

中國醫藥大學營養學系

碩士論文

Histidine 對脂質代謝的影響－高飽和油脂之動物模式

The influence of histidine upon lipid metabolism-a model of animals consumed high saturated fat diet

研究生：李欣珮 Hsin-pei Lee

指導教授：殷梅津 教授 Mei-chin Yin, PH.D.

中華民國 100 年 6 月 21 日

中國醫藥大學營養學系

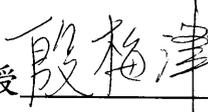
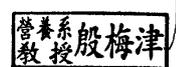
論文指導教授推薦書

營養學系碩士班：李欣珮君所提之論文

中文：Histidine 對脂質代謝的影響－高飽和油脂之動物
模式

英文：The influence of histidine upon lipid metabolism-a
model of animals consumed high saturated fat diet

係由本人指導撰述，同意提付審查。

指導教授  (簽章)


中華民國 100 年 6 月 21 日

中國醫藥大學營養學系

論文口試委員審定書

論文題目：

中文：Histidine 對脂質代謝的影響－高飽和油脂之動物
模式

英文：The influence of histidine upon lipid metabolism-a
model of animals consumed high saturated fat diet

本論文係李欣珮於中國醫藥大學營養學系碩士班
完成之碩士論文，經考試委員審查及考試合格，特此證
明。

委員姓名	服務機關	職稱	考試委員簽章
殷梅津	中國醫藥大學	教授	殷梅津
徐成金	中山醫學大學	教授	徐成金
詹恭巨	靜宜大學	副教授	詹恭巨

中華民國 100 年 6 月 21 日

目錄

	頁次
目錄	i
表目錄	iii
圖目錄	iv
摘要	I
Abstract.....	II
第一章 前言	1
第二章 文獻探討	2
一、 飽和脂肪與健康	2
二、 脂肪組織(Adipose tissue)	5
三、 肥胖與脂肪組織	7
四、 脂肪代謝相關的荷爾蒙	8
五、 組胺酸 (Histidine ; His).....	13
六、 Carnosine與histidine在本實驗室過去研究	16
第三章 研究目的	18
第四章 材料方法	19
一、 實驗材料	19
二、 實驗方法	23
三、 分析方法	26

四、 統計分析	40
第五章 結果	41
一、 體重變化	41
二、 飲水量	41
三、 臟器重量	41
四、 血糖、血清insulin濃度及HOMA-IR	42
五、 脂質變化	42
六、 血清、心臟及腎臟中uric acid濃度	43
七、 心臟及腎臟中xanthine oxidase活性	43
八、 血清賀爾蒙分析	43
九、 脂肪酸組成	44
十、 血中賀爾蒙與副睪脂質重量的相關性	45
第六章 討論	63
一、 高飽和脂肪酸飲食	63
二、 胰島素阻抗之探討	65
三、 Histidine對於體脂肪之影響	66
四、 細胞激素之影響	68
五、 尿酸與氧化壓力之影響	70
第七章 結論	72
第八章 參考文獻	73

表目錄

	頁次
【表 4-1】 奶油成分表	20
【表 4-2】 MF-18 飼料一般成分表	20
【表 4-3】 MF-18 飼料成分組成表	21
【表 4-4】 實驗分組	23
【表 4-5】 不同樣品所分析的項目	25
【表 4-6】 蛋白質測定的標準品配製	26
【表 4-7】 Xanthine oxidase標準品配製	33
【表 5-1】 餵食不同濃度histidine後臟器與體重之相對重量	48
【表 5-2】 餵食不同濃度histidine之小鼠血糖、血清insulin濃度及HOMA-IR	49
【表 5-3】 本實驗所使用之飼料與奶油脂肪酸的組成	58
【表 5-4】 餵食不同濃度histidine後肝臟脂肪酸組成	59

圖目錄

	頁次
【圖 2-1】 脂肪酸生成路徑圖	3
【圖 2-2】 Arachidonic acid及eicosapentaenoic acid氧化代謝路徑圖.....	4
【圖 2-3】 肥胖引起脂肪激素分泌的改變，並發展為胰島素阻抗.....	6
【圖 2-4】 肥胖引起低程度的發炎反應.....	7
【圖 2-5】 肥胖降低adiponectin的作用進而造成胰島素阻抗	10
【圖 2-6】 過多的脂肪堆積於脂肪組織可能造成的影響.....	13
【圖 2-7】 Histidine的結構.....	13
【圖 2-8】 Histidine代謝圖	15
【圖 4-1】 Xanthine oxidase作用反應圖	32
【圖 5-1】 進行 8 週實驗期間每週的體重變化.....	46
【圖 5-2】 進行 8 週實驗之平均飲水量.....	47
【圖 5-3】 餵食不同濃度histidine之小鼠血清及肝臟中Triglyceride(TG)濃度.....	50
【圖 5-4】 餵食不同濃度histidine之小鼠血清及肝臟Total Cholesterol(TC)濃度.....	51
【圖 5-5】 餵食不同濃度histidine之小鼠肝臟中LDL cholesterol(LDL-C)濃度.....	52
【圖 5-6】 餵食不同濃度histidine之小鼠血清、心臟及腎臟中uric acid濃度.....	53
【圖 5-7】 餵食不同濃度histidine之小鼠心臟及腎臟中xanthine oxidase活性.....	54
【圖 5-8】 餵食不同濃度histidine之小鼠血清中leptin濃度.....	55

【圖 5-9】 餵食不同濃度histidine之小鼠血清中ghrelin濃度	56
【圖 5-10】 餵食不同濃度histidine之小鼠血清中adiponectin濃度	57
【圖 5-11】 Leptin與副睪脂質重量的相關性.....	60
【圖 5-12】 Ghrelin與副睪脂質重量的相關性.....	61
【圖 5-13】 Adiponectin與副睪脂質重量的相關性.....	62



摘要

Histidine 為人體必需胺基酸之一，存在於腦、骨骼肌、肝臟中。已有研究顯示其具有抗氧化、抗發炎等保護作用。本實驗室之前研究顯示，飲水中 0.1% histidine 或 canosine 的添加可降低餵食 5% 奶油飲食的小鼠其發炎及氧化傷害。由於添加 histidine 與 carnosine 兩者有相似的效果，而 carnosine 價位較高，因此本研究將探討於給予不同濃度的 histidine 飲水，對於餵食 15% 奶油飲食的小鼠之影響。本實驗使用 4 週齡大的 C57BL/6 小鼠，分成 (1) 正常組：餵食一般飲食 (2) 控制組：為添加 15% 奶油飲食及一般飲水 (3) 0.1% histidine 組：15% 奶油飲食與 0.1% 的 histidine 飲水 (4) 0.2% histidine 組：15% 奶油飲食與 0.2% 的 histidine 飲水。餵食 8 週後犧牲，並測定體重、血糖、副睪脂重、胰島素、體脂質、尿酸、xanthine oxidase 與脂質代謝相關荷爾蒙。實驗結果發現，餵食 15% 奶油飲食可以顯著增加體重、副睪脂重、胰島素、心臟、肝臟和腎臟的尿酸、血清和肝臟三酸甘油酯及總膽固醇、肝臟 LDL，賀爾蒙方面有血清 leptin 濃度提高，血清 ghrelin 與 adiponectin 濃度下降。而給予 histidine 的飲水後，顯著降低小鼠血清 insulin、HOMA-IR 值與尿酸濃度；也顯著降低血清膽固醇、肝臟三酸甘油酯、LDL 及 leptin 濃度；也提高血清 ghrelin 及 adiponectin 濃度。實驗結果推測 histidine 的補充，可能可以減緩因攝取大量飽和脂肪所造成的高血脂及胰島素阻抗，進而降低代謝症候群的發生。

關鍵字：Histidine、飽和脂肪、胰島素阻抗

Abstract

Histidine is an essential amino acid and present in brain, skeletal muscle and liver. Several studies have reported that it could provide anti-oxidative and anti-inflammatory protection. Our previous study also found that histidine or carnosine supplement markedly reduced oxidative and inflammatory stress in mice consumed 5% high saturated fat diet (HFD). Furthermore, we observed that histidine and carnosine exhibited similar effects. The major purpose of this present study was to investigate the effects of 0.1% and 0.2% histidine in mice consumed 15% HFD prepared from butter. Mice were divided into 4 groups: normal diet with water, 15% HFD with water, 15% HFD with 0.1% histidine and 15% HFD with 0.2% histidine for 8 weeks. Results showed that mice consumed HFD had higher body weight, epididymal fat weight, insulin, uric acid, triglyceride (TG), total cholesterol (TC), low density lipoprotein and leptin levels; and lower ghrelin and adiponectin levels than mice with normal diet. However, the intake of histidine significantly diminished level of insulin, HOMA-IR, uric acid, liver TG, LDL, serum TC. Supplementation of histidine also significantly reduced leptin, and increased ghrelin and adiponectin. These findings suggested that histidine was a potent agent to alleviate high fat diet induced hyperlipidemia and insulin resistance.

Key words : histidine, saturated fat, insulin resistance

第一章 前言

飽和脂肪來源主要以動物性油脂居多，如豬油、牛油、奶油和乳酪等。植物來源則有椰子油、棕櫚油等。其中奶油的組成主要為短鏈的飽和脂肪酸，一般常用於西式糕點類，也可直接塗抹於麵包上食用，若飲食習慣喜愛吃西式糕點類的食材，則可能會攝取到過多的飽和脂肪酸，進而提高罹患心血管疾病的危險。

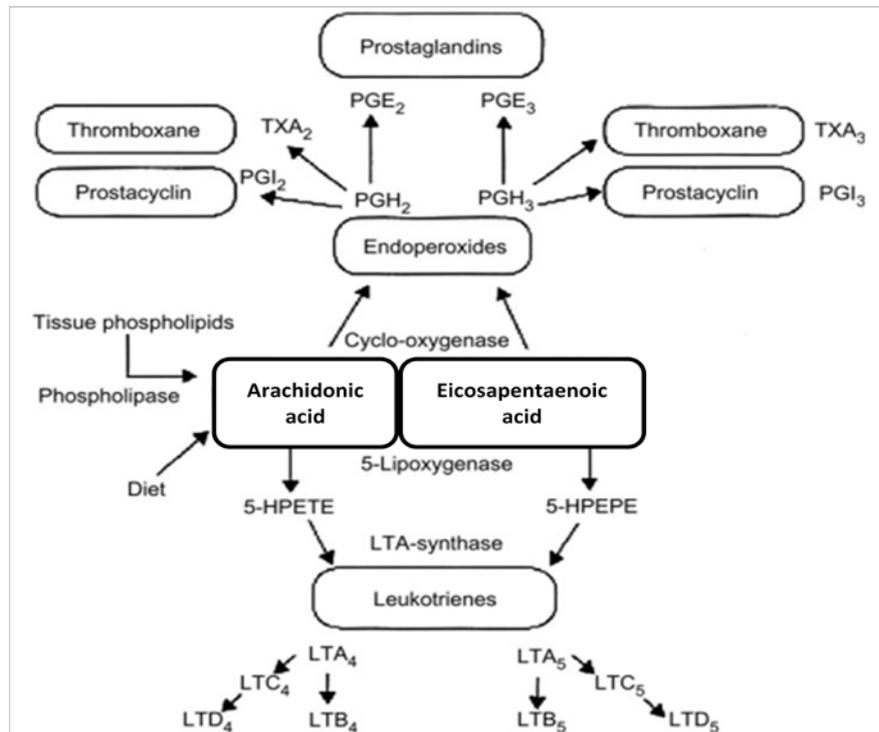
Histidine(組胺酸)為一種胺基酸，常出現於動物性食品，如紅肉、牛奶。Carnosine 是由 β -alanine 與 L-histidine 所組成的內生性雙胺基酸，carosine 可發現於脊椎動物的腦，肝臟及骨骼肌中，可在體內代謝為 histidine 與 alanine。已有許多研究證實，histidine 具有清除自由基、抗氧化、抗發炎等保護作用。而本實驗室先前研究指出，給予含 5% 奶油的高飽和油脂飲食之動物，並在飲水中添加 0.1% histidine 與 carnosine，結果發現兩者皆可減少由 5% 飽和脂肪所造成的脂肪堆積。但兩者效果相似，且 histidine 價位較低。因此本實驗將進一步探討飼食含 15% 奶油飲食之動物，並給予 0.1% 及 0.2% 的 histidine 飲水，並分析其體脂肪如 TG、TC、LDL 及相關荷爾蒙之影響，期望以 histidine 取代 carnosine 的攝取，可以對於高量飽和脂肪飲食所造成的肥胖有保護效果。

第二章 文獻探討

一、飽和脂肪與健康

高飽和脂肪飲食對人體健康的影響已有很多研究。攝取高飽和油脂飲食可以促使肥胖的產生 (Lee, Pinnamaneni et al. 2006; Araújo, Leite et al. 2011)；而大量食用飽和脂肪(16:0)時，不只會增加白色脂肪組織的堆積，且會透過 reactive oxygen species (ROS)生成，造成氧化壓力，增加發炎作用及細胞凋亡 (Kennedy, Martinez et al. 2009)。飲食中若攝取大量的飽和脂肪，會增加血中總膽固醇及 LDL。當血液 LDL 過多時，易滯留在血管壁形成氧化型 LDL，刺激黏附因子及吸引 T 細胞及單核球細胞，另一方面刺激巨噬細胞產生許多發炎因子並吞噬氧化型 LDL，形成泡沫細胞，堆積在血管壁上進而增加心血管疾病的危險 (Seo, Qi et al. 2005)。文獻指出，飽和脂肪酸易造成脂肪堆積以及胰島素阻抗 (Lee, Pinnamaneni et al. 2006)。動物研究也證實，餵食高飽和脂肪飲食會使大鼠的體重與副睪脂質重量增加、肝臟三酸甘油酯堆積、並顯著上升血中三酸甘油酯、總膽固醇及 LDL 濃度，也會造成脂肪肝 (Ha, Kim et al. 2011)。給予小鼠高油飲食會增加 sterol regulatory element-binding proteins (SREBP)-1c 的表現量，SREBP-1c 為一轉錄因子，活化 SREBP-1c 可刺激 acetyl coenzyme-A carboxylase (ACC)、fatty acid synthase(FAS)的基因表現，增加脂質的生合成 (Peng, Rideout et al. 2009)。大鼠餵食高飽和油脂飲食 8 週後，會使體重增加；造成高血糖及胰島素阻抗；並增加脂質過氧化與蛋白質氧化，進而導致非酒精性肝炎 (Carmiel-Haggai, Cederbaum et al. 2005)。

如【圖 2-1】(Mathias, Vergara et al. 2010)所示，飲食中的飽和脂肪酸可能會在體內經由酵素代謝產生 16:1 或 18:1 脂肪酸；另一方面飲食中的 18:2 及 18:3 脂肪酸也可分別經由酵素代謝生成 omega-6 (n-6)與 omega-3(n-6)系列脂肪酸。



【圖 2-2】 Arachidonic acid 及 eicosapentaenoic acid 氧化代謝路徑圖

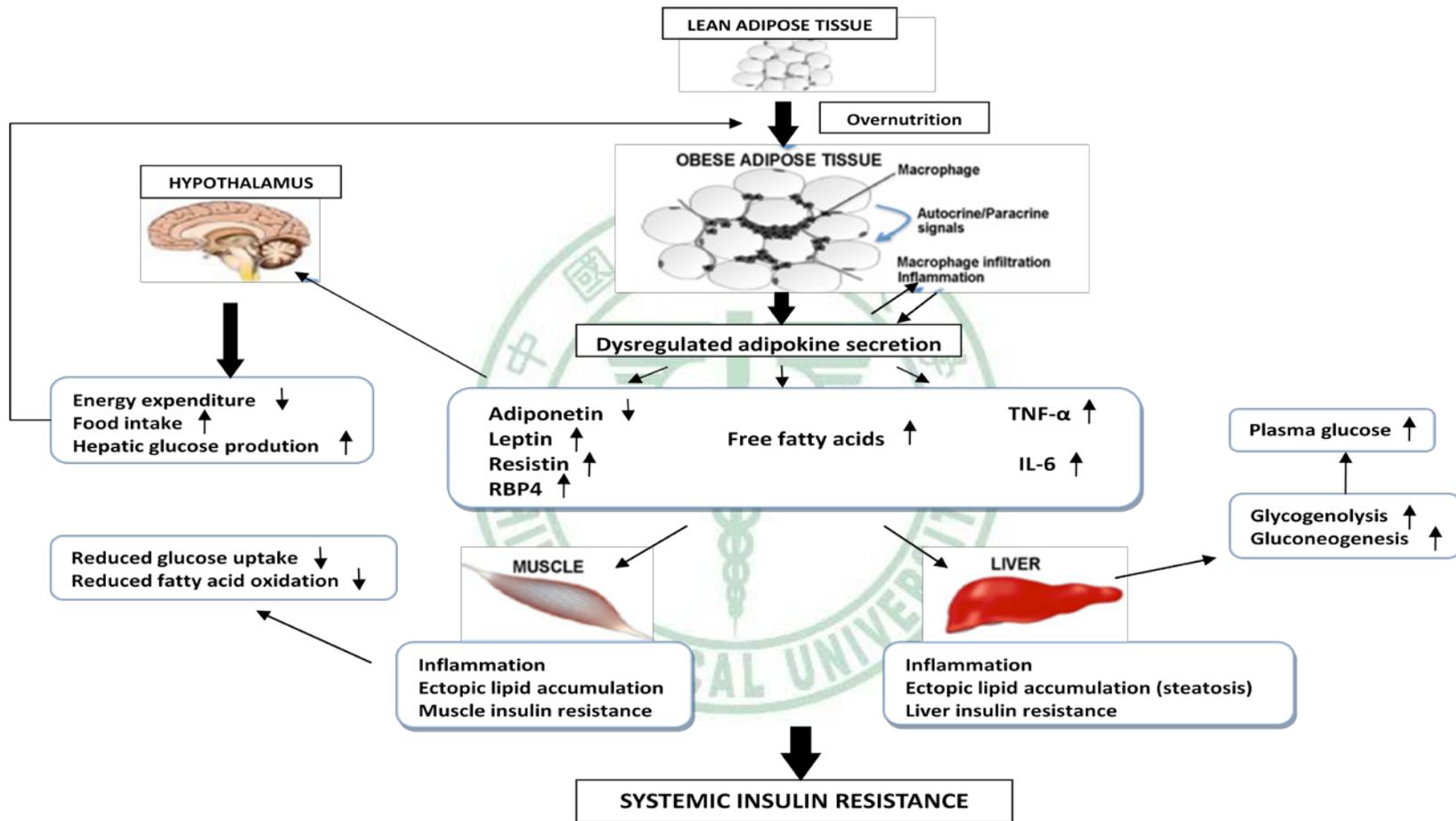
2010 年美國公布的飲食指南指出，飽和脂肪每日攝取應不超過總熱量的 10%，並利用單不飽和脂肪酸或多不飽和脂肪酸代替，此建議與降低血中膽固醇有很大相關性，被認為有助於降低心血管疾病 (USDA. and HHS. 2010)。

奶油(Butter)，為富含短鏈的飽和脂肪酸，冷藏會呈現固態，但置於室溫下會軟化易於塗抹於食品上食用。主要由牛奶或鮮奶油經過攪拌提製而成的乳製品。顏色為淡黃色，顏色深淺取決於動物飼料或添加食用色素。常應用於烹飪上，如作為西點、烘焙、煎炸食品以及製作醬料，也可直接塗抹於麵包等食物上食用。

二、脂肪組織(Adipose tissue)

脂肪組織組成包括脂肪細胞與血管間質部分，如前脂肪細胞、纖維細胞、內皮細胞及巨噬細胞 (Otto and Lane 2005)。脂肪組織可以幫助身體保溫、在飽食時儲存多餘的游離脂肪酸，並在飢餓狀態時予以釋出利用。哺乳動物的脂肪組織可分為白色脂肪組織(white adipose tissue ; WAT)與棕色脂肪組織(brown adipose tissue ; BAT)。白色脂肪組織依分布位置分為皮下與內臟脂肪組織，皮下脂肪為內臟脂肪的 3 至 4 倍 (Chowdhury, Sjostrom et al. 1994)。WAT 與 BAT 有不同的代謝特性，WAT 可儲存能量而 BAT 卻消耗能量 (Gustafson 2010)，有文獻指出 BAT 與肥胖及胰島素敏感性呈負相關 (Hammarstedt, Jansson et al. 2003)。

脂肪組織與脂肪細胞可以製造多種荷爾蒙和細胞激素，廣泛參與葡萄糖代謝(如 adiponectin、resistin)、脂肪代謝(如 cholesteryl ester transfer protein)、發炎作用(如 TNF- α 、IL-6)、血壓調控(如 angiotensinogen、angiotensin II)以及攝食行為(如 leptin)，並且影響許多組織與器官的代謝與功能，包括肌肉，肝臟，血管以及腦部 (Hajer, van Haefen et al. 2008)。人體血液中 adipokines 的濃度會隨著脂肪組織及脂肪細胞體積增加而增加，而血液中 adiponectin 的濃度是伴隨肥胖而減少 (Wannamethee, Lowe et al. 2007)。

