

中國醫藥大學營養學系

碩士論文

飽和脂肪及反式脂肪的攝取對 STZ 誘發糖尿病小
鼠之發炎反應的影響

**The influence of saturated and trans fats upon
inflammatory status in diabetic mice**

研究生：溫心璇 Shin-Shiuan Wen

指導教授：殷梅津 博士 Mei-Chin Yin, Ph D.

中華民國 101 年 6 月 26 日

June, 2012

謝誌

首先，要謝謝我的指導教授殷梅津教授，離家出門在外的我特別可以感受到殷老師像媽媽的溫暖，不只是在實驗及課業上，生活中也常給我們許多關心，我永遠不會忘記老師的直接與率性。寫論文時，我常有許多小迷糊與粗心大意，幸虧老師很有耐心一次又一次地給予我論文上的指教與建議。如果沒有一個這麼好的指導老師，或許現在的我還在沒有方向的遊走，謝謝殷老師給我很大的空間與自由，在研究所最後三個月去做自己想做的事，同時也讓我順利完成這個學位，或許我比其他同學都還要捨不得自己的指導老師吧！另外要感謝詹老師與黃老師抽空前來我的口試，謝謝兩位老師給予我實驗與論文上的指教，帶給我在實驗上有更進一步的思考。

研究所這兩年時間過得很快，轉眼間就要離開這個充滿歡笑又令人懷念的實驗室，很感謝當初遇見殷老師的收留，讓我認識超級 nice 的欣珮學姊，除了實驗上細心指導外，更帶我認識許多學姐們，讓我有機會和大家一起出遊，增添碩一生活更多色彩與回憶。要感謝每一次犧牲都抽空前來幫忙的文虎及智弘學長，如果沒有你們的幫忙，我們也不可能如此神速地完成犧牲。還要謝謝與我同時驗室同學培群，在你身上我學到了許多實驗上的細心外，同時帶給我更多思考的方向，還有，每一次殷家的出遊，幸好有你擔任大家的司機，讓大家有個很舒適的旅程。當然還要感謝殷家乾女兒(毛毛)和兩個貼心的學妹(維婷&筱淇)，殷家有了你們後，雖然規矩不再，但實驗室裡的氣氛卻是越來越好，謝謝你們帶來的歡笑與快樂。

最後，還要感謝不能少了研究所裡陪伴著我的同學們：義泰、金剛、木瓜田，雖然大家都有個自很忙碌的實驗，但每次與你們相聚在一起時，總可以忘卻許多煩惱，無話不談、歡笑不斷。雖然我提早離開了你們，但希望我們的這份情誼可以保持連繫延續下去。

溫心璇 謹致於
中國醫藥大學營養學系研究所
中華民國一百零一年七月八日

目錄

	頁次
目錄.....	i
圖目錄.....	v
表目錄.....	vi
縮寫對照表.....	vii
摘要.....	I
Abstract.....	II
第一章 前言.....	1
第二章 文獻探討.....	2
一、反式脂肪酸.....	2
二、食品中的反式脂肪酸.....	2
三、飽和脂肪與反式脂肪對健康的影響.....	3
1.飽和脂肪與健康.....	3
2.反式脂肪與健康.....	4
四、糖尿病的定義、診斷標準及分類.....	5
1.糖尿病之定義.....	5
2.糖尿病之診斷標準.....	6
五、糖尿病的類型.....	6
1.第1型糖尿病(T1DM).....	6
2.第2型糖尿病(T2DM).....	7
3.妊娠性糖尿病(GDM).....	7
4.糖尿病併發症(diabetes complication).....	8

六、糖尿病與氧化發炎反應.....	9
七、糖尿病與血脂代謝異常.....	13
八、糖尿病與高脂飲食.....	13
第三章 研究目的.....	14
第四章 材料與方法.....	15
一、實驗材料.....	15
1. 實驗動物.....	15
2. 實驗特殊飲食.....	15
3. 化學試藥.....	15
4. 分析實驗套組.....	16
5. 儀器設備.....	17
6. 中西式食品脂肪酸組成分析.....	17
二、實驗方法.....	18
1. 糖尿病動物誘發模式.....	18
2. 實驗設計.....	18
(a) 特殊飲食製備方法.....	19
(b) 血液、臟器之收集.....	19
(c) 臟器均質液處理.....	19
3. 中西式食品脂質萃取.....	20
三、分析方法.....	21
1、血清胰島素濃度測定.....	21
2、HOMA-IR 計算.....	22
3、血清 AST 濃度測定.....	23
4、血清 ALT 濃度測定.....	24

5、肝臟均質液蛋白質濃度測定	25
6、肝臟粗萃脂均質液中 TG 濃度測定	27
7、肝臟粗萃脂均質液中 TC 濃度測定	27
8、肝臟粗萃脂均質液中 LDL 濃度測定	28
9、肝臟均質液中 IL-6 濃度測定	29
10、肝臟均質液中 TNF- α 濃度測定	31
11、肝臟均質液中 MCP-1 濃度測定	32
12、肝臟脂肪酸組成	34
13、中西式食品中脂肪酸組成	36
四、統計分析	36
第五章 結果	37
一、體重變化	37
二、飲水量	37
三、攝食量	38
四、臟器重量	38
五、空腹血糖、血清 insulin 濃度及 HOMA-IR 值	38
六、血清酵素變化	39
1、血清 AST 濃度	39
2、血清 ALT 濃度	39
七、肝臟 TG 濃度	39
八、肝臟 TC 濃度	40
九、肝臟 LDL 濃度	40
十、肝臟中發炎因子濃度	40
1、肝臟 IL-6 濃度	40

2、肝臟 TNF- α 濃度	40
3、肝臟 MCP-1 濃度	41
十一、脂肪酸組成	41
1、實驗飼料、20% 奶油飼料所含的脂肪酸組成	41
2、肝臟脂肪酸組成	41
十二、中式食品中脂肪酸組成	41
十三、西式食品中脂肪酸組成	42
第六章 討論	60
一、不同脂質對糖尿病小鼠胰島素和血糖之影響	60
二、不同脂質對糖尿病小鼠體重及肝臟脂質組成之影響	60
1.體重與副睪脂質	60
2.肝臟脂質組成	61
三、不同脂質對糖尿病小鼠肝臟發炎指標之影響	62
1.肝臟發炎指標之影響	62
2.肝功能之影響	63
四、市售食品脂肪酸組成	64
第七章 結論	65
第八章 參考文獻	66

圖目錄

頁次

【圖 2-1】 Cis form (oleic acid)和 Trans form (elaidic acid)幾何圖形.....	3
【圖 2-2】 高血糖及游離脂肪酸活化氧化壓力訊息路徑導致糖尿病併發症路徑.....	10
【圖 2-3】 高血糖所誘發的 polyol、hexosamine、PKC 及 AGE pathway.....	12
【圖 5-1】 進行 8 週實驗期間每週體重變化.....	43
【圖 5-2】 進行 8 週實驗期間每天平均飲水量之變化.....	44
【圖 5-3】 進行 8 週實驗期間每天平均攝食量之變化.....	45
【圖 5-4】 餵食 20 % 飽和及反式脂肪飲食 8 週後小鼠血清 AST 濃度.....	48
【圖 5-5】 餵食 20 % 飽和及反式脂肪飲食 8 週後小鼠血清 ALT 濃度.....	49
【圖 5-6】 餵食 20 % 飽和及反式脂肪飲食 8 週後小鼠肝臟 TG 濃度.....	50
【圖 5-7】 餵食 20 % 飽和及反式脂肪飲食 8 週後小鼠肝臟 TC 濃度.....	51
【圖 5-8】 餵食 20 % 飽和及反式脂肪飲食 8 週後小鼠肝臟 LDL 濃度.....	52
【圖 5-9】 餵食 20 % 飽和及反式脂肪飲食 8 週後小鼠肝臟 IL-6 濃度.....	53
【圖 5-10】 餵食 20 % 飽和及反式脂肪飲食 8 週後小鼠肝臟 TNF- α 濃度.....	54
【圖 5-11】 餵食 20 % 飽和及反式脂肪飲食 8 週後小鼠肝臟 MCP-1 濃度.....	55

表目錄

	頁次
【表 4-1】實驗分組.....	18
【表 4-2】不同樣品所分析的項目.....	20
【表 4-3】蛋白質測定的標準品配製.....	26
【表 5-1】進行 8 週實驗後小鼠臟器與體重之相對重.....	46
【圖 5-2】餵食 20 % 飽和及反式脂肪飲食 8 週後小鼠空腹血糖、血清 insulin 濃度及 HOMA-IR 值.....	47
【表 5-3】本實驗所使用之飼料與實驗奶油飲食脂肪酸的組成.....	56
【表 5-4】本實驗餵食市售奶油飲食後肝臟脂肪酸組成.....	57
【表 5-5】市售中式食品脂肪酸組成.....	58
【表 5-6】市售西式食品脂肪酸組成.....	59

縮寫對照表

英文縮寫	英文全名
ADA	American diabetes association
AGEs	Advanced glycation end-products
AST	Aspartate aminotransferase
ALT	Alanine aminotransferase
BF3	Boron trifluoride-methanol-complex solution
BSA	Bovine serum albumin
CETP	Cholesteryl ester transfer protein
CRP	C-Reactive Protein
CVD	Cardiovascular disease
DAG	Diacylglycerol
DAN	Diabetic autonomic neuropathy
DAP	Dihydroxyacetone phosphate
DHAP	Dihydroxyacetone phosphate
DM	Diabetes mellitus
DN	Diabetic nephropathy
DPN	Diabetic peripheral neuropathy
DR	Diabetic retinopathy
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
F-6-P	Fuctose-6-phosphate
G-3-P	Glycerol-3-phosphate
GA-3-P	Glycerolaldehyde-3-phosphate
GAPDH	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase
GC	Gas chromatography
GDM	Gestational diabetes mellitus
GFAT	Glutamine fructose-6-phosphate amidotransferase:
GK	Glycerolkinase
GLUT4	Glucose transporter 4
GOT	Glutamate oxaloacetate transaminase
GPO	Glycerol-3-phosphate oxidase

GPT	Glutamate pyruvate transaminase
HDL	High-density lipoprotein
HLA	Human leukocyte antigen
HOMA-IR	Homeostasis model assessment-insulin resistance
IDDM	Insulin dependent diabetes mellitus
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
IRS1	Insulin receptor substrate 1
JNK/SAPK	Jun N-terminal kinase / Stress activated protein kinase
KH₂PO₄	Potassium dihydrogenphosphate
LDH	Lactate dehydrogenase
LDL	Low-density lipoprotein
LDL-C	Low-density lipoprotein cholesterol
LPL	Lipoprotein lipase
MCP-1	Mouse monocyte chemoattractant protein-1
MDH	Malate dehydrogenase
MUFA	Monounsaturated fatty acid
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
Na₂HPO₄	Disodium hydrogenphosphate
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NIDDM	Non- insulin-dependent diabetes mellitus
OGTT	Oral glucose tolerance test
p38 MAPK	p38 Mitogen-activated protein kinase
PBS	Phosphate buffer saline
PKC	Protein kinase C
PUFA	Polyunsaturated fatty acid
ROS	Reactive oxygen species
SFA	Saturated fatty acid
STZ	Streptozocin
T1DM	Type 1 diabetes mellitus
T2DM	Type 2 diabetes mellitus
TC	Cholesterol
TFA	Trans fatty acid

TG	Triglyceride
TNF-α	Tumor necrosis factor-α
UDP-GlcNAc	Uridine diphosphate-N-acetylglucosamine
VEGF	Vascular endothelial growth factor



摘要

本研究以動物實驗探討飽和及反式脂肪攝取對於 STZ 誘發糖尿病(DM)小鼠之影響。本實驗使用 5 週齡大的 C57BL/6JNarl 小鼠，隨機分成四組皆為正常飲水，(1) normal 組，為正常小鼠攝取一般飲食；(2) DM 組，為 STZ 誘發之糖尿病小鼠及一般飲食；(3) DM+SFA 組，STZ 誘發之糖尿病小鼠餵食 20 % 含高飽和奶油飲食；(4) DM+TFA 組，STZ 誘發之糖尿病小鼠餵食 20 % 含反式脂肪奶油飲食。八週後犧牲。實驗結果發現，誘發糖尿病後顯著增加空腹血糖、HOMA-IR、血清丙胺酸轉胺酶及天門冬酸轉胺酶、肝臟總膽固醇及低密度脂蛋白、發炎因子(IL-6、TNF- α 、MCP-1)，並降低體重、副睪脂質重量及血清胰島素。而餵食 SFA 或 TFA 後，顯著增加糖尿病小鼠體重、副睪脂質重、空腹血糖及 HOMA-IR 值、血清 AST、TC 及 LDL、肝臟發炎因子(IL-6 及 TNF- α)，並降低胰島素值；其中攝取 TFA 的糖尿病小鼠與 SFA 組相較，其副睪脂質重、血清 AST、及肝臟發炎因子 IL-6 皆有顯著升高。本研究結果顯示 SFA 或 TFA 的攝取都會影響糖尿病小鼠血糖調控及加重肝臟發炎傷害，TFA 對 DM 的惡化效果與 SFA 相近似。進一步再以氣相層析儀分析市售中西式食品中脂肪酸組成。因此，實驗結果顯示糖尿病個體飲食上並不建議攝取過多飽和及反式脂肪，以避免加重糖尿病的惡化。

關鍵字：反式脂肪酸、高脂飲食、糖尿病

Abstract

The content of trans fatty acids (TFAs) in several commonly available snake foods was analysed. Furthermore, the present study was designed to investigate and compare the effects of saturate fat (SFA) and trans fat (TFA) on streptozotocin-induced diabetic development variation. Mice were divided into 4 group: normal group (without DM, normal diet), control group (DM with normal diet), DM+SFA group (DM with 20 % SFA diet), DM+TFA group (DM with 20 % TFA diet) for 8 weeks. Result showed DM mice had lower body weight, epididymal fat mass and serum insulin than normal mice. However, DM mice with SFA or TFA intake had higher body weight, epididymal fat, fasting glucose, homeostasis model assessment-insulin resistance, asparate aminotransferase, total cholesterol, low-density lipoprotein, interleukin-6 and tumor necrosis factor- α compared with DM control groups. The intake of TFA increased epididymal fat mass, AST and liver IL-6. Both SFA and TFA intake affected DM mice glucose regulation and enhanced liver inflammation. These findings suggest that both TFA and SFA diet deteriorate diabetes.

