

中國醫藥大學營養學系碩士班

碩士論文

**Histidine 和 Carnosine 對攝取高飽和油脂飲食老
鼠的影響**

**Effects of Histidine and Carnosine on mice with
High Saturated Fat Diet**

研究生： 施穎 Ying Shih

指導教授： 殷梅津 教授 Mei-chin Yin, Ph.D.

中華民國 99 年 6 月 22 日

謝誌

研究所兩年的日子，原來一晃眼也就結束了。想當初還在猶豫該不該唸研究所，該不該念哪間學校時，原來也一晃眼都結束了。

這兩年的時光裡，最感謝的就是我的指導教授殷梅津博士，在剛進來什麼都不懂時，老師會告訴我該注意的方向；在對未來很徬徨無助之際，老師會幫我分析情勢；在研究所玩過頭時，老師又會再把我罵回來。老師真的就像我研究所裡面的媽媽一樣，帶著我們經歷了好多事情，訓練我們自己解決事情的能力，真的真的非常感謝老師。

感謝中山醫的徐成金老師，每次犧牲時都麻煩您來操刀，徐老師親切的言談和豪爽的作風真的十分深植人心。感謝靜宜大學的詹恭巨老師，您辛苦的幫我批改論文並給予我許多建議，讓我對於實驗的方向有更多不同的想法。

中國醫的所有老師和實驗夥伴們，陪我在實驗遇到困難時一起想解決的辦法，特別謝謝我的導師蔡佳文老師，總是會找出時間和我們聊聊天，聚在一起吃飯，分享我們許多過去的經驗，真的覺得好幸運可以有蔡老師當我們的導師！魚丸、虹君、武雄、伊婷、艾琳、小葉、盈禎、家媛、孟菽、盈詩、前毅、文耀、小咩、momo，研究所能感情這麼好、玩得這麼瘋狂的大概就只有我們中國醫營養所這班啦！

當然還有我們殷家最棒的團隊，感謝文虎學長、泓道學長和筱菁學姊帶我們做實驗，當初應該也給你們添了不少麻煩；感謝我的實驗夥伴阿甘，好險有你一起陪我渡過好多的難關，一起分享交流不同的經驗與想法，沒有你的話我想這兩年會過的很不一樣，謝謝你；感謝我的學妹欣珮，你真的是最棒的學妹，你的貼心和善良都非常討人喜歡，祝你未來一帆風順；感謝中山醫的學姊、殷家的萬能小助理育儒，你和小白我真的都超感激的，特別是育儒，無論是實驗上的難題或生活中瑣碎的煩惱，在我遇到困難時都會以樂觀開朗的笑容幫助我。感謝中山醫的所有人，智弘學長、杏如、美環、大頭、烏梅，有了你們的幫忙，每次犧牲都非常順利，特別感謝杏如和美環，我會非常想念我們的吃飯聚會的！另外要謝謝中國醫下一屆的妹妹們，特別是阿攀、林芳芳、小毓軒，每次聽到你們在喊我姐姐，關心我給我打氣時，都覺得好窩心，你們真是一群小天使。

最後，最感謝我的家人，因為有你們給我無條件的支持，讓我一步一步向前探索未來的方向，沒有後顧之憂。施家人萬歲！

雖然現在對於要踏出哪一步，走哪個方向，還是一點頭緒都沒有，但我相信只要踏出去了，腳印會帶領著腳印，夢想會跟隨著夢想，朝屬於自己的未來前進。大家一起加油！

施穎 謹致於
中國醫藥大學營養系研究所
中華民國九十九年七月十九號

目錄

	頁次
摘要.....	I
Abstract.....	II
第一章 前言.....	1
第二章 文獻探討.....	2
一、 組織胺酸 (Histidine ; His)	2
二、 肌肽 (L-Carnosine)	3
三、 本實驗室過去 Histidine 和 Carnosine 相關研究.....	5
四、 飽合脂肪飲食 (Saturated Fat Diet)	7
五、 奶油 (Butter)	10
六、 體內抗氧化系統.....	12
七、 免疫反應.....	13
第三章 材料方法.....	14
一、 實驗材料.....	14
二、 實驗方法.....	16
三、 分析方法.....	17
四、 統計分析.....	29
第四章 結果.....	30
一、 體重變化.....	30
二、 臟器重.....	30
三、 氧化傷害及抗氧化防禦之影響.....	30
四、 發炎前細胞激素濃度之影響.....	31
五、 脂質變化.....	32
第五章 討論.....	49
一、 Histidine 和 Carnosine 的氧化發炎防禦.....	50
二、 Histidine 和 Carnosine 減少脂質堆積.....	52
第六章 結論.....	54
第七章 參考文獻.....	55

圖目錄

	頁次
【圖 2.1】 Histidine 結構圖.....	3
【圖 2.2】 Histidine 和 Carnosine 代謝圖	4
【圖 2.3】 Carnosine 結構圖	5
【圖 2.4】 油脂引起發炎反應圖.....	8
【圖 2.5】 飽和脂肪引起白色脂質發炎圖	10
【圖 2.5】 體內抗氧化酵素和活性氧物種作用.....	12
【圖 3.1】 GSH 的循環反應圖.....	19
【圖 3.2】 SOD 的循環反應圖.....	22
【圖 4.1】 餵食八週的體重變化.....	34
【圖 4.2】 不同組別肝臟的 Glutathione (GSH) 含量	36
【圖 4.3】 不同組別肝臟的 Antioxidant 含量	37
【圖 4.4】 不同組別肝臟中的 MDA 含量	38
【圖 4.5】 不同組別肝臟的 Glutathione Peroxidase (GPx) 含量	39
【圖 4.6】 不同組別肝臟的 Superoxidase Dismutase (SOD) 含量.....	40
【圖 4.7】 不同組別肝臟的 Interleukin-6 (IL-6) 含量	41
【圖 4.8】 不同組別心臟的 Interleukin-6 (IL-6) 含量	42
【圖 4.9】 不同組別肝臟的 TNF- α 含量.....	43
【圖 4.10】 不同組別心臟的 TNF- α 含量.....	44
【圖 4.11】 不同組別血清中的 Triglycerol (TG) 含量	45
【圖 4.12】 不同組別心臟的 Triglycerol (TG) 含量	46
【圖 4.13】 不同組別肝臟的 Total Cholesterol (TC) 含量	47
【圖 4.14】 不同組別血清的 LDL 含量	48

表目錄

	頁次
【表 2.1】 食物中飽和脂肪酸的分類、來源	7
【表 2.2】 動物性奶油的基本成分表	11
【表 2.3】 動物性奶油的飽和脂肪酸總量百分比(%).....	11
【表 4.1】 餵食八週的臟器變化情形	35



摘要

Histidine 和其衍生物 carnosine 存在於腦、骨骼肌、肝臟之中，具有抗氧化、抗發炎、幫助神經傳導和緩衝調和等生理活性。奶油主要為短鏈的飽和脂肪酸，過度攝取飽和脂肪會上升體內的血膽固醇、LDL 等，嚴重時會引起肥胖和心血管相關疾病。本實驗主要探討 histidine 及 carnosine 對於攝取飽和飲食老鼠的影響，將 5 週齡 C57BL/6JNarl 小鼠 60 隻，隨機分成四組，分別為 (1)正常飲食 + 一般飲水 (2)飲食含 5%奶油 + 一般飲水 (3)飲食含 5%奶油 + 飲水含 1 g/L histidine (4)飲食含 5%奶油 + 飲水含 1 g/L carnosine。餵食八週後，犧牲並取血清、肝臟和心臟進行氧化傷害、發炎和脂質的分析，測量 GSH 含量、Antioxidant 含量、SOD activity、GPx activity、TG、TC、LDL，和發炎指標：IL-6、TNF- α 。結果顯示：餵食含 5%奶油的飼料後，小鼠的副睪重和肝臟重均顯著上升，血清中 LDL、TC，肝臟 TG 均顯著上升，肝中的 SOD activity、GPx activity 和 GSH、Antioxidant 含量則明顯降低；而發炎相關的細胞激素方面，肝臟和心臟的 IL-6 和 TNF- α 都顯著提高。但是，攝取 1 g/L histidine 或 1 g/L carnosine 飲水之小鼠，其副睪重和肝臟重都顯著減輕；而肝臟 TG 和血清 LDL、TC 明顯降低；肝臟和心臟中 IL-6 和 TNF- α 也都有顯著下降。抗氧化的部份則顯示肝臟中的 SOD 及 GPx activity 和 GSH、Antioxidant 含量都有顯著的升高。實驗結果支持 histidine 或 carnosine 可減緩小鼠脂肪的累積和抗氧化、抑制發炎的效果。

關鍵字：histidine (組胺酸)、carnosine (肌肽)、飽和脂肪、TC (總膽固醇)、LDL (低密度脂蛋白)

Abstract

Histidine and carnosine (beta-alanyl-l-histidine) are endogenously synthesized peptides present in brain, skeletal muscle, and liver. Our present study examined the effects of histidine and carnosine in mice consumed 5% butter. Mice were divided into 4 groups: normal diet with water, butter with water, histidine, or carnosine for 5 weeks. Results indicated that the intake of butter caused an increase in body weight, epididymal fat weight, IL-6, TNF- α , LDL, TG and total cholesterol; and decrease in hepatic GSH level and activity of GPx and SOD. Intake of histidine or carnosine at 1 g/L, however, significantly reduced oxidative stress by increasing the level or activity of GSH, GPx and SOD in liver. Histidine or carnosine also appeared to significantly diminish the formations of IL-6, TNF- α , LDL, TG and total cholesterol. Based on the observed anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-obesity effects, the supplements of these agents might be able to attenuate the risk of obesity.

Key words : histidine 、 carnosine 、 saturated fat 、 TC (Total Cholesterol) 、
LDL (Low Density Lipoprotein)

第一章 前言

奶油 (butter) 的組成為短鏈的飽和脂肪酸，常添加在西點烘焙中，也可直接塗抹於麵包食用。飲食中若過度攝取飽和脂肪易引起血脂上升，進而造成血管堵塞，嚴重甚至可能有中風、動脈粥狀硬化的風險。根據衛生署公佈每日營養素攝取量的基準值，一般人每日攝取脂肪總量不超過 55 公克，飽和脂肪不超過 18 公克，過多的飽和脂肪酸，易堆積在血管壁，引發心血管疾病。自 2008 年 1 月 1 日起，所有市售包裝食品的营养標示都必須加註「飽和脂肪」含量，提醒民眾這兩種脂肪可能增加心血管疾病風險。飽和脂肪的來源以動物性油脂居多，如豬油、乳酪和奶油等，而植物性食物如椰子油、棕櫚油也含有很高量的飽和脂肪酸。

Histidine 為體內之必須胺基酸，由於無法在體內自行合成，需從飲食中攝取，富含於紅肉、鮪魚等。Carnosine 是由 β -alanine 與 L-histidine 所組成的內生性雙胜肽，在脊椎動物的腦、心臟、肝臟和骨骼組織中都可以發現，其中在骨骼肌和腦部之嗅球 (olfactory bulbs) 濃度最高。已有研究指出 histidine 和 carnosine 具有清除自由基、與金屬離子結合等相關抗氧化作用，並可以溶於水中。本實驗室之前已分別對於糖尿病、急性肝損傷和酒精性慢性肝損傷三種不同的模式，探討 histidine 和 carnosine 的功效，並發現 histidine 和 carnosine 對於降低氧化和發炎傷害都有顯著的效果，甚至 carnosine 的抗氧化發炎能力還較 histidine 優秀。至於 histidine 和 carnosine 對於飽和脂肪所引發的氧化發炎傷害，是否有緩和氧化壓力的作用；或是對於飽和脂肪造成血脂、血膽固醇的堆積，是否有清除和減低的作用，都是本實驗可以研究思考的議題。

因此，本實驗的目的主要為探討 histidine 和 carnosine 對於攝取 5% 奶油飲食的小鼠是否具保護作用，並觀察分析肝臟、心臟和血清的氧化發炎指標、與體內脂質含量，進一步討論未來 histidine 和 carnosine 對於預防肥胖相關疾病的可能性與開發空間。

第二章 文獻探討

一、組織胺酸 (Histidine ; His)

Histidine 為一種必須胺基酸(Vissek, 1984)，由於在體內無法自行合成或合成量不足，故須從飲食中攝取獲得，富含於紅肉和魚類中(Kasaoka et al., 2004)，在血漿中正常含量約 4~20 mg/L 或 26~130 μ M。

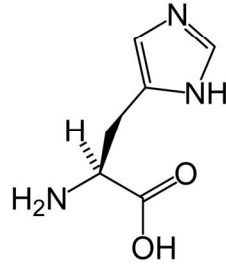
有人體實驗指出，若飲食中缺乏 histidine 的攝取，體內會逐漸產生負氮平衡、血清白蛋白減少、鐵離子上升和血容比(hematocrit)下降(Kopple and Swendseid, 1975)等情形。缺乏 histidine 會影響胃酸分泌(Nakamura et al., 2004)、骨關節疼痛，血清中 histidine 濃度較低時有可能伴隨類風濕性關節炎的病症，關節炎的患者攝取 histidine 可幫助病情的改善(Gerber and Gerber, 1977)。

許多文獻中證實，histidine 具抗氧化的能力(Cai et al., 1995; Yan et al., 2009)。由於 histidine 本身的結構中有 imidazole ring，【圖 2.1】此結構可以利用高度的還原力和金屬離子結合，扮演提供電子的角色，與自由基反應穩定結構，進而抑制過氧化物的產生，並中止連鎖反應 (chain reaction) (Boldyrev and Severin, 1990; Kohen et al., 1988)。

當氧化壓力增加時，會造成一些細胞激素如 IL-6 和 TNF- α 的不平衡，導致免疫系統失調。有動物研究證實，histidine 藉由抑制 IL-6 和 TNF- α 之 mRNA 量，能有效的抑制這些前細胞激素的產生，並具劑量依存性 (dose-dependent) 的效果(Liu et al., 2008)。小腸上皮細胞實驗也指出，histidine 可減緩由 TNF- α 和 H₂O₂所引發的 IL-8 發炎反應(Son et al., 2005)。

在減少體內脂質堆積方面，2001 年 Masaki 等人指出，histidine 代謝成 histamine 後，可藉由向上調控 UCP (uncoupling protein) 的 mRNA 表現量來減少脂質的堆積(Masaki et al., 2001)。2003 年 Fulop 等人也證實當抑制小鼠體內的 histidine decarboxylase (HDC) 時，由於減少產生 histidine 的代謝物 histamine，

