顯示，最主要的與肥胖相關的疾病包括：糖尿病、代謝症後群、膽囊疾病(Gallbladder diseases)、血脂異常、呼吸困難(breathlessness)、睡眠呼吸停頓(sleep apnea)等；其次為高血壓、高尿酸血症/痛風、骨性關節炎、和冠心病；再其次為：乳癌、子宮內膜癌、結直腸癌、女性賀爾蒙異常(reproductive hormone abnormalities)、多囊性卵巢症(polycystic ovary syndrome)、不孕症、下背痛、麻醉風險、胎兒畸形等，因此肥胖是一個重要的健康議題。

國內調查數據也顯示身體質量指數和高血壓、糖尿病、高三酸甘油酯血症、高尿酸血症有密切的關連(6, 7)。身體質量指數過高、腰臀圍比過高的女性罹患乳癌的危險性也顯著的提高(8)。此外，脂肪肝在國內相當盛行，國內的數據顯示，身體質量指數和肝功能指標異常比例成正相關，減肥能有效回轉脂肪肝的現象(9)。

(三) 國人成人肥胖定義

國民營養健康變遷調查 1993~1996 的數據顯示，在每一固定的身體質量指數下，國人的高血壓、糖尿病、高尿酸血症等和代謝症候群相關的病徵盛行率都較美國白人為高。以相對危險性來看，國人隨著身體質量指數增加所對應的高血壓、糖尿病、高三酸甘油酯的相對危險性也比白人為高。有鑑於此，專家群認為國人肥胖定義有依本土數據建立的必要。

2000 年世界衛生組織，在缺乏亞洲肥胖危險性相關資料下，曾暫時建議分別以 BMI 23 與 25 作為亞洲人過重與肥胖的切點，並鼓勵亞洲各國積極進行資料收集與分析工作，作為日後訂定亞洲人肥胖定義之參考。而我國則在民國 91 年(2002 年)，由衛生署邀集國內專家學者成立「肥胖定義及處理委員會」，參

考我國國民營養變遷調查結果、國人代謝症候群相關研究，訂定我國之肥胖標準及處理方法，以提供公共衛生、醫界及其他健康相關行業作為肥胖預防、篩選、及介入之參考。

由於國內數據顯示，BMI 24 以上成人中，有 68% 男性、65% 女性有代謝症候群相關病徵；BMI 24 以下的成人中，有 68% 男性、70% 女性無此病徵；而 BMI 27 以上成人 85% 以上有肥胖相關的代謝症疾病。因此，委員會之「成人肥胖定義小組」建議將國人過重與肥胖的切點定為 BMI 24 與 27(10)；各指標切點如表 1-1 所示。

表 2-1 國人成人肥胖定義

	身體質量指數(BMI) (kg/m ²)	腰圍 (cm)
體重過輕	BMI < 18.5	
正常範圍	18.5 ≤ BMI < 24	
異常範圍	過重：24 ≤ BMI < 27	男性：≥ 90 公分
	輕度肥胖：27 ≤ BMI < 30	女性：≥ 80 公分
	中度肥胖：30 ≤ BMI < 35	
	重度肥胖：BMI ≥ 35	

行政院衛生署(10)

(四) 行政院衛生署核可降體脂功效健康食品

不論為了健康因素或愛美，國人一向對減肥趨之若鶩，國內減肥市場商機廣大，但目前為止通過衛生署核可宣稱有助減少體脂肪堆積健康食品項目並不多，茲列於下：

1. 御茶園每朝健康綠茶 (衛署健食字第 A00061 號)
功能成分：兒茶素(Catechins)、菊苣纖維(Inulin)
功能機制：增加飽足感降低熱量攝取、刺激 β -3 adrenergic receptor，促進脂肪細胞脂解及生熱。
2. 益品年食用油 (衛署健食字第 A00047 號)
功能成分：雙甘油酯
功能機制：促進脂肪酸 β 氧化(11)
3. 統一綺麗健康油 (衛署健食字第 A00067 號)
功能成分：中鏈脂肪酸
功能機制：促進熱量支出及脂肪酸 β 氧化(12)
4. 黑烏龍茶 (衛署健食字第 A00152 號)
功能成分：烏龍茶聚合多酚
5. 茶裏王濃茶阿里山烏龍茶 (衛署健食字第 A00159 號)
功能成分：兒茶素
功能機制：刺激 β -3 adrenergic receptor，促進脂肪細胞脂解及生熱

二. 脂肪細胞生理

肥胖包含脂肪細胞數目增加 (hyperplasia)和肥大(hypertrophy)，因此脂肪細胞的分化、脂質生成水解與脂肪細胞的死亡均可影響體脂肪大小，此外體脂肪不同分布位置(內臟 vs 皮下脂肪)也與代謝疾病風險有關。目前已不再視脂肪細胞為單純熱量貯存處所，它所分泌 adipokines、chemokine 可能影響代謝相關疾病。

(一) 脂肪細胞分化 (Adipocyte differentiation)

脂肪組織包含不同的細胞型態，只有三分之一的組織是由脂肪細胞所構成的，其餘的為纖維母細胞 (Fibroblasts)、巨噬細胞 (Macrophages)、基質細胞 (Stromal cells)、單核球 (Monocytes) 和前脂肪細胞 (Preadipocytes)(13)。賀爾蒙活性和轉錄因子會使前脂肪細胞分化成脂肪細胞(14)。在人類，前脂肪細胞轉變為脂肪細胞主要發生在胚胎後期(15)，而前脂肪細胞分化為脂肪細胞的能力是終身存在，此能力是取決於身體的能量狀態和儲存所需。

研究脂肪細胞的分化大多為體外模式，主要是利用兩種細胞，一種是多功能纖維母細胞(Pluripotential fibroblasts)，可分化成肌肉細胞、軟骨細胞和脂肪細胞。另一種為前脂肪細胞株如 3T3-L1，已注定分化成脂肪細胞(16, 17)。在轉變為脂肪細胞前，3T3-L1 維持分泌因子 Pref-1 (Preadipocyte factor 1)表現因此抑制分化(18)。分化的啟動由數種轉錄因子參與(19, 20): C/EBPs (CCAAT enhancer binding protein)、ADD-1/SREBP1 (Adipocyte determination and differentiation factor 1/sterol response element binding protein)、PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor)，互相作用形成 "Transcription cascade"，首先 C/EBP- β/δ 的表現會開始增加，接下來就會引發

C/EBP- α 和 PPAR γ 的表現，二者共同啟動脂肪細胞特定基因如：Lipoprotein lipase(LPL)、Adipose specific fatty acid binding protein (aP2)之轉錄，維持脂肪細胞的表型。同時伴隨 ADD-1/SREBP-1 的表現增加，推測其角色為產生內生性 PPAR γ 結合子(可能是脂肪酸或其代謝物)，活化 PPAR γ (21)。

體外培養 3T3-L1 前脂肪細胞分化成脂肪細胞可借助 Cocktail 刺激，包括 Insulin、Dexamethasone 和 Isomethylbutylxanthine，在五到七天的刺激後，脂肪細胞會形成圓鼓狀並包含酵素參與 Lipogenesis (脂質生合成) 和 Lipolysis (脂質分解)，也發展出胰島素敏感性(22)。

已知轉錄因子 PPAR γ 在脂肪細胞分化過程扮演決定性角色，除了 PPAR γ 活化劑 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ $_2$ (15d-PGJ $_2$)或 Thiazolidinediol(TZD)可促進脂肪細胞分化外，利用 Retrovirus transfection，強迫原本分化力極低的纖維母細胞表現 PPAR γ ，在 PPAR γ 活化劑存在下即會分化為脂肪細胞(23)。利用 PPAR γ heterozygous mice、PPAR $\gamma^{+/+}$ \leftrightarrow PPAR $\gamma^{-/-}$ chimeric mice 或特定 knock-down 脂肪組織 PPAR γ 小鼠均證實缺乏 PPAR γ 將無法形成脂肪細胞(24, 25)。雖然抑制脂肪細胞分化或拮抗 PPAR γ 活性有抗肥胖潛力，但可能有惡化胰島素敏感性風險。

(二) 脂肪油滴 (Lipid Droplets)

在白色脂肪細胞，TG 是儲存在單室(monolocular)的脂肪油滴，相對於棕色脂肪細胞特色為多室(multilocular)。雖然之前認為脂肪油滴為靜態的儲存位置，但近來已被認為是個動態的胞器，參與脂質和能量的代謝。脂肪油滴主要是由 TG 和 Cholesterol ester core 組成，周圍是單層磷脂質層上面鑲嵌許多蛋白質，有一些蛋白質的特色為含有 N-terminal motif 稱之為 PAT domain，取名為 Perilipin、Adipophilin (也稱為 Adipocyte differentiation-related protein, ADRP)

和 Tail-interacting protein of 47kDa (TIP47)，也包括 OXPAT/MLDP 和 S3-12(26)。而這些 PAT (perilipin/ADRP/TIP47) 蛋白質表現在不同的組織，猜測可能有不同組織的特異性功能(26)。此外在脂肪油滴中，很多其他的蛋白質也參與了脂肪油滴的形成、脂質的合成與分解和細胞膜的運輸(27-30)。Caveolin 蛋白質主要位於細胞膜上，已有研究發現 Caveolin 除參與胞噬作用幫助細胞攝取外界脂質外，也會移動至脂肪油滴並調控脂質分解(31)。這些與脂肪油滴相關的蛋白質，它們的轉譯後修飾和與其他蛋白質的交互作用，幫助脂肪細胞調控脂質生成和水解。

有關脂肪油滴是如何形成的？目前廣被接受的模式為中性脂肪堆積在內質網，並開始持續在 Cytosolic leaflet 生長(32)，而 TG 是如何運送至脂肪油滴而使脂肪油滴變大？可能是藉由囊泡運輸或直接在脂肪油滴合成，例如脂肪油滴內存有合成 TG 酵素 Diacylglycerol acyltransferase (DGATs)；也有研究表示可能是 TG 形成新的小油滴結合在一起形成大油滴(29, 32)。

(三) 脂質生合成(Lipogenesis)

脂質生合成是合成酯化的 FAs，是由飲食中的醣類或其它能量來源來而形成 TG。在大鼠中，脂質生合成主要發生在肝臟和白色脂肪組織，而在人類—尤其是高糖飲食，脂質生合成主要發生在肝臟，少部分在脂肪組織(33)。營養的狀態和胰島素的濃度會影響脂質生合成的速率，脂質合成主要是發生在餐後和醣類的攝取之後，而在禁食狀態則會抑制脂質的合成(34)。脂肪組織脂質的堆積主要是決定於對循環中的 FAs 汲取(35)，飽食後乳糜微粒中的 TG 被脂肪組織的 Lipoprotein lipase 水解釋出 FAs，而當 FAs 進入脂肪細胞後，為了以 TG 形態儲存會被再酯化(36)；脂肪組織也可利用汲取的 Glucose 經過 Glycolysis 與 Lipogenesis 生成脂質。

受胰島素或營養狀態調控並參與脂肪組織的脂質生合成酵素有 fatty acid synthase (FAS)、acetyl CoA carboxylase (ACC)和 malic enzyme (ME)，調節可在酵素活性層次或基因表現層次。已知胰島素或葡萄糖可活化轉錄因子 SREBP-1c與Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP)，雖然 SREBP-1c與ChREBP 促進Lipogenic genes表現之作用在肝臟已被透徹研究(37, 38)，但在脂肪組織則不明確--Sekiya 等認為脂肪組織脂質生合成不受 SREBP-1c調控(39)，另有人提出脂肪組織脂質生合成受Liver X receptor (LXR) 調控(40, 41)，但眾說紛紜。

(四) 脂質水解(Lipolysis)

在哺乳類動物，儲存在白色脂肪組織的TG是主要的能量來源。當熱量過剩，TG 會合成並儲存在油滴，而當需要能量時，TG 會藉由脂解作用(lipolysis)離開油滴產生 fatty acids (FAs)以供利用(32, 42)。而在肥胖的人中發現其血液中有典型慢性高游離脂肪酸(non-esterified fatty acids; NEFA)的狀態，此現象與很多代謝不良症狀如胰島素抗性有關。但在一些老鼠實驗模式發現增加脂解作用並沒有增加血清 NEFA 的濃度，可知增加脂肪細胞的脂解不必然伴隨血清 NEFA 增加。在老鼠增加脂解作用，可使老鼠變瘦且促進脂肪細胞的 FAs 氧化作用，而不會使血清有較高的 NEFA(43-46)，因此除了抑制脂肪組織 lipogenesis，增加脂肪細胞的脂解作用亦可視為治療肥胖的對策之一。

在營養不足的情形下，原本儲存在脂質油滴的 TG 會分解成 NEFA 和 glycerol，二者進入循環，在肝臟中 NEFA 和 glycerol 分別為 ketogenesis 和 gluconeogenesis 的基質，肌肉和心臟則利用 NEFA 經由粒線體的 β -oxidation 產生 ATP 作為能量的供應。在脂解路徑，兒茶酚胺(catecholamine)結合至細胞膜上的 β -adrenergic G protein-coupled receptors，產生一連串的訊息傳遞活化 cAMP - dependent PKA，相對 insulin 會活化 phosphodiesterase 切斷 cAMP 訊

號而抑制脂解作用。PKA 活化會促進 TG 水解成 diacylglycerol (DG) 而產生 FAs，再從 DG 水解成 monoacylglycerol，最後從 monoacylglycerol 產生 glycerol(26)。目前認為 TG 的水解主要由 Adipose triglyceride lipase (ATGL) 負責，DAG 的水解才是由 Hormone-sensitive lipase (HSL) 負責；ATGL 活化需要 CGI-58 coactivator(47)，HSL 的活化涉及蛋白質磷酸化(48)。

脂解作用近年來被廣泛接受是藉由活化 PKA 而磷酸化下游的 HSL 與 Perilipin，後者是一種包覆在脂肪油滴表面阻隔脂解之蛋白質。研究發現在中性脂肪中，當脂肪細胞的脂解作用被 PKA 活化，磷酸化的 HSL 從細胞質轉移至脂肪油滴的表面(48)，同時磷酸化的 Perilipin(在一個或六個以上的 serine 位點，尤其是 serine 492 位點)也由油滴表面散去，結果會重排脂質油滴的形態並且破壞與脂肪油滴相連接的蛋白質，造成脂肪油滴的破裂，而增加更多表面積讓 Lipase 進行脂解作用(26)。

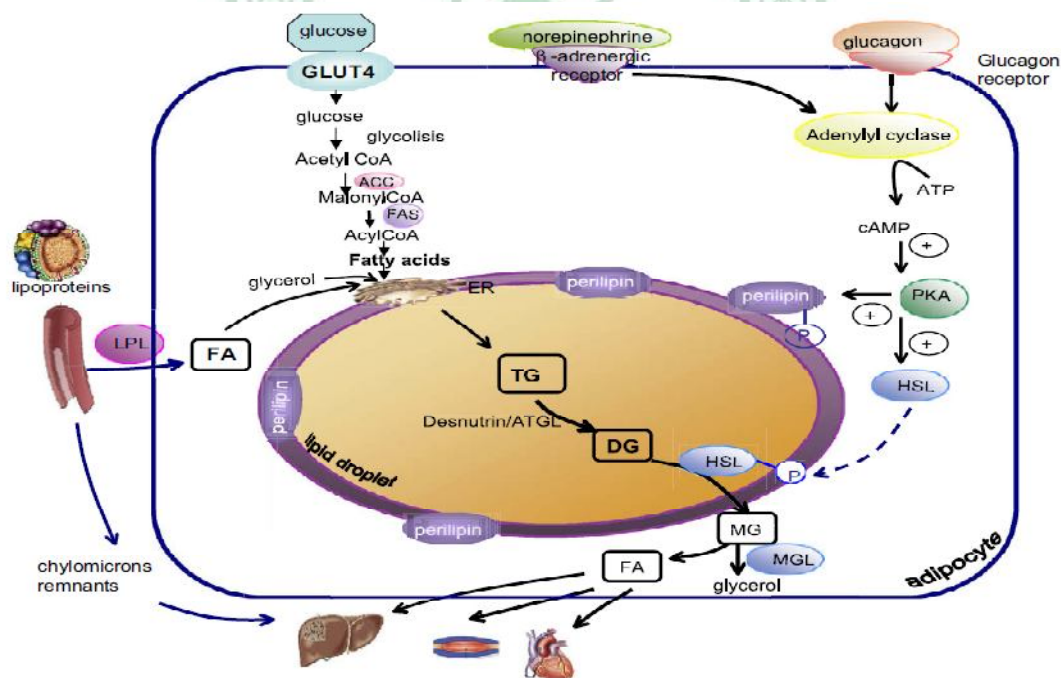


圖 2-1 描述脂肪組織 Lipogenesis 與 Lipolysis

資料來源：Maria Eugenia Frigolet 等人., 2008(49)

(五) 脂肪細胞發炎與死亡 (Adipocyte inflammation and death)

1. Adipocyte inflammation

肥胖會造成白色脂肪組織的輕度發炎，脂肪組織的發炎是造成胰島素阻抗、葡萄糖不耐甚至是糖尿病原因之一(50, 51)。已知脂肪組織會分泌很多細胞激素，統稱adipokines，包括Leptin、Adiponectin、Resistin、Retinol binding protein 4 (RBP4)和一些與發炎有關的細胞激素包括 Tumour necrosis factor-alpha (TNF- α)、 Interleukin (IL) 1 β 、IL-6 和 Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1)(52)。有越來越多證據顯示脂肪組織發炎反應會增加與肥胖有關的血管病變和心血管疾病的危險。內臟脂肪和慢性發炎反應的關係是因為巨噬細胞聚集在脂肪細胞的周圍，並增加發炎相關細胞激素的產生。在肥胖狀態下，脂肪細胞會浸潤在巨噬細胞中，且在肥胖的人類白色脂肪組織發現有很高的CD68(巨噬細胞marker)基因表現，顯示身體質量指數與脂肪組織的巨噬細胞含量呈正相關(53)。在人類和小鼠中，白色脂肪組織的巨噬細胞數量與體脂和脂肪細胞大小有關(54)。在逐漸增大的脂肪細胞其促發炎因子(pro-inflammatory)和抗發炎因子(anti-inflammatory)表現失衡，促發炎因子過度增加(55)。

已知巨噬細胞和脂肪細胞之間有交互作用(Cross-talk)，尤其是發生在代謝旺盛的內臟脂肪，形成一個發炎性細胞浸潤、促發炎激素產生和脂肪細胞功能障礙的惡性循環(50)。脂肪細胞本身也會分泌TNF- α 和MCP-1，吸引單核球進駐並分化為巨噬細胞，而巨噬細胞分泌的TNF- α 又會促進脂肪細胞釋出游離脂肪酸(NEFA)，更加促進發炎反應(如，向上調控MCP-1、IL-6和TNF- α 的表現且向下調控Adiponectin)，這些反應部分是藉由活化Mitogen activated protein kinase (MAPK)路徑(56)。

肥胖的脂肪組織中巨噬細胞所釋放的發炎因子可藉由釋放至循環造成全身

性胰島素阻抗，或藉由 paracrine 或 autocrine 造成脂肪組織的胰島素阻抗。

2. Adipocyte death

脂肪細胞的死亡在肥胖的人類和啮齒類動物皆有發現。目前已證實在飲食誘導的肥胖過程，脂肪細胞死亡是早期且持續發生的，此事件與巨噬細胞的聚集與表型轉換(M1↔M2 phenotype)(57)、脂肪組織發炎和全身性的胰島素阻抗有關。一般而言，腹部脂肪比皮下脂肪更容易受到巨噬細胞的浸潤，有更多的發炎因子產生，與肥胖造成的代謝紊亂有密切關係(58-63)。為了解脂肪細胞肥大過程伴隨細胞死亡現象，Strissel 等人(64) 餵食 C57BL/6J 小鼠高油飲食 (HFD) 20 週，每 4 週分析胰島素耐受性，並觀察副睪脂 (Epididymal) 及鼠蹊皮下脂肪 (Inguinal subcutaneous) 的組織切片。發現脂肪量及脂肪細胞體積在 HFD 餵食 12 週時達最大，12 週後脂肪細胞開始有死亡的情形，及一些發炎因子 (TNF- α 、MCP-1、IL-6 和 IL-10) 表現增加。在死掉的脂肪細胞周圍聚集巨噬細胞形成所謂的 "crown-like structure" (CLS)，並表現 TNF- α 和 IL-6 蛋白質，且脂肪細胞的數量開始減少。而在第 16 週脂肪細胞大約有 80% 已死亡，巨噬細胞 marker CD11c 和發炎基因的表現達到最大，副睪脂重量減少 40%、脂肪組織有膠原蛋白沉積、肝臟出現脂肪肝現象。直到第二十週，脂肪細胞大小回復為較小的細胞，CLS 減少、CD11c 和 MCP-1 的表現減少，胰島素阻抗趨緩，副睪脂重量沒有進一步增加但自 12 週起與肝重有逆相關。作者推測 HFD 在誘發小鼠肥胖的第 12-16 週觀察到的大量脂肪細胞死亡是為了 adipose tissue remodeling，脂肪細胞由 hypertrophic 轉至 hyperplastic obesity (65)。在脂肪細胞大量發炎與死亡的階段 (第 12-16 週) 也是發展出胰島素阻抗和肝脂堆積的關鍵期。相對的皮下脂肪組織在這 20 週當中偵測到的死亡細胞數一直很低 (<3%)。

同樣是研究肥胖造成脂肪細胞死亡與併發胰島素阻抗和肝脂堆積現象，Alkhoury 等人 (66)利用高脂(HFD)或高糖飲食(HSD)誘發小鼠肥胖，觀察到的脂肪細胞死亡進一步證實是細胞凋亡(涉及 extrinsic and intrinsic pathway)，伴隨脂肪組織有 ATM (Adipose tissue macrophage)與發炎、出現胰島素阻抗(IR)與肝脂堆積，作者將 *Bid* 基因(a key pro-apoptotic molecule)剔除，避免 HFD 或 HSD 導致的脂肪細胞凋亡，後續事件包括 ATM、IR 與肝脂堆積均消失。可見肥胖導致的脂肪細胞凋亡是造成 IR 與肝脂堆積主因(如圖 1-2)。

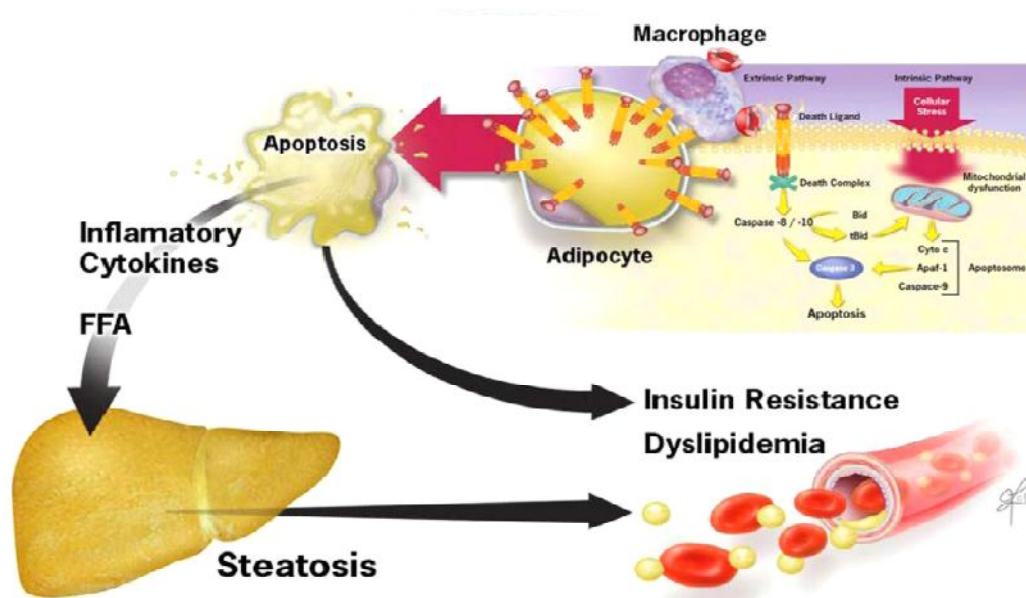


圖 2-2 Proposed model for role of adipocyte apoptosis in metabolic complications of obesity.

資料來源：Alkhoury 等人., 2010(66)

特別的是，除了肥胖會導致脂肪細胞發炎與死亡，過度削瘦的 Lipodystrophy 也被發現脂肪組織有發炎與死亡現象。最早注意到是在 HIV 感染病人藥物治療常發生的 lipodystrophy，脂肪組織切片發現有大量 ATM 與發炎因子表現，被認為是造成 HIV 病人 IR 原因之一(67)。

為研究 Lipodystrophy 的脂肪組織發炎，Herrero 等人使用 aP2-nSREBP-1c 基因轉殖鼠，此種小鼠是已建立的 Lipodystrophy model(68)，作者證實此種小鼠血液有高量發炎因子(TNF- α 、MCP-1、IL-6 和 IL-10)且是來自萎縮的脂肪組織；脂肪組織出現 CLS 與 ATM，伴隨全身性 IR；給予抗發炎藥物或剔除 IKK β 抑制全身性或脂肪組織發炎反應並無法改善 IR，除非給予脂肪組織移植。雖然外源性脂肪組織在這種小鼠體內發育良好且有效改善 IR，但小鼠自身脂肪組織仍呈現發炎與細胞凋亡狀態；加以作者發現 Lipodystrophy 的 ATM 與 HFD 或 ob/ob 肥胖鼠的 ATM 基因表現截然不同，因此作者結論 Lipodystrophy 脂肪組織的發炎/細胞凋亡與胰島素抵抗無關，此點與肥胖情形大不相同(69)。肥胖與缺乏脂肪組織(lipodystrophy)均會併發 IR 與肝脂堆積，不過二者造成 IR 原因不相同:Lipodystrophy-induced IR 已證實是肇因於缺乏脂肪組織分泌的 Leptin 與 Adiponectin，給予這兩種 Adipokines 可有效逆轉 Lipodystrophic transgenic mice 的 IR (70)。另外異位性的脂質堆積(例如脂質堆積於肝臟或肌肉)也是 Lipodystrophy 惡化 IR 另一原因。

三. Conjugated linoleic acid (CLA)降體脂功效與機制

CLA (Conjugated linoleic acid) 是一群來自亞麻油酸之立體異構物，以 *c-9,t-11* 與 *t-10,c-12* CLA 為主，多存在於反芻動物之肉、脂肪及乳汁中，在一些人類和動物模式的研究發現有降體脂的功效，而 *t-10,c-12* CLA 被鑑定為主要的降體脂功能成分。Park 等人 (71)首度證實 CLA 可改變身體組成，在他們的實驗中分別給予公鼠和母鼠 0.5% (wt/wt) 的 CLA 混合物，與控制組相比分別顯著降低 57%和 60%的體脂肪。其它研究也陸續證明 CLA 在小鼠、大鼠和豬身上皆可降體脂肪(72-76)。舉例來說給予 C57BL/6J 小鼠 1% (wt/wt) CLA 混合物可減少體重和白色脂肪組織(77)。相同的在 *ob/ob* (78)和 ICR 肥胖小鼠(79)，也發現給予 1~1.5% (wt/wt) CLA 混合物三到四週，可降低體重及減少白色脂肪含量。

在動物實驗裡，CLA 可藉由增加基礎代謝率、生熱作用、脂肪酸氧化，甚至脂肪細胞凋亡，達到降體脂的功效(80-85)。BALB/c 小鼠餵食 CLA 六週與控制組比，可藉由增加基礎代謝率而減少 50% 體脂(83)。另外增加生熱作用也可增加能量的消耗，在啮齒類動不管給予 CLA 混合物或者是 *t-10,c-12* CLA，皆可增加白色脂肪組織的 UCP2 轉錄作用(79, 86-89)，但其扮演的能量消耗角色還不清楚。給予 *t-10,c-12* CLA 也可增加脂肪組織 Carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) 的表現(89, 90)，CPT1 主要是參與粒線體脂肪酸的汲取及並催化脂肪酸氧化的速率限制步驟。在正常油脂 (5%) 下給予 C57BL/6N female mice 1 % CLA (*c-9,t-11* 與 *t-10,c-12* 各占 35%) 4天到8個月，結果脂肪組織顯著減少，脂肪細胞表現 TNF- α 、UCP-2 增加，TUNEL 判定發生細胞凋亡(91)。

在細胞培養實驗也顯示*t-10,c-12*CLA會抑制動物和人的前脂肪細胞增生和分化，在成熟的人類分化初代脂肪細胞和成熟的3T3L1脂肪細胞，*t-10,c-12* CLA

可持續減少PPAR γ 的表現和活性 (92, 93) , 進而減少下游基因表現和脂質的含量(94)。另外, 有許多的蛋白質參與lipogenesis, 如lipoprotein lipase (LPL)、acetyl-CoA carboxylase (ACC)、fatty acid synthase (FAS) 和 stearoyl-CoA desaturase (SCD), 研究發現給予CLA混合物或者是 *t*-10,*c*-12 CLA 皆可減少上述lipogenic enzymes的表現 (89, 94-96) 。 PPAR γ 是許多lipogenic基因的上游調控者, 包括Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)、LPL 和 Lipin, 也包括與脂肪油滴有關的蛋白質, 如Perilipin 和 Adipocyte-differentiation-related protein (ADRP) (97)。因此 CLA 的 Anti-adipogenic effect , 有一部分可能是藉由抑制PPAR γ 的活性。

其它在細胞培養顯示的CLA降體脂可能機制還包括促進脂解(98)、脂肪酸 β 氧化(96)及(前)脂肪細胞的凋亡(96, 99, 100)。有關*t*-10,*c*-12 CLA在脂肪細胞作用分子機制研究最透徹的是Brown 等人, 他們以Human adipocytes 與 Non-differentiated stroma vascular cells進行研究顯示*t*-10, *c*-12 CLA藉由活化NF κ B-dependent pathway促進IL-6和 IL8分泌, 導致脂肪細胞Delipidation與胰島素阻抗(94, 101)。*t*-10, *c*-12 CLA在動物實驗也證實可引起脂肪組織發炎反應, 每日管餵含*t*-10, *c*-12 CLA的TG (約0.016 g *t*-10, *c*-12 CLA)從d3或d7就可見到脂肪組織IL-6、TNF α 、MCP-1增加 (但不影響血清量) , 脂肪組織亦可見CLS及ATM(76)。

CLA雖然在動物--尤其小鼠的降體脂功效卓越, 但可能危害胰島素敏感性, 事實上攝取CLA小鼠會出現Lipodystrophic diabetes典型特徵: 白色脂肪顯著降低、肝脂堆積、高胰島素血症及嚴重胰島素阻抗(102), 這些現象在本實驗室也曾觀察到(103)。Tsuboyama-Kasaoka 給予 CLA-induced lipodystrophic and diabetes mice 注射Leptin後胰島素抗性消失, 類似 aP2-SREBP-1c 基因轉殖鼠(91)。在metabolic syndrome肥胖男性也發現補充 3.4 g/d *t*-10,*c*-12 CLA (純度76%) 十二週後, 受試者胰島素抗性增加, 且HDL-C降低, 伴隨尿液過氧化物

排出增加、血清C-peptide增加，顯示糖尿病與心血管疾病危險增加(104)。

四. 苦瓜籽油生理功能研究

苦瓜籽油富含另種共軛雙鍵脂肪酸 *c9,t11,t13-Conjugated linolenic acid* (*c9,t11,t13-CLN*)，基於先前苦瓜全果凍乾粉有降體脂功效(2)及 *c9,t11,t13-CLN* 在 3T3-L1 可抑制 Adipogenesis(3)，我們選擇苦瓜籽油進行動物實驗探討降體脂可能。

(一) 降血脂

Noguchi 等人 (105) 給予 Wistar rats 7% 油脂飼料 (三組分別為 7% soybean oil、6.5% soybean+0.5% BMSO、5% soybean oil+2% BMSO)，後二者分別提供佔飼料重 0.25% 與 1% *c9,t11,t13-CLN*，四週後給予 2% BMSO 大鼠體重顯著低於對照，血液游離膽固醇下降(總膽固醇無差異)，HDL-C 有增加趨勢，但肝臟 Hydroperoxide 增加，可能與 *c9,t11,t13-CLN* 脂肪酸易氧化有關。然而 Dhar 等人 (106) 使用 20% 高油飼料餵食大鼠油脂來源分別為 sunflower oil 或 sunflower oil 混 BMSO(二者比例 99:1、96:4、80:20)，結果無論 total cholesterol、HDL-C or nonHDL-C 均無顯著差異。

如果苦瓜籽油真有降血脂功能，可能與 PPAR α 活化有關，已證實苦瓜籽油中富含的 *c9,t11,t13-CLN* 相較一般脂肪酸有較強 PPAR α 活化力(107)，PPAR α 活化可促進脂肪酸走向異化途徑。

(二) 抗癌

Kohno 等人 (108, 109) 證實在 azoxymethane (AOM) 誘導大腸癌之大鼠，給予富含 *c9,t11,t13*-CLN 苦瓜籽油 0.01-0.1% 三十二週，可以增加大腸黏膜細胞 PPAR γ 蛋白質表現，並且抑制 Colon carcinogenesis。Yasui 等人 (110) 將苦瓜籽油水解所得游離脂肪酸用來處理大腸癌細胞 Caco-2，可促進凋亡、抑制增生。自苦瓜籽油游離脂肪酸分離出的 *c9,t11,t13*-CLN 只要 20 μ M，可完全殺死 Caco-2，毒殺作用遠大於另一抗癌物--*c9,t11*-CLA，作者認為苦瓜籽油游離脂肪酸造成 Caco-2 apoptosis 與向上調節 GADD45、p53 及 PPAR γ 有關。

有關 *c9,t11,t13*-CLN 的抗癌作用，大部份研究認為與 PPAR γ 活化有關，Yasui 等人 (111) 比較 troglitazone (a synthetic PPAR γ ligand) 與 *c9,t11,t13*-CLN 對三種結腸癌細胞 HT-29, DLD-1, Caco-2 cells 之抗增生與促凋亡效果，結果不論 troglitazone 或 *c9,t11,t13*-CLN 均可抑制癌細胞增生與誘使凋亡，如預期的是 HT-29 細胞--表現最高量 PPAR γ 之細胞--對 TZD 與 *c9,t11,t13*-CLN 毒殺作用最敏感。Tsuzuki 等人 (112) 以 in vitro 與 in vivo 模式證明 *c9,t11,t13*-CLN 抑制腫瘤血管新生：利用 mouse dorsal air sac assay 技術，植入 DLD-1 colorectal adenocarcinoma cells 後給予小鼠管餵 Tung oil (含 *c9,t11,t13*-CLN 50 及 100 mg/kg/d 劑量)，顯著降低腫瘤組織血管長度；在與 Fibroblast 共培養的 HUVEC cells，*c9,t11,t13*-CLN (10 and 20 μ M) 可抑制 VEGF 誘導的 Tube formation、Migration and proliferation，並抑制 HUVEC 之 VEGF-Receptor 與 PPAR γ 表現，促進 Apoptosis；*c9,t11,t13*-CLN 的促進細胞凋亡與抑制 Tube formation 作用在添加 GW9662 (a PPAR γ inhibitor) 後消失，表示 *c9,t11,t13*-CLN 的 antiangiogenesis effect 與 PPAR γ 活化有關。

雖然 *c9,t11,t13*-CLN 在體內可被代謝為 *c9,t11*-CLA，但 *c9,t11,t13*-CLN 的抗癌作用似乎不是單純可以 *c9,t11*-CLA 解釋：Tsuzuki 等人 (113) 將 DLD-1 Human colon cancer cells 殖入裸鼠，結果補充 *c9,t11,t13*-CLN 比起 *c9,t11*-CLA 可以有效降低腫瘤重量。雖然補充 *c9,t11,t13*-CLN 組織中出現的 *c9,t11*-CLA 含

量與補充 *c9,t11*-CLA 相當，但補充 *c9,t11,t13*-CLN 者癌組織 Phospholipid hydroperoxide 及 TBARS 含量卻高於補充 *c9,t11*-CLA 者，表示 *c9,t11,t13*-CLN 的抗癌作用與增加脂質過氧化有關；加入 α -tocopherol 則可以抑制上述氧化壓力及細胞凋亡。此外 *c9,t11,t13*-CLN 也被報告能夠抑制數種癌細胞 A549、DLD-1、HepG2、HL-60 存活。