Key words : trans fatty acid 、 saturated fat 、 diabetic rodents 、 inflammation

第一章 前言

文獻顯示反式脂肪不但會使血液中的低密度脂蛋白膽固醇(LDL-C)濃度升高，還會降低血液中高密度脂蛋白膽固醇(HDL-C)濃度；對於血糖方面還可能增加胰島素阻抗性及體內前發炎反應細胞激素的產生。因此飲食中若攝取過量的反式脂肪，可能會增加罹患冠狀動脈心臟病、動脈硬化及糖尿病的風險。

因此，本研究旨在探討反式脂肪是否會加重糖尿病的惡化。本研究動物實驗採用糖尿病動物模式，餵食反式脂肪及等劑量的飽和脂肪，檢測並比較這兩種高脂飲食對糖尿病的影響，分析的項目有體重、血糖、血脂、發炎因子等。進一步分析市售中西式食品反式脂肪酸的分析，以瞭解市售食品中反式脂肪酸之食物來源及含量高低。



第二章 文獻探討

一、反式脂肪酸

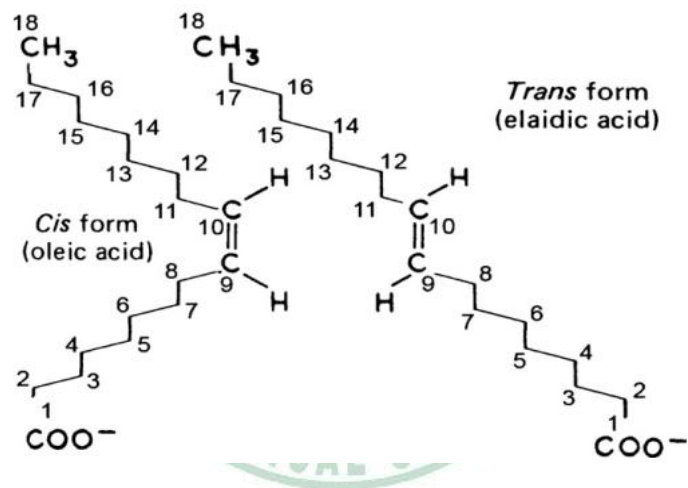
不飽和脂肪酸中，雙鍵上的兩個氫原子在同一側，就稱為「順式(cis)不飽和脂肪酸」，相反地，在不同側就稱為「反式(trans)不飽和脂肪酸」，簡稱反式脂肪酸。

反式脂肪來源有兩種，一是天然形成的反式脂肪，由反芻動物胃中的微生物合成，存在於牛、羊的乳汁及體脂肪中 (Mendis et al., 2008)。二則是來自食品工業將不飽和脂肪酸(如植物油)進行部分氫化，部份氫化過程會減少不飽和脂肪酸的雙鍵數，部分即會由 cis 轉變成 trans 構型。反式脂肪酸由於分子極性較大，油分子之間的互相吸引力較強，所以在常溫下呈現半固態，分子構型的改變使其具有能讓油更耐高溫、增添食品酥脆口感、易於長期保存等優點，此類氧化脂肪常被運用於西式糕點類。

二、食品中的反式脂肪酸

目前法規規定，包裝食品標示之反式脂肪為食用油經部分氫化過程中所形成的非共軛反式脂肪，每 100 公克含少於 0.3 公克反式脂肪的食品可標示每 100 公克含 0 公克反式脂肪。聯合國糧食及農業組織(FAO)與世界衛生組織(WHO)建議，飲食中僅應包含極小量的反式脂肪，低於每天攝取熱量的 1%。以每日消耗 2000 卡的成人而言，相當於每天攝取不超過 2.2 公克反式脂肪。

反式脂肪酸存在於反芻動物類(牛、綿羊、山羊)的乳製品及肉品當中，主要為 Vaccenic acid (18:1;trans Δ^9 18:1)。植物油氫化過程中將油酸(Oleic acid ; cis Δ^9)幾何異構化為反式異構體，即為反式油酸(Elaidic acid ; trans Δ^9 18:1)，如【圖 2-1】，以下幾種日常食物中較易隱藏反式脂肪酸，包括：(1)烘焙食品，如比斯吉、蛋糕、瑪芬、西式餅乾、烤餅、派皮，(2)塗抹麵包的奶油及醬料，如奶油、乳瑪琳、花生醬，(3)經油炸後帶有酥脆口感，如薯條、洋芋片、酥餅，(4)含可可原料，如巧克力、可可粉，(5) 速食食品，如炸雞、炸魚、比薩 (Fu et al., 2008)。



【圖 2-1】 Cis form (oleic acid)和 Trans form (elaidic acid)幾何圖形 (Kummerow, 2009)

三、飽和脂肪與反式脂肪對健康的影響

1. 飽和脂肪與健康

飽和脂肪酸內碳碳均為單鍵結合，多直鍊。愈飽和的脂肪，在室溫時越穩定，即愈容易形成固態脂肪，主要來源以動物油脂居多，如豬油、乳酪和奶油等，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。飲食中

若攝取大量飽和脂肪，會使血脂上升，進而造成血管栓塞，嚴重甚至可能提升中風、動脈粥狀硬化的風險 (Hegsted et al., 1965; Samuelson et al., 2001)。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 10%，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)。

飲食中攝取大量飽和脂肪，會增加血中膽固醇及 LDL，當血液 LDL 過多時，易滯留在血管壁形成氧化型 LDL，刺激內皮細胞分泌黏附因子，吸引 T 細胞及單核球細胞，單核球與內皮表面黏著後，單核球會分化成巨噬細胞，產生許多促發炎物質如 IL-6 和 TNF- α ，而氧化型 LDL 能被巨噬細胞的 scavener receptors 所辨識，形成 foam cell 與 fatty streaks，這些脂肪條紋會緩慢的形成 fibrous plaque，堆積在血管壁上進而增加心血管疾病的危險 (Lusis et al., 2004)。

高飽和脂肪飲食會造成體重增加，引起肥胖，當脂肪細胞過度累積脂肪時，會促使脂肪細胞分泌 MCP-1，並因此吸引巨噬細胞進入脂肪細胞 (Curat et al., 2004)。正常個體的脂肪組織內有大約 5-10% 的巨噬細胞，而肥胖的個體則最高有 50% 的巨噬細胞出現。浸潤的巨噬細胞分泌 TNF- α ，誘發發炎反應，並使得脂肪組織攝入游離脂肪酸的反應受到阻礙，造成過多游離脂肪酸得以進入肌肉組織，使得肌肉組織的粒腺體 β -氧化受阻，造成長鏈脂肪酸堆積，因而影響葡萄糖的吸收，導致胰島素抗性的產生，而類似的過程也出現在肝臟和胰臟 (Lagathu et al., 2006)。

2. 反式脂肪與健康

流行病學研究發現攝取高反式脂肪酸(Elaidic acid)者，罹患冠心病與糖尿病的危險性也隨之增高，與心律不整及心臟病猝死也大有相關。大多數的研究結果

指出反式脂肪酸對血脂有不良影響，進而引起冠心病與糖尿病 (Mozaffarian et al., 2006)。

許多文獻指出反式脂肪酸對血脂影響，綜合整理如下：

- (a) 根據臨床試驗證實，受試者攝取富含反式脂肪奶油後，改變血清 apolipoprotein B 的濃度、脂質組成：血液 LDL 上升，HDL 下降，LDL-C 顆粒縮小 (Aro et al., 1997；Mauger et al., 2003；Matthan et al., 2004)；推測其可能機制為反式脂肪酸透過對膜或核受體的作用，增加肝細胞 free cholesterol 和 cholesterol ester 的蓄積和分泌，促進血漿 CETP 活性，使得血液 LDL 上升，HDL 下降，造成 LDL/HDL 比值上升 (Mauger et al., 2003)；反式脂肪酸更使得血液 lipoprotein a 上升 (Hu et al., 2001)，增加冠心病的危險。
- (b) 反式脂肪酸增加 apolipoprotein A-I 分解代謝率，使血脂上升 (Mitmesser and Carr, 2005；Matthan et al., 2004)。
- (c) 動物實驗證實，大鼠被餵食富含反式脂肪酸飲食後，有較高濃度的空腹血漿胰島素及三酸甘油酯，並且脂肪細胞膜流動性降低。且反式脂肪酸改變脂肪細胞膜脂肪酸組成，進而降低胰島素敏感度 (Ibrahim et al., 2005)。
- (d) 反式脂肪酸平日攝取量與全身性的發炎反應指標(TNF- α 、IL-6、CRP、MCP-1)有正相關，而發炎反應則是動脈硬化、糖尿病及多種癌症的起始 (Mozaffarian et al., 2004)。

四、糖尿病的定義、診斷標準及分類

1. 糖尿病之定義

正常人攝取食物後在腸胃道被分解產生葡萄糖，胰島素可幫助葡萄糖進入身

體各組織細胞，並產生能量，或貯存在肝臟、肌肉及脂肪組織內，促進葡萄糖以肝醣或脂肪形式儲存。當胰臟不能分泌胰島素或者雖能分泌胰島素，但身體各組織對胰島素產生阻抗性，此時血糖會升高，當超過腎臟葡萄糖閾值，就會出現尿糖，當血糖高達一定濃度，便可診斷為糖尿病。糖尿病是由於胰島素分泌或作用的缺陷，而引起高血糖，產生的新陳代謝疾病。其主要的臨床症狀為多尿、善渴、多吃，體重減輕，視力模糊，容易感染等。糖尿病嚴重的急性合併症有酮酸血症和非酮酸性高滲透壓症等。

2. 糖尿病之診斷標準

美國糖尿病學會(ADA)於 2009 年公佈之糖尿病診斷標準，以下各項中有二次超過標準則診斷為糖尿病：

- (1) 有糖尿病症狀且隨機血糖值 ≥ 200 mg/dl
- (2) 空腹 8 小時之血糖值 ≥ 126 mg/dl
- (3) 口服 75 公克 OGTT 兩小時後之血糖值 ≥ 200 mg/dl

五、 糖尿病的類型

1. 第 1 型糖尿病(T1DM)

在台灣，T1DM 佔全國糖尿病病患的 2%，好發於兒童及青少年期，主要是由於基因傾向和環境因子使得胰臟 β 細胞遭受自體免疫之破壞，導致 β 細胞胰島素缺乏，稱為胰島素依賴型糖尿病(IDDM)，易導致酮酸血症。致病因包括：

- (1) 染色體上 HLA，即人類第六對染色體之白血球抗原異常。
- (2) 自體免疫性，具

有破壞胰島細胞的自體抗體如 islet 細胞抗體、insulin autoantibodies、GAD65 抗體等。(3)原因不明性，可能是病毒或其他因素侵入體內的自體防衛系統，不僅會破壞自體的胰島素細胞，造成胰島素細胞死亡消耗殆盡 (Atkinson et al., 2001)。

2. 第 2 型糖尿病(T2DM)

台灣的 T2DM 約佔全國糖尿病病患 98 %，其中 80 %之 T2DM 病患有肥胖的情形，此類病人發病初期之病因並非胰島素分泌不足，而是分泌缺陷和周邊組織(肌肉、脂肪組織或肝臟)對胰島素的利用產生抗性(insulin resistance)，使血中葡萄糖無法被周邊組織利用所引起的，稱為非胰島素依賴型糖尿病 (NIDDM)，此型糖尿病人較不易得酮酸血症。

3. 妊娠性糖尿病(GDM)

GDM定義為在懷孕後第一次診斷為T2DM或首次發現輕重程度不等的醣類耐受異常。GDM對母親和胎兒有短期和長期的影響，懷孕期間高血糖易促使胎兒過度生長，較易出現巨嬰症，亦有較高比率的耐糖障礙以及日後罹患T2DM的機會增加。台灣GDM發生機率为5.7%，其中有15~45% GDM個案出現巨嬰症。懷孕期間血糖控制不良時，其代謝的改變也可能會影響嬰兒的智力及神經發育。對母體所產生併發症危險包括：高血壓、子癲前症、羊水過多等 (Landon and Gabbe, 2011)。

4. 糖尿病併發症(diabetes complication)

血糖控制不良，導致身體各組織器官長期浸潤於高血糖之環境下，可能進一步促使體內發生自體氧化作用，會使體內 ROS 濃度增加，當 ROS 產生過量時會攻擊細胞膜、破壞細胞組成並活化生長因子和細胞激素之轉錄因子(如：PKC、VEGF 和 NF- κ B)，使促發炎細胞激素 IL-6、TNF- α 等合成增加，造成體內各組織器官或血管呈現發炎狀態。糖尿病患者易有以下併發症 (Soskolne and Klinger, 2001)：

(1) 大血管併發症

高血糖會造成動脈硬化，導致心血管疾病、腦中風、周邊血液循環不良和末梢血管異常等疾病。文獻指出心血管疾病(CVD)是T2DM最常見的大血管併發症，亦是造成糖尿病相關死亡的主要原因 (Semenkovich and Heinecke, 1997)。CVD係指大動脈中脂肪、平滑肌細胞混合鈣離子沈積在血管內壁，逐漸形成斑塊，使體內血液供應不足、血管硬化出血、血塊阻塞導致組織發生缺血及壞死。

(2) 小血管疾病

包括糖尿病腎病變(DN)、糖尿病視網膜病變(DR)等。台大戴東原教授於國內成年糖尿病的調查研究發現，糖尿病病人罹患視網膜病變之盛行率約 35%，當中約有90%之糖尿病病患會於發病後20年被診斷出視網膜病變，若病情嚴重者可導致失明 (Tai et al., 1992)。糖尿病腎病變為T1DM患者之主要死因，另有研究指出10~20%的T2DM患者會產生腎臟病變，而其中有20~50%的機率會惡化成糖尿病末期腎臟病 (Ritz and Orth, 1999；Campbell,