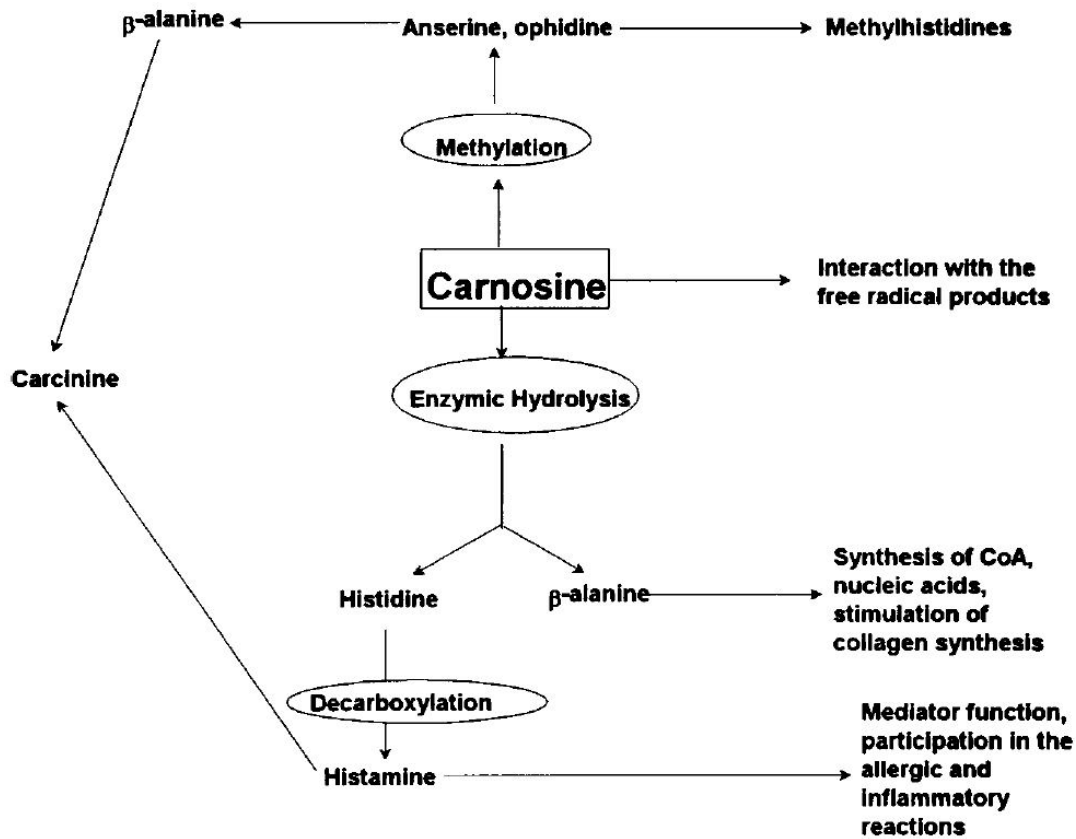
無法調控體內能量的代謝和棕色組織中 UCP-1 mRNA 的表現，導致副睪脂和體重均顯著高於正常組(Fulop et al., 2003)。至於 histidine 是否對飽和短鏈的脂肪酸飲食也能有降低脂質的效用，由於相關的文獻至今仍不多，為本篇研究的重點之一。



【圖 2.1】Histidine 結構圖

二、肌肽 (L-Carnosine)

肌肽 (Carnosine; β -alanyl-L-Histidine) 為內生性雙胺肽，在脊椎動物的腦、心臟、肝臟和骨骼組織中都可以發現，其中在骨骼肌和腦部之嗅球 (olfactory bulbs) 濃度最高(AA and SE.; McFarland and Holliday, 1999)。體內 carnosine 的量取決於飲食中 carnosine 的攝取量，大鼠相關實驗證實，當飲食中 carnosine 和 histidine 的濃度增加時，骨骼肌中 carnosine 的濃度也會上升(Maynard et al., 2001)。carnosine 經酵素性水解後會代謝成 histidine 和 β -alanine。其代謝路徑如下【圖 2.2】(Salah et al., 2000)：



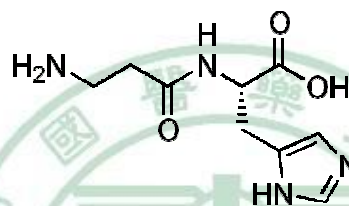
【圖 2.2】Histidine 和 Carnosine 代謝圖

在許多文獻中指出 carnosine 具有抗氧化、增強免疫系統、緩衝調和、和幫助神經傳導的功用，故利用這些特性，可調節許多特殊疾病如：糖尿病、阿茲海默症和冠狀動脈硬化等(Hipkiss, 2007; Ibrahim et al., 2008)。

Carnosine 是一種可溶於水的物質，結構如【圖 2.3】，其抗氧化的能力已被許多文獻證實，指出 carnosine 具螯合金屬離子、抑制單氧及結合過氧化氫(H_2O_2)的能力，並由於其良好的水溶性，可提供細胞質一個抗氧化的環境(Babizhayev et al., 1994; Guiotto et al., 2005; Ukeda, 2002)。

活體內的氧化反應可分為酵素性與非酵素性氧化：酵素性抗氧化防禦系統主要含有 superoxide dismutase(SOD)、catalase 與 glutathione peroxidase (GPx)等，有

文獻證實 carnosine 可抑制酵素性氧化(Kang et al., 2002)，提升 SOD 促使超氧陰離子轉化成 H_2O_2 ，以消除超氧陰離子；而 H_2O_2 會再經由 GPx 還原成水和 O_2 ；另外 GPx 亦會還原脂質過氧化物成為無毒害產物。非酵素性之抗氧化系統主要包括維生素 E (tocopherol)、維生素 C (ascorbic acid)、GSH (glutathione)、 β -胡蘿蔔素 (β -carotene) 等。Carnosine 可幫助提升或維持體內 GSH 的含量，使其經由 GPx 之酵素性反應還原脂質過氧化物或 H_2O_2 而間接抑制自由基之連鎖反應，亦可與自由基反應，使細胞免受到自由基之傷害(Artun et al., 2010)。



【圖 2.3】Carnosine 結構圖

三、本實驗室過去 Histidine 和 Carnosine 相關研究

(一) Histidine and carnosine delay diabetic deterioration in mice and protect human low density lipoprotein against oxidation and glycation. (Lee et al., 2005)

以糖尿病 Balb/cA 的小鼠為動物模式，將 histidine 和 carnosine 分別以 0.5, 1 g/L 的量加入水中餵食，進行四週。結果顯示血漿、心臟和肝臟中 histidine 和 carnosine 的含量均顯著上升，並均能降低血糖、fibronectin、IL-6 和 TNF- α ，但只有 1 g/L 的 histidine 和 carnosine 能有效提升 insulin 的量和 GPx 活性。脂質分析顯示：histidine 和 carnosine 均能降低 TG，並呈現 dose-dependent 的效果，但只有 1 g/L 的 histidine 和 carnosine 可以顯著抑制肝臟和心臟膽固醇脂質的氧化。在 in vitro 方面，histidine 和 carnosine 均能減緩由葡萄糖所誘發的氧化和糖化反應。結論為支持 histidine 和 carnosine 為有潛力治療糖尿病併發症的胺基酸和胜肽。

(二) Beneficial effects of histidine and carnosine on ethanol-induced chronic liver Injury.(Liu et al., 2008)

本實驗以酒精誘發小鼠慢性肝損傷，進行四周後，再將飲水換成0.5, 1或2 g/L的histidine和carnosine，進行三週。結果顯示，histidine和carnosine都可以顯著降低ALT和AST的活性($p < 0.05$)。受酒精誘發的小鼠，肝臟中MDA上升，而GSH、GPx和CYP2E1活性下降。攝取histidine和carnosine三週後，肝臟中MDA生成減少，而GSH、GPx和CYP2E1活性則顯著提升。發炎反應方面，CRP、IL-6和TNF- α 在酒精誘發肝損傷後均顯著升高，而攝取histidine和carnosine三週後CRP、IL-6和TNF- α 的量減少，並呈現dose-dependent。實驗進一步發現，histidine和carnosine可以向下調節IL-6和TNF- α 受酒精誘發而升高的mRNA的表現量。本實驗支持飲食中補充histidine和carnosine，對於慢性酒精性肝損傷具抗氧化和抗發炎的效果。

(三) Protective Effects from Carnosine and Histidine on Acetaminophen-Induced Liver Injury.(Yan et al., 2009)

飲水中以0.5、1或2 g/L的量加入histidine和carnosine餵食四周後，將小鼠分為兩組：一組進行犧牲，另一組以APAP誘發急性肝損傷後24小時犧牲。結果顯示，APAP誘發後，肝臟中GSH、GPx、catalase和SOD活性及維生素C含量減少，MDA、ROS、GSSG則均顯著提升($p < 0.05$)。但有預先攝取histidine和carnosine四周的組別顯示，histidine和carnosine可以藉由增加肝臟的GSH量，和維持GPx、catalase和SOD活性，並減少MDA、ROS、GSSG生成量來減緩APAP所造成的氧化壓力。cytochrome P450 2E1的活性也顯示提升。發炎反應方面，受APAP誘發後IL-6、IL-10、TNF-a和MCP-1都顯著升高，而有先攝取histidine和carnosine的組別這些細胞激素則顯示降低。實驗結果支持histidine和carnosine具保護肝臟的效果。

四、飽合脂肪飲食 (Saturated Fat Diet)

(一)飽和脂肪的特性和來源

飽和脂肪酸內碳均為單鍵結合，多直鏈。飽和脂肪在常溫下是固體的形態，許多常見動物油都有這種特性，如豬油是白色固體，奶油是黃色固體。而植物油大多為不飽和脂肪酸，但也有例外情形：如椰子油和棕櫚油都是飽和油脂，常溫呈現固態。

【表 2.1】食物中飽和脂肪酸的分類、來源

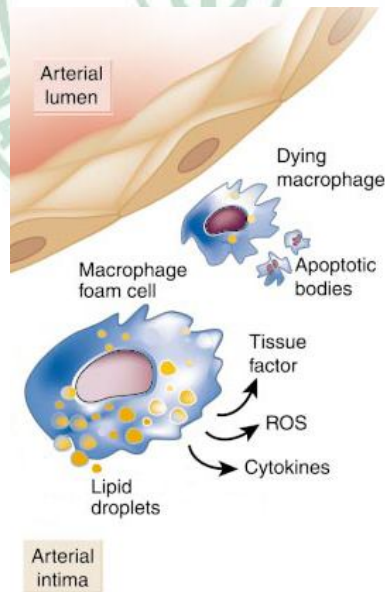
Common Name	Carbon Double		Scientific Name	Sources
	Atoms	Bonds		
Butyric acid	4	0	butanoic acid	butter
Caproic Acid	6	0	hexanoic acid	butter
Caprylic Acid	8	0	octanoic acid	coconut oil、 butter
Capric Acid	10	0	decanoic acid	coconut oil、 butter
Lauric Acid	12	0	dodecanoic acid	coconut oil、 butter
Myristic Acid	14	0	tetradecanoic acid	palm oil、 butter 、kernel oil
Palmitic Acid	16	0	hexadecanoic acid	palm oil
Stearic Acid	18	0	octadecanoic acid	animal fats

(二)飽和脂肪所造成的傷害

飲食中若攝取高量油脂與膽固醇，尤其是飽和脂肪酸，會升高血膽固醇 (Hegsted et al., 1965; Samuelson et al., 2001)。食物中飽和脂肪酸含量對血膽固醇的影響甚於食物中膽固醇含量。而飽和脂肪酸除了存在於動物性食物，如豬油、

牛油、雞油、全脂奶、乳酪、奶油等之外，植物性食物如椰子油、棕櫚油和棕櫚仁油也含有很高量的飽和脂肪酸。

過度攝取飽和脂肪會上升體內的 LDL(Müller et al., 2003; Seo et al., 2005)。當血液中 LDL 過多時，在代謝過程中容易滯留而附著在血管壁並發生氧化，氧化型的 LDL 會刺激內皮細胞分泌黏附因子，吸引 T 細胞和單核球細胞黏沾並侵血管內膜。在血管內膜，單核球活化成為巨噬細胞，產生許多發炎物質如：IL-6 和 TNF- α ，並吞噬大量的氧化型 LDL，形成脂肪堆積的泡細胞(Foam cell)與脂肪塊。動脈血管壁上逐漸產生斑塊硬化，造成動脈粥狀硬化，使得動脈血管管徑變小。損傷的管壁組織釋出的成分會促進血小板凝集，形成凝血塊或血栓，血栓或血塊過大就會阻塞血流，發生於腦血管則是中風；發生於心臟血管則是心肌梗塞的原因之一，心肌因缺氧而壞死。嚴重時更會導致心肌梗塞、中風等冠狀動脈和腦血管疾病的發生。

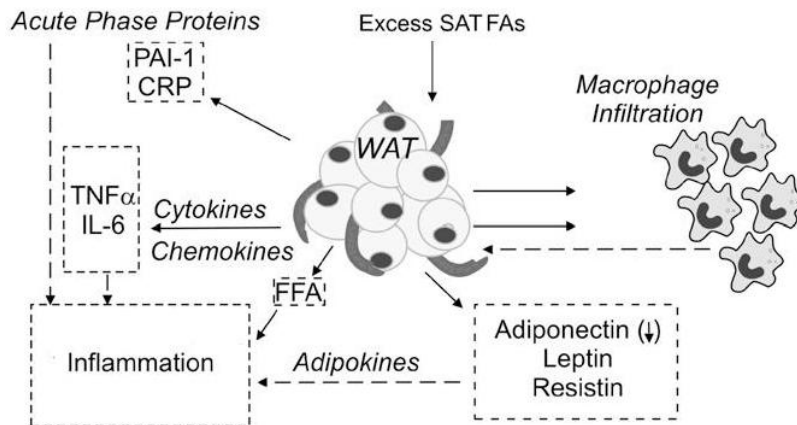


【圖 2.4】油脂引起發炎反應圖

攝取飽和脂肪酸和代謝症候群呈現高度的相關性(Cnop, 2008; Galgani et al., 2008)。人體實驗的文獻指出，飲食中脂肪的攝取若較高，容易使體重上升並有發炎反應(Lundman et al., 2007)。副睪脂屬於白色脂肪(white adipose tissue; WHT)的一種，而飽和脂肪特別容易導致白色脂肪產生發炎反應(Kien et al., 2005)。白色脂肪在體內除了扮演儲存能量的角色之外，還是一個內分泌器官，可分泌物質調節葡萄糖恆定、能量代謝、體重變化和免疫功能(Lago et al., 2007)。

脂肪組織(Adipose tissue)可分為白色脂肪和棕色脂肪，棕色脂肪會受到冷覺和飲食的刺激而產熱，新生兒出生時為了抵禦溫度比母體低的環境，棕色脂肪較成人多，而棕色脂肪會隨著年紀而逐漸消失(Gonzalez-Barroso et al., 2000; Himms-Hagen, 2001)。白色脂肪主要分布在皮下和內臟周圍。皮下脂肪可儲存體內過多的熱量，而內臟脂肪為供應內臟能量的來源之一。皮下脂肪的量為內臟脂肪的三至四倍(Chowdhury et al., 1994)，兩者在體內有互相協調和互補的作用。

脂肪細胞(Adipocyte)是很複雜的細胞。在正常的情況下，脂肪細胞參與脂質合成、儲存和分泌抗發炎的物質，但同時也可以分泌會引起發炎的細胞激素如：MCP-1、TNF- α 和IL-6。人體實驗指出TNF- α 和IL-6都和肥胖相關的胰島素抗性有關，而其中TNF- α 為引起發炎的主要介質之一(Kern et al., 2001)。TNF- α 和IL-6不一樣的地方在IL-6是由脂肪細胞和巨噬細胞所分泌的，而TNF- α 是由脂肪組織中的巨噬細胞所分泌，並扮演旁分泌(paracrine)和自分泌(autocrine)的因子(Mohamed-Ali et al., 1997; Xu et al., 2002)。



【圖 2.5】飽和脂肪引起白色脂質發炎圖

五、奶油 (butter)

奶油是由鮮奶油 (cream) 或牛奶通過攪拌提製的乳製品。奶油可直接作為調味品塗抹在食品上食用，以及在烹飪中使用，例如烘焙、製作醬料和煎炸食品等。它是世界上許多地區的日常食物。奶油是由分散在乳脂中的微小液滴組成的，而這些微小液滴大多是由水和乳蛋白形成的。最常見的奶油原料是牛奶，某些奶油則採用其他哺乳動物的奶，包括羊、山羊、水牛和犛牛。奶油的生產過程中有時候會加入食鹽、調味劑和防腐劑。

奶油主要為短鏈的飽和脂肪酸，成分如【表2.2】和【表2.3】，經冷藏後呈現固體狀，但會在室溫軟化至可供塗抹的程度，並在攝氏32至35度（華氏90至95度）融化成稀薄的液體。顏色主要是淡黃色，但也有較深的黃色或接近白色的淺黃。顏色的深淺取決於動物的飼料，或添加的食用色素如胡蘿蔔素等。

【表 2.2】動物性奶油的基本成分表(100g)