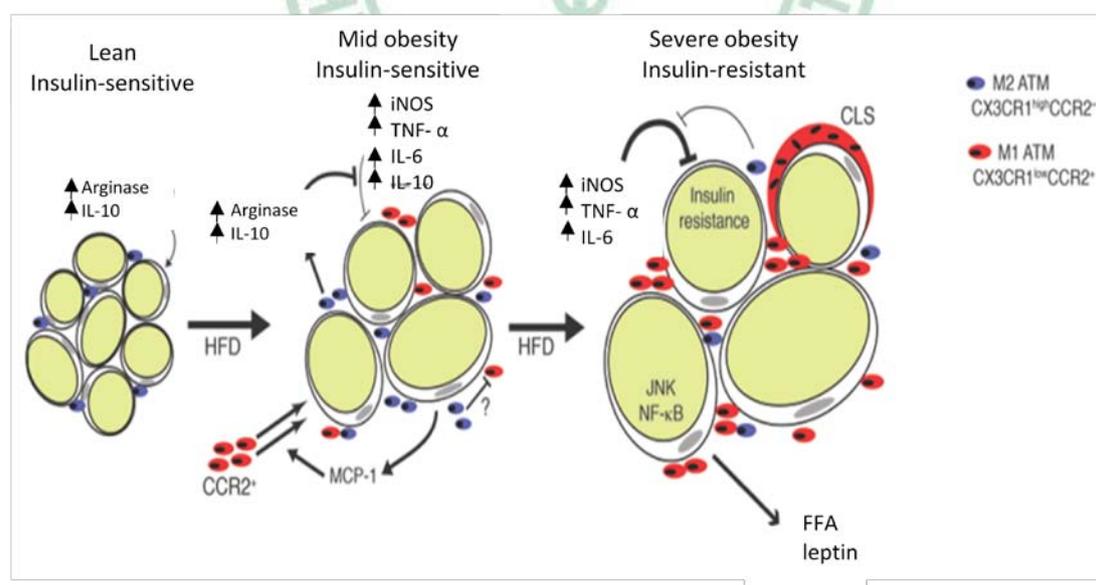


【圖 2-3】肥胖引起脂肪激素分泌的改變，並發展為胰島素阻抗

三、肥胖與脂肪組織

肥胖主要來自過多的能量攝取或是過少的能量消耗。在大多數肥胖的受試者中，脂肪細胞以及巨噬細胞的分泌功能明顯改變，常伴隨著慢性的發炎反應，且會增加胰島素阻抗，糖尿病及心血管疾病的風險 (Hajer, van Haeften et al. 2008)，如【圖 2-3】 (Galic, Oakhill et al. 2010)。

研究指出，巨噬細胞在肥胖的受試者的量高於瘦的受試者 (Otto and Lane 2005)，且脂肪組織中的巨噬細胞分成兩種，一種為 M1-macrophages 主要分泌 TNF- α 和 IL-6，因此會增加發炎反應；另一種為 M2-macrophages 會分泌抗發炎細胞激素，如 IL-10。在瘦的受試者的脂肪細胞中，主要表現 M2-macrophage，但經過高油飲食的給予促進肥胖後，脂肪細胞擴大，並逐漸增加 M1-macrophages 的表現，其分泌 TNF- α 和 IL-6 的量會提高，增加發炎反應，釋出脂肪酸並活化 NF κ B，增加 adipokines 的分泌，產生脂肪細胞胰島素阻抗如【圖 2-4】 (Lumeng, Bodzin et al. 2007)。



【圖 2-4】肥胖引起低程度的發炎反應

四、脂肪代謝相關的荷爾蒙

(一) Leptin

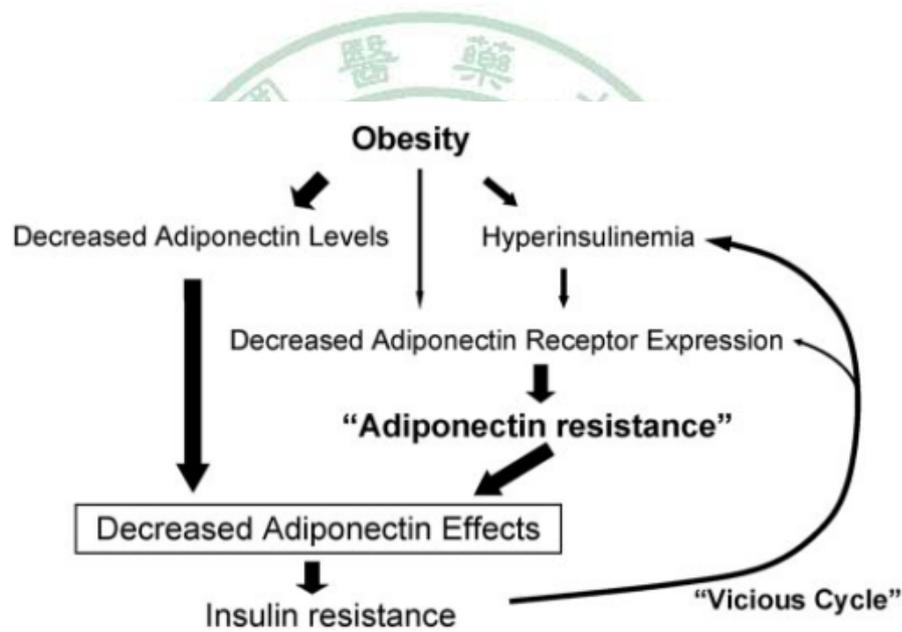
Leptin 是由 *ob* 基因製造產生的蛋白質，並由脂肪細胞所分泌。動物實驗中給予胰島素可以刺激脂肪細胞產生 leptin，此外 TNF- α 、游離脂肪酸及生長激素也會使 leptin 增加，但食物本身不會直接影響 leptin (Saladin, De Vos et al. 1995; Zhang, Kumar et al. 2000; Hajer, van Haefen et al. 2008)。大腦下視丘在食物攝取、能量的儲存與支出及血糖調控等訊息的整合中，扮演重要的角色 (Rabe, Lehrke et al. 2008)。Leptin 被脂肪組織分泌出後，會透過血液循環穿越血腦障壁與下視丘的 leptin 接受器結合 (Sahu 2003)，並影響下視丘許多神經元的活性以及神經肽的表現量，如抑制 neuropeptide Y 與 agouti-related protein，促進 pro-opiomelanocortin 等，使食慾降低 (Cheung, Clifton et al. 1997; Klok, Jakobsdottir et al. 2007)。文獻指出，leptin 可以透過活化 AMP-activated protein kinase (AMPK) 增加肝臟脂肪酸氧化作用及肌肉和脂肪細胞的脂肪分解作用，並抑制下視丘的 AMPK 活化，進而抑制食慾 (Long and Zierath 2006)。研究顯示，大鼠餵食高油飲食後，其體重與體脂肪皆增加，並發現血清中 leptin 濃度也隨之增加 (Handjieva-Darlenska and Boyadjieva 2009)。另一研究指出，肥胖受試者的腦脊髓液中 leptin 濃度與血漿 leptin 濃度皆較正常體重的受試者高 (Nam, Kratzsch et al. 2001)。由以上可知，肥胖常伴隨有高量的 leptin，但其卻沒有辦法控制能量消耗以及降低食慾，並且可能會使肥胖的人仍然感到飢餓，進而使體重不易降低，此為下視丘 leptin resistance 的概念 (Munzberg and Myers 2005)。動物實驗指出，小鼠餵食高油飲食 12 週後，會使血清 leptin 濃度顯著上升，並抑制肌肉 AMPK 活性及提高下視丘的 AMPK 活性 (Martin, Alquier et al. 2006)。Cytokine signaling 3 (SOCS3) 為一種 leptin signaling 的潛在抑制因子 (Wormald and Hilton 2004)。文獻指出，SOCS3 會結合至 leptin 的接受器，阻斷 leptin signaling，並且 SOCS3 會受

到 leptin 誘發而刺激其表現量。因此肥胖會增加 leptin 分泌，刺激 SOCS3 表現而抑制 leptin signaling，進而造成 leptin resistance (Bjorbaek, El-Haschimi et al. 1999)。此外以手術取得受試者的肌肉組織所做的體外實驗發現，肥胖者的骨骼肌會透過 cytokine signaling 3 (SOCS3) 抑制 leptin 所活化的 AMPK signaling，抑制脂肪酸氧化作用，增加脂質生合成，進而導致肥胖，甚至引起 leptin resistance (Long and Zierath 2006; Steinberg, McAinch et al. 2006)。

(二) Adiponectin

Adiponectin 也是由脂肪細胞所製造產生，有線條型與球型等不同的型式在血液中循環。人體研究指出，在肥胖、胰島素阻抗及代謝症候之受試者中，其血漿 adiponectin 較低 (Hajer, van der Graaf et al. 2007)。動物研究發現，餵食高油飲食誘發肥胖的小鼠，其血漿 adiponectin 也顯著低於正常飲食之小鼠 (Kadowaki and Yamauchi 2005)。adiponectin 可透過活化 AMPK 而降低肝臟葡萄糖生合成，增加肝臟及肌肉脂肪酸氧化作用；另一方面，adiponectin 在葡萄糖代謝的影響是透過兩個接受器，adiponectin receptor 1 (AdipoR1) 及 adiponectin receptor 2 (AdipoR2)，此兩者皆會在有肥胖及胰島素阻抗的動物模式中降低 (Yamauchi, Nio et al. 2007; Ha, Kim et al. 2011)。文獻指出，在經 streptozotocin(STZ)誘發產生低胰島素及高血糖症狀的小鼠，骨骼肌上之 AdipoR1 及 AdipoR2 的 mRNA 表現量明顯增加，但是在給予胰島素治療後，兩者的 mRNA 表現量皆顯著降低，此表示 adiponectin 接受器與胰島素呈負向調控 (Tsuchida, Yamauchi et al. 2004)。同一文獻指出，有胰島素阻抗的 ob/ob 小鼠，其肝臟及脂肪組織中 AdipoR1 及 AdipoR2 的 mRNA 表現量皆顯著低於控制組小鼠 (Tsuchida, Yamauchi et al. 2004)。小鼠給予高油飲食發現 AdipoR1 及 AdipoR2 的基因表現量降低，並增加 insulin receptor substrate (IRS)-1、ACC、FAS、SREBP-1c 的基因表現量，此文獻也指出，高油飲食可透

過降低 AdipoR1 及 AdipoR2 的表現量，使下游 AMPK 也受抑制，同時提高 IRS-1 的表現可刺激 SREBP-1c，促進脂肪酸生合成 (Matsunami, Sato et al. 2011)。另一動物研究證實，餵食高油飲食誘發肥胖的小鼠，其血漿 adiponectin 濃度顯著低於正常飲食之小鼠，並且與體脂肪及副睪脂質重成反比 (Razny, Wator et al. 2010)。因此，adiponectin 的降低在胰島素阻抗與脂肪生合成可能佔有重要的角色。文獻也支持，肥胖會造成 adiponectin 接受器表現量下降，使組織對 adiponectin 的敏感度降低，進而造成胰島素阻抗，並產生一個惡性循環，如【圖 2-5】 (Kadowaki and Yamauchi 2005)。



【圖 2-5】肥胖降低 adiponectin 的作用進而造成胰島素阻抗

(三) Ghrelin

Ghrelin 為調控食慾及能量代謝的腸道荷爾蒙，也是 growth hormone secretagogue receptor (GHS-R) 的配體，與之結合可刺激生長激素分泌。飢餓狀態會刺激胃部分泌 ghrelin，並經由血液運送至下視丘活化 neuro peptide Y (NPY)及

agouti-related peptide (AgRP)以刺激食慾 (Ukkola 2003; Murphy and Bloom 2006; Li, Wang et al. 2010)。相反的，恢復進食或血糖上升後，會降低 ghrelin 的濃度 (Shiia, Nakazato et al. 2002)。研究指出，人體禁食血漿 ghrelin 濃度會與體脂肪百分比及空腹血漿胰島素成反比 (Tschop, Weyer et al. 2001)。當人體經由靜脈注射胰島素後 30 分鐘，可發現血漿 ghrelin 的濃度降低，顯示胰島素可能是血中 ghrelin 的調控者之一 (Saad, Bernaba et al. 2002)。Ghrelin 與其接受器可表現於胰臟的 β 細胞，ghrelin 的增加可經由神經元的調控，抑制胰臟分泌胰島素 (Wierup, Svensson et al. 2002)。另一方面，長期的血漿 ghrelin 濃度與體脂肪含量為負相關，動物研究指出，給予大鼠高油飲食 11 週會增加其副睪脂質重，但降低血中 ghrelin 濃度 (Handjieva-Darlenska and Boyadjieva 2009)。研究顯示 ghrelin 可短期調控食物攝取、胰島素代謝，長期則會受飲食及體脂肪量影響而降低 (Ukkola 2003; Klok, Jakobsdottir et al. 2007)。

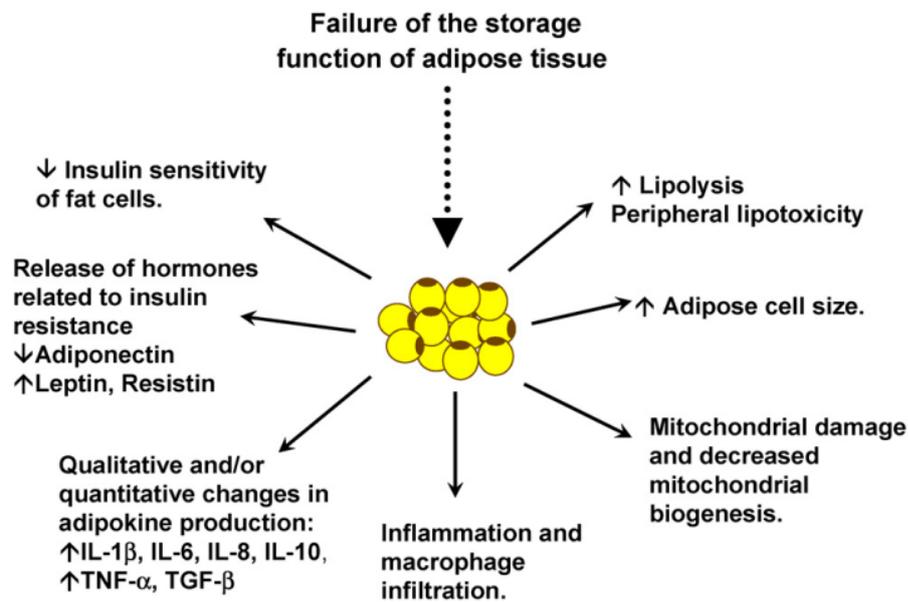
(四) 胰島素 (Insulin)

胰島素是由胰臟的 β 細胞所產生的荷爾蒙並會被分泌至體內循環，主要反映血漿中葡萄糖的濃度變化，可作用於醣類、脂質及蛋白質的代謝。胰島素敏感度 (insulin sensitivity) 為一個量化值，是量化胰島素藉由刺激周邊組織和骨骼肌接受葡萄糖，以及抑制肝臟產生葡萄糖來控制血糖濃度的能力。胰島素阻抗 (insulin resistance) 則是指胰島素在葡萄糖代謝的作用能力減弱 (Gastaldelli, Natali et al. 2010)。一般測量胰島素阻抗有很多種方法，常被使用的有 homeostasis model assessment-insulin resistance (HOMA-IR)，公式為 $HOMA-IR\ index = \text{insulin}(\mu U/mL) \times \text{glucose}(mmol/L) / 22.5$ ，以及 Quantitative insulin sensitivity check index (QUICKI)，公式為 $QUICKI = 1 / [\log \text{insulin}(\mu U/mL) + \log \text{glucose}(mg/dL)]$ ，這兩者皆是利用空腹血糖以及胰島素做運算而得到結果 (Matthews, Hosker et al. 1985; Katz, Nambi et al. 2000)。當胰島素作用能力減弱時會使血糖升高，而體內血糖的狀況

可利用血糖機直接測定，也可藉由測定糖化血色素(HbA1c)及 oral glucose tolerance test (OGTT)分別得知長期血糖狀況與葡萄糖的耐受程度。

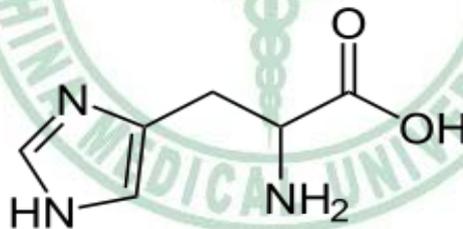
正常狀態下，胰島素可作用於骨骼肌，刺激其接受葡萄糖；在脂肪組織可刺激脂肪酸酯化為三酸甘油酯，並抑制三酸甘油酯水解而釋出游離脂肪酸進入循環中；在肝臟則是會抑制葡萄糖生合成和脂肪分解 (Gastaldelli, Natali et al. 2010)。有許多研究指出，高飽和油飲食會使得體脂肪增加，並堆積在肝臟或脂肪組織中，也會使血中胰島素濃度增加，但其敏感度降低，造成胰島素阻抗並可能發展出代謝症候群 (Lee, Pinnamaneni et al. 2006; Isharwal, Misra et al. 2009; Siri-Tarino, Sun et al. 2010)。文獻指出，肥胖引起的胰島素阻抗可能一方面是因擴大的脂肪組織增加釋出游離脂肪酸，可能增加肝臟葡萄糖生合成，降低葡萄糖進入肌肉細胞，並增加胰島素分泌，如【圖 2-5】 (Galic, Oakhill et al. 2010)；另一方面，脂肪組織會分泌 adipokines 調控脂質與能量代謝，例如增加 leptin、resistin 及 TNF- α 濃度，降低 adiponectin 濃度，也會造成胰島素阻抗 (Canete, Gil-Campos et al. 2007)，如【圖 2-5】 (Galic, Oakhill et al. 2010)。

由以上介紹可知，高油飲食可造成脂肪堆積於器官或脂肪組織之中，使脂肪組織擴大並刺激許多相關荷爾蒙調控體內代謝，造成胰島素阻抗，如【圖 2-6】 (Gastaldelli, Natali et al. 2010)。



【圖 2-6】過多的脂肪堆積於脂肪組織可能造成的影響

五、組胺酸 (Histidine ; His)



【圖 2-7】Histidine 的結構

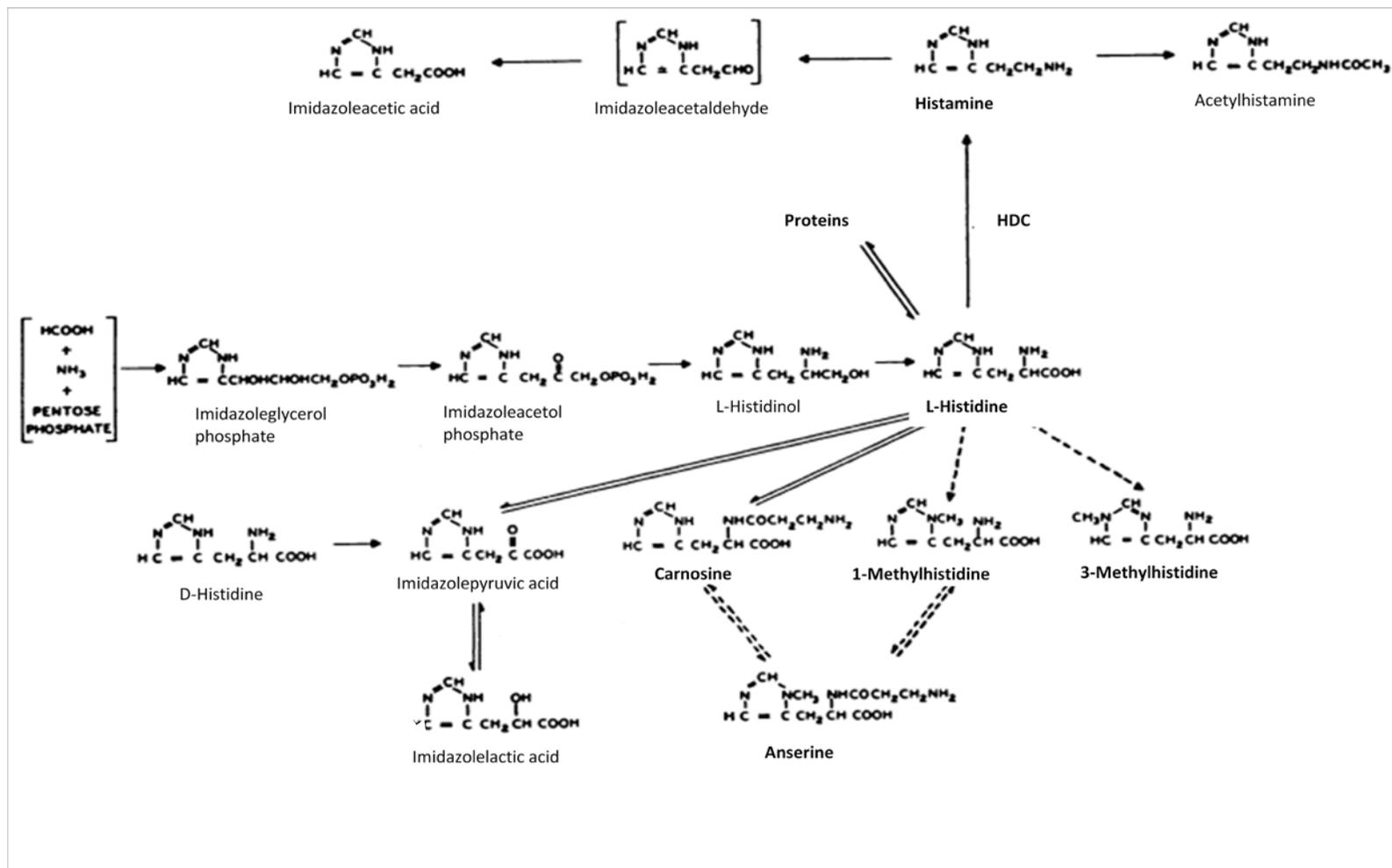
Histidine 為胺基酸之一【圖 2-7】，人體無法自行合成，因此為必需胺基酸 (Snyderman, Boyer et al. 1963)。L-histidine 廣泛分布於植物、動物及微生物中，也有研究顯示 histidine 富含於紅肉及魚類中，如鮪魚、鯷魚 (Kasaoka, Tsuboyama-Kasaoka et al. 2004)。