(三) 降體脂

相對於 *t10,c12*-CLA 降體脂功能廣被接受，*c9,t11,t13*-CLN 對體脂生成影響從未被研究，Koba 等人 (114) 利用動物模式將 CLN 複合物 (Mixture of conjugated diene and triene) 添加於飼料，發現可以降低白色脂肪含量，但此種 CLN 異構物型式與苦瓜中不同。Nishimura 等人 (115) 將苦瓜萃出之 CLN 添加於 3T3-L1，發現 200 μ M 促進前脂肪細胞凋亡。本實驗室利用 3T3-L1 前脂肪細胞株比較 LN (C18:3 n3) 與 *c9,t11,t13*-CLN 之 Adipogenic effects，發現 CLN 促進 Preadipocytes 增生時期的細胞凋亡、抑制分化，其 Adipogenic effect 小於 LN，暗示可能有降體脂潛能；此外 CLN 在 3T3-L1 的 Anti-adipogenic effect 與延長細胞 Mitotic clonal expansion 時期的 ERK/MAPK 磷酸化(活化)有關(3)。已知短暫的 ERK 活化是 3T3-L1 分化所必需(116, 117)，延長 ERK 活化將導致脂肪細胞分化必要因子 PPAR γ 磷酸化(轉錄失活)及 Ubiquitin-proteasome-dependent degradation (118, 119)。

除了苦瓜籽油，近來另一個富含 Conjugated linolenic acid 的石榴籽油降體脂與肝脂功能也受到重視(120, 121)，石榴籽油含有另種 CLN 異構物--*c9,t11,c13*-CLN(又名 Punicic acid)，基因改良 Rapeseed oil 使之富含 punicic acid，證明可藉由促進肝臟及棕色脂肪 CPT 活性，促進脂肪酸氧化代謝，降低肝脂及體脂堆積(121)。

(四) *c9,t11,t13*-CLN 的代謝

已知苦瓜籽油脂肪酸組成含 60-80% *c9,t11,t13*-CLN (又名 α -eleostearic acid)(122)，苦瓜肉也有此種脂肪酸。苦瓜籽油降體脂功能可能來自 *c9,t11,t13*-CLN，因此了解 *c9,t11,t13*-CLN 在體內代謝是必要的：許多研究顯示動物補充 *c9,t11,t13*-CLN 或苦瓜籽油後組織可偵測到 *c9,t11*-Conjugated linoleic acid (CLA)(105, 123, 124)並伴隨 DHA 含量增加(105)；除 *c9,t11*-CLA 外沒有其它 CLA 異構物(例如 *t10,c12*-CLA)被發現。根據研究大鼠食入 *c9,t11,t13*-CLN 立即於肝、小腸、腎經 NADPH-dependent enzyme (飽和酶)轉變為 *c9,t11*-CLA (123)；至於組織 DHA 如何增加目前並不清楚。

另外苦瓜籽油也可能含一些 triterpenoids，最近陸續報導從苦瓜根莖葉或全果分離出 Triterpenoids compounds，具有活化 AMPK 能力(125, 126)。

五. 能量代謝相關傳訊

(一) AMP-activated protein kinase (AMPK)

AMPK是一個異三聚體(Heterotrimeric)蛋白質，含有催化部位 α 和調節部位 β 和 γ (127-129)。在 α ($\alpha 1$ 和 $\alpha 2$) 和 β ($\beta 1$ 和 $\beta 2$)皆由兩個基因所組成，而 γ 則由三個基因組成($\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 和 $\gamma 3$)。AMPK會被細胞中AMP/ATP的比例增加所活化，是做為細胞能量狀態的感應者。AMP異位活化AMPK是藉由上游腫瘤抑制因子LKB1磷酸化 α subunit Thr-172這個位點，進而活化AMPK(127, 128, 130)。AMP的結合會抑制去磷酸酶蛋白質對Thr-172的去磷酸化作用，而高濃度的ATP狀態會抑制AMPK的活化。而最近研究發現Calmodulin-dependent protein kinase kinase (CaMKK)為AMPK另一個上游的kinase，CaMKK活化AMPK主要是受細胞內鈣離子濃度增加所導致的，並非細胞內AMP/ATP的比例改變(131)(如圖 1-3)。CaMKK主要是表現在CNS，在其他組織如肝臟和肌肉其表現很低，推測AMPK的路徑會有不同組織特异性(132)。5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside (AICAR)是一種人工合成的AMPK活化劑，結構類似AMP。

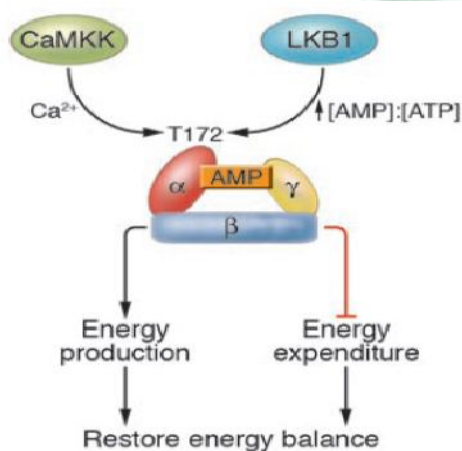


圖 2-3 Structure and regulation of AMPK

資料來源：Long 等人., 2006 (133)

活化 AMPK 會走向生成 ATP 的路徑，並且關閉消耗 ATP 的路徑，在肌肉細胞，急性活化 AMPK 會增加葡萄糖的汲取和脂肪酸的氧化，而長期活化 AMPK 則與粒線體的生合成有關。在肝臟活化 AMPK 會抑制葡萄糖和脂質的合成，但會增加脂肪酸的氧化(133)。在白色脂肪組織，利用 AMPK 的活化劑 AICAR 處理初代脂肪細胞，發現急性活化 AMPK 對脂肪細胞葡萄糖汲取、脂質生合成和脂肪酸的氧化均降低，而脂肪酸氧化減少是因為 AICAR 誘導的 AMPK 活化減少了細胞對脂肪酸的汲取(134)，而 AMPK 長期活化不但減少葡萄糖汲取，葡萄糖轉變為脂肪酸、胞外脂肪酸的汲取外，並增加脂肪酸的氧化(135)。總而言之，在肌肉、肝臟和脂肪組織中 AMPK 的活化可使體內有良好的代謝環境，並且可預防或治療第二型糖尿病，包括可降低葡萄糖的循環、減少血脂質和不正常的脂質堆積，進而改善胰島素的敏感性或有降體脂功能。

在台灣，周等(126)利用 TNF- α 造成 FL83B 肝細胞與 C2C12 肌細胞胰島素阻抗，觀察投予物對細胞葡萄糖汲取改善能力，利用此平台篩選苦瓜莖分離物，找出三種 triterpene 化合物 (23*E*)cucurbita-5,23,25-triene-3 β ,7 β -diol、3 β ,25-dihydrox-7 β -methoxycucurbita-5,23(*E*)-diene 及 3 β ,7 β ,25-trihydroxycucurbita-5,23(*E*)-diene-19-al，在 5-25 μ g/mL 劑量下可促進葡萄糖汲取能力，並在肝細胞促進 IRS-1 的酪胺酸磷酸化(如 insulin)及 AMPK 磷酸化。這三個化合物過去也曾經從苦瓜分離出並鑑定有抗糖尿病功效(136, 137)，但活化 AMPK 角色直到最近才被注意。目前並不知道苦瓜籽油中是含有這些三萜類化合物或具有活化 AMPK 作用。

(二) Protein kinase A / cAMP-dependent protein kinase (PKA)

PKA是一個 serine–threonine kinase，當腎上腺素 (Epinephrine) 刺激細胞膜進而提高cAMP的濃度就會活化 PKA (138, 139)。在PKA路徑， G-protein receptor 為一個穿膜七次的蛋白質，參與很多細胞內的傳訊，當細胞外的荷爾蒙結合至G-protein receptor，會使構型改變而活化G-protein heterotrimeric。當G-protein活化會使G-protein的subunit G_{α} 活化 adenylyl cyclases (ACs)，ACs就會將ATP轉換成cAMP。當cAMP與PKA結合，會分開不活化的holoenzyme並且磷酸化下游目標基因(140) (如圖1-4)。

已知PKA holoenzyme 有四個 subunit，分別為兩個催化活性部位 (PKAC subunits)，另外兩個為調控酵素活性部位 (PKAR subunits)。當結合在一起時為不活化的Heterotrimeric enzyme。而當細胞膜的訊號來時，細胞內cAMP的濃度會上升，則cAMP就會結合至調節部位，而釋放催化活性部位PKAC，使之自由。

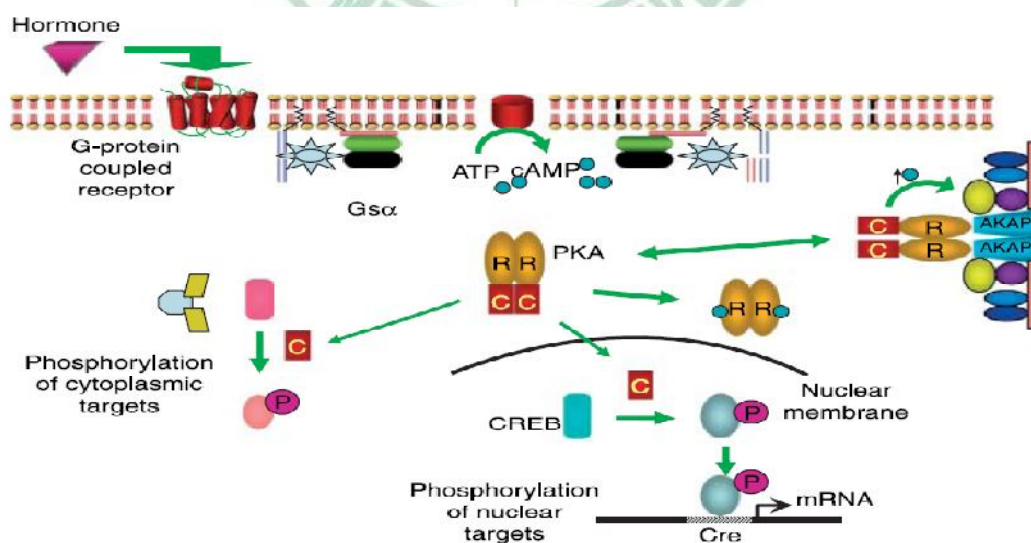


圖 2-4 General overview of protein kinase A signaling

資料來源：Kirschner 等人., 2009 (141)

PKA的活化與 β -adrenergic刺激有關，其結果在脂肪組織除了促進脂解(如前述)外，可能也會促進生熱(如圖1-5)。 β -adrenergic刺激會誘發cAMP依賴路徑，在棕色脂肪細胞一方面增加脂解釋出脂肪酸提供氧化，也會增加粒線體Uncoupling protein 1 (UCP1)活性，去偶和氧化磷酸化反應以促進生熱(142)，在鼠類增加棕色脂肪組織UCP1表現被認為是對抗飲食誘導肥胖的對策之一。

給予小鼠 β -adrenoreceptor的促進劑 CL 316243或將小鼠置於低溫下以增強 β -adrenergic刺激，證明可減少白色脂肪組織量，同時發現白色脂肪組織出現會表現 UCP1 的 multilocular細胞，類似棕色脂肪細胞(143)。雖然這些棕色脂肪細胞的來源還不清楚，但可確定的是增加 β -adrenergic刺激有助降體脂。

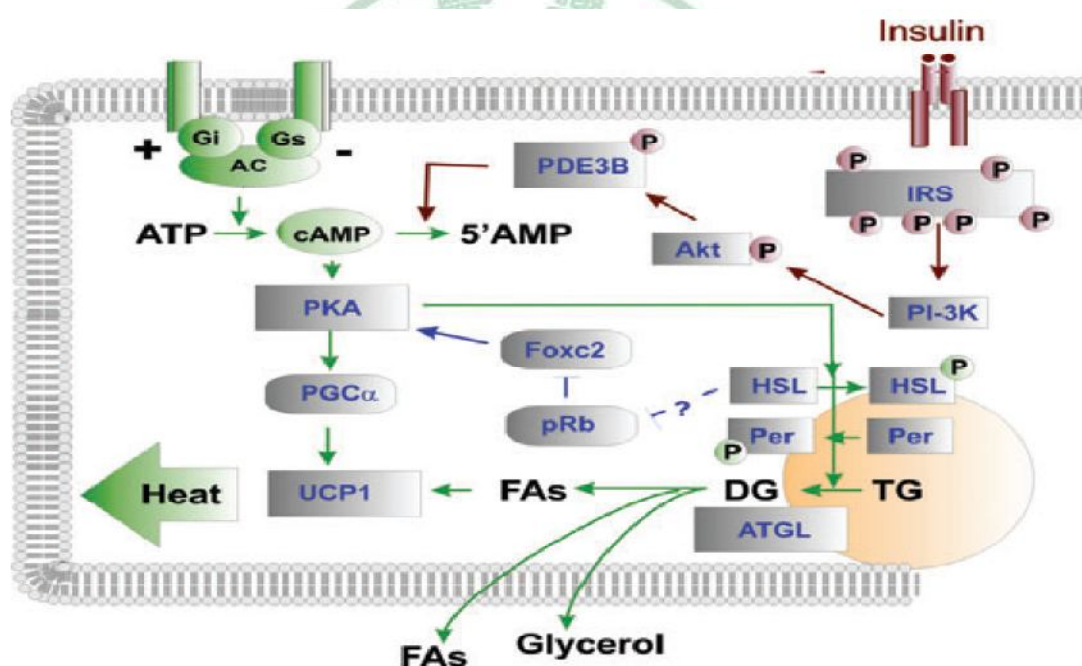


圖 2-5 The role of cAMP and insulin in regulation of energy expenditure in brown and brown-like adipocytes

資料來源：Lise 等人., 2010(144)

AMPK 與 PKA 磷酸化蛋白質後可能改變酵素活性或轉錄因子活性而影響下游基因表現。例如 AMPK 或 PKA 均可磷酸化 acetyl-CoA carboxylase (ACC) 造成酵素失活(如圖 1-6)。在哺乳動物，ACC 有兩種 isoforms，稱為 ACC1(or

ACC265、ACC α) 和 ACC2(or ACC280、ACC β)，前者生成的 malonyl-CoA 作為 Lipogenesis 受質，後者生成的 malonyl-CoA 可抑制 CPT1 因而抑制脂肪酸 β -oxidation。ACC α 主要表現在脂質合成多的組織，如肝臟、白色脂肪組織和乳腺(145, 146)，而 ACC β 主要是表現在骨骼肌和心臟(147, 148)。總之活化的 ACC 會促進脂肪酸合成、抑制脂肪酸氧化代謝。

ACC α 有幾個絲胺酸磷酸化位點，在動物體中這些磷酸化位點會被 PKA (Ser 1200)和 AMPK (Ser 79)所磷酸化，進而使 ACC 失活。研究顯示 AMPK 磷酸化 ACC 可減少 80~90% ACC α 的 V_{max} ，而 PKA 磷酸化 ACC 頂多只能減少 <15%的 V_{max} 。在大鼠 AMPK 磷酸化 ACC α 磷酸化位點為 Ser 79，而對 ACC β 磷酸位點則是 Ser 218，這些磷酸化作用會降低 V_{max} ，並且增加對 Citrate (activator of ACC)的 K_a (149-153)。

不論 AMPK 或 PKA 也均可磷酸化轉錄因子 cAMP response-element binding protein (CREB)，而使其結合至 DNA 上，進而改變下游基因的 Transcription (154)(如圖 1-6)，已知能量代謝相關 CPT、Cytochrome c 與 PPAR- γ coactivator 1- α (PGC1 α)均是 CREB 下游基因。

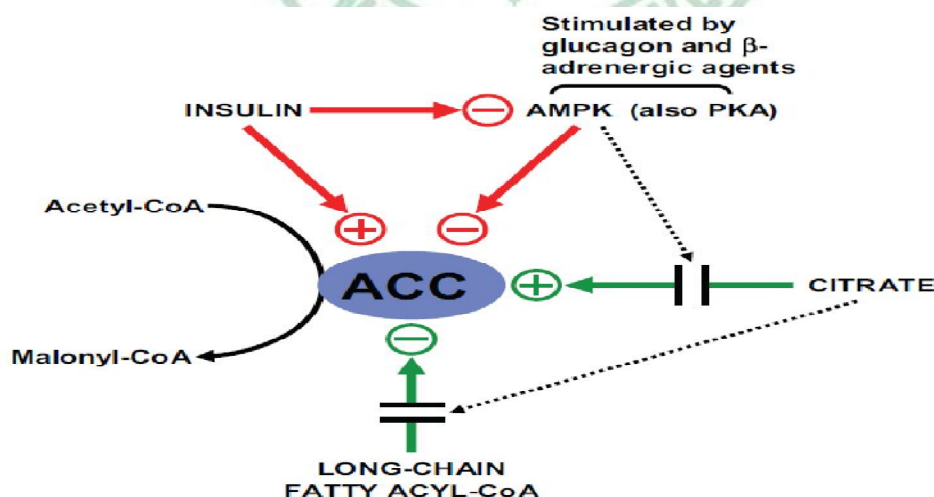


圖 2-6 Regulation of acetyl-CoA carboxylase by allosteric effectors (green) and protein phosphorylation (red)

資料來源：Saggerson 等人., 2008 (155)

(三) Leptin signaling

1994年Leptin在基因突變的ob老鼠身上發現，缺乏這種蛋白質是ob/ob老鼠嚴重肥胖原因(156)。Leptin主要表現於脂肪組織，分泌出Leptin在下視丘降低促進食慾 (orexigenic) 及增加抑制食慾的胜肽(anorexigenic peptide)，達到抑制食慾及減重功效(157)；Leptin調控能量的代謝、增加能量的消耗並且減少能量的攝取，因此leptin被認為是能量效率的代謝中樞。在肥胖者的身上由於Leptin阻抗關係，Leptin的表現與分泌會上升，身體脂肪的囤積與血液Leptin濃度有很強的正相關(158)。目前已知Leptin sensitive neurons位在下視丘，因此下視丘的Leptin receptors控制飽足感和能量平衡。研究發現Leptin receptors在很多器官皆有表現，如肝臟、骨骼肌、心臟、腎臟、胰臟與脂肪細胞本身(159-161)。這些Receptor屬於class I細胞激素接受器，有三種Leptin receptors包括：long (ObRb)、short (ObRa、ObRc、ObRd和ObRf) 和 ObRe (162)。ObRb可啟動Leptin所引發的能量代謝訊息路徑。ObRb dimerizes結合Leptin後形成一個複合體，可吸引Janus kinase 2 (Jak2)， Jak2 可磷酸化自己和 Leptin receptor。被磷酸化的受器會結合至轉錄因子 Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)，STAT3 在被 Jak2 磷酸化後轉移至核內，並增加 β -oxidation、uncoupling proteins 和調控食物攝取的基因表現(163)。阻斷 Leptin 的訊息傳遞路徑可藉由活化Protein tyrosine phosphatase-1B (PTP-1B)或Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS-3)，二者均可干擾Jak2的磷酸化(164, 165)。在高脂飲食所誘導的肥胖發現 PTP-1B 與 SOCS-3 有大量表現，導致leptin resistance。Leptin 也會影響 AMPK，例如 Leptin 活化骨骼肌的AMPK，促進肌肉的脂肪酸氧化；又如Leptin抑制下視丘的 AMPK，減少 NPY 和 AGRP 的訊息傳遞路徑，進而減少食物的攝取和增加能量的消耗(166)。

第三章 材料與方法

一. 實驗設計與假說

本研究目的在探討富含之特殊脂肪酸 *cis9*, *trans11*, *trans13*-conjugated linolenic acid (*c9*, *t11*, *t13*-CLN)的苦瓜籽油(BMSO)之降體脂功能、需要劑量及可能機制。

實驗一

目的：初步探討苦瓜籽油是否有降體脂功效。

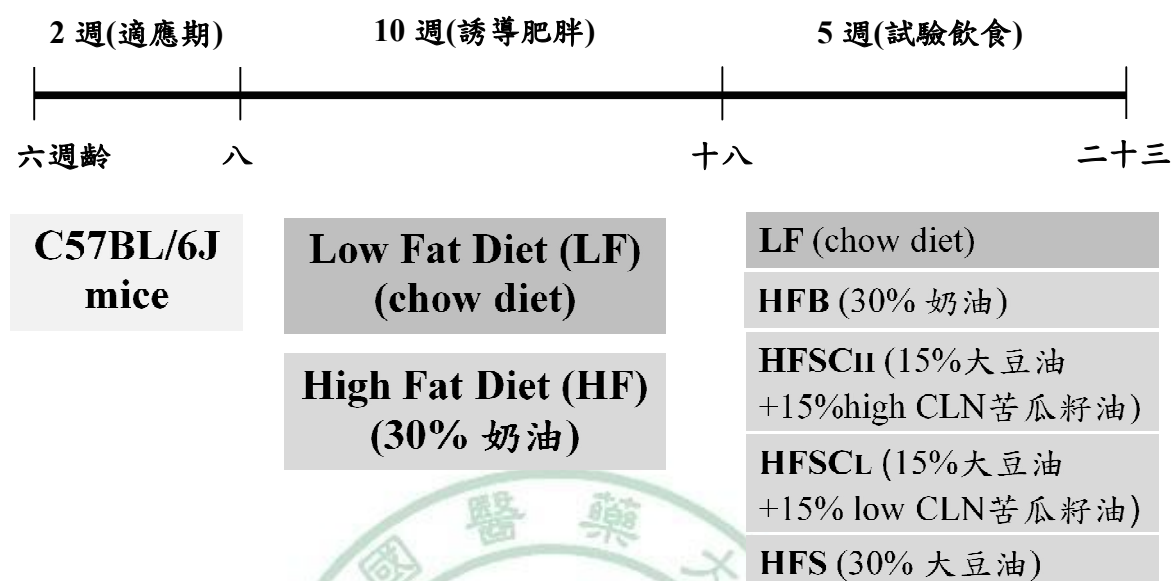
策略：以高奶油飲食誘發小鼠肥胖後，比較苦瓜籽油(BMSO)與大豆油降體脂效果，實驗設計大綱如圖 3-1 所示。為了解功能成分是否來自 CLN，使用兩種品系苦瓜籽分別含高或低 *c9*, *t11*, *t13*-CLN，並測量脂肪組織脂質代謝相關 gene 表現，以期為後續機制探討提供方向。

實驗二

目的：在證實 BMSO 有降體脂的功效後，進一步探討 BMSO 的作用機制及所需劑量。

策略：小鼠分別給予不同比例大豆油混苦瓜籽油(30:0, 25:5, 20:10, 15:15)長期餵食，觀察降體脂效果是否有劑量-反應關係，並尋找苦瓜籽油降體脂可能機制：包括腸道脂質吸收、PPAR α 活化、AMPK、PKA 或 leptin 傳訊，實驗設計大綱如圖 3-2 所示。

實驗一之實驗設計



- 組織秤重 • 血液生化值測定 • 脂肪組織切片與脂肪細胞大小
- 副睪脂之脂質含量測定 • 脂肪組織 mRNA 含量測定

圖 3-1 實驗一實驗設計示意圖

實驗一之動物犧牲與樣品收集

本實驗設計是利用奶油將小鼠誘發肥胖再給予不同油脂觀察其降體脂功效，奶油為一飽和脂肪酸(SFA)可誘導肥胖，而大豆油為不飽和脂肪酸(PUFA)可使小鼠較不易肥胖，所以皆以奶油誘發肥胖之後，再給與奶油和大豆油分別會肥胖及較不易肥胖的油脂與苦瓜籽油做比較。動物在犧牲前予以禁食 12 小時，利用二氧化碳將動物窒息，秤取動物犧牲前之體重，以眼窩採血採集小鼠禁食血清，並迅速取出組織包括肝臟，腹膜後脂肪(Retroperitoneal fat, RE)及副睪脂(Epididymal fat, EP)、鼠蹊脂肪(Inguinal fat)、小腿腓腸肌、腎臟、心臟、胰臟和脾臟等，取出後立即秤重並投入液態氮中，保存於 -80°C ，供日後實驗分析。Epididymal fat 剪下一小塊泡在 10% 甲醛中，以供日後切片用。

實驗二之實驗設計

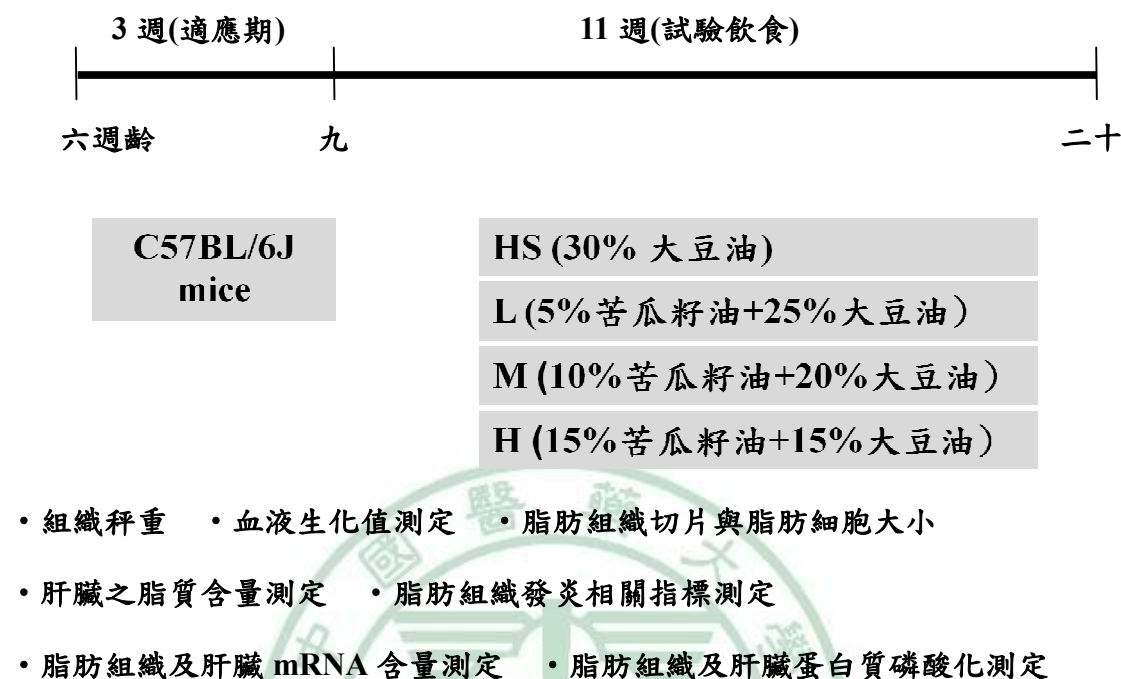


圖 3-2 實驗一實驗設計示意圖

實驗二之動物犧牲與樣品收集

本實驗設計是給予不同油脂觀察其體脂堆積情形，由於上個實驗已有與奶油做比較，且發現苦瓜籽油降體脂效果較奶油好，所以在實驗二我們就只與大豆油做比較。動物在餵食試驗飲食 4 週，取眼窩血測血清三酸甘油酯及 Leptin，第 8 週收集糞便測腸道脂質吸收率。動物在犧牲前予以禁食 12 小時，利用二氧化碳將動物窒息，量小鼠鼻肛長做為測量小鼠的 BMI (Lee's index)，秤取動物犧牲前之體重，以眼窩採血採集小鼠禁食血清，並迅速取出組織包括肝臟，腹膜後脂肪(RE)及副睪脂(EP)、鼠鱧脂肪(Inguinal fat)、小腿腓腸肌、腎臟、心臟、胰臟、脾臟、下視丘等，取出後立即秤重並投入液態氮中，保存於 -80°C ，供日後實驗分析。Epididymal fat 剪下一小塊泡在 10% 甲醛中，以供日後切片用。

二. 苦瓜籽油的製備

將花蓮農改場所提供之曬乾苦瓜籽以磨咖啡豆機磨成粉末，將苦瓜籽粉末和 n-hexan (n-hexan, HPLC GRADE, ECHO) 以 1:10 的比例浸泡一天，再將其過濾，並收集濾液，而剩餘的苦瓜籽渣再以相同比例浸泡兩天，再進行過濾，將兩次所過濾的濾液以減壓濃縮的方式得到所需要的苦瓜籽油。實驗一依據本實驗室先前定量 11 種品系苦瓜籽油(小量製備)的脂肪酸組成，挑出 High CLN 及 Low CLN 兩種品系，各 600g 萃得各約 150g 油脂(萃率約 25%)供應動物實驗，但此批苦瓜籽油並無分析脂肪酸組成數據；實驗二為混合品系苦瓜籽 4600 g 萃得約 1480 g 油脂(萃率約 32%) 供應動物實驗，分析脂肪酸組成與奶油、大豆油共列於表 3-1。

三. 苦瓜籽油脂脂肪酸組成分析

由於 conjugated linolenic acids (CLN) 結構特殊，因此以 GC 做脂肪酸定量時需較謹慎的方式做脂肪酸甲基酯化，以避免 artifacts 產生，以致 CLN 比例減少。Chen 等學者在 2007 年發表 NaOCH₃/MeOH 對於 TG 型式的 CLN 是最好的甲基酯化方式 (base-catalyzed methods)(167)，而 NaOCH₃/MeOH 甲基酯化方式則是採用 Tsuzuki 等學者之 protocol(124)。

(一) 藥品配製：

1 M, NaOCH₃/MeOH

藥品	需要量 (g)
NaOCH ₃ (Alfa Aesar), F.M. = 54.02	5.402
將 NaOCH ₃ 溶於 100 ml MeOH 中	

(二) 實驗方法

取 5 mg 苦瓜籽油，加入 2 mL (1 M NaOCH₃/MeOH) 室溫下反應 5 分鐘並 vortex，之後加入 3 mL 的飽和食鹽水以停止反應，再加入 5mL 的 hexane 並 vortex，靜置後取上層，此步驟重複三次，以確保脂肪酸萃取完全，最後以減壓濃縮或氮氣吹乾，待測定時以 1mL hexane 回溶，即送至生理所蘇慧敏老師實驗室做 GC 定量脂肪酸比例。

四. 試驗飼料配製

除了實驗一 LF 組餵食標準 chow diet，其它高脂飼料的基本組成是仿 Hsu & Huang 依據 AIN-76 配方修改而成(168)。飼料成份包括蔗糖 (Sucrose)、酪蛋白 (Casein purified high > 85% protein, MP Biomedicals)、玉米澱粉 (Corn starch, Seoul Korea)、纖維素 (Alpha cellulose non-nutritive bulk)、AIN-93 礦物質混合物、AIN-93 M 維生素混合物、胱胺酸 (L-Cystine) 及膽鹼 (Choline bitartrate, 41.1% Choline)。將各種粉狀材料依照表 3-1 比例先行混合均勻，再依配方比例分別拌入苦瓜籽油、大豆油及安佳無鹽奶油，飼料烘乾後密封置於 -20°C 冷凍保存，以供動物飼養實驗。實驗一的高脂飼料組成分如表 3-2，推測兩組苦瓜籽油組 CLN 含量佔飼料重的 3-8%。而實驗二的高脂飼料組成分如表 3-3，其中油脂含量分別為 30% soybean oil (HS)、5% BMSO + 25% soybean oil (L)、10% BMSO + 20% soybean oil (M) 和 15%BMSO + 15% soybean oil (H)，CLN 含量分佔飼料重的 0、2.5、5 及 7.5%。

五. 動物飼養

(一) 實驗一之動物飼養

本實驗使用 6 週齡 C57BL/6J 公小鼠 (購自國家動物實驗中心)，適應兩週後(8 週齡)將小鼠分為兩組,一組為 LF 組(control, n=10)給予正常 chow diet (Prolab[®] RMH 2500)，一另組為 HF 組(30% butter, n=40)誘發肥胖，誘發十週後 HF 再分為四組，分別為 HFB (30% butter—安佳無鹽奶油)、HFS (30% soybean oil—統一大豆沙拉油)、HFSC_L (15% low CLN BMSO +15% soybean oil) 和 HFSC_H (15% high CLN BMSO +15% soybean oil)，每組 10 隻。動物房溫度維持於 25±2 °C，光照及黑暗各 12 小時 (0800-2000 為光照期，其餘為黑暗期)，飼料飲水自由攝食，期間紀錄體重及進食量。試驗飲食餵食五週後犧牲。

(二) 實驗二之動物飼養

本實驗使用 6 週齡 C57BL/6J 公小鼠(購自國家動物實驗中心)，適應三週後(九週大)將小鼠分為五組，給予 30%高脂飲食，油脂來源分別為 soybean oil (HS)、5% BMSO +25% soybean oil (L)、10% BMSO + 20% soybean oil (M)、15%BMSO + 15% soybean oil (H)，每組 10 隻，此試驗飲食餵食 11 週。動物房溫度維持於 25±2 °C，光照及黑暗各 12 小時 (0800-2000 為光照期，其餘為黑暗期)，飼料飲水自由攝食，期間紀錄體重及進食量。試驗飲食餵食 11 週後犧牲。

表 3-1 奶油、大豆油和苦瓜籽油之脂肪酸組成^{1,2}

	Butter	Soybean oil	BMSO (H)	BMSO (L)	BMSO
C6 : 0	0.7	-	-	-	-
C8 : 0	0.8	-	-	-	-
C10 : 0	2.5	-	-	-	-
C12 : 0	3.6	-	-	-	-
C14 : 0	11.8	-	-	-	0.05
C16 : 0	33.1	10.4	2.4	3.39	3.58
C18 : 0	13.4	3.8	31.31	38.5	28.73
C20 : 0	-	-	0.4	-	0.5
C16 : 1	2.0	-	-	-	-
C18 : 1, n-9	29.3	22.5	5.05	-	7.82
C20 : 1, n-9	-	-	0.3	-	0.38
C18 : 2, n-6	0.7	55.8	3.77	6.2	6.35
C18 : 3, n-3	2.0	7.2	-	-	-
C20 : 3, n-6	-	-	-	20.5	4.52
c9,t11,t13-CLN	-	-	56.72	19.6	47.79
SUFA	65.9	14.2	34.1	41.9	32.8
MUFA	31.3	22.5	5.4	10.9	8.47
PUFA	2.7	63.0	60.5	46.5	58.6

¹ BMSO (H)及 BMSO (L)分別為實驗一使用 HFSC_H及 HFSC_L 兩品系苦瓜籽油在小量製備所得脂肪酸組成 (感謝本實驗室林毓舜分析, 採用 diazomethane 法)

² BMSO 為實驗二所用混合品系苦瓜籽油之脂肪酸組成 (感謝陳姮君分析, 採用 NaOMe/methanol 法)。

表 3-2 實驗一高脂飼料組成

Table 3-2 The composition of high fat experimental diets used in Experiment 1

	HFB	HFSC _H	HFSC _L	HFS
	%			
Casein	26	26	26	26
DL-Cystine	0.3	0.3	0.3	0.3
Corn starch	16	16	16	16
Sucrose	16	16	16	16
Cellulose	6.1	6.1	6.1	6.1
Butter oil	29	-	-	-
High CLN BMSO	-	15	-	-
Low CLN BMSO	-	-	15	-
Soybean oil	1	15	15	30
Vitamine mixture	1.2	1.2	1.2	1.2
Mineral mixture	4.2	4.2	4.2	4.2
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2
Calorie density (kcal / g)	5.02	5.02	5.02	5.02
Protein / calorie (g / 100 kcal)	52	52	52	52
Vitamins / calorie (g / 1000 kcal)	2.6	2.6	2.6	2.6
Minerals / calorie (g / 1000 kcal)	9	9	9	9

表 3-3 實驗二高脂飼料組成

Table 3-3 The composition of high fat experimental diets used in Experiment 2

	HS	L	M	H
	%			
Casein	26	26	26	26
DL-Cystine	0.3	0.3	0.3	0.3
Corn starch	16	16	16	16
Sucrose	16	16	16	16
Cellulose	6.1	6.1	6.1	6.1
BMSO	-	5	10	15
Soybean oil	30	25	20	15
Vitamine mixture	1.2	1.2	1.2	1.2
Mineral mixture	4.2	4.2	4.2	4.2
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2
Calorie density (kcal / g)	5.02	5.02	5.02	5.02
Protein / calorie (g / 100 kcal)	52	52	52	52
Vitamins / calorie (g / 1000 kcal)	2.6	2.6	2.6	2.6
Minerals / calorie (g / 1000 kcal)	9	9	9	9

六. 腸道脂質吸收率測定

四組小鼠各分為兩小組，收取小鼠三天的糞便並烘乾，其間的三天每天測量其進食量，烘乾後的糞便磨成粉，各取 0.5 的烘乾糞便粉末，取約 5mL 萃取液(Chloroform : Methanol = 2 : 1) 萃取脂質，之後測定其糞便中 Total Lipids 的含量。

(一) 血清總脂質 (Total Lipids) 含量測定

1. 原理

脂質與濃硫酸反應，進行水解，再與磷酸 (Phosphoric acid) 及香草醛 (Vanillin) 反應形成粉紅色複合物，測定其在 530 nm 之吸光值。