熱量 (kcal)	水分 (g)	粗蛋白 (g)	粗脂肪 (g)	碳水化合 物(g)	灰分 (g)	維生素 B1(mg)
679	17	0.8	71.8	8.8	1.6	0.01

膽固醇 (mg)	維生素A效力 (RE)	維生素E效力 (α -TE)	維生素 B2(mg)	菸鹼素 (mg)	維生素 B6(mg)
197	524	1.49	0.08	Tr	Tr

維生素 B12 (ug)	鈉 (mg)	鉀 (mg)	鈣 (mg)	鎂 (mg)	磷 (mg)	鐵 (mg)	鋅 (mg)
0.03	564	27	23	3	38	0.1	0.1

【表 2.3】動物性奶油的飽和脂肪酸總量百分比(%)

粗脂肪 (g/100g)	食物中飽和脂肪酸總量百分比(%)							
	總量 (%)	酪酸 4:0	己酸 6:0	辛酸 8:0	癸酸 10:0	月桂酸 12:0	十三脂酸 13:0	肉豆蔻酸 14:0
71.8	72.97	2.27	1.99	1.30	2.95	3.52	0.09	11.89

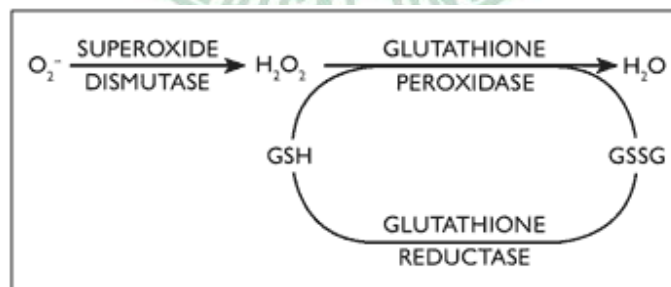
食物中飽和脂肪酸總量百分比(%)							
十五脂 酸15:0	棕櫚酸 16:0	十七脂酸 17:0	硬脂酸 18:0	十九脂酸 19:0	花生酸 20:0	山酸 22:0	二十四脂 酸24:0
1.38	33.26	0.68	13.09	0.15	0.23	0.10	0.07

(食品工業發展研究所 and 屏東科技大學, 1998)

六、體內抗氧化系統

正常狀況下，生物體內會依賴體內的抗氧化系統來清除過剩的自由基及活性氧分子，以避免體內遭受氧化壓力傷害，此一抗氧化系統則包含抗氧化分子及抗氧化酵素，抗氧化分子可分為脂溶性及水溶性兩大類，脂溶性分子包括維生素E及 β -carotene，水溶性有麩胱甘肽 (Glutathione; GSH)、維生素C等；而抗氧化酵素是包含超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase; SOD)、麩胱甘肽過氧化酶 (Glutathione Peroxidase; GPx) 及過氧化氫酶 (catalase)，體內可以經由此一完整的抗氧化系統來防止細胞受到氧化傷害。

抗氧化酵素可經由起始反應 (Initiation)、增值反應 (Propagation)、及終止反應 (Termination)來阻斷自由基的作用。過氧化氫酶 (catalase) 及超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase; SOD)為阻斷自由基起始期的抗氧化酵素，使自由基的前驅物失去活性而預防活性氧的生成。麩胱甘肽過氧化酶 (Glutathione peroxidase; GPx) 則有助於過氧化氫 (H_2O_2) 以及脂肪酸氫過氧化物 (R-OOH) 的移除。有動物實驗指出，攝取飽和脂肪飲食會導致肝臟均質液的的氧化程度增加(Piot et al., 1999)。由上述推斷，飽和脂肪飲食容易引起體內產生氧化傷害。



【圖 2.6】體內抗氧化酵素和活性氧物種作用

七、免疫反應

一般免疫反應可分為兩大類：先天性免疫反應(Innate immune response)與適應性免疫反應(Adaptive immune response)。先天性與適應性免疫反應依白血球(Leukocyte)的活性而定(陳豪勇, 2002)，先天性免疫反應並不會因重複暴露在同一特定病原而改變，適應性免疫反應則隨著每次對抗相同病原而增強其反應，能記憶病原而避免相同的病原體再度感染而發病。適應性免疫反應的特徵為專一性與記憶性。

(一) 先天性免疫反應(Innate immune response)

先天性免疫反應主要包含顆粒細胞(granulocyte)及巨噬細胞。顆粒細胞，又稱為多型核白血球(polymorphonuclear leukocyte)，經染色後有明顯的顆粒是其主要特徵；包含屬於吞噬細胞的嗜中性球(neutrophil)，主要以原始且非專一性辨認系統與各種微生物結合並吞噬，為對抗感染的第一線(林孟曉, 2005)。而巨噬細胞在傷口癒合過程中，可提供傷口癒合所需的 cytokines，如 IL-1、IL-6 及 TNF- α 等(Dieleman et al., 1996)。研究顯示，飽和脂肪會增加脂肪細胞和巨噬細胞中 TNF- α 的 mRNA 表現量，引起發炎反應(Suganami et al., 2007)。

(二) 適應性免疫反應 (Adaptive immune response)

適應性免疫反應是由淋巴球、單核球及其產物如抗體、細胞激素及抗原-專一性細胞毒性(殺手)細胞所組成。其功能為圍堵或破壞入侵物，或是使自我組織發生改變，以保護宿主。適應性免疫具有兩項特點：1. 它能區分自我及非自我，保護宿主組織免於受破壞，以及能選擇性摧毀致病原；2. 它會記憶所碰過的特定致病物，因此寄主再遇到相同致病原時，會立即且劇烈地引發免疫反應，避免宿主再度發生相同之疾病。2001 年有文獻指出，餵食高飽和脂肪飲食的老鼠其脾臟發現，產生較多的發炎細胞激素和其 mRNA 量(Fiona. A et al., 2001)。所以當飽和脂肪攝取量較多時，體內的發炎反應會相對的較活躍。

第三章 材料方法

一、 實驗材料

(一) 實驗動物

由國家科學委員會實驗動物繁殖暨研究中心購進 4-5 週齡、雄性 C57BL/6JNarl 小黑鼠。小黑鼠飼養於中山醫學大學動物中心，動物飼養條件為自動空氣調節（換氣率每小時 12 次）、自動光照控制（12 小時白晝、12 小時黑夜）、室內溫度於 22°C、相對溼度 55%。動物給予特殊飲水飼料並自由進食。經三天適應期後，開始進行八週實驗。

(二) 化學試藥

1. 特殊飲水用藥：

- (1) Beta-alanyl-L-histidine (Carnosine) 購自 Sigma Chemical Company，純度 99%
- (2) Histidine 購自 Sigma Chemical Company，純度 99.5%

2. 實驗分析試藥：

- (1) Bovine Serum Albumin (BSA) 購自 Sigma Chemical Company，純度 96%
- (2) Sodium Carbonate (Na₂CO₃) 購自 MERCK Chemical Company，純度 99.5%
- (3) Sodium Hydroxide (NaOH) 購自 MERCK Chemical Company，純度 93%
- (4) Copper Sulfate (CuSO₄) 購自島久藥品株式會社，純度 99%
- (5) Disodium Hydrogenphosphate 購自 Wako Chemical Company，純度 99%
- (6) 2-Thiobarbituric Acid (TBA) 購自 Sigma Chemical Company，純度 98%
- (7) Trichloroacetic Acid (TCA) 購自 Wako Chemical Company，純度 99%
- (8) 安佳牌無鹽奶油條 (ACHOR Butter Roll, Unsalted) 購自台中大潤發流通事

業股份有限公司

(三) 分析檢驗套組

1. Glutathione、Glutathione Peroxidase、Antioxidant 及 Superoxide Dismutase Assay Kits 購自德國 Cayman 公司
2. Mouse Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) 及 Mouse Interleukin-6 (IL-6) ELISA Kits 購自美國 eBioscience 公司 (San Diego, CA)
3. Direct LDL Cholesterol、Cholesterol、Triglyceride Reagent Set 購自美國 Teco Diagnostics 公司 (Anaheim, CA)

(四) 儀器設備

1. 酸鹼測定儀 (pH meter) : METTLER TOLEDO, Switzerland
2. 離心機 : HETTICH, MICRO 22R, Germany
3. 分光光度計 (Spectrophotometer) : GBC, Cintra UV-Vis Spectrometer, Australia
4. 高溫高壓滅菌釜 : TM-328, 東明儀器有限公司
5. 免疫分析微盤清洗機 (ELISA Washer) : Bio-Rad Model 1575, USA
6. 微盤分光光度計 (Microplate Spectrometer) : Bio-Rad xMark, USA
7. 均質機 : Glas-Co, USA
8. 震盪橫溫循環水槽 : Shaker Bath BT-150, Taiwan

二、 實驗方法

(一) 實驗設計

實驗分組：

組別	飼料及飲水	隻數
Normal	標準飼料及一般飲水，飼養八週	12
Control	飼料中添加 5%的奶油，飼養八週 5% Butter+Water	12
Histidine	飼料中添加 5%的奶油，飲水中添加 1 g/L Histidine，飼養八週	18
Carnosine	飼料中添加 5%的奶油，飲水中添加 1 g/L Carnosine，飼養八週	18

實驗分為正常小黑鼠和餵食奶油的小黑鼠，而餵食奶油的組別又分為攝取含有 histidine 和 carnosine (1g/L)的飲用水。每日更換飲水，每週測量老鼠的體重並紀錄。

(二) 特殊飲水飲食製備方法：

1. 飲水：各將 1 克的 histidine 和 carnosine 加入 1L 的二次水中，充分攪拌均勻後給予老鼠飲用。
2. 飲食：將奶油和標準飼料以 5%的比例充份揉勻混和。首先將奶油加入熱水中溶解，攪拌均勻後添加入已磨成粉狀的飼料中，反覆搓揉拍打，直到飼料軟硬度適中後切割成適當大小，每日給予老鼠食用。

(三) 血液、臟器之收集

老鼠經斷頸犧牲後，將取得的血液收集入真空採血管中，靜置於4°C約10分鐘後，以3000xg離心15分鐘，將分層的血清、血球取出分別儲存。肝臟、心臟、腎臟、副睪脂取出秤重後，置於-80°C冰箱儲存待分析。

(四) 組織液之處理

臟器取100mg加入1mL之磷酸鹽緩衝液(phosphate buffer solution, pH=7.2~7.3)後，置於冰上進行均質。均質完全後，離心取其上清液。依據Lowry et al. (1951)的方法以Bovine serum albumin (BSA)為標準，將組織均質液進行蛋白質濃度定量。

三、 分析方法

(一) 肝臟均質液蛋白質濃度測定

1. 原理

以Bradford protein-binding assay的方法進行蛋白質定量，此定量方法利用coomassie brilliant blue G-250會與蛋白質結合的特性，在G-250與蛋白質結合後，G-250的顏色會從紅色轉變成為藍色，此時在595nm波長下，會有較高的吸收，以便偵測。這個方法的優點為G-250與蛋白質結合所需的時間很短(大約2分鐘左右)，且結合的G-250-蛋白質複合物(complex)可在溶液中維持較長的時間(大約1小時)。此法方便而靈敏(只需10 ng sample)，可使用微量滴定盤進行分析。

2. 實驗步驟

(1) 標準品濃度配置

tube	BSA (μL)	dd water (μL)	Conc. (mg/mL)
A	0	100	0
B	10	90	0.1
C	20	80	0.2
D	30	70	0.3
E	40	60	0.4
F	50	50	0.5

(2) 先將均質液稀釋 50 倍

(3) 將 sample 和標準品取 10 μL 加入 96-well

(4) 在每個 well 中加入稀釋後的 Bio-Rad 染劑 20 μl (Bio-Rad 原液：
dd water=1:4)

(5) 在室溫下搖晃 5 分鐘

(6) 測其 OD_{595nm} 吸光值

3. 標準曲線

以標準品的濃度配置為 X 軸，所測得之標準品的吸光值為 Y 軸，即可得一標準曲線。

4. 計算方法

測得實驗樣品於 OD_{595nm} 吸光值後，依據標準曲線以內插法，代入一次方程式 ($y=ax+b$) 計算，則可求得蛋白質的濃度。

(二) 肝臟均質液麩胱甘肽 (Glutathione ; GSH) 濃度測定

1. 原理

本實驗是以 Cayman 的商業試驗套組來分析，是利用 GSH 的酵素氧化還原系統，藉以測 glutathione reductase 活性，再以此定量 GSH 濃度。GSH 的 sulfhydryl group 會和 DNTB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid, Ellman's reagent) 反應，產生黃色的 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB)，而混合的 disulfide-GSTNB 會伴隨著產生，並藉由 GSH reductase 的還原再生成 GSH 和 TNB，而 TNB 的產生速率會直接和此還原的反應呈現比例關係而反應了 GSH 的濃度。



【圖 3.1】GSH 的循環反應圖

2. 實驗步驟

(1) 標準品濃度配置

Tube	GSSG std.(μ L)	MES buffer final conc. (μ L)	Final conc. (μ L GSSG)	Equiv. total GSH(μ L)
A	0	500	0	0
B	5	495	0.25	0.5
C	10	490	0.5	1.0
D	20	480	1.0	2.0
E	40	460	2.0	4.0
F	80	420	4.0	8.0
G	120	380	6.0	12.0
H	160	340	8.0	16.0

(2) 將標準品和 sample 各加入 50 μ L 到 96-well 中

(3) 製備 assay cocktail，包含

- MES buffer : 11.25 mL
- reconstituted cofactor mixture : 0.45 mL
- reconstituted enzyme mixture : 2.1 mL
- water : 2.3 mL
- reconstituted DNTB : 0.45 mL

此 assay cocktail 必須要新鮮配置，並混合均勻。

(4) 再將配置好的 assay cocktail 加入 150 μ L 到 96-well 中

(5) 在黑暗中振盪 25 分鐘後，測其 OD_{405nm} 吸光值。

3. 標準曲線

以標準品的濃度為 X 軸，所測得之標準品的吸光值為 Y 軸，即可得一標準曲線。

4. 計算方法

測得實驗樣品於 OD_{405nm} 吸光值，依據標準曲線以內插法代入一次方程式 ($y=ax+b$) 計算，則可求得 GSH 的濃度。

(三) 麩胱甘肽過氧化酶 (Glutathione Peroxidase ; GP_X) 活性測定

1. 原理

本實驗是以商業套組進行分析，原理是利用 GP_X 催化 H₂O₂ 與 GSH 作用會使 GSH 轉變為 oxidized glutathione (GSSG)，而 oxidized glutathione (GSSG) 會經由 glutathione reductase 的催化，由 NADPH 得到 H⁺ 後再還原成 GSH。因此可由測定波長 OD_{340nm} 下一分鐘吸光值之變化量，以此檢測 GP_X 之活性。

2. 實驗步驟

- (1) 在石英管中加入 10 μ L 稀釋100倍的實驗樣品 (肝臟均質液)
- (2) 依序加入 0.5 mL 以 buffer (phosphate buffer 0.05 mol / L ; pH 7.2 EDTA 4.3 mmol / L)，稀釋過的 reagent (glutathione 4mmol / L、glutathione reductase ≥ 0.5 U/l、NADPH 0.34 mmol / L) 及以二次水稀釋過的 cumene hydroperoxide 20 μ L 後均勻混合，一分鐘後測定其在波長 OD_{340nm} 之吸光值。
- (3) 第二分鐘再讀一次波長 OD_{340nm} 時之吸光值，求出第二分鐘及第一分鐘所得吸光值之差 (ΔA) 後代入以下公式：