動物研究中，發現適量的 histidine 攝取可以維持大鼠的體重以及氮平衡，而食用 histidine 缺乏的飲食超過一週，會造成動物體內產生負氮平衡 (Tabor 1954)。人

體實驗也指出，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、鐵離子上升和血比容下降等症狀 (Kopple and Swendseid 1975)。人體實驗發現，類風濕性關節炎的病人，其血液中 histidine 濃度較低 (Gerber and Gerber 1977)，給予類風溼性關節炎的病人，每天 4.5 公克 histidine 似乎對此疾病有益 (Pinals, Harris et al. 1977)。Histidine 含有 imidazole 環的結構，有研究指出含有此結構的 histidine、carnosine 及 anserine 可抑制 NO 的生成 (Urazaev, Naumenko et al. 1998)。體外實驗發現，經過 histidine 結構修飾而含有 imidazole 結構的 PGE2 (PGE2-imidazole)、PGE2-histidine 和 L-histidine 可能對於因霍亂毒素而造成的腸液流失有保護作用 (Peterson, King et al. 2001)。人體實驗指出，L-histidine 的補充對於霍亂病人是安全且有用的制酸劑 (Rabbani, Sack et al. 2005)。

Histidine 可以透過 histidine decarboxylase (HDC) 催化生成 histamine，如【圖 2-8】(Tabor 1954) 所示。有研究指出，在餵食高油飲食誘發肥胖的小鼠，histamine 注射於下視丘，可抑制食慾及脂肪的堆積，並同時向上調控 uncoupling protein (UCP) 的 mRNA 表現量，進而改善胰島素阻抗 (Masaki, Yoshimatsu et al. 2001)。以 histidine 腹腔注射於大鼠，可以透過活化交感神經作用，增加白色脂肪組織的脂質分解 (Yoshimatsu, Tsuda et al. 2002)。

另一方面，histidine 可由 carnosine (β -alanyl-L-histidine) 代謝產生，也可相反的與 β -alanine 生成 carnosine。Carnosine 為一水溶性內生性雙胺肽，發現於脊椎動物的腦，肝臟及骨骼肌中，可在體內代謝產生 histidine 與 β -alanine (Tabor 1954)。因此飲食中攝取 carnosine 或 histidine 會相互影響體內的濃度。文獻指出，大鼠餵食含 3% histidine 的飼料 28 天後，其副腎脂質重明顯低於未含 histidine 的組別，並發現血清 3-methylhistidine 和 carnosine 濃度增加 (Endo, Kasaoka et al. 2010)。



【圖 2-8】Histidine 代謝圖

六、Carnosine 與 histidine 在本實驗室過去研究

(一) 以糖尿病小鼠為對象，將 carnosine 或 histidine 分別配製 0.05%、0.1% 兩種濃度，添加於飲水之中並餵食 4 週。結果顯示兩種濃度的 carnosine 與 histidine 均能降低血糖、fibrinogen、interleukin (IL)-6、tumor necrosis factor (TNF)- α 以及心臟與肝臟 triglyceride (TG) 濃度，但是只有在 0.1% 的 carnosine 與 histidine 組別中提升胰島素含量、glutathione peroxidase (GPx) 活性及減少心臟與肝臟 cholesterol (TC) 濃度 (Lee, Hsu et al. 2005)。

(二) 以酒精誘發小鼠慢性肝損傷之後，給予 carnosine 或 histidine 配製成 0.05%、0.1% 及 0.2% 等濃度餵食 3 週。結果顯示 carnosine 與 histidine 可以降低因肝損傷而提升的 alanine aminotransferase (ALT)、aspartate aminotransferase (AST)、malonyldialdehyde (MDA)、C-reactive protein (CRP)、IL-6 及 TNF- α ，提高 glutathione (GSH)、GPx 和 cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) 等活性。以上結果指出 carnosine 與 histidine 的補充對酒精性的慢性肝損傷具有抗氧化及抗發炎的效果 (Liu, Liu et al. 2008)。

(三) 以 acetaminophen (APAP) 誘發肝損傷之動物模式，在飲水中添加 0.05%、0.1% 及 0.2% 等濃度的 carnosine 或 histidine。結果顯示，預先給予 carnosine 或 histidine 的小鼠，與 APAP 誘發組相較，可增加其肝臟 GSH、GPx、catalase 和 superoxide dismutase (SOD) 活性，降低肝臟 MDA、reactive oxygen species (ROS)、oxidized glutathione (GSSG)、IL-6、IL-10、TNF- α 和 monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 等含量。以上結果表示 carnosine 及 histidine 具有預先保護肝臟抗氧化及抗發炎效果 (Yan, Wu et al. 2009)。

(四) 餵食小鼠含 5% 奶油飼料加上飲水中添加 0.1% 的 carnosine 或 histidine，實驗 8 週。結果發現餵食含 5% 奶油飼料會增加小鼠體重、肝臟重量、副睪脂質重量、肝臟 ALT、AST 以及肝臟和血中 TG、TC，而飲水中添加 carnosine 或 histidine 均可以降低脂肪堆積，其中脂肪增加可能是藉由提高肝臟及脂肪組織中的脂肪合成酵素和 SREBPs 的活性與 mRNA 表現量，實驗結果也顯示，carnosine 與 histidine 的攝取可以透過降低 malic enzyme、FAS 以及 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase 等脂肪合成酵素以及 SREBP-1c、SREBP-2 的活性與 mRNA 表現量，以減少體內脂肪生成，進而降低胰島素阻抗 (Mong, Chao et al. 2011)。

以上研究已證實 carnosine 及 histidine 在許多動物模式中，皆具有抗氧化、抗發炎及減少脂肪堆積等保護效果，因此本實驗希望以更高劑量的高飽和脂肪飲食做更進一步的探討。另一方面，過去實驗結果也顯示 carnosine 與 histidine 的攝取多有相似的效果，而其中 carnosine 的取得較昂貴，所以本實驗將利用不同濃度的 histidine 飲水取代 carnosine 餵食小鼠，探討 histidine 對於此模式與脂質代謝相關荷爾蒙的影響。

第三章 研究目的

本研究目的是以 15%飽和油脂飲食餵食小鼠，並在飲水中添加 0.1%及 0.2%的 histidine，飼養 8 週後，探討 histidine 對於高飽和油脂飲食的影響，及是否影響調控脂質代謝相關荷爾蒙的初步研究。



第四章 材料方法

一、實驗材料

(一) 實驗動物

本實驗使用雄性 4 週齡 C57BL/6JNarL 小黑鼠，購自國家科學委員會實驗動物繁殖暨研究中心。飼養於中國醫藥大學動物中心，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 22°C、相對濕度 55%。入室後經三天適應期開始進行 8 週實驗。

(二) 化學試藥

1. 特殊飲水用藥：

Histidine 購自美國 Sigma 公司，純度 99.5%

2. 特殊飲食：

(1) 奶油：KIRKLAND SIGNATURE 無鹽奶油，購自好市多股份有限公司，其成分標示如【表 4-1】。

(2) 一般飼料：Laboratory Animal Diets (MF-18)，購自樂斯科生物科技股份有限公司，其成分表如【表 4-2】及【表 4-2】所示。

【表 4-1】 奶油成分表

奶油成分	每份 100 大卡
Total Fat	11 g
Saturated Fat	7 g
Trans Fat	0 g
Polyunsaturated Fat	0.4 g
Monounsaturated Fat	2.8 g
Cholesterol	30 mg
Sodium	0 mg

【表 4-2】 MF-18 飼料一般成分表

General analysis (per 100g)	
Moisture (水分)	less than 10%
Crude Protein (粗蛋白質)	more than 18%
Crude Fat (粗脂肪)	more than 6%
Crude Ash (粗灰分)	less than 6%
Crude Fiber (粗纖維)	less than 6%
Nitrogen Free Extract (可溶性無窒素物)	more than 58%
Calorie (卡路里)	350 kcal

【表 4-3】MF-18 飼料成分組成表

Chemical Composition

Proteins		Phosphorus, %	0.80
Isoleucine, %	0.61	Magnesium, %	0.25
Leucine, %	1.28	Sodium, %	0.20
Lysine, %	0.85	Potassium, %	0.80
Methionin, %e	0.42	Iron, ppm	100
Cystine, %	0.30	Zinc, ppm	60
Phenylalanine, %	0.75		
Tyrosine, %	0.48	Vitamins	
Threonine, %	0.65	Vitamin A, IU/gm	20
Tryptophan, %	0.23	Vitamin D3, IU/gm	3
Valine, %	0.85	Vitamin E, ppm	150
Arginine, %	1.07	Vitamin K3, ppm	1
Histidine, %	0.44	Vitamin B1, ppm	30
Alanine, %	0.96	Vitamin B2, ppm	20
Asparatate, %	1.44	Vitamin B6, ppm	10
Glutamate, %	2.82	Vitamin B12, ppm	0.1
Glycine, %	0.88	Nicotinic acid, ppm	150
Proline, %	1.03	Pantothenic acid, ppm	40
Serine, %	0.79	Biotin, ppm	0.15
		Folic acid, ppm	2
Minerals		Inositol, ppm	5000
Calcium, %	1.00	Choline, ppm	2000

3. 實驗分析試藥：

- (1) Methanol 購自美國 Tedia 公司
- (2) Chloroform 購自美國 Tedia 公司
- (3) Boron trifluoride-methanol-complex solution (BF₃) 購自美國 Sigma 公司
- (4) n-Heptane 購自日本 Wako 公司
- (5) Triton X-100 購自美國 Sigma 公司

(三) 分析實驗套組

1. Mouse Insulin Kit 購自瑞典 Mercodia 公司
2. Triglycerides Kit 購自英國 Fortress Diagnostics 公司
3. Cholesterol (CHOL) Kit 購自英國 Randox 公司
4. Direct LDL Cholesterol Reagent Kit 購自美國 Teco Diagnostics 公司
5. Uric Acid (UA) Kit 購自英國 Randox 公司
6. Xanthine oxidase (XO) Kit 購自德國 Cayman 公司
7. AssayMax Mouse Leptin ELISA Kit 購自美國 Assaypro 公司
8. AssayMax Mouse adiponectin ELISA Kit 購自美國 Assaypro 公司
9. Human/Mouse/Rat Ghrelin Enzyme Immunoassay Kit 購自美國 Raybiotech 公司

(四) 儀器設備

1. 酸鹼測定儀 (PH meter)：METTLER TOLEDO，瑞士
2. 離心機：HETTICH，MICRO 22R，德國
3. 分光光度計 (Spectrophometer)：GBC，Cintra UV-Vis Spectrometer，澳洲
4. 螢光分光光譜儀：Molecular Devices Gemini XPS，美國
5. 高溫高壓滅菌鍋：AS-3560，台灣光杏生物科技有限公司

6. 免疫分析微盤清洗機 (ELISA Washer) : Bio-Rad Model 1575 , 美國
7. 微盤分光光度計 (Microplate Spectrometer) : Bio-Rad xMark , 美國
8. 均質機 :
 - (1) Glas-Co , 美國
 - (2) Bullet Blender™ , 美國
9. 水浴器 : BH-230D , 台灣
10. 氣相層析儀 (Gas Chromatography ; GC) : Thermo Scientific Focus GC , 美國
11. 血糖機 : TD-4207 , 台灣
12. 血糖試紙 : EasiCheck , 台灣

二、實驗方法

(一) 實驗設計

【表 4-4】實驗分組

組別	飼料	飲水	隻數
Normal	標準飼料	一般飲水	10
Control	15% 奶油飼料	一般飲水	12
1g/l histidine	15% 奶油飼料	0.1% histidine 飲水	14
2g/l histidine	15% 奶油飼料	0.2% histidine 飲水	14

小鼠入室經 3 天適應期後，隨機分成四組，開始 8 週實驗。實驗期間每日更換新鮮飲食與不同濃度的 histidine 飲水，並記錄飲水量。每週測量記錄老鼠體重，每兩週測量記錄血糖變化。

(二) 特殊飲食飲水製備方法：

1. 飲食：製備添加 15% 奶油之飼料。先計算好標準飼料與 15% 的奶油份量，將標準飼料磨碎成粉狀後，再將奶油用熱水溶解，添加至粉狀飼料中，經過反覆搓揉使奶油與飼料混合均勻，最後切割搓揉成一定大小的球狀飼料，用以每日餵食老鼠。
2. 飲水：將 1 克及 2 克的 histidine 分別加入 1 升的二次水中(濃度為 0.1% 及 0.2%)，攪拌均勻，每日給予老鼠飲用。

(三) 血液、臟器之收集

老鼠經由斷頸犧牲，使用不添加抗凝劑之真空採血管收集血液，靜置 4°C 10 分鐘後，以 3000rpm 離心 15 分鐘，將上層之血清與下層血球分別取出並儲存。臟器採集肝臟、心臟、腎臟、脾臟及副睪脂質，經秤重記錄之後置於 -80°C 冰箱供日後分析之用。

(四) 組織液之處理

1. 腎臟、心臟均質液：將腎臟及心臟取 100mg 放入 1.5ml 微量離心管，加入 1ml 磷酸鹽緩衝溶液(Phosphate buffer saline; PBS, pH=7.2~7.3)，再加入與臟器體積相等量的均質專用 beads，置於均質機(Bullet Blender™)進行均質，總時間約為 1 分半鐘，每均 30 秒即放於冰上以保持低溫。均質完全後，離心取其上層均質液作分析。依據 Lowry et al. (1951)的方法以 bovine serum albumin (BSA) 為標準品，將蛋白質濃度定量。

2. 肝臟均質液：將肝臟取 200mg 加入 1ml (methanol : chloroform = 2 : 1) 溶液後，馬上置於冰上利用均質機(Glas-Co)進行均質，先均 3 次後將肝臟刮至均質棒下端，再均 5 次，均質完將均質液倒入 2ml 微量離心管中暫存放於-20°C 冰箱待分析。

3. 不同樣品所分析的項目如【表 4-5】

【表 4-5】不同樣品所分析的項目

樣品	項目
血清	Insulin, total cholesterol, triglyceride, uric acid, ghrelin, leptin
腎臟均質液	Uric acid, xanthine oxidase
心臟均質液	Uric acid, xanthine oxidase
肝臟均質液	Total cholesterol, triglyceride, LDL cholesterol

三、分析方法

(一) 腎臟、心臟均質液蛋白質濃度測定

1. 原理

以 Lowry et al.(1951)的方法進行蛋白質定量，此方法是利用 coomassie brilliant blue G-250 會與蛋白質結合的特性。G-250 與蛋白質結合後，G-250 的顏色會從紅色轉變成藍色，此時在 595nm 的波長下會有吸光值。此定量方法的優點為 G-250 與蛋白質結合所需的時間很短(2 分鐘)，且結合的 G-250-蛋白質複合物可在溶液中維持較長的時間。具有方便快捷而靈敏(sample 量只需 10ng)的優點。

2. 實驗步驟

(1) 配製標準品，濃度配製如【表 4-6】

【表 4-6】蛋白質測定的標準品配製

編號	S0	S1	S2	S3	S4	S5
BSA(μ l)	0	10	20	30	40	50
二次水(μ l)	100	90	80	70	60	50
濃度(mg/ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5

(2) 將腎臟及心臟均質液稀釋至適當的倍數

(3) 將標準品與均質液樣品取 10 μ l 依序加入 96 孔盤

(4) 稀釋 Bio-Rad 染劑(Bio-Rad 原液：二次水=1：4)

(5) 每個 well 加入 200 μ l 的稀釋染劑

(6) 在室溫下混合，經震盪器處理 5 分鐘

(7) 用 ELISA reader 測定 OD_{595nm} 吸光值

3. 標準曲線與計算方法

將標準品的濃度(0~0.5 mg/ml)設為 X 軸，實驗所測得的標準品吸光值為 Y 軸，即可得此實驗之標準曲線。再將 OD_{595nm} 下測得之樣品吸光值，依據標準曲線以內插法代入方程式($y=ax+b$)計算，並乘上稀釋倍數，即可求得蛋白質的濃度，單位以 mg/ml 表示。

(二) 血清胰島素濃度測定

1. 原理

本實驗是用 Mouse Insulin ELISA 商業套組作分析，利用 Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)的原理，先將具有偵測 insulin 的抗體 coating 在 96 孔盤上，加入的樣品中若含有 insulin 就會與之結合在 96 孔盤上，再加入的 peroxidase-conjugated anti-insulin 抗體也會與 insulin 專一性結合並固定在微孔上，利用緩衝溶液沖洗掉多餘樣品後，再加入 peroxidase 的受質 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine(TMB)作為呈色劑，最後加入 0.5M H₂SO₄ 終止反應並測定 OD_{450nm} 之吸光值，依其不同的吸光值代入標準曲線即可換算出 insulin 濃度。

2. 實驗步驟

- (1) 將標準品與血清樣品取 10 μ l 依序加入已 coating 好的 96 孔盤
- (2) 每個 well 加入 100 μ l enzyme conjugate solution，於室溫下經震盪器震盪 (700-900 rpm)兩小時
- (3) 使用免疫分析微盤清洗機以 wash buffer 清洗 6 次

- (4) 避光後，每個 well 加入 200 μ l TMB，於室溫下反應 15 分鐘
- (5) 每個 well 加入 50 μ l stop solution，經震盪器震盪 5 秒鐘以確保混勻
- (6) 用 ELISA reader 測定 OD_{450nm} 之吸光值

3. 標準曲線與計算方法

將標準品的濃度(0、0.2、0.5、1.5、3、6.5 μ g/l)設為 X 軸，實驗所測得的標準品 OD_{450nm} 吸光值為 Y 軸，即可得此實驗之標準曲線。再將實驗測得在 OD_{450nm} 下之樣品吸光值，依據標準曲線以內插法代入方程式($y=ax+b$)計算，即可求得 insulin 的濃度，單位以 μ g/l 表示。

(三) Homeostasis Model Assessment (HOMA)的計算

$$\text{HOMA-IR index} = \frac{\text{insulin } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glucose } (\text{mmol/L})}{22.5}$$

單位換算如下：

$$\text{空腹血糖}(\text{mg/dl}) \times 0.0555 = \text{mmol/L}$$

$$\text{空腹 insulin}(\mu\text{g/ml}) / 5808 \times 10^9 = \text{pmol/L}$$

$$\text{Insulin } (\text{pmol/L}) / 6.945 = \mu\text{U/L}$$

$$\text{Insulin } (\mu\text{U/L}) / 1000 = \mu\text{U/mL}$$

(四) 血清與肝臟中三酸甘油酯(Triglyceride)濃度測定

1. 原理

本實驗利用三酸甘油酯經由 lipoprotein lipase(LPL)水解成甘油及脂肪酸，甘油藉由 glycerolkinase(GK)與 ATP 作用產生 ADP 及 glycerol-3-phosphate(G-3-P)，G-3-P 再經 glycerol-3-phosphate oxidase(GPO)氧化作用產生 H₂O₂ 及 dihydroxyacetone phosphate(DAP)，產物 H₂O₂ 再與

4-aminoantipyrine 及 p-chlorophenol 經 peroxidase 氧化產生的產物為紅色 4-(p-benzoquinone-monoimino)-phenazone，最後於 OD_{546nm} 波長下測定紅色產物的吸光值。

2. 實驗步驟

(1) 血清三酸甘油酯：

取血清樣品 10 μ l 以及標準品 10 μ l 分別加入至含有 pipes buffer、p-chlorophenol、LPL、GK、GPO、peroxidase、4-aminoantipyrine、ATP、Mg²⁺、Na-cholate 及 potassium-hexacyanoferrat(II)之 1mL 溶液中，混合均勻，於 37 $^{\circ}$ C 下反應 5 分鐘後，測定 OD_{546nm} 下之吸光值。

(2) 肝臟三酸甘油酯：

取肝臟均質液樣品 10 μ l 與 5 μ l Triton X-100 混合，經真空抽乾後，再與 10 μ l 標準品分別加入含有 pipes buffer、p-chlorophenol、LPL、GK、GPO、peroxidase、4-aminoantipyrine、ATP、Mg²⁺、Na-cholate 及 potassium-hexacyanoferrat(II)之 1ml 溶液中，混合均勻，於 37 $^{\circ}$ C 下反應 5 分鐘後，測定波長 OD_{546nm} 下之吸光值。