2. 方法

採用市售試劑組 (RANDOX, Cat. No. TL100, Lot 027213)。取 20 μ L Standard (標準濃度為 1000 mg / dL) 加入 1 mL 濃硫酸或 20 μ L Sample 加入 1 mL 濃硫酸至 10 cm 玻璃試管中，混合均勻後以 100°C 水浴 10 分鐘。待冷卻後，取上述溶液 10 μ L 加 200 μ L Reagent 和濃硫酸 (blank) 10 μ L 加入 200 μ L Reagent 到 96 well 中混合均勻後，在室溫下 (20-25°C) 反應 30 分鐘，測量樣品 530 nm 之吸光值。再根據下列式計算糞便中總脂質濃度 (mg / dL)。

$$\text{糞便中總脂質濃度 (mg / dL)} = \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{standard}}} \times 1000$$

(二) 計算

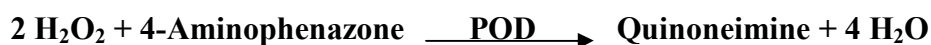
$$\text{脂質吸收率} = \frac{(\text{三天總攝食量}) - (\text{三天糞便排出量})}{\text{三天總攝食量}} \times 100\%$$

七. 體溫測定

利用 MicroTherma 2T Thermometers (ETI Ltd) 測量小鼠肛溫，小鼠肛溫測量時間點：0hr (未暴露於 4°C 下)、暴露在 4°C 下後之 1hr、2hr、3hr 和 4hr 的肛溫，觀察小鼠的體溫變化。

八. 血糖分析

1. 原理



測定 Quinoneimine (紅紫色) 在 500 nm 的吸光值。

2. 方法

採用市售試劑組(*RANDOX* GL2623, Amtrim, UK)。取 4 μL Samples 或 Glucose standard (5.55 mmol/L) 於 96 孔透明盤中，加入 200 μL 反應試劑(含 Phosphate buffer pH 7、MOPS buffer pH 7、4 - aminophenazone、Phenol、Peroxidase、glucose oxidase)，混合均勻後，在室溫下反應 25 分鐘，以 4 μL 二次水加 200 μL 反應試劑做為 Blank，測定 500 nm 之吸光值，即可得樣品血清之葡萄糖含量。

3. 計算

$$\text{Glucose conc. (mmol/L)} = \frac{\text{A sample}}{\text{A standard}} \times \text{Standard 濃度 (5.55 mmol/L)}$$

九. 血清胰島素含量測定

1. 原理

此商業套組 (LINCO, Rat/Mouse insulin ELISA kit) 為利用固態雙向免疫酵素結合原理測定，利用兩個具專一性之單株抗體與胰島素分子上特定抗原結合(三明治法)，使檢體中的胰島素藉由 Anti-insulin antibody (一抗，已 Coating 於 Microplate 上) 和 Peroxidase conjugated anti-insulin antibody (二抗) 結合於反應槽中，再以 Buffer 清洗未結合之酵素標定抗體，以降低非專一性反應，而後加入 Peroxidase 之受質 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine 反應呈色，最後以強酸中止反應，讀取其吸光值 ($A_{450\text{ nm}}$) 即可套入標準曲線換算出胰島素濃度。

2. 方法

以二次水將 Wash buffer concentrate 製備成 Wash buffer。其它試劑市售套組皆配好可直接使用。Well 先以 300 μ L 的 Wash buffer 清洗 3 次。加入 10 μ L 的 Assay buffer 到 blank 和 sample 的 well 中，接著加入 10 μ L Matrix solution 到 Blank、Standard 和 Quality control 1、2 的 Well 中。將 10 μ L 的 Standard、Blank、Quality control 1、2、Sample 加入 Well 中，再加入 Detection antibody。貼上膠膜於室溫下搖晃反應 2 小時。吸出 Well 中的溶液以 300 μ L 的 Wash buffer 清洗 3 次。加入 100 μ L 的 Enzyme solution，貼上新的膠膜於室溫下搖晃反應 30 分鐘。吸出 Well 中的溶液以 300 μ L 的 Wash buffer 清洗 6 次。加入 100 μ L 的 Substrate solution (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)，於室溫下避光反應 15 分鐘。加入 100 μ L 的 Stop solution(含 Hydrochloric acid solution)，慢慢地輕拍 plate 確定混合均勻(或放在 Microplate vortex 上混勻)。測量 450 nm 之吸光值(波長校正設定 590 nm)，以標準曲線來換算 Sample 內 Insulin 濃度。

3. 計算

將 Standard 的吸光值與濃度利用 ELISA reader(μ Quant)中 4 - Parameter 之標準曲線方程式，求得 Standard curve，藉以換算出檢體之胰島素濃度。

十. 血清 Leptin 含量測定

1. 原理

此分析套組(R&D Systems Mouse Leptin)是利用定量的三明治酵素免疫分析技術 (Sandwich enzyme immunoassay)。將 Goat anti-mouse leptin 事先固定在 Microplate 上,加入 Block buffer 降低非專一性抗體結合。當 Standard、Blank 和 Sample 注入 well 中,Goat anti-mouse leptin 會和 Immobilized antibody 結合,之後洗去沒有結合的受質,再加入 biotinylated goat anti-mouse leptin 到 well 中,接著洗去一除掉未結合的 biotinylated goat anti-mouse leptin,加入 Streptavidin conjugated to horseradish-peroxidase (Streptavidin-HRP)洗去未結合的 Streptavidin-HRP,再加入受質溶液 (Substrate solution) 到 well 中。酵素反應會生成藍色產物,當終止溶液(Stop Solution)加入之後會轉變成黃色,顏色強度代表樣品中 Leptin 結合量的比例。

2. 方法

PBS 和 Capture antibody 混勻即得 goat anti-mouse leptin。Tween 20 加入 PBS 製備成 Wash buffer。Color reagent A (含 Hydrogen peroxide)和 B (Tetramethylbenzidine)以等體積的比例混合均勻即得 Substrate solution。

加入 100 μ L 的 Standard 或 Sample 到每一個 well 中 (已 coating 好 Goat anti-mouse leptin),貼上膠膜於室溫下搖晃反應 2 小時。吸出 well 中的溶液以 300 μ L 的 Wash buffer 清洗五次。加入 100 μ L 的 biotinylated goat anti-mouse leptin 到每一個 well 中,貼上膠膜於室溫下搖晃反應 2 小時。吸出 well 中的溶

液以 300 μ L 的 Wash buffer 清洗五次。加入 100 μ L 的 Streptavidin-HRP 到每一個 well 中，貼上膠膜於室溫下避光反應 20 分鐘。吸出 well 中的溶液以 300 μ L 的 Wash buffer 清洗五次。加入 100 μ L 的 Substrate solution 到每一個 well 中，貼上膠膜於室溫下避光反應 20 分鐘。加入 50 μ L 的 Stop solution (含 sulfuric acid) 到每一個 well 中，慢慢地輕拍 plate 確定混合均勻(或放在 Microplate vortex 上混勻)。測量 450 nm 之吸光值(波長校正設定 540 nm 或 570 nm)，以標準曲線來換算 Sample 內 Leptin 濃度。

3. 計算

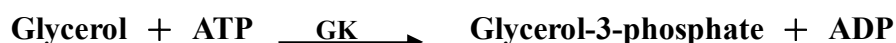
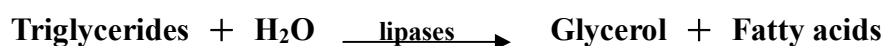
將 Standard 的吸光值與濃度利用 ELISA reader (μ Quant) 之標準曲線方程式，求得 Standard curve，藉以換算出檢體之濃度。

十一. 血清脂質分析

(一) 血清三酸甘油酯 (Triacylglycerol, TG) 含量測定

1. 原理

應用 Fully-enzymatic GPO-PAP 法，利用四種酵素 Lipases、Glycerokinase (GK)、Glycerol-3-phosphate oxide (GPO)、Peroxide (POD) 與 TG 作用，最後產生淡紅色色素，藉由測定此色素 Quinoneimine (淡紅色) 在 500 nm 的吸光值，來計算三酸甘油酯之濃度。



2. 方法

採用市售試劑組 (RANDOX, Cat. No. TR213, Lot 033857)。將 Buffer 1 (含 Pipes buffer, pH 7.6、4-Chloro-phenol、Magnesium ions) 與 Enzyme Reagent 2 (含 4-Aminophenazone、ATP、Lipases、Glycerol-kinase、Glycerol-3-phosphate oxidase、Peroxidase) 混合，配成反應試劑。在 96 孔盤分別加好 4 μL Standard (標準濃度為 200 mg / dL) 或 4 μL Sample 後，以八爪 Pipette 加入 200 μL Reagent。混合均勻後，於室溫下(20-25 $^{\circ}\text{C}$)反應 10 分鐘。另外以 200 μL Reagent 作空白試驗，測定 500 nm 之吸光值。再根據下列式計算血清中三酸甘油酯濃度。

3. 計算

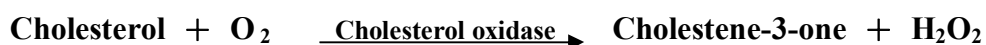
$$\text{血清中三酸甘油酯濃度 (mg / dL)} = \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{standard}}} \times 200$$

(二) 血清膽固醇 (Cholesterol) 含量測定

1. 原理

應用 Enzymatic CHOD-PAP 法，利用三種酵素 Cholesterol esterase、

Cholesterol oxidase、Preoxidase 與 Cholesterol ester、Cholesterol 作用，最後產生淡紅色色素，藉由測定此色素 Quinoneimine (淡紅色) 在 500 nm 的吸光值，來計算膽固醇之濃度。



2. 方法

採用市售試劑組 (RANDOX, Cat. No. CH201, Lot 037503)。在 96 孔盤分別加好 4 μL 二次水 (Blank)、4 μL Standard (標準濃度為 200 mg / dL) 及 4 μL Sample 後，以八爪 Pipette 加入 200 μL Reagent，混合均勻後，於室溫下(20-25 $^{\circ}\text{C}$) 反應 10 分鐘後測定 500 nm 之吸光值。再根據下列式計算血清中膽固醇濃度 (mg/dL)。血清膽固醇正常濃度範圍為 <5.17 mmol / L (200 mg / dL)。

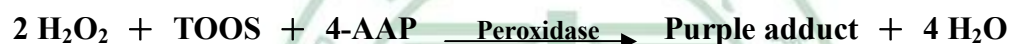
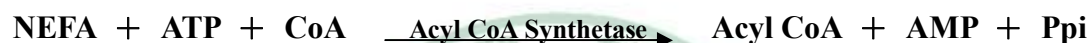
3. 計算

$$\text{血清中膽固醇濃度 (mg / dL)} = \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{standard}}} \times 200$$

(三) 血清游離脂肪酸 (Non-Esterified Fatty Acid, NEFA) 含量測定

1. 原理

利用三種酵素 Acyl CoA synthetase、Acyl CoA oxidase 與 Peroxidase 的作用，最後產生青紫色色素，藉由測定此色素 Purple adduct (青紫色) 在 550 nm 的吸光值，來計算 NEFA 之濃度。



NEFA = None Esterified Fatty Acids

TOOS = N-ethyl-N-(2hydroxy-3-sulphopropyl) m-toluidine

4-AAP = 4-aminoantipyrine

2. 方法

採用市售試劑組 (RANDOX, Cat. No. FA115, Lot 048897)。將 10 mL 的 Buffer 1 和一瓶的 Enzyme/Coenzyme 2 混合得 Solution 2；Enzyme diluent 3 和一瓶的 Maleimide 3a 混合得 Solution 3；一瓶的 Enzyme reagent 4 和一瓶的 Solution 3 混合得 Solution 4，配成反應試劑。在 96 孔盤分別加好 4 μL 二次水、4 μL Standard(標準濃度為 1 mmol / L)及 4 μL Sample 後，以八爪 Pipette(Gilson 8X 200)加入 80 μL Solution 2 混合均勻後，於 37°C 下反應 10 分鐘，再加入 160 μL Solution 4，混合均勻後，於 37°C 下反應 10 分鐘，測定 550 nm 之吸光值。再根據下列式計算血清中游離脂肪酸濃度 (mmol / L)。血清游離脂肪酸在禁食

狀態下正常濃度範圍為：0.1 ~ 0.9 mmol / L。

3. 計算

$$\text{血清中游離脂肪酸濃度 (mmol / L)} = \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{standard}}} \times 1$$

十二. 肝臟脂質分析

(一) 肝脂質萃取液製備

1. 藥品配製：萃取液 (Chloroform : Methanol = 2 : 1)

藥品	需要量
Chloroform (TEDIA)	2x
Methanol (TEDIA)	1x

將氯仿和甲醇以 2 : 1 的比例混合均勻。先估計使用量，再依照所需當天配製，不要一次配製太多，因為容易揮發掉。

2. 方法

採 Folch 等學者 (1957) 之方法(169)。在萃取肝脂的前一天先將研鉢放進 -80°C 冰箱預冷，取 0.4 克肝臟，剪成小塊狀放進研磨鉢中，研鉢倒入液態氮，將肝研磨至粉狀以藥勺(藥勺可先用液態氮潤洗一下，避免肝臟粉末遇見藥勺降溫而沾黏在上)輕撥入玻璃瓶中，加入少量萃取溶液 (Chloroform : Methanol = 2 : 1) 於研鉢中潤洗一下並倒入玻璃瓶中。加入萃取液約 5ml 至玻璃瓶中加蓋

萃取約 20 分鐘，過程中以 vortex 混勻，將均質液再以 90 mm 濾紙(ADVANTEC, qualitative, Lot. No. 40804032) 過濾到 15 mL 離心管中，並以萃取液定量至 10 mL，定量完畢立刻倒至玻璃（含蓋）試管中，避免塑膠離心管被有機溶劑溶出物質，儲存於-20°C 備用。

(二) 肝臟三酸甘油酯 (Triacylglycerol, TG) 含量測定

分析原理同血清中三酸甘油酯之分析。從 10mL 肝脂質萃取液中取 20μL(總萃取液 1/500) 至 10 cm 玻璃試管中，置於通風櫥使溶劑完全揮發，再加入 1000 μL Reagent，混合均勻後，於室溫下 (20-25°C) 反應 10 分鐘。另外作空白試驗及三酸甘油酯標準品 (標準濃度為 200 mg / dL) 20 μL (含有 TG 40 μg) 加 1000 μL Reagent，測定 500 nm 之吸光值。再根據下列式計算肝臟樣品中三酸甘油酯濃度。

$$\boxed{\text{TG (mg) / g liver}}$$

$$\frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{standard}}} \times 40 \mu\text{g (Standard 之 TG 含量)} \times 500 \times 10^{-3} = \frac{\text{TG (mg)}}{\text{均質肝重(g)}} = \text{每克 Liver(g)}$$

$$\boxed{\text{TG (mg) / total liver}}$$

$$\frac{\text{TG (mg)}}{\text{每克 Liver (g)}} \times \text{total liver weight} = \frac{\text{TG (mg)}}{\text{Liver}}$$

(三) 肝臟膽固醇 (Cholesterol) 含量測定

分析原理同血清中膽固醇之分析。從 10mL 肝脂質萃取液中取 150 μ L (總萃取液 3/200) 至 10 cm 玻璃試管中，再加入 10 μ L Triton X-100，均勻混合後，置於通風櫥使溶劑完全揮發，再加入 1000 μ L Reagent，混合均勻後，於室溫下 (20-25 $^{\circ}$ C) 反應 10 分鐘。另外以 10 μ L 加 1000 μ L Reagent 作空白試驗及膽固醇標準品 (標準濃度為 200 mg / dL) 10 μ L (含有 Cholesterol 40 μ g) 加 1000 μ L Reagent 作為對照，測定 500 nm 之吸光值。再根據下列式計算肝臟樣品中膽固醇濃度。

$$\frac{\text{Cholesterol (mg) / g liver}}{\text{均質肝重(g)}} = \frac{\frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{standard}}} \times 40 \mu\text{g(Standard 之 Cholesterol 含量)} \times 66.67 \times 10^{-3}}{\text{Cholesterol(mg)}} \times \frac{\text{Cholesterol(mg)}}{\text{每克 Liver(g)}}$$

$$\frac{\text{Cholesterol (mg) / total liver}}{\text{每克 Liver (g)}} \times \text{total liver weight} = \frac{\text{Cholesterol (mg)}}{\text{Liver}}$$

脂肪組織脂質萃取及三酸甘油酯測定(同肝組織)

十三. 脂肪組織 TNF- α 含量測定

1. 原理

此分析套組(eBioscience Systems Mouse TNF- α)是利用定量的三明治酵素免疫分析技術 (Sandwich enzyme immunoassay)。將 Goat anti-mouse TNF- α 事先固定在 Microplate 上，加入 Block buffer 降低非專一性抗體結合。當 Standard、Blank 和 Sample 注入 well 中，Goat anti-mouse TNF- α 會和 Immobilized antibody 結合，之後洗去沒有結合的受質，再加入 biotinylated goat anti-mouse TNF- α 到 well 中，接著洗去一除掉位結合的 biotinylated goat anti-mouse TNF- α ，加入 Streptavidin conjugated to horseradish-peroxidase (Streptavidin-HRP)洗去未結合的 Streptavidin-HRP，再加入受質溶液 (Substrate solution) 到 well 中。酵素反應會生成藍色產物，當終止溶液(Stop Solution)加入之後會轉變成黃色，顏色強度代表樣品中 TNF- α 結合量的比例。

2. 方法

PBS 和 Capture antibody 混勻即得 goat anti-mouse TNF- α 。Tween 20 加入 PBS 製備成 Wash buffer。Color reagent A (含 Hydrogen peroxide)和 B (Tetramethylbenzidine)以等體積的比例混合均勻得 Substrate solution。

加入 100 μ L 的 Standard 或 Sample(脂肪組織 RIPA 均質液)到每一個 well 中 (已 coating 好 Goat anti-mouse TNF- α)，貼上膠膜於室溫下搖晃反應 2 小時。吸出 well 中的溶液以 300 μ L 的 Wash buffer 清洗五次。加入 100 μ L 的 biotinylated goat anti-mouse TNF- α 到每一個 well 中，貼上膠膜於室溫下搖晃反

應 2 小時。吸出 well 中的溶液以 300 μ L 的 Wash buffer 清洗五次。加入 100 μ L 的 Streptavidin-HRP 到每一個 well 中，貼上膠膜於室溫下避光反應 20 分鐘。吸出 well 中的溶液以 300 μ L 的 Wash buffer 清洗五次。加入 100 μ L 的 Substrate solution 到每一個 well 中，貼上膠膜於室溫下避光反應 20 分鐘。加入 50 μ L 的 Stop solution (含 sulfuric acid) 到每一個 well 中，慢慢地輕拍 plate 確定混合均勻 (或放在 Microplate vortex 上混勻)。測量 450 nm 之吸光值 (波長校正設定 540 nm 或 570 nm)，以標準曲線來換算 Sample 內 TNF- α 濃度。

十四. 脂肪組織切片

委託中興大學動物疾病診斷中心製備脂肪組織切片。以石臘包埋，切片厚度 2 μ M。

(一) 脂肪細胞計數

每組隨機選取 3 隻小鼠 epididymal 檢體，每個檢體製作 5 片 HE staining 切片，用顯微鏡 (Olympus) 放大 100 倍觀察切片，以照相機 (Diagnostic) 將所得影像拍攝下來，再利用影像處理系統 (Spot advanced) 在每個切片上圈選 10 個不同區塊，計數細胞數目。

脂肪細胞平均直徑計算

$$\text{平均細胞面積} (\mu\text{m}^2) = \text{選取面積} (\mu\text{m}^2) / \text{細胞數目}$$

(二) 脂肪組織 TUNEL assay

1. 脫蠟

Slides 與兩缸 Xylene (二甲苯) 同時置入烘箱(70°C)復性 30 分鐘，接著將 Slides 浸泡在第一缸、第二缸 Xylene 中脫蠟，各十分鐘。以連續酒精梯度(100%、100%、95%及 70%)去除 Xylene，各 5 分鐘，使其恢復成水溶性狀態。將 Slides 放入塑膠盒，內放 200 ml 0.1M Citrate buffer pH6.0，之後放入微波爐中 1 分鐘，之後加入 80 ml 二次水快速冷卻，之後再放入 PBS 中。

2. Blocking

使用 Tris-HCl 0.1M pH7.5 (containing 3% BSA 和 20% normal bovine serum) 30 分鐘，之後用 PBS wash 兩次並擦乾。

3. Immunoblotting

加入 50 μ l 的 TUNEL reaction mixture 放在 incubater 中 60 分鐘，此步驟需避光，之後用 PBS wash 3 次，每次 5 分鐘，之後即可拍照不必封片。

十五. 蛋白質定量

1. 原理

蛋白質定量分析是根據 Bradford 原理所設計，其蛋白質染劑可與蛋白質結合形成藍色複合物，並可以於 630 nm 測得此複合物之吸光值。藉由比對

BSA 標準品的定量標準曲線，即可換算出待測樣品的蛋白質濃度。

2. 方法

將 BSA (bovine serum albumin, Sigma) 配製成濃度為 1mg/ml 的 stock，使用時將濃度稀釋為 0.5、0.25、0.125、0.0625 mg/ml 之標準溶液，把標準品及 10 μ l 樣品加入 250 μ l Bio-Red protein assay，震盪均勻靜置 5 分鐘。以 ELSA reader 測 630 nm 吸光值，根據標準曲線計算樣品之蛋白質濃度。

十六.西方墨點法 (Western blot)

(一) 製備組織均質液

將脂肪組織 0.1g (epididymal) 加入 500 μ l RIPA buffer 後在冰上以迷你均質機均質，肝臟 0.2g 加入 1000 μ l RIPA bufferr 均質，接著以 4 $^{\circ}$ C、10000 g、15 min. 的條件離心，取上清液至新 eppendorf 並放置於冰上，若非當天測試則需放入- 80 $^{\circ}$ C。

*RIPA buffer 內含 50 mM Tris HCl、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 % NP-40、0.25 % Na deoxycholate、0.1 % SDS 及 protease inhibitor、phosphatase inhibitor (Sigma)。

(二) 藥品配置

1.5 M Tris pH8.8

藥品	需要量
Tris	181.7g

先溶於 800ml 二次水中，調整 pH 值至 8.8 再定量至 1000ml，儲存於室溫

0.5 M Tris pH6.8

藥品	需要量
Tris-HCl	78.8g

先溶於 800ml 二次水中，調整 pH 值至 6.8 再定量至 1000ml，儲存於室溫

20% SDS 溶液

藥品	需要量
Sodium dodecyl sulfate	40g

取 40g SDS 粉末溶於 200ml 二次水，儲存於室溫

鑄膠配方

	分離膠體		焦集膠體
	7.5%	10%	4%
30% Acrylamide	2.5 ml	3.33 ml	0.67 ml
1.5M Tris-HCl pH8.8	2.5 ml	2.5 ml	1.25 ml (0.5M pH6.8)
DI water	5 ml	4.17 ml	3.1 ml
20% SDS	50 μ l	50 μ l	50 μ l
10% APS	50 μ l	50 μ l	25 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l	7.5 μ l
Total	10 ml	10 ml	5 ml

APS 溶液在鑄膠前再加入

6 X Laemmli buffer (store at -20°C)

Stock	Add	Final concentration
1.5 M Tris HCl pH 6.8	2 mL	300 mM
glycerol	6 mL	60 %
SDS powder	0.6 g	6 %
DTT powder (Mw 154.25)	0.925 g	600 mM
10 % bromophenol blue	30 μ L	

以 DI water 定量至 10 ml

Sample 蛋白質的製備

藥品	需要量
Sample solution	x μ L
6 X Laemmli buffer (儲存於-20°C)	?
二次水	?

(脂肪組織和肝臟 AMPK、PKA、ACC、STAT3 免疫染色使用蛋白質量為 50 μ g)

10 X Running buffer

藥品	需要量
Tris	30.3 g
Glycine	144 g
10% SDS	100 mL

Tris 與 Glycine 先溶於少量水，加入 SDS 後再定量至 1000ml，儲存於 4°C。

使用前再稀釋至 1X(每次用量約 400 ml)，不重複使用

轉印

Transfer buffer (Freshly prepared)

藥品	需要量
Tris base	3.03 g
glycine	14.4 g
ethanol	100 mL

每次轉印時新鮮配製，酒精最後再加，最後定量至 1L，儲存於 4°C

PVDF 膜製備

藥品	需要量
PVDF 膜	一片
MeOH	適量

PVDF 膜截去右上角作記號，之後須完全浸泡於 MeOH 中使其濕潤，再換入

Transfer buffer 準備轉印

(三) 蛋白質電泳

與 Laemmli buffer 混合好樣品，於 100 °C 水浴五分鐘，Spin-down 後注入膠槽，Molecular marker (All Blue, BIO RAD) 注入 10 μ L，倒入 1 \times running buffer 以 120 伏特電壓進行電泳。

(四) 蛋白質轉印

將膠體及 PVDF 膜（先以甲醇潤濕增加其親水性）浸泡在轉印緩衝液 (Transfer buffer) 五分鐘，將膠片與 PVDF 膜組合好後，於冰浴下以 400 毫安培電流進行轉印 2 個小時。PVDF 膜以 Ponceau S 染色確認轉印是否成功。

(五) 免疫染色

轉印完後取出 PVDF 膜以 TBST 清洗四次，每次五分鐘。接著與 10 % 脫脂奶粉溶液（安佳，溶於 TBST）於室溫下反應一小時，進行 Blocking 作用。反應後以 TBST 清洗四次，每次五分鐘，加入稀釋 1000 倍之一級抗體，在 4 °C 反應整夜後，以 TBST 清洗四次，每次五分鐘。再加入稀釋 5000 倍之二級抗體，室溫反應一小時後以 TBST 清洗五次，每次五分鐘。再加入 1 ml ECL 呈色劑反應後即可壓片顯影，利用 LAS-4000 mini FUJIFILM 冷光影像系統分析。

表 3-4 免疫染色使用抗體

蛋白質	一級抗體	二級抗體
p-AMPK(Thr172) (62kDa)	Cell Signaling #2532 1 : 1000	Rabbit 1 : 5000
AMPK (62kDa)	Cell Signaling #2531 1 : 1000	Rabbit 1 : 5000
p-ACC (Ser 79) (280kDa)	Cell Signaling #3661 1 : 1000	Rabbit 1 : 5000
ACC (280kDa)	Cell Signaling #3662 1 : 1000	Rabbit 1 : 5000
p-PKA C (Thr197) (42kDa)	Cell Signaling #4781 1 : 1000	Rabbit 1 : 5000
PKA (42kDa)	Cell Signaling #4782 1 : 1000	Rabbit 1 : 5000
p-STAT3 (Tyr705) (92kDa)	Millipore #05-485 1 : 100	Mouse 1 : 5000
STAT3 (92kDa)	Millipore #06-596 1 : 1000	Rabbit 1 : 5000

十七. 抽取 RNA 及 cDNA 的製備

(一) RNA 的抽取

1. 藥品配置

(1) BCP (1-bromo-3-chloropropane, MRC)

(2) SUPERase-In(RNase inhibitor, Ambion, 20 u/uL, 2500 u, cat 2694)放置於
-20°C 保存

(3) RNase-Free Dnase I Set (Qiagen 79254)

(4) DNase I 以 550ul RNase-free water 溶解，即可使用，之後儲存於-20°C

reagent	需要量
DNase I	10 μ l
RDD buffer	70 μ l

2. 實驗步驟—RNAmimi kit (Qiagen)

(1) 取 0.1g 的脂肪組織加入 0.5ml TRIzol 以均質機均質，而肝臟則是取 0.1g 加

- 入 1ml TRIzol 以均質機均質，並收集在 1.5ml eppendorf
- (2) 室溫下混合 5-10 分鐘，如沒有要馬上抽 RNA，均質液可放在 -70°C 保存數週
 - (3) sample 離心 10 分鐘(10,000rpm, 4°C)，離心後取下層(粉紅色)至一個新的 eppendorf，每個 eppendorf 加 TRIzol 至 1ml，再加入 100ul BCP(1-bromo-3-chloropropane, MCR:BP-151)至每一個 sample，以 vortex 混勻，室溫下放 5 分鐘，再離心 15 分鐘(12,000rpm, 4°C)
 - (4) 取上層(無色)至一新的 eppendorf 並加入 600ul 的 70%酒精(以 DEPC-H₂O 配置)，再以 vortex 混勻
 - (5) 取 700ul loading 至 RNeasy spin columns(放在 2ml collection tube 上)後，離心(10000rpm, 15 秒)，流出液丟棄，再 loading 剩下的 sample，離心(10000rpm, 15 秒)，流出液丟棄
 - (6) 加入 350ul 的 RW1，離心(10000rpm, 15 秒)，流出液丟棄
 - (7) 另以新的 eppendorf 配置 DNase 所需要的量：每一 sample 需 10ul DNase I stock solution(Qiagen)和 70ul Buffer RDD (Qiagen)依 sample 量預先混好，再加在 DNase 時盡量都加在白色的 silica membrane 上每 sample 加 80 ul，室溫下放 15 分鐘
 - (8) 加入 350ul 的 RW1，離心(10000rpm, 15 秒)，流出液丟棄
 - (9) 加入 500ul 的 RPE(需確認是否有加 100%酒精)後，離心(10000rpm, 15 秒)，流出液丟棄
 - (10) 加入 500ul 的 RPE 後，離心(10000rpm, 2 分鐘)，流出液丟棄
 - (11) 將 RNeasy spin columns 放到新的 2ml collection tube 裡，離心(14000rpm, 1 分鐘)，去除殘餘的酒精
 - (12) 配置所需的 SUPERase-In(RNase inhibitor, Ambion, 20 u/uL, 2500 u, cat 2694)，每一 sample 需 1ul SUPERase-In 和 4ul RNase-free water 依 sample 量預先混好，再加在新的 1.5ml collection tube，每管加入 5ul

- (13) 將 RNeasy spin columns 放到加了 SUPERase-In 的 1.5ml collection tube 裡，加 40ul RNase-free water，離心 (10000rpm，1 分鐘) 收集流出液，內含 RNA
- (14) 以 nanoDrop 測 260/280 ratio 和濃度，RNA 需放置 -70°C 長期保存。

(二) RNA quality

1. 鑄膠

藥品	需要量
Agarose (GibcoBRL)	1g
Etidium Bromide (Gene pure)	26 μ l

將上述藥品皆加入 1x TAE (UniRegion Bio-Tech) buffer 配成 1% 膠，微波 2-3 min 至完全溶解，將鑄膠液倒入 RNA gel 鑄膠槽並插入齒模，避免產生氣泡，待其凝固後即可用於 RNA 電泳。

2. 樣品

Sample 取 2 μ g RNA 在依比例加入 10X dye，混勻後即可注入洋菜膠體中，以 100 伏特電壓進行電泳，當色帶泳動至洋菜膠體之 3/4 時停止，取出膠體置於 UV box (LONGLIFE FILTER, SPECTROLINE) 上觀察 rRNA 28S / 18S 的比例，若約等於 2:1 表示 RNA 品質良好，無降解現象便可進行 qRT-PCR。

(三) RNA 轉成 cDNA(Reverse transcription reaction)**1. 原理**

逆轉錄反應(Reverse transcription ; RT reaction)是利用逆轉錄酶(Reverse transcriptase) , 將單股 RNA (Single-stranded RNA) 逆轉錄為互補 DNA (Complementary DNA ; cDNA) 。逆轉錄作用即為第一股 cDNA 之合成(First strand cDNA synthesis) 。此 cDNA 可用來進行後續的聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction ; PCR) 。

2. 反應試劑製備 (均使用滅菌之 Eppendorf)**(1) 50 ng / μ L Random hexamer**

Reagent	需要量	final conc.
Random hexamer (Promega C118A) (500 μ g / mL , 20 μ g , 共 40 μ L)	40 μ l	50 ng / μ L
DEPC-H ₂ O	360 μ l	

以 DEPC-H₂O 將 500 μ g / mL stock 稀釋為 50 ng / μ L 的 Random hexamer。分裝於 Eppendorf 儲存於-20 $^{\circ}$ C 。避免重複冷凍解凍。

★Random hexamer 是非專一性 primer , 含有 6 個 nucleotide 。又稱為 random primer 。

(2) M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase)

(200 U / μ L) (Promega M1701)

儲存於-20 $^{\circ}$ C , 於使用前才取出。避免重複冷凍解凍。

(3) 5x M-MLV RT buffer (Promega M531A) (1 mL)

儲存於-20°C，使用前 vortex 均勻。避免重複冷凍解凍。

(4) 10 mM dNTP mixture

Reagent	final conc.
40 mM dNTP mixture stock	10 mM
DEPC-H ₂ O	

以 DEPC-H₂O 將 40 mM Stock 稀釋為 10 mM 的 dNTP mixture。分裝於 Eppendorf 儲存於-20°C。

3. 反應試劑條件&操作步驟

(1)反應試劑

Reagent	需要量
Total RNA	500ng
Random hexamer (50 ng / μ L)	1 μ L

以 DEPC-H₂O 補體積至 14 μ L，於 70°C 加熱 10min(為避免 primer 的二級結構產生，以 70°C 加熱 10min 打開二級結構)。後迅速冰浴 3 min(防止二級結構再黏合回去)。

(2)再依序加入以下試劑

Reagent	需要量	Final conc.
5x M-MLV RT buffer	4 μ L	1x
10 mM dNTP mixture	1 μ L	0.5 mM
M-MLV RT(200 U / μ L)	1 μ L	10 U / μ L
總體積	20 μ L	

於室溫下反應 10 min，42°C 下反應 50 min，95°C 下反應 5 min 將 RT 去活化以終止反應，最後置於 4°C 下 10 min，此即完成了第一股 cDNA 之合成，分裝於

滅菌 Eppendorf 中凍於-80°C 備用 (此 cDNA 濃度為 50ng / μ L)。

十八. Real time polymerase chain reaction (同步定量 PCR ; qRT-PCR)

(一) SYBR[®] Green 系統

1. 原理

SYBR[®] Green PCR Master Mix 是 PCR 試劑套組，內含有一種能與雙股 DNA minor groove 結合而發光的螢光染料。其與雙股 DNA 結合後，會釋出螢光，其螢光信號強度與雙股 DNA 的數量成正相關，可據此定量 PCR 反應產物。

2. 反應試劑製備

(1) 1x SYBR[®] Green PCR Master Mix

Reagent	需要量	Final conc.
2x SYBR [®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems 4309159)	12.5 μ L	1x

第一次開封後即進行分裝為透明液體，並用錫箔紙包覆避光，儲存於 4°C。

(2) Primer (10 μ M)

Reagent	需要量	Final conc.
Primer stock (100 μ M)	10 μ L	10 μ M
滅菌二次水	90 μ L	
總體積	100 μ L	

將 Primer stock 與滅菌二次水混合均勻分裝儲存於-20°C。

(3) 製備 2 μ M Primer mixture

Reagent	需要量	Final conc.
10 μ M 之 (F) Primer	5 μ L	1 μ M
10 μ M 之 (R) Primer	5 μ L	1 μ M
滅菌二次水	40 μ L	
總體積	50 μ L	

(4) 製備 5 ng / μ L cDNA。

Reagent	需要量	Final conc.
cDNA Stock (50 ng / μ L)	1 μ L	5 ng / μ L
滅菌二次水	9 μ L	
總體積	10 μ L	

3. 操作步驟 (全程用錫箔紙包覆)

Reagent	需要量	Final conc.
2 μ M Primer mixture	2.5 μ L	200 nM (F: 100 nM; R: 100 nM)
2x SYBR [®] Green PCR Master Mix	12.5 μ L	
cDNA	10 μ L	50ng
總體積	25 μ L	

依照順序混合試劑並由底部觀看確定已加入所有試劑，以 Pipettman 上下吸放數次混勻，最後於盤上貼好 Optical cover。先將 Well 內液體以 800 rpm 離心一分鐘 (Eppendorf. Centrifuge 5810)。使用 ABI PRISM[™] 7900HT sequence detection system，PCR 條件 95 $^{\circ}$ C 15 sec, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 40 cycles，PCR 結束以 dissociation curve 確認反應專一性。

*大量使用時，2 μ M Primer mixture 可與 2x SYBR[®] Green PCR Master Mix 以 2.5 : 12.5 體積比預先混合好，每次使用 15 μ L。

4. 結果計算

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{Unknown}) - \Delta C_T (\text{Calibration})$$

產物量以 $2^{-\Delta C_T}$ 表示。

表 3-5 SYBR[®] Green 系統使用 Primer 序列

Gene	Accession number	Primers
Mest	NM_008590	F:GCCTGACCCTGAGGTTCCA R:TGCTGGCCTGCTCAAATATG
Adiponectin	AY033885	F:ATCTGGAGGTGGGAGACCA R:ATGGTAGAGAAGGAAGCCTG
FAS		F:ATCCTGGAACGAGAACACGATCT R:AGAGACGTGTCACTCCTGGACTT
ACO	NM_015729	F:CCAAGATTCAAGACAGAGCC R:TCCCCTCAAGAAAATCCCC
ACC1	J03808	F:ACCGGCTGAGTGATGGTGG R:GGGAGCGCATTACAGACGG