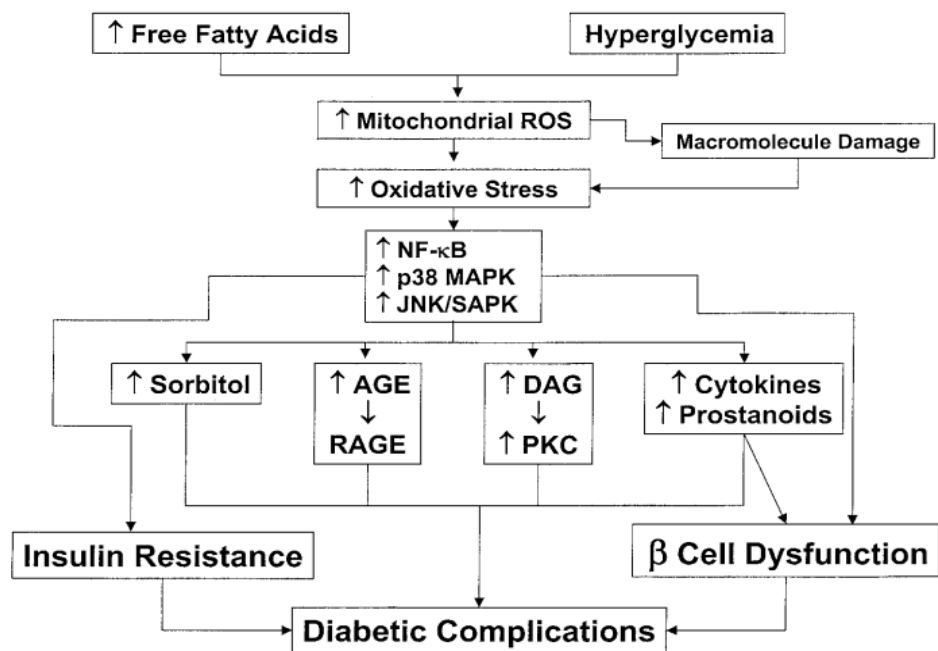
2000)。研究發現控制糖化血色素濃度至7%或以下，可減少體內氧化壓力傷害，而降低糖尿病腎病變或腎衰竭之發生 (Sharma et al., 2006)。

(3) 神經病變

糖尿病神經病變是糖尿病中最常見的慢性併發症，其中有75%屬於末梢神經病變 (Bansal et al., 2006)。糖尿病引起的神經病變可分為自主神經病變(DAN)和周邊神經病變(DPN)。自主神經病變包括心律不整、泌尿生殖系統功能障礙、胃輕癱和心血管系統異常等；周邊神經病變包括四肢末梢神經病變、足部感覺神經病變等，常引起手腳疼痛與無力或造成雙腳麻痺，並增加雙腳受傷的機會，最後造成截肢。

六、糖尿病與氧化發炎反應

如【圖 2-2】，糖尿病患因體內脂質代謝混亂及葡萄糖代謝異常，產生高血糖及大量的游離脂肪酸進入血液，當細胞內粒腺體代謝大量葡萄糖及游離脂肪酸時，使細胞產生過多 ROS 或自由基，造成體內氧化壓力上升或活化壓力敏感路徑 (NF- κ B、p38 MAPK、JNK/SAPK)，並生成有毒之中間代謝產物，或蛋白質經糖化作用產生糖化終產物(AGEs)，促進前發炎激素(TNF- α 、IL-1 及 IL-6)生成，誘導 IRS 的 serine 位置磷酸化，抑制胰島素訊息傳遞，導致慢性發炎及對組織器官損傷最後造成糖尿病併發症的發生 (Evans et al., 2002)。另有研究指出 AGEs 會累積在血管、神經周圍組織等而促進氧化及發炎反應的進行並導致糖尿病慢性的、大、小血管病變等糖尿病併發症之產生 (Yorek, 2003；Basta et al., 2004；Jay et al., 2006)。



【圖 2-2】高血糖及游離脂肪酸活化氧化壓力訊息路徑導致糖尿病併發症路徑
(Evans et al., 2002)

糖尿病患因胰島素阻抗，血糖代謝異常，會增加【圖 2-3】代謝途徑如下：

(1) Polyol pathway

Aldose reductase 為多元醇代謝中第一速率限制酵素，與 NADPH 存在之下可催化葡萄糖還原作用的氧化還原酶，高血糖的狀態之下會增加葡萄糖經由此代謝行成 sorbitol，再藉由 sorbitol dehydrogenase 氧化形成 fructose。

(2) Hexosamine pathway

高血糖狀態下過多的 F-6-P 堆積，並經由 GFAT 催化下，代謝成 glucosamine-6-phosphate 再轉成 UDP-GlcNAc，此 UDP-GlcNAc 上的 GlcNAc 透過類似磷酸化作用將蛋白質修飾，改變原來蛋白質的活性、

穩定性及與其他蛋白之間的交互作用，並進一步影響細胞核內基因轉錄、轉譯及訊息傳遞甚至造成細胞的凋亡。

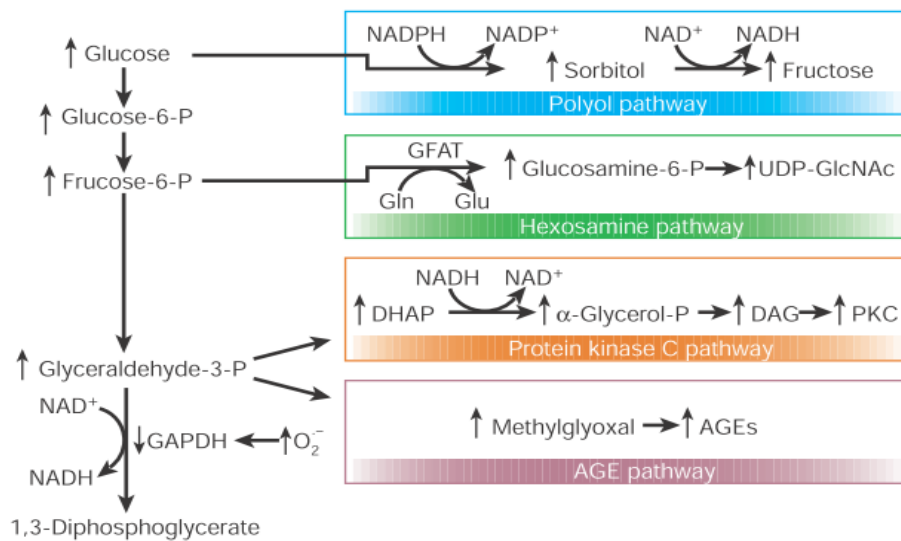
(3) PKC pathway

細胞內粒線體在代謝大量葡萄糖及游離脂肪酸時，會產生過多的電子供應者(NADH 和 FADH₂)，經電子傳遞鏈作用後生成大量的超氧陰離子自由基(O₂⁻)。這些無法及時清除的自由基會抑制糖解酵素 GAPDH，透過 PKC pathway 使 DHAP 經還原成 glycerol-3-phosphate 再醃化形成 DAG，進一步提升 PKC 活性。

(4) AGEs pathway

細胞內葡萄糖可自行由糖解中間產物 GA-3P、DHAP 裂解形成 methylglyoxal，正常血糖下可經由還原酶作用代謝清除，不易有過多的 AGEs 行成。

以上途徑皆可能造成細胞內的滲透壓增加，而造成組織或是器官之生理功能的損傷，因此隨著病情之進展，糖尿病所併發之大、小血管性病變逐漸顯現 (Brownlee, 2001 ; Ceriello and Motz, 2004)。



【圖 2-3】高血糖所誘發的 polyol、hexosamine、PKC 及 AGE pathway
(Brownlee, 2001)

體內慢性發炎對糖尿病所導致之併發症扮演相當重要之角色。發炎反應原為體內一種保護作用，當組織受到傷害感染時，可控制感染情況、促進組織的修復；但過度發炎則會造成組織的傷害甚至形成疾病，如血管粥狀硬化、類風濕性關節炎及癌症等。在發炎反應中會分泌具有調控發炎作用的細胞激素，可分為(1)促發炎反應細胞激素，如 TNF- α 、IL-1 及 IL-8；(2)抗發炎反應細胞激素，如 IL-4、IL-10 等。而 IL-6 為多功能細胞激素，可調控人體免疫反應、刺激 B 淋巴球進行分化產生抗體、調節急性發炎反應與促進細胞毒殺 T 淋巴球活化與生長 (Eto et al., 2011)。高血糖患者由於體內長期處於發炎狀態之下，活化體內巨噬細胞，促使細胞激素分泌，進而促進心血管疾病之發生 (King, 2008)。有研究發現於肥胖者與具有胰島素抗性者，其脂肪細胞會增加促發炎激素的分泌，如 TNF- α 、IL-1、IL-6，加速體內發炎作用 (Dandona et al., 1998；Winkler et al., 1999)，其中 IL-6 主要由脂肪細胞分泌，當脂肪組織過度製造 IL-6 時，可能造成慢性活化 ERK 路徑並且誘導 IRS1 上的絲胺酸磷酸化，因此抑制胰島

素訊息傳遞，妨礙細胞攝取葡萄糖，導致血中胰島素無法有效利用，使得胰臟分泌更多胰島素，增加血液中細胞激素濃度，造成胰島素阻抗 (Lagathu et al., 2003 ; Bastard et al., 2006)。

七、糖尿病與血脂代謝異常

T2DM 之胰島素阻抗性，會使胰島素無法有效抑制脂解作用(lipolysis)的發生，因而造成脂肪細胞釋出游離脂肪酸至循環血液中，提升血液中游離脂肪酸的濃度 (Semenkovich, 2006)。糖尿病最常見血脂異常是：(1)TG 濃度升高，(2)HDL 濃度降低，(3)LDL 濃度略高於正常人或無明顯差異，但因其顆粒體積變小、濃度變高，所以容易滲入血管壁內，誘發氧化壓力與發炎反應，而導致血管動脈硬化 (ADA, 2003)。

八、糖尿病與高脂飲食

由文獻可知，同樣以 STZ 誘發糖尿病，分別給予高脂飲食或一般飲食，高脂飲食的餵食明顯增加糖尿病鼠空腹血漿葡萄糖濃度、肝臟 TC、TG 及 LDL，升高胰島素阻抗性指標 HOMA-IR，並且提升肝臟發炎指標 ALT 及 AST 值 (Zhang et al., 2008 ; Król and Krejpcio, 2011)，並加重肝臟促發炎因子 CRP、IL-6 及 TNF- α 的生成 (Khan et al., 2012)。另有文獻顯示，以牛油為飽和脂肪來源的高脂飲食餵食 STZ 誘發之糖尿病鼠，也會造成糖尿病鼠血清 TC、TG、ALT 及 AST 升高 (Sahin et al., 2007)。

第三章 研究目的

本研究目的是以 20 % Wt 飽和奶油飲食及 20 % Wt 市售含反式脂肪奶油飲食，餵食 STZ 誘發之 DM 小鼠，探討高脂飲食對 DM 小鼠之影響，並比較飽和與反式脂肪酸對 DM 小鼠影響程度，是否會加重糖尿病的發炎及惡化血脂組成。並進一步利用氣相層析儀(GC)分析市售中西式食品所含反式脂肪酸種類及其含量高低。



第四章 材料與方法

一、實驗材料

1. 實驗動物

本實驗使用雄性 5 週齡 C57BL/6JNarL 小黑鼠，購買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)、室內溫度控制於 22 °C、相對溼度 55 %。動物給予正常飲水及一般飼料並自由進食，入室後經飼養 5 週後平均體重達 25 克，以 STZ 誘發為糖尿病小鼠以進行後續實驗。

2. 實驗特殊飲食

- (a) KIRKLAND SIGNATURE 無鹽奶油，作為飽和脂肪奶油(SFA)，購自好市多股份有限公司
- (b) 北海道雪印純植物奶油，作為反式脂肪奶油(TFA)購自立基食品股份有限公司
- (c) 一般飼料：Laboratory animal diet (MF-18)，購自樂斯科生物科技股份有限公司。

3. 化學試藥

- (a) 實驗誘發試藥：

STZ, 98 % 購自美國 Sigma 公司

(b) 實驗分析試藥：

(1) Citric acid 購自日本林純藥工株式會社

(2) Sodium chloride 購自美國 Sigma 公司

(3) 生理食鹽水注射液 購自台灣東信生科股份有限公司

(4) BSA 購自美國 Sigma 公司

(5) KH_2PO_4 購自日本和光純藥株式會社

(6) Na_2HPO_4 購自日本 Wako 公司

(7) Bio-rad protein assay (Dye reagent concentrate) 購自美國 Bio-Rad 公司

(8) Methanol 購自美國 Tedia 公司

(9) Chloroform 購自美國 Tedia 公司

(10) BF_3 購自美國 Sigma 公司

(11) n-Heptane 購自美國 Tedia Wako 公司

(12) Triton X-100 購自美國 Sigma 公司

4. 分析實驗套組

(a) Mouse insulin Kit 購自瑞典 Mercodia 公司

(b) TG Kit 購自英國 Fortress Diagnostics 公司

(c) TC Kit 購自英國 Fortress Diagnostics 公司

(d) LDL Kit 購自英國 Fortress Diagnostics 公司

(e) AST Kit 購自英國 Randox 公司

(f) ALT Kit 購自英國 Randox 公司

(g) Mouse IL-6 ELISA kit 購自美國 eBioscience 公司

- (h) Mouse MCP-1 ELISA kit 購買自美國 eBioscience 公司
- (i) Mouse TNF- α ELISA kit 購買自美國 eBioscience 公司