3. 計算方法

三酸甘油酯濃度(mg/dl)=樣品吸光值/標準品吸光值 \times 200

(五) 血清與肝臟中膽固醇(Chloesterol)濃度測定

1. 原理

本實驗是利用 choleaterol esterase 先將膽固醇酯分解成膽固醇與脂肪酸，

膽固醇再經 cholesterol oxidase 氧化產生 cholestene-3-one 及 H₂O₂，H₂O₂ 與 phenol 及 4-aminoantipyrine 經 peroxidase 作用下產生紅紫色之 quinoneimine 產物，測定 OD_{500nm} 下之吸光值。

2. 實驗步驟

(1) 血清膽固醇：

取 10 μ l 血清樣品以及 10 μ l 標準品，分別加入至含有 pipes buffer、phenol、peroxidase、cholesterol esterase、cholesterol oxidase 及 4-aminoantipyrine 之 1ml 溶液中，混合均勻，於 37 $^{\circ}$ C 下反應 5 分鐘後測定 OD_{500nm} 下之吸光值。

(2) 肝臟膽固醇：

取肝臟均質液樣品 10 μ l 與 5 μ l Triton X-100 混合，經真空抽乾後，再取 10 μ l 標準品，分別加入含有 pipes buffer、phenol、peroxidase、cholesterol esterase、cholesterol oxidase 及 4-aminoantipyrine 之 1ml 溶液中，混合均勻，於 37 $^{\circ}$ C 下反應 5 分鐘後測定 OD_{500nm} 下之吸光值。

3. 計算方法

膽固醇濃度(mg/dl)=樣品吸光值/標準品吸光值 \times 200

(六) 肝臟中低密度脂蛋白膽固醇濃度(LDL cholesterol)濃度測定

1. 原理

本實驗分兩部分，Reagent 1 為非呈色反應，此試劑會溶出除了低密度脂蛋白顆粒之外的膽固醇(VLDL、HDL)，並經 choleaterol esterase 將膽固醇酯分解成膽固醇與脂肪酸，膽固醇再經 cholesterol oxidase 氧化產生 H₂O₂。Reagent

2 為呈色反應，試劑會溶出低密度脂蛋白顆粒中的膽固醇，作用於偶聯劑 2:N,N-bis[4-sulfhobutyl]-m-Toluidine-disodium(DSBmT)而呈色。

2. 實驗步驟

- (1) 取肝臟均質液樣品 10 μ l 與 5 μ l Triton X-100 混合，經真空抽乾後，與 10 μ l 標準品分別加入 300 μ l 含有 buffer、phenol、cholesterol esterase、cholesterol oxidase、peroxidase 及 4-aminoantipyrine 之 Reagent 1 溶液，並於 37 $^{\circ}$ C 下反應 5 分鐘。
- (2) 加入 100 μ l 含有 DSBmT 及 buffer 之 Reagent 2，於 37 $^{\circ}$ C 下反應 5 分鐘後測定 OD_{546nm} 吸光值。

3. 計算方法

低密度脂蛋白膽固醇濃度(mg/dl) = 樣品吸光值 / 標準品吸光值 \times 標準品濃度 (mg/dl)

(七) 血清、心臟及腎臟中尿酸(Uric acid)濃度測定

1. 原理

本實驗是利用試劑中 uricase 將 uric acid 分解成 allantoin 與 H₂O₂，H₂O₂ 再與 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid (3,5 DCHBS) 及 4-aminophenazone 經 peroxidase 氧化產生紅紫色產物 N-(4-antipryl)-3-chloro-5-sulfonate-p-benzo-quinoneimine，最後測定 OD_{520nm} 之吸光值。

2. 實驗步驟

- (1) 配製標準品如【表 4-7】
- (2) 將標準品與樣品各加入 50 μ l 到 96 孔盤中
- (3) 製備 assay cocktail，包括
 - a. Assay buffer：4.9 ml
 - b. Detector：50 μ l
 - c. HRP：50 μ l此 assay cocktail 配製完，須混合均勻後，在 10 分鐘內與樣品反應
- (4) 將配好的 assay cocktail 在 10 分鐘內取 50 μ l 加入至每個 well 中
- (5) 放入螢光分光光譜儀中利用激發光波長 550nm，吸收光波長 586nm，測定其螢光吸光值。

【表 4-7】Xanthine oxidase 標準品配製

編號	XO standard(μ l) (1 mU/ml)	Sample Buffer(μ l)	Final concentration (μ U/ml)
A	0	1000	0
B	20	980	20
C	40	960	40
D	60	940	60
E	80	920	80
F	100	900	100

3. 標準曲線與計算方法

將標準品的濃度設為 X 軸，實驗所測得的標準品螢光吸光值為 Y 軸，即可得此實驗之標準曲線。再將實驗測得的樣品吸光值，依據標準曲線以內插法代入方程式($y=ax+b$)計算，即可求得 xanthine oxidase 的活性，單位以 $\mu\text{U/ml}$ 表示。

(九) 血清中 leptin 濃度測定

1. 原理

本實驗是用 Mouse Leptin ELISA 商業套組作分析，利用 ELISA 的原理，套組已將具有偵測 leptin 的多株抗體 coating 在 96 孔盤上，再加入樣品，樣品中 leptin 會與抗體結合，之後加入 biotinylated polyclonal antibody 會再接合至 leptin 上，形成 sandwich 的結構固定在微孔上，接著以緩衝溶液清洗掉多餘 biotinylated polyclonal antibody 後，加入 streptavidin-peroxidase conjugate 可與 sandwich 結構結合，再以緩衝溶液沖洗掉多餘 streptavidin-peroxidase conjugate 後，加入 peroxidase 受質 chromogen substrate (tetramethylbenzidine) 作為呈色劑，最後加入 0.5N hydrochloric acid 終止反應，測定 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 之吸光值，將測得的吸光值代入標準曲線即可換算出 leptin 濃度。

2. 實驗步驟

- (1) 將血清樣品稀釋 5 倍，並將標準品稀釋至濃度 24ng/ml 後，再序列稀釋 6 次
- (2) 取 50 μl 稀釋好的樣品與標準品分別加入至 96 孔盤中，於室溫下反應 2 小時
- (3) 以 wash buffer 利用免疫分析微盤清洗機清洗 5 次
- (4) 每個微孔加入 50 μl biotinylated polyclonal antibody，於室溫下反應 2 小時

- (5) 以 wash buffer 利用免疫分析微盤清洗機清洗 5 次
- (6) 每個微孔加入 50 μ l streptavidin-peroxidase conjugate，於室溫下反應 30 分鐘
- (7) 以 wash buffer 利用免疫分析微盤清洗機清洗 5 次
- (8) 每個微孔加入 50 μ l chromogen substrate，混合均勻，反應直到顏色呈現藍色
- (9) 每個微孔加入 50 μ l stop solution 終止反應，此時顏色會由藍色轉變成黃色，測定 OD_{450nm} 之吸光值

3. 標準曲線與計算方法

將標準品經過序列稀釋，其濃度(24、12、6、3、1.5、0.75、0.325、0 ng/ml) 設為 X 軸，實驗所測得的標準品 OD_{450nm} 吸光值為 Y 軸，即可得此實驗之標準曲線。將實驗測得在 OD_{450nm} 下之樣品吸光值，依據標準曲線以內插法代入方程式($y=ax+b$)計算，即可求得 leptin 的濃度，單位以 ng/ml 表示。

(十) 血清 Ghrelin 濃度測定

1. 原理

本實驗是用 Mouse Ghrelin ELISA 商業套組作分析，利用 ELISA 的原理，套組已將 anti-rabbit secondary antibody coating 在 96 孔盤上，加入 anti-ghrelin antibody 固定後，再加樣品，此時樣品中 ghrelin peptide 與 biotinylated ghrelin peptide 會結合在微孔上之 ghrelin 抗體，以緩衝溶液清洗掉多餘樣品後，加入可產生呈色反應之 streptavidin-horseradish peroxidase(SA-HRP)，其會與 biotinylated ghrelin peptide 結合形成 biotinylated peptid-SA-HRP complex，由於 biotinylated ghrelin peptide 會與樣品及標準品上之 ghrelin peptide 競爭結合 ghrelin antibody，因此呈色濃度深淺與 biotinylated peptid-SA-HRP complex 成正

比，反之與樣品及標準品上之 ghrelin peptide 成反比。最後可藉由已知濃度的標準曲線去推估樣品中 ghrelin peptide 濃度。

2. 實驗步驟

- (1) 依廠商建議，配置標準品以序列稀釋方式稀釋 6 次，將血清樣品稀釋 6 倍，並依套組需求，配置好的樣品中須含 biotinylated ghrelin peptide 10ng/ml
- (2) 每個微孔加入 100 μ l anti-ghrelin antibody，於室溫下反應 1.5 小時
- (3) 以 wash buffer 利用免疫分析微盤清洗機清洗 5 次
- (4) 每個微孔加入 100 μ l 稀釋好的樣品、標準品及 positive control，於室溫下反應 2.5 小時
- (5) 以 wash buffer 利用免疫分析微盤清洗機清洗 4 次
- (6) 每個微孔加入 100 μ l HRP-streptavidin solution，於室溫下反應 45 分鐘
- (7) 以 wash buffer 利用免疫分析微盤清洗機清洗 5 次
- (8) 避光，每個微孔加入 100 μ l TMB one-step substrate reagent，於室溫下反應 30 分鐘
- (9) 每個微孔加入 50 μ l stop solution 後，立即測 OD_{450nm} 之吸光值

3. 標準曲線與計算方法

將標準品經過序列稀釋，其濃度(1000 ng/ml、100 ng/ml、10 ng/ml、1 ng/ml、100 pg/ml、10 pg/ml、0 pg/ml)設為 X 軸，實驗所測得的標準品 OD_{450nm} 吸光值換算成 percentage absorbance 設為 Y 軸，即可得此實驗之標準曲線。

$$\text{percentage absorbance} = (\text{B-blank OD}) / (\text{B}_0\text{-blank OD})$$

B = 樣品或標準品之吸光值

B_0 = 標準品在濃度 0 pg/ml 的吸光值

將實驗測得在 OD_{450nm} 下之樣品吸光值，經上述方法換算後，依據標準曲線以內插法代入方程式($y=ax+b$)計算，即可求得 ghrelin 的濃度，單位以 ng/ml 表示。

(十一) 血清 adiponectin 濃度測定

1. 原理

本實驗是用 Mouse Adiponectin ELISA 商業套組作分析，利用 ELISA 的原理，套組已將具有偵測 adiponectin 的多株抗體 coating 在 96 孔盤上，再加入樣品，樣品中 adiponectin 會與抗體結合，之後加入 biotinylated adiponectin antibody 會再接合至 adiponectin 上，形成 sandwich 的結構固定在微孔上，接著以緩衝溶液清洗掉多餘 biotinylated adiponectin antibody 後，加入 streptavidin-peroxidase conjugate 可與 sandwich 結構結合，再以緩衝溶液沖洗掉多餘 streptavidin-peroxidase conjugate 後，加入 peroxidase 受質 chromogen substrate (tetramethylbenzidine) 作為呈色劑，最後加入 0.5N hydrochloric acid 終止反應，測定 OD_{450nm} 之吸光值，將測得的吸光值代入標準曲線即可換算出 adiponectin 濃度。

2. 實驗步驟

- (1) 將血清樣品稀釋 400 倍，並將標準品稀釋至濃度 50ng/ml 後，再序列稀釋 6 次
- (2) 取 50 μ l 稀釋好的樣品與標準品分別加入至 96 孔盤中，於室溫下反應 2 小時

- (3) 以 wash buffer 利用免疫分析微盤清洗機清洗 5 次
- (4) 每個微孔加入 50 μ l biotinylated adiponectin antibody，於室溫下反應 1 小時
- (5) 以 wash buffer 利用免疫分析微盤清洗機清洗 5 次
- (6) 每個微孔加入 50 μ l streptavidin-peroxidase conjugate，於室溫下反應 30 分鐘
- (7) 以 wash buffer 利用免疫分析微盤清洗機清洗 5 次
- (8) 每個微孔加入 50 μ l chromogen substrate，混合均勻，反應直到顏色呈現藍色
- (9) 每個微孔加入 50 μ l stop solution 終止反應，此時顏色會由藍色轉變成黃色，測定 OD_{450nm} 之吸光值

3. 標準曲線與計算方法

將標準品經過序列稀釋，其濃度(50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.78、0 ng/ml)設為 X 軸，實驗所測得的標準品 OD_{450nm} 吸光值為 Y 軸，即可得此實驗之標準曲線。將實驗測得在 OD_{450nm} 下之樣品吸光值，依據標準曲線以內插法代入方程式($y=ax+b$)計算，即可求得 adiponectin 的濃度，單位以 ng/ml 表示。

(十二) 肝臟脂肪酸組成

1. 原理

本實驗是利用氣相層析儀分析脂肪酸的組成，1 μ l 的樣品注入後，經過高溫氣化，以氦氣做為攜帶氣體(動相)，通過分離管柱(靜相)，利用動相氣體與靜相液體薄膜的親和力不同，將不同碳數或雙鍵數的脂肪酸分離，經過偵測器 FID (flame ionization detector) 燃燒氣體 (氫氣及空氣) 將樣品離子化後偵測其訊號，將訊號在記錄器上放大並記錄。

2. 實驗步驟

- (1) 取肝臟 200mg，加入 1ml (氯仿：甲醇=2：1)溶液之後立即置於冰上低溫均質
- (2) 加入 400 μ l 二次水
- (3) 離心 2000rpm，10 分鐘
- (4) 取下層均質液(氯仿層)，以氮氣吹乾
- (5) 加入 1ml BF₃，95°C 熱水浴 1 小時
- (6) 冷卻後，加入 500 μ l 二次水及 1ml heptane
- (7) 離心 2000rpm，10 分鐘
- (8) 取上層均質液，以氮氣吹乾
- (9) 用 50 μ l heptane 回溶後，取 1 μ l 注入 GC 以測定脂肪酸

3. 條件

- (1) 攜帶氣體：氮氣
- (2) 流速：1ml/min
- (3) 分流比：20：1
- (4) 管柱：Rtx-2330，長度 60m，ID 為 0.25mm，df 為 0.20 μ m
- (5) 溫度：起始溫度 165°C，以 5°C/min 的升溫速率升溫至 250°C，維持 5 分鐘
- (6) 注入口溫度：250°C
- (7) 偵測器溫度：250°C

4. 計算方法

將樣品與標準品利用上述條件注入 GC 得到脂肪酸組成，樣品可比對標準品脂肪酸之波峰位置，再由面積(area %)求得各脂肪酸所佔之相對百分比。

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)，擷 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差異 ($p < 0.05$)。本實驗並利用 Pearson 檢定分析荷爾蒙與副睪脂質重量的相關係數。



第五章 結果

本實驗在餵食 C57BL/6JNarl 小鼠的飼料中加入 15% 的無鹽奶油，並在實驗組的飲水中添加 0.1% 或 0.2% (1 g/l、2 g/l) 的 histidine，實驗為期 8 週。旨在探討不同濃度的 histidine 對飲食中含 15% 飽和脂肪飲食的小鼠之影響。

一、體重變化

8 週實驗期間，每週的體重變化如【圖 5-1】。由圖中可知實驗 8 週後，飼料中含有 15% 高飽和脂肪飲食之組別與 normal 組相較，體重有顯著增加($P < 0.05$)。飲水中添加不同濃度 histidine 與 control 組相較對於體重則沒有顯著性影響($P > 0.05$)。

二、飲水量

實驗期間小鼠的每日平均飲水量如【圖 5-2】所示，在餵食 15% 高飽和油脂 control 組小鼠的飲水量顯著增加($P < 0.05$)，而飲水中添加不同濃度 histidine，與 control 組相較，飲水量沒有顯著影響 ($P > 0.05$)。

三、臟器重量

所有臟器重均除以體重後，所得到的相對臟器重如【表 5-1】。表中所示，肝臟重量在高飽和脂肪飲食(control、0.1% histidine、0.2% histidine)與 normal 組相較雖然有增加，但沒有達顯著差異($P > 0.05$)；另一方面，脾臟重量在 control 組與 0.1% histidine 組明顯增加 ($P < 0.05$)，但在 0.2% histidine 組重量則與 normal 組相似；小鼠的心臟重量在飲用 0.2% histidine 組才有明顯減少 ($P < 0.05$)；腎臟重量則是各組間沒有顯著差異($P > 0.05$)。而副睪脂質重方面，給予高飽和脂肪飲食可以顯著增加其重量($P < 0.05$)，與 control 組相較，飲水中添加 0.1% histidine 明顯降低其重量(P

<0.05)，但是給予 0.2% histidine 飲水，對於副睪脂質重沒有顯著影響($P>0.05$)。

四、血糖、血清 insulin 濃度及 HOMA-IR

如【表 5-2】所示，血糖方面，在小鼠飼養 8 週之後，四組之間並沒有顯著差異($P>0.05$)。

小鼠血清 insulin 濃度方面，餵食含 15% 高飽和脂肪飼料的 control 組與 normal 組相較，血清 insulin 濃度有顯著增加($P<0.05$)，但在飲用含 0.1% 及 0.2% histidine 飲水後，其血清 insulin 濃度下降，在 0.2% histidine 組明顯低於 control 組並達統計上顯著差異($P<0.05$)。

HOMA-IR 值由結果得知，餵食 15% 飽和飲食之 control 組明顯增加($P<0.05$)，而在飲水中添加不同濃度 histidine 後，其 HOMA-IR 有顯著下降的效果($P<0.05$)。

五、脂質變化

(一) 血清及肝臟中 Triglyceride(TG)濃度

由【圖 5-3】可知，餵食含 15% 高飽和脂肪酸飲食之組別(control 組、0.1% histidine 組、0.2% histidine 組)，其血清中 TG 的含量顯著高於 normal 組($P<0.05$)，而飲水中添加 histidine 對於血清 TG 則沒有顯著影響($P>0.05$)。

結果中 control 組的肝臟 TG 含量顯著高於 normal 組($P<0.05$)，飲水中添加不同濃度 histidine 皆明顯降低肝臟 TG($P<0.05$)，而其中 0.1% histidine 組降低效果顯著高於 0.2% histidine 組($P<0.05$)。

(二) 血清及肝臟中 Total Cholesterol(TC)濃度

由【圖 5-4】可知，血清中 TC 的含量，在餵食含 15% 高飽和脂肪飼料的 control 組明顯高於 normal 組 ($P<0.05$)，飲水中加入 histidine 可顯著降低血清 TC 含量

($P < 0.05$)，但不同濃度 histidine 間沒有顯著差異($P > 0.05$)。

肝臟中 TC 含量為 control 組顯著高於 normal 組($P < 0.05$)，但飲水中添加 histidine 之組別與 control 組相較，並沒有顯著影響($P > 0.05$)。

(三) 肝臟中 LDL cholesterol(LDL-C)濃度

由【圖 5-5】可知，肝臟中 LDL-C 在 control 組的含量顯著高於 normal 組($P < 0.05$)，飲水中添加不同濃度的 histidine 皆明顯降低肝臟 LDL-C ($P < 0.05$)。

六、血清、心臟及腎臟中 uric acid 濃度

如【圖 5-6】所示，血清、心臟及腎臟中的 uric acid 濃度在 control 組與 normal 組相較顯著增加($P < 0.05$)，而餵食含 0.1% 及 0.2% histidine 飲水後，在血清、心臟及腎臟中皆有下降趨勢，其中 0.2% histidine 組與 control 組相較，無論血清、心臟及腎臟皆達顯著降低的結果($P < 0.05$)。

七、心臟及腎臟中 xanthine oxidase 活性

如【圖 5-7】所示，與 normal 組相較，餵食含 15% 飽和脂肪的飲食顯著增加心臟及腎臟中 xanthine oxidase 的活性($P < 0.05$)，而飲水中添加不同濃度的 histidine 後，對於兩者的 xanthine oxidase 活性並沒有顯著影響($P > 0.05$)。

八、血清賀爾蒙分析

(一) 血清中 leptin 濃度

如【圖 5-8】所示，餵食含 15% 高飽和脂肪飲食的 control 組顯著高於 normal 組($P < 0.05$)，飲水中添加 0.1% histidine 與 control 組相較顯著降低 ($P < 0.05$)，但在 0.2% histidine 組則明顯增加，與 0.1% histidine 相較有顯著差異 ($P < 0.05$)。

(二) 血清中 ghrelin 濃度

如【圖 5-9】所示，與 normal 組相較，餵食含 15% 高飽和脂肪飲食的 control 組的 ghrelin 濃度顯著降低 ($P < 0.05$)，在飲水中添加不同濃度的 histidine 可以使 ghrelin 濃度明顯回升 ($P < 0.05$)，其中兩種濃度間沒有顯著差異 ($P > 0.05$)。

(三) 血清中 adiponectin 濃度

由【圖 5-10】可知，小鼠血清中 adiponectin 濃度在 control 組與 normal 組相較，有顯著降低 ($P < 0.05$)，而飲水中添加不同濃度的 histidine 後，可顯著上升 adiponectin 濃度 ($P < 0.05$)，但未恢復至 normal 組的濃度。