(二) TaqMan[®]系統

1. 原理

使用 TaqMan[®] one-step RT-PCR Master Mix 試劑套組，直接使用 RNA 不需預先轉 cDNA。TaqMan 系統比起 SYBR[®] Green 系統多了一個 probe，專一性提高。Probe 接在所需測定的 target gene 上，因為 quencher 的存在所以 Probe 不發光，當 PCR 產物生成 probe 被切斷就會發出螢光，機器藉由偵測螢光即可判斷 sample 中 target gene 的含量。由於螢光信號強度與 target gene 的含量成正相關，可據此定量。

2. 反應試劑製備：

Reagent	需要量	Final conc.
2x TaqMan [®] PCR master mix	20 μ l	1x
40x MultiScribe [™]	1 μ l	1x
20x primer & probe	1.6 μ l	0.8x
DEPC-H ₂ O	14.4 μ l	
RNA (2 ng/ μ l)*	3 μ l	6 ng/40 μ l
總體積	40 μ l	

* RNA 可預先製備成 2 ng/ μ l 濃度之 master plate (其中製作標準曲線用 pooled RNA 濃度為 20、5、1、0.2 ng/ μ l)

3. 操作步驟

先計算好 2x TaqMan[®] PCR master mix、40x MultiScribe[™]、20x primer & probe 和 DEPC-H₂O 所需的用量，預混好在滅菌的 eppendorf 中 (40x MultiScribe[™] 最後加入)，PCR plate 每槽加 37 μ L，待加入 RNA 後使用 ABI PRISM[™] 7900HT sequence detection system 進行反應，加入逆轉錄所需 48°C 30 min，PCR 條件為 95°C 15 sec, 60 °C 1 min, 40 cycles。

4. 結果計算

對照標準曲線(60-0.6 ng RNA)儀器自動換算 mRNA 量。

表 3-6 TaqMan®系統使用 Primer&Probe (inventory from ABI)

Gene	Accession number	Product ID
Leptin	NM_008493.3	Mm00434759_ml
UCP2	NM_011671.4	Mm00627599_ml
Perilipin	NM_175640.2	Mm00558672_ml
LPL	NM_0085509.2	Mm00434770_ml
aP2	NM_024406.2	Mm00445880_ml
Adiponectin	NM_197985.3	Mm00456425_ml
ACC2	NM_133904.2	Mm01204691_ml
CGI-58	NM_026179.2	Mm00470731_ml
DGAT	NM_010046.2	Mm01197412_ml
β 3-adrenergic receptor	NM_013462.3	Mm00442669_ml
PGC-1 α	NM_008904.2	Mm00447181_ml
CPT-1	NM_013495.2	Mm00550438_ml

十九. 統計分析

實驗結果均以平均值 \pm 標準偏差 (Means \pm SD) 表示。數據之統計均須確定認為常態分布，否則轉型為對數值 (Log)。數據以單向變方分析 (One way ANOVA) 檢定檢定組間差異之顯著性，再以 Duncan's Multiple Range Test 來檢定各組獨立樣本其組間之差異 ($p < 0.05$)。統計分析係以 SAS 軟體 (SAS 8.2, Cary, NC, USA) 執行。

第四章 結果

第一節 實驗一

由於我們不清楚 BMSO 是否真的有降體脂的功效，在實驗過程中小鼠只有些微的體重減少，直到犧牲後才發現在 BMSO 組其體脂有減少，所以我們便針對一些與脂質代謝相關的基因先做測定，以便初步了解苦瓜籽油可能的降體脂機制。

- Leptin、Adiponectin 及 Mest 這三個主要是與體脂的堆積成正相關，所以如果表現量增加則表示其體脂堆積較高
- ACC、FAS、DGAT、aP2 及 LPL 則與脂質生合成相關，其表現越高則表示脂質合成增加，體脂堆積較多
- perilipin 及 CGI-58，perilipin 主要是保護油滴避免油滴被水解，其表現越高則表示油滴沒有被水解，體脂堆積多；而 CGI-58 則是 TG lipase 的 cofactor，如果其表現越高，則表示脂解越高，體脂堆積會減少
- UCP2 主要是可增加生熱作用，其表現越高則體脂越少

一. 苦瓜籽油對小鼠攝食之影響

表 4-1 為小鼠 18 至 23 週齡實驗期間體重增加及飼料攝取量。以誘導肥胖之後 (18 週齡) 的體重做為初始體重，可看到四組高脂飲食 (HFB、HFSC_H、HFSC_L 及 HFS) 其初始體重皆高於 LF 組 ($P < 0.0001$)，而四組高脂飲食的初始體重則無顯著差異，但在體重增加的情形 HFSC_H 和 HFSC_L 則比 HFB 和 HFS，有顯著的減少 ($P < 0.0001$)。而在攝食情況方面，由於高脂飼料熱量密度大於 LF 飼料 (5.02 vs. 3.4 Kcal/g)，四組高脂飲食的攝食量均顯著低於 LF 組 ($P < 0.0001$)，但四組間無顯著差異，雖然苦瓜

籽油組剛開始介入時攝食量降低，但不久即回復如 HFS 與 HFB。換算為熱量攝取後則高脂組大於 LF 組，四組高脂組間除 HFSC_H 熱量攝取稍低外其餘無顯著差異。

二. 體脂肪及其他組織重

絕對及相對體脂肪量分別顯示於表 4-2 與 4-3，白色脂肪(包括 retroperitoneal, epididymal 及 inguinal fat)不論絕對及相對重，高脂組均顯著高於低脂組，但在 retroperitoneal fat 發現含苦瓜籽油之 HFSC_H 及 HFSC_L 二組顯著低於 HFS 及 HFB ($P<0.0001$)，而在 epididymal 及 inguinal fat 苦瓜籽油二組則顯著低於 HFB ($P<0.0001$)，且有低於 HFS 的傾向，其中 HFSC_H 與 HFSC_L 無差異。此結果顯示奶油飲食成功誘發肥胖，大豆油取代 5 週並不能減緩體脂增加，相對的 BMSO 介入(不論 CLN 含量高或低品系)可有效降低體脂堆積。

至於棕色脂肪，雖然高脂組絕對重量大於低脂組，但以相對重量表達並無差異，而在肝臟和腎臟方面五組在相對重量表達也無差異，顯示 BMSO 餵食並無誘發肝臟及腎臟腫大情形(表 4-2 及 4-3)。

三. 其他肥胖相關指標

由於 serum leptin 常與體脂肪堆積呈現正比關係(158)，因此我們測定血清 leptin 濃度(圖 4-1)，發現與體脂肪量結果類似，HFB 及 HFS 均顯著高於 LF ($P<0.005$)，HFSC_H 及 HFSC_L 二組相較於 HFB 及 HFS 有較低的 serum leptin levels，其中含高 CLN 品系 BMSO 之 HFSC_H 組降低效果優於 HFSC_L。

我們也測定了脂肪組織 TG 含量(圖 4-2)，結果與脂肪組織重量結果大致相符，HFB 顯著高於 LF 有最高值($P<0.0001$)，其次依序為 HFS、HFSC_L、HFSC_H、HFSC_H

與 LF 間無顯著差異。

為進一步確認降體脂功能，我們以脂肪組織切片觀察脂肪細胞大小(圖 4-3)，結果顯示 HFB 及 HFS 比起 LF 確實可見脂肪細胞肥大情形，相較之下 HFSC_H 及 HFSC_L 二組脂肪細胞肥大情形不如 HFS 及 HFB 明顯，但仍大於 LF 組。這些結果確認苦瓜籽油相較於同為 PUFA rich 之大豆油，確實有降體脂功能。

四. 血糖與血清胰島素

禁食血糖值方面 HFB、HFSC_L、HFSC_H 顯著高於 LF($P<0.0001$)(圖 4-4)，飽食血糖值五組並無顯著差異(data not shown)；另測定飽食胰島素值(圖 4-5)，結果高脂組均顯著高於低脂組($P<0.0001$)，四組高脂組間無顯著差異。此結果顯示 BMSO 補充四週在此模式下並無改善胰島素抵抗功效。

五. 血脂質

血清脂質結果列於表 4-4，HFB 相較於 LF 有較高血清 TG，HFS 與 HFSC_H 血清 TG 則顯著低於 HFB($P<0.05$)，同樣含苦瓜籽油之 HFSC_L 血清 TG 降低效果不如 HFS 及 HFSC_H 明顯。至於血清 cholesterol，四組高脂組均顯著大於 LF($P<0.0001$)，大豆油或 BMSO 並無降低 serum cholesterol 功能。在血清游離脂肪酸(NEFA)方面，HFSC_H、HFSC_L 與 HFS 均呈現降低功效，但 BMSO(不論兩種品系)降低效果不如大豆油。血清 TG 與 NEFA 降低或許與膳食油脂來源由 SFA(奶油)轉換為 PUFA(soybean oil 及 BMSO)有關，降血脂功能方面 BMSO 並未證實優於 soybean oil。

六. 脂肪組織脂質代謝相關基因表現

脂肪組織 leptin、adiponectin 及 mesoderm-specific transcript (Mest) mRNA levels 通常與脂肪細胞肥大相關(158)，結果示於圖 4-6。leptin mRNA 與血清值大致符合，除了 HFS 顯著大於 HFB($P<0.0001$)，一致均觀察到含 BMSO 組(HFSC_H與 HFSC_L)比起 HFB 與 HFS 有較低 leptin mRNA levels；Mest mRNA 結果與 leptin mRNA 相似；adiponectin mRNA 則可見 HFSC_H與 HFSC_L比起 HFB 與 HFS 有較低 mRNA levels，而在 HFSC_L則顯著低於 HFB 與 HFS($P<0.0001$)。

與脂質生合成相關基因包括 ACC、FAS、DGAT、aP2 及 LPL 結果分別示於圖 4-7 及 4-8。ACC1 mRNA 由高至低分別為 LF>HFS>HFB=HFSC_H=HFSC_L，HFB、HFSC_H和 HFSC_L相較於 HFS 有較低的趨勢，而與 LF 相比則有顯著降低($P<0.05$)；ACC2 mRNA 由高至低分別為 LF>HFB=HFSC_H>HFSC_L>HFS，HFS 組顯著低於其他三組高脂飲食($P<0.005$)；FAS mRNA 則可見含 BMSO 之 HFSC_H與 HFSC_L組均顯著低於 HFB 及 HFS；DGAT mRNA levels 四組高脂組均一致顯著低於 LF 組($P<0.0001$)；aP2 mRNA 五組無顯著差異；LPL mRNA 方面 HFB、HFSC_H與 HFSC_L比起 HFS 與 LF 有較低趨勢，HFSC_L有最低值。

脂肪組織中脂質水解重要酵素為 TG lipase 及 hormone sensitive lipase (HSL)，分別負責 TG 與 DG 水解；Perilipin 為 coating 於脂肪油滴(lipid droplet)表面蛋白質，可防止 lipase 進入水解；CGI-58 則為 TG lipase 活化所需 cofactor(47)。perilipin 與 CGI-58 mRNA 結果示於圖 4-9，perilipin mRNA 五組間無顯著差異；CGI-58 mRNA HFB、HFSC_H與 HFSC_L比起 HFS 與 LF 有較低趨勢，其中 HFSC_L有最低值。

脂肪組織中 UCP2 為生熱功能相關蛋白質也參與脂肪酸氧化作用，UCP2 mRNA 結果示於圖 4-10，PUFA rich oil 包括 HFS、HFSC_H及 HFSC_L有高於 HFB

與 LF 趨勢，其中 HFSC_L 有最高 UCP2 mRNA levels。

這些結果顯示苦瓜籽油降體脂功能可能與抑制脂肪組織脂質生合成(如 FAS 及 LPL)或促進生熱(UCP-2)有關。



表 4-1 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 5 週之初始體重、最終體重、攝食量及能量攝取^{1,2}

Table 4-1 Initial body weight, final body weight, food intake and energy intake of C57BL/6J mice fed the experimental diets for 5 wk^{1,2}

	Initial body weight(18wk)	Final body weight(23wk)	Body weight gain(18-23wk)	Food intake	Energy intake
	(g)	(g)	(g / 5w)	(g / d)	(kcal / d)
LF (n = 10)	25.19±1.09 ^b	25.72±1.09 ^b	0.53±0.50 ^b	3.22±0.2 ^a	10.95±0.70 ^c
HF _B (n = 6)	34.85±6.26 ^a	35.03±5.51 ^a	0.18±1.13 ^{bc}	2.46±0.08 ^b	12.28±0.39 ^a
HF _{SC_H} (n = 9)	34.02±4.49 ^a	32.29±4.10 ^a	-1.74±0.96 ^d	2.23±0.15 ^b	11.16±0.76 ^{bc}
HF _{SC_L} (n = 8)	34.19±3.91 ^a	33.68±3.58 ^a	-0.52±0.82 ^c	2.35±0.14 ^b	11.75±0.72 ^{abc}
HFS (n = 10)	33.28±3.04 ^a	35.08±3.32 ^a	1.80±0.83 ^a	2.41±0.21 ^b	12.07±1.06 ^{ab}

¹ Calory content for LF diet (chow diet) : 3.4 kcal/g ; for high fat diet : 5.02 kcal/g

² The significance of differences among the five groups (LF, HF_B, HF_{SC_H}, HF_{SC_L} and HFS) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. The values are the means ± S.D.. Values not sharing the same superscript letters in the same column are significantly different among groups ($p < 0.05$).

表 4-2 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 5 週之絕對組織重^{1,2}Table4-2 The absolute tissue weights of C57BL/6J mice fed the experimental diets for 5 wk^{1,2}

	Liver	Retroperitoneal fat	Epididymal fat	Inguinal fat	Brown fat	Kidney
	(g)					
LF (n = 10)	0.98±0.08	0.08±0.02 ^c	0.32±0.04 ^c	0.25±0.06 ^c	0.07±0.01 ^b	0.29±0.01 ^c
HFB (n = 6)	1.15±0.25	0.51±0.21 ^a	1.64±0.71 ^a	1.11±0.51 ^a	0.10±0.02 ^a	0.41±0.04 ^a
HFSC _H (n = 9)	1.11±0.16	0.32±0.17 ^b	1.18±0.56 ^b	0.79±0.42 ^b	0.09±0.01 ^a	0.37±0.03 ^b
HFSC _L (n = 8)	1.09±0.18	0.35±0.15 ^b	1.26±0.47 ^b	0.81±0.31 ^b	0.09±0.02 ^a	0.39±0.04 ^{ab}
HFS (n = 10)	1.13±0.12	0.56±0.14 ^a	1.46±0.45 ^{ab}	0.95±0.26 ^{ab}	0.10±0.02 ^a	0.42±0.05 ^a

¹ The values are the means ± S.D..

² The significance of differences among the five groups (LF, HFB, HFSC_H, HFSC_L and HFS) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letters in the same column are significantly different among groups ($p < 0.05$).

表 4-3 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 5 週之相對組織重^{1,2}Table 4-3 The relative tissue weights of C57BL/6J mice fed the experimental diets for 5 wk^{1,2}

	Liver	Retroperitoneal fat	Epididymal fat	Inguinal fat	Brown fat	Kidney
	(% of body weight)					
LF (n = 10)	3.84±0.27 ^a	0.30±0.07 ^c	1.24±0.13 ^c	0.96±0.24 ^c	0.27±0.05	1.13±0.05
HFB (n = 6)	3.26±0.32 ^b	1.41±0.37 ^a	4.52±1.43 ^a	3.04±1.00 ^a	0.30±0.06	1.19±0.11
HFSC _H (n = 9)	3.43±0.19 ^b	0.95±0.41 ^b	3.52±1.31 ^b	2.35±1.08 ^b	0.29±0.05	1.16±0.06
HFSC _L (n = 8)	3.23±0.39 ^b	1.02±0.38 ^b	3.67±1.07 ^b	2.36±0.78 ^b	0.26±0.05	1.15±0.11
HFS (n = 10)	3.23±0.12 ^b	1.60±0.32 ^a	4.14±1.00 ^{ab}	2.73±0.75 ^{ab}	0.27±0.03	1.19±0.09

¹ The values are the means ± S.D..

² The significance of differences among the five groups (LF, HFB, HFSC_H, HFSC_L and HFS) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letters in the same column are significantly different among groups ($p < 0.05$).

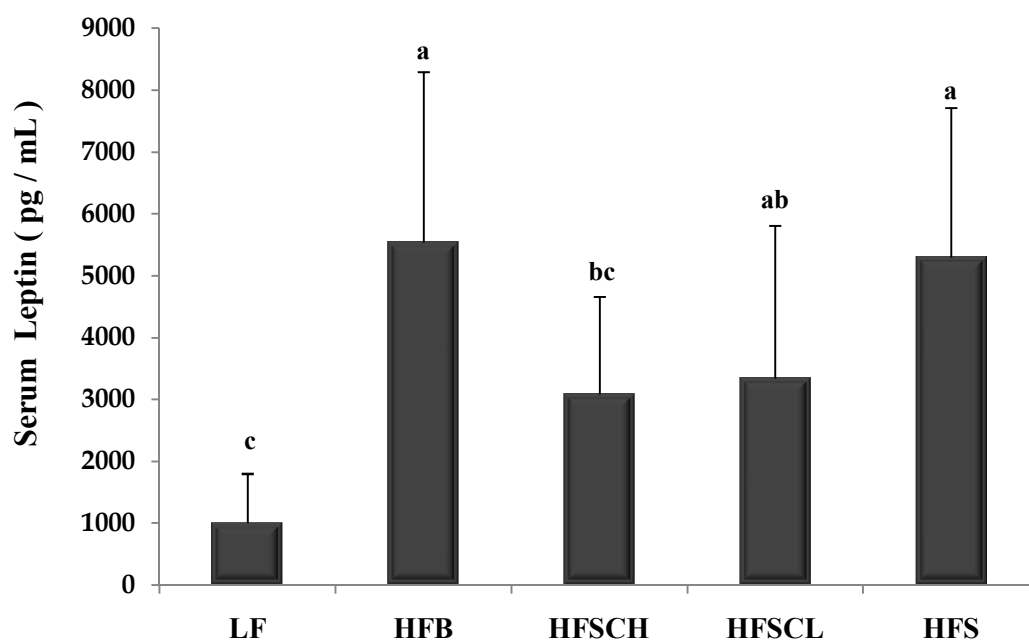


圖 4-1 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 5 週之禁食血清瘦體素(leptin)含量

Figure4-1 The fasting serum leptin levels of C57BL/6J mice fed the experimental diets for 5 wk. The values are the means \pm S.D. ($n=6\sim 10$). The significance of differences among the five groups (LF, HFB, HFSC_H, HFSC_L and HFS) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letters are significantly different among groups ($p < 0.05$).

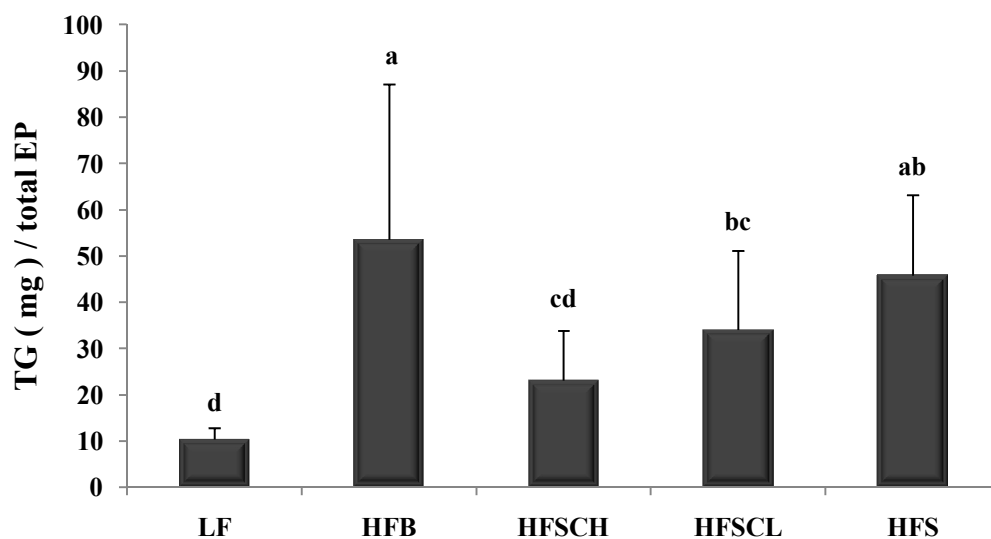


圖 4-2 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 5 週之副睪脂內脂質含量

Figure4-2 The epididymal TG levels of C57BL/6J mice fed the experimental diets for 5 wk. The values are the means \pm S.D. (n=6~10). The significance of differences among the five groups (LF, HFB, HFSC_H, HFSC_L and HFS) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letters are significantly different among groups ($p < 0.05$).

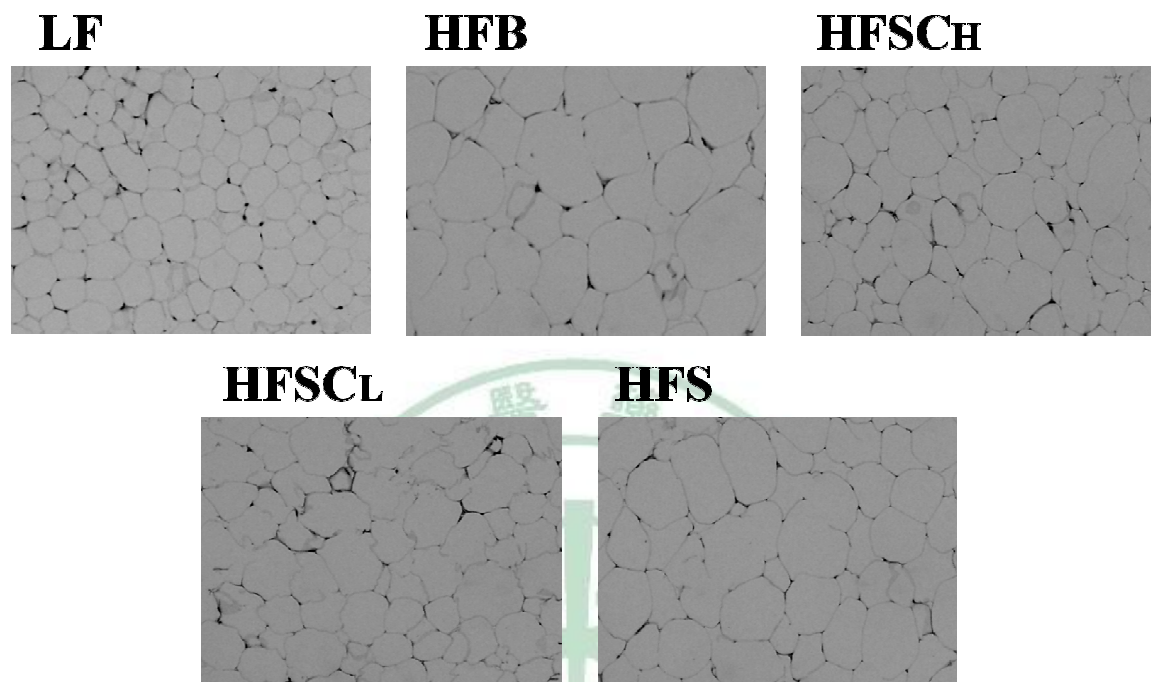


圖 4-3 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 5 週之副睪脂脂肪組織切片

Figure4-3 The histological section of epididymal fat of C57BL/6J mice fed the experimental diets for 5 wk.

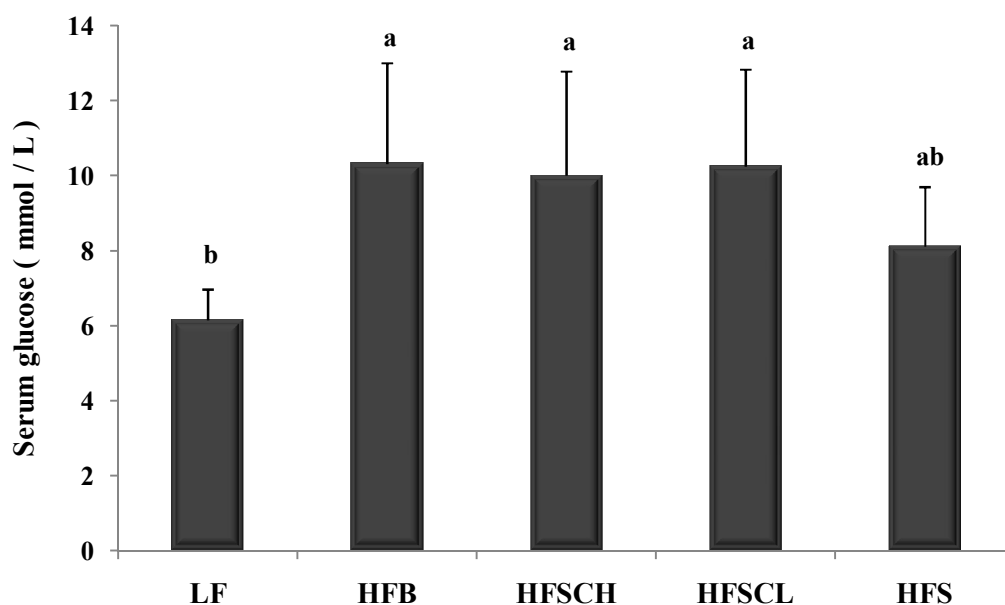


圖 4-4 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 5 週之禁食血糖

Figure 4-4 The fasting serum glucose levels of C57BL/6J mice fed with experimental diets for 5 wk. The values are the means \pm S.D. ($n=6-10$). The significance of differences among the five groups (LF, HFB, HFSC_H, HFSC_L and HFS) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letters are significantly different among groups ($p < 0.05$).

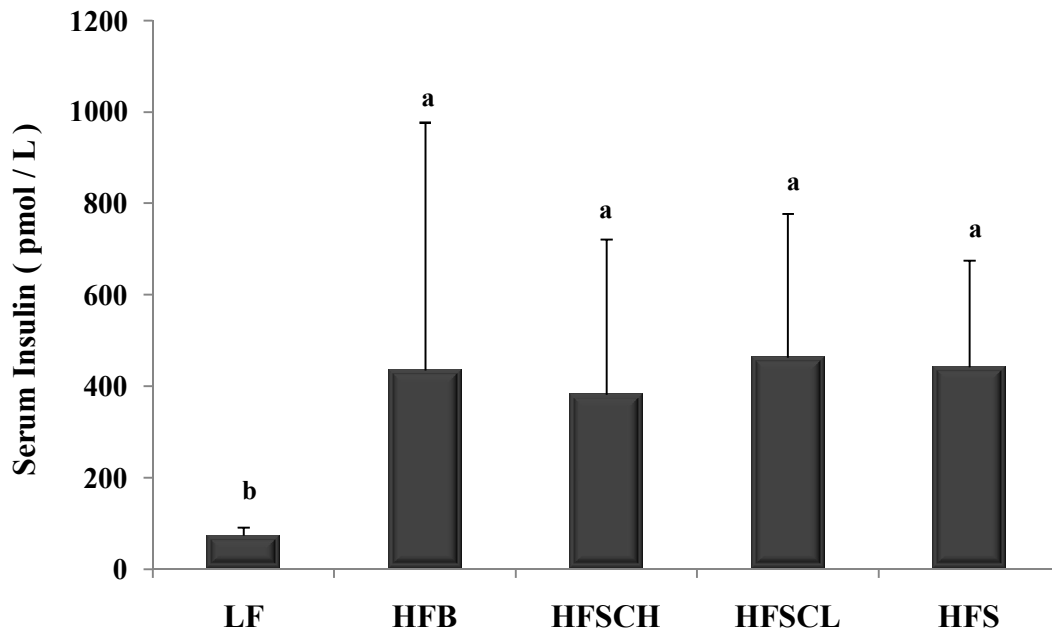


圖 4-5 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 4 週之飽食血清胰島素(insulin)含量

Figure4-5 The feeding serum insulin levels of C57BL/6J mice fed with experimental diets for 4 wk. The values are the means \pm S.D. (n=6~10). The significance of differences among the five groups (LF, HFB, HFSC_H, HFSC_L and HFS) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letters are significantly different among groups ($p < 0.05$).

表 4-4 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 5 週之禁食血液生化值^{1,2,3}Table4-4 The fasting serum levels of mice fed the experimental diets for 5 wk^{1,2,3}

Treatment group	Serum TG	Serum TC	Serum NEFA
	(mmol / L)	(mmol / L)	(mmol / L)
LF (n = 10)	0.93±0.23 ^{ab}	2.22±0.16 ^b	1.16±0.26 ^a
HFB (n = 6)	1.15±0.27 ^a	4.23±0.56 ^a	1.16±0.18 ^a
HFSC _H (n = 9)	0.81±0.14 ^b	4.05±0.42 ^a	0.93±0.17 ^b
HFSC _L (n = 8)	1.05±0.35 ^{ab}	4.11±0.46 ^a	0.93±0.21 ^b
HFS (n = 10)	0.82±0.20 ^b	3.89±0.29 ^a	0.68±0.12 ^c

¹ The values are the means ± S.D..

² The significance of differences among the five groups (LF, HFB, HFSC_H, HFSC_L and HFS) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letters in the same column are significantly different among groups ($p < 0.05$).

³ TG : Triacylglycerol ; TC : Total cholesterol ; NEFA : Non esterified fatty acid

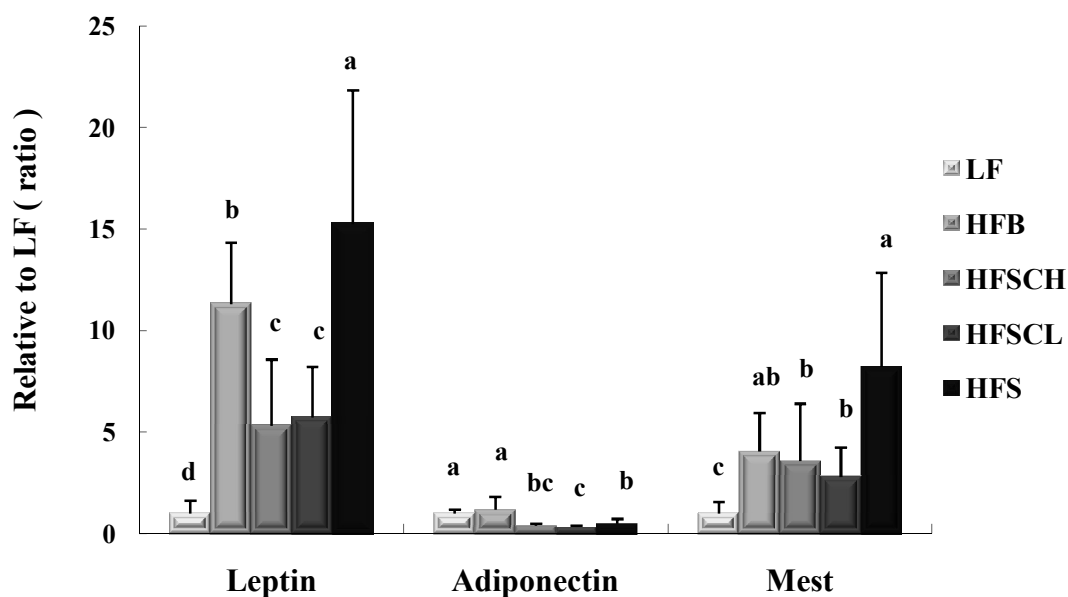


圖 4-6 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 5 週以 qRT-PCR 定量腹膜後脂肪(RE)中與體脂堆積量相關基因表現

Figure 4-6 The mRNA levels of genes associated with adiposity quantified by qRT-PCR in retroperitoneal fat of C57BL/6J mice fed the experimental diets for 5 wk. The fold induction was calculated by taking the normalized values of LF group as 1. The values are the means \pm S.D. ($n=6\sim 10$). The significance of differences among the five groups (LF, HFBS, HFSC_H, HFSC_L and HFS) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letters are significantly different among groups ($p < 0.05$).

Mest : mesoderm-specific transcript

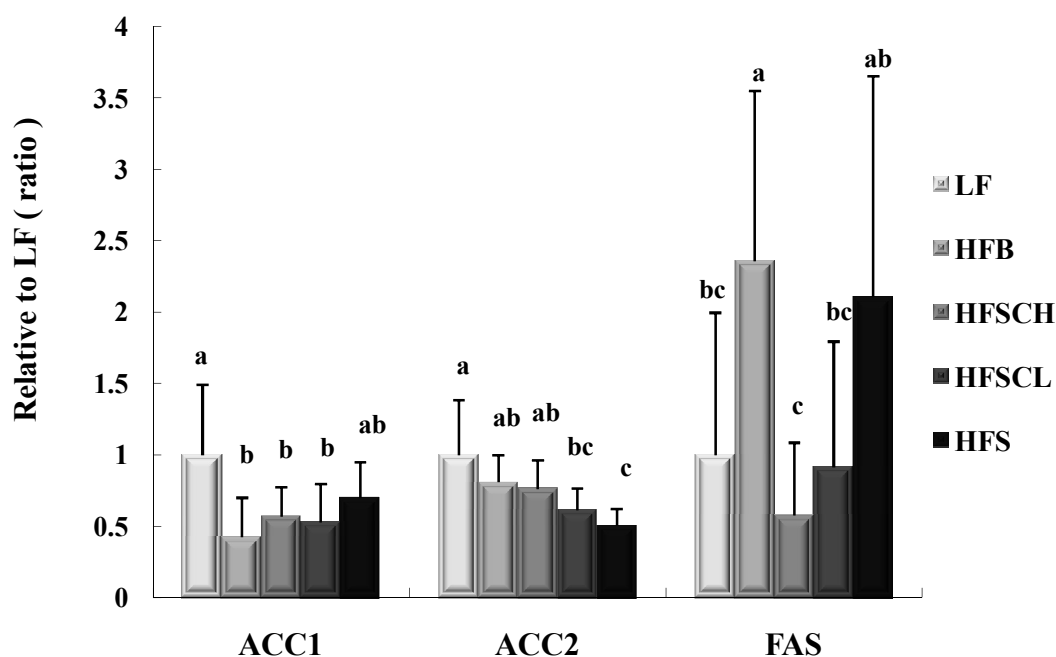


圖 4-7 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 5 週以 qRT-PCR 定量腹膜後脂肪(RE)中與脂質生成相關基因表現

Figure4-7 The mRNA levels of genes associated with lipogenesis quantified by qRT-PCR in retroperitoneal fat of C57BL/6J mice fed the experimental diets for 5 wk. The fold induction was calculated by taking the normalized values of LF group as 1. The values are the means \pm S.D. (n=6~10). The significance of differences among the five groups (LF, HFB, HFSC_H, HFSC_L and HFS) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letters are significantly different among groups ($p < 0.05$).

ACC : acetyl CoA carboxylase ; FAS : fatty acid synthase

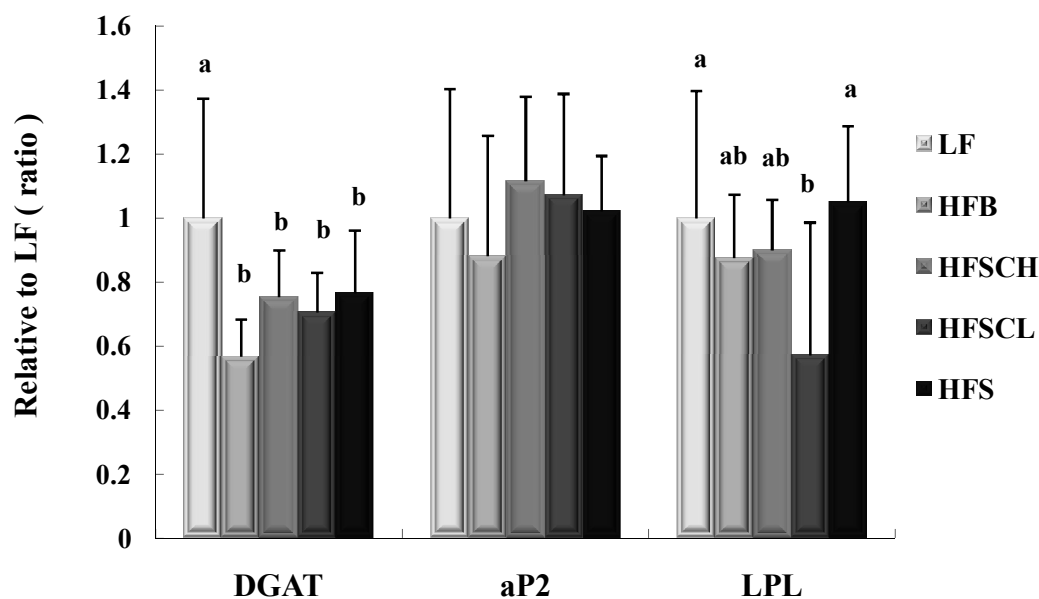


圖 4-8 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 5 週以 qRT-PCR 定量腹膜後脂肪(RE)中與脂質生成相關基因表現

Figure 4-8 The mRNA levels of genes associated with lipogenesis quantified by qRT-PCR in retroperitoneal fat of C57BL/6J mice fed the experimental diets for 5 wk. The fold induction was calculated by taking the normalized values of LF group as 1. The values are the means \pm S.D. ($n=6\sim 10$). The significance of differences among the five groups (LF, HFB, HFSC_H, HFSC_L and HFS) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letters are significantly different among groups ($p < 0.05$).