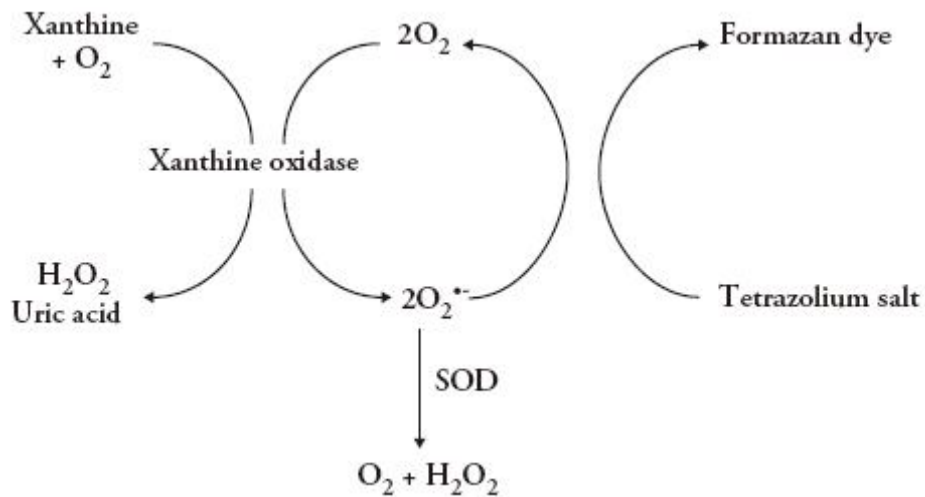
$$GP_X \text{ activity (U / L)} = 8412 \times \Delta A_{340nm} / \text{minute} \times 100 \text{ (稀釋因子)}$$

修正蛋白質後，濃度單位以 U / mg protein 表示

(四) 超氧化物歧化酶 (Superoxide Dimutase ; SOD) 活性測定

1. 原理

本實驗採用商業套組分析，原理是依據當 Xanthine 轉變為 Uric acid 的過程當中，經由 Xanthine oxidase 的催化會有超氧陰離子的產生。此時若有超氧化物歧化酶 (Superoxide Dimutase ; SOD) 存在便能催化超氧陰離子與 H^+ 作用，得到 H_2O_2 及 O_2 。



【圖 3.2】SOD 的循環反應圖

2. 實驗步驟

- (1) 將 10 μ L 的肝臟均質液和 200 μ L 的 diluted Tetrazolium salt 注入 96 孔盤
- (2) 加入 20 μ L 稀釋過後的黃嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase) 起始反應
- (3) 室溫下使用 shaker 振盪反應二十分鐘後，測其 OD_{450nm} 下的吸光值

3. 標準曲線之製作

使用 bovine erythrocyte SOD 作為實驗標準品，將標準品原液依指示分別稀釋成 SOD 活性為 0、0.025、0.05、0.1、0.15、0.2、0.25 U / mL 七種標

準品，再與實驗樣品同時以上述方法分析測定後，可由吸光值求出 linearized rate (LR)， $LR(A) = \text{standard}(A) \text{所測得吸光值} / \text{standard}(A) \text{所測得吸光值}$ ； $LR(B) = \text{standard B 所測得吸光值} / \text{standard A 所測得吸光值}$ ，以此類推。以標準品活性 (U/mL) 為X軸、LR為Y軸，則可得到一標準曲線。

4. 計算方式公式：

$$SOD(U/ml) = \left\{ \left[\frac{\text{sample LR} - \text{y-intercept}(b)}{\text{slope}(a)} \right] \times \frac{0.23\text{ml}}{0.01\text{ml}} \right\} \times \text{sample dilution}$$

* $LR(\text{sample}) = \text{sample 所測得吸光值} / \text{standard A 所測得吸光值}$

由標準曲線可得一次方程式 ($y=ax+b$)，以實驗樣品所測得之吸光值代入上述公式可求得超氧化物歧化酶 (Superoxide Dimutase ; SOD) 的活性，活性單位以 U / mg protein 表示。

(五) 腫瘤壞死因子(Tumor Necrosis Factor ; TNF- α)濃度測定

1. 原理

本實驗是以商業套組進行分析，此分析方法是利用酵素接合免疫吸附法 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay ; ELISA) 的原理。因具TNF- α 特異性的多株抗體已附著在96孔盤上，故直接將實驗樣品(肝臟或心臟均質液)加入96孔盤內，此時樣品內的TNF- α 會與抗體產生專一性的結合而附著在96孔盤中，移除96孔盤內的液體後再加入 biotin conjugated anti - TNF- α antibody 使其與96孔盤內的 TNF- α 共軛結合，接著依序加入horseradish peroxidase-labelled avidin (Avidin-HRP) 及 3,3',5,5' - tetramethylbenzidine (TMB)。Avidin - HRP中的 Avidin 會結合上 biotin，由於 TMB 是過氧化酶 (Peroxidase)的受質，TMB受peroxidase 催化後會有藍色氧化產物產生。最後加入終止劑中止反應後，即可測其 OD_{450nm}之吸光值，代入標準曲線換算TNF- α 濃度。

2. 實驗步驟

- (1) 將實驗樣品100 μL 注入96孔盤中，室溫下使用shaker反應二小時後，以wash buffer清洗各微孔五次；
- (2) 各微孔加入100 μL 稀釋250倍的detection antibody，室溫使用shaker反應三小時後，以wash buffer清洗各微孔五次；
- (3) 各微孔加入100 μL 稀釋250倍的Avidin-HRP，室溫下使用shaker反應三十分鐘後，以wash buffer清洗各微孔七次；
- (4) 各微孔加入100 μL substrate solution，室溫下使用shaker反應十五分鐘後，最後加入50 μL 終止劑 (1N HCl) 後，在波長 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 下測其吸光值。

3. 標準曲線之製作

以濃度為 500、250、125、62.5、31.2、15.6、7.8、0 pg/mL 之TNF- α 標準品和實驗樣品同時以上述方法分析測定後，以標準品濃度為X軸、所測得之 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 吸光值為Y軸，則可得到一標準曲線。

4. 計算方式

測得實驗樣品於波長 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 下之吸光值後，依據標準曲線以內插法代回一次方程式 ($y=ax+b$) 計算，則可求得 TNF- α 濃度，修正蛋白質後，濃度單位以 $\text{pg}/\text{mg protein}$ 表示。

(六) 介白素-6 (Interlukin-6 ; IL-6) 濃度測定

1. 原理

本實驗是以商業套組進行分析，此分析方法是利用ELISA的原理。因具IL-6 特異性的多株抗體已附著在96孔盤上，故直接將實驗樣品(肝臟或心臟均質液) 加入微孔內，此時樣品內的IL-6會和抗體產生專一性結合而附著在

96孔盤中，移除96孔盤內的液體後再加入biotin conjugated anti- IL-6 antibody，使其與96孔盤內的IL-6共軛結合，接著依序加入 horseradish peroxidase-labelled avidin (Avidin-HRP) 及 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine (TMB)。Avidin - HRP中的Avidin 會與biotin結合。由於TMB是過氧化酶 (peroxidase) 的受質，故TMB受peroxidase 催化後會有藍色氧化產物產生。最後加入終止劑中止反應，測其 OD_{450nm} 之吸光值，代入標準曲線即可換算得 IL-6濃度。

2. 實驗步驟

- (1) 將實驗樣品 (肝臟或心臟均質液) 100 μ L 注入96孔盤中，室溫使用shaker反應二小時後，以wash buffer清洗各微孔五次；
- (2) 各微孔加入100 μ L稀釋250倍的detection antibody，室溫使用shaker反應一小時後，以wash buffer清洗各微孔五次；
- (3) 各微孔加入100 μ L稀釋250倍的 Avidin-HRP，室溫使用shaker反應三十分鐘後，以wash buffer清洗各微孔七次；
- (4) 各微孔加入100 μ L substrate solution，室溫使用shaker反應十五分鐘後，最後加入50 μ L 終止劑(1N HCl)後在波長OD_{450nm}下測其吸光值。

3. 標準曲線之製作

以濃度為 500、250、125、62.5、31.2、15.6、7.8、0 pg / ml 之 IL-6 標準品和實驗樣品同時以上述方法分析測定後，以標準品濃度為X軸、所測得波長 OD_{450nm}下吸光值為Y軸，則可得到一標準曲線。

4. 計算方式

測得實驗樣品於波長 OD_{450nm} 下之吸光值後，依據標準曲線以內插法代入一次方程式($y=ax+b$)計算，再乘回稀釋倍數，則可求得 IL-6 濃度，修正蛋

白質後，濃度單位以 pg/mg protein 表示。

(七) 心臟及肝臟中三酸甘油酯(Triglyceride)濃度測定

1. 原理

脂解酶(Lipase)將三酸甘油酯水解成甘油及脂肪酸，甘油經由甘油激酶，ATP 作用下產生 glycerol-3-phosphate 及 ADP，glycerol-3-phosphate 再經 GPO(glycerol-3-phosphate oxidase)產生過氧化氫，在過氧化酶催化下，與 4-aminophenazone 及 4-chlorophenol 氧化成 quinoneimine 紅紫色物。

2. 實驗步驟

將 5 μ l 的心臟或肝臟均質液及標準品加入含有 pipes buffer、magnesium ion、4-chloro phenol、4-aminoantipyrine、ATP、Lipase、glycerol-kinase、glycerol-3-phosphate oxidase、peroxidase 溶液中，混合均勻，在 37°C 恆溫下反應5分鐘，於波長 OD_{500nm} 吸光值下，測定三酸甘油酯濃度。

3. 計算

三酸甘油酯濃度(mg/dL)=均質液樣品吸光值/標準品吸光值×200

(八) 心臟及肝臟中膽固醇(Cholesterol)濃度測定

1. 原理

先以膽固醇酯水解酶，將膽固醇酯水解成游離膽固醇，再利用膽固醇氧化酶分解膽固醇產生過氧化氫，然後在過氧化酶催化下，4-aminoantipyrine 及 phenol 氧化成 quinoneimine 紅紫色物。

2. 實驗步驟

將 5 μ L 的心臟或肝臟均質液及標準品加入含有 pipes buffer、phenol、

4-aminoantipyrine、cholesterol esterase、cholesterol oxidase、peroxidase 溶液中，混合均勻，在 37°C 恆溫箱中反應 5 分鐘，於波長 OD_{500nm} 吸光值下，測定膽固醇濃度。

3. 計算

$$\text{膽固醇濃度(mg/dL)} = \text{均質液樣品吸光值} / \text{標準品吸光值} \times 200$$

(九) 血清中低密度脂蛋白膽固醇(LDL cholesterol)濃度測定

1. 原理

先將具有特異選擇性的強離子緩衝液與表面活性劑作用於血清中 CM、VLDL、HDL，所釋放出的膽固醇再經由膽固醇酯水解酶和膽固醇氧化酶的催化反應下生成 H_2O_2 ， H_2O_2 被過氧化氫酶分解為 H_2O 和 O_2 。然後，在另一表面活性劑的作用下，LDL 顆粒中的膽固醇被釋放出來，作用於偶聯劑 DSBmT (2: N,N-bis [4-sulfhobutyl]- m-Toluidine- disodium) 產生呈色反應。

2. 實驗步驟

(1) 第一部份：

將 5 μ L 的心臟與肝臟均質液及標準品加入含有 pipes buffer、phenol、4-aminoantipyrine、cholesterol esterase、cholesterol oxidase、peroxidase 溶液中，混合均勻，在 37°C 恆溫箱中反應 5 分鐘。

(2) 第二部份：

加入 100 μ l 的 Buffer (DSBmT 1.2%) 100 mmol/L (pH 7.0) 和 DSBmT，產生呈色反應。

3. 計算

$$\text{低密度脂蛋白膽固醇濃度(mg/dL)} = \text{均質液樣品吸光值} / \text{標準品吸光值} \times$$

標準品濃度(mg/dL)

(十) 丙二醛 (Malondialdehyde ; MDA) 濃度測定

1. 原理

利用脂質過氧化會產生的降解產物 MDA 在酸性環境下會與二分子的 thiobarbituric acid (TBA) 發生縮和反應，形成一粉紅色產物 thiobarbituric acid reactive substances (TBARs)。因此，可測其在波長 OD_{532nm} 時的吸光值，做為檢驗 MDA 濃度之分析。

2. 實驗步驟

- (1) 取樣品 1 mL 加入 30% Trichloroacetic acid (TCA) 1 mL
- (2) 12000 rpm 離心 10 分鐘後取上清液 500 μ L
- (3) 500 μ L 上清液加入等量之 0.85 % TBA 溶液，在 100°C 下水浴 20 分鐘
- (4) 測定樣品在 532 nm 之吸光值。

3. 標準曲線之製作

以濃度為 0、0.2、1、2、5、10 μM 之 MDA 標準品 Trimethyl phosphite (TMP) 和實驗樣品同時以上述方法分析測定後，以標準品濃度為X軸、所測得之 OD_{532nm} 吸光值為Y軸，則可得到一標準曲線。

4. 計算方法

測得實驗樣品於 OD_{532nm} 波長下之吸光值後，依據標準曲線以內插法代入一次方程式 ($y=ax+b$) 計算後，再乘回稀釋倍數10倍，即可求得丙二醛(MDA) 濃度，經修正蛋白質濃度後，濃度單位以 $\mu\text{mol} / \text{L}$ 表示。

(十一) 總抗氧化濃度測定 (Antioxidant)

1. 原理

首先利用ABTS(2,2'-azino-bis-[3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid])與metmyoglolojin及peroxidase反應，會產生 $ABTS^+$ 。此為一相當穩定藍綠色物質，於波長734 nm 有吸收波峰。抗氧化劑的加入會抑制此顏色的產生，因此吸光值愈低，抗氧化效果愈佳。sample 依其清除自由基之能力作為總抗氧化濃度之測定。

2. 實驗步驟

取 peroxidase、ABTS溶液以及 metmyoglolojin混合均勻，待產生安定藍綠色之 $ABTS^+$ 陽離子自由基後，加入不同濃度的 trolox 樣品，以分光光度計測734 nm之吸光值，做成 trolox 之檢量線。樣品的檢測同上，測得後再由 trolox 的檢量線，換算其相當的濃度(mM)。

3. 計算

總抗氧化濃度(mM) =
(樣品的平均吸光值 - y軸截距) / 斜率(-1.478) * 稀釋倍數(10)

四、統計分析

各組實驗數據以Mean±SD表示，所獲結果皆以單因子變異數分析方法進行分析 (one-way ANOVA)，採用Duncan's test比較組間差異，統計結果以英文字母表示是否具有組間差異性，相同字母表示沒有顯著差異 ($p > 0.05$)，而不同字母表示有組間性差異 ($p < 0.05$)。

第四章 結果

本實驗將 histidine 和 carnosine 分別添加至 C57BL/6JNarl 小鼠飲水中，並在飲食中添加 5% 的無鹽奶油。進行為期八週的飼養。探討 histidine 和 carnosine 對攝取飽和脂肪飲食小鼠的影響。

一、 體重變化

飼養八週期間，其體重變化如【圖 4.1】。自實驗第一週到第八週，normal 組、control 組、histidine 組和 carnosine 組四組之間體重均無顯著差異 ($p > 0.05$)。

二、 臟器重

所有臟器重均除以體重以減少誤差，如【表 4.1】所示。Control 組的肝臟重和副睪脂重均顯著高於 normal 組、histidine 組和 carnosine 組 ($p > 0.05$)，其中 histidine 組的副睪脂重又顯著高於 normal 組和 carnosine 組。四組之間心臟重均無顯著差異 ($p > 0.05$)。

三、 氧化傷害及抗氧化防禦之影響

1. 四組肝臟 GSH 含量呈現下列關係，如【圖 4.2】

餵食 5% 奶油飲食的 control 組其 GSH 含量顯著高於正常飲食飲水的 normal 組 ($p < 0.05$)。Histidine 組和 carnosine 組之間的 GSH 含量沒有差異性 ($p > 0.05$)，和 control 組比較，histidine 組顯著高於 control 組 ($p < 0.05$)，而 carnosine 組和 control 組之間沒有差異性 ($p > 0.05$)。