九、脂肪酸組成

(一) 飼料、奶油與含 15% 奶油飼料所含脂肪酸的組成

經由氣相層析儀分析所得結果如【表 5-3】所示，飼料中的脂肪酸組成有 59% 為 Polyunsaturated fatty acid (PUFA)，而 Saturated fatty acid (SFA) 與 Monounsaturated fatty acid (MUFA) 的含量分別佔 18.3% 與 22.6%。另一方面，奶油組成大部分為 SFA，佔 71.8%，而 MUFA 及 PUFA 分別佔 21.2%、4.5%。15% 奶油飼料的脂肪酸組成中，主要為 SFA 佔約 60%，其次 MUFA 及 PUFA 分別佔 19.6%、20%。

(二) 肝臟脂肪酸組成

如【表 5-4】所示，經氣相層析儀分析後，餵食含 15% 飽和脂肪飼料的小鼠 (control 組) 與餵食一般飲食之組別相較，其肝臟 SFA 含量顯著增加 ($P < 0.05$)，脂肪酸組成中 control 組的三種飽和脂肪酸 (14:0、16:0、18:0) 皆明顯高於 normal 組 ($P < 0.05$)，但在 PUFA 含量顯著減少 ($P < 0.05$)，降低 PUFA 中 18:2、18:3

脂肪酸含量 ($P < 0.05$)，另外增加了 PUFA 中脂肪酸 20:4、22:5、22:6 含量，有達到顯著差異 ($P < 0.05$)。與 control 組相較，飲水中 0.1% 或 0.2% histidine 的添加，對於肝臟脂肪酸沒有顯著性影響 ($P > 0.05$)。

十、血中賀爾蒙與副睪脂質重量的相關性

(一) Leptin 與副睪脂質重

如【圖 5-11】所示，Leptin 與副睪脂質重量為正向的線性關係，並在 Pearson 相關性檢定下，有顯著相關 ($P < 0.01$)。

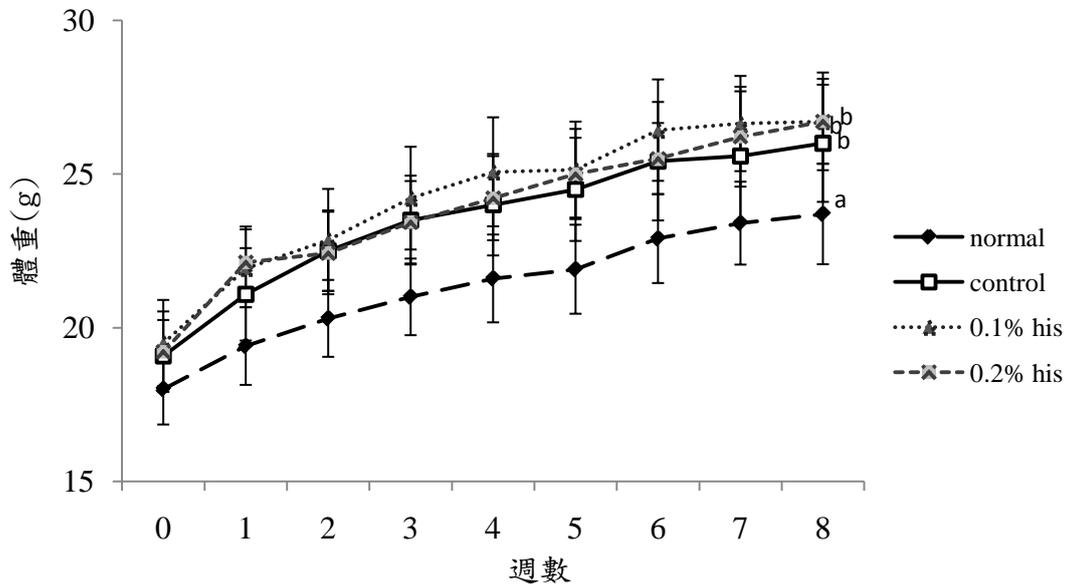
(二) Ghrelin 與副睪脂質重

如【圖 5-12】所示，Ghrelin 與副睪脂質重量為負向的線性關係，而在 Pearson 相關性檢定下，未達顯著相關 ($P > 0.01$)。

(三) Adiponectin 與副睪脂質重

如【圖 5-13】所示，Adiponectin 與副睪脂質重量為負向的線性關係，並在 Pearson 相關性檢定下，達到顯著相關 ($P < 0.01$)。

體重變化



【圖 5-1】進行 8 週實驗期間每週的體重變化

normal：正常飲食及飲水，n=10

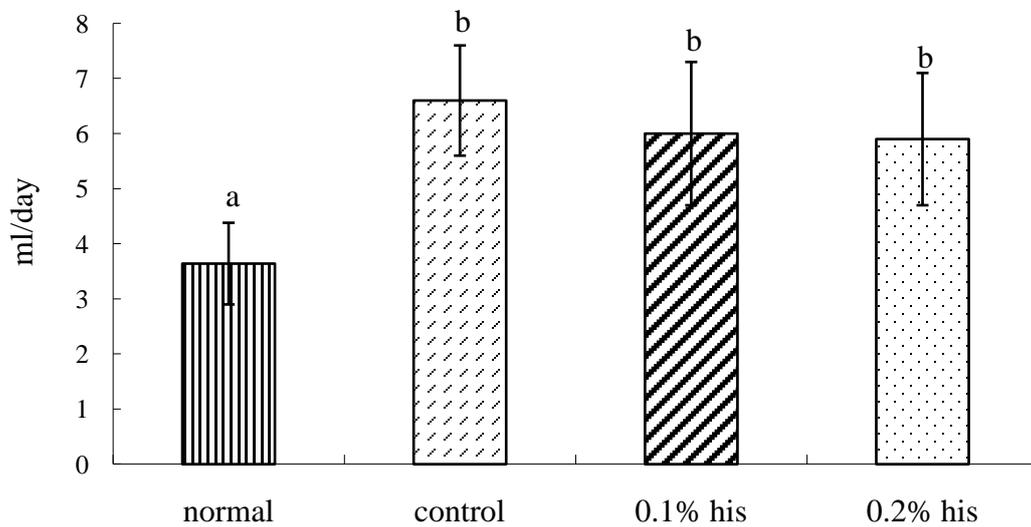
control：飼料中添加 15% 奶油飲食，正常飲水，n=12

0.1% his：飼料中添加 15% 奶油飲食，飲水含 1 g/l histidine，n=14

0.2% his：飼料中添加 15% 奶油飲食，飲水含 2 g/l histidine，n=14

數據皆以 mean±SD 表示；不同英文字母表示各組之間有顯著差異($P < 0.05$)

飲水量



【圖 5-2】進行 8 週實驗之平均飲水量

normal：正常飲食及飲水，n=10

control：飼料中添加 15% 奶油飲食，正常飲水，n=12

0.1% his：飼料中添加 15% 奶油飲食，飲水含 1 g/l histidine，n=14

0.2% his：飼料中添加 15% 奶油飲食，飲水含 2 g/l histidine，n=14

飲水量數據以 mean±SD 表示；不同英文字母表示各組之間有顯著差異($P < 0.05$)

【表 5-1】 餵食不同濃度 histidine 後臟器與體重之相對重量

normal：正常飲食及飲水，n=10

control：飼料中添加 15% 奶油飲食，正常飲水，n=12

0.1% his：飼料中添加 15% 奶油飲食，飲水含 1 g/l histidine，n=14

0.2% his：飼料中添加 15% 奶油飲食，飲水含 2 g/l histidine，n=14

數據皆以 mean±SD 表示；不同英文字母表示各組之間有顯著差異($P < 0.05$)

	肝臟重(mg) /BW (g)	腎臟重(mg) /BW (g)	脾臟重(mg) /BW (g)	心臟重(mg) /BW (g)	副睪脂重(mg) /BW (g)
normal	32.94±4.05 ^a	13.59±3.89 ^a	2.53±0.45 ^a	6.86±1.04 ^a	217.51±21.66 ^a
control	34.51±3.63 ^a	12.36±0.84 ^a	3.12±0.43 ^b	6.86±0.76 ^a	438.60±104.2 ^c
0.1% his	35.11±3.70 ^a	12.90±0.99 ^a	3.08±0.70 ^b	6.32±0.99 ^{ab}	364.24±77.66 ^b
0.2% his	33.56±3.15 ^a	11.92±1.20 ^a	2.47±0.26 ^a	5.91±0.72 ^b	438.79±61.54 ^c

【表 5-2】 餵食不同濃度 histidine 之小鼠血糖、血清 insulin 濃度及 HOMA-IR

normal：正常飲食及飲水，n=10

control：飼料中添加 15% 奶油飲食，正常飲水，n=12

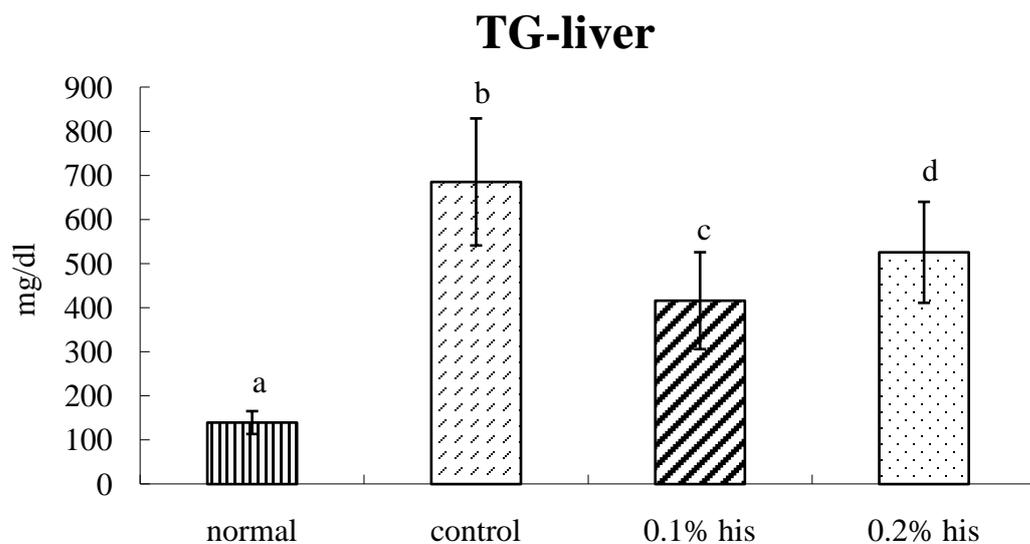
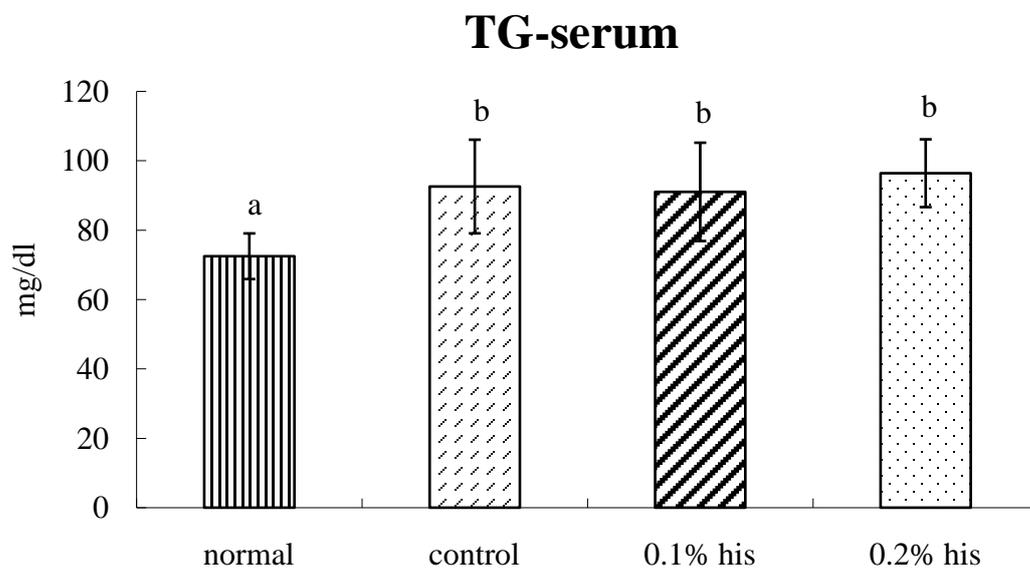
0.1% his：飼料中添加 15% 奶油飲食，飲水含 1 g/l histidine，n=14

0.2% his：飼料中添加 15% 奶油飲食，飲水含 2 g/l histidine，n=14

數據皆以 mean±SD 表示；不同英文字母表示各組之間有顯著差異($P < 0.05$)

HOMA-IR：Homeostasis model assessment-insulin resistance

	Glucose (mg/dl)	Insulin (μ g/l)	HOMA-IR (μ U/l)
normal	104.40±22.96 ^a	0.35±0.03 ^a	2.38±0.56 ^a
control	106.83±23.04 ^a	0.66±0.18 ^c	4.76±1.35 ^c
0.1% his	105.61±19.50 ^a	0.57±0.12 ^c	3.68±0.71 ^b
0.2% his	122.08±20.10 ^a	0.48±0.14 ^b	3.31±0.95 ^b



【圖 5-3】 餵食不同濃度 histidine 之小鼠血清及肝臟中 Triglyceride(TG)濃度

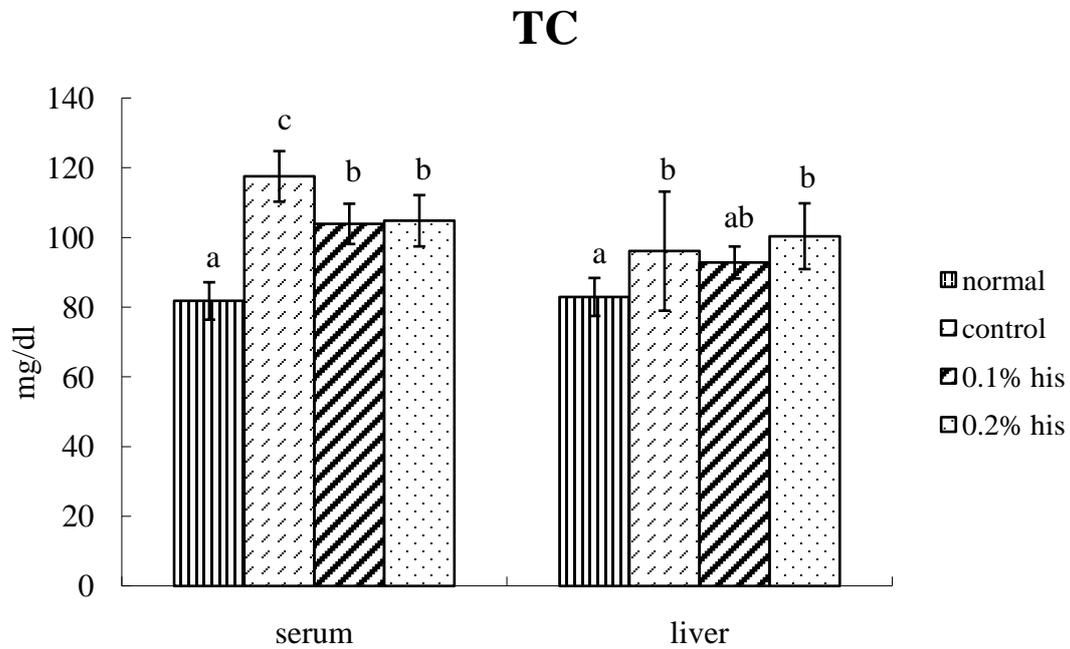
normal：正常飲食及飲水，n=10

control：飼料中添加 15% 奶油飲食，正常飲水，n=12

0.1% his：飼料中添加 15% 奶油飲食，飲水含 1g/L histidine，n=14

0.2% his：飼料中添加 15% 奶油飲食，飲水含 2g/L histidine，n=14

數據皆以 mean±SD 表示；不同英文字母表示各組之間有顯著差異($P < 0.05$)



【圖 5-4】餵食不同濃度 histidine 之小鼠血清及肝臟 Total Cholesterol(TC)濃度

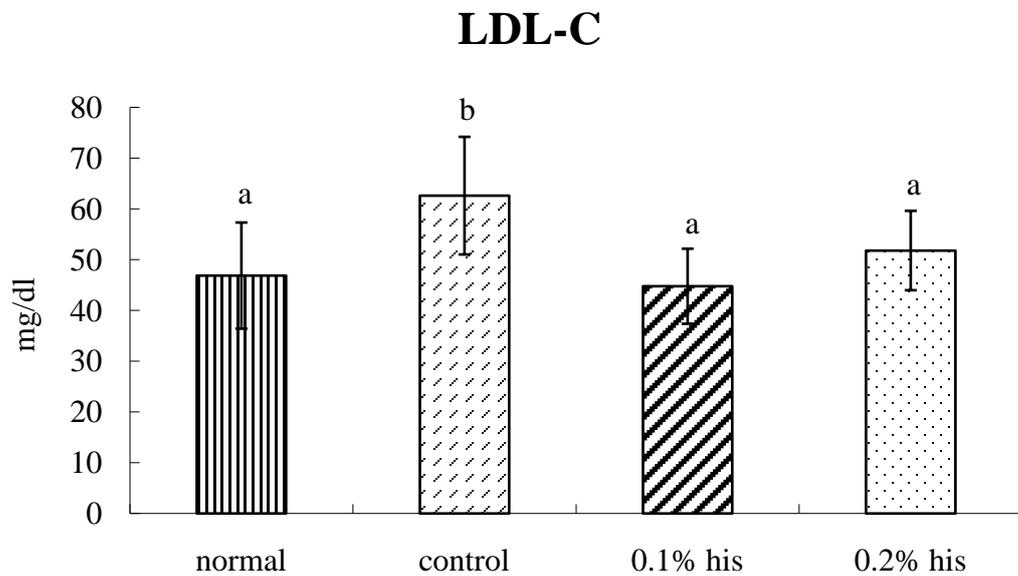
normal：正常飲食及飲水，n=10

control：飼料中添加 15% 奶油飲食，正常飲水，n=12

0.1% his：飼料中添加 15% 奶油飲食，飲水含 1 g/l histidine，n=14

0.2% his：飼料中添加 15% 奶油飲食，飲水含 2 g/l histidine，n=14

數據皆以 mean±SD 表示；不同英文字母表示各組之間有顯著差異($P < 0.05$)



【圖 5-5】餵食不同濃度 histidine 之小鼠肝臟中 LDL cholesterol(LDL-C)濃度

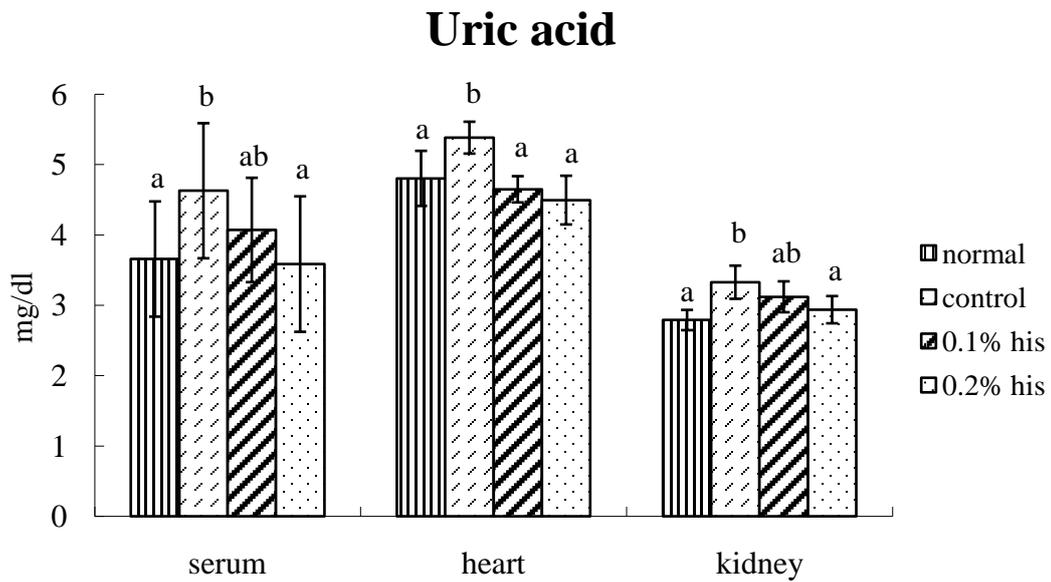
normal：正常飲食及飲水，n=10

control：飼料中添加 15% 奶油飲食，正常飲水，n=12

0.1% his：飼料中添加 15% 奶油飲食，飲水含 1 g/l histidine，n=14

0.2% his：飼料中添加 15% 奶油飲食，飲水含 2 g/l histidine，n=14

數據皆以 mean±SD 表示；不同英文字母表示各組之間有顯著差異($P < 0.05$)