DGAT : diacylglycerol acyltransferase ; aP2 : adipose specific fatty acid binding protein ; LPL : lipoprotein lipase

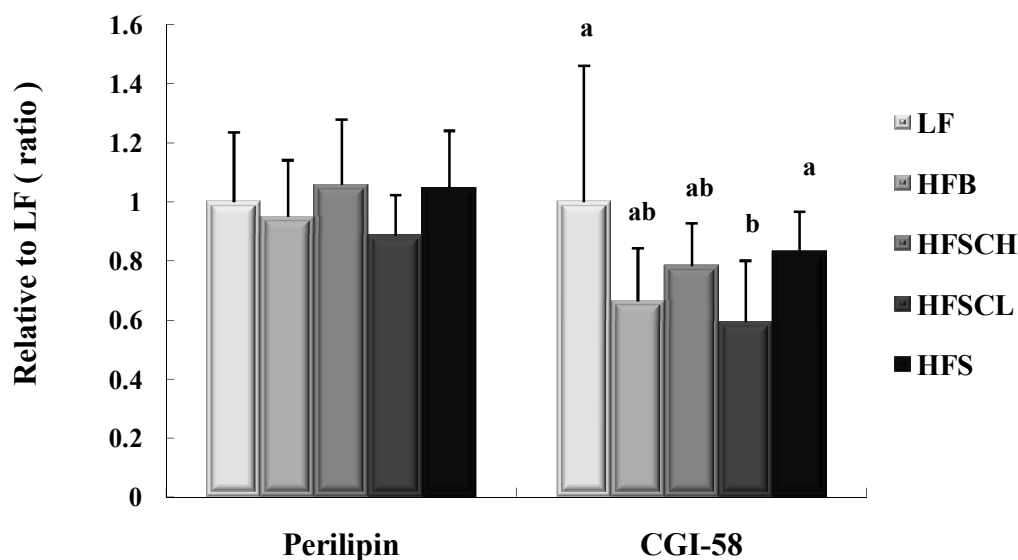


圖 4-9 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 5 週以 qRT-PCR 定量腹膜後脂肪(RE)中與脂肪油滴脂解相關基因表現

Figure 4-9 The mRNA levels of genes associated with lipolysis quantified by qRT-PCR in retroperitoneal fat of C57BL/6J mice fed the experimental diets for 5 wk. The fold induction was calculated by taking the normalized values of LF group as 1. The values are the means \pm S.D. ($n=6\sim 10$). The significance of differences among the five groups (LF, HFB, HFSC_H, HFSC_L and HFS) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letters are significantly different among groups ($p < 0.05$).

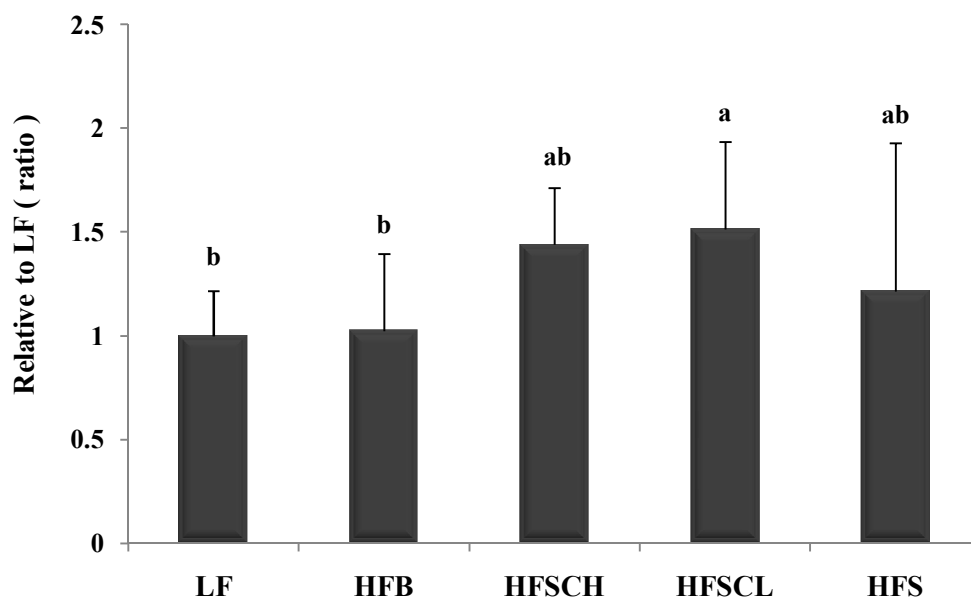
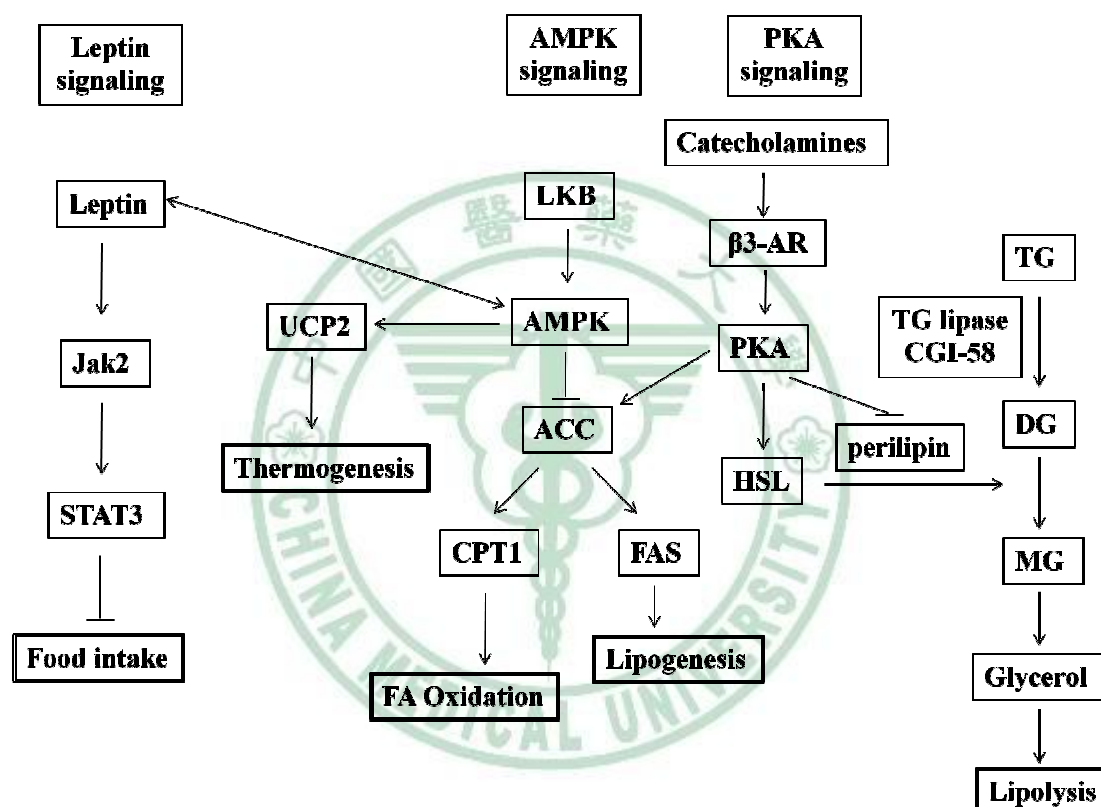


圖 4-10 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 5 週以 Real-Time PCR 定量腹膜後脂肪 (RE) Uncoupling protein 2 (UCP2) 的表現

Figure 4-10 The mRNA levels of UCP2 quantified by qRT-PCR in retroperitoneal fat of C57BL/6J mice fed the experimental diets for 5 wk. The fold induction was calculated by taking the normalized values of LF group as 1. The values are the means \pm S.D. ($n=6\sim 10$). The significance of differences among the five groups (LF, HFB, HFSC_H, HFSC_L and HFS) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letters are significantly different among groups ($p < 0.05$).

第二節 實驗二

由上述實驗一的結果可知 BMSO 確實有降體脂的功效，且有可能是傾向於活化 AMPK 路徑及下列可能延緩體脂堆積路徑。



一. 不同劑量 BMSO 對小鼠攝食之影響

表 4-5 為小鼠 9 至 20 週實驗期間體重增加及飼料攝取量。在初始體重方面四組皆無差異，而在給予試驗飲食 11 週後可看到其最終體重，在 BMSO 組皆顯著低於 HS($P<0.0001$)，以 H 有最低體重。至於體重增加速率，也是 BMSO 組皆顯著低於 HS($P<0.0001$)。而在飼料攝食方面，低劑量苦瓜籽油(L)與 HS 無顯著

差異，中劑量苦瓜籽油(M)的攝食量有低於 HS 的傾向，而高劑量苦瓜籽油(H)則顯著低於 HS($P<0.05$)，熱量攝取的結果與飼料攝取相同。在第一批實驗小鼠適應苦瓜籽油飼料後攝食量回升，但此批實驗 H 組攝食量並沒有回復。雖然中高劑量苦瓜籽油降低食慾(分別為 HS 之 6 與 13%)，但體脂肪降低幅度更大(分別為 HS 之 42 與 73%)，換算飼料效率顯示 HS 顯著高於三組 BMSO 組($P<0.0001$)，而 H 又比 L 和 M 組顯著較低($P<0.0001$)。

二. 體脂堆積及其它肥胖相關指標

犧牲前小鼠體型即可見明顯差異(圖 4-11)，HS 組腰腹明顯大於它組，我們利用小鼠的鼻肛長換算小鼠的 BMI(圖 4-12)，BMSO 三組的 Lee's index 有低於 HS 的傾向，且在 M 和 H 是顯著的低於 HS($P<0.005$)。腹腔打開後肉眼即可見體脂肪量明顯差異，H 組的白色脂肪組織不但量少且呈現黃色，對照於其他組仍為白色(圖 4-11)。

絕對及相對體脂肪量顯示於表 4-6，白色脂肪(包括 retroperitoneal, epididymal 及 inguinal fat)不論絕對及相對重，三組 BMSO 皆顯著低於 HS 組($P<0.0001$)，且有劑量依存效應(L、M、H 組白色脂肪總量分別是 HS 組之 62、58 和 27%)，而在棕色脂肪絕對量 HS 組高於三組 BMSO($P<0.06$)(表 4-6)，但校正體重後四組無顯著差異。此結果顯示長期給予苦瓜籽油低劑量(2.5%CLN in 30% high fat diet)即可有效降低體脂，且隨著劑量加大(至 7.5% CLN in 30% high fat diet)降低效果更顯著。

以血清 leptin levels 作為體脂堆積量指標(圖 4-13)，在試驗飲食 4 週時的血清 leptin levels 即可見三組 BMSO 比 HS 組低，且 M 和 H 顯著低於 HS($P<0.0001$)，而三組 BMSO 也有劑量依存效應，我們推測補充四週體脂差距即已呈現；但在 11 週犧牲時測定血清 leptin 含量只有 H 組顯著低於 HS 組($P<0.0001$)(圖 4-13)。

雖然最終血清 leptin levels 似乎不能反映體脂堆積量，但我們測定副睪脂的 leptin mRNA 表現(圖 4-14)，三組 BMSO 的 leptin mRNA 皆顯著低於 HS 組($P<0.0001$)，且有劑量依存效應，再次肯定體脂堆積量結果。

以脂肪組織切片定量脂肪細胞大小(圖 4-15)，可見脂肪細胞的直徑隨著 BMSO 攝取增加顯著的減少($P<0.0001$)。

三. 血糖與胰島素

BMSO 既可降體脂，為評估安全性首先測試是否惡化胰島素敏感性，餵食 11 週後測定禁食血糖及胰島素，圖 4-16 可見三組 BMSO 其血糖濃度皆顯著比 HS 低($P<0.005$)，且血清胰島素四組間並無顯著差異，顯示 BMSO 相較於大豆油，血糖較低，因此胰島素敏感性可能大於或等於大豆油組。

四. 血脂、肝脂與肝功能

為評估 BMSO 使用安全性，表 4-7 為小鼠血脂值與肝功能指標 GOT，在餵食試驗飲食 11 週小鼠血清 TG、TC 與 NEFA 在四組間皆無顯著差異，但我們曾在餵食 4 週時取血測 leptin 與 TG，發現 4 週時小鼠血清 TG 在三組 BMSO 比起 HS 有降低趨勢，且 M 和 H 與 HS 組相比有顯著差異($P<0.0001$)。為了確保高劑量 BMSO 不會對小鼠的肝功能造成損傷，我們測定了血清 GOT levels，發現三組 BMSO 其 GOT levels 不但沒有增加，甚至顯著低於 HS ($P<0.05$)，顯示長期(11 週)食用 BMSO 劑量高達飼料重 15%(其中 CLN 約佔飼料重 7.5%)，並不會造成肝功能受損。

由於體脂降低(或脂肪細胞數目減少)可能造成脂肪異位性堆積於肝臟，因此我們也測定了肝臟 TG 和 TC 的含量，在肝臟 TG 方面三組 BMSO 與 HS 相比有顯著降低 ($P<0.05$)，而在肝臟 TC 也可看到三組 BMSO 有降低傾向($P=0.1094$)，其中 H 組顯著低於 HS 組，以上結果顯示 BMSO 不但降體脂，也有降肝脂功效(圖 4-17)。

五. BMSO 對副羧脂磷酸激酶活性之影響

先前有文獻指出苦瓜中的三萜類成分可活化 AMPK 而降血糖(136, 137)，我們在實驗一也發現 BMSO-treated mice 脂肪組織有類似 AMPK 活化效應(lipogenesis 降低，thermogenesis 增加)，因此在實驗二我們以西方墨點法偵測副羧脂中 p-AMPK 的表現量(圖 4-18)，結果發現只有 L 組與 HS 組相比有增加的趨勢，但差異未達統計意義($P=0.0654$)。但是在 p-ACC (ACC 去活化)則可看到在三組 BMSO 皆顯著的高於 HS 組($P<0.008$)，表示 BMSO 會抑制 ACC 的活化(圖 4-18)，此結果與先前推測的 BMSO 抑制 lipogenesis 吻合。由於 ACC 磷酸

化增加，但 AMPK 活化並不明顯，因此又偵測了 p-PKA，已知活化的 PKA 亦可磷酸化 ACC 蛋白質，結果發現 L 組與 HS 相比其 p-PKA 的表現有顯著的增加($P<0.05$)，但 M 和 H 組則與 HS 無顯著差異(圖 4-18)。

不論 AMPK 或 PKA 活化亦可活化 leptin signaling，共同啟動下遊反應(增加生熱和脂肪酸 β 氧化，抑制脂質合成)，因此我們也偵測 p-STAT3 代表 leptin 傳訊是否活化，結果顯示 L 和 M 組與 HS 組相比有傾向或顯著的增加($P<0.05$)(圖 4-18)。

以上結果顯示至少低劑量 BMSO 可藉由活化 PKA 及增加 Leptin sensitivity 而達到降體脂的功效。

六. BMSO 對肝臟磷酸激酶活性的影響

BMSO 既可活化脂肪組織磷酸激酶，是否在肝臟也可看到同樣效應?我們測量肝臟磷酸化與總 PKA、ACC 和 AMPK 的蛋白質，如圖 4-19 所示，p-AMPK 的表現在 L 和 M 有高於 HS 的傾向，但未達顯著差異($P=0.4308$);至於 p-PKA，L 與 HS 相比有顯著增加($P<0.05$)，M 和 H 組與也有較高傾向，但與 HS 無顯著差異;另外在 p-ACC 也觀察到 BMSO 有增加 p-ACC 蛋白質傾向，其中 H 組顯著高於 HS 組($P<0.007$)(圖 4-19)。

七. BMSO 對小鼠生熱效應

為瞭解 BMSO 降體脂功效是否與促進生熱有關，我們曾經在餵食第 10 週進行產熱實驗：時將小鼠暴露低溫下(4°C)，觀察小鼠其體溫變化情形(4-20)，結果發現在給予 cold stimulation 前四組小鼠體溫(肛溫)並無差異，但 cold stimulation 一小時，M 和 H 組與 L 和 HS 組相比有顯著較高的體溫($P<0.0001$) (圖 4-20)，

但在此時間點之後則無顯著差異。此結果顯示 BMSO 可能增加小鼠全身生熱能力，但只見於中高劑量組。

八. 脂肪細胞的發炎與凋亡

雖然在 H 組之副睪脂和肝臟皆沒有觀察到 PKA 活化，但我們在脂肪組織切片(HE 染色)發現 H 組脂肪細胞型態有別於其它組，不但大小呈現不均一，且出現許多 Crown-like structure (CLS)(圖 4-21)，大量的 CLS 只見於長期餵食之 H 組，長期中低劑量或短期(5 wk)高劑量的脂肪組織切片並不見大量 CLS。由於 CLS 是巨噬細胞的聚集而成，因此我們測定副睪脂中 TNF- α 的蛋白質含量(圖 4-21)，發現隨 BMSO 劑量增加，TNF- α levels 皆顯著高於 HS($P<0.0001$)，且在 H 組最高，顯示此脂肪組織有發炎反應的發生及巨噬細胞浸潤的現象。

一般脂肪細胞的發炎及巨噬細胞浸潤常見於肥胖脂肪組織，H 組脂肪塊明顯縮小為何出現發炎反應？根據 Herrero 等人 (69)發表 lipodystrophy model 亦可見到脂肪組織 CLS 及發炎反應，巨噬細胞的聚集乃是為了吞併死亡脂肪細胞，因此我們懷疑高劑量 BMSO 可能造成脂肪細胞凋亡，因此利用 TUNEL assay 觀察脂肪切片，結果示於圖 4-22，發現在 H 組確實檢測到凋亡的細胞核(綠色亮點)，相較於 HS 組並無細胞凋亡發生，因此高劑量 BMSO 降體脂途徑可部份歸功於促進脂肪細胞凋亡。

九. 脂肪組織脂質代謝相關基因表現

以 qRT-PCR 檢測脂肪組織脂質代謝相關基因表現結果示於圖 4-23，由於低劑量 BMSO 可活化 PKA 途徑，因此我們測定 β 3-adrenergic receptor(β 3-AR)，結果發現 H 組與 HS 相比其 β 3-AR mRNA levels 有顯著的上升($P<0.05$)，而 L

和 M 組與 HS 組相比有增加的趨勢(圖 4-23)。已知增加 β -adrenergic receptor 的表現會增加脂肪細胞的脂解作用，而 perilipin 主要是保護油滴不受 HSL 作用，在 perilipin mRNA levels 發現 H 組與 HS 相比有顯著的降低($P<0.005$) (圖 4-23)，而 M 組與 HS 相比有降低的趨勢。為探討脂肪組織 FA 氧化是否增加並促進生熱，我們測定 CPT-I、PGC-1 α 及 UCP-2 mRNA levels(圖 4-24)，結果在 CPT-I 為 HS 組最高，H 與 HS 相比有降低的趨勢，而 L 和 M 則是比 HS 顯著下降($P<0.008$)，而 PGC-1 α levels 在四組中無顯著差異。至於與生熱作用有關的 UCP2 表現，則是 H 與 HS 相比有增高的趨勢。高劑量 BMSO 可能可藉由增加脂解作用而達到降體脂功效。

十. 肝臟脂質代謝相關基因表現

以 qRT-PCR 觀察肝臟脂質代謝相關基因表現(圖 4-25)，FAS mRNA levels 在三組 BMSO 皆顯著低於 HS 組($P<0.0001$)，尤其 L 與 M 組的降低程度大於 H 組，另外 CPT-I、ACO 與 PGC-1 α 常受 PPAR α 活化而增加表現，可促進脂肪酸氧化代謝，結果發現 CPT-I 和 PGC-1 α 的濃度在四組間皆無顯著差異，而在 ACO 為 HS 組最高，H 與 HS 相比有降低的趨勢，而 L 和 M 則是比 HS 顯著下降($P<0.005$)，顯示低劑量 BMSO 可活化 PKA 而抑制 Lipogenesis，且 FAS mRNA levels 的降低可能貢獻 BMSO 降肝脂功效。

表 4-5 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 11 週之初始體重、最終體重、攝食量及能量攝取^{1,2,3}

Table4-5 Initial body weight, final body weight, food intake and energy intake of C57BL/6J mice fed with experimental diets for 11 wk^{1,2,3}

	Initial body Weight (9 wk)	Final body Weight (20 wk)	Body weight gain	Food intake	Energy intake
	(g)	(g)	(g / 11w)	(g / d)	(kcal / d)
HS (n = 9)	24.66±1.78 ^a	38.53±4.47 ^a	13.87±3.42 ^a	2.63±0.40 ^a	13.21±2.03 ^a
L (n = 10)	24.22±1.73 ^a	34.74±3.37 ^b	10.52±2.26 ^b	2.69±0.26 ^a	13.52±1.33 ^a
M (n = 10)	24.19±1.75 ^a	34.09±3.74 ^b	9.91±3.11 ^b	2.47±0.27 ^{ab}	12.40±1.38 ^{ab}
H (n = 10)	24.23±1.65 ^a	30.19±2.47 ^c	5.96±1.18 ^c	2.30±0.33 ^b	11.53±1.66 ^b

¹ Calory content of the four high fat diets : 5.02 kcal/g

² The values are the means ± S.D..

³ The significance of differences among the four groups (HS, L, M, and H) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letters in the same column are significantly different among groups ($p < 0.05$).

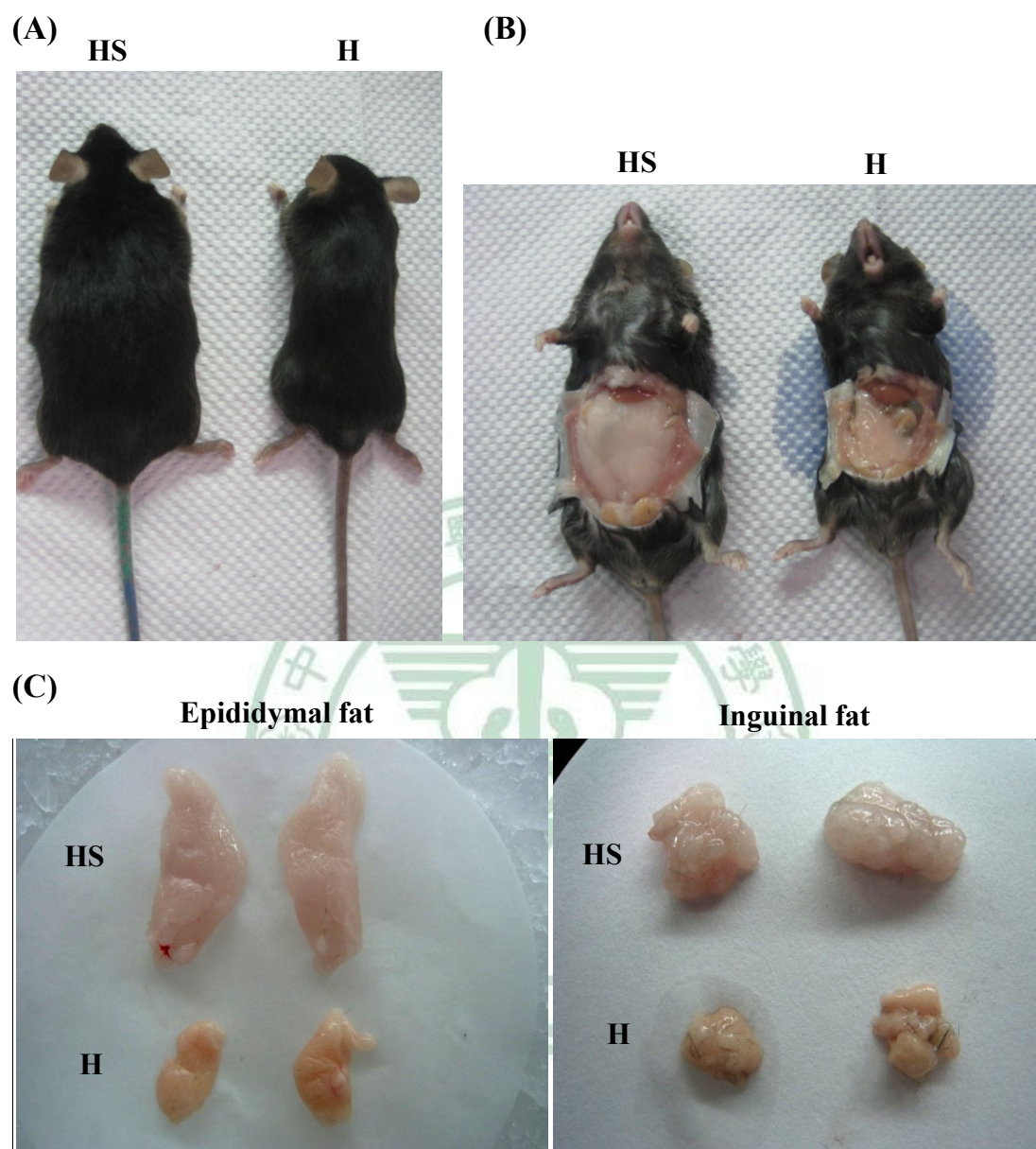


圖 4-11 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 11 週之體型(A)、腹部解剖圖(B) 和副睪脂與鼠鱧脂肪(C)

Figure4-11 Photograph of gross change in HS and H groups of C57BL/6J mice fed the experimental diets for 11 wk. The shape of body (A), exposed ventral view (B), epididymal fat and inguinal fat(C) in these mice.

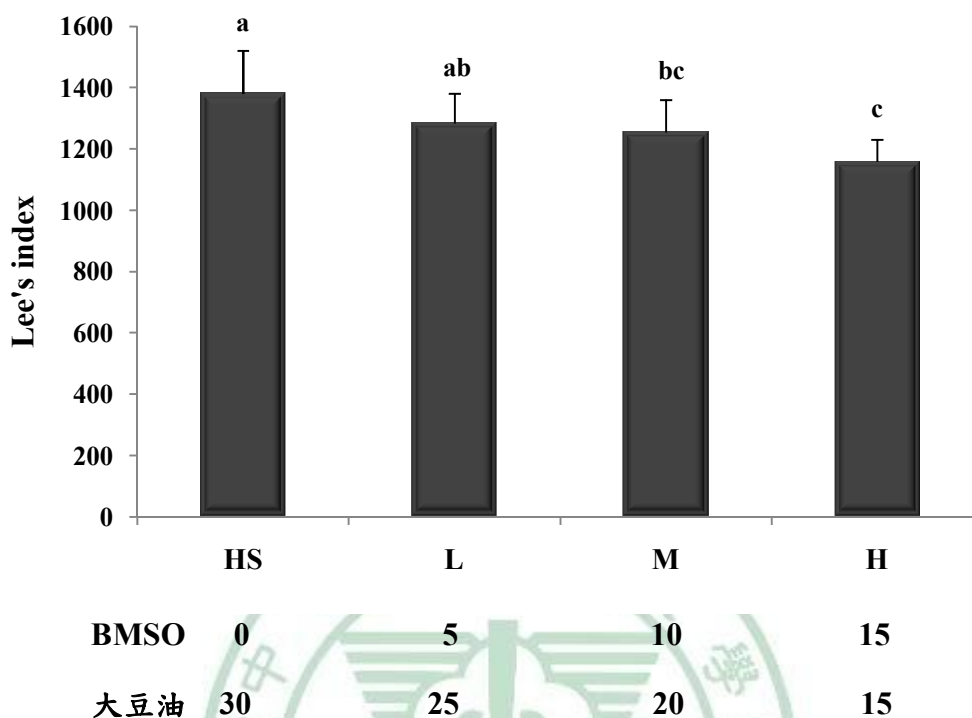


圖 4-12 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 11 週之 Lee's index

Figure4-12 The Lee's index of C57BL/6J mice fed the experimental diets for 11 wk. The values are the means \pm S.D. (n=9~10). The significance of differences among the four groups (HS, L, M, and H) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letters are significantly different among groups ($p < 0.05$).

$$\text{Lee's index} = \frac{\text{Body weight (g)}^{1/3}}{\text{Nasal-anal length (cm)}} \times 1000 \quad (170)$$

表 4-6 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 11 週之絕對及相對體脂重^{1,2}

Table4-6 The absolute and relative adipose weights of C57BL/6J mice fed experimental diets for 11 wk^{1,2}

		Absolute weight (g)			Relative weight (% of body weight)				
		WAT		BAT	WAT			BAT	
		Retroperitoneal	Epididymal	Inguinal	Retroperitoneal	Epididymal	Inguinal		
HS	(n = 9)	0.89±0.25 ^a	2.20±0.58 ^a	1.00±0.37 ^a	0.179±0.04 ^a	2.28±0.45 ^a	5.64±1.07 ^a	2.55±0.70 ^a	0.46±0.07
L	(n = 10)	0.54±0.26 ^b	1.40±0.62 ^b	0.57±0.25 ^b	0.144±0.05 ^b	1.51±0.61 ^b	3.93±1.37 ^b	1.61±0.56 ^b	0.41±0.10
M	(n = 10)	0.43±0.20 ^{bc}	1.44±0.52 ^b	0.50±0.27 ^b	0.141±0.03 ^b	1.23±0.50 ^{bc}	4.14±1.22 ^{bc}	1.41±0.69 ^b	0.42±0.07
H	(n = 10)	0.24±0.17 ^c	0.63±0.09 ^c	0.25±0.10 ^c	0.132±0.03 ^b	0.76±0.48 ^c	2.09±0.37 ^c	0.81±0.32 ^c	0.44±0.08

¹ The values are the means ± S.D. .

² The significance of differences among the four groups (HS, L, M, and H) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letters in the same column are significantly different among groups ($p < 0.05$).

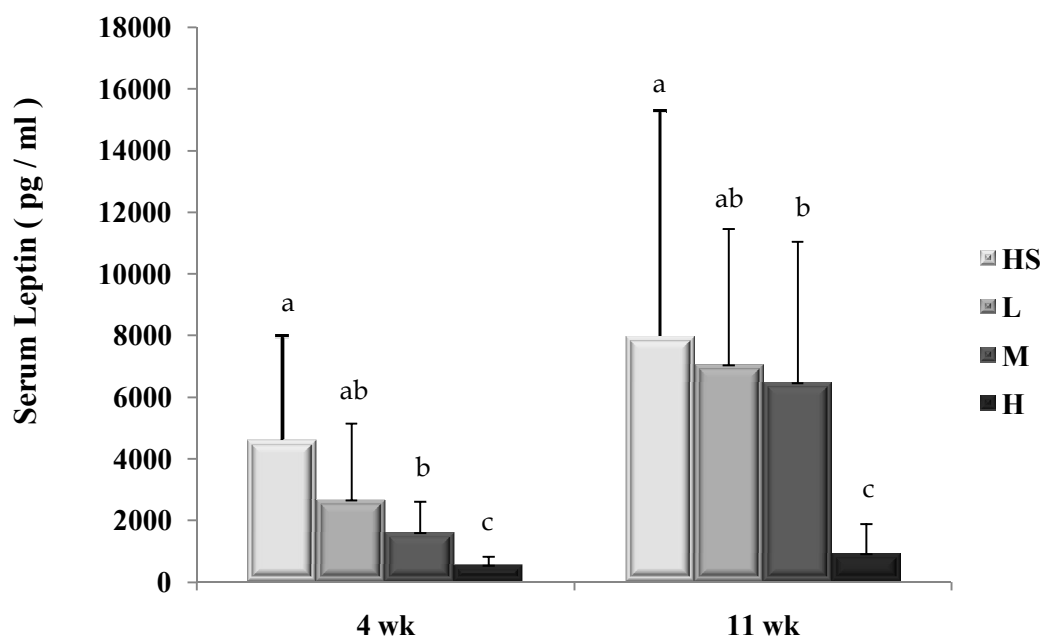


圖 4-13 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 4 和 11 週之禁食血清瘦體素(leptin)含量

Figure4-13 The fasting serum leptin levels of C57BL/6J mice fed the experimental diets for 4 and 11 wk. The values are the means \pm S.D. ($n=9\sim 10$). The significance of differences among the four groups (HS, L, M, and H) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letters are significantly different among groups ($p < 0.05$).

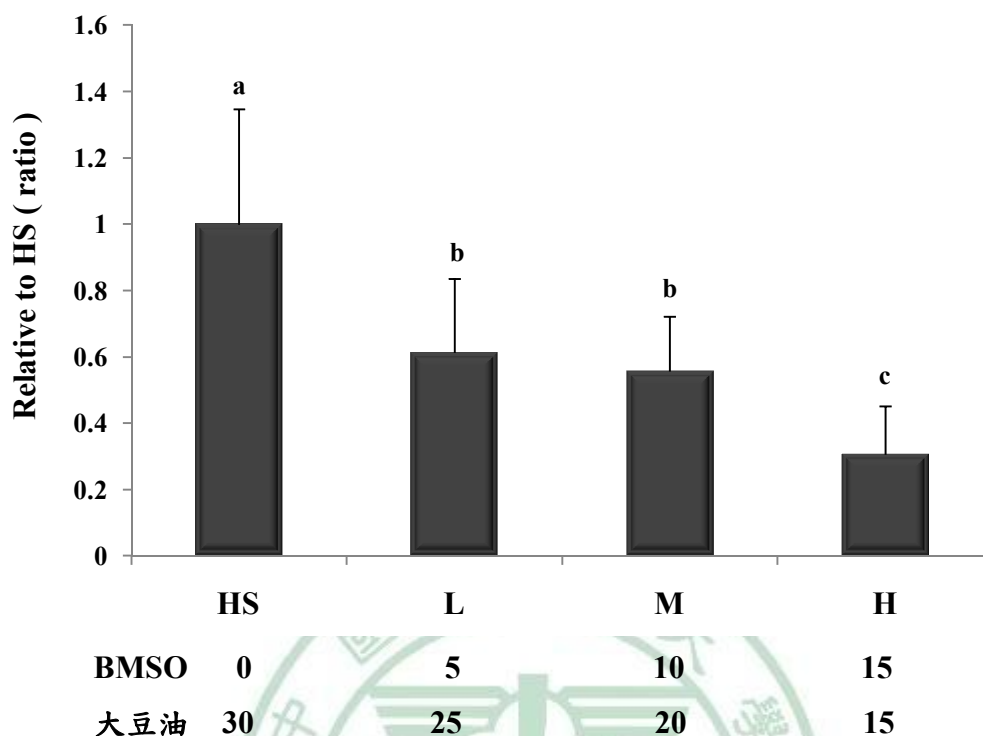


圖 4-14 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 11 週以 qRT-PCR 定量副睪脂 leptin mRNA 的表現

Figure 4-14 The mRNA levels of leptin quantified by qRT-PCR in epididymal fat of C57BL/6J mice fed the experimental diets for 11 wk. The fold induction was calculated by taking the normalized values of HS group as 1. The values are the means \pm S.D. (n=9~10). The significance of differences among the four groups (HS, L, M, and H) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letters are significantly different among groups ($p < 0.05$).