2. 四組肝臟 Antioxidant 含量呈現下列關係，如【圖 4.3】

Normal 組的 Antioxidant 含量顯著較 control 組高 ($p < 0.05$)，兩組實

驗組相比，histidine 組比 carnosine 組高，但在統計上沒有差異性 ($p > 0.05$)，而這兩組的 Antioxidant 含量都比 control 組高 ($p < 0.05$)。

3. 四組肝臟 MDA 含量呈現下列關係，如【圖 4.4】

Normal 組的 MDA 含量顯著高於其他三組 ($p < 0.05$)，而 control 組、hisitidne 組、和 carnosine 組之間並無顯著差異 ($p > 0.05$)。

4. 四組肝臟 GPx activity 呈現下列關係，如【圖 4.5】

餵食 5%奶油飲食的 control 組其 GPx activity 顯著低於其他三組 ($p < 0.05$)，而 normal 組、hisitidne 組、和 carnosine 組之間並無顯著差異 ($p > 0.05$)。

5. 四組肝臟 SOD activity 呈現下列關係，如【圖 4.6】

肝臟 SOD activity 結果和 GPx activity 呈現一致，餵食 5%奶油飲食的 control 組其 SOD activity 顯著低於其他三組 ($p < 0.05$)，而 normal 組、hisitidne 組、和 carnosine 組三組之間並無顯著差異 ($p > 0.05$)。

四、發炎前細胞激素濃度之影響

1. 肝臟與心臟均質液的 IL-6 含量

在肝臟方面如【圖 4.7】所示，control 組的 IL-6 含量顯著高於 normal 組 ($p < 0.05$)，兩組實驗組相比，carnosine 組略低於 histidine 組，但在統計上沒有差異性 ($p > 0.05$)，carnosine 組的 IL-6 含量顯著低於 control 組 ($p < 0.05$)，和 normal 組則沒有差異性 ($p > 0.05$)。

心臟的 IL-6 含量如【圖 4.8】，結果和肝臟的分析一致，histidine 組和 control 組沒有差異性 ($p > 0.05$)，而 carnosine 組則顯著低於 control 組 ($p < 0.05$)。

2. 肝臟與心臟均質液的 TNF- α 含量

肝臟的 TNF- α 分析顯示如【圖 4.9】，normal 組顯著低於 control 組 ($p < 0.05$)，而 control 組、hisitidne 組、和 carnosine 組之間並無顯著差異 ($p > 0.05$)，其中 hisitidne 組和 normal 組在統計上沒有差異性 ($p > 0.05$)。

心臟與肝臟 TNF- α 的分析類似，如【圖 4.10】，除了 normal 組顯著低於其他三組 ($p < 0.05$)，control 組、hisitidne 組、和 carnosine 組之間並無顯著差異 ($p > 0.05$)。

五、 脂質變化

1. 血清和心臟均質液中的三酸甘油脂 (TG) 含量

血清的 TG 含量如【圖 4.11】所示，normal 組的 TG 含量顯著低於 control 組 ($p < 0.05$)，而 normal 組、histidine 組和 carnosine 組三組之間並無顯著差異 ($p > 0.05$)。

心臟的 TG 含量如【圖 4.12】，和血清的 TG 相同之處為 control 均顯著高於其他三組 ($p < 0.05$)，但和血清不同之處在於，histidine 組和 carnosine 組更顯著低於 normal 組 ($p < 0.05$)，無論是血清或心臟的分析，histidine 組和 carnosine 組之間均無差異性 ($p > 0.05$)。

2. 肝臟總膽固醇 (TC) 含量，如【圖 4.13】

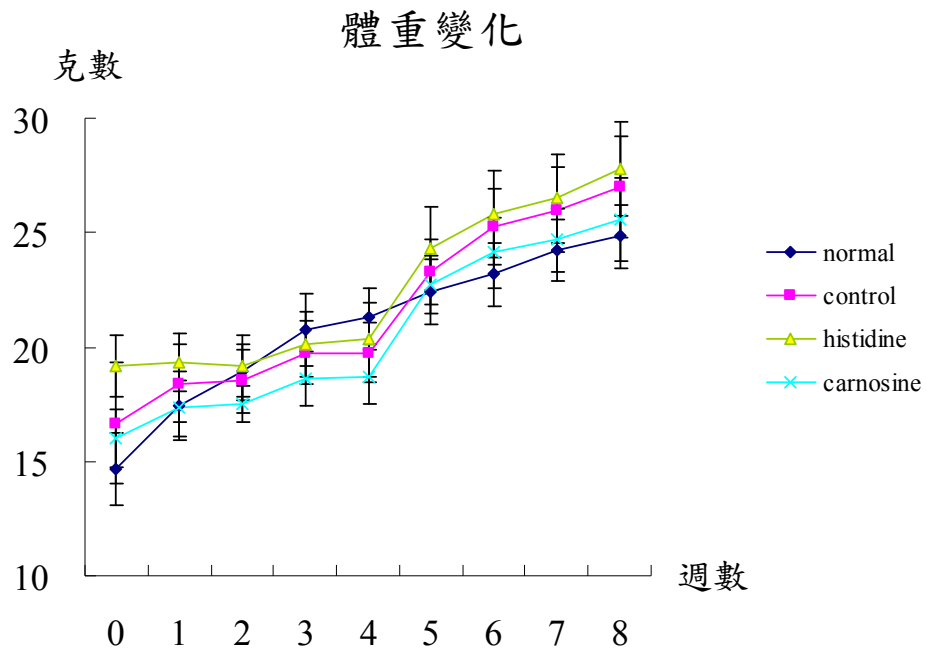
餵食 5%奶油飲食的 control 組其 TC 含量顯著高於其他三組 ($p < 0.05$)，而 histidine 組又顯著高於 normal 組和 carnosine 組 ($p < 0.05$)，其中 normal 組和 carnosine 組之間在統計上沒有差異性 ($p > 0.05$)。

3. 血清中低密度脂蛋白 (LDL) 含量，如【圖 4.14】

結果與 LDL 分析類似，餵食 5%奶油飲食的 control 組其 LDL 含量顯

著高於其他三組($p < 0.05$), 而 normal 組和 carnosine 組又顯著高於 histidine 組 ($p < 0.05$), 其中 normal 組和 carnosine 組之間在統計上沒有差異性 ($p > 0.05$)。





【圖 4.1】餵食八週的體重變化

normal：正常飲食飲水，n=12

control：餵食含 5% 奶油飲食，正常飲水，n=12

histidine：餵食含 5% 奶油飲食，飲水含 1 g/L histidine，n=18

carnosine：餵食含 5% 奶油飲食，飲水含 1 g/L carnosine，n=18

【表 4.1】 餵食八週的臟器變化情形

	肝臟重(mg) /BW(g)	心臟重(mg) /BW(g)	副睪脂重(mg) /BW(g)
normal	44.9±3.5 ^{ab}	5.4±0.5	17.2±3.8 ^c
control	46.4±5.6 ^a	5.3±0.4	33.0±7.0 ^a
histidine	42.8±4.0 ^b	5.0±0.4	27.5±6.8 ^b
carnosine	42.5±4.8 ^b	5.0±0.7	16.7±4.6 ^c

1. normal：正常飲食飲水，n=12

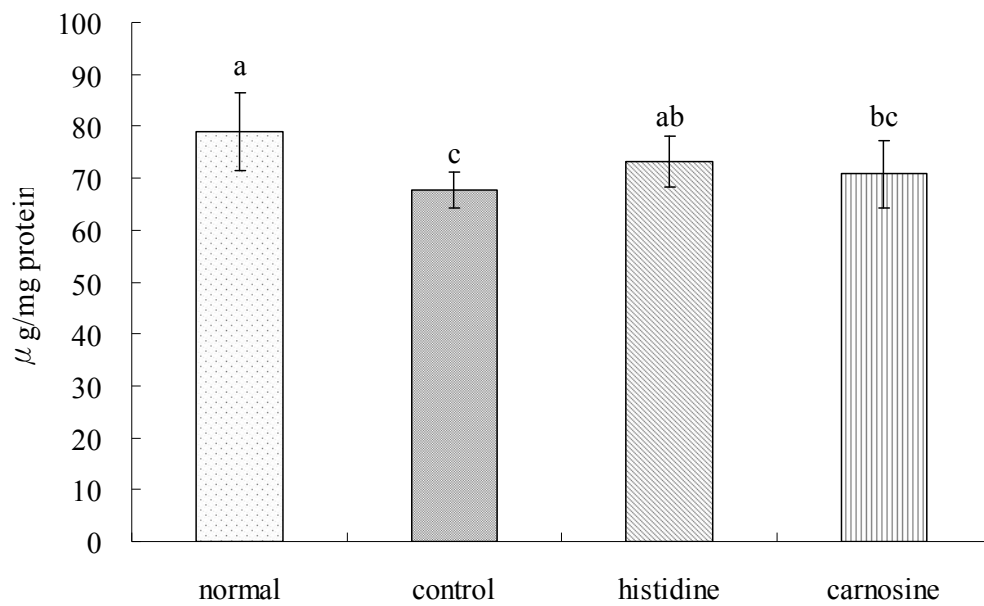
control：餵食含 5% 奶油飲食，正常飲水，n=12

histidine：餵食含 5% 奶油飲食，飲水含 1 g/L histidine，n=18

carnosine：餵食含 5% 奶油飲食，飲水含 1 g/L carnosine，n=18

2. 英文字母不同表示與同週數的其他組相比有顯著差異 ($p < 0.05$)

GSH - liver



【圖 4.2】不同組別肝臟的 Glutathione (GSH) 含量

1. normal：正常飲食飲水，n=12

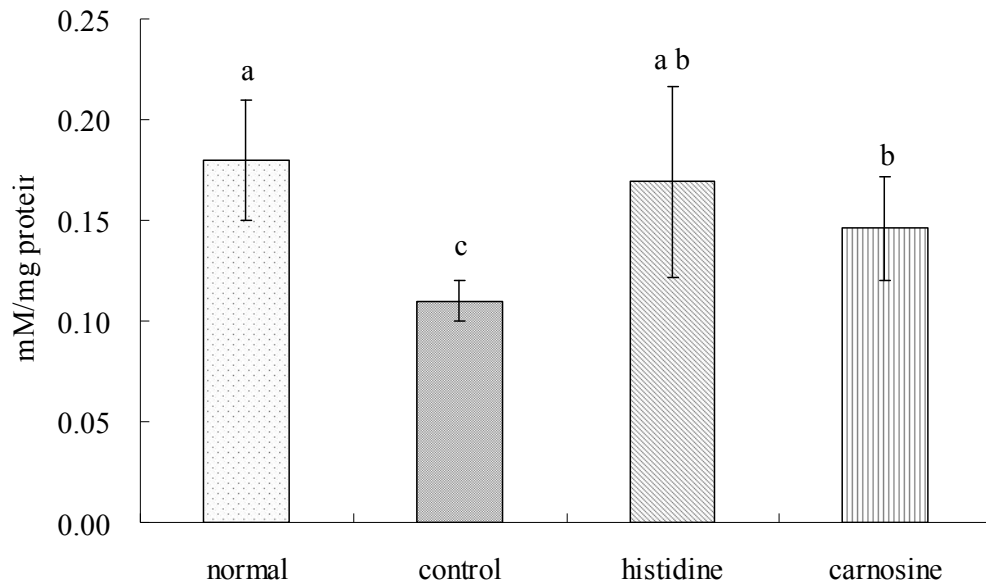
control：餵食含 5% 奶油飲食，正常飲水，n=12

histidine：餵食含 5% 奶油飲食，飲水含 1 g/L histidine，n=18

carnosine：餵食含 5% 奶油飲食，飲水含 1 g/L carnosine，n=18

2. 英文字母不同表示與同週數的其他組相比有顯著差異 ($p < 0.05$)

Antioxidant - liver



【圖 4.3】不同組別肝臟的 Antioxidant 含量

1. normal：正常飲食飲水，n=12

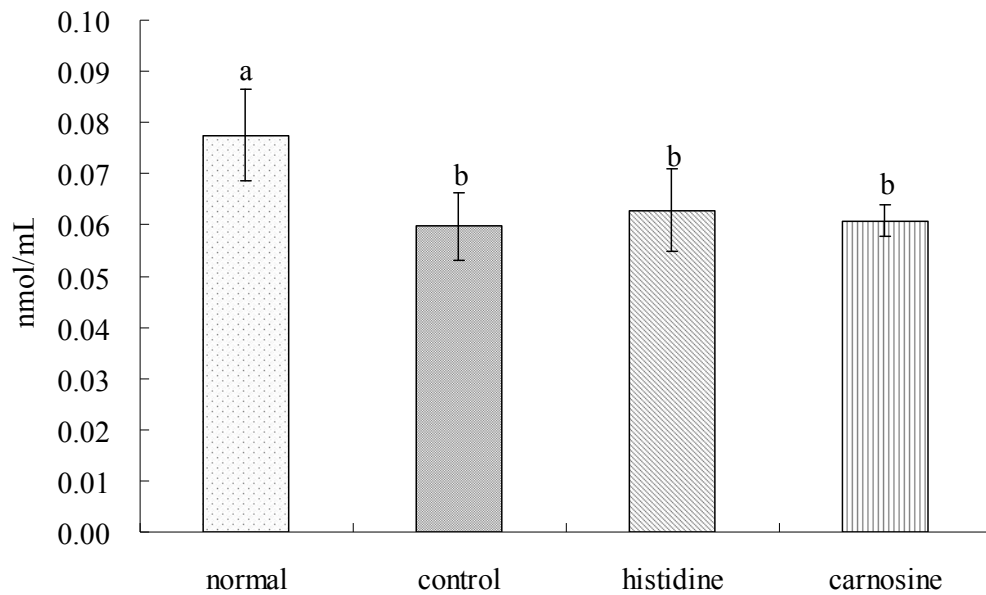
control：餵食含 5% 奶油飲食，正常飲水，n=12

histidine：餵食含 5% 奶油飲食，飲水含 1 g/L histidine，n=18

carnosine：餵食含 5% 奶油飲食，飲水含 1 g/L carnosine，n=18

2. 英文字母不同表示與同週數的其他組相比有顯著差異 ($p < 0.05$)

MDA - liver



【圖 4.4】不同組別肝臟中的 MDA 含量

1. normal：正常飲食飲水，n=12

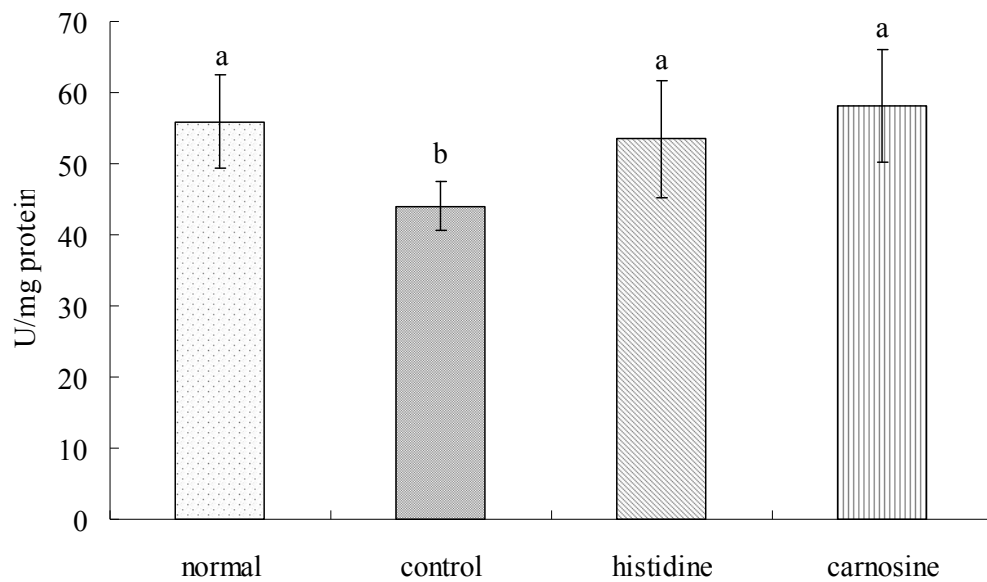
control：餵食含 5% 奶油飲食，正常飲水，n=12

histidine：餵食含 5% 奶油飲食，飲水含 1 g/L histidine，n=18

carnosine：餵食含 5% 奶油飲食，飲水含 1 g/L carnosine，n=18

2. 英文字母不同表示與同週數的其他組相比有顯著差異 ($p < 0.05$)