5. 儀器設備

- (a) 酸檢測定儀 (pH meter) : Mettler toledo , 瑞士
- (b) 離心機 :
 - (1) Hettich , Micro 22R , 德國
 - (2) Eppendorf , Centrifuge 5810R , 德國
- (c) 分光光度計 (Spectrophometer) : GBC , Cintra UV-Vis spectrometer , 澳洲
- (d) 高溫高壓滅菌釜 : AS-3560 , 台灣光杏生物科技有限公司
- (e) 免疫分析微盤清洗機 (ELISA washer) : Bio-rad model 1575 , 美國
- (f) 微盤分光光度計 (Microplate spectrometer) : Bio-rad xMark , 美國
- (g) 均質機 :
 - (1) Glas-co , 美國
 - (2) Bullet blenderTM , 美國
- (h) 水浴器 : BH-230D , 台灣
- (i) GC : Thermo scientific , 美國
- (j) 血糖機 : TD-4207 , 台灣
- (k) 血糖試紙 : Easichcek , 台灣

6. 中西式食品脂肪酸組成分析

◎中式食品：

本實驗使用市售月餅、月餅餡料、鹹酥雞、鳳梨酥、燒餅和油條。

食品購買時間：於民國 99 年 8 月至 100 年 4 月

食品購買地點：中國醫藥大學附近商家

◎西式食品：

本實驗使用市售奶精、西式喜餅、馬鈴薯薯條、甜甜圈和洋芋片。

食品購買時間：於民國 99 年 8 月至 100 年 4 月

食品購買地點：中國醫藥大學附近商家

二、實驗方法

1. 糖尿病動物誘發模式

根據Kunjathoor等人於1996年誘發C57BL/6J小鼠糖尿病之模式，使用體重23~24 g之雄性小鼠，空腹6~8小時後由腹腔注射含有0.1 M檸檬酸緩衝溶液(pH=4.3)的STZ (劑量45 mg/kg body weight)連續施打五天，注射完後第8天從尾巴採血，利用血糖機測其空腹血糖濃度，判斷是否成功誘發糖尿病(篩選標準：禁食後空腹血糖 \geq 200 mg/dl)。

2. 實驗設計

【表 4-1】實驗分組

組別	誘發模式	隻數	飼料與飲水
normal	normal	10	標準飼料及一般飲水
DM	DM	12	標準飼料及一般飲水
DM+SFA	DM	18	20 % 飽和脂肪奶油飼料及一般飲水
DM+TFA	DM	18	20 % 富含反式脂肪奶油飼料及一般飲水

小鼠入室後給予正常飲水及一般飼料並自由進食，經飼養 5 週後體重不足 25 克的小鼠編入 normal 組，剩餘 48 隻，隨機分成三組，以 STZ 誘發為糖尿病小鼠後，開始 8 週實驗。實驗期間每天更換新鮮飲食與飲水，並記錄每日攝食量。每 7 天進行小鼠體重測量，每 14 天測量血糖(尾靜脈血)並記錄血糖變化，八週後採斷頭犧牲法取血液及組織樣品進行分析。

(a) 特殊飲食製備方法

本實驗小鼠所餵食之飼料為日本 OCYMF18 標準鼠飼料。製備添加 20 % Wt 奶油之飼料，計算好標準飼料的份量，利用攪碎機把飼料攪成粉末狀再分別加入預先秤好的 20 % Wt 飽和脂肪奶油或反式脂肪奶油，加入熱水將奶油溶解，經反覆搓揉使奶油與飼料混合均勻，最後切割搓揉做成團狀飼料餵食小鼠。

(b) 血液、臟器之收集

小鼠斷頭犧牲後，使用不添加抗凝血劑之真空採血管收集血液，靜置於 4 °C 約 10 分鐘後，以 3000 rpm 離心 15 分鐘，將上層之血清與下層之血球分別取出並貯存。臟器採集心臟、肝臟、脾臟、腎臟，秤重紀錄後並於分析前置於 -80 °C 冰箱貯存，供日後分析之用。

(c) 臟器均質液處理

- (1) 肝臟均質液：將肝臟取 100 mg 放入 1.5 ml 微量離心管，用小剪刀剪碎後，加入 1 ml 之 PBS，pH = 7.2 ~ 7.4，再加入與臟器體積相等量的均質專用均質磨珠，放置於均質機(Bullet blendwe™)進行均質，均質總時間約 2 分鐘，每均 30 秒即放置於冰上以保持低溫，約 1 分鐘後再放入均質機中進行均質。

均質完全後，以2000 rpm 10分鐘離心取其上清液。依據Lowry et al.(1951)以BSA為標準品，將組織均質液進行蛋白質濃度定量。

(2) 肝臟粗萃脂均質液：將肝臟取200 mg放入均質管(5 cm³)中加入1 ml(氯仿：甲醇=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，均質完成後將均質液倒入1.5 ml 微量離心管中暫存放於 -20 °C 冰箱待分析。

(3) 不同樣品(本)所分析的項目如【表4-2】

【表 4-2】不同樣品所分析的項目

樣品	分析項目
中西式食品萃脂質	Food fatty acid composition
血清	Insulin, AST, ALT
肝臟均質液	IL-6, MCP-1 TNF- α
肝臟粗萃脂均質液	TC, TG, Fatty acid composition

3. 中西式食品脂質萃取

(a) 實驗步驟


(1) 取食品 200 mg 放入 1.5 ml 微量離心管，先將食品用小剪刀剪碎後，加入 0.5 ml (氯仿：甲醇=2：1)溶液之後，再加入與食品體積相等量的均質專用均質磨珠，放置於均質機(Bullet blenderTM)均質。均質總時間約 2 分鐘，每均 30 秒即放置於冰上以保持低溫，約 1 分鐘後再放入均質機中進行均質。

- (2) 均質完全後，加入 200 μl 二次水
- (3) 離心 2000 rpm，10 分鐘
- (4) 取下層均質液(氣仿層)放置於 15 ml 玻璃管，以抽氣缸隔夜抽乾
- (5) 加入 1 ml BF_3 ，鎖緊瓶蓋，95 $^{\circ}\text{C}$ 熱水浴 1 小時
- (6) 靜置冷卻至室溫，加入 0.5 ml 二次水及 1 ml heptane
- (7) 離心 2000 rpm，10 分鐘
- (8) 取上層液，以抽氣缸隔夜抽乾
- (9) 加入 100 μl heptane 回溶，即為 GC 待注入樣品

三、分析方法

1、血清胰島素濃度測定

(a) 原理



本實驗是以 Mouse insulin ELISA 商業套組進行分析，利用 ELISA 的原理。具 insulin 特異性的多株抗體已 coating 於 96 孔盤上，將實驗樣品加入孔盤中，此時樣品的 insulin 會專一性結合於其抗體上，再加入的 peroxidase-conjugated anti-insulin 抗體也會與 insulin 專一性結合並固定於孔盤上，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 0.5 M H_2SO_4 終止反應後，測其 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 之吸光值，依其不同吸光值代入標準曲線即可換算出 insulin 濃度。

(b) 實驗步驟

- (1) 分別將標準品與血清樣品各取 10 μl 依序加入已 coating 好的 96 孔盤

- (2) 每個 well 加入 100 μl enzyme conjugate solution，於室溫下經震盪器震盪(700 - 900 rpm) 2 小時
- (3) 使用免疫分析微盤清洗機以 wash buffer 清洗 6 次，洗完後反蓋在衛生紙上輕拍吸乾
- (4) 避光後，加入 200 μl TMB 於各 well 內，於室溫下反應 15 分鐘
- (5) 加入 50 μl stop solution (H_2SO_4)終止其反應，經震盪器震盪 5 秒鐘以確保混勻
- (6) 用 ELISA reader 測定 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 之吸光值

(c) 標準曲線之製作

以 insulin 標準品濃度 0、0.2、0.5、1.5、3、6.5 $\mu\text{g/l}$ 設為 X 軸，實驗所測得的標準品 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 吸光值設為 Y 軸，即可得一標準曲線。

(d) 計算方法

此實驗樣品於 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 測得之吸光值，依據標準曲線以內插法代入一次方程式($y = ax+b$)計算，則可求得樣品 insulin 濃度，單位以 $\mu\text{g/l}$ 表示。

2、HOMA-IR 計算

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

單位換算如下：

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

Mouse insulin kit 測得 insulin 單位為 $\mu\text{g/l}$

$$\text{故空腹 insulin } (\mu\text{U/ml}) = \text{insulin } (\mu\text{g/l}) \times 174 / 7.175$$

	Gravimetric unit	Conversion factor	SI unit
insulin	µg/l	172.1	pmol/l
insulin	µU/ml	7.175	pmol/l

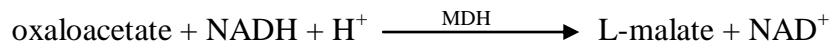
註：Gravimetric unit × Conversion factor = SI unit

3、血清 AST 濃度測定

(a) 原理

AST 主要存在肝細胞的細胞質內，當肝細胞受到傷害而破損時，AST 就會釋放出來。本實驗採用商業套組進行分析。AST 的作用為催化 aspartate 上的氨基(-NH₂ group)與 α-oxoglutarate 上的酮基(-C-O group)互相交換，產生 oxaloacetate 與 glutamate，因此，AST 過去也被稱作 GOT。而 oxaloacetate 與 NADH+H⁺ 透過 MDH 的催化後，會產生產物 malate 及 NAD⁺，在 OD_{340nm} 之吸光值測定 NAD⁺ 在 3 分鐘內的變化，計算得知 AST 之活性。

測 AST 的方法中主要有兩類：colorimetric 和 ultraviolet。本實驗是利用 colorimetric 方法。



(b) 實驗步驟

- (1) 先取 20 ml R1a reagent (buffer/substrate) 加到一瓶 R1b (enzyme/coenzyme/α-oxoglutarate)，使其回溶至液體狀
- (2) 在每個 well 中加入 200 µl reagent
- (3) 在 37 °C 下 incubate 5 分鐘後取出
- (4) 並快速取 20 µl 血清樣品到 96 孔盤中

(5) 用 ELISA reader 設定 kinetic 測定 OD_{340nm} 之 1、2、3 分鐘吸光值

(c) 計算方法

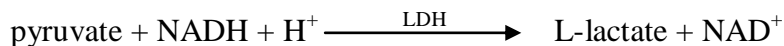
$$\text{AST activity (U/l)} = 1746 \times \Delta A_{340 \text{ nm/min}}$$

4、血清 ALT 濃度測定

(a) 原理

ALT 主要存在肝細胞的細胞質內，當肝細胞受到傷害而破損時，ALT 就會釋放出來。ALT 的作用為催化 alanine 上的氨基(-NH₂ group)與 α-oxoglutarate 上的酮基(-C-O group)互相交換，產生 pyruvate 與 glutamate，因此，ALT 過去也被稱作 GPT。而 pyruvate 與 NADPH+H⁺透過 LDH 的催化後，會產生產物 lactate 及 NAD⁺，在 OD_{340nm} 之吸光值測定 NAD⁺ 在 3 分鐘內的變化，計算得知 ALT 之活性。

測 ALT 的方法中主要有兩類：colorimetric 和 ultraviolet。本實驗是利用 colorimetric 方法。



(b) 實驗步驟

- (1) 先取 20 ml R1a reagent (buffer/substrate) 加到一瓶 R1b (enzyme/coenzyme/α-oxoglutarate)，使其回溶至液體狀

- (2) 在每個 well 中加入 200 μ l reagent
- (3) 在 37 $^{\circ}$ C 下 incubate 5 分鐘後取出
- (4) 並快速取 20 μ l 血清樣品到 96 孔盤中
- (5) 用 ELISA reader 設定 kinetic 測定 OD_{340nm} 之 1、2、3 分鐘吸光值

(c) 計算方法

$$\text{ALT activity (U/l)} = 1746 \times \Delta A_{340 \text{ nm/min}}$$

5、肝臟均質液蛋白質濃度測定

(a) 原理

以 Lowry et al.(1951) Bradford protein-binding assay 的方法進行蛋白質定量，此定量是利用 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藍色，在 595 nm 的波長下可測得其吸光值，故可利用其吸光值計算樣品之蛋白質濃度。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。

(b) 實驗步驟

- (1) 配置標準品，濃度配製如【表 4-3】

【表 4-3】蛋白質測定的標準品配製

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

- (2) 將肝臟均質液稀釋 40 倍
- (3) 分別取標準品及均質液樣品各 10 μl 依序加入 96 孔盤
- (4) 避光後，稀釋 Bio-rad 染劑 (Bio-rad 原液：二次水= 1：4)
- (5) 加入 200 μl 的稀釋染劑到各 well 內
- (6) 在室溫下使用震盪器反應 5 分鐘後
- (7) 使用 ELISA reader 測定其 OD_{595nm} 之吸光值

(c) 標準曲線之製作

使用BSA 作為實驗標準品，將標準品原液分別稀釋成為0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/ml。標準品和樣品同時以上述方法分析測定後，以標準品濃度為X軸，所測得其OD_{595nm} 吸光值為Y軸，則可得一標準曲線。

(d) 計算方法

測得實驗樣品於波長OD_{595nm} 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，再乘回稀釋倍數($\times 40$)，則可求得樣品之蛋白質濃度。

6、肝臟粗萃脂均質液中 TG 濃度測定

(b) 原理

本實驗是利用三酸甘油酯經由 LPL 水解成甘油及脂肪酸，甘油藉由 GK 與 ATP 作用產生 ADP 及 G-3-P，G-3-P 再經 GPO 氧化作用產生 H₂O₂ 及 DAP，產物 H₂O₂ 再與 4-aminoantipyrine 及 p-chlorophenol 經 peroxidase 氧化產生紅色 4-(p-benzoquinone-monoimino)-phenazone 的產物，最後於 OD_{546nm} 波長下測定紅色產物的吸光值。

(c) 實驗步驟

取肝臟粗萃脂均質液各取 10 μl 與 10 μl triton X-100 混合，經真空抽乾後，與 10 μl 標準品，分別加入含有 pipes buffer、p-chlorophenol、LPL、GK、GPO、4-aminoantipyrine、peroxidase、ATP、Mg²⁺、Na-cholate 及 potassium-hexacyanoferrat (II) 之 1 ml 溶液中，混合均勻，於 37 °C 下反應 5 分鐘後，測定 OD_{546nm} 之吸光值。

(d) 計算方法

$$\text{TG con. (mg/dl)} = \frac{\Delta\text{absorbance sample}}{\Delta\text{absorbance standard}} \times \text{Standard con (200 mg/dl)}.$$