【圖 5-6】餵食不同濃度 histidine 之小鼠血清、心臟及腎臟中 uric acid 濃度

normal：正常飲食及飲水，n=10

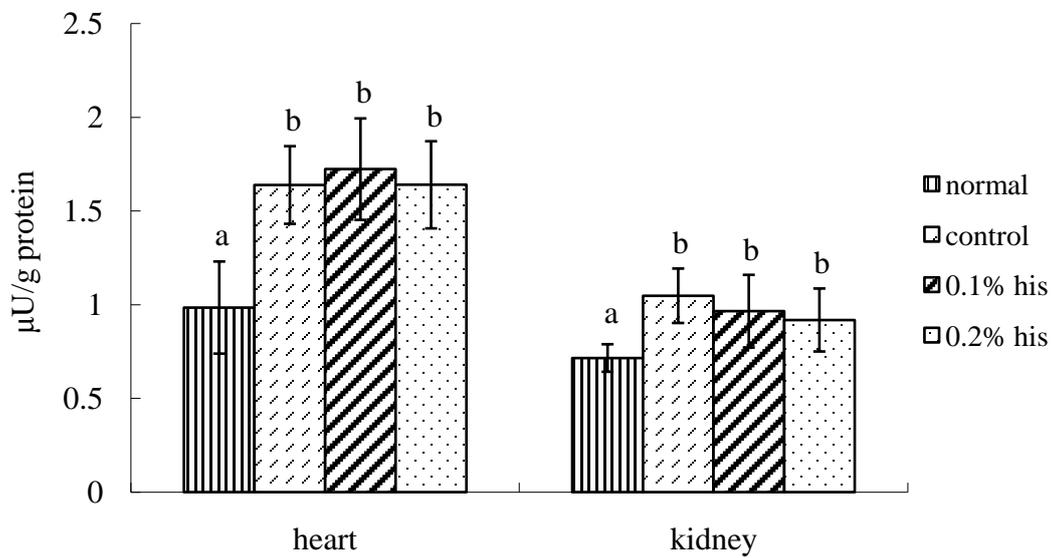
control：飼料中添加 15% 奶油飲食，正常飲水，n=12

0.1% his：飼料中添加 15% 奶油飲食，飲水含 1 g/l histidine，n=14

0.2% his：飼料中添加 15% 奶油飲食，飲水含 2 g/l histidine，n=14

數據皆以 mean±SD 表示；不同英文字母表示各組之間有顯著差異($P < 0.05$)

Xanthine oxidase



【圖 5-7】餵食不同濃度 histidine 之小鼠心臟及腎臟中 xanthine oxidase 活性

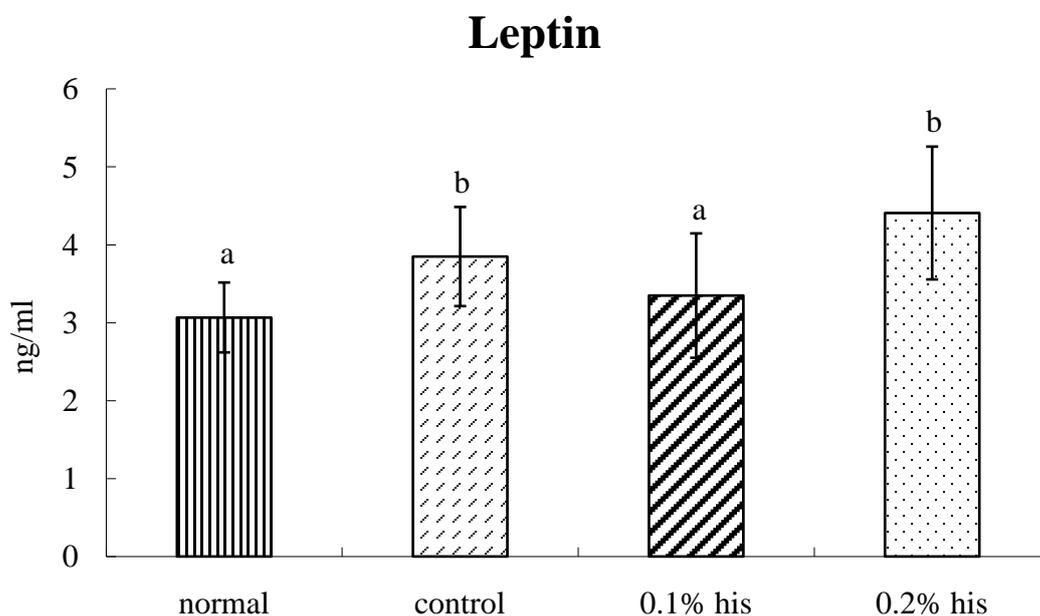
normal：正常飲食及飲水，n=10

control：飼料中添加 15% 奶油飲食，正常飲水，n=12

0.1% his：飼料中添加 15% 奶油飲食，飲水含 1 g/l histidine，n=14

0.2% his：飼料中添加 15% 奶油飲食，飲水含 2 g/l histidine，n=14

數據皆以 mean±SD 表示；不同英文字母表示各組之間有顯著差異($P < 0.05$)



【圖 5-8】餵食不同濃度 histidine 之小鼠血清中 leptin 濃度

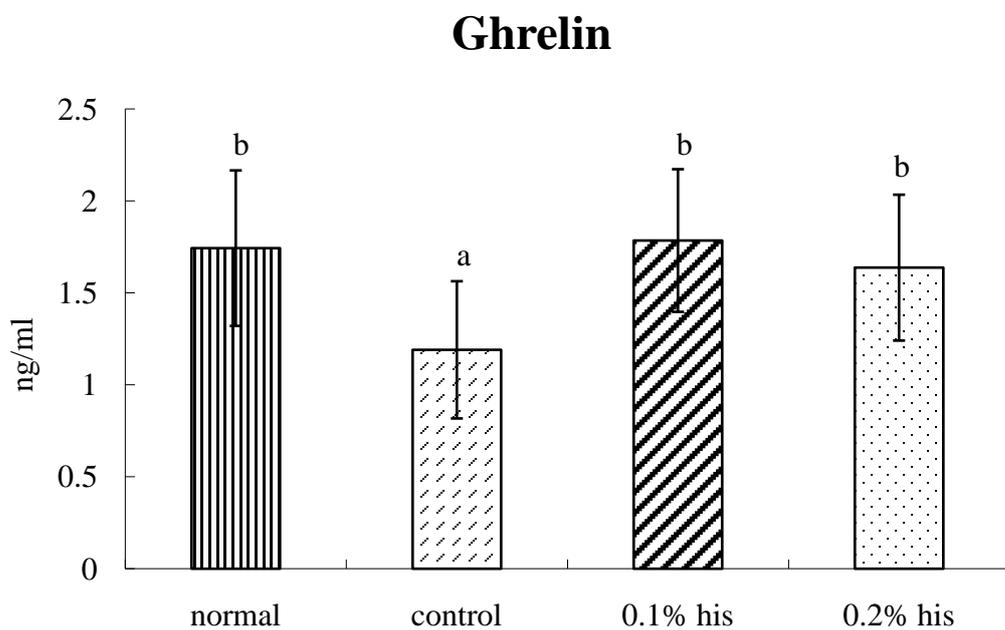
normal：正常飲食及飲水，n=10

control：飼料中添加 15% 奶油飲食，正常飲水，n=12

0.1% his：飼料中添加 15% 奶油飲食，飲水含 1 g/l histidine，n=14

0.2% his：飼料中添加 15% 奶油飲食，飲水含 2 g/l histidine，n=14

數據皆以 mean±SD 表示；不同英文字母表示各組之間有顯著差異($P < 0.05$)



【圖 5-9】餵食不同濃度 histidine 之小鼠血清中 ghrelin 濃度

normal：正常飲食及飲水，n=10

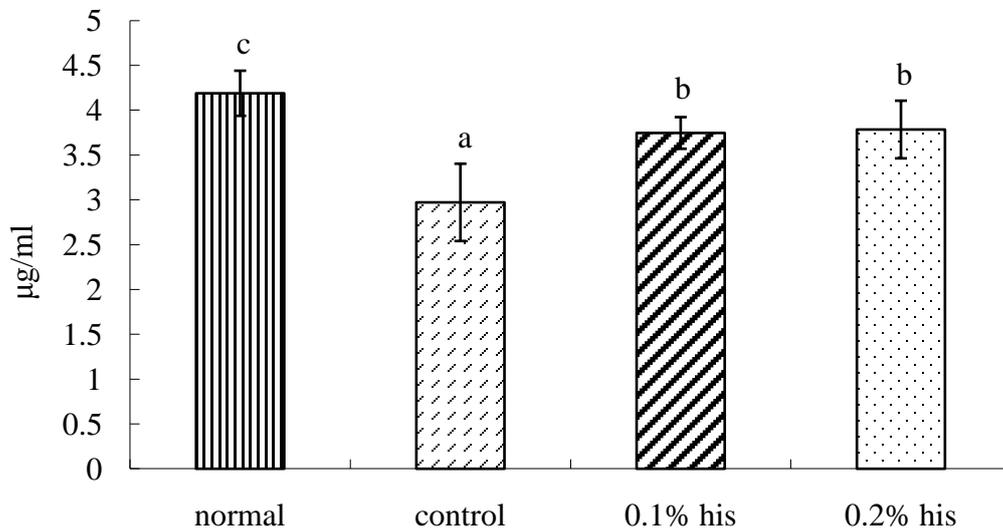
control：飼料中添加 15% 奶油飲食，正常飲水，n=12

0.1% his：飼料中添加 15% 奶油飲食，飲水含 1 g/l histidine，n=14

0.2% his：飼料中添加 15% 奶油飲食，飲水含 2 g/l histidine，n=14

數據皆以 mean±SD 表示；不同英文字母表示各組之間有顯著差異($P < 0.05$)

Adiponectin



【圖 5-10】餵食不同濃度 histidine 之小鼠血清中 adiponectin 濃度

normal：正常飲食及飲水，n=10

control：飼料中添加 15% 奶油飲食，正常飲水，n=12

0.1% his：飼料中添加 15% 奶油飲食，飲水含 1 g/l histidine，n=14

0.2% his：飼料中添加 15% 奶油飲食，飲水含 2 g/l histidine，n=14

數據皆以 mean±SD 表示；不同英文字母表示各組之間有顯著差異($P < 0.05$)

【表 5-3】本實驗所使用之飼料與奶油脂肪酸的組成

SFA : Saturated fatty acid

MUFA : Monounsaturated fatty acid

PUFA : Polyunsaturated fatty acid

Fatty acid	飼料 (area %)	奶油 (area %)	15%奶油飼料 (area %)
4:0	nd	0.41	0.27
8:0	0.36	0.72	0.16
10:0	0.32	2.69	1.16
12:0	nd	3.56	2.07
14:0	0.33	11.50	8.06
14:1	2.61	nd	1.73
16:0	13.80	31.16	28.20
16:1	0.48	0.38	0.13
18:0	3.49	21.73	20.05
18:1	20.67	18.24	17.78
18:2	52.57	4.09	18.29
18:3	4.77	0.30	1.71
20:1	1.45	0.15	nd
20:4	0.91	nd	nd
22:6	0.78	nd	nd
SFA	18.30	71.77	59.97
MUFA	22.60	21.23	19.64
PUFA	59.03	4.54	20.00
Total	99.93	97.54	99.61

【表 5-4】 餵食不同濃度 histidine 後肝臟脂肪酸組成

normal：正常飲食及飲水，n=10

control：飼料中添加 15% 奶油飲食，正常飲水，n=12

0.1% his：飼料中添加 15% 奶油飲食，飲水含 1g/l histidine，n=14

0.2% his：飼料中添加 15% 奶油飲食，飲水含 2g/l histidine，n=14

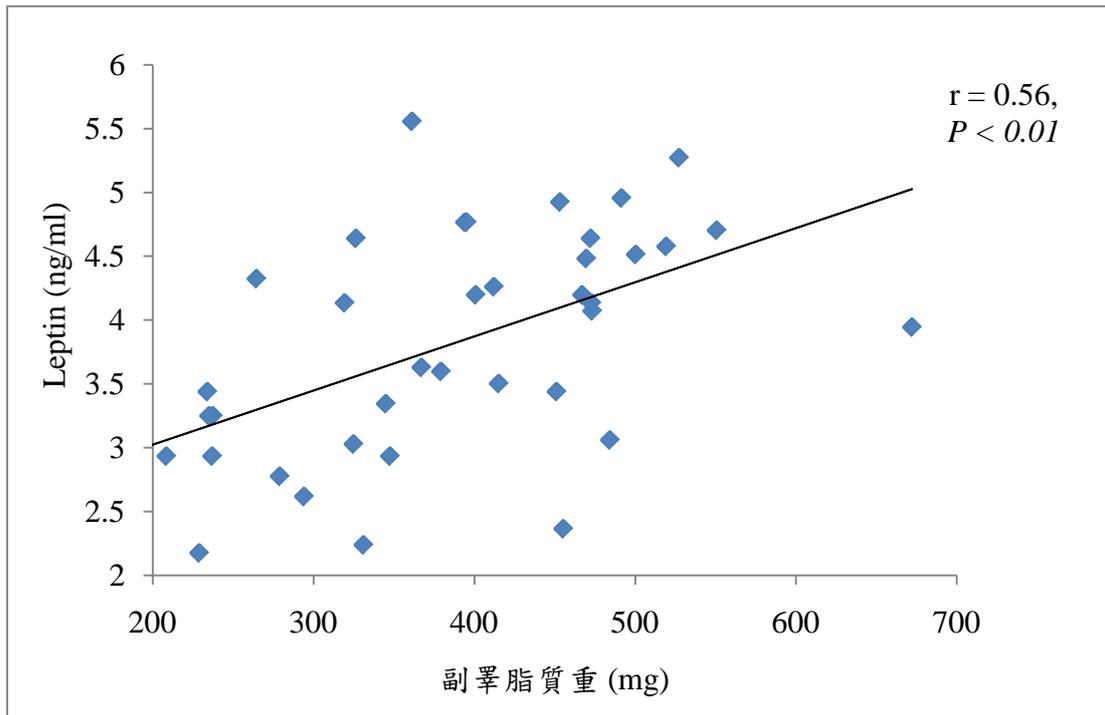
SFA：Saturated fatty acid

MUFA：Monounsaturated fatty acid

PUFA：Polyunsaturated fatty acid

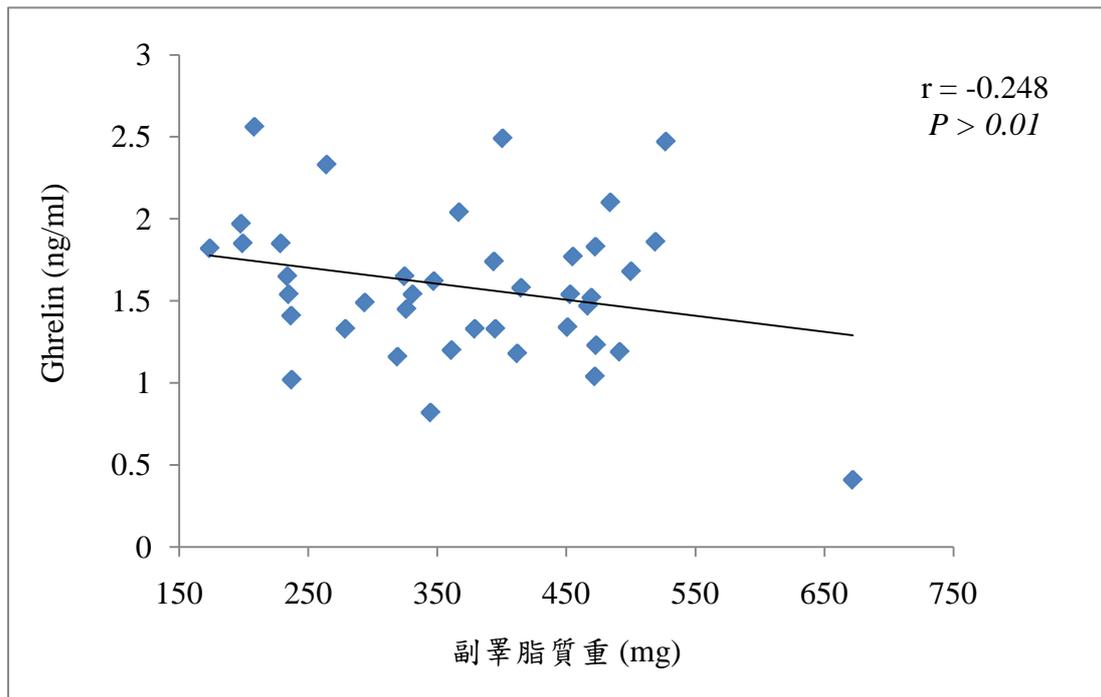
數據皆以 mean±SD 表示；不同英文字母表示各組之間有顯著差異($P < 0.05$)

Fatty acid	Normal (area %)	Control (area %)	0.1% his (area %)	0.2% his (area %)
14:0	0.50 ±0.08 ^a	1.16 ±0.17 ^b	0.91 ±0.26 ^c	1.06 ±0.16 ^{bc}
16:0	21.45 ±0.81 ^a	23.43 ±1.05 ^b	22.88 ±0.56 ^b	23.51 ±1.73 ^b
16:1	2.76 ±0.47 ^{ab}	3.17 ±0.30 ^a	2.51 ±0.76 ^b	2.89 ±0.40 ^{ab}
18:0	7.39 ±1.01 ^a	9.05 ±1.30 ^b	9.27 ±1.01 ^b	9.03 ±1.31 ^b
18:1	14.90 ±1.31 ^a	20.24 ±1.32 ^b	19.37 ±1.70 ^b	20.16 ±1.03 ^b
18:2	33.53 ±1.37 ^a	22.23 ±1.28 ^b	22.23 ±0.95 ^b	22.02 ±0.81 ^b
18:3	1.57 ±0.15 ^a	1.00 ±0.10 ^b	0.88 ±0.13 ^c	0.90 ±0.09 ^{bc}
20:1	0.50 ±0.04 ^a	0.55 ±0.03 ^{ab}	0.62 ±0.09 ^c	0.59 ±0.09 ^{bc}
20:4	5.78 ±0.54 ^a	6.99 ±0.63 ^b	8.09 ±1.25 ^c	7.33 ±0.62 ^b
22:5	0.73 ±0.05 ^a	0.79 ±0.06 ^b	0.88 ±0.06 ^c	0.81 ±0.08 ^b
22:6	7.65 ±0.51 ^a	8.63 ±0.50 ^b	9.49 ±1.09 ^c	8.66 ±0.82 ^b
SFA	29.27±1.14 ^a	32.93±2.07 ^b	33.13±1.20 ^b	33.17±1.80 ^b
MUFA	18.32±1.87 ^a	23.62±1.61 ^b	22.36±1.95 ^b	23.62±1.03 ^b
PUFA	48.31±2.61 ^a	40.11±0.76 ^b	41.76±1.48 ^b	39.66±1.90 ^b
Total	96.71±1.00	96.65±0.80	97.24±1.79	96.3±0.97



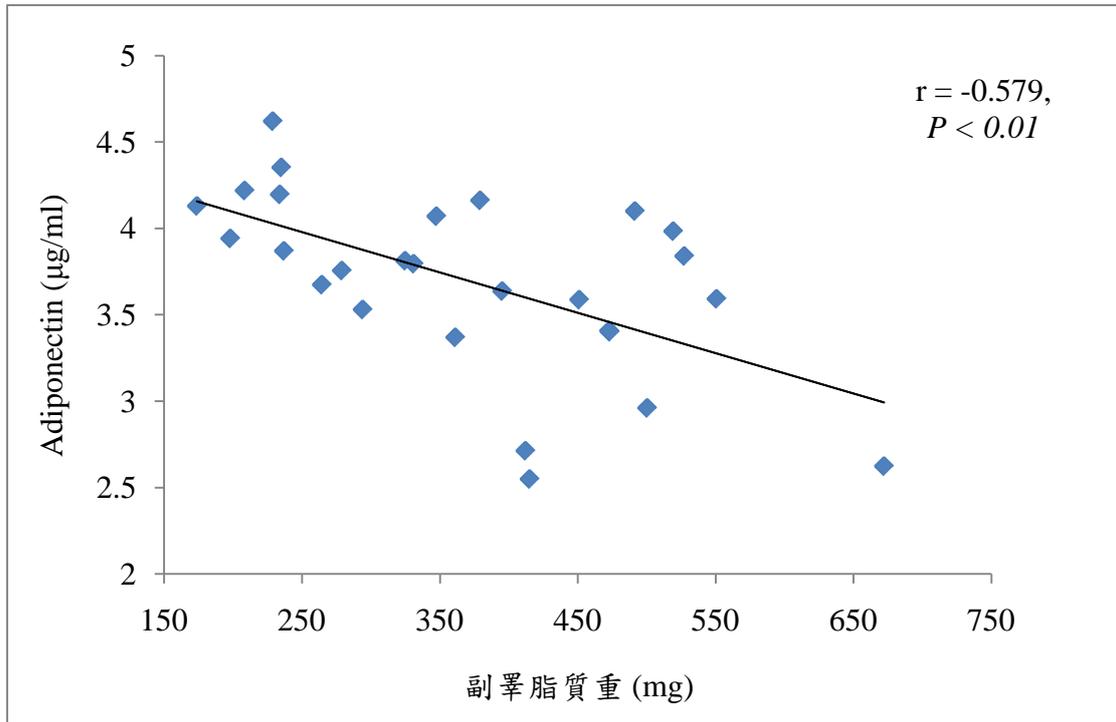
【圖 5-11】 Leptin 與副睪脂質重量的相關性

$P < 0.01$: Leptin 與副睪脂質重量為達顯著的線性相關



【圖 5-12】 Ghrelin 與副睪脂質重量的相關性

$P > 0.01$: Ghrelin 與副睪脂質重量未達顯著的線性相關



【圖 5-13】 Adiponectin 與副睪脂質重量的相關性

$P < 0.01$: Adiponectin 與副睪脂質重量為達顯著的線性相關

第六章 討論

Carnosine 可藉由 carnosinase 降解為 histidine 及 β -alanine，其中 histidine 可再經由 L-histidine decarboxylase 分解產生 histamine (Brown, Stevens et al. 2001)。本實驗室過去的研究指出，在酒精性肝損傷及糖尿病模式下的小鼠，飲水中添加 0.05%、0.1% histidine 或 carnosine 可提供抗發炎、抗氧化的保護效果 (Lee, Hsu et al. 2005; Liu, Liu et al. 2008)。而預先給予 histidine 或 carnosine，對於 acetaminophen 誘發的急性肝損傷小鼠，也可減緩肝臟氧化及發炎傷害 (Yan, Wu et al. 2009)。此外，本實驗室另一份研究發現餵食 5% 奶油的飽和脂肪飲食之小鼠，在飲水中添加 0.1% histidine 或 carnosine 後，有降低胰島素阻抗、血脂質及內臟脂肪堆積等效果 (Mong, Chao et al. 2011)。因此，本實驗更進一步設計探討 histidine 對於更高量(15%)飽和油脂飲食的影響。另一方面，由於先前實驗於飲水中添加 histidine 或 carnosine，結果發現兩者有相似的保護效果，而 histidine 為 carnosine 的代謝產物之一，但是 carnosine 卻比較昂貴，因此本實驗設計為利用不同濃度的 histidine 去探討 histidine 對於高飽和脂肪飲食是否有不同的影響。實驗結果發現，15% 奶油飲食增加體重與副睪脂質重，顯示高飽和油脂飲食確實可誘發肥胖及脂肪堆積。本實驗於飲水中添加不同濃度的 histidine 與高油飲食 control 組相較，對於體重，肝臟脂肪酸組成及副睪脂質沒有明顯影響，但降低了因高飽和油脂所提高的胰島素、血清 TC、肝臟 TG 及 LDL-C 的量。