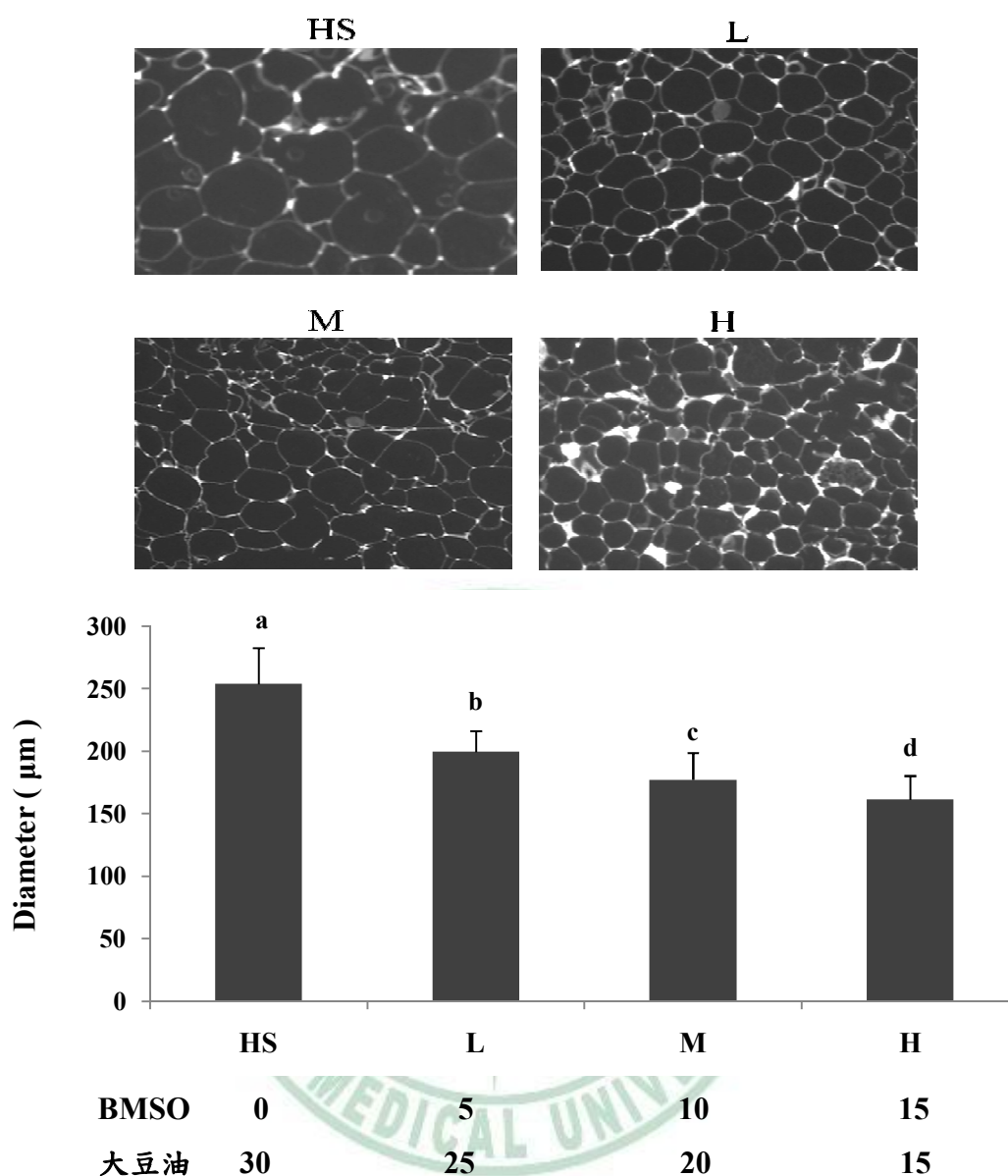


圖 4-15 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 11 週之副睪脂脂肪組織切片與脂肪細胞平均直徑

Figure 4-15 The histological section (A) and average diameter of adipocyte (B) in epididymal fat of C57BL/6J mice fed the experimental diets for 11 wk. The values are the means \pm S.D. (n=9~10). The significance of differences among the four groups (HS, L, M, and H) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letters are significantly different among groups ($p < 0.05$).

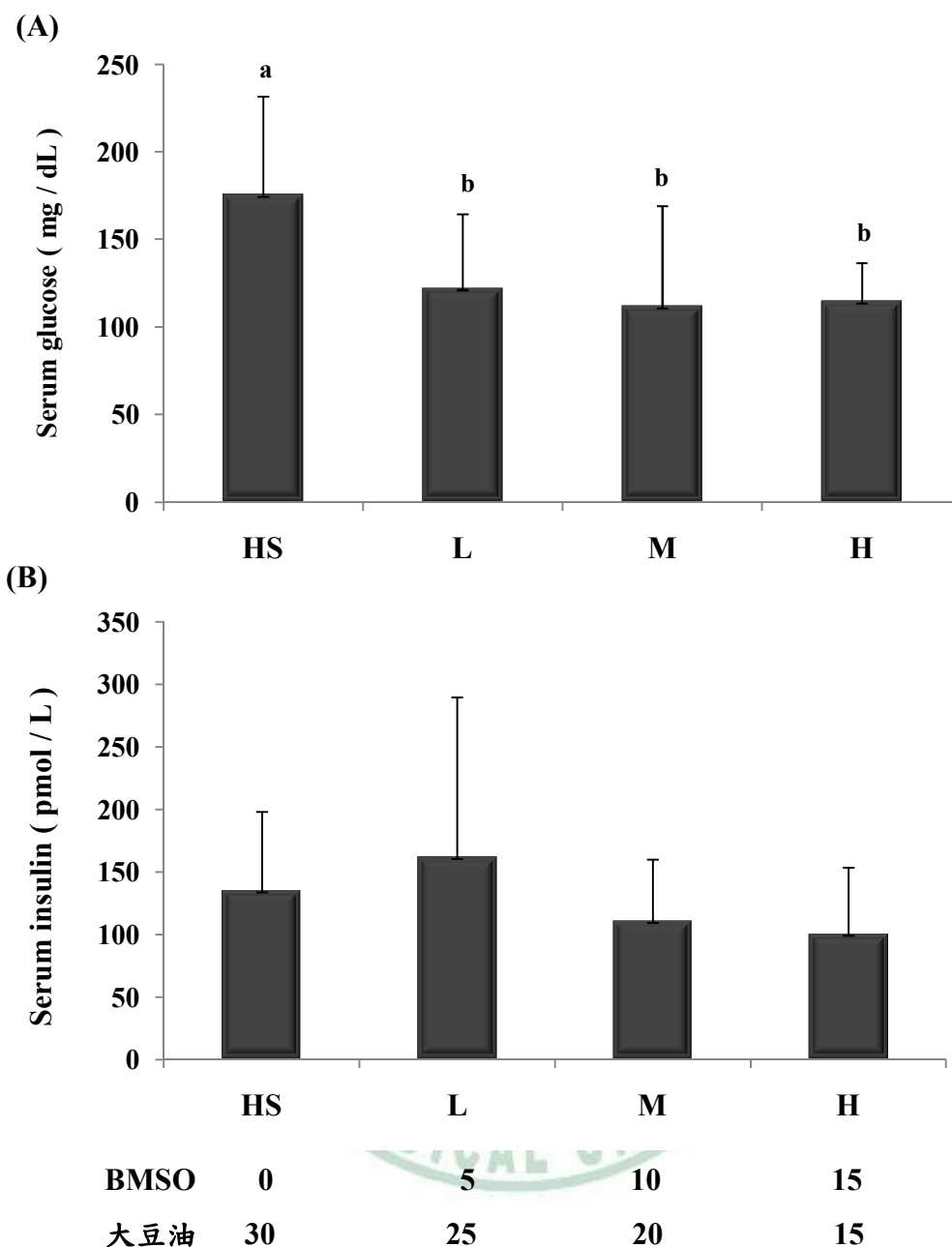


圖 4-16 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 11 週之禁食血糖及血清胰島素

Figure 4-16 The fasting serum glucose (A) and insulin (B) of C57BL/6J mice fed the experimental diets for 11 wk. The values are the means \pm S.D. ($n=9\sim 10$). The significance of differences among the four groups (HS, L, M, and H) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letters are significantly different among groups ($p < 0.05$).

表 4-7 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 11 週之禁食血液生化值^{1,2,3}Table4-7 The fasting serum levels of mice fed the experimental diets for 11 wk^{1,2,3}

	4w		11w		
	Serum TG (mmol / L)	Serum TG (mmol / L)	Serum TC (mmol / L)	Serum NEFA (mmol / L)	Serum GOT (U / L)
HS (n = 9)	1.21±0.17 ^a	0.82±0.19	1.40±0.05	1.03±0.24	40.25±12.42 ^a
L (n = 10)	1.12±0.16 ^{ab}	0.87±0.16	1.42±0.14	1.13±0.25	30.56±10.34 ^b
M (n = 10)	1.06±0.08 ^{bc}	0.93±0.22	1.46±0.12	1.12±0.14	28.03±7.71 ^b
H (n = 10)	0.93±0.10 ^c	0.74±0.20	1.39±0.06	0.99±0.17	29.85±8.13 ^b

¹ The values are the means ± S.D..

² The significance of differences among the four groups (HS, L, M, and H) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letters in the same column are significantly different among groups ($p < 0.05$).

³ TG : Triacylglycerol ; TC : Total cholesterol ; NEFA : Non esterified fatty acid ; GOT : glutamate oxaloacetate transaminase

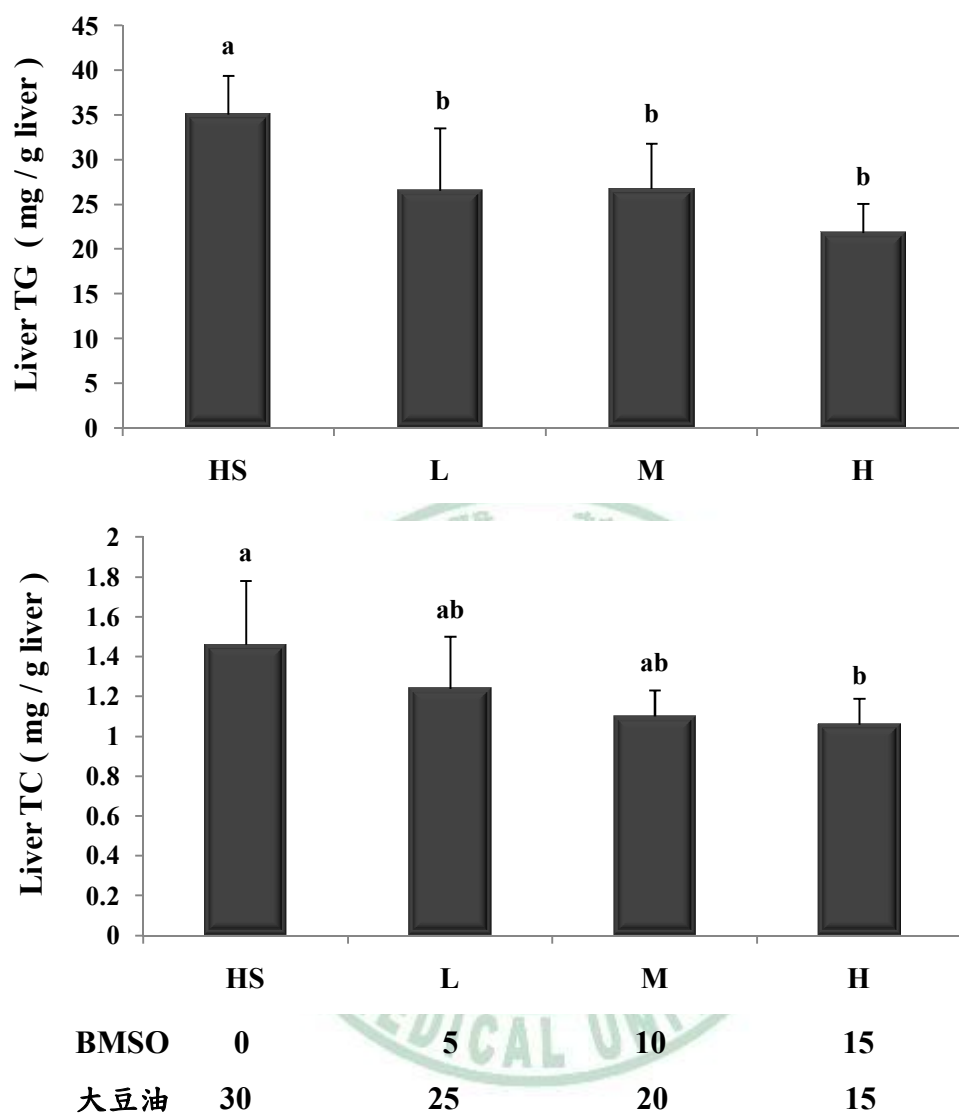


圖 4-17 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 11 週之肝臟組織 TG 和 TC 含量

Figure 4-17 The TG and TC content in liver of C57BL/6J mice fed the experimental diets for 11 wk. The values are the means \pm S.D. (n=9~10). The significance of differences among the four groups (HS, L, M, and H) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letters are significantly different among groups ($p < 0.05$).

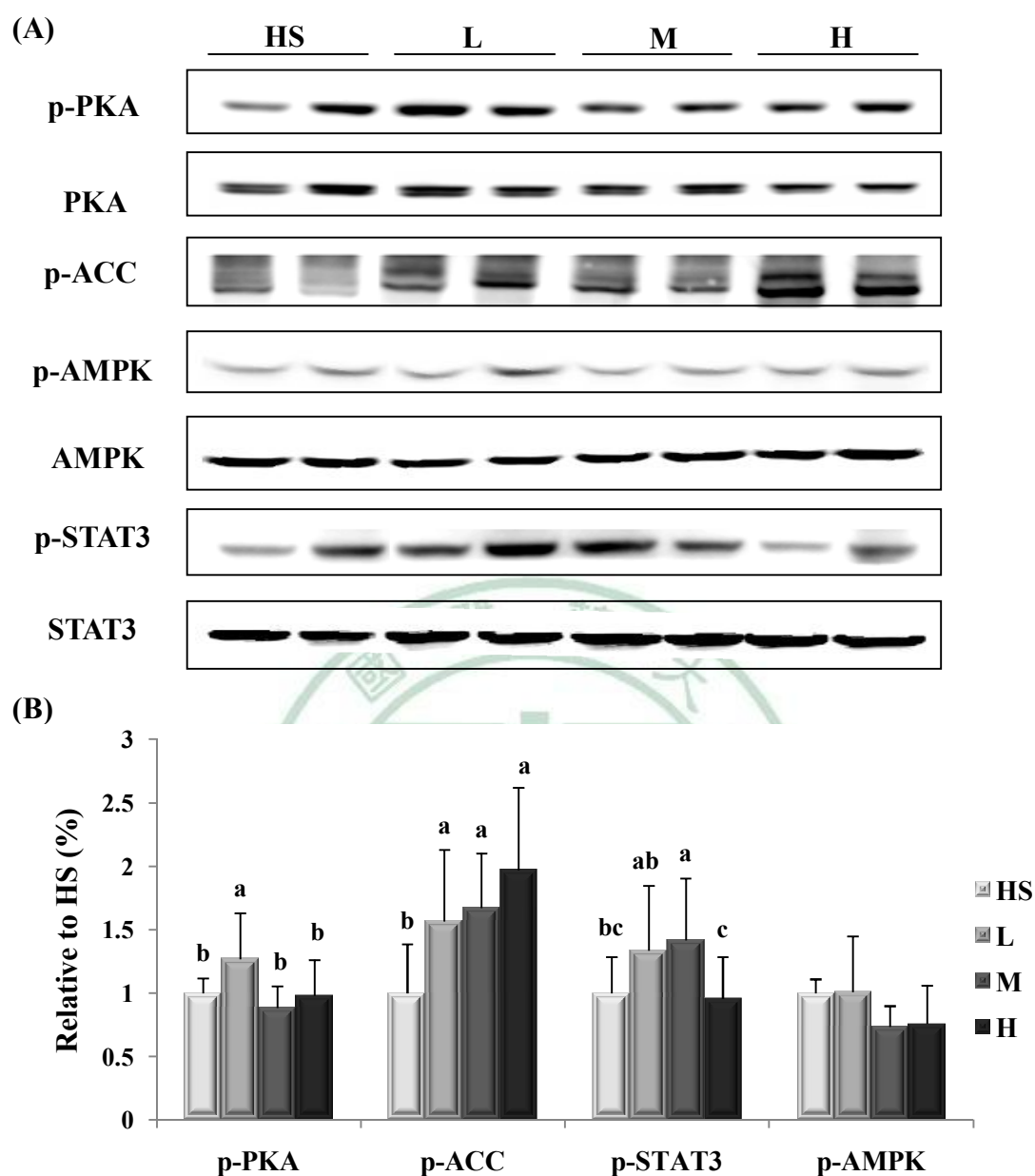


圖 4-18 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 11 週以西方墨點法偵測副睪脂 PKA、ACC、AMPK 及 STAT3 磷酸化蛋白質含量

Figure 4-18 The immunoblot (A) and quantified (B) phosphorylated and total PKA, ACC, AMPK and STAT3 protein in epididymal fat of C57BL/6J mice fed the experimental diets for 11 wk. The fold induction was calculated by taking the normalized values of HS group as 1. The values are the means \pm S.D. (n=9~10). The significance of differences among the four groups (HS, L, M, and H) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letters are significantly different among groups ($p < 0.05$).

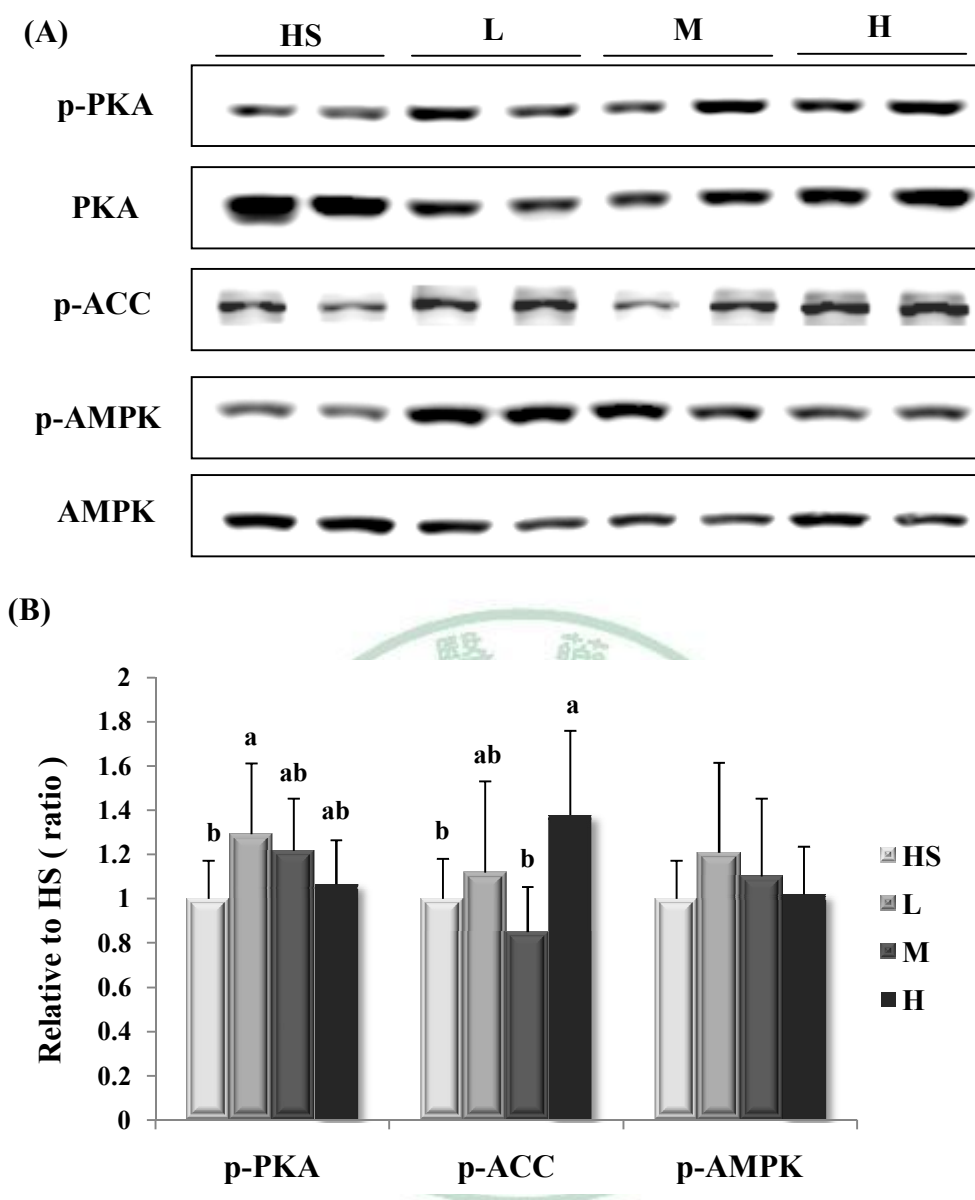


圖 4-19 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 11 週以西方墨點法偵測肝臟 PKA、ACC 及 AMPK 磷酸化蛋白質含量

Figure 4-19 The immunoblot (A) and quantified (B) phosphorylated and total PKA, ACC, AMPK and STAT3 protein in liver of C57BL/6J mice fed the experimental diets for 11 wk. The fold induction was calculated by taking the normalized values of HS group as 1. The values are the means \pm S.D. (n=9~10). The significance of differences among the four groups (HS, L, M, and H) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letters are significantly different among groups ($p < 0.05$).

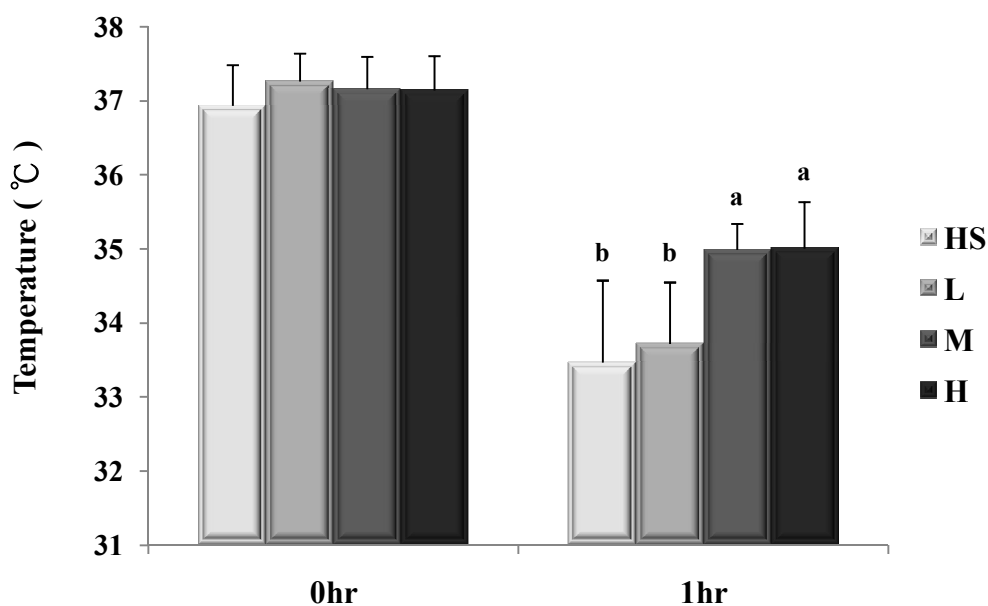
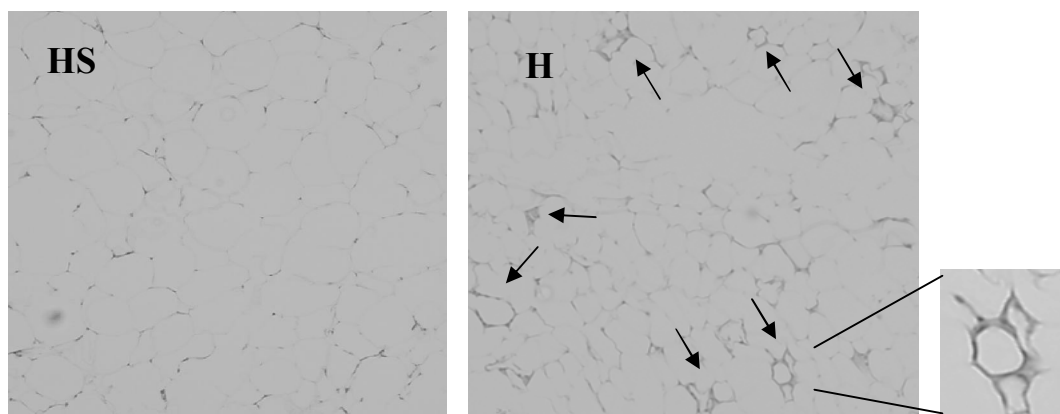


圖 4-20 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 10 週暴露於 4°C 0 與 1 小時之體溫

Figure4-20 The body temperature at 0 and 1-hour exposure to 4°C of C57BL/6J mice fed the experimental diets for 10 wk. The values are the means \pm S.D. (n=9~10). The significance of differences among the four groups (HS, L, M, and H) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letters are significantly different among groups ($p < 0.05$).

(A)



(B)

(右小圖為 H 放大圖)

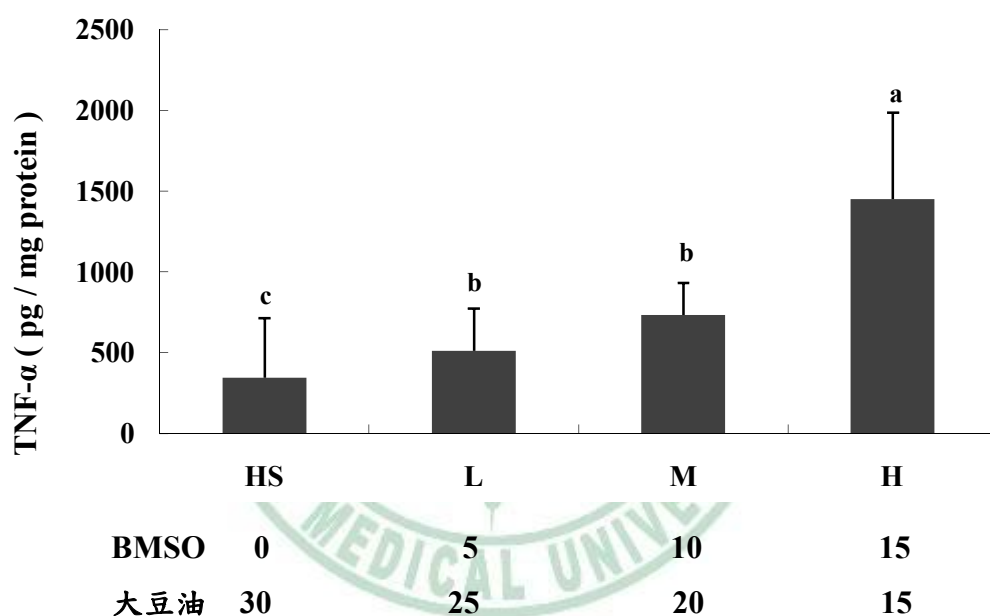


圖 4-21 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 11 週之副睪脂組織 crown-like structure 與 TNF- α 蛋白質含量

Figure 4-21 The crown-like structure (A) and TNF- α protein levels (B) in epididymal fat of C57BL/6J mice fed the experimental diets for 11 wk. The crown-like structures were indicated by arrows. The values are the means \pm S.D. ($n=9\sim 10$). The significance of differences among the four groups (HS, L, M, and H) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letters are significantly different among groups ($p < 0.05$).

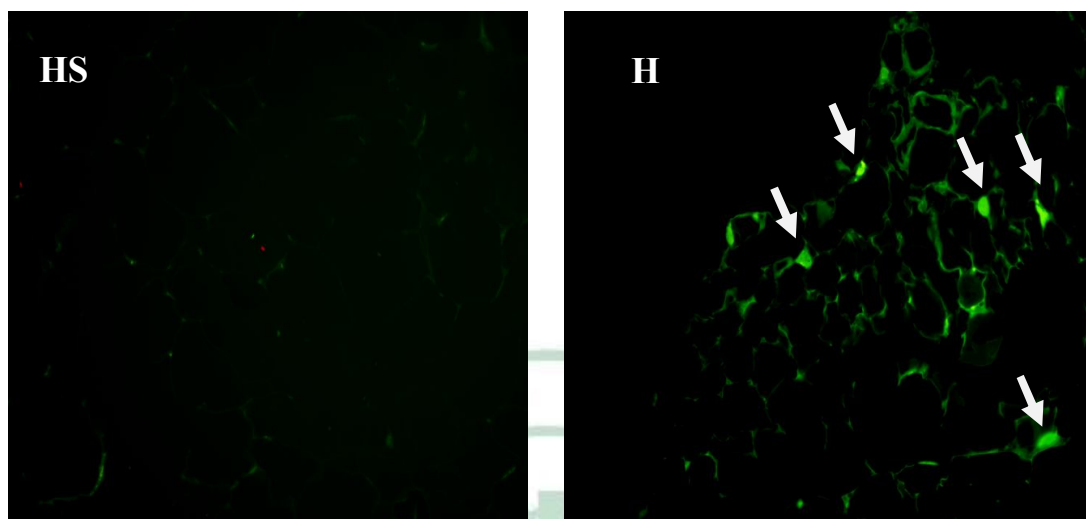


圖 4-22 C57BL/6J 小鼠餵食高劑量 BMSO 11 週後利用 TUNEL 觀察脂肪細胞凋亡情形

Figure4-22 TUNEL analysis for apoptosis in adipose tissue of C57BL/6J mice fed the experimental diets for 11 wk. The apoptotic nuclei were indicated by arrows.

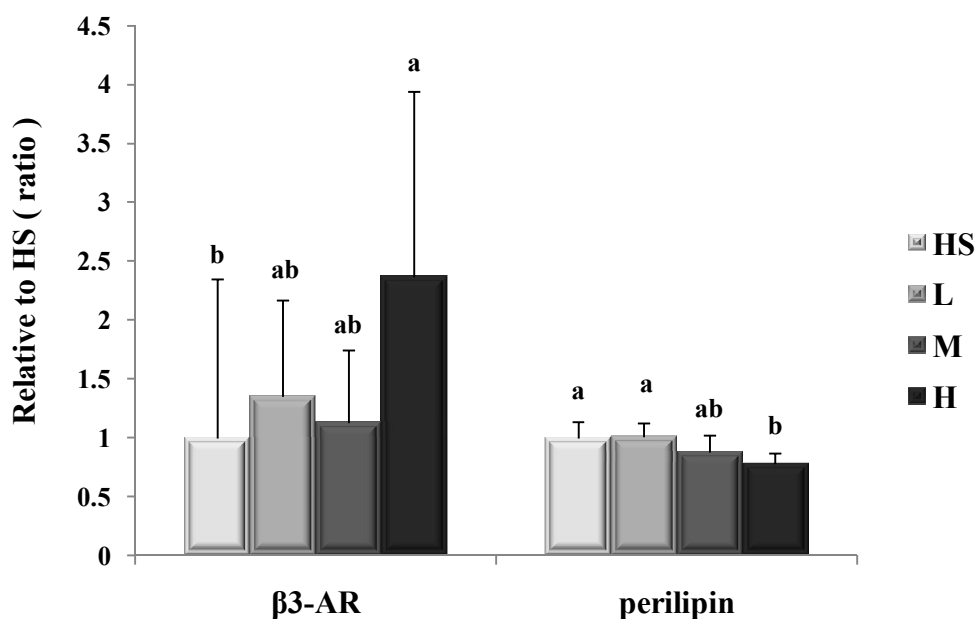


圖 4-23 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 11 週以 qRT-PCR 定量副睪脂 β 3-adrenergic receptor 和 perilipin mRNA 含量

Figure4-23 The expression levels of β 3-adrenergic receptor and perilipin quantified by qRT-PCR in epididymal fat of C57BL/6J mice fed the experimental diets for 11 wk. The fold induction was calculated by taking the normalized values of HS group as 1. The values are the means \pm S.D. (n=9~10). The significance of differences among the four groups (HS, L, M, and H) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letters are significantly different among groups ($p < 0.05$).

$\beta 3$ -AR : $\beta 3$ -adrenergic receptor

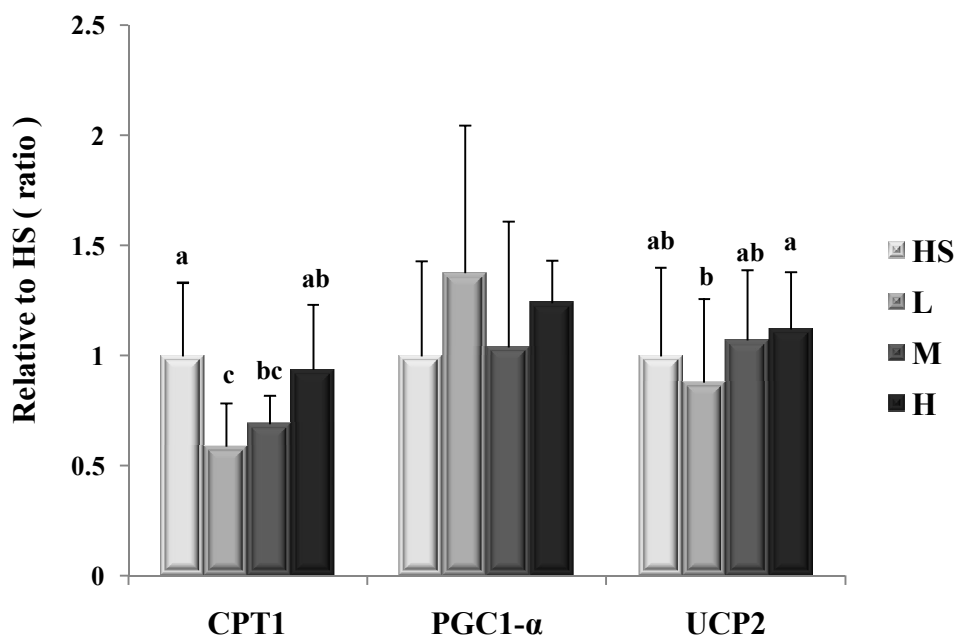


圖 4-24 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 11 週以 qRT-PCR 定量副睪脂 CPT-1、PGC1- α 和 UCP2 mRNA 含量

Figure4-24 The expression levels of CPT-1、PGC1- α and UCP2 quantified by qRT-PCR in epididymal fat of C57BL/6J mice fed the experimental diets for 11 wk. The fold induction was calculated by taking the normalized values of HS group as 1. The values are the means \pm S.D. (n=9~10). The significance of differences among the four groups (HS, L, M, and H) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letters are significantly different among groups ($p < 0.05$).

CPT-I : carnitine palmitoyl transferase I ; PGC1- α : PPAR-gamma coactivator ;
UCP2 : uncoupling protein 2

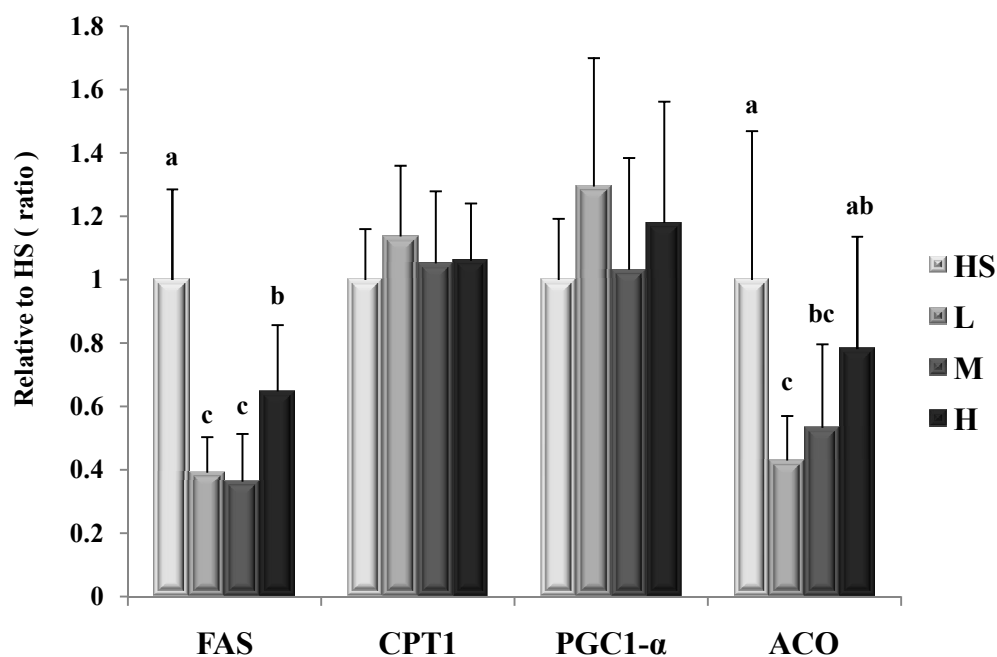


圖 4-25 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 11 週之肝臟內基因表現

Figure 4-25 The gene expression levels quantified by qRT-PCR in liver of C57BL/6J mice fed with experimental diets for 11 wk. The fold induction was calculated by taking the normalized values of HS group as 1. The values are the means \pm S.D. ($n=9\sim 10$). The significance of differences among the four groups (HS, L, M, and H) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letters are significantly different among groups ($p < 0.05$).