GPx activity- liver



【圖 4.5】不同組別肝臟的 Glutathione Peroxidase (GPx) 含量

1. normal：正常飲食飲水，n=12

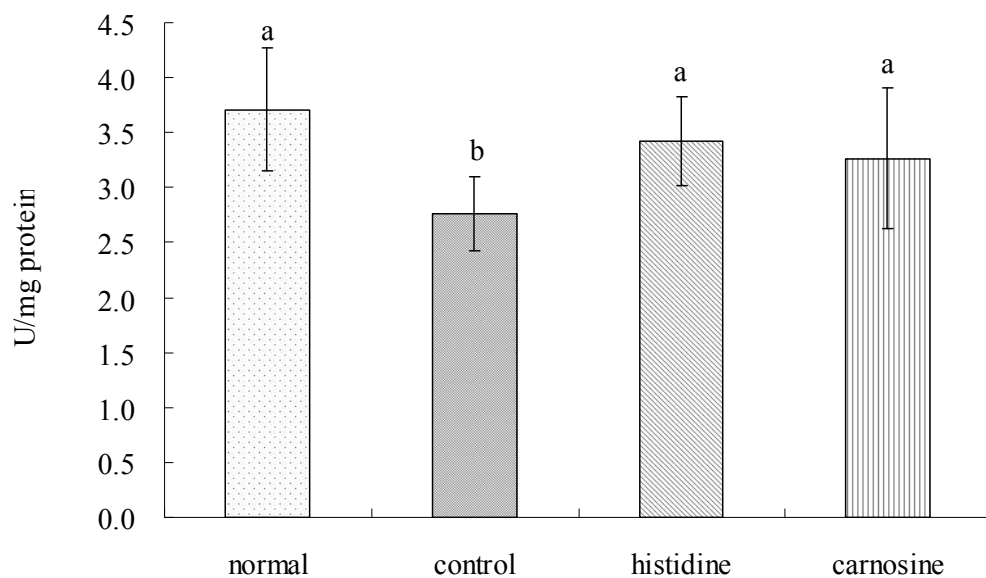
control：餵食含 5% 奶油飲食，正常飲水，n=12

histidine：餵食含 5% 奶油飲食，飲水含 1 g/L histidine，n=18

carnosine：餵食含 5% 奶油飲食，飲水含 1 g/L carnosine，n=18

2. 英文字母不同表示與同週數的其他組相比有顯著差異 ($p < 0.05$)

SOD activity - liver



【圖 4.6】不同組別肝臟的 Superoxidase Dismutase (SOD) 含量

1. normal：正常飲食飲水，n=12

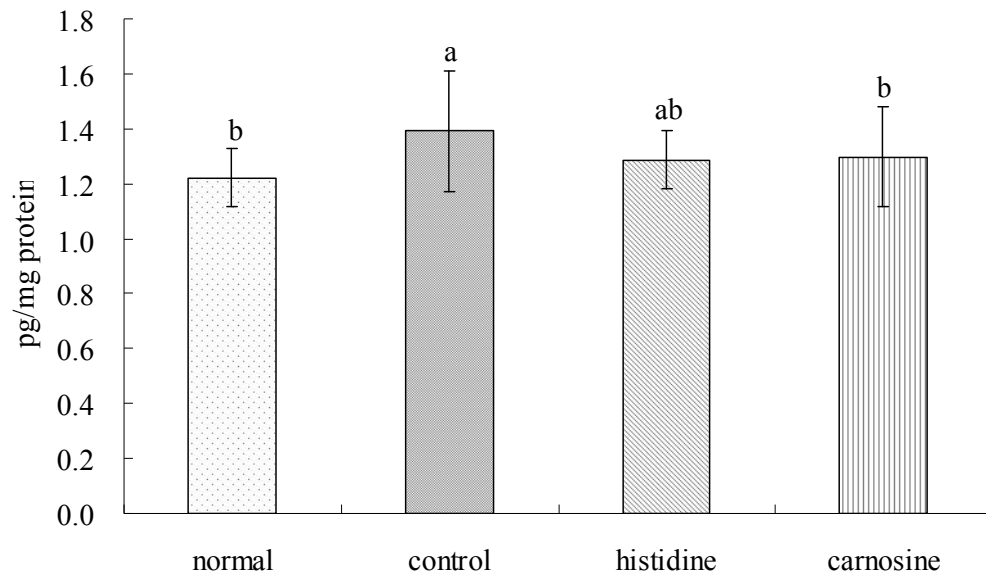
control：餵食含 5% 奶油飲食，正常飲水，n=12

histidine：餵食含 5% 奶油飲食，飲水含 1 g/L histidine，n=18

carnosine：餵食含 5% 奶油飲食，飲水含 1 g/L carnosine，n=18

2. 英文字母不同表示與同週數的其他組相比有顯著差異 ($p < 0.05$)

IL-6 - liver



【圖 4.7】不同組別肝臟的 Interleukin-6 (IL-6) 含量

1. normal：正常飲食飲水，n=12

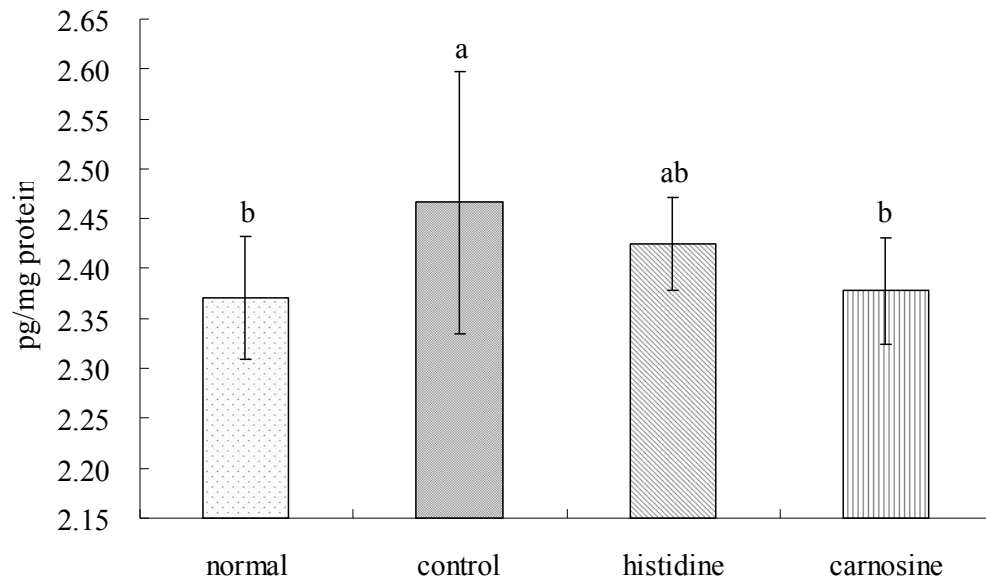
control：餵食含 5% 奶油飲食，正常飲水，n=12

histidine：餵食含 5% 奶油飲食，飲水含 1 g/L histidine，n=18

carnosine：餵食含 5% 奶油飲食，飲水含 1 g/L carnosine，n=18

2. 英文字母不同表示與同週數的其他組相比有顯著差異 ($p < 0.05$)

IL-6 - heart



【圖 4.8】不同組別心臟的 Interleukin-6 (IL-6) 含量

1. normal：正常飲食飲水，n=12

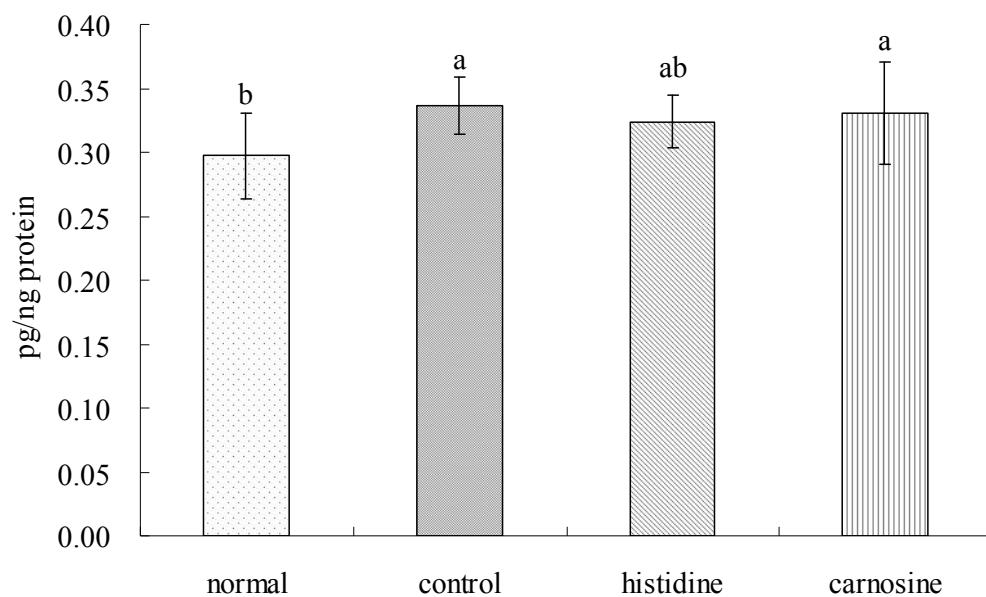
control：餵食含 5% 奶油飲食，正常飲水，n=12

histidine：餵食含 5% 奶油飲食，飲水含 1 g/L histidine，n=18

carnosine：餵食含 5% 奶油飲食，飲水含 1 g/L carnosine，n=18

2. 英文字母不同表示與同週數的其他組相比有顯著差異 ($p < 0.05$)

TNF- α - liver



【圖 4.9】不同組別肝臟的 TNF- α 含量

1. normal：正常飲食飲水，n=12

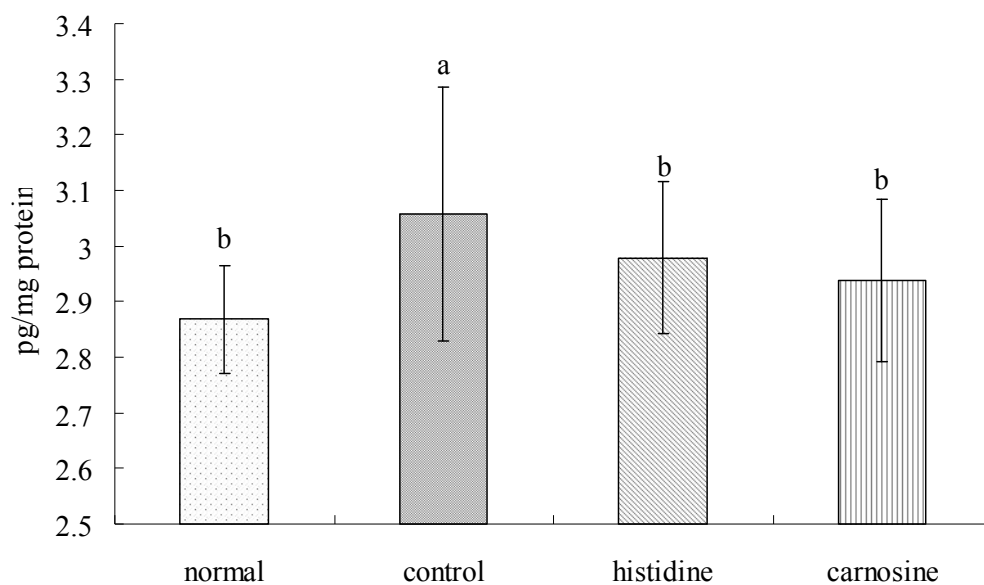
control：餵食含 5% 奶油飲食，正常飲水，n=12

histidine：餵食含 5% 奶油飲食，飲水含 1 g/L histidine，n=18

carnosine：餵食含 5% 奶油飲食，飲水含 1 g/L carnosine，n=18

2. 英文字母不同表示與同週數的其他組相比有顯著差異 ($p < 0.05$)

TNF- α - heart



【圖 4.10】不同組別心臟的 TNF- α 含量

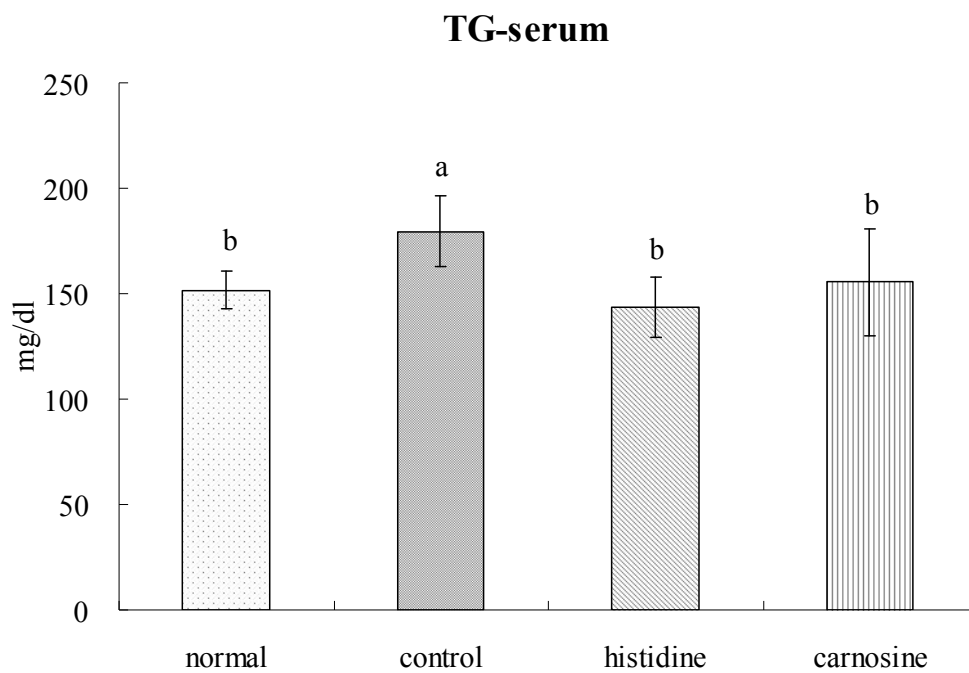
1. normal：正常飲食飲水，n=12

control：餵食含 5% 奶油飲食，正常飲水，n=12

histidine：餵食含 5% 奶油飲食，飲水含 1 g/L histidine，n=18

carnosine：餵食含 5% 奶油飲食，飲水含 1 g/L carnosine，n=18

2. 英文字母不同表示與同週數的其他組相比有顯著差異 ($p < 0.05$)