7、肝臟粗萃脂均質液中 TC 濃度測定

(a) 原理

本實驗是利用 cholesterol 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，最後於 OD_{500nm} 波長下測定紅紫色產物的吸光值。

(b) 實驗步驟

取肝臟粗萃脂均質液各取 10 μl 與 10 μl triton X-100 混合，經真空抽乾後，與 10 μl 標準品，分別加入含有 pipes buffer、cholesterol oxidase、cholesterol esterase、4-aminoantipyrine、peroxidase 及 phenol 之 1 ml 溶液中，混合均勻，於 37 °C 下反應 5 分鐘後，測定 OD_{500nm} 之吸光值。

(c) 計算方法

$$\text{TC con. (mg/dl)} = \frac{\Delta\text{absorbance sample}}{\Delta\text{absorbance standard}} \times \text{Standard con (200 mg/dl)}.$$

8、肝臟粗萃脂均質液中 LDL 濃度測定

(e) 原理

本實驗分為兩部分，Reagent 1 試劑會與肝臟均質液中 LDL 反應，產生混濁沉澱，此時取其上清液(不含 LDL)加入含有 pipes buffer、cholesterol oxidase、cholesterol esterase、4-aminoantipyrine、peroxidase 及 phenol 之 Reagent 2 試劑作呈色反應，最後於 OD_{500nm} 波長下測定產物的吸光值。

(f) 實驗步驟

- (1) 取肝臟粗萃脂均質液 100 μl 加入 1 ml LDL precipitant 於室溫下反應 10 分鐘，經 4000 rpm 離心 15 分鐘後，取上清液各 50 μl 與 50 μl 標準品，分別加入含有 pipes buffer、cholesterol oxidase、cholesterol esterase、4-aminoantipyrine、peroxidase 及 phenol 之 1 ml 溶液中，混合均勻，於 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反應 5 分鐘後，測定 $\text{OD}_{500\text{nm}}$ 之吸光值。

(g) 計算方法

Step 1.

$$\text{Cholesterol in the supernatant con.} = \frac{\Delta\text{absorbance sample}}{\Delta\text{absorbance standard}} \times \text{Standard con (200 mg/dl)}.$$

Step 2.

$$\text{LDL Cholesterol (mg/dl)} = \text{TC (mg/dl)} - \text{Cholesterol in the supernatant con. (mg/dl)}$$

9、肝臟均質液中 IL-6 濃度測定

(a) 原理

本實驗以 Mouse IL-6 ELISA 商業套組進行分析，是利用 ELISA 的原理。具 IL-6 特異性之多株抗體已結合在 96 孔盤上，將實驗樣品加入孔盤中，此時樣品的 IL-6 會專一性被結合於其抗體上，利用 wash buffer 沖洗掉未結合的樣品後，再加入與生物素共軛的抗 IL-6 抗體 (biotin conjugate anti IL-6 antibody)，使其與孔盤內的 IL-6 共軛結合，再依序加入 (horseradish peroxidase-labeled avidin (Avidin-HRP) 及 TMB。TMB 受過氧化酶催化後會

有藍色氧化產物產生，加入stop solution中止反應後，即可測其OD_{450nm}之吸光值。代入標準曲線則可換算IL-6濃度。

(b) 實驗步驟

- (1) 將肝臟均質液做適當倍數稀釋(40 X)；將標準品稀釋至 2000 pg/ml 後再序列稀釋至 31.3 pg/ml
- (2) 加入 50 μ l sample diluents 到各個 sample well
- (3) 加入已稀釋好的均質液 50 μ l 到各個 sample well；將標準品取 100 μ l 加到各個 standard well
- (4) 每個 well 中加入 50 μ l biotin-conjugate，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 well 中加入 100 μ l streptavidin-HRP，於室溫下反應 1 小時
- (7) 以 wash buffer 利用免疫分析微盤清洗機清洗 5 次
- (8) 避光後，每個 well 中加入 100 μ l TMB substrate solution，於室溫下反應 30 分鐘
- (9) 每個 well 中加入 100 μ l stop solution
- (10) 使用 ELISA reader 測定其 OD_{450nm} 之吸光值

(c) 標準曲線之製作

將標準品序列稀釋成濃度為 2000、1000、500、250、125、62.5、31.3 pg/ml，以此設為 X 軸，實驗所測得之標準品 OD_{450nm} 吸光值設為 Y 軸，即可得一標準曲線。

(d) 計算方法

將實驗樣品在 OD_{450nm} 之下測得之吸光值，依標準曲線以內插法代回一次方程式($y = ax+b$)計算，再乘回稀釋倍數($\times 40$)，即可求得樣品之 IL-6 濃度，除以樣品蛋白質濃度後，濃度單位以 pg/mg protein 表示。

10、肝臟均質液中 TNF- α 濃度測定

(a) 原理

本實驗以 Mouse TNF- α ELISA 商業套組進行分析，是利用 ELISA 的原理。具 TNF- α 特異性之多株抗體已結合在 96 孔盤上，將實驗樣品加入孔盤中，此時樣品的 TNF- α 會專一性被結合於其抗體上，利用 wash buffer 沖洗掉未結合的樣品後，再加入與生物素共軛的抗 TNF- α 抗體 (biotin conjugate anti TNF- α antibody)，使其與孔盤內的 TNF- α 共軛結合，再依序加入 avidin-HRP 及 TMB。TMB 受過氧化酶催化後會有藍色氧化產物產生，加入 stop solution 中止反應後，即可測其 OD_{450nm} 之吸光值。代入標準曲線則可換算 TNF- α 濃度。

(b) 實驗步驟

- (1) 將肝臟均質液做適當倍數稀釋 (40 X)；將標準品稀釋至 1000 pg/ml 後再序列稀釋至 15.6 pg/ml
- (2) 加入 50 μ l sample diluents 到各個 sample well
- (3) 加入已稀釋好的均質液 50 μ l 到各個 sample well；將標準品取 100 μ l 加到各個 standard well
- (4) 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 well 中加入 100 μ l biotin-conjugate，於室溫下反應 1 小時
- (7) 以 wash buffer 利用免疫分析微盤清洗機清洗 5 次
- (8) 每個 well 中加入 100 μ l streptavidin-HRP，於室溫下反應 1 小時
- (9) 以 wash buffer 利用免疫分析微盤清洗機清洗 5 次
- (10) 避光後，每個 well 中加入 100 μ l TMB substrate solution，於室溫下反應 10 分鐘
- (11) 每個 well 中加入 100 μ l stop solution
- (12) 使用 ELISA reader 測定其 OD_{450nm} 之吸光值

(c) 標準曲線之製作

將標準品序列稀釋成濃度為 1000、500、250、125、62.5、31.3、15.6 pg/ml，以此設為 X 軸，實驗所測得之標準品 OD_{450nm} 吸光值設為 Y 軸，即可得一標準曲線。

(d) 計算方法

將實驗樣品在 OD_{450nm} 之下測得之吸光值，依標準曲線以內插法代回一次方程式($y = ax+b$)計算，再乘回稀釋倍數($\times 40$)，即可求得樣品之 TNF- α 濃度，除以樣品蛋白質濃度後，濃度單位以 pg/mg protein 表示。

11、肝臟均質液中 MCP-1 濃度測定

(a) 原理

本實驗以 Mouse MCP-1 ELISA 商業套組進行分析，是利用 ELISA 的原

理。具MCP-1特異性之多株抗體已結合在96孔盤上，將實驗樣品加入孔盤中，此時樣品的MCP-1會專一性被結合於其抗體上，利用wash buffer沖洗掉多餘樣品後，再加入與生物素共軛的抗MCP-1抗體，使其與孔盤內的MCP-1共軛結合，再依序加入avidin-HRP及TMB。TMB受過氧化酶催化後會有藍色氧化產物產生，加入stop solution中止反應後，即可測其OD_{450nm}之吸光值。代入標準曲線則可換算MCP-1濃度。

(b) 實驗步驟

- (1) 將肝臟均質液做適當倍數稀釋(40X);將標準品稀釋至 1000 pg/ml 後再序列稀釋至 15.6 pg/ml
- (2) 加入 50 μ l sample diluents 到各個 sample well
- (3) 加入已稀釋好的均質液 50 μ l 到各個 sample well ; 將標準品取 100 μ l 加到各個 standard well
- (4) 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 4 次
- (6) 每個 well 中加入 100 μ l biotin-conjugate , 於室溫下反應 1 小時
- (7) 以 wash buffer 利用免疫分析微盤清洗機清洗 4 次
- (8) 每個 well 中加入 100 μ l streptavidin-HRP , 於室溫下反應 1 小時
- (9) 以 wash buffer 利用免疫分析微盤清洗機清洗 4 次
- (10) 避光後，每個 well 中加入 100 μ l TMB substrate solution , 於室溫下反應 10 分鐘
- (11) 每個 well 中加入 100 μ l stop solution
- (12) 使用 ELISA reader 測定其 OD_{450nm} 之吸光值

(c) 標準曲線之製作

將標準品序列稀釋成濃度為 1000、500、250、125、62.5、31.3、15.6 pg/ml，以此設為 X 軸，實驗所測得之標準品 OD_{450nm} 吸光值設為 Y 軸，即可得一標準曲線。

(d) 計算方法

將實驗樣品在 OD_{450nm} 之下測得之吸光值，依標準曲線以內插法代回一次方程式($y = ax+b$)計算，再乘回稀釋倍數($\times 40$)，即可求得樣品之 MCP-1 濃度，除以樣品蛋白質濃度後，濃度單位以 pg/mg protein 表示。

12、肝臟脂肪酸組成

(a) 原理

本實驗採用氣相層析法分析脂肪酸組成，樣品由注射口注入並於高溫下氣化進入分離管柱(靜相)中，以氦氣做為攜帶氣體(動相)，動相並不與分析分子產生反應，僅是帶動分子流經管柱中，利用動相氣體與靜相液體薄膜親和力不同，將不同碳數或雙鍵數的脂肪酸分離，最後進入偵測器燃燒氣體(氦氣、空氣)將樣品離子化後偵測訊號，將訊號於記錄器上放大顯示。

(b) 實驗步驟

- (1) 取肝臟 200 mg 放入均質玻璃管，加入 1 ml (氯仿：甲醇=2：1)溶液之後立即置於冰上利用均質機低溫均質，均質完成後取出液體至 1.5 ml

微量離心管

- (2) 加入 200 μl 二次水
- (3) 離心 2000 rpm，10 分鐘
- (4) 取下層均質液(氯仿層)質放置於 15 ml 玻璃管，以抽氣缸隔夜抽乾
- (5) 加入 1 ml BF_3 ，鎖緊瓶蓋，95 $^\circ\text{C}$ 熱水浴 1 小時
- (6) 靜置冷卻至室溫，加入 0.5 ml 二次水及 1 ml heptane
- (7) 離心 2000 rpm，10 分鐘
- (8) 取上層液，以抽氣缸隔夜抽乾
- (9) 加入 100 μl heptane 回溶，取 1 μl 注入 GC 分析儀測定其脂肪酸組成

(c) 條件

- (1) 樣品注射體積：1 μl
- (2) 攜帶氣體：氮氣
- (3) 流速：1 ml/min
- (4) 分流比：20：1
- (5) 管柱：SPTM-2380，ID 0.25 mm \times 60 meter，df 為 0.20 μm
- (6) 升溫條件：起始溫度 165 $^\circ\text{C}$ ，以 5 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 的升溫速率升溫至 185 $^\circ\text{C}$ ，再以 2.5 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 的升溫速率升溫至 250 $^\circ\text{C}$ ，維持 2 分鐘
- (7) 注射口溫度：250 $^\circ\text{C}$
- (8) 火焰偵測器溫度：250 $^\circ\text{C}$

(d) 計算方法

將樣品及標準品經上述條件注入 GC 得到脂肪酸組成，樣品各波峰的流滯時間(retention time)與標準品之波峰位置比較，確認各脂肪酸甲基酯，

由相對面積(area)求得各脂肪酸所占之相對百分比。

13、中西式食品中脂肪酸組成

(a) 原理

本實驗原理同肝臟脂肪酸組成之分析原理 P. 34。

(b) 條件

本實驗計算方法同肝臟脂肪酸組成之計算方法 P. 35。

(c) 計算方法

本實驗計算方法同肝臟脂肪酸組成之計算方法 P. 35。

四、統計分析

各組實驗數據以 Mean±SD 表示，所獲得結果皆以單因子變異數分析方法進行分析(one-way ANOVA)，採用 Dunccan'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($p>0.05$)，而不同字母表示有顯著差異($p<0.05$)。

第五章 結果

本研究第一部分為分析市售中西式食品中脂肪酸之組成及其含量；第二部分則為以 STZ 誘發糖尿病之 C56BL/6JNarl 小鼠，在其飼料中加入 20 % 無鹽奶油及 20 % 市售富含反式脂肪酸之奶油，實驗期為 8 週。旨在探討反式脂肪是否會加重糖尿病發展之惡化。

一、體重變化

8 週實驗期間，每週體重變化如【圖 5-1】。由圖中可知實驗第 1 週三組 STZ 誘發之糖尿病小鼠(DM、DM+SFA、DM+TFA)其體重與 normal 組比較皆有顯著下降($p < 0.05$)。於實驗 1~3 週，餵食 20% 飽和奶油飲食組(DM+SFA)及 20 % 富含反式脂肪奶油飲食組(DM+TFA)與 normal 組和 DM 組相比較，體重快速上升($p < 0.05$)，實驗 8 週後明顯看見 DM+SFA 及 DM+TFA 兩組體重與 normal 組相似，但 DM+SFA 及 DM+TFA 兩組之間並無顯著差異($p > 0.05$)。

二、飲水量

8 週實驗期間，小鼠每日平均飲水量如【圖 5-2】所示。在 DM、DM+SFA 及 DM+TFA 三組中，其各組飲水量與 normal 組相比皆有顯著增加($p < 0.05$)，而 DM+SFA 及 DM+TFA 兩組，其飲水量皆顯著低於 DM 組($p < 0.05$)。而 DM+SFA 及 DM+TFA 兩組之間，其飲水量無顯著差異($p > 0.05$)。