FAS : fatty acid synthase ; CPT-I : carnitine palmitoyl transferase I ; PGC1- α : PPAR-gamma coactivator ; ACO : acyl-CoA oxidase

第五章 討論

已知 C57BL/6J mice 對高脂 (SFA-rich) 飲食誘發肥胖及代謝症候群敏感。在實驗一的設計我們首先以富含 SFA 的奶油高脂飲食誘發小鼠肥胖，再將油脂來源轉為 PUFA-rich (soybean oil 或 soybean oil+BMSO)，比較這兩種 PUFA-rich (polyunsaturated fatty acids) 油脂來源對於減緩體脂堆積之功效。選擇 soybean oil 與 BMSO 相比的理由是：soybean oil 是一般民眾普遍攝取之植物油，且 PUFA 含量與 BMSO 相當；至於決定採 soybean oil+BMSO 以 1:1 混合，是為滿足小鼠必需脂肪酸需求並一舉以高劑量 BMSO 看到功效；另外為了解降體脂功能是否與 CLN 有關，使用兩品系 BMSO 含高或低量 CLN。部分小鼠餵以 chow diet 低脂飲食 (油脂約佔飼料重 4.5%)，是作為低脂對照組 (LF) 有正常體重體脂，HFB (奶油為油脂來源) 作為高脂飲食對照組是為肥胖，抑制肥胖的功效是將含有 soybean oil 的 HFS 組與 soybean oil+BMSO 的 HFSC_H 和 HFSC_L 組相比。

小鼠的攝食情況可看到雖然在 LF 組的攝取量較高，但是因為高脂飲食的熱量密度較高，所以換算為熱量攝取的話還是高脂組來的比 LF 組高，終體重也是高脂組顯著高於 LF 組(表 4-1)。將四組高脂組相比較可知苦瓜籽油對體重影響不大，不過腹部體脂堆積確有不同的進展，我們以腹膜後脂肪塊(RE)和副睪脂(EP)來評估腹部的體脂堆積情況(表 4-2 及 4-3)，結果顯示在苦瓜籽油組(HFSC_H 和 HFSC_L)其腹部體脂堆積與 HFB 和 HFS 相比有減少的趨勢，在 RE 達到顯著降低，其它支持體脂肪降低之證據包括與體脂堆積成正比的 Leptin，在圖 4-1 與圖 4-6 看到 BMSO 組的血清 Leptin 濃度與脂肪組織 Leptin mRNA 均有顯著減少，各組變化與腹脂堆積大致相符。脂肪組織切片也證實奶油飲食確實刺激脂肪細胞肥大，轉換油脂來源後，只有給予苦瓜籽油可成功抑制脂肪細胞的肥大。

為進一步確認體脂降低並為後續機制探討提供方向，以qRT-PCR偵測脂肪組織中與體脂堆積和脂質代謝有關之基因表現。與體脂堆積有關的基因除Leptin

外，並偵測Adiponectin和Mest。Adiponectin雖然有報告指出在肥胖及胰島素抵抗者較低，但也有報告顯示和體脂堆積量呈正比，本實驗也發現在苦瓜籽油組有較低的趨勢。Mest是最新發現與肥胖密切相關基因，Mest在肥胖鼠脂肪組織表現多，一般認為它與脂肪細胞肥大能力有關(171)，結果也發現苦瓜組較低(圖4-6)。在脂質生合成相關的基因方面(圖4-7)，ACC和FAS主要是參與Lipogenesis的關鍵酵素，雖然給予苦瓜籽油並沒有觀察到ACC的基因表現降低，但FAS mRNA levels有明顯的降低，因此我們推測BMSO有可能是改變ACC蛋白質的活性，已有文獻指出AMPK可藉由磷酸化ACC蛋白質而使ACC失活，而達到抑制Lipogenesis效果。另外與脂質生合成有關的三個基因(DGAT、aP2和LPL)(圖4-8)，DGAT主要存在脂質油滴中負責脂質生合成的酵素，而aP2是專一表現於脂肪細胞負責細胞質中運輸脂肪酸之蛋白質，BMSO均無顯著影響；相對的，BMSO組的LPL有低於HFS與LF組趨勢，且HFSC_L有最低值。LPL是由成熟的脂肪細胞所分泌負責脂肪組織lipogenesis之酵素(22)，LPL與FAS的降低一致肯定苦瓜籽油可能有抑制脂質生合成的潛力。另外我們也測定與生熱作用有關的UCP2，發現在苦瓜籽油組有較高的趨勢。綜合苦瓜籽油在脂肪組織抑制lipogenesis與促進生熱，我們大膽推測其機制可能與促進AMPK pathway與Leptin signaling有關。

另外在實驗一的設計裡我們原是想利用不同品種苦瓜籽油其所含的CLN含量不同，對於功能成份是否CLN獲得一些訊息，但此部分並不成功。雖然我們有此二品種小量萃得CLN定量數據(來自本實驗室林毓舜學長)，但動物實驗所用為不同批之大量萃物，可惜實驗一所用苦瓜籽油之CLN測定失敗及樣品用罄，已無法確知CLN含量是否有如預期之高低差距。如果利用當初小量萃之CLN定量數據，推測實驗一飼料中的CLN含量約佔飼料重3~8%，實驗一結果顯示不論高低CLN品系之苦瓜籽油都有降體脂的潛力。

得知苦瓜籽油有降體脂的成效後，接著設計實驗二探討苦瓜籽油所需劑量及可能降體脂的機制。由於實驗二BMSO需求量大，指定品系獲取不易，因此我們在實驗二是使用混合不同品系的苦瓜籽去萃取BMSO，並定量出其中

BMSO 的 CLN 含量為總脂肪酸的 50%左右。基於實驗一結果，我們在實驗二決定不預先誘發肥胖，直接比較不同比例大豆油混合 BMSO(30:0, 25:5, 20:10, 15:15)高脂飲食長期餵食效果，其中 BMSO 給予劑量分別為 0、5、10 和 15%，換算飼料中 CLN 的含量分別為 0、2.5、5 和 7.5%。相較於實驗一，本實驗 BMSO 劑量下拉，為了使降體重體脂效果呈現，因此拉長給予時間至 11 週。有研究指出高脂飲食誘發小鼠肥胖於給予 12 週時脂肪組織量及脂肪細胞大小達到最大，之後細胞開始死亡，12-16 週時脂肪組織積極進行 re-modeling，死掉細胞被新生 size 小之細胞取代(64)。為避開脂肪組織自我修護之 re-modeling 機制干擾我們的實驗觀察，因此實驗二設計在高脂飲食處理 12 週之內結束。

實驗二中支持 BMSO 降體脂的證據有體重、Lee index、白色脂肪量、脂肪細胞大小與脂肪組織 Leptin mRNA 等，BMSO 三種劑量均有效，且隨劑量增加降低更明顯。如上述以血清 Leptin 濃度作為體脂堆積量指標，實驗二在餵食 11 週檢測血清 Leptin 卻只看到 H 組顯著低於 HS 組，L 和 M 組與 HS 無差異(圖 4-13)，此結果與其它體脂堆積相關指標明顯不符。不過我們在餵食試驗飲食 4 週時也曾經檢測血清 Leptin，結果呈現 HS>L=M>H(圖 4-13)，表示體脂堆積的差異在 4 週時即出現，至於 11 週血清 Leptin 濃度為何沒有符合體脂變化之結果，原因並不清楚，可能與此批血樣 Leptin 濃度過高有關。

從實驗一及實驗二的降體脂成效看來，BMSO 的作用是具有 time-and dose-dependent manner，就實驗二所用的最低劑量 5%可見成效來估計人體建議補充量，由於成人一天攝取食物乾重約 500 g，估計此動物實驗劑量相當於一個習慣高油飲食的人每日油脂攝取當中的 25 克(5 tea spoon)油脂由苦瓜籽油替代。但由於兩次動物實驗的背景飲食均為極端高油的 30%高油飲食(相當於膳食油脂佔熱量來源約 60%)，在比較合乎人體建議的膳食油脂攝取量下(膳食油脂佔熱量來源 30%以下)，也許更低劑量 BMSO 即可見成效，但這需要實驗實際驗證。

實驗二再次肯定 BMSO 的降體脂功效，且效果更加顯著。雖然美中不足處是實驗二的 BMSO 組攝食量偏低，但我們仍有信心 BMSO 具特殊功效。在補充中與高劑量 BMSO 的 M 和 H 組攝食量與 HS 相比分別減少約 6 和 13%(表 4-5)，但白色脂肪的量與 HS 相比卻大幅減少了 42 和 73%(表 4-6)，而且低劑量 BMSO 的 L 組攝食量與 HS 無差異，但白色脂肪量與 HS 相比也明顯減少 38%。此外在 H 組發現脂肪組織發炎與凋亡證據，這並不是攝食量降低所能夠解釋的。如前述，在實驗一 BMSO 飲食介入初期攝食量的確有降低，但小鼠很快適應並恢復如它組，顯示此食慾降低應是飼料適口性(palatability)問題；但實驗二長期餵食食慾卻一直沒有恢復，因此我們猜測補充 BMSO 可能增加 leptin sensitivity，leptin 有降低食慾功效，因此抑制了高脂飲食常見的暴食 (hyperphagia)現象——此暴食現象可見於實驗一高脂組熱量攝取高於低脂對照組(表 4-1)。至於實驗一的 BMSO 補充組為何沒有觀察到 leptin sensitivity 提高的抑制食慾作用，可能是預先的高脂飲食誘發肥胖處理已造成這群小鼠 leptin resistance。有關於此，我們已預留小鼠下視丘組織，日後可分析調節食慾相關基因(AgRP、NPY、POMC 等)表現以驗證我們的推測(166)。

已知 Leptin 主要表現在脂肪組織，釋放至血液經由循環作用在下視丘的 Neuropeptide containing regions，藉著增加 Leptin signaling 來降低食物攝取、增加能量消耗和增加生熱作用，因此促進體重減少(157)，此外 Leptin 也藉由 Autocrine 或 Paracrine 作用於脂肪組織，促進脂肪酸化與生熱來防止脂肪細胞進一步肥大。當 Leptin 與 Leptin receptor 結合會活化 Jaks2，Jaks2 除了會自體磷酸化也會活化 receptor，被磷酸化的 receptor 會結合至轉錄因子 STAT，並增加 β -oxidation、uncoupling proteins 和調控食物攝取的基因表現(163)。為了解 BMSO 的降體脂功能是否真與促進 leptin sensitivity 有關，在實驗二我們測定脂肪組織可代表 Leptin sensitivity 的 STAT3 磷酸化(圖 4-18)，結果發現 L 和 M 組 p-STAT3 有顯著的增加 (vs. HS, $P < 0.03$)。Wang 等人 (172)曾利用 aP2-Leptin receptor 基因轉殖來增加小鼠脂肪組織的 Leptin sensitivity，證明即使在高油的飲食(60% fat)下基因轉殖鼠的脂肪細胞 hypertrophy 和 hyperplasia 均被抑制而不易肥胖，伴隨 STAT3 和 AMPK 活化(磷酸化增加)，脂肪組織中脂質氧化酶

素和生熱作用蛋白質(如 PGC-1 α 、UCP1 和 UCP2)的 mRNA 表現增加，也藉由 UCP 表現提高而增加基因轉殖鼠的體溫。在實驗二我們測定脂肪組織的 PGC-1 α 和 UCP2 的 mRNA 表現及小鼠的肛溫(圖 4-24 及圖 4-20)，PGC-1 α 在四組間無顯著差異，而 UCP2 只在 H 組有些微的上升(vs. HS)，另將小鼠暴露在 4°C 下觀察其體溫變化，則看到在低溫刺激一小時下，M 和 H 組的肛溫顯著高於 HS 組 ($P < 0.0001$)，L 組與 HS 組無差異，顯示中高劑量的 BMSO 可能增加生熱作用。雖然上述變化在不同劑量 BMSO 處理下欠缺一致的劑量反應關係，但也透漏出 BMSO 的降體脂功用多少與促進脂肪組織 Leptin sensitivity 與增加生熱有關。

Tan 等人 (125) 發現苦瓜中的 triterpenoids 成分，可藉由活化 AMPK 降血糖並增加脂肪酸氧化，而我們在實驗一的結果也發現，給予苦瓜籽油的老鼠其脂肪組織有類似活化 AMPK 的效果 (lipogenesis 降低，thermogenesis 增加)，且 AMPK 近來被認為可做為治療代謝疾病包括肥胖和的二型糖尿病的目標藥物潛力，所以在實驗二我們也測定副睪脂中的 AMPK 是否有活化(圖 4-18)。結果看來苦瓜籽油只有在 L 組有些微活化 AMPK 的效果，但沒有達顯著差異 ($P = 0.0654$, vs. HS)，但在 p-ACC (inactive ACC) 卻可看到苦瓜籽油組明顯增加(圖 4-18)，合併實驗一看到的 FAS mRNA 減少(圖 4-7)，表示苦瓜籽油在脂肪組織可抑制 ACC 活性而降低脂質生合成。由於 PKA 也參與 ACC 磷酸化，所以我們另測定 PKA 活性，結果可見 L 組顯著增加 PKA 的磷酸化，顯示低劑量苦瓜籽油可藉由活化 PKA 磷酸化 ACC 而抑制脂質生合成。不過我們目前仍不排除 BMSO 活化 AMPK 可能，或高劑量 BMSO 在初始也是藉由活化這些磷酸激酶開啟降體脂功效，我們長期給食 11 週後才檢測這些磷酸激酶，可能錯過觀察時間點；Ricardo 等人 (173) 在研究 Atorvastatin 藥物降血脂功能時也發現動物實驗長期補充此藥物並未看到 p-AMPK 增加，只看到 p-PKA 與 p-ACC 增加，但細胞實驗卻可檢測到此藥物增加 p-AMPK 證據。因此有關 BMSO 是否活化 AMPK 或 PKA，將來可藉助細胞實驗澄清。

不論 AMPK 或 PKA 活化亦可活化 Leptin signaling，共同啟動下游反應(增加生熱和脂肪酸 β 氧化，抑制脂質合成)，此外 PKA 的活化也與兒茶酚胺

(Catecholamine)活化 β -adrenergic receptor 進而增加 cAMP 的濃度而活化 PKA 有關, Catecholamine 透過 PKA 刺激脂解作用是藉由磷酸化 HSL 和 perilipin(174, 175), 使 perilipin 離開脂肪油滴表面, 供活化的 HSL 順利進行脂解, 因此在實驗二我們測定脂肪組織 β 3-AR 和 perilipin 的 mRNA 表現(圖 4-23), 結果發現 β 3-AR 的表現隨 BMSO 劑量而增加, 在 H 組最高, 而 perilipin 則是隨 BMSO 劑量而降低, 在 H 組最低, 此結果暗示 BMSO 降體脂功效也與促進脂肪組織脂解有關。四組當中高劑量苦瓜籽油組的脂解作用應是最大的, 但 perilipin 的減少已很難說是降體脂的因或果了。

因為觀察到上述脂肪組織中的變化, 因此我們也觀察肝臟 PKA、ACC 和 AMPK 蛋白質磷酸化情形(圖 4-19), 看是否也會受到苦瓜籽油的影響。已知 PKA 和 AMPK 不只磷酸化 ACC, 在細胞質也會磷酸化 ChREBP, 使 ChREBP 無法進入核內, 減少與 DNA 結合機會, 降低醣解與脂質生合成基因轉錄, 進而降低脂肪肝與肥胖的狀況產生(38, 176)。在 Ricardo 等人.(173)研究降血脂藥物 Atorvastatin 也證明可藉由活化 PKA 或 AMPK 而減少肝臟中的 ChREBP 的 DNA 結合能力, 而達到降血脂及降肝脂的功效。我們在肝臟免疫染色結果發現與脂肪組織類似: 低劑量苦瓜籽油可顯著活化 PKA($P < 0.03$), 些微活化 AMPK ($P = 0.4308$); 在肝臟 TG 的測定也看到三組 BMSO 組其肝臟 TG 含量與 HS 相比皆隨劑量顯著降低, 而肝臟 FAS mRNA levels 也顯示 BMSO 組顯著低於 HS 組低, 尤其是 L 與 M 組最低。以上結果顯示 BMSO 在肝臟也可藉由活化 PKA 抑制 lipogenesis, 達到降肝脂的功效。

有關肝脂的降低也可能透過另一途徑--PPAR α 活化, 苦瓜全果 EA 萃中曾鑑定出 PPAR α 活化物是 *c9,t11, t13-CLN* (107), 此脂肪酸添加在 H4IIEC3 肝細胞株可促進 PPAR α 下游基因 acyl-CoA oxidase (ACO)活性。Chan 等人首次指出苦瓜汁抑制高脂飲食誘發大鼠肥胖是透過增加 UCP 和 PGC-1 α 表現(二者也受 PPAR α 调控), 可以增加生熱作用來達到抗體脂堆積作用(177)。為探討 BMSO 降肝脂或體脂功能是否也與 PPAR α 活化有關, 我們測定肝臟中 ACO 和 PGC-1 α mRNA levels (二者為 PPAR α target genes)(圖 4-25)。結果發現 ACO 的表現在

苦瓜籽油組均低於 HS 組，但有隨 BMSO 劑量增加而增加，在 H 組與 HS 組相比無顯著差異；而 PGC-1 α 在四組中均無顯著差異，顯示苦瓜籽油在肝臟並沒有特別活化 PPAR α 。肝臟 ACO 酵素活性測定結果也與 ACO mRNA levels 一致(如圖 5-1)，隨著 BMSO 劑量增高 ACO 活性增加，但是與 HS 相比仍是無顯著差異。已知 PUFA 本身為 PPAR α activators，我們的結果顯示 BMSO 活化 PPAR α 效果並沒有優於大豆油，但可看到隨著 BMSO 劑量的增加其 ACO 酵素活性及 mRNA 表現增加，顯示 BMSO 活化 PPAR α 的能力不如大豆油好，但不能否認 BMSO 有活化 PPAR α 的能力。倒是補充 BMSO 中的 H 組雖然抑制 lipogenesis 效果(p-PKA、p-ACC、FAS mRNA)沒有優於 L 或 M 組，卻有最低的肝脂堆積，這可能是 H 組相較於 L 或 M 組同時有較高的 FA oxidation。



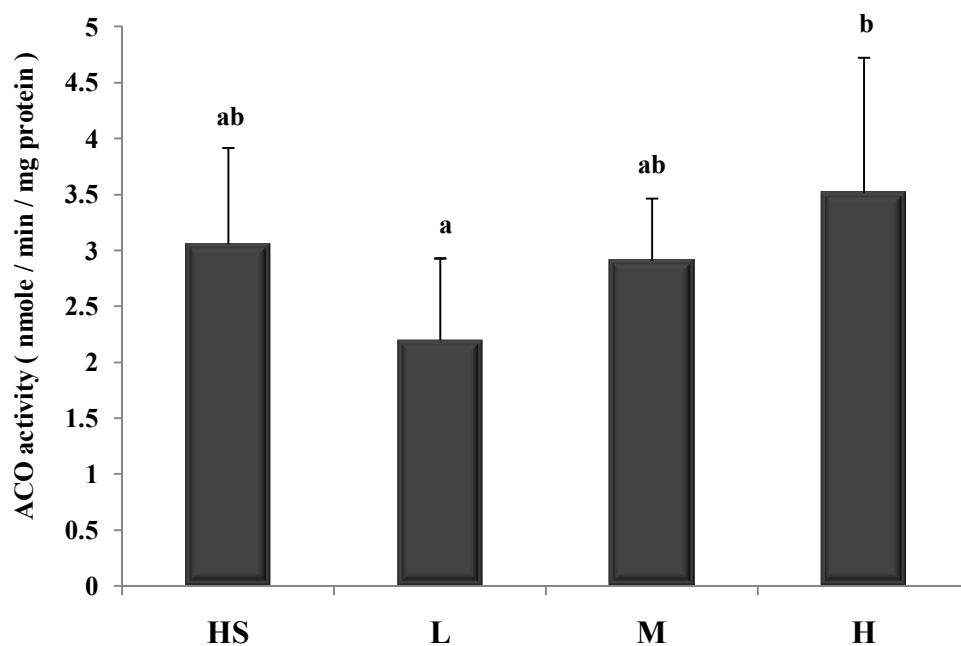


圖 5-1 C57BL/6J 小鼠餵食試驗飲食 11 週之肝臟 ACO 酵素活性

Figure 5-1 The Acyl-CoA oxidase activity in liver of C57BL/6J mice fed the experimental diets for 11 wk. The values are the means \pm S.D. ($n=9\sim 10$). The significance of differences among the four groups (HS, L, M, and H) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letters are significantly different among groups ($p < 0.05$).

(感謝謝政憲與莊舒涵測定)

實驗二最意外的發現是在體脂降低最顯著的 H 組脂肪組織切片發現有 crown-like structure (CLS) 的現象，同時此組脂肪組織有最高的 TNF- α 含量，顯示 H 組的脂肪組織有發炎反應(圖 4-21)，並且巨噬細胞浸潤(adipose tissue macrophage; ATM)現象，另外 TUNEL assay 也證明 H 組有脂肪細胞凋亡(圖 4-22)。一般而言 CLS、脂肪組織發炎與脂肪細胞凋亡是被預期發生於肥胖的脂肪組織，搜索文獻可發現大量有關肥胖和脂肪組織發炎、巨噬細胞浸潤相關研究(69)，發炎的脂肪組織釋出大量發炎因子被公認與造成肥胖者胰島素阻抗有重要關聯(66)，然而本實驗卻在最瘦的 H 組發現脂肪組織有明顯發炎現象，而此組的血糖和胰島素並沒有顯示任何胰島素阻抗徵象。在進一步搜尋文獻後發現 lipodystrophy 的 AIDS 病人脂肪組織也被報導有大量 ATM 與發炎因子表現(67)。動物已建立的 Lipodystrophy model --aP2-nSREBP-1c 基因轉殖鼠(68)也證實脂肪組織出現 CLS 與 ATM，並伴隨大量發炎因子表現(69)，表示脂肪組織的發炎或死亡不僅是發生於過度肥胖，體脂萎縮(lipodystrophy)者也會發生，這可能是脂肪組織重新整塑或自我修復的一種機制。特別的是肥胖者脂肪組織 ATM 基因表現與表型與 Lipodystrophy 者截然不同，前者會造成胰島素阻抗，但 Herrero 等人 證明 Lipodystrophy 脂肪組織的發炎/細胞凋亡，也與全身胰島素阻抗無關(69)。

基於此，我們好奇苦瓜籽油在高劑量下對小鼠似乎造成與已知的 CLA-induced lipodystrophy 類似，那麼補充 CLA 在小鼠是否也會造成脂肪組織 CLS 與 ATM 呢？果然曾有報導每日管餵含 *t*-10, *c*-12 CLA 的 TG (約 0.016 g *t*-10, *c*-12 CLA) 從 d3 或 d7 就可見到小鼠脂肪組織 IL-6、TNF α 、MCP-1 增加(但不影響血清量)，脂肪組織亦可見 CLS 及 ATM (76)。細胞實驗證實脂肪細胞投予 *t*-10, *c*-12 CLA 會經由活化 NF κ B-dependent pathway，促進發炎因子 IL-6 和 IL8 分泌(93, 178)；在 *in vivo* (76, 89) 及 *in vitro* (93, 94, 101) 實驗皆證實給予 *t*-10, *c*-12 CLA 會造成脂肪細胞凋亡。CLA 是一群來自亞麻油酸之立體異構物，降體脂功效卓越—尤其在小鼠，而 *t*-10, *c*-12 CLA isomer 被鑑定為主要的降體脂功能成分，自然界主要的 *c*-9, *t*-11 CLA isomer 功能主要在抗癌，體內體外實驗均排除其降體脂之可能，例如 Ahn 等人 (179) 給予 3T3-L1 細胞 *t*-10, *c*-12 CLA、

c-9, *t*-11 CLA 及 linoleic acid (LA)，發現 *t*-10, *c*-12 CLA 可能藉由調控發炎因子 (如 TNF- α) 而降低脂質堆積，但在 *c*-9, *t*-11 CLA 及 LA 其脂質堆積無顯著差異。相對於 CLA, *c*9, *t*11, *t*13-CLN 降體脂潛能從未被研究。在 Tsuzuki 等人 (112, 113) 的研究發現給予大鼠 1% 的 *c*9, *t*11, *t*13-CLN 4 週，在大鼠的肝臟和血液均可檢測到 *c*-9, *t*-11 CLA，但沒有 *t*-10, *c*-12 CLA 或 *c*9, *t*11, *t*13-CLN 被偵測到，這群作者進一步發現 *c*-9, *t*-11 CLA 是經由組織中 Δ 13- saturase 作用於 *c*9, *t*11, *t*13-CLN 轉變來的。目前我們正在分析肝臟組織脂肪酸組成，期望能夠回答 H 組的脂肪細胞凋亡是否與大劑量攝取 *c*9, *t*11, *t*13-CLN 在體內生成 *t*-10, *c*-12 CLA 之可能性有關，又或者 *c*9, *t*11, *t*13-CLN 本身或代謝成其它脂肪酸有如此效應。

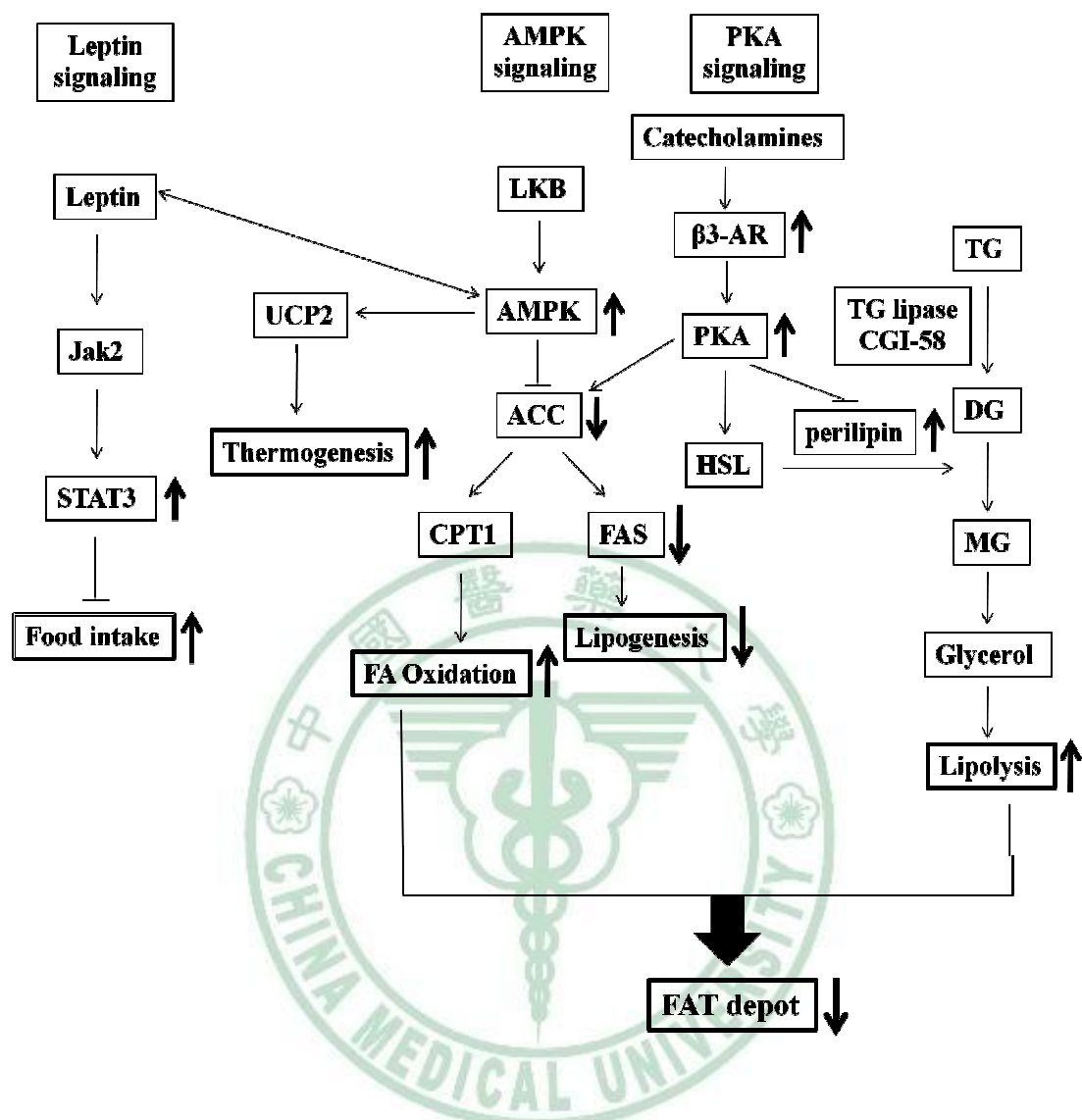
在發現長期高劑量 BMSO 補充會造成小鼠脂肪組織細胞凋亡後，我們將實驗一的脂肪組織切片再次取出觀察，但發現大量的 CLS 只出現於長期補充之脂肪組織，小劑量或短期補充之脂肪組織都沒有大量 CLS 情形。

在許多的研究發現，雖然 *t*-10, *c*-12 CLA 降體脂功能顯著，但和其他 lipodystrophy 模式一樣有胰島素抵抗和脂肪異位堆積 (如脂肪肝) 的副作用，已知 lipodystrophy 的基因轉殖鼠與 CLA-induced lipodystrophic and diabetes mice 在注射 Leptin 或 adiponectin 後胰島素抗性消失，顯示是因為極度的缺少脂肪組織分泌上述 adipokines 而造成胰島素抵抗 (68)。另外在 Strissel 等人 (64) 的研究發現，給予 lipodystrophy 的小鼠植入正常脂肪組織，就不會有胰島素抵抗的現象 (雖然自體脂肪組織的發炎還存在)，因此我們推測高劑量的苦瓜籽油長期使用在小鼠雖然有類似 CLA 誘導的脂肪組織萎縮發生，但可能殘存的脂肪 (HS 組的 27% 量) 仍足以分泌足夠 Leptin 與 adiponectin，所以 H 組並沒有胰島素抵抗和脂肪肝的發生，甚至血糖 (見後敘)、肝脂有降低效果。

BMSO 對血糖及血清胰島素影響方面，綜合二批實驗結果來看，雖然實驗一並沒有顯示 BMSO 在已誘發高血糖的代謝症候群小鼠有改善血糖功效 (圖 4-4 及 4-5)，但在實驗二 BMSO 與大豆油相比有助於降血糖，或許是長時間給予才顯示出功效 (圖 4-16)。實驗一短期給予苦瓜籽油無法改善奶油飲食已誘發的高胰

島素血症，實驗二長期給予苦瓜籽油與 HS 相比血清胰島素無顯著差異，總之苦瓜籽油的給予應不會惡化胰島素阻抗，而且以實驗二數據看來，BMSO 組與 HS 組有相當的血清胰島素卻有較低的血糖，也許暗示了有較好的胰島素敏感性。而通常血液中有高的 NEFA 濃度被歸咎是造成胰島素阻抗原因之一，且前述結果推測 BMSO 脂肪組織有較高的 lipolysis，擔心可能造成血清 NEFA 增加，不過測定禁食血清 NEFA 結果看來(表 4-4&4-7)，四組皆無顯著差異，再次支持 BMSO 沒有惡化胰島素敏感性之顧慮。而在血脂質方面，實驗一可看到 BMSO 與大豆油皆能降低血清 TG(表 4-4)，但 BMSO 功效並沒有優於大豆油。而實驗二也再次顯示 11 週的給食 BMSO 與大豆油對於血清 TG 並無差異，但在餵食試驗飲食 4 週曾看到，隨著苦瓜籽油的劑量增加(表 4-7)，血清 TG 有低於大豆油組的效果，由於本實驗設計並非探測血脂適當模式，因此 BMSO 對血脂質影響不宜下定論，但仍可肯定 BMSO 使用安全性。

綜合以上結果可知，補充苦瓜籽油，對於血糖、胰島素敏感性、NEFA 及血清 TG 並不會有惡化效果，另外血清 Aspartate aminotransferase (GOT)濃度做肝功能之評估(表 4-7)，顯示 BMSO 補充並沒有肝毒性。低劑量長期補充可藉由活化 PKA(和 AMPK)改善代謝，抑制體脂堆積；高劑量 BMSO 長期補充雖看到類似 *t-10,c-12* CLA-induced lipodystrophy，但相較於 CLA 有胰島素阻抗副作用——不只發生於鼠類，人體實驗也曾被報導，補充 BMSO 很可能是比 CLA 補充更具安全又有效的方法。不過 BMSO 的功能成份究竟是否可歸功於 *c9,t11,t13-CLN* 或其它脂溶性三萜類還是未知，未來將朝此努力。



由以上兩個實驗可知，BMSO 可藉由 AMPK、PKA 及 STAT3 路徑共同啟動下游路徑，推測進而增加 Leptin sensitivity、FA oxidation 及 lipolysis，並減少 lipogenesis 作用，進而減少體脂堆積。

第六章 結論

本研究目的在探討苦瓜籽油對降體脂之功效，所得重要結果歸納如下：

- (一) 就本論文使用兩種模式--預先誘發肥胖與不預先誘發肥胖，苦瓜籽油與一般日常食用大豆油相比，不但可有效緩減奶油飲食已誘發之肥胖，也可預防因高脂飲食(30% fat)所誘發之肥胖。
- (二) 在高脂(30% fat)飲食條件下，苦瓜籽油的降體脂功能在高劑量短期補充(15% BMSO, 4 wk)或低劑量長期補充(5% BMSO, 11 週)均可見，且降體脂效果隨著 BMSO 劑量增加(5, 10, 15% BMSO)效果更明顯。降體脂證據包括體重減少、腹部體脂(副睪脂和腹膜後脂肪)堆積減少，並且有效抑制脂肪細胞肥大及脂肪組織 Leptin levels。
- (三) 長期補充低劑量苦瓜籽油在脂肪組織及肝臟皆可看到 PKA 活化，並增加下游 ACC 的磷酸化(使 ACC 失活)，加上 FAS mRNA 降低，顯示 BMSO 可抑制 Lipogenesis 作用而達到降體脂及肝脂的效果。此外隨 BMSO 劑量增加，脂肪組織 β 3-adrenergic receptor 與 perilipin mRNA 分別有增加及降低傾向，暗示脂肪組織脂解增加。
- (四) 長期補充低與中劑量苦瓜籽油在脂肪組織可見 STAT3 磷酸化增加，表示促進 Leptin sensitivity，推測 BMSO 也可能藉由改善 Leptin sensitivity 而抑制食慾、促進生熱，達到降體脂功能。
- (五) 長期補充高劑量苦瓜籽油在脂肪組織可見脂肪組織發炎及脂肪細胞凋亡現象，有如 *t10*, *c12*-CLA 所誘發的 lipodystrophy，但無胰島素阻抗及脂肪肝發生。推測高劑量 CLN 本身或代謝成類似 *t10*, *c12*-CLA 物可導致脂肪細胞死亡。

本研究首度肯定 BMSO 確實有降體脂功能，在 30%高油飲食下其中 5%以 BMSO 取代大豆油可見成效。其降體脂功能在低劑量長期使用下與活化 PKA / AMPK / STAT3 有關，因此抑制脂質合成、促進脂肪組織脂解，或者是經由增加 Leptin sensitivity，抑制小鼠食慾增加生熱；高劑量長期使用則會造成脂肪細胞死亡。以上可作為開發 BMSO 作為降體脂功能保健食品之基礎。



第七章 參考文獻

1. Chen Q, Chan LL, Li ET (2003) Bitter melon (*Momordica charantia*) reduces adiposity, lowers serum insulin and normalizes glucose tolerance in rats fed a high fat diet. *J Nutr* 133:1088-1093.
2. Huang HL, Hong YW, Wong YH, Chen YN, Chyuan JH, Huang CJ, Chao PM (2008) Bitter melon (*Momordica charantia* L.) inhibits adipocyte hypertrophy and down regulates lipogenic gene expression in adipose tissue of diet-induced obese rats. *Br J Nutr* 99:230-239.
3. Lai TW, Chou YC, Su HM, Chyuan JH, Chao PM. *Cis-9, trans-11, trans-13-conjugated linolenic acid induces apoptosis of preadipocytes and sustained ERK activation of 3T3-L1. Obesity*
4. Lin YC, Yen LL, Chen SY, Kao MD, Tzeng MS, Huang PC, Pan WH (2003) Prevalence of overweight and obesity and its associated factors: findings from National Nutrition and Health Survey in Taiwan, 1993-1996. *Prev Med* 37:233-241.
5. Pan WH, Lee MS, Chuang SY, Lin YC, Fu ML (2008) Obesity pandemic, correlated factors and guidelines to define, screen and manage obesity in Taiwan. *Obes Rev* 9 (Suppl. 1): 22-31.
6. Huang K, Lin W, Lee L, Chen C, Lo H, Hsia H, Liu I, Shau W, Lin R (2002) Four anthropometric indices and cardiovascular risk factors in Taiwan. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26:1060-1068.
7. Chien L, Liou Y, Chen J (2004) Association between indices of obesity and fasting hyperglycemia in Taiwan. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28:690-696.
8. Chie W, Li C, Huang C, Chang K, Lin R (1998) Body size as a factor in different ages and breast cancer risk in Taiwan. *Anticancer Res* 18:565-570.
9. Hsiao T, Chen J, Wang J (2004) Insulin resistance and ferritin as major determinants of nonalcoholic fatty liver disease in apparently healthy obese patients. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28:167-172.
10. <http://www.doh.gov.tw>.
11. Murase T, Nagasawa A, Suzuki J, Wakisaka T, Hase T, Tokimitsu I (2002) Dietary {alpha}-Linolenic Acid-Rich Diacylglycerols Reduce Body Weight Gain Accompanying the Stimulation of Intestinal {beta}-Oxidation and Related Gene Expressions in C57BL/KsJ-db/db Mice. *J Nutr* 132:3018-3022.
12. St-Onge MP, Jones P (2003) Greater rise in fat oxidation with medium-chain triglyceride consumption relative to long-chain triglyceride is associated with lower initial body weight and greater loss of subcutaneous adipose tissue. *Int J Obes (Lond)* 27:1565-1571.
13. Geloan A, Roy PE, Bukowiecki LJ (1989) Regression of white adipose tissue in diabetic rats. *Am J Physiol* 257:E547-553.
14. Farmer SR (2006) Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab* 4:263-273.
15. Cornelius P, MacDougald OA, Lane MD (1994) Regulation of adipocyte development. *Annu Rev Nutr* 14:99-129.