【圖 4.11】不同組別血清中的 Triglycerol (TG) 含量

1. normal：正常飲食飲水，n=12

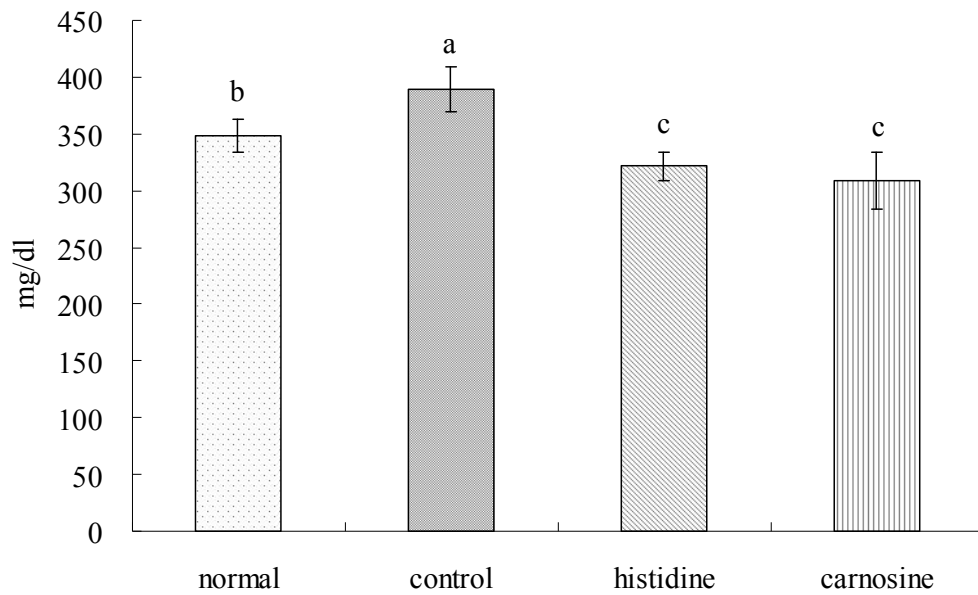
control：餵食含 5% 奶油飲食，正常飲水，n=12

histidine：餵食含 5% 奶油飲食，飲水含 1 g/L histidine，n=18

carnosine：餵食含 5% 奶油飲食，飲水含 1 g/L carnosine，n=18

2. 英文字母不同表示與同週數的其他組相比有顯著差異 ($p < 0.05$)

TG - heart



【圖 4.12】不同組別心臟的 Triglycerol (TG) 含量

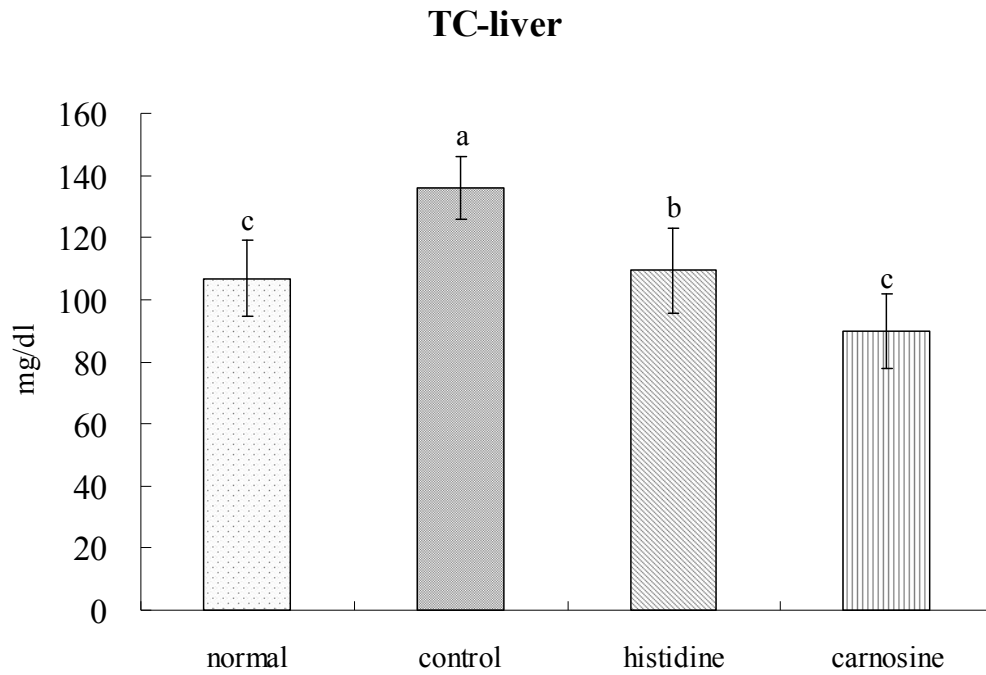
1. normal：正常飲食飲水，n=12

control：餵食含 5% 奶油飲食，正常飲水，n=12

histidine：餵食含 5% 奶油飲食，飲水含 1 g/L histidine，n=18

carnosine：餵食含 5% 奶油飲食，飲水含 1 g/L carnosine，n=18

2. 英文字母不同表示與同週數的其他組相比有顯著差異 ($p < 0.05$)



【圖 4.13】不同組別肝臟的 Total Cholesterol (TC) 含量

1. normal：正常飲食飲水，n=12

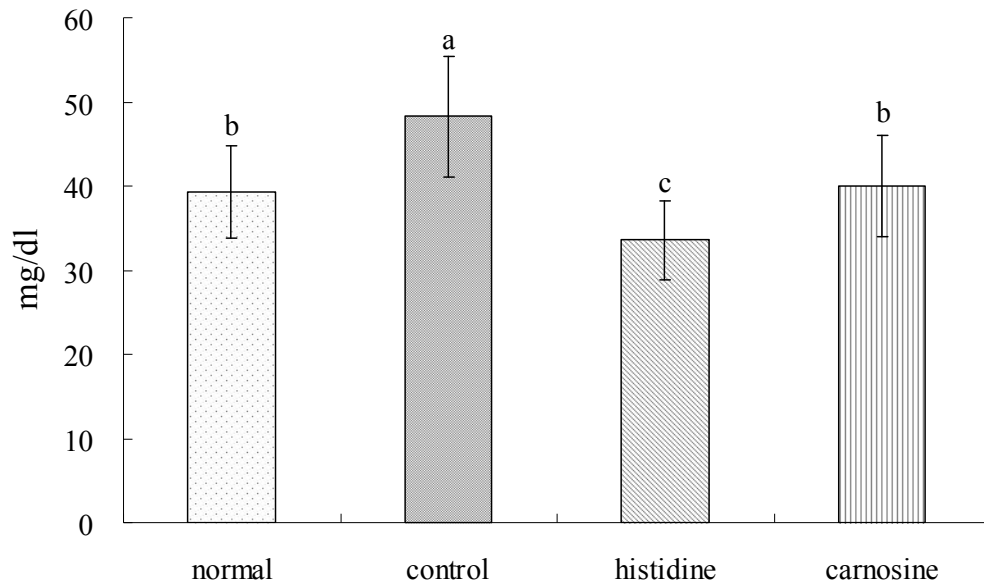
control：餵食含 5% 奶油飲食，正常飲水，n=12

histidine：餵食含 5% 奶油飲食，飲水含 1 g/L histidine，n=18

carnosine：餵食含 5% 奶油飲食，飲水含 1 g/L carnosine，n=18

2. 英文字母不同表示與同週數的其他組相比有顯著差異 ($p < 0.05$)

LDL-serum



【圖 4.14】不同組別血清的 LDL 含量

1. normal：正常飲食飲水，n=12

control：餵食含 5% 奶油飲食，正常飲水，n=12

histidine：餵食含 5% 奶油飲食，飲水含 1 g/L histidine，n=18

carnosine：餵食含 5% 奶油飲食，飲水含 1 g/Lcarnosine，n=18

2.英文字母不同表示與同週數的其他組相比有顯著差異 ($p < 0.05$)

第五章 討論

本實驗室過去的研究顯示，預先餵食 histidine 和 carnosine 對於糖尿病、酒精性肝損傷和急性肝損傷等均有抗氧化、抗發炎等保護效果(Lee et al., 2005; Liu et al., 2008; Yan et al., 2009)。這次本實驗更進一步發現，餵食 histidine 和 carnosine 對於飽和脂肪所引起之肝臟、心臟和血清的氧化發炎和血脂上升的情形，也都具有保護的效應。

飼養的八週期間，四組體重均沒有顯著差異產生，但反觀臟器重則顯示，有攝取 5%奶油的小鼠在肝臟和副睪脂重量都比 normal 組高。Matsuzawa 的研究指出，內臟脂肪的堆積易引起代謝症候群，如高血脂症和葡萄糖耐受性差等病症產生，甚至影響脂蛋白如 LDL 的變化(Matsuzawa, 2010)，由此可推斷攝取 5%奶油的小鼠或許具代謝症候群之風險。本實驗的脂質分析顯示，餵食八週 5%奶油的 control 組，無論是肝臟或血清的總膽固醇、低密度脂蛋白和三酸甘油酯含量，均顯著高於攝取正常飲食的 normal 組。而攝取 1 g/L histidine 和 carnosine 的組別和 control 組相比，能有效降低 5%奶油飲食造成 TG 上升的情形，進而提供保護血清和心臟的效果。在肝臟總膽固醇(TC)方面，則呈現和 TG 一樣的結果。據 Kalant 和 McCormick 在 in vivo 的相關實驗指出，histidine 可保護 LDL 避免受到氧化傷害(Kalant and McCormick, 1992)，另外本實驗室在 2005 年的 in vitro 實驗也證實，1 g/L 和 2 g/L 的 histidine 和 carnosine 在人體的 LDL 中，均可有效抑制高濃度葡萄糖誘發的氧化和糖化傷害(Lee et al., 2005)。本實驗老鼠血清中 LDL 含量顯示，histidine 組和 carnosine 組均顯著低於 control 組，其中 histidine 組又更低於 normal 組。此結果顯示，histidine 和 carnosine 都有助於維持體內 LDL 含量，避免受到飽和脂肪影響而上升，其中 histidine 組不僅能維持，更可以降低血清中 LDL 含量。本實驗攝取 5%奶油的組別顯示肝臟脂肪較高，由後續的血脂和前細胞激素分析可證實內臟脂肪確實為代謝症候群的危險因子。

一、Histidine 和 Carnosine 的氧化發炎防禦

攝取飽和脂肪易在體內形成脂質過氧化物 (LPO; lipid peroxidation)，LPO 為一不穩定物種，會藉由和其他脂肪酸或促氧化物反應產生更多的 LPO，而提高細胞和組織的氧化壓力。大多數已知的抗氧化物都具有其特殊的構造或機制來預防氧化傷害，如阻擋自由基起始反應的產生、與活性氧物種作用、穩定細胞膜等。

已有文獻證實，histidine 和 carnosine 具高度的還原力可有效的擷取金屬離子，如銅、鐵離子，形成複合結構以避免氧化傷害發生(Pisarenko, 1996)。在非金屬離子引起的氧化反應時，histidine 和 carnosine 的抗氧化能力大部分歸功於其捕捉 OH[•]和脂質過氧化物等自由基之活性。histidine 和 carnosine 結構類似，均具有 imidazole ring，可提供電子與自由基反應，穩定結構並終止連鎖反應發生 (Boldyrev and Severin, 1990; Kohen et al., 1988)。本實驗室 2005 年以糖尿病老鼠為動物模式研究，histidine 和 carnosine 分別在肝臟和腎臟的 MDA 含量、catalse 和 GPx activity 的分析上都具有降低氧化傷害的能力，兩者的效果之間沒有差異性(Lee et al., 2005)。而 2007 年 histidine 和 carnosine 在酒精性慢性肝損傷的小鼠實驗觀察到，肝臟的 catalse activity 分析上除了 0.5 g/L 的 histidine 和 carnosine 具一樣的抗氧化效果之外，無論是 1 或 2 g/L 的 carnosine 其緩和氧化傷害的能力均比 histidine 顯著(Liu et al., 2008)。另外，2009 年分別以劑量 0.5、1、2 g/L 的 histidine 和 carnosine 實驗，研究對以 APAP 誘發急性肝損傷的小鼠之效果，結果發現三個劑量都具抑制氧化的成效，其中以攝取 1 和 2 g/L carnosine 小鼠肝臟的 SOD、Catalse 和 GPx activity 都比 histidine 呈現更優秀的抗氧化力(Yan et al., 2009)。本實驗無論是 histidine 或 carnosine 都具緩和 5%奶油飲食所造成的氧化傷害，但在 GSH、總抗氧化含量和 GPx、SOD activity 分析上，兩著的效果之間並沒有觀察到差異性。

攝取飽和脂肪飲食的老鼠，因體內的脂蛋白受飽和脂肪的氧化形成氧化型態的低密度脂蛋白，進而產生發炎與氧化反應，為對抗升高的氧化壓力，體內的抗

氧化物的含量和活性均會因消耗而減少。本實驗結果顯示，餵食八週 5%奶油飲食的小鼠其 GSH、總抗氧化含量和 GPx、SOD activity 均顯著低於 normal 的組別。因此，體內氧化壓力呈現較高的狀態。反觀 histidine 組和 carnosine 組，對於維持體內 GSH、總抗氧化含量和 GPx、SOD activity 都有顯著的效果，與 Babizhayev 研究證實的抗氧化效果結果一致(Babizhayev et al., 1994; Ukeda, 2002)，除了肝臟 MDA 含量較異常外，本實驗結果均顯示 histidine 和 carnosine 可回復 5%奶油飲食造成的氧化傷害。原本預期奶油飲食的 control 組會受脂質過氧化物的影響，會有較多的 MDA 產物，由本實驗室之前研究證實 histidine 組和 carnosine 組可減少脂質過氧化物 MDA 生成(Yan et al., 2009)，此與本實驗之分析結果不相印證，可能的原因仍須多加探討。但若同時參考 GSH 的分析，單就 control 組和實驗組的比較，histidine 組和 carnosine 組並沒有產生比 control 組更多的脂質氧化產物，不會進一步惡化氧化傷害。

前發炎細胞激素 IL-6 和 TNF- α 為引起發炎反應的主要指標(Mohamed-Ali et al., 2001; Tomita et al., 2004)。本實驗結果顯示，攝取奶油飲食組別的肝臟和心臟都有較高的 IL-6 和 TNF- α ，表示發炎的程度比正常組別嚴重。實驗結果可觀察到，肝臟和心臟在 carnosine 的組別其 IL-6 含量顯著低於 control 組，而 histidine 組和無論是 normal 或 control 的組別相比都沒有差異性。在 TNF- α 含量的分析方面，肝臟的結果呈現和 IL-6 分析一樣的情形，反觀心臟的 histidine 組和 carnosine 組都顯著低於 control 組。本實驗室 2005 年以糖尿病老鼠為動物模式研究，histidine 和 carnosine 降低 IL-6、TNF- α level 的能力一樣，在統計上沒有顯著差異(Lee et al., 2005)。2007 年 Liu 等人的動物研究指出，histidine 和 carnosine 對於慢性酒精性肝損傷具保護的效果，可降低 IL-6、TNF- α 和 CRP 的量進而緩和由酒精引起的發炎反應，減少肝臟 histidine 和 carnosine 的含量，並具有劑量依存性，除了在 TNF- α 的結果呈現一致之外，在肝臟 IL-6 和 CRP 的分析可觀察到，1 和 2 g/L 的 histidine 其抗發炎效果比 carnosine 好，0.5 g/L 的組別並沒有看到差異性(Liu et al., 2008)。另外，2009 年分別以劑量 0.5、1、2 g/L 的 histidine 和

carnosine 實驗，研究對以 APAP 誘發急性肝損傷的小鼠之效果，結果發現三個劑量都具抑制發炎的成效，在肝臟 TNF- α 、IL-6、IL-10 和 MCP-1 的分析發現，histidine 的效果又比 carnosine 略好(Yan et al., 2009)。2005 年 Son 等人的細胞研究顯示，histidine 可抑制氧化壓力和 TNF- α 誘導產生的 IL-8 分泌，也同樣具劑量依存性(Son et al., 2005)。雖然在本實驗僅部分支持 histidine 對心臟和肝臟的抗發炎效果，但綜合上述均支持 histidine 和 carnosine 的抗發炎特性。