三、攝食量

8 週實驗期間，小鼠每日平均攝食量如【圖 5-3】所示。在 DM、DM+SFA 及 DM+TFA 三組中，其各組攝食量與 normal 組相比皆有顯著增加($p < 0.05$)，實驗 1~4 週，DM+SFA 及 DM+TFA 兩組，其攝食量皆顯著高於 DM 組($p < 0.05$)，實驗第 5 週後，餵食奶油飲食的兩組，其攝食量與 DM 組相比無顯著差異($p > 0.05$)。

四、臟器重量

各組之間小鼠平均之臟器與體重的相對重量，如【表5-1】所示。肝臟重量在STZ誘發糖尿病的三組與normal組相較皆有顯著增加($p < 0.05$)，餵食20 %奶油飲食(DM+SFA及DM+TFA)之組別與DM組比較，雖然有增加但未達顯著差異($p > 0.05$)；心臟重量在DM+SFA及DM+TFA兩組與normal組相較有顯著下降($p < 0.05$)，與DM組相較雖有下降，但未達顯著差異($p > 0.05$)；脾臟重量在DM+SFA及DM+TFA兩組與normal組和DM組相較有顯著增加($p < 0.05$)；腎臟重量在DM組顯著高於其他三組($p < 0.05$)；副睪脂質重量在DM組顯著低於normal組($p < 0.05$)，餵食飽和奶油飲食組(DM+SFA)，其副睪脂質重量則與normal組相似，但添加富含反式脂肪酸之奶油飲食組(DM+TFA)其副睪脂質重量顯著高於其他三組($p < 0.05$)。

五、空腹血糖、血清 insulin 濃度及 HOMA-IR 值

實驗8週後，小鼠犧牲並測量其空腹血糖與空腹血清胰島素，分別如【表5-2】所示。血糖方面，在DM、DM+SFA及DM+TFA三組中，其空腹血糖濃度皆高於normal組($p < 0.05$)，其中，DM+SFA及DM+TFA兩組，其空腹血糖濃度皆顯著高於DM組($p < 0.05$)。

胰島素方面，誘發糖尿病之DM組小鼠其血清胰島素濃度有顯著下降($p < 0.05$)，而DM+SFA及DM+TFA兩組胰島素濃度皆顯著低於DM組($p < 0.05$)，其中又以DM+TFA組顯著低於DM+SFA組($p < 0.05$)。

HOMA-IR值由結果得知，DM組小鼠顯著高於normal組($p < 0.05$)，且DM+SFA及DM+TFA兩組與DM組相較HOMA-IR值有顯著增加($p < 0.05$)。

六、血清酵素變化

1、血清 AST 濃度

實驗 8 週後，小鼠血清中 AST 濃度如【圖 5-4】所示。DM、DM+SFA 與 DM+TFA 組，其 AST 濃度與 normal 組相較皆有顯著增加($p < 0.05$)。且 DM+TFA 組 AST 濃度比 DM 組有顯著增加($p < 0.05$)，但 DM+SFA 與 DM+TFA 兩組之間並無顯著差異($p > 0.05$)。

2、血清 ALT 濃度

實驗 8 週後，小鼠血清 ALT 濃度如【圖 5-5】。DM、DM+SFA 與 DM+TFA 組，其 ALT 濃度與 normal 組相較皆有顯著增加($p < 0.05$)。而 DM、DM+SFA 及 DM+TFA，三組間並無顯著差異($p > 0.05$)。

七、肝臟 TG 濃度

如【圖 5-6】所示，DM 組肝臟 TG 含量顯著低於 normal 組($p < 0.05$)，與 DM+TFA 組相比較，DM+SF 組肝臟 TG 含量顯著較高($p < 0.05$)。

八、肝臟 TC 濃度

如【圖 5-7】所示，DM、DM+SFA 及 DM+TFA 三組肝臟 TC 含量皆顯著高於 normal 組($p < 0.05$)，DM+SFA 肝臟 TC 含量顯著高於 DM 組，與 DM+TFA 組相比較，DM+SFA 肝臟 TC 含量顯著較高($p < 0.05$)。

九、肝臟 LDL 濃度

如【圖 5-8】所示，DM、DM+SFA 及 DM+TFA 三組肝臟 LDL 含量皆顯著高於 normal 組($p < 0.05$)，DM+SFA 組肝臟 LDL 含量顯著高於 DM 組，與 DM+TFA 組相比較，DM+SFA 肝臟 LDL 含量顯著較高($p < 0.05$)。

十、肝臟中發炎因子濃度

1、肝臟 IL-6 濃度

如【圖 5-9】所示，三組 DM 小鼠肝臟的 IL-6 濃度明顯高於 normal 組($p < 0.05$)，DM+SFA 組及 DM+TFA 組其肝臟 IL-6 濃度與 DM 組相較皆有顯著增加($p < 0.05$)，而 DM+SFA 與 DM+TFA 兩組之間並無顯著差異($p > 0.05$)。

2、肝臟 TNF- α 濃度

如【圖 5-10】所示，DM 組肝臟的 TNF- α 濃度明顯高於 normal 組($p < 0.05$)，DM+SFA 組肝臟 TNF- α 濃度與 DM 組相較，有明顯增加($p < 0.05$)，但 DM+TFA 與 DM 組相較則無顯著影響($p > 0.05$)。

3、肝臟 MCP-1 濃度

如【圖 5-11】所示，DM 組肝臟的 MCP-1 濃度明顯高於 normal 組($p < 0.05$)，DM+SFA 及 DM+TFA 兩組其肝臟 MCP-1 濃度與 DM 組相較並沒有顯著影響($p > 0.05$)。

十一、 脂肪酸組成

1、 實驗飼料、20% 奶油飼料所含的脂肪酸組成

經由氣相層析儀分析所得結果如【表 5-3】所示。一般飲食飼料中的脂肪酸組成有 24.3 % 為 SFA，而 MUFA 及 PUFA 的含量分別為 49.93 % 及 25.75 %。另一方面，飽和奶油組成大部分為 SFA，佔 66.32 %；而富含反式脂肪的奶油含 TFA 有 12.27 %。

2、 肝臟脂肪酸組成

如【表 5-4】所示，經氣相層析儀分析後，DM+SFA 與 normal 組比較，其肝臟 SFA 含量顯著增加($p < 0.05$)，其中三種飽和脂肪(14:0、16:0、18:0)雖未達顯著差異，但有較高於 normal 組，而 PUFA 含量(18:2、18:3)則顯著減少($p < 0.05$)；而 DM+TFA 組與其他三組比較，肝臟含有少量 TFA (18:1 trans)約 0.77%。

十二、 中式食品中脂肪酸組成

平均一克市售中式食品所含脂肪酸組成及其量如【表 5-5】所示。反式脂肪酸

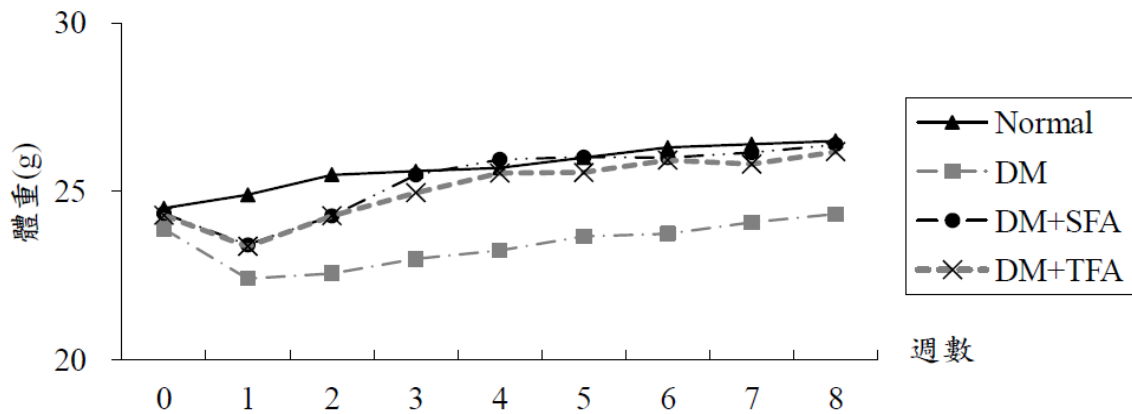
含量最高者為鹹酥雞，次之則為油條、燒餅及月餅餡，含量最低者為月餅皮，中式食品中主要反式脂肪酸為 Ealidic acid (18:1 trans-9)。本實驗分析的中式食品其中又以鳳梨酥富含有多種反式脂肪酸(14:1 trans、16:1 trans、18:1 trans)。

十三、 西式食品中脂肪酸組成

平均一克市售西式食品所含脂肪酸組成及其量如【表 5-6】所示。反式脂肪酸含量最高者為甜甜圈，次之則為西式喜餅，其反式脂肪酸主要為 Ealidic acid (18:1 trans-9)，其餘食品皆無測得反式脂肪酸。



體重變化



【圖 5-1】進行 8 週實驗期間每週體重變化

normal：正常飲食及飲水，n=10

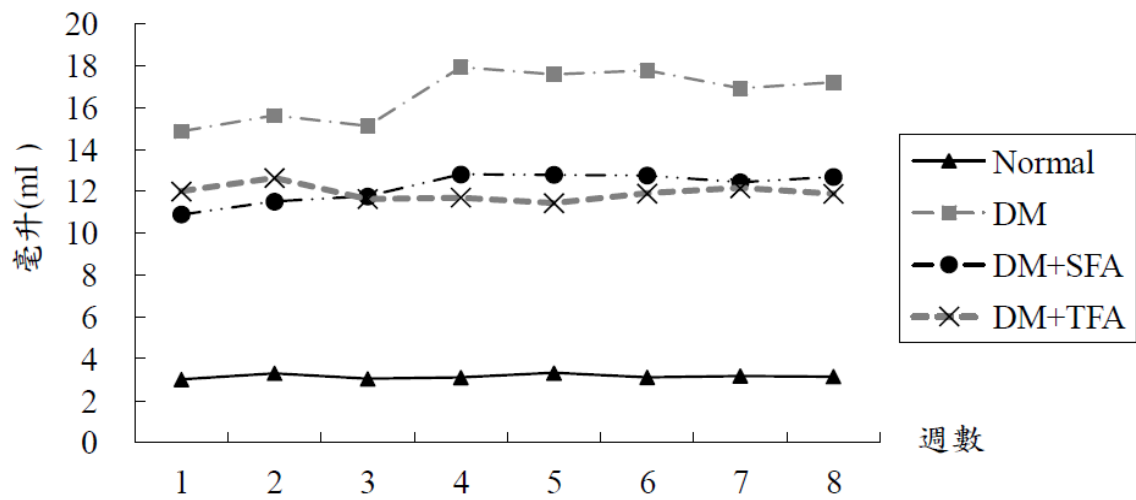
DM：STZ 誘發之 DM 小鼠，正常飲食及飲水，n=12

DM+SFA：STZ 誘發之 DM 小鼠，飼料添加 20 % 飽和奶油飲食，正常飲水，n=18

DM+TFA：STZ 誘發之 DM 小鼠，飼料添加富含反式脂肪奶油飲食，正常飲水，n=18

數據皆以 mean 表示，不同英文字母代表各組之間有顯著差異($p < 0.05$)

飲水量變化



【圖 5-2】進行 8 週實驗期間每天平均飲水量之變化

normal：正常飲食及飲水，n=10

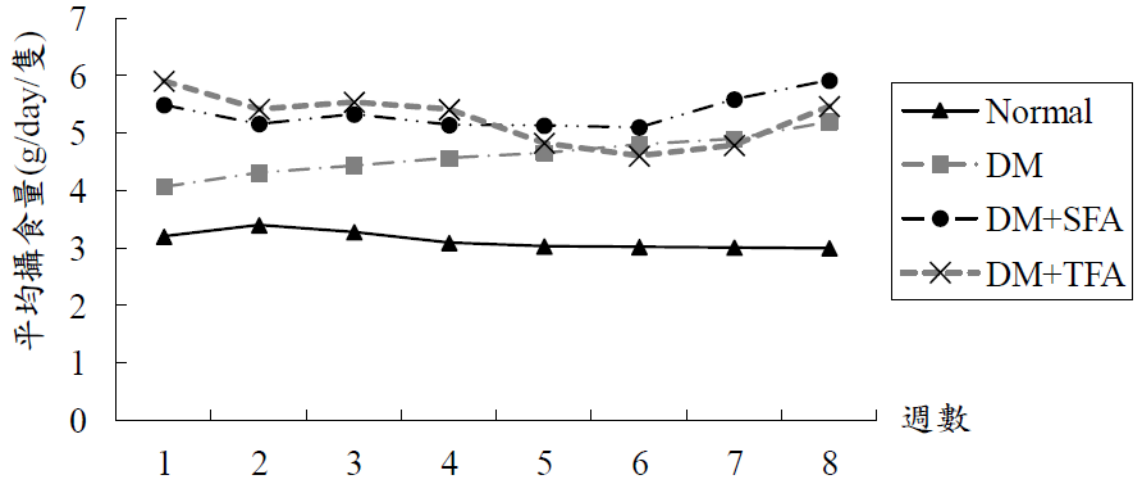
DM：STZ 誘發之 DM 小鼠，正常飲食及飲水，n=12

DM+SFA：STZ 誘發之 DM 小鼠，飼料添加 20 % 飽和奶油飲食，正常飲水，n=18

DM+TFA：STZ 誘發之 DM 小鼠，飼料添加富含反式脂肪奶油飲食，正常飲水，n=18

數據皆以 mean 表示，不同英文字母代表各組之間有顯著差異($p < 0.05$)

攝食量變化



【圖 5-3】進行 8 週實驗期間每天平均攝食量之變化

normal：正常飲食及飲水，n=10

DM：STZ 誘發之 DM 小鼠，正常飲食及飲水，n=12

DM+SFA：STZ 誘發之 DM 小鼠，飼料添加 20 % 飽和奶油飲食，正常飲水，n=18

DM+TFA：STZ 誘發之 DM 小鼠，飼料添加富含反式脂肪奶油飲食，正常飲水，n=18

數據皆以 mean 表示，不同英文字母代表各組之間有顯著差異($p < 0.05$)