一、高飽和脂肪酸飲食

由【表 5-3】可知本實驗所使用的一般與特殊飼料的脂肪酸組成差異，表中含奶油飼料的組成中，飽和脂肪酸約 60%，遠高於一般飲食所含的 18%；而多不飽和脂肪酸則是只含 20%，明顯低於一般飼料的 59%。由此可知，餵食含此奶油飼料的

小鼠與一般飲食相較，會攝取到較高量的飽和脂肪。而結果【表 5-4】顯示，給予含 15% 高飽和脂肪飲食會影響小鼠肝臟脂肪酸組成，增加了 SFA 及 MUFA 的比例，降低 PUFA 比例。然而給予 0.1% 或 0.2% 的 histidine 對於肝臟脂肪酸組成與高油飲食 control 組相較，沒有顯著性影響。這結果說明 histidine 對於肝臟脂肪酸 SFA、MUFA 及 PUFA 代謝的影響不大。另有文獻指出，18:2 脂肪酸可在體內經由酵素的延長及去飽和作用生成 20:4 等 n-6 系列脂肪酸；肝臟中的 18:3 脂肪酸也可經由相同酵素作用生成 22:5 與 22:6 等 n-3 系列脂肪酸 (Mathias, Vergara et al. 2010)，文獻也表示 20:4 脂肪酸的增加，也會藉由酵素 cyclooxygenase 和 lipoxygenase 的氧化作用，提高 PGE₂、TXA₂ 及 LTB₄ 等促發炎因子生成；而 n-3 系列脂肪酸則是會與 n-6 系列脂肪酸競爭酵素的作用，並生成 PGE₃、TXA₃ 及 LTB₄ 降低發炎反應 (Mathias, Vergara et al. 2010; Simopoulos 2010)。【表 5-4】中高飽和油脂飲食與一般飲食組別相較，其 18:2 及 18:3 脂肪酸比例皆顯著降低，而 20:4、22:5 與 22:6 脂肪酸比例顯著增加，此暗示餵食高飽和脂肪飲食可能會增加肝臟中 n-6 與 n-3 脂肪酸競爭 cyclooxygenase 和 lipoxygenase 的作用及影響發炎反應的進行。本實驗 0.1% histidine 飲水的組別與 control 組相較，其 18:3 脂肪酸仍然明顯降低，而 20:4、22:5 與 22:6 脂肪酸比例顯著增加；0.2% histidine 組的 20:4、22:5 與 22:6 脂肪酸比例則顯著較 0.1% histidine 組低。目前已知 histidine 可經由 HDC 催化生成 histamine (Brown, Stevens et al. 2001)。動物研究指出，histamine 可以透過 histamine H₂ receptor 降低 arachidonic acid (20:4 脂肪酸) 的釋出以及堆積 cAMP (Traiffort, Ruat et al. 1992)。另一體外研究也表示，histamine 抑制 LTB₄ 的生成是透過 histamine H₂ receptor 抑制 arachidonic acid 釋出以及抑制 5-lipoxygenase 轉位至核膜 (Flamand, Plante et al. 2004)。根據以上研究結果推測，低濃度 histidine 對於合成 n-6 與 n-3 脂肪酸可能有促進效果，但是是否影響發炎反應仍無法證實。此外，0.2% 的 histidine 可能一部分在體內代謝為 histamine，進而抑制 arachidonic acid 的生成、減少發炎因

子合成，而可能因此降低發炎反應。本實驗結果【表 5-1】中，觀察到脾臟重量在高飽和脂肪飲食 control 組顯著增加，而給予 0.2% histidine 的飲水有明顯降低脾臟重量。研究指出，在發炎的小鼠身上可觀察到其脾臟重量顯著較正常小鼠的重，實驗給予抗發炎物質後，有降低小鼠脾臟重量的效果 (Cho, Shin et al. 2010; Komiyama, Andoh et al. 2011)。本實驗室之前研究已證實，給予小鼠含 histidine 的飲水有降低其肝臟中 IL-6、TNF- α 含量等抗發炎的效果 (Lee, Hsu et al. 2005; Liu, Liu et al. 2008; Yan, Wu et al. 2009)。故推測給予此高飽和脂肪飲食可能暗示著發炎反應的發生，而在飲水中添加 0.2% histidine 可能可以降低發炎反應。

目前已有很多研究指出，高脂肪飲食及高飽和脂肪飲食可以誘發人類及老鼠各種系統的改變，包括體重增加、高三酸甘油血症及胰島素阻抗，甚至是代謝症候群等慢性疾病 (Sumiyoshi, Sakanaka et al. 2006; Isharwal, Misra et al. 2009; de Melo, Queiroz et al. 2010)。文獻指出飽和脂肪飲食會造成脂肪堆積、LDL-C 升高、胰島素阻抗及發炎反應，為導致心血管疾病的危險因子 (Siri-Tarino, Sun et al. 2010)。也有研究指出，人體內堆積過多的內臟脂肪，對心血管疾病、胰島素阻抗及代謝症候群是一個高危險因子 (Despres 2007)。餵食高飽和油脂飲食之大鼠，可以誘發其體重增加，產生肥胖，並且增加血中 TG、TC 及 LDL 的濃度，在副睪脂質與肝臟也有脂肪堆積現象，可能會導致脂肪肝等非酒精性肝臟疾病 (Ha, Kim et al. 2011)。本實驗結果與以上研究結果有一致性，餵食高飽和油脂飲食的組別(control 組)其體重、副睪脂質重、insulin、血清中 TC 及 TG、肝臟中 TG 及 LDL-C 皆顯著增加。

二、胰島素阻抗之探討

實驗結果【表 5-2】指出 15% 飽和脂肪的飲食顯著提高胰島素濃度及 HOMA-IR 值。此結果顯示在此飲食造成體內需要更多胰島素去維持血糖的恆定，因此推測飲

食中飽和脂肪使小鼠體內的胰島素敏感度下降。流行病學研究指出，食用富含飽和脂肪的西方飲食與人體胰島素阻抗有正相關，如果飲食中減少攝取 SFA 約 8~14% (佔總熱量的百分比)，空腹胰島素濃度可減少 18%，餐後胰島素濃度也可降低 25% (Parker, Weiss et al. 1993)。由此可知高飽和脂肪飲食會造成體脂肪堆積及降低體內對胰島素的敏感度，導致血中胰島素濃度上升。本實驗結果顯示在飲用含 histidine 飲水後，對血糖沒有顯著影響，但降低了由飽和脂肪所提高的胰島素的量及 HOMA-IR 值。本實驗室過去研究發現，給予飲水含 0.1% 的 histidine 或 carnosine，在餵食含 5% 飽和脂肪飲食的小鼠，可以降低血中胰島素濃度以及 HOMA-IR 的效果 (Mong, Chao et al. 2011)；該文獻也指出，histidine 與 carnosine 降低胰島素阻抗可能是藉由減少脂質生合成、降低血中 TG 及 TC 濃度，因而增加胰島素的敏感度，減少胰島素的分泌。另一研究指出，糖尿病小鼠的飲水中給予 0.1% 的 histidine 或 carnosine 可幫助刺激胰島素分泌、降低血糖，並改善脂質代謝，減少心臟與肝臟 TG 及 TC 的濃度 (Lee, Hsu et al. 2005)。因此推測在本實驗中，給與含 histidine 的飲水對於降低胰島素阻抗，可能是透過增加胰島素的敏感度，減少胰島素分泌，進而降低 HOMA-IR。

三、Histidine 對於體脂肪之影響

本實驗結果發現與 normal 組相較，餵食高飽和脂肪飲食顯著增加了體重【圖 5-1】、副睪脂質重【表 5-1】、血清與肝臟的 TG【圖 5-3】、TC【圖 5-4】及 LDL-C【圖 5-5】。前人的研究顯示，給予小鼠高飽和脂肪飲食會造成體重顯著增加，副睪脂肪重、胰島素、血清 TG 及 TC 量也明顯增加 (Araújo, Leite et al. 2011)。而本實驗給予小鼠含 15% 飽和脂肪酸飲食所產生的結果與以上研究結果具有一致性。且實驗結果顯示給予小鼠 0.1% 及 0.2% 的 histidine 飲水，可降低其血清 TC、肝臟 TG 及 LDL-C 的量，但血清 TG 及肝臟 TC 沒有顯著性影響。本實驗室之前的研究顯示，

給予含 5% 飽和脂肪酸飲食的小鼠，其飲水中添加 0.1% histidine 或 carnosine 後，發現其副睪脂質重，血清及肝臟中 TG、TC 有降低的效果，並指出此結果是透過減少 malic acid、FAS、HMG-CoA reductase、SREBP-1c 和 SREBP-2 的活性或 mRNA 表現量 (Mong, Chao et al. 2011)。本研究結果顯示，提高飼料的脂肪含量(15%)後，0.1% 的 histidine 仍然有降低肝臟 TG 效果。另有文獻指出，大鼠腹腔注射 histidine 可以透過 histamine H3 receptor 拮抗劑活化交感神經而加速白色脂肪組織的分解 (Yoshimatsu, Tsuda et al. 2002)。Uncoupling protein (UCP) -1 的基因表現是由甲狀腺荷爾蒙所調控，在動物研究中，於冷刺激下發現 UCP-1 在產熱效應與調控體溫機制中扮演重要的角色 (Silva and Rabelo 1997)。研究指出，大鼠飼料中添加不同濃度的 histidine，可以提高 UCP-1 的表現量，進而增加老鼠的產熱效應，提高能量的消耗 (Kasaoka, Tsuboyama-Kasaoka et al. 2004)。由以上研究結果推測，低濃度 histidine 對於體內脂肪的影響可能是透過降低脂質生合成相關酵素的活性或表現量，而減少肝中脂質生合成；或是藉由活化交感神經增加棕色脂肪組織產熱效應，加速脂肪組織的分解。此外，有研究顯示大鼠的飲食中給予大量 histidine (2.5%、5%)，反而會增加肝臟中 TG 以及 TC 的堆積 (Hitomi-Ohmura, Amano et al. 1992; Kasaoka, Tsuboyama-Kasaoka et al. 2004)。本實驗結果在 0.2% histidine 組的肝臟 TG、TC 與 0.1% histidine 組相較，有增加的趨勢，含量雖未顯著高於高油 control 組，但這可能是一個過量的警訊。本實驗給予 histidine 飲水可使肝臟 LDL-C 顯著下降，而肝臟中總膽固醇卻沒有顯著差異。文獻指出，LDL-C 在循環之中可將膽固醇酯釋出，而膽固醇酯可再進入 HDL 送回肝臟 (Klerkx, El Harchaoui et al. 2006)。然而，本研究未測血液循環中的 LDL-C 及 HDL-C 之變化 (因小鼠血液不足)，因此，推測肝臟中 LDL-C 可能轉變成 HDL，而使肝中總膽固醇含量維持不變。

四、細胞激素之影響

Ghrelin 為一種經由胃分泌的荷爾蒙，會與 GHS-R 結合，刺激生長激素的分泌，並可透過活化下視丘 NPY 神經元與 AgRP 作用，刺激食慾，增加食物的攝取並減少脂肪的利用，進而導致體重增加 (Ukkola 2003; Klok, Jakobsdottir et al. 2007)。動物研究指出，大鼠餵食高飽和油脂飲食與低油飲食相較，高油飲食組的血漿 ghrelin 濃度顯著低於低油飲食組，表示肥胖和飲食中油脂所佔的量與 ghrelin 的濃度為負相關 (Li, Wang et al. 2010)。另有研究發現，餵食高油飲食的大鼠，其血中 ghrelin 的濃度與副睪脂質重量成反比 (Yamauchi, Kamon et al. 2001)。此外，在人體血漿中 ghrelin 濃度也與體脂肪量及空腹胰島素濃度成反比 (Tschop, Weyer et al. 2001)。在人體中，ghrelin 與其接受器廣泛表現在體內，包含胰臟的 β 細胞，有文獻指出 ghrelin 的增加可經由調控神經元，而抑制胰島素的分泌 (Wierup, Svensson et al. 2002)。本實驗小鼠在餵食高飽和油脂飲食後，ghrelin 明顯下降，其體重與胰島素濃度顯著增加，此與以上研究結果一致。然而飲用含 histidine 之飲水使 ghrelin 濃度回升至與 normal 組相似【圖 5-9】，這可能是因前面討論所推測的 histidine 降低體內脂肪合成，進而使體內 TG、TC 減少，提高胰島素敏感度，並恢復血中 ghrelin 含量，但本實驗沒有測量攝食量，因此不清楚 histidine 對 ghrelin 的影響是否經由調控食慾。

Leptin 主要是由脂肪組織所分泌，其釋放出的 leptin，會通過血腦障壁進入大腦下視丘，並給予訊號使身體將過多的能量儲存下來。高油飲食誘發肥胖會使 leptin 分泌增加，並抑制由 ghrelin 活化的 NPY、AgRP 來降低食慾以抑制食物攝取。文獻指出 leptin 與 ghrelin 會相互影響下視丘的調控食慾與能量儲存，以維持體重與能量動態平衡 (Klok, Jakobsdottir et al. 2007; Handjieva-Darlenska and Boyadjieva 2009)。人體實驗發現，體內血漿 leptin 也與 ghrelin 濃度成反比 (Tschop, Weyer et al. 2001)。有研究指出，肥胖受試者的腦脊髓液中 leptin 濃度與血漿 leptin 濃度一樣皆較正常

體重受試者高，當肥胖受試者在兩週期間食用極低熱量飲食(800kcal)減少約 5% 體重後，其腦脊髓液中 leptin 濃度與血漿 leptin 濃度皆下降 (Nam, Kratzsch et al. 2001)。另一動物研究顯示，大鼠餵食高油飲食後，其體重與體脂肪皆增加，並發現血清中 leptin 濃度與副睪脂質重成正比的關係 (Handjiev-Darlenska and Boyadjieva 2009)。本實驗結果【圖 5-8】在餵食高飽和油脂飲食的小鼠，其血清 leptin 濃度明顯高於 normal 組，顯示飲食中含大量飽和油脂會使體重上升，並增加 leptin 的分泌。而本實驗小鼠飲用含 0.1% histidine 的飲水後，肝臟 TG 與 leptin 有顯著下降，；另一方面，實驗結果也顯示血中 leptin 與 ghrelin 之間的濃度變化成反比，故推測 0.1% histidine 對於 leptin 濃度的降低，可能與增加 ghrelin 的分泌及作用有關。然而 0.2% histidine 的飲水卻沒有改善 leptin 濃度。文獻指出，人體血漿 leptin 濃度及脂肪組織的 mRNA 表現直接涉及肥胖的程度，像是體脂肪百分比的增加與 leptin 的上升有關，可作為總脂肪量的指標 (Considine, Sinha et al. 1996)。在本實驗肝臟 TC 及副睪脂質重的結果中，0.2% histidine 組與高油飲食控制組相較，並沒有顯著降低肝臟 TC 及副睪脂質重量，並且在副睪脂質重量的結果顯示，0.2% histidine 組的重量比高油飲食控制組還重。由此推測 0.2% histidine 的攝取對於 leptin 的沒有顯著降低，可能是因為 0.2% histidine 未改善副睪脂質重，而 leptin 的分泌與體脂肪含量有正相關【圖 5-11】。

文獻指出，adiponectin 是由脂肪組織所分泌，已證實在肥胖及胰島素阻抗的動物模式中，血漿 adiponectin 濃度會降低 (Scherer, Williams et al. 1995; Hotta, Funahashi et al. 2001)。研究顯示，adiponectin 在肝臟中可透過活化 AMPK 而降低葡萄糖生合成，並刺激 ACC 磷酸化及脂肪酸氧化；也可活化 PPAR- α ，刺激脂肪酸氧化作用和降低肝臟 TG 含量 (Kadowaki and Yamauchi 2005)。另外文獻指出，adiponectin 可增加小鼠肌肉葡萄糖接受以及脂肪酸氧化作用，降低肝臟葡萄糖產生

以及改善全身胰島素敏感度 (Yamauchi, Kamon et al. 2001)。在動物研究中，餵食高油飲食誘發肥胖的小鼠，其血漿 adiponectin 濃度顯著低於正常飲食之小鼠，並且與體脂肪及副睪脂質重成反比 (Kadowaki and Yamauchi 2005; Ha, Kim et al. 2011)。文獻證實轉錄因子 PPAR- α 可以透過 adiponectin 促進子上的 peroxisome proliferator response elements (PPRE) 刺激 adiponectin 的基因轉錄作用 (Hiuge, Tenenbaum et al. 2007)，並在動物研究發現，餵食高油飲食會使小鼠的白色脂肪組織增加，直接影響使 PPAR- α 的表現量降低，進而減少血中 adiponectin 濃度 (Qiao, Lee et al. 2011)。本實驗結果【圖 5-10】、【圖 5-13】中，高飽和飲食之攝取的確降低了血清 adiponectin 的量，與體脂肪呈負相關，而飲用含 histidine 的飲水可顯著恢復 adiponectin 濃度。推測 histidine 可能經由減少體脂肪量，使血清中 adiponectin 的濃度恢復，但 histidine 是否影響 PPAR α 或 AMPK pathway 仍不清楚，有待後續研究探討。此外，恢復的 adiponectin 可能可以幫助肌肉對葡萄糖的攝取，進而改善胰島素的敏感度，此結果與本實驗 HOMA-IR 值相比較有一致性。

五、尿酸與氧化壓力之影響

文獻指出，攝取富含脂肪、海鮮及酒類的飲食會使血清尿酸濃度增加，並增加代謝症候群的危險 (Lee, Terkeltaub et al. 2006)。另一文獻指出，當胰島素增加時，腎臟排出尿酸的能力下降，而使血中尿酸增加，因此血中胰島素濃度會與尿酸濃度成正比 (Facchini, Chen et al. 1991)。在動物研究中，餵食高油飲食可以顯著增加體重、血脂 (如 TG、TC 和 LDL)、胰島素阻抗以及血中尿酸濃度 (Amin and Nagy 2009)。人體研究發現，代謝症候群的受試者血液分析中，尿酸濃度與肥胖程度成正比，且血液中尿酸越高者，其血中 TC、TG 濃度也較高 (Ishizaka, Ishizaka et al. 2005; Chen, Zhu et al. 2007)。本實驗結果【圖 5-6】發現，餵食高飽和脂肪飲食的小鼠在血清、心臟及腎臟中尿酸濃度皆顯著增加，且血中胰島素、TG 及 TC 含量也明顯提高。而

飲水中添加不同濃度的 histidine 之後，顯著降低血清、心臟及腎臟中尿酸及 TC 濃度，推測可能是 histidine 降低血中 TC，使腎臟排出尿酸能力增加，進而降低體內尿酸濃度。