16. Burdi AR, Poissonnet CM, Garn SM, Lavelle M, Sabet MD, Bridges P (1985) Adipose tissue growth patterns during human gestation: a histometric comparison of buccal and gluteal fat depots. *Int J Obes* 9:247-256.
17. Ailhaud G, Grimaldi P, Negrel R (1992) Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr* 12:207-233.
18. Villena JA, Kim KH, Sul HS (2002) Pref-1 and ADSF/Resistin: Two Secreted Factors Inhibiting Adipose Tissue Development. *Horm Metab Res* 34:664-670.
19. Loftus TM, Lane MD (1997) Modulating the transcriptional control of adipogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 7:603-608.
20. Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J (1998) Transcriptional control of adipogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 10:165-173.
21. JB K, BM S (1996) ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev* 10:1096-1107.
22. Ntambi JM, Young-Cheul K (2000) Adipocyte Differentiation and Gene Expression. *J Nutr* 130:3122S-3126S.
23. Tontonoz P, Graves RA, Budavari AI, Erdjument-Bromage H, Lui M, Hu E, Tempst P, Spiegelman BM (1994) Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR γ and RXR α . *Nucl Acids Res* 22:5628-5634.
24. Barak Y, Nelson M, Ong E, Jones Y, Ruiz-Lozano P, Chien K, Koder A, Evans R (1999) PPAR γ is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 4:585-595.
25. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM (1999) PPAR γ Is Required for the Differentiation of Adipose Tissue In Vivo and In Vitro. *Mol Cell* 4:611-617.
26. Brasaemle DL (2007) Thematic review series: Adipocyte Biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res* 48:2547-2559.
27. Gubern A, Casas J, Barcelo-Torns M, Barneda D, de la Rosa X, Masgrau R, Picatoste F, Balsinde J, Balboa MA, Claro E (2008) Group IVA Phospholipase A $_2$ Is Necessary for the Biogenesis of Lipid Droplets. *J Biol Chem* 283:27369-27382.
28. Gubern A, Barcelo-Torns M, Casas J, Barneda D, Masgrau R, Picatoste F, Balsinde J, Balboa MA, Claro E (2009) Lipid Droplet Biogenesis Induced by Stress Involves Triacylglycerol Synthesis That Depends on Group VIA Phospholipase A $_2$. *J Biol Chem* 284:5697-5708.
29. Guo Y, Cordes KR, Farese RV, Jr., Walther TC (2009) Lipid droplets at a glance. *J Cell Sci* 122:749-752.
30. Yu W, Bozza PT, Tzizik DM, Gray JP, Cassara J, Dvorak AM, Weller PF (1998) Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A $_2$ at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies. *Am J Pathol* 152:759-769.
31. Cohen AW, Razani B, Schubert W, Williams TM, Wang XB, Iyengar P, Brasaemle DL, Scherer PE, Lisanti MP (2004) Role of Caveolin-1 in the Modulation of Lipolysis and Lipid Droplet Formation. *Diabetes* 53:1261-1270.

32. Walther TC, Farese Jr RV (2009) The life of lipid droplets. *Biochim Biophys Acta* 1791:459-466.
33. McDevitt RM, Bott SJ, Harding M, Coward WA, Bluck LJ, Prentice AM (2001) De novo lipogenesis during controlled overfeeding with sucrose or glucose in lean and obese women. *Am J Clin Nutr* 74:737-746.
34. Sebokova E, Klimes I (1997) Molecular and cellular determinants of triglyceride availability. *Ann NY Acad Sci* 827:200-214.
35. Zechner R, Strauss J, Frank S, Wagner E, Hofmann W, Kratky D, Hiden M, Levak-Frank S (2000) The role of lipoprotein lipase in adipose tissue development and metabolism. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 Suppl 4:S53-S56.
36. Hirata K-i, Dichek HL, Cioffi JA, Choi SY, Leeper NJ, Quintana L, Kronmal GS, Cooper AD, Quertermous T (1999) Cloning of a Unique Lipase from Endothelial Cells Extends the Lipase Gene Family. *J Biol Chem* 274:14170-14175.
37. Stoeckman AK, Towle HC (2002) The Role of SREBP-1c in Nutritional Regulation of Lipogenic Enzyme Gene Expression. *J Biol Chem* 277:27029-27035.
38. Uyeda K, Yamashita H, Kawaguchi T (2002) Carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP): a key regulator of glucose metabolism and fat storage. *Biochem Pharmacol* 63:2075-2080.
39. Sekiya M, Yahagi N, Matsuzaka T, Takeuchi Y, Nakagawa Y, Takahashi H, Okazaki H, Iizuka Y, Ohashi K. (2007) SREBP-1-independent regulation of lipogenic gene expression in adipocytes. *J Lipid Res* 48:1581-1591.
40. Juvet LK, Andresen SM, Schuster GU, Dalen KT, Tobin KAR, Hollung K, Haugen F, Jacinto S, Ulven SM. (2003) On the Role of Liver X Receptors in Lipid Accumulation in Adipocytes. *Mol Endocrinol* 17:172-182.
41. Darimont C, Avanti O, Zbinden I, Leone-Vautravers P, Mansourian R, Giusti V, Mac K (2006) Liver X receptor preferentially activates de novo lipogenesis in human preadipocytes. *Biochimie* 88:309-318.
42. Ahmadian M, Duncan RE, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS (2007) Triacylglycerol metabolism in adipose tissue. *Future Lipidol* 2:229-237.
43. Ahmadian M, Duncan RE, Varady KA, Frasson D, Hellerstein MK, Birkenfeld AL, Samuel VT, Shulman GI (2009) Adipose Overexpression of Desnutrin Promotes Fatty Acid Use and Attenuates Diet-Induced Obesity. *Diabetes* 58:855-866.
44. Jaworski K, Ahmadian M, Duncan RE, Sarkadi-Nagy E, Varady KA, Hellerstein MK, Lee H-Y, Samuel VT, Shulman GI (2009) AdPLA ablation increases lipolysis and prevents obesity induced by high-fat feeding or leptin deficiency. *Nat Med* 15:159-168.
45. Saha PK, Kojima H, Martinez-Botas J, Sunehag AL, Chan L (2004) Metabolic Adaptations in the Absence of Perilipin: INCREASED β -OXIDATION AND DECREASED HEPATIC GLUCOSE PRODUCTION ASSOCIATED WITH PERIPHERAL INSULIN RESISTANCE BUT NORMAL GLUCOSE TOLERANCE IN PERILIPIN-NUL MICE. *J Biol Chem* 279:35150-35158.
46. Tansey JT, Sztalryd C, Gruia-Gray J, Roush DL, Zee JV, Gavrilova O, Reitman ML, Deng CX, Li C (2001) Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S*

- A 98:6494-6499.
47. **Montero-Moran G, Caviglia JM, McMahon D, Rothenberg A, Subramanian V, Xu Z, Lara-Gonzalez S, Storch J, Carman GM, Brasaemle DL (2009) CGI-58/ABHD5 is a coenzyme A-dependent lysophosphatidic acid acyltransferase. *J Lipid Res* 51:709-719.**
 48. **Brasaemle DL, Levin DM, Adler-Wailes DC, Londos C (2000) The lipolytic stimulation of 3T3-L1 adipocytes promotes the translocation of hormone-sensitive lipase to the surfaces of lipid storage droplets. *Biochim Biophys Acta* 1483:251-262.**
 49. **Maria Eugenia Frigolet VV, Nimbe T, Armando RT (2008) White Adipose Tissue as Endocrine Organ and Its Role in Obesity. *Arch Med Res* 39:715-728.**
 50. **Wellen KE, Hotamisligil GS (2003) Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1785-1788.**
 51. **Wellen KE, Hotamisligil GS (2005) Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115:1111-1119.**
 52. **MacDougald OA, Burant CF (2007) The Rapidly Expanding Family of Adipokines. *Cell Metabolism* 6:159-161.**
 53. **Khazen W, M'Bika JP, Tomkiewicz C, Benelli C, Chany C, Achour A, Forest C (2005) Expression of macrophage-selective markers in human and rodent adipocytes. *FEBS Letters* 579:5631-5634.**
 54. **Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS (2003) Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112:1821-1830.**
 55. **Tsatsanis C, Zacharioudaki V, Androulidaki A, Dermitzaki E, Charalampopoulos I, Minas V, Gravanis A, Margioris AN (2005) Adiponectin induces TNF- α and IL-6 in macrophages and promotes tolerance to itself and other pro-inflammatory stimuli. *Biochem Biophys Res Commun* 335:1254-1263.**
 56. **Suganami T, Nishida J, Ogawa Y (2005) A Paracrine Loop Between Adipocytes and Macrophages Aggravates Inflammatory Changes: Role of Free Fatty Acids and Tumor Necrosis Factor {alpha}. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:2062-2068.**
 57. **Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR (2007) Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 117:175-184.**
 58. **Gabriely I, Ma XH, Yang XM, Atzmon G, Rajala MW, Berg AH, Scherer P, Rossetti L, Barzilai N (2002) Removal of Visceral Fat Prevents Insulin Resistance and Glucose Intolerance of Aging: An Adipokine-Mediated Process? *Diabetes* 51:2951-2958.**
 59. **Pitombo C, Araujo EP, De Souza CT, Pareja JC, Geloneze B, Velloso LA (2006) Amelioration of diet-induced diabetes mellitus by removal of visceral fat. *J Endocrinol* 191:699-706.**
 60. **Bashan N, Dorfman K, Tarnovscki T, Harman-Boehm I, Liberty IF, Bluher M, Ovadia S, Maymon-Zilberstein T, Potashnik R (2007) Mitogen-Activated Protein Kinases, Inhibitory- γ Kinase, and Insulin Signaling in Human Omental Versus Subcutaneous Adipose Tissue in Obesity. *Endocrinology* 148:2955-2962.**
 61. **Harman-Boehm I, Bluher M, Redel H, Sion-Vardy N, Ovadia S, Avinoach E, Shai I, Kloting N, Stumvoll M (2007) Macrophage Infiltration into Omental Versus Subcutaneous Fat across Different Populations: Effect of Regional Adiposity and the Comorbidities of**

- Obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 92:2240-2247.
62. Yu R, Kim CS, Kwon BS, Kawada T (2006) Mesenteric Adipose Tissue-Derived Monocyte Chemoattractant Protein-1 Plays a Crucial Role in Adipose Tissue Macrophage Migration and Activation in Obese Mice[ast]. *Obesity* 14:1353-1362.
 63. Canello R, Tordjman J, Poitou C, Guilhem G, Bouillot JL, Hugol D, Coussieu C, Basdevant A, Hen AB (2006) Increased Infiltration of Macrophages in Omental Adipose Tissue Is Associated With Marked Hepatic Lesions in Morbid Human Obesity. *Diabetes* 55:1554-1561.
 64. Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield JW, DeFuria J, Jick Z, Greenberg AS, Obin MS (2007) Adipocyte Death, Adipose Tissue Remodeling, and Obesity Complications. *Diabetes* 56:2910-2918.
 65. Faust IM, Johnson PR, Stern JS, Hirsch J (1978) Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 235:E279-286.
 66. Alkhourri N, Gornicka A, Berk MP, Thapaliya S, Dixon LJ, Kashyap S, Schauer PR, Feldstein AE (2010) Adipocyte Apoptosis, a Link between Obesity, Insulin Resistance, and Hepatic Steatosis. *J Biol Chem* 285:3428-3438.
 67. Sievers M, Walker UA, Sevastianova K, Setzer B, Wagsater D, Eriksson P, Yki-Jrvinen H, Sutinen J (2009) Gene Expression and Immunohistochemistry in Adipose Tissue of HIV Type 1-Infected Patients with Nucleoside Analogue Reverse-Transcriptase Inhibitor-Associated Lipoatrophy. *J Infect Dis* 200:252-262.
 68. Shimomura I, Hammer RE, Richardson JA, Ikemoto S, Bashmakov Y, Goldstein JL, Brown MS (1998) Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy. *Genes Dev* 12:3182-3194.
 69. Herrero L, Shapiro H, Nayer A, Lee J, Shoelson SE (2010) Inflammation and adipose tissue macrophages in lipodystrophic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:240-245.
 70. Shimomura I, Hammer RE, Ikemoto S, Brown MS, Goldstein JL (1999) Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature* 401:73-76.
 71. Park Y, Albright K, Liu W, Storkson J, Cook M, Pariza M (1997) Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids* 32:853-858.
 72. Sisk MB, Hausman DB, Martin RJ, Azain MJ (2001) Dietary Conjugated Linoleic Acid Reduces Adiposity in Lean but Not Obese Zucker Rats. *J Nutr* 131:1668-1674.
 73. Clement L, Poirier H, Niot I, Bocher V, Guerre-Millo M, Krief S, Staels B, Besnard P (2002) Dietary trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse. *J Lipid Res* 43:1400-1409.
 74. Meadus WJ, MacInnis R, Dugan ME (2002) Prolonged dietary treatment with conjugated linoleic acid stimulates porcine muscle peroxisome proliferator activated receptor gamma and glutamine-fructose aminotransferase gene expression in vivo. *J Mol Endocrinol* 28:79-86.
 75. Masao Y, Atsushi I, Mariko O, Yoko T, Akira H, Masaaki K, Toshio I, Hirofumi T, Koji Y (2003) Modulation of body fat and serum leptin levels by dietary conjugated linoleic acid in Sprague-Dawley rats fed various fat-level diets. *Nutrition* 19:30-35.

76. Poirier H, Shapiro JS, Kim RJ, Lazar MA (2006) Nutritional Supplementation With trans-10, cis-12 Conjugated Linoleic Acid Induces Inflammation of White Adipose Tissue. *Diabetes* 55:1634-1641.
77. Poirier H, Rouault C, Clement L, Niot I, Monnot M, Guerre-Millo M (2005) Hyperinsulinaemia triggered by dietary conjugated linoleic acid is associated with a decrease in leptin and adiponectin plasma levels and pancreatic beta cell hyperplasia in the mouse. *Diabetologia* 48:1059-1065.
78. Wendel AA, Purushotham A, Liu LF, Belury MA (2008) Conjugated linoleic acid fails to worsen insulin resistance but induces hepatic steatosis in the presence of leptin in ob/ob mice. *J Lipid Res* 49:98-106.
79. House RL, Cassady JP, Eisen EJ, Eling TE, Collins JB, Grissom SF, Odle J (2005) Functional genomic characterization of delipidation elicited by trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid (t10c12-CLA) in a polygenic obese line of mice. *Physiol Genomics* 21:351-361.
80. Miner J, Cederberg C, Nielsen M, Chen X, Baile C (2001) Conjugated linoleic acid (CLA), body fat, and apoptosis. *Obes Res* 9:129-134.
81. West DB, Blohm FY, Truett AA, DeLany JP (2000) Conjugated Linoleic Acid Persistently Increases Total Energy Expenditure in AKR/J Mice without Increasing Uncoupling Protein Gene Expression. *J Nutr* 130:2471-2477.
82. Terpstra AHM, Beynen AC, Everts H, Kocsis S, Katan MB, Zock PL (2002) The Decrease in Body Fat in Mice Fed Conjugated Linoleic Acid Is Due to Increases in Energy Expenditure and Energy Loss in the Excreta. *J Nutr* 132:940-945.
83. Terpstra AHM, Javadi M, Beynen AC, Kocsis S, Lankhorst AE, Lemmens AG, Mohede ICM (2003) Dietary Conjugated Linoleic Acids as Free Fatty Acids and Triacylglycerols Similarly Affect Body Composition and Energy Balance in Mice. *J Nutr* 133:3181-3186.
84. Ohnuki K, Haramizu S, Oki K, Ishihara K, Fushiki T (2001) A single oral administration of conjugated linoleic acid enhanced energy metabolism in mice. *Lipids* 36:583-587.
85. Nagao K, Wang YM, Inoue N, Seo-Youn H, Buang Y, Noda T, Kouda N, Okamatsu H, Yanagita T (2003) The 10trans, 12cis isomer of conjugated linoleic acid promotes energy metabolism in OLETF rats. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)* 19:652-656.
86. Takahashi Y, Kushiro M, Shinohara K, Ide T (2002) Dietary conjugated linoleic acid reduces body fat mass and affects gene expression of proteins regulating energy metabolism in mice. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 133:395-404.
87. Ealey K, El-Sohemy A, Archer M (2002) Effects of dietary conjugated linoleic acid on the expression of uncoupling proteins in mice and rats. *Lipids* 37:853-861.
88. Kang K, Miyazaki M, Ntambi JM, Pariza MW (2004) Evidence that the anti-obesity effect of conjugated linoleic acid is independent of effects on stearoyl-CoA desaturase1 expression and enzyme activity. *Biochem Biophys Res Commun* 315:532-537.
89. LaRosa PC, Miner J, Xia Y, Zhou Y, Kachman S, Fromm ME (2006) Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid causes inflammation and delipidation of white adipose tissue in mice: a microarray and histological analysis. *Physiol Genomics* 27:282-294.
90. Martin J, Grégoire S, Siess M, Genty M, Chardigny J, Berdeaux O (2000) Effects of conjugated linoleic acid isomers on lipid-metabolizing enzymes in male rats. *Lipids* 35:91-98.

91. Tsuboyama-Kasaoka N, Takahashi M, Tanemura K, Kim HJ, Tange T, Okuyama H, Kasai M, Ikemoto S, Ezaki O (2000) Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes* 49:1534-1542.
92. Miller JR, Siripurkpong P, Hawes J, Majdalawieh A, Ro H-S, McLeod RS (2008) The trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid decreases adiponectin assembly by PPAR{gamma}-dependent and PPAR{gamma}-independent mechanisms. *J Lipid Res* 49:550-562.
93. Kennedy A, Chung S, LaPoint K, Fabiyi O, McIntosh MK (2008) Trans-10, Cis-12 Conjugated Linoleic Acid Antagonizes Ligand-Dependent PPAR{gamma} Activity in Primary Cultures of Human Adipocytes. *J Nutr* 138:455-461.
94. Brown JM, Boysen MS, Chung S, Fabiyi O, Morrison RF, Mandrup S, McIntosh MK (2004) Conjugated Linoleic Acid Induces Human Adipocyte Delipidation: AUTOCRINE/PARACRINE REGULATION OF MEK/ERK SIGNALING BY ADIPOCYTOKINES. *J Biol Chem* 279:26735-26747.
95. Brown JM, Boysen MS, Jensen SS, Morrison RF, Storkson J, Lea-Currie R, Pariza M, Mandrup S, McIntosh MK (2003) Isomer-specific regulation of metabolism and PPAR{gamma} signaling by CLA in human preadipocytes. *J Lipid Res* 44:1287-1300.
96. Evans M, Lin X, Odle J, McIntosh M (2002) Trans-10, Cis-12 Conjugated Linoleic Acid Increases Fatty Acid Oxidation in 3T3-L1 Preadipocytes. *J Nutr* 132:450-455.
97. Nielsen R, Pedersen Ts, Hagenbeek D, Moulos P, Siersbk R, Megens E, Denissov S, Brgesen M, Francoijs KJ (2008) Genome-wide profiling of PPARgamma:RXR and RNA polymerase II occupancy reveals temporal activation of distinct metabolic pathways and changes in RXR dimer composition during adipogenesis. *Genes Dev* 22:2953-2967.
98. Chung S, Brown JM, Sandberg MB, McIntosh M (2005) Trans-10,cis-12 CLA increases adipocyte lipolysis and alters lipid droplet-associated proteins: role of mTOR and ERK signaling. *J Lipid Res* 46:885-895.
99. Liu LF, Purushotham A, Wendel AA, Belury MA (2007) Combined effects of rosiglitazone and conjugated linoleic acid on adiposity, insulin sensitivity, and hepatic steatosis in high-fat-fed mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292:G1671-1682.
100. Moon HS, Lee HG, Seo JH, Chung CS, Kim TG, Kim IY, Lim KW, Seo SJ, Choi YJ, Cho CS (2006) Down-regulation of PPARγ2-induced adipogenesis by PEGylated conjugated linoleic acid as the pro-drug: Attenuation of lipid accumulation and reduction of apoptosis. *Arch Biochem Biophys* 456:19-29.
101. Chung S, Brown JM, Provo JN, Hopkins R, McIntosh MK (2005) Conjugated Linoleic Acid Promotes Human Adipocyte Insulin Resistance through NFγB-dependent Cytokine Production. *J Biol Chem* 280:38445-38456.
102. Bhattacharya A, Banu J, Rahman M, Causey J, Fernandes G (2006) Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *J Nutr Biochem* 17:789-810.
103. Liao CH, Shaw H-M, Chao PM (2008) 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.
104. Riserus U, Arner P, Brismar K, Vessby B (2002) Treatment With Dietary trans10cis12 Conjugated Linoleic Acid Causes Isomer-Specific Insulin Resistance in Obese Men With the Metabolic Syndrome. *Diabetes Care* 25:1516-1521.

105. Noguchi R, Yasui Y, Suzuki R, Hosokawa M, Fukunaga K, Miyashita K (2001) Dietary Effects of Bitter Gourd Oil on Blood and Liver Lipids of Rats. *Arch Biochem Biophys* 396:207-212.
106. Dhar P, Ghosh S, Bhattacharyya D (1999) Dietary effects of conjugated octadecatrienoic fatty acid (9 cis, 11 trans, 13 trans) levels on blood lipids and nonenzymatic in vitro lipid peroxidation in rats. *Lipids* 34:109-114.
107. Chuang C, Hsu C, Chao C, Wein Y, Kuo Y, Huang C (2006) Fractionation and identification of 9c, 11t, 13t-conjugated linolenic acid as an activator of PPARalpha in bitter melon (*Momordica charantia* L.). *J Biomed Sci* 13:763-772.
108. Kohno H, Suzuki R, Noguchi R, Hosokawa M, Miyashita K, Tanaka T (2002) Dietary conjugated linolenic acid inhibits azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Jpn J Cancer Res* 93:133-142.
109. Kohno H, Yasui Y, Suzuki R, Hosokawa M, Miyashita K, Tanaka T (2004) Dietary seed oil rich in conjugated linolenic acid from bitter melon inhibits azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis through elevation of colonic PPARgamma expression and alteration of lipid composition. *Int J Cancer* 110:896-901.
110. Yasui Y, Hosokawa M, Sahara T, Suzuki R, Ohgiya S, Kohno H, Tanaka T, Miyashita K (2005) Bitter melon seed fatty acid rich in 9c,11t,13t-conjugated linolenic acid induces apoptosis and up-regulates the GADD45, p53 and PPAR[gamma] in human colon cancer Caco-2 cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73:113-119.
111. Yasui Y, Hosokawa M, Kohno H, Tanaka T, Miyashita K (2006) Troglitazone and 9cis,11trans,13trans-conjugated linolenic acid: comparison of their antiproliferative and apoptosis-inducing effects on different colon cancer cell lines *Chemotherapy* 52:220-225.
112. Tsuzuki T, Kawakami Y (2008) Tumor angiogenesis suppression by {alpha}-eleostearic acid, a linolenic acid isomer with a conjugated triene system, via peroxisome proliferator-activated receptor {gamma}. *Carcinogenesis* 29:797-806.
113. Tsuzuki T, Tokuyama Y, Igarashi M, Miyazawa T (2004) Tumor growth suppression by α -eleostearic acid, a linolenic acid isomer with a conjugated triene system, via lipid peroxidation. *Carcinogenesis* 25:1417-1425.
114. Koba K, Akahoshi A, Yamasaki M, Tanaka K, Yamada K, Iwata T, Kamegai T, Tsutsumi K, Sugano M (2002) Dietary conjugated linolenic acid in relation to CLA differently modifies body fat mass and serum and liver lipid levels in rats. *Lipids* 37:343-350.
115. Nishimura K, Tsumagari H, Morioka A, Yamauchi Y, Miyashita K, Lu S, Jisaka M, Nagaya T, Yokota K (2002) Regulation of apoptosis through arachidonate cascade in mammalian cells. *Appl Biochem Biotechnol* 102-103: 239-250.
116. Prusty D, Park B, Davis K, Farmer S (2002) Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and C/EBPalpha gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem* 277:46226-46232.
117. Bost F, Aouadi M, Caron L, Even P, Belmonte N, Prot M, Dani C, Hofman P, Pages G (2005) The extracellular signal-regulated kinase isoform ERK1 is specifically required for in vitro and in vivo adipogenesis. *Diabetes* 54:402-411.
118. Mora JFd, Porras A, Ahn N, Santos E (1997) Mitogen-activated protein kinase activation is not necessary for, but antagonizes, 3T3-L1 adipocytic differentiation. *Mol Cell Biol* 17:6068-6075.

119. Floyd Z, Stephens J (2002) Interferon-gamma-mediated activation and ubiquitin-proteasome-dependent degradation of PPARgamma in adipocytes. *J Biol Chem* 277:4062-4068.
120. Arao K, Yotsumoto H, Han S, Nagao K, Yanagita T (2004) The 9cis,11trans,13cis isomer of conjugated linolenic acid reduces apolipoprotein B100 secretion and triacylglycerol synthesis in HepG2 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 68:2643-2645.
121. Koba K, Imamura J, Akashoshi A, Kohno-Murase J, Nishizono S, Iwabuchi M, Tanaka K, Sugano M (2007) Genetically modified rapeseed oil containing cis-9,trans-11,cis-13-octadecatrienoic acid affects body fat mass and lipid metabolism in mice. *J Agric Food Chem* 55:3741-3748.
122. Takagi T, Itabashi Y (1981) Occurrence of mixtures of geometrical isomers of conjugated octadecatrienoic acids in some seed oils: Analysis by open-tubular gas liquid chromatography and high performance liquid chromatography. *Lipids* 16:546-551.
123. Tsuzuki T, Tokuyama Y, Igarashi M, Nakagawa K, Ohsaki Y, Komai M, Miyazawa T (2004) Alpha-eleostearic acid (9Z11E13E-18:3) is quickly converted to conjugated linoleic acid (9Z11E-18:2) in rats. *J Nutr* 134:2634-2639.
124. Tsuzuki T, Kawakami Y, Abe R, Nakagawa K, Koba K, Imamura J, Iwata T, Ikeda I, Miyazawa T (2006) Conjugated linolenic acid is slowly absorbed in rat intestine, but quickly converted to conjugated linoleic acid. *J Nutr* 136:2153-2159.
125. Tan M, Ye J, Turner N, Hohnen-Behrens C, Ke C, Tang C, Chen T, Weiss H, Gesing E (2008) Antidiabetic activities of triterpenoids isolated from bitter melon associated with activation of the AMPK pathway. *Chem Biol* 15:263-273.
126. Cheng H, Huang H, Chang C, Tsai C, Chou C (2008) A cell-based screening identifies compounds from the stem of *Momordica charantia* that overcome insulin resistance and activate AMP-activated protein kinase. *J Agric Food Chem* 56:6835-6843.
127. Hardie D (2004) The AMP-activated protein kinase pathway: new players upstream and downstream. *J Cell Sci* 117:5479-5487.
128. Carling D (2004) The AMP-activated protein kinase cascade: a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci* 29:18-24.
129. Kemp BE (2003) AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. *Biochem Soc Trans* 31:162-168.
130. Kahn B, Alquier T, Carling D, Hardie D (2005) AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 1:15-25.
131. Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, Ross L, Bain J, Edelman AM, Frenguelli BG, Hardie DG (2005) Calmodulin-dependent protein kinase kinase- β is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metabolism* 2:9-19.
132. Birnbaum M (2005) Activating AMP-activated protein kinase without AMP. *Mol Cell* 19:289-290.
133. Long YC, Zierath JR (2006) AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest* 116:1776-1783.
134. Gaidhu MP, Fediuc S, Ceddia RB (2006) 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside-induced AMP-activated Protein Kinase Phosphorylation Inhibits Basal and Insulin-stimulated Glucose Uptake, Lipid

- Synthesis, and Fatty Acid Oxidation in Isolated Rat Adipocytes. *J Biol Chem* 281:25956-25964.
135. Gaidhu MP, Fediuc S, Anthony NM, So M, Mirpourian M, Perry RLS, Ceddia RB (2009) Prolonged AICAR-induced AMP-kinase activation promotes energy dissipation in white adipocytes: novel mechanisms integrating HSL and ATGL. *J Lipid Res* 50:704-715.
 136. Harinantenaina L, Tanaka M, Takaoka S, Oda M, Mogami O, Uchida M, Asakawa Y (2006) Momordica charantia constituents and antidiabetic screening of the isolated major compounds. *Chem Pharm Bull* 54:1017-1021.
 137. Fatope M, Takeda Y, Yamashita H, Okabe H, Yamauchi T (1990) New cucurbitane triterpenoids from Momordica charantia. *J Nat Prod* 53:1491-1497.
 138. Sutherland E, Rall T (1985) Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J Biol Chem* 232:1077-1091.
 139. Walsh D, Perkins J, Krebs E (1968) An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem* 243:3763-3765.
 140. Manning G, Whyte D, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298:1912-1934.
 141. Kirschner LS, Yin Z, Jones GN, Mahoney E (2009) Mouse models of altered protein kinase A signaling. *Endocr Relat Cancer* 16:773-793.
 142. Cummings D, Brandon E, Planas J, Motamed K, Idzerda R, McKnight G (1996) Genetically lean mice result from targeted disruption of the RII[β] subunit of protein kinase A. *Nature* 382:622-626.
 143. Cannon B, Nedergaard. J (2004) Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84:277-359.
 144. Lise M, Karsten K (2010) The importance of dietary modulation of cAMP and insulin signaling in adipose tissue and the development of obesity. *Ann NY Acad Sci* 1190:1-14.
 145. Bianchi A, Evans J, Iverson A, Nordlund A, Watts T, Witters L (1990) Identification of an isozymic form of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem* 265:1502-1509.
 146. Iverson A, Bianchi A, Nordlund A, Witters L. Immunological analysis of acetyl-CoA carboxylase mass, tissue distribution and subunit composition. *Biochem J* 1990:365-71
 147. Saddik M, Gamble J, Witters L, Lopaschuk G (1993) Acetyl-CoA carboxylase regulation of fatty acid oxidation in the heart. *J Biol Chem* 268:25836-25845.
 148. Thampy K (1989) Formation of malonyl coenzyme A in rat heart. Identification and purification of an isozyme of A carboxylase from rat heart. *J Biol Chem* 264:17631-17634.
 149. Barber M, Price N, Travers M (2005) Structure and regulation of acetyl-CoA carboxylase genes of metazoa. *Biochim Biophys Acta* 1733:1-28.
 150. Brownsey R, Boone A, Elliott J, Kulpa J, Lee W (2006) Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soc Trans* 34:223-227.
 151. Hardie D (1989) Regulation of fatty acid synthesis via phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase. *Prog Lipid Res* 28:117-146.
 152. Kim K (1997) Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase. *Annu Rev Nutr* 17:77-99.
 153. Kim K, Lopez-Casillas F, Bai D, Luo X, Pape M (1989) Role of reversible phosphorylation

- of acetyl-CoA carboxylase in long-chain fatty acid synthesis. *FASEB J* 3:2250–2256.
154. Thomson DM, Herway ST, Fillmore N, Kim H, Brown JD, Barrow JR, Winder WW (2008) AMP-activated protein kinase phosphorylates transcription factors of the CREB family. *J Appl Physiol* 104:429-438.
 155. Saggerson D (2008) Malonyl-CoA, a Key Signaling Molecule in Mammalian Cells. *Annu Rev Nutr* 28:253-272.
 156. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432.
 157. Campfield L, Smith F, Guisez Y, Devos R, Burn P (1995) Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269:546-549.
 158. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley R, Lee G, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S (1995) Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1:1155-1161.
 159. Hoggard N, Mercer J, Rayner D, Moar K, Trayhurn P, Williams L (1997) Localization of leptin receptor mRNA splice variants in murine peripheral tissues by RT-PCR and in situ hybridization. *Biochem Biophys Res Commun* 232:383-387.
 160. Lollmann B, Gruninger S, Stricker-Krongrad A, Chiesi M (1997) Detection and quantification of the leptin receptor splice variants Ob-Ra, b, and, e in different mouse tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 238:648-652.
 161. Morioka T, Asilmaz E, Hu J, Dishinger J, Kurpad A, Elias C (2007) Disruption of leptin receptor expression in the pancreas directly affects beta cell growth and function in mice. *J Clin Invest* 117:2860-2868.
 162. Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoffel R, Heim M, Skoda R (1996) Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6231-6235.
 163. Bates S, Myers M (2004) The role of leptin/STAT3 signaling in neuroendocrine function: an integrative perspective. *J Mol Med* 82:12-20.
 164. Bjorbaek C, El-Haschimi K, Frantz J, Flier J (1999) The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *J Biol Chem* 274:30059-30065.
 165. Cheng A, Uetani N, Simoncic P, Chaubey V, Lee-Loy A, McGlade C (2002) Attenuation of leptin action and regulation of obesity by protein tyrosine phosphatase 1B. *Dev Cell* 2:497-503.
 166. Schwartz MW, Porte D, Jr (2005) Diabetes, Obesity, and the Brain. *Science* 307:375-379.
 167. Chen J, Cao Y, Gao H, Yang L, Chen Z-Y (2007) Isomerization of conjugated linolenic acids during methylation. *Chem Phys Lipids* 150:136-142.
 168. Hsu SC, Huang CJ (2006) Reduced Fat Mass in Rats Fed a High Oleic Acid-Rich Safflower Oil Diet Is Associated with Changes in Expression of Hepatic PPAR{alpha} and Adipose SREBP-1c-Regulated Genes. *J Nutr* 136:1779-1785.
 169. Folch J, Lees M, Stanley GHS (1957) A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES. *J Biol Chem* 226:497-509.
 170. Lee MO (1928) Determination of the surface area of the white rat with its application to the

- expression of metabolic results. *Am J Physiol* 89:24-33.
171. Nikonova L, Koza R, Mendoza T, Chao P, Curley J, Kozak L (2008) Mesoderm-specific transcript is associated with fat mass expansion in response to a positive energy balance. *FASEB J* 22:3925-3937.
 172. Wang MY, Orci L, Ravazzola M, Unger RH (2005) Fat storage in adipocytes requires inactivation of leptin's paracrine activity: Implications for treatment of human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:18011-18016.
 173. Ricardo RC, Emma B, Lucia S, Teresa C, Rosa MS, Manuel M, Xavier P, Juan CL, Manuel VC (2009) Atorvastatin prevents carbohydrate response element binding protein activation in the fructose-fed rat by activating protein kinase A. *Hepatology* 49:106-115.
 174. Sztalryd C, Xu G, Dorward H, Tansey J, Contreras J, Kimmel A, Londos C. Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *J Cell Biol* 161:1093-1103.
 175. Lass A, Zimmermann R, Haemmerle G, Riederer M, Schoiswohl G, Schweiger M, Kienesberger P, Strauss J, Gorkiewicz G, Zechner R (2008) Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metabolism* 3:309-319.
 176. Uyeda K, Repa JJ (2006) Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metabolism* 4:107-110.
 177. Chan LLY, Chen Q, Go AGG, Lam EKY, Li ETS (2005) Reduced Adiposity in Bitter Melon (*Momordica charantia*)-Fed Rats Is Associated with Increased Lipid Oxidative Enzyme Activities and Uncoupling Protein Expression. *J Nutr* 135:2517-2523.
 178. Petruschke T, Hauner H (1993) Tumor necrosis factor- α prevents the differentiation of human adipocyte precursor cells and causes delipidation of newly developed fat cells. *J Clin Endocrinol Metab* 76:742-747.
 179. Ahn IS, Choi BH, Ha J-H, Byun JM, Shin HG, Park KY, Do MS (2006) Isomer-Specific Effect of Conjugated Linoleic Acid on Inflammatory Adipokines Associated with Fat Accumulation in 3T3-L1 Adipocytes. *J Med Food* 9:307-12.