【表 5-1】進行 8 週實驗後小鼠臟器與體重之相對重

	肝臟重	心臟重	脾臟重	腎臟重	副睪脂重	副睪脂重
	mg/BW	mg/BW	mg/BW	mg/BW	mg/BW	mg
normal	34.5±5.5 ^a	6.1±0.8 ^b	2.3±0.3 ^a	12.7±0.9 ^a	14.2±3.8 ^b	375.1±10.1 ^b
DM	41.8±3.2 ^b	5.6±0.7 ^a	2.2±0.6 ^a	13.8±1.2 ^b	4.2±2.5 ^a	104±7.8 ^a
DM+SFA	44.4±5.9 ^b	5.3±0.7 ^a	2.7±0.3 ^b	13.1±0.8 ^{ab}	12.2±4.3 ^b	327.3±10.8 ^b
DM+TFA	43.5±5.5 ^b	5.3±0.5 ^a	2.6±0.5 ^b	12.9±0.9 ^{ab}	29±4.6 ^c	771.8±11 ^c

normal：正常飲食及飲水，n=10

DM：STZ 誘發之 DM 小鼠，正常飲食及飲水，n=12

DM+SFA：STZ 誘發之 DM 小鼠，飼料添加 20 % 飽和奶油飲食，正常飲水，n=18

DM+TFA：STZ 誘發之 DM 小鼠，飼料添加富含反式脂肪奶油飲食，正常飲水，n=18

數據皆以 mean±SD 表示，不同英文字母代表各組之間有顯著差異($p < 0.05$)

【表 5-2】餵食 20 % 飽和及反式脂肪飲食 8 週後小鼠空腹血糖、血清 insulin 濃度及 HOMA-IR 值

	Glucose (mg/dl)	Insulin (μ U/ml)	HOMA-IR (units)
normal	100.90 \pm 21.88 ^a	0.34 \pm 0.03 ^c	2.15 \pm 0.50 ^a
DM	210.92 \pm 64.47 ^b	0.27 \pm 0.02 ^b	3.35 \pm 0.91 ^b
DM+SFA	328.67 \pm 110.24 ^c	0.23 \pm 0.02 ^a	4.36 \pm 1.21 ^c
DM+TFA	359.44 \pm 90.55 ^c	0.20 \pm 0.03 ^a	4.27 \pm 1.09 ^c

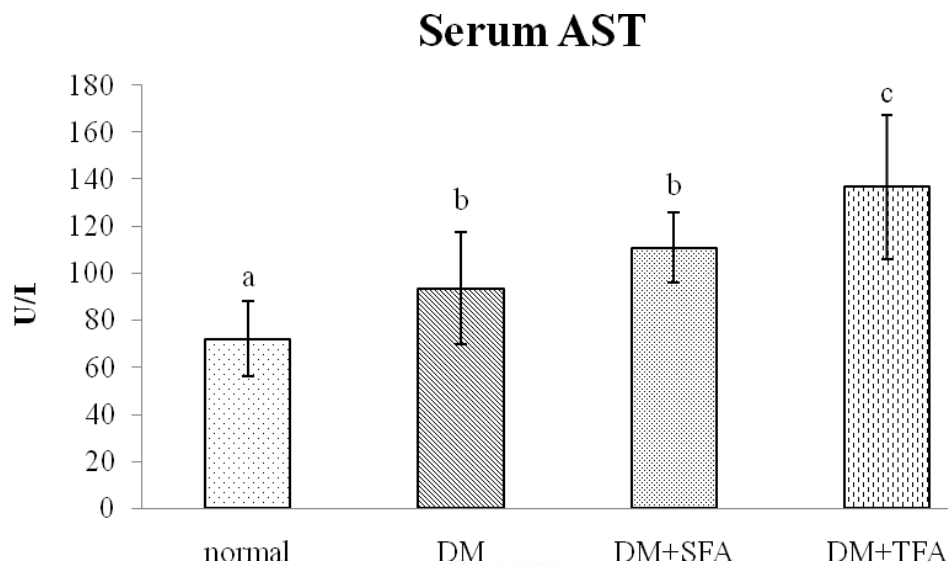
normal：正常飲食及飲水，n=10

DM：STZ 誘發之 DM 小鼠，正常飲食及飲水，n=12

DM+SFA：STZ 誘發之 DM 小鼠，飼料添加 20 % 飽和奶油飲食，正常飲水，n=18

DM+TFA：STZ 誘發之 DM 小鼠，飼料添加富含反式脂肪奶油飲食，正常飲水，n=18

數據皆以 mean \pm SD 表示，不同英文字母代表各組之間有顯著差異($p < 0.05$)



【圖 5-4】餵食 20 % 飽和及反式脂肪飲食 8 週後小鼠血清 AST 濃度

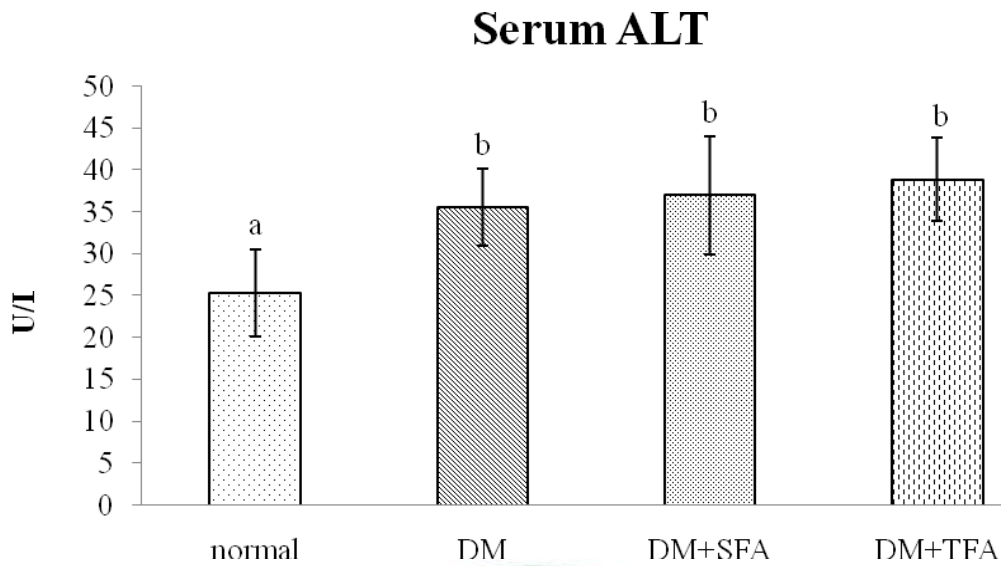
normal：正常飲食及飲水，n=10

DM：STZ 誘發之 DM 小鼠，正常飲食及飲水，n=12

DM+SFA：STZ 誘發之 DM 小鼠，飼料添加 20 % 飽和奶油飲食，正常飲水，n=18

DM+TFA：STZ 誘發之 DM 小鼠，飼料添加富含反式脂肪奶油飲食，正常飲水，n=18

數據皆以 mean±SD 表示，不同英文字母代表各組之間有顯著差異($p < 0.05$)



【圖 5-5】餵食 20 % 飽和及反式脂肪飲食 8 週後小鼠血清 ALT 濃度

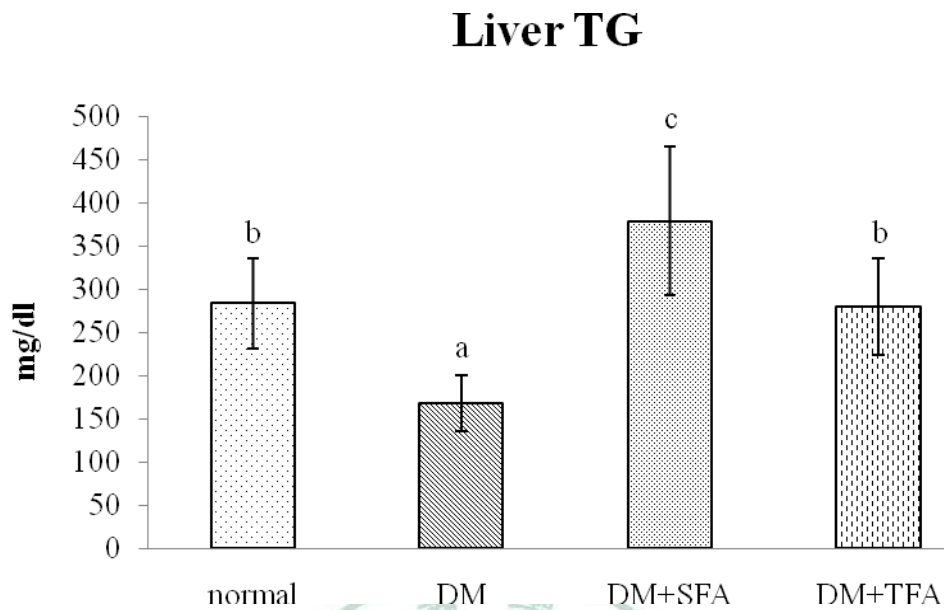
normal：正常飲食及飲水，n=10

DM：STZ 誘發之 DM 小鼠，正常飲食及飲水，n=12

DM+SFA：STZ 誘發之 DM 小鼠，飼料添加 20 % 飽和奶油飲食，正常飲水，n=18

DM+TFA：STZ 誘發之 DM 小鼠，飼料添加富含反式脂肪奶油飲食，正常飲水，n=18

數據皆以 mean±SD 表示，不同英文字母代表各組之間有顯著差異($p < 0.05$)



【圖 5-6】餵食 20 % 飽和及反式脂肪飲食 8 週後小鼠肝臟 Triglyceride(TG)濃度

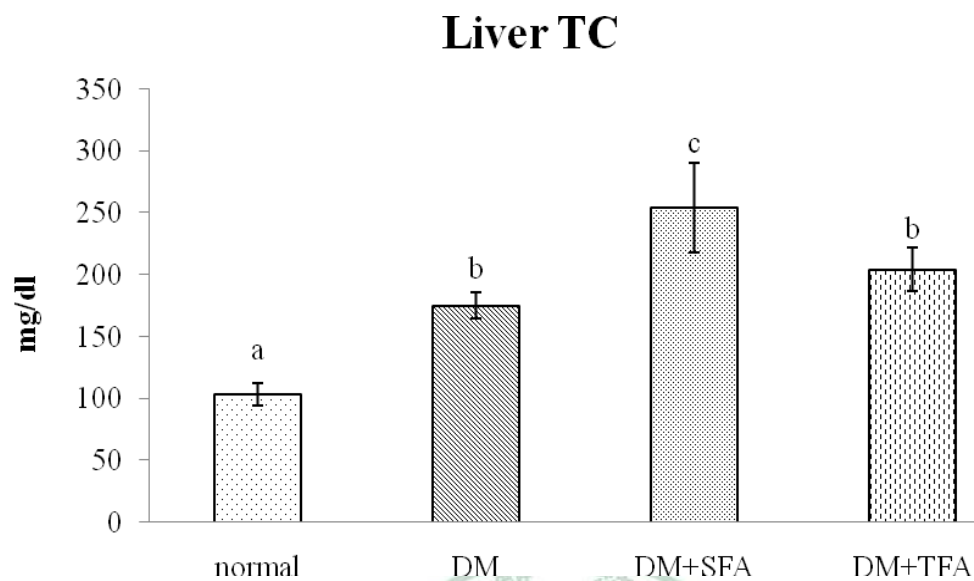
normal：正常飲食及飲水，n=10

DM：STZ 誘發之 DM 小鼠，正常飲食及飲水，n=12

DM+SFA：STZ 誘發之 DM 小鼠，飼料添加 20 % 飽和奶油飲食，正常飲水，n=18

DM+TFA：STZ 誘發之 DM 小鼠，飼料添加富含反式脂肪奶油飲食，正常飲水，n=18

數據皆以 mean±SD 表示，不同英文字母代表各組之間有顯著差異($p < 0.05$)



【圖 5-7】 餵食 20 % 飽和及反式脂肪飲食 8 週後小鼠肝臟 Cholesterol(TC)濃度

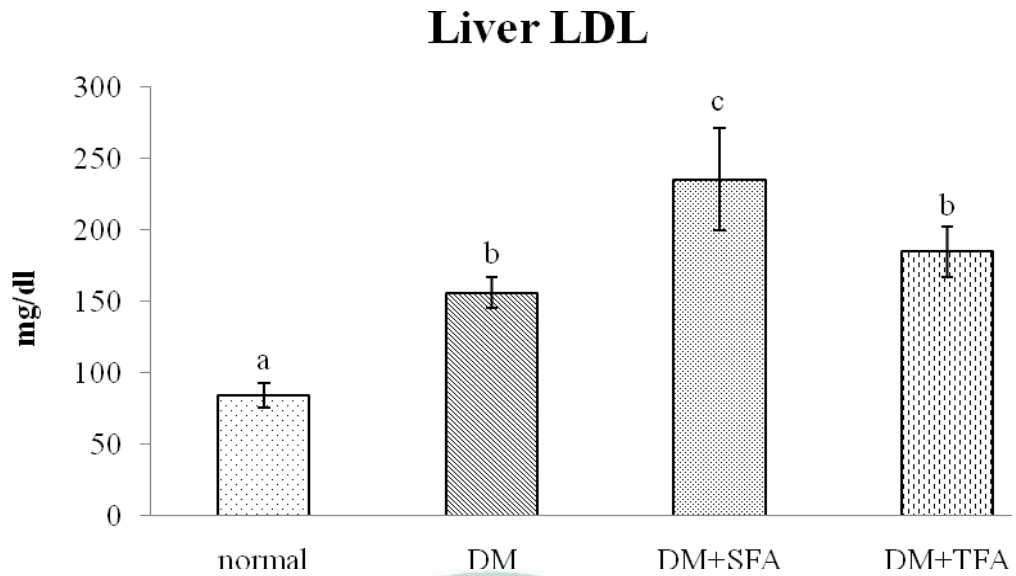
normal：正常飲食及飲水，n=10

DM：STZ 誘發之 DM 小鼠，正常飲食及飲水，n=12

DM+SFA：STZ 誘發之 DM 小鼠，飼料添加 20 % 飽和奶油飲食，正常飲水，n=18

DM+TFA：STZ 誘發之 DM 小鼠，飼料添加富含反式脂肪奶油飲食，正常飲水，n=18

數據皆以 mean±SD 表示，不同英文字母代表各組之間有顯著差異($p < 0.05$)