研究指出，高尿酸血症可能會透過氧化壓力而使內皮細胞功能異常，進而導致心血管疾病 (Kanellis and Kang 2005)。體內尿酸為 purine 代謝的最終產物，其形成是經由 XO 的作用，代謝步驟為 hypoxanthine 藉由 XO 的 hydroxylation 作用轉變成 xanthine，接著再將其代謝產生尿酸。文獻指出，尿酸形成後，一方面經血液運送至腎臟收集成尿液並排出體外，另一方面可經由 uricase 代謝為 allantoin。但人類經過進化已使得體內的 uricase 成為不活化狀態，因此尿酸在人體被視為 purine 的最終產物，而其他哺乳動物如小鼠體內還有活化的 uricase，可使尿酸代謝為 allantoin (Hayashi, Fujiwara et al. 2000; So and Thorens 2010)。本實驗結果【圖 5-6】及【圖 5-7】顯示，餵食高飽和脂肪飲食的小鼠在血清、心臟及腎臟中尿酸濃度以及 XO 活性都有顯著增加，表示高飽和脂肪的攝取會增加體內氧化壓力，並且會增加尿酸的形成。但是在飲用含 histidine 的飲水後，XO 的活性沒有顯著影響，而尿酸卻有顯著下降，故推測一方面可能是 histidine 降低胰島素阻抗，增加尿酸在腎臟的排出；另一方面可能是因為小鼠體內有 uricase 可以催化尿酸代謝成 allantoin (So and Thorens 2010)，但本實驗沒有測定 uricase 的活性，因此 histidine 對於尿酸的降低，是經由腎臟排出還是經酵素降解為其他產物仍無法確定。

第七章 結論

給予小鼠飲水含 0.1%的 histidine，對於 15%飽和油脂飲食所誘發的胰島素抵抗以及脂質代謝相關荷爾蒙的改變有保護的效果；但是給予 0.2% histidine 飲水與 0.1%相較，其效果並沒有因劑量關係而更佳。因此，本實驗結果支持 0.1%的 histidine 或許有助於減緩高飽和油脂所造成的肥胖相關的代謝傷害。



第八章 參考文獻

- Amin, K.A., Nagy, M.A., 2009. Effect of Carnitine and herbal mixture extract on obesity induced by high fat diet in rats. *Diabetol Metab Syndr* 1, 17.
- Araújo, T.G., Leite, A.C.R., Martins da Fonseca, C.S., Carvalho, B.M., Schuler, A.R.P., Lima, V.L.d.M., 2011. High-fat diet based on dried bovine brain: an effective animal model of dyslipidemia and insulin resistance. *J Physiol Biochem*.
- Bjorbaek, C., El-Haschimi, K., Frantz, J.D., Flier, J.S., 1999. The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *J Biol Chem* 274, 30059-30065.
- Brown, R.E., Stevens, D.R., Haas, H.L., 2001. The physiology of brain histamine. *Prog Neurobiol* 63, 637-672.
- Canete, R., Gil-Campos, M., Aguilera, C.M., Gil, A., 2007. Development of insulin resistance and its relation to diet in the obese child. *Eur J Nutr* 46, 181-187.
- Carmiel-Haggai, M., Cederbaum, A.I., Nieto, N., 2005. A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *FASEB J* 19, 136-138.
- Chen, L.Y., Zhu, W.H., Chen, Z.W., Dai, H.L., Ren, J.J., Chen, J.H., Chen, L.Q., Fang, L.Z., 2007. Relationship between hyperuricemia and metabolic syndrome. *J Zhejiang Univ Sci B* 8, 593-598.
- Cheung, C.C., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 1997. Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* 138, 4489-4492.
- Cho, E.J., Shin, J.S., Noh, Y.S., Cho, Y.W., Hong, S.J., Park, J.H., Lee, J.Y., Lee, K.T., 2010. Anti-inflammatory effects of methanol extract of *Patrinia scabiosaefolia* in mice with ulcerative colitis. *J Ethnopharmacol*.
- 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.
- Considine, R.V., Sinha, M.K., Heiman, M.L., Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Marco, C.C., McKee, L.J., Bauer, T.L., et al., 1996. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334, 292-295.
- de Melo, C.L., Queiroz, M.G.R., Fonseca, S.G.C., Bizerra, A.M.C., Lemos, T.L.G., Melo, T.S., Santos, F.A., Rao, V.S., 2010. Oleanolic acid, a natural triterpenoid improves blood glucose tolerance in normal mice and ameliorates visceral obesity in mice fed a high-fat diet. *Chem-Biol Interact* 185, 59-65.
- Despres, J.P., 2007. Cardiovascular disease under the influence of excess visceral fat.

- Crit Pathw Cardiol 6, 51-59.
- Endo, M., Kasaoka, S., Takizawa, M., Goto, K., Nakajima, S., Moon, S.K., Kim, I.S., Jeong, B.Y., Nakamura, S., 2010. Suppressed Fat Accumulation in Rats Fed a Histidine-Enriched Diet. *J Food Sci Nutr* 15, 1-6.
- Facchini, F., Chen, Y.D., Hollenbeck, C.B., Reaven, G.M., 1991. Relationship between resistance to insulin-mediated glucose uptake, urinary uric acid clearance, and plasma uric acid concentration. *JAMA* 266, 3008-3011.
- Flamand, N., Plante, H., Picard, S., Laviolette, M., Borgeat, P., 2004. Histamine-induced inhibition of leukotriene biosynthesis in human neutrophils: involvement of the H₂ receptor and cAMP. *Br J Pharmacol* 141, 552-561.
- Galic, S., Oakhill, J.S., Steinberg, G.R., 2010. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol* 316, 129-139.
- Gastaldelli, A., Natali, A., Vettor, R., Corradini, S.G., 2010. Insulin resistance, adipose depots and gut: interactions and pathological implications. *Dig Liver Dis* 42, 310-319.
- Gerber, D.A., Gerber, M.G., 1977. Specificity of a low free serum histidine concentration for rheumatoid arthritis. *J Chronic Dis* 30, 115-127.
- Gustafson, B., 2010. Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 17, 332-341.
- Ha, S.K., Kim, J., Chae, C., 2011. Role of AMP-activated Protein Kinase and Adiponectin during Development of Hepatic Steatosis in High-fat Diet-induced Obesity in Rats. *J Comp Pathol* 145, 88-94.
- Hajer, G.R., van der Graaf, Y., Olijhoek, J.K., Edlinger, M., Visseren, F.L., 2007. Low plasma levels of adiponectin are associated with low risk for future cardiovascular events in patients with clinical evident vascular disease. *Am Heart J* 154, 750 e751-757.
- Hajer, G.R., van Haften, T.W., Visseren, F.L., 2008. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J* 29, 2959-2971.
- Hammarstedt, A., Jansson, P.A., Wesslau, C., Yang, X., Smith, U., 2003. Reduced expression of PGC-1 and insulin-signaling molecules in adipose tissue is associated with insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun* 301, 578-582.
- Handjieva-Darlenska, T., Boyadjieva, N., 2009. The effect of high-fat diet on plasma ghrelin and leptin levels in rats. *J Physiol Biochem* 65, 157-164.
- Hayashi, S., Fujiwara, S., Noguchi, T., 2000. Evolution of urate-degrading enzymes in animal peroxisomes. *Cell Biochem Biophys* 32 Spring, 123-129.
- Hitomi-Ohmura, E., Amano, N., Aoyama, Y., Yoshida, A., 1992. The effect of a histidine-excess diet on cholesterol synthesis and degradation in rats. *Lipids* 27,

755-760.

- Hiuge, A., Tenenbaum, A., Maeda, N., Benderly, M., Kumada, M., Fisman, E.Z., Tanne, D., Matas, Z., Hibuse, T., Fujita, K., Nishizawa, H., Adler, Y., Motro, M., Kihara, S., Shimomura, I., Behar, S., Funahashi, T., 2007. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor ligands, bezafibrate and fenofibrate, on adiponectin level. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 635-641.
- Hotta, K., Funahashi, T., Bodkin, N.L., Ortmeier, H.K., Arita, Y., Hansen, B.C., Matsuzawa, Y., 2001. Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes* 50, 1126-1133.
- Isharwal, S., Misra, A., Wasir, J.S., Nigam, P., 2009. Diet & insulin resistance: a review & Asian Indian perspective. *Indian J Med Res* 129, 485-499.
- Ishizaka, N., Ishizaka, Y., Toda, E., Nagai, R., Yamakado, M., 2005. Association between serum uric acid, metabolic syndrome, and carotid atherosclerosis in Japanese individuals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 1038-1044.
- James, M.J., Gibson, R.A., Cleland, L.G., 2000. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr* 71, 343S-348S.
- Kadowaki, T., Yamauchi, T., 2005. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 26, 439-451.
- Kanellis, J., Kang, D.H., 2005. Uric acid as a mediator of endothelial dysfunction, inflammation, and vascular disease. *Semin Nephrol* 25, 39-42.
- Kang, J.X., Weylandt, K.H., 2008. Modulation of inflammatory cytokines by omega-3 fatty acids. *Subcell Biochem* 49, 133-143.
- 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.
- Katz, A., Nambi, S.S., Mather, K., Baron, A.D., Follmann, D.A., Sullivan, G., Quon, M.J., 2000. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 2402-2410.
- Kennedy, A., Martinez, K., Chuang, C.C., LaPoint, K., McIntosh, M., 2009. Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications. *J Nutr* 139, 1-4.
- Klerkx, A.H., El Harchaoui, K., van der Steeg, W.A., Boekholdt, S.M., Stroes, E.S., Kastelein, J.J., Kuivenhoven, J.A., 2006. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) inhibition beyond raising high-density lipoprotein cholesterol levels: pathways by which modulation of CETP activity may alter atherogenesis.

- Arterioscler Thromb Vasc Biol 26, 706-715.
- Klok, M.D., Jakobsdottir, S., Drent, M.L., 2007. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obes Rev* 8, 21-34.
- Komiyama, Y., Andoh, A., Fujiwara, D., Ohmae, H., Araki, Y., Fujiyama, Y., Mitsuyama, K., Kanauchi, O., 2011. New prebiotics from rice bran ameliorate inflammation in murine colitis models through the modulation of intestinal homeostasis and the mucosal immune system. *Scand J Gastroenterol* 46, 40-52.
- Kopple, J.D., Swendseid, M.E., 1975. Evidence that histidine is an essential amino acid in normal and chronically uremic man. *J Clin Invest* 55, 881-891.
- Lee, J.S., Pinnamaneni, S.K., Eo, S.J., Cho, I.H., Pyo, J.H., Kim, C.K., Sinclair, A.J., Febbraio, M.A., Watt, M.J., 2006a. Saturated, but not n-6 polyunsaturated, fatty acids induce insulin resistance: role of intramuscular accumulation of lipid metabolites. *J Appl Physiol* 100, 1467-1474.
- Lee, S.J., Terkeltaub, R.A., Kavanaugh, A., 2006b. Recent developments in diet and gout. *Curr Opin Rheumatol* 18, 193-198.
- 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.
- Li, J., Wang, S., Zhang, N., Li, Z., Li, R., Li, C., 2010. Effects of changing dietary fat content on plasma gut hormone concentrations in diet-induced obese and diet-resistant rats. *Brit J Nutr* 105, 879-886.
- 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.
- Long, Y.C., Zierath, J.R., 2006. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest* 116, 1776-1783.
- Lumeng, C.N., Bodzin, J.L., Saltiel, A.R., 2007. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 117, 175-184.
- Martin, T.L., Alquier, T., Asakura, K., Furukawa, N., Preitner, F., Kahn, B.B., 2006. Diet-induced obesity alters AMP kinase activity in hypothalamus and skeletal muscle. *J Biol Chem* 281, 18933-18941.
- Masaki, T., Yoshimatsu, H., Chiba, S., Watanabe, T., Sakata, T., 2001. Central infusion of histamine reduces fat accumulation and upregulates UCP family in leptin-resistant obese mice. *Diabetes* 50, 376-384.
- Mathias, R.A., Vergara, C., Gao, L., Rafaels, N., Hand, T., Campbell, M., Bickel, C., Ivester, P., Sergeant, S., Barnes, K.C., Chilton, F.H., 2010. FADS genetic variants and omega-6 polyunsaturated fatty acid metabolism in a

- homogeneous island population. *J Lipid Res* 51, 2766-2774.
- Matsunami, T., Sato, Y., Ariga, S., Sato, T., Shimomura, T., Kashimura, H., Hasegawa, Y., Yukawa, M., 2011. Regulation of synthesis and oxidation of fatty acids by adiponectin receptors (AdipoR1/R2) and insulin receptor substrate isoforms (IRS-1/-2) of the liver in a nonalcoholic steatohepatitis animal model. *Metabolism* 60, 805-814.
- Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Treacher, D.F., Turner, R.C., 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28, 412-419.
- Mong, M.-c., Chao, C.-y., Yin, M.-c., 2011. Histidine and carnosine alleviated hepatic steatosis in mice consumed high saturated fat diet. *Eur J Pharmacol* 653, 82-88.
- Munzberg, H., Myers, M.G., Jr., 2005. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat Neurosci* 8, 566-570.
- Murphy, K.G., Bloom, S.R., 2006. Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature* 444, 854-859.
- Nam, S.Y., Kratzsch, J., Kim, K.W., Kim, K.R., Lim, S.K., Marcus, C., 2001. Cerebrospinal fluid and plasma concentrations of leptin, NPY, and alpha-MSH in obese women and their relationship to negative energy balance. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 4849-4853.
- Otto, T.C., Lane, M.D., 2005. Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 40, 229-242.
- Parker, D.R., Weiss, S.T., Troisi, R., Cassano, P.A., Vokonas, P.S., Landsberg, L., 1993. Relationship of dietary saturated fatty acids and body habitus to serum insulin concentrations: the Normative Aging Study. *Am J Clin Nutr* 58, 129-136.
- Peng, Y., Rideout, D., Rakita, S., Sajan, M., Farese, R., You, M., Murr, M.M., 2009. Downregulation of adiponectin/AdipoR2 is associated with steatohepatitis in obese mice. *J Gastrointest Surg* 13, 2043-2049.
- Peterson, J.W., King, D., Ezell, E.L., Rogers, M., Gessell, D., Hoffpauer, J., Reuss, L., Chopra, A.K., Gorenstein, D., 2001. Cholera toxin-induced PGE(2) activity is reduced by chemical reaction with L-histidine. *Biochim Biophys Acta* 1537, 27-41.
- Pinals, R.S., Harris, E.D., Burnett, J.B., Gerber, D.A., 1977. Treatment of rheumatoid arthritis with L-histidine: a randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *J Rheumatol* 4, 414-419.
- Qiao, L., Lee, B., Kinney, B., Yoo, H.S., Shao, J., 2011. Energy intake and

- adiponectin gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300, E809-816.
- Rabbani, G.H., Sack, D.A., Ahmed, S., Peterson, J.W., Saha, S.K., Marni, F., Thomas, P., 2005. Antidiarrheal effects of L-histidine-supplemented rice-based oral rehydration solution in the treatment of male adults with severe cholera in Bangladesh: a double-blind, randomized trial. *J Infect Dis* 191, 1507-1514.
- Rabe, K., Lehrke, M., Parhofer, K.G., Broedl, U.C., 2008. Adipokines and insulin resistance. *Mol Med* 14, 741-751.
- Razny, U., Wator, L., Polus, A., Kiec-Wilk, B., Wan, Y.J., Dyduch, G., Tomaszewska, R., Dembinska-Kiec, A., 2010. Modulatory effect of high saturated fat diet-induced metabolic disturbances on angiogenic response in hepatocyte RXRalpha knockout mice. *Pharmacol Rep* 62, 1078-1089.
- Saad, M.F., Bernaba, B., Hwu, C.M., Jinagouda, S., Fahmi, S., Kogosov, E., Boyadjian, R., 2002. Insulin regulates plasma ghrelin concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 3997-4000.
- Sahu, A., 2003. Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Front Neuroendocrinol* 24, 225-253.
- Saladin, R., De Vos, P., Guerre-Millo, M., Leturque, A., Girard, J., Staels, B., Auwerx, J., 1995. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 377, 527-529.
- Scherer, P.E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., Lodish, H.F., 1995. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 270, 26746-26749.
- Seo, T., Qi, K., Chang, C., Liu, Y., Worgall, T.S., Ramakrishnan, R., Deckelbaum, R.J., 2005. Saturated fat-rich diet enhances selective uptake of LDL cholesteryl esters in the arterial wall. *J Clin Invest* 115, 2214-2222.
- Shiiba, T., Nakazato, M., Mizuta, M., Date, Y., Mondal, M.S., Tanaka, M., Nozoe, S., Hosoda, H., Kangawa, K., Matsukura, S., 2002. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 240-244.
- Silva, J.E., Rabelo, R., 1997. Regulation of the uncoupling protein gene expression. *Eur J Endocrinol* 136, 251-264.
- Simopoulos, A.P., 2010. Genetic variants in the metabolism of omega-6 and omega-3 fatty acids: their role in the determination of nutritional requirements and chronic disease risk. *Exp Biol Med (Maywood)* 235, 785-795.
- Siri-Tarino, P.W., Sun, Q., Hu, F.B., Krauss, R.M., 2010. Saturated fat, carbohydrate, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 91, 502-509.
- Snyderman, S.E., Boyer, A., Roitman, E., Holt, L.E., Jr., Prose, P.H., 1963. The histidine requirement of the infant. *Pediatrics* 31, 786-801.

- So, A., Thorens, B., 2010. Uric acid transport and disease. *J Clin Invest* 120, 1791-1799.
- Steinberg, G.R., McAinch, A.J., Chen, M.B., O'Brien, P.E., Dixon, J.B., Cameron-Smith, D., Kemp, B.E., 2006. The suppressor of cytokine signaling 3 inhibits leptin activation of AMP-kinase in cultured skeletal muscle of obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 3592-3597.
- Sumiyoshi, M., Sakanaka, M., Kimura, Y., 2006. Chronic intake of high-fat and high-sucrose diets differentially affects glucose intolerance in mice. *J Nutr* 136, 582-587.
- Tabor, H., 1954. Metabolic studies on histidine, histamine, and related imidazoles. *Pharmacol Rev* 6, 299-343.
- Traiffort, E., Ruat, M., Arrang, J.M., Leurs, R., Piomelli, D., Schwartz, J.C., 1992. Expression of a cloned rat histamine H₂ receptor mediating inhibition of arachidonate release and activation of cAMP accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 2649-2653.
- Tschop, M., Weyer, C., Tataranni, P.A., Devanarayan, V., Ravussin, E., Heiman, M.L., 2001. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 50, 707-709.
- Tsuchida, A., Yamauchi, T., Ito, Y., Hada, Y., Maki, T., Takekawa, S., Kamon, J., Kobayashi, M., Suzuki, R., Hara, K., Kubota, N., Terauchi, Y., Froguel, P., Nakae, J., Kasuga, M., Accili, D., Tobe, K., Ueki, K., Nagai, R., Kadowaki, T., 2004. Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *J Biol Chem* 279, 30817-30822.
- Ukkola, O., 2003. Ghrelin and insulin metabolism. *Eur J Clin Invest* 33, 183-185.
- Urazaev, A., Naumenko, N.V., Nikolsky, E.E., Vyskocil, F., 1998. Carnosine and other imidazole-containing compounds enhance the postdenervation depolarization of the rat diaphragm fibres. *Physiol Res* 47, 291-295.
- USDA., HHS., 2010. Dietary Guidelines for Americans, 2010.
- Wannamethee, S.G., Lowe, G.D., Rumley, A., Cherry, L., Whincup, P.H., Sattar, N., 2007. Adipokines and risk of type 2 diabetes in older men. *Diabetes Care* 30, 1200-1205.
- Wierup, N., Svensson, H., Mulder, H., Sundler, F., 2002. The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul Pept* 107, 63-69.
- Wormald, S., Hilton, D.J., 2004. Inhibitors of cytokine signal transduction. *J Biol Chem* 279, 821-824.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., Mori, Y., Ide, T., Murakami, K., Tsuboyama-Kasaoka, N., Ezaki, O., Akanuma, Y., Gavrilova,

- O., Vinson, C., Reitman, M.L., Kagechika, H., Shudo, K., Yoda, M., Nakano, Y., Tobe, K., Nagai, R., Kimura, S., Tomita, M., Froguel, P., Kadowaki, T., 2001. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity. *Nat Med* 7, 941-946.
- Yamauchi, T., Nio, Y., Maki, T., Kobayashi, M., Takazawa, T., Iwabu, M., Okada-Iwabu, M., Kawamoto, S., Kubota, N., Kubota, T., Ito, Y., Kamon, J., Tsuchida, A., Kumagai, K., Kozono, H., Hada, Y., Ogata, H., Tokuyama, K., Tsunoda, M., Ide, T., Murakami, K., Awazawa, M., Takamoto, I., Froguel, P., Hara, K., Tobe, K., Nagai, R., Ueki, K., Kadowaki, T., 2007. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med* 13, 332-339.
- 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, H259-265.
- Yoshimatsu, H., Tsuda, K., Nijima, A., Tatsukawa, M., Chiba, S., Sakata, T., 2002. Histidine induces lipolysis through sympathetic nerve in white adipose tissue. *Eur J Clin Invest* 32, 236-241.
- Zhang, H.H., Kumar, S., Barnett, A.H., Eggo, M.C., 2000. Tumour necrosis factor-alpha exerts dual effects on human adipose leptin synthesis and release. *Mol Cell Endocrinol* 159, 79-88.