二、Histidine 和 Carnosine 減少脂質堆積

Carnosine 在體內可代謝為 histidine 和 β -alanine，而 histidine 為 histamine 的前驅物。Schwartz 等人證實，以 IP 注射 histidine 在大鼠，其腦部的 histamine 會增加(Schwartz et al., 1972)。Yoshimatsu 等人進一步指出，以 IP 注射大鼠 histidine，會加速體內的脂肪分解(Yoshimatsu et al., 2002)。Histidine decarboxylase 可幫助 histidine 轉換為 histamine，此酵素可在下視丘中發現(Taylor and Snyder, 1972)。有動物研究指出，熱量的攝取和 histidine 的攝取量呈現負相關性(Nakajima et al., 2000; Nakajima et al., 2001)，也就是說，攝取的 histidine 越多時，對熱量的攝取反而減少，綜合上述的結果顯示，histamine 或許具抑制食慾的效果。

Histamine 神經元可藉由向上調控 UCP-1 的 mRNA 表現量，進而減少脂質的堆積，UCP-1 的基因表現受到甲狀腺荷爾蒙的調控，對於啮齒類在寒冷環境的體溫維持和適應性產熱(Adaptive thermogenesis)扮演重要的角色(Silva and Rabelo, 1997)。2002 年前人以 UCP-1 的轉殖基因鼠研究發現，小鼠的體重減輕、增加氧氣的消耗並討厭進食(Bernal-Mizrachi et al., 2002)。2004 年另外一個動物實驗也証實，大鼠的腹部脂肪量和 histidine 的攝取量呈現負相關性，而棕色脂肪內的 UCP-1 的 mRNA 表現量則和 histidine 的攝取量呈現正相關性(Kasaoka et al., 2004)。由以上論點推測本研究中老鼠攝取 histidine 也許可藉由向上調控 UCP-1 的 mRNA 表現量來刺激 histamine 神經元，進而減少內臟脂肪的堆積，避免代謝症候群的風險。

有關於 carnosine 減少脂肪累積的文獻至今仍不齊全，除了藉由代謝為 histamine 調控之外，有動物實驗指出，L-carnosine 可能藉由調控 apoE 來降低 Zucker 大鼠體內的脂質含量，並改善血脂不平衡的情形(Aldini et al.)。由上述文獻與本實驗結果可推論，histidine 和 carnosine 可改善減少脂質堆積，雖然詳細的機制仍不明瞭，未來有繼續探討開發的空間和可看性。

綜合以上敘述，histidine 和 carnosine 對於抗氧化、抗發炎和減少脂質都具有功效，在本實驗中兩者的效用並沒有顯著差異，以價錢而論，carnosine 比 histidine 昂貴，故就這個觀點來說，histidine 可能是較佳的選擇，同時也能達到和 carnosine 相同的功效。另外，過敏體質的患者不建議攝取 histidine 和 carnosine，避免其代謝產物 histamine 所引起的過敏反應，有關於 histamine 相關的文獻尚未非常齊全，值得進一步探討。



第六章 結論

C57BL/6JNarl 老鼠飲用含 1 g/L histidine 和 carnosine 的飲水為期八週，可改善攝取 5% 奶油飲食所造成的氧化、發炎和脂質堆積等傷害。本實驗結果支持 histidine 和 carnosine 或許可減緩或預防肥胖相關疾病。



第七章 參考文獻

- 林孟曉, 2005. Histidine 和 Carnosine 延緩糖尿病惡化之動物研究.
- 食品工業發展研究所, 屏東科技大學, 1998. 台灣地區食品營養成分表. 行政院衛生署.
- 陳豪勇, 2002. 免疫生物學. 藝軒圖書出版社 第一版.
- Aldini, G., Orioli, M., Rossoni, G., Savi, F., Braidotti, P., Vistoli, G., Yeum, K.J., Negrisoli, G., Carini, M., 2010. The carbonyl scavenger carnosine ameliorates dyslipidemia and renal function in Zucker obese rats. *J Cell Mol Med*, Epub.
- Artun, B., Küskü-Kiraz, Z., Gulluoglu, M., Cevikbas, U., Koçak-Toker, N., Uysal, M., 2010. The effect of carnosine pretreatment on oxidative stress and hepatotoxicity in binge ethanol administered rats. *Hum Exp Toxicol.*, Epub.
- Babizhayev, M., Seguin, M., Gueyne, J., Evstigneeva, R., Ageyeva, E., Zheltukhina, G., 1994. L-carnosine (beta-alanyl-L-histidine) and carcimine (beta-alanylhistamine) act as natural antioxidants with hydroxyl-radical-scavenging and lipid-peroxidase activities. *Biochem J.*, 304, 509-516.
- Bernal-Mizrachi, C., Weng, S., Li, B., 2002. Respiratory uncoupling lowers blood pressure through a leptin-dependent mechanism in genetically obese mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 22, 961-968.
- Boldyrev, A.A., Severin, S.E., 1990. The histidine-containing dipeptides, carnosine and anserine: distribution, properties and biological significance. *Adv Enzyme Regul*, 30, 175-94.
- Cai, Q., Takemura, G., Ashraf, M., 1995. Antioxidative properties of histidine and its effect on myocardial injury during ischemia/reperfusion in isolated rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol*, 25, 147-155.
- Chowdhury, B., Sjostrom, L., Alpsten, M., Kostanty, J., Kvist, H., Lofgren, R., 1994. A multicompartiment body composition technique based on computerized tomography. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 18, 219-234.
- Cnop, M., 2008. Fatty acids and glucolipotoxicity in the pathogenesis of Type 2 diabetes. *Biochem Soc Trans*, 36, 348-352.
- Dieleman, L.A., Elson, C.O., Tennyson, G.S., Beagley, K.W., 1996. Kinetics of cytokine expression during healing of acute colitis in mice. *Am J Physiol*, 271, 130-136.
- Fiona, A. W., Miles, E.A., Evans, C., Stock, T.E., Yaqoob, P., Calder, P.C., 2001.

- Dietary fatty acids influence the production of Th1- but not Th2-type cytokines *J Leukoc Biol.* , 69, 449-457.
- Fulop, A.K., Foldes, A., Buzas, E., Hegyi, K., Miklos, I.H., Romics, L., Kleiber, M., Nagy, A., Falus, A., Kovacs, K.J., 2003. Hyperleptinemia, visceral adiposity, and decreased glucose tolerance in mice with a targeted disruption of the histidine decarboxylase gene. *Endocrinology*, 144, 4306-4314.
- Galgani, J.E., Uauy, R.D., Aguirre, C.A., Diaz, E.O., 2008. Effect of the dietary fat quality on insulin sensitivity. *Br J Nutr*, 100, 471-479.
- Gerber, D.A., Gerber, M.G., 1977. Specificity of a low free serum histidine concentration for rheumatoid arthritis. *J Chronic Dis*, 30, 115-127.
- Gonzalez-Barroso, M., Ricquier, D., Cassard-Doulcier, A., 2000. The human uncoupling protein-1 gene (UCP): present status and perspectives in obesity research. *Obesity Rev*, 1, 61-72.
- Guiotto, A., Calderan, A., Ruzza, P., Borin, G., 2005. Carnosine and carnosine-related antioxidant: a review. *Curr Med Chem*, 12, 2293-2315.
- Hegsted, D.M., McGandy, R.B., Myers, M.L., Stare, F.J., 1965. Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man. *Am J Clin Nutr*, 17, 281-295.
- Himms-Hagen, J., 2001. Does brown adipose tissue (BAT) have a role in the physiology or treatment of human obesity? *Rev Endocr Metab Disord*, 2, 395-401.
- Hipkiss, A., 2007. Could carnosine or related structures suppress Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis* 11, 229-240.
- Ibrahim, W., Tatum, V., Yeh, C., Hong, C., Chow, C., 2008. Effects of dietary carnosine and vitamin E on antioxidant and oxidative status of rats. *Int J Vitam Nutr Res* 78, 230-237.
- Kalant, N., McCormick, S., 1992. Inhibition by serum components of oxidation and collagen-binding of low-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta*, 1128, 211-219.
- Kang, J.H., Kim, K.S., Choi, S.Y., Kwon, H.Y., Won, M.H., Kang, T.-C., 2002. Protective effects of carnosine, homocarnosine and anserine against peroxy radical-mediated Cu,Zn-superoxide dismutase modification. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1570, 89-96.
- Kasaoka, S., Tsuboyama-Kasaoka, N., Kawahara, Y., Inoue, S., Tsuji, M., Ezaki, O., Kato, H., Tsuchiya, T., Okuda, H., Nakajima, S., 2004. Histidine supplementation suppresses food intake and fat accumulation in rats. *Nutrition*, 20, 991-996.
- Kern, P.A., Ranganathan, S., Li, C., Wood, L., Ranganathan, G., 2001. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and

- insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 280, 745-751.
- Kien, C.L., Bunn, J.Y., Ugrasbul, F., 2005. Increasing dietary palmitic acid decreases fat oxidation and daily energy expenditure. *Am J Clin Nutr*, 82, 320-326.
- Kohen, R., Yamamoto, Y., Cundy, K.C., Ames, B.N., 1988. Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 3175-3179.
- Kopple, J., Swendseid, M., 1975. Evidence that histidine is an essential amino acid in normal and chronically uremic man. *J Clin Invest*, 55, 881-91.
- Lago, F., Dieguez, C., Gomez-Reino, J., Gualillo, O., 2007. Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nat Clin Pract Rheumatol.*, 3, 716-724.
- Lee, Y.T., Hsu, C.C., Lin, M.H., Liu, K.S., Yin, M.C., 2005. Histidine and carnosine delay diabetic deterioration in mice and protect human low density lipoprotein against oxidation and glycation. *Eur J Pharmacol*, 513, 145-150.
- Liu, W.H., Liu, T.C., Yin, M.C., 2008. Beneficial effects of histidine and carnosine on ethanol-induced chronic liver injury. *Food Chem Toxicol*, 46, 1503-1509.
- Lundman, P., Boquist, S., Samnegard, A., Bennermo, M., Held, C., Ericsson, C., Silveira, A., Hamsten, A., Tornvall, P., 2007. High-fat meal is accompanied by increased plasma interleukin-6 concentrations. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.*, 17, 195-202.
- Müller, H., Lindman, A., Brantsaeter, A., Pedersen, J., 2003. The serum LDL/HDL cholesterol ratio is influenced more favorably by exchanging saturated with unsaturated fat than by reducing saturated fat in the diet of women. *J Nutr.* , 133, 78-83.
- Masaki, T., Yoshimatsu, H., Chiba, S., Watanabe, T., Sakata, T., 2001. Targeted disruption of histamine H1-receptor attenuates regulatory effects of leptin on feeding, adiposity, and UCP family in mice. *Diabetes* 50, 385-391.
- Matsuzawa, Y., 2010. Establishment of a concept of visceral fat syndrome and discovery of adiponectin. *Proc. Jpn. Acad.*, 86, 131-141
- Maynard, L.M., Boissonneault, G.A., Chow, C.K., Bruckner, G.G., 2001. High levels of dietary carnosine are associated with increased concentrations of carnosine and histidine in rat soleus muscle. *J Nutr*, 131, 287-290.
- McFarland, G., Holliday, R., 1999. Further evidence for the rejuvenating effects of the dipeptide L-carnosine on cultured human diploid fibroblasts. *Exp Gerontol.*, 34, 35-45.
- Mohamed-Ali, V., Armstrong, L., Vlack, D., Bolton, C.H., Pinkney, J.H., 2001. Evidence for the regulation of levels of plasma adhesion molecules by

- inflammatory cytokines and their soluble receptors in type 1 diabetes. *J. Internal Med.*, 250, 415-421.
- Mohamed-Ali, V., Goodrick, S., Rawesh, A., Katz, D., Miles, J., Yudkin, J., Klein, S., Coppack, S., 1997. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab.*, 12, 4196-4200.
- Nakajima, S., Hamada, M., Tsuchiya, T., Okuda, H., 2000. Suppression of food intake by histidine-rich protein under low energy intake. *J Jpn Soc Nutr Food Sci*, 53, 207-214.
- Nakajima, S., Tanaka, K., Hamada, M., Tsuchiya, T., Okuda, H., 2001. Correlation between energy and histidine intake in female living in Setouchi area. *J Jpn Soc Stud Obes*, 7, 276-282.
- Nakamura, E., Kataoka, T., Furutani, K., Jimbo, K., Aihara, T., Tanaka, S., Ichikawa, A., Ohtsu, H., Okabe, S., 2004. Lack of histamine alters gastric mucosal morphology: comparison of histidine decarboxylase-deficient and mast cell-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 287, 1053–1061.
- Piot, C., Hocquette, J., Veerkamp, J., Durand, D., Bauchart, D., 1999. Effects of dietary coconut oil on fatty acid oxidation capacity of the liver, the heart and skeletal muscles in the preruminant calf. *Br J Nutr.*, 4, 299-308.
- Pisarenko, O., 1996. Mechanisms of myocardial protection by amino acids: facts and hypotheses. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 23, 627-633.
- Salah, E., Gariballa, Sinclair, A.J., 2000. Carnosine: physiological properties and therapeutic potential. *Age and Ageing* 29, 207-210.
- Samuelson, G., Bratteby, L., Mohsen, R., Vessby, B., 2001. Dietary fat intake in healthy adolescents: inverse relationships between the estimated intake of saturated fatty acids and serum cholesterol. *Br J Nutr.*, 85, 333-341.
- Schwartz, J., Lampart, C., Rose, C., 1972. Histamine formation in rat brain in vivo: effects of histidine loads. *J Neurochem*, 19, 801-810.
- Seo, T., Qi, K., Chang, C., Liu, Y., Worgall, T., Ramakrishnan, R., Deckelbaum, R., 2005. Saturated fat-rich diet enhances selective uptake of LDL cholesteryl esters in the arterial wall. *J Clin Invest.*, 115, 2214-2222.
- Silva, J., Rabelo, R., 1997. Regulation of the uncoupling protein gene expression. *Eur J Endocrinol*, 136, 251-264.
- Son, D., Satsu, H., Shimizu, M., 2005. Histidine inhibits oxidative stress- and TNF-alpha-induced interleukin-8 secretion in intestinal epithelial cells. *FEBS Lett*, 579, 4671-4677.
- Suganami, T., Tanimoto-Koyama, K., Nishida, J., Itoh, M., Yuan, X., Mizuarai, S., Kotani, H., Yamaoka, S., Miyake, K., 2007. Role of toll-like receptor4/NFkB

- pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 27, 84-91.
- Taylor, K., Snyder, S., 1972. Isotopic microassay of histamine, histidine, histidine decarboxylase and histamine methyltransferase in brain tissue. *J Neurochem*, 19, 1343-1358.
- Tomita, M., Dragoman, M., Worcester, H., Conran, P., Santoro, T.J., 2004. Proinflammatory cytokine genes are constitutively overexpressed in the heart in experimental systemic lupus erythematosus: a brief communication. *Exp. Biol. Med.*, 229, 971-976.
- Ukeda, H., Hasegawa, Y., Harada, Y., Sawamura, M., 2002. Effect of carnosine and related compounds on the inactivation of human Cu, Zn superoxide dismutase by modification of fructose and glycolaldehyde. *Biotechnol. Biochem.*, 66, 36-43.
- Visek, W., 1984. An update of concepts of essential amino acids. *Annu Rev*, 4, 137-155.
- Xu, H., Uysal, K., Becherer, J.D., Arner, P., Hotamisligil, G.S., 2002. Altered tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) processing in adipocytes and increased expression of transmembrane TNF-alpha in obesity. *Diabetes.*, 6, 1876-1883.
- Yan, S.L., Wu, S.T., Yin, M.C., Chen, H.T., Chen, H.C., 2009. Protective effects from carnosine and histidine on acetaminophen-induced liver injury. *J Food Sci*, 74, 259-265.
- Yoshimatsu, H., Tsuda, A., Nijima, M., Tatsukawa, S., Sakata, T., 2002. Histidine induces lipolysis through sympathetic nerve in white adipose tissue. *Eur J Clin Invest*, 32, 136-141.