【圖 5-8】 餵食 20 % 飽和及反式脂肪飲食 8 週後小鼠肝臟 LDL 濃度

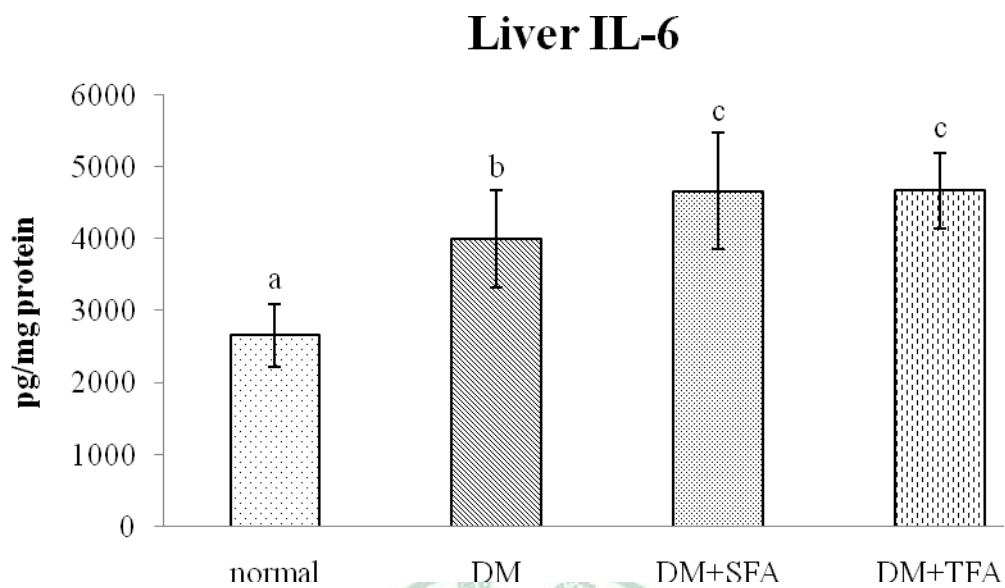
normal：正常飲食及飲水，n=10

DM：STZ 誘發之 DM 小鼠，正常飲食及飲水，n=12

DM+SFA：STZ 誘發之 DM 小鼠，飼料添加 20 % 飽和奶油飲食，正常飲水，n=18

DM+TFA：STZ 誘發之 DM 小鼠，飼料添加富含反式脂肪奶油飲食，正常飲水，n=18

數據皆以 mean±SD 表示，不同英文字母代表各組之間有顯著差異($p < 0.05$)



【圖 5-9】餵食 20 % 飽和及反式脂肪飲食 8 週後小鼠肝臟 IL-6 濃度

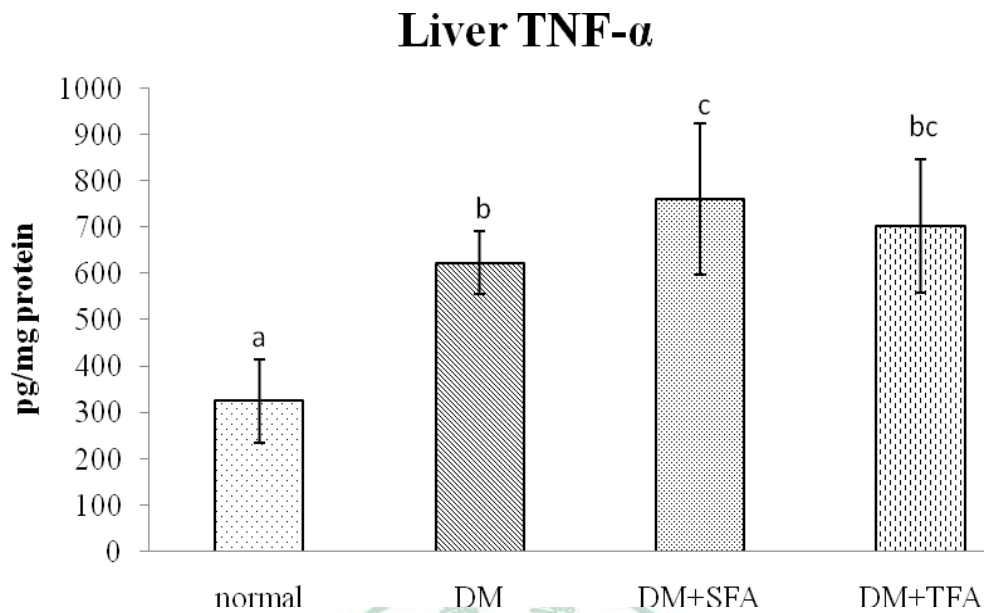
normal：正常飲食及飲水，n=10

DM：STZ 誘發之 DM 小鼠，正常飲食及飲水，n=12

DM+SFA：STZ 誘發之 DM 小鼠，飼料添加 20 % 飽和奶油飲食，正常飲水，n=18

DM+TFA：STZ 誘發之 DM 小鼠，飼料添加富含反式脂肪奶油飲食，正常飲水，n=18

數據皆以 mean±SD 表示，不同英文字母代表各組之間有顯著差異($p < 0.05$)



【圖 5-10】 餵食 20 % 飽和及反式脂肪飲食 8 週後小鼠肝臟 TNF- α 濃度

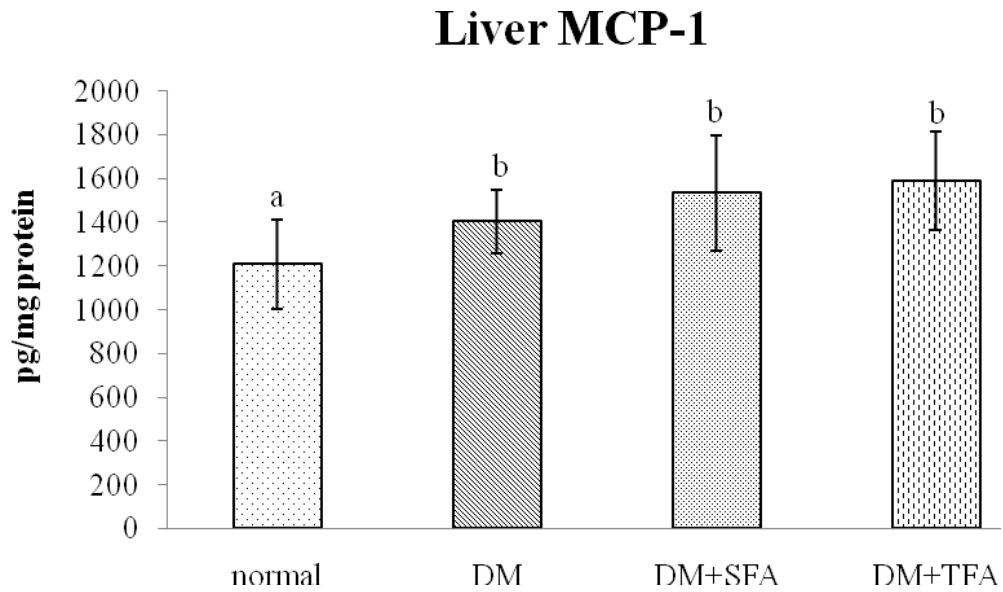
normal：正常飲食及飲水，n=10

DM：STZ 誘發之 DM 小鼠，正常飲食及飲水，n=12

DM+SFA：STZ 誘發之 DM 小鼠，飼料添加 20 % 飽和奶油飲食，正常飲水，n=18

DM+TFA：STZ 誘發之 DM 小鼠，飼料添加富含反式脂肪奶油飲食，正常飲水，n=18

數據皆以 mean \pm SD 表示，不同英文字母代表各組之間有顯著差異($p < 0.05$)



【圖 5-11】 餵食 20 % 飽和及反式脂肪飲食 8 週後小鼠肝臟 MCP-1 濃度

normal：正常飲食及飲水，n=10

DM：STZ 誘發之 DM 小鼠，正常飲食及飲水，n=12

DM+SFA：STZ 誘發之 DM 小鼠，飼料添加 20 % 飽和奶油飲食，正常飲水，n=18

DM+TFA：STZ 誘發之 DM 小鼠，飼料添加富含反式脂肪奶油飲食，正常飲水，n=18

數據皆以 mean±SD 表示，不同英文字母代表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實驗奶油飲食脂肪酸的組成

SFA : Saturated fatty acid

MUFA : Monounsaturated fatty acid

PUFA : Polyunsaturated fatty acid

TFA : Trans fatty acid

Fatty acid	飼料 (area%)	KL-奶油 (area%)	雪印-奶油 (area%)	Diet SFA (area%)	Diet TFA (area%)
10:0		2.52		1.46	
12:0		3.91		2.91	
14:0	0.44	12.55		10.23	0.67
14:1		2.50		2.13	
16:0	16.64	32.29	12.64	30.38	16.95
16:1	0.89	1.91		2.37	
18:0	3.45	15.05	13.09	13.19	8.68
18:1 T			12.27		8.64
18:1 C	22.77	24.30	21.38	24.61	21.50
18:2	46.80	3.72	33.65	11.24	32.25
18:3	3.13	0.38	4.84	0.97	3.64
22:0	3.77				3.02
20:1	2.09				4.32
20:4					
SFA	24.30 %	66.32 %	25.73 %	58.17 %	29.32 %
MUFA	25.75 %	28.71 %	21.38 %	29.11 %	25.82 %
PUFA	49.93 %	4.10 %	38.49 %	12.21 %	35.89 %
TFA			12.27%		8.64 %
Total	99.98 %	99.13 %	97.87 %	99.49 %	99.67 %

【表 5-4】本實驗餵食市售奶油飲食後肝臟脂肪酸組成

normal：正常飲食及飲水，n=10

DM：STZ 誘發之 DM 小鼠，正常飲食及飲水，n=12

DM+SFA：STZ 誘發之 DM 小鼠，飼料添加 20 % 飽和奶油飲食，正常飲水，n=18

DM+TFA：STZ 誘發之 DM 小鼠，飼料添加富含反式脂肪奶油飲食，正常飲水，n=18

數據皆以 mean±SD 表示，不同英文字母代表各組之間有顯著差異($p < 0.05$)

Fatty acid	normal (area%)	DM (area%)	DM+SFA (area%)	DM+TFA (area%)
14:0	0.88±0.11		0.94±0.33	
16:0	22.7±6.99 ^{ab}	20.88±0.81 ^a	27.15±2.43 ^b	22.48±3.39 ^a
16:1	2.74±1.22 ^b	1.19±0.14 ^a	2.05±1.59 ^{ab}	0.68±0.14 ^a
18:0	8.14±2.47 ^a	12.58±1.17 ^b	8.95±2.94 ^a	12.95±1.19 ^b
18:1 T				0.77±0.06
18:1 C	16.37±4.62 ^b	12.9±1.2 ^a	22.2±6.03 ^c	12.83±1.54 ^a
18:2	28.91±1.31 ^c	26.57±0.97 ^b	17.72±1.03 ^a	27.36±1.12 ^b
18:3	1.38±0.14 ^b	1.08±0.15 ^{ab}	1.1±0.15 ^{ab}	0.85±0.35 ^a
20:1	0.97±0.62 ^a	1.41±0.2 ^a	1.3±0.28 ^a	1.39±0.37 ^a
20:4	5.91±2.12 ^a	11.03±0.78 ^b	7.11±1.32 ^a	10.15±1.73 ^b
20:5	7.35±2.06 ^a	7.49±0.92 ^a	7.55±2.1 ^a	7.26±1.78 ^a
22:5	1.26±0.07 ^{ab}	0.97±0.13 ^a	1.17±0.36 ^{ab}	1.47±0.17 ^b
22:6	1.05±0.26 ^a	1.74±0.22 ^b	2.19±0.48 ^b	1.88±0.51 ^b
SFA	31.72 %	33.46 %	37.04 %	35.43 %
MUFA	20.08 %	15.51 %	29.55 %	15.67 %
PUFA	45.86 %	48.88 %	36.83 %	48.96 %
TFA				0.77 %
Total	97.66 %	97.84 %	99.43 %	99.30 %

【表 5-5】市售中式食品脂肪酸組成

Fatty acid	月餅皮 (area%)	月餅餡 (area%)	鹹酥雞 (area%)	鳳梨酥 (area%)	燒餅 (area%)	油條 (area%)
8:0	0.7427±0			0.9462±0.31		
10:0	1.62±1.87	1.67±0.9		1.93±0.88		
12:0	3.37±7.2	2.43±1.38		3.16±1.43	3.72±0	
14:0	7.83±4.33	6.09±4.55	0.95±0.22	7.81±4.24	1.77±1.03	
14:1 C	0.97±0.21 ^{ab}	0.91±0 ^a		1.12±0.01 ^b		
14:1 T	1.03±0.12	1.2±0		1.11±0.10		
16:0	34.44±8.56 ^d	23.59±11.39 ^{bc}	31.58±8.12 ^{cd}	33.64±2.35 ^{cd}	20.83±12.27 ^{ab}	12.18±1.11 ^a
16:1 C	1.00±0.28 ^a	0.98±0.23 ^a	2.84±1.94 ^b	1.07±0.24 ^a		
16:1 T				0.89±0		
18:0	8.88±3.39 ^a	8.39±5.11 ^a	4.91±1.4 ^a	13.6±5.02 ^b	5.81±2.54 ^a	5.09±0.67 ^a
18:1 T	15.69±3.29 ^a	21.22±7.37 ^a	38.06±7.01 ^b	17.13±0.62 ^a	21.04±1.61 ^a	22.45±2.39 ^a
18:1 C	21.64±11.64 ^c	19.2±13.8 ^c	15.81±19.75 ^{bc}	20.23±10.83 ^c	3.98±6.03 ^{ab}	1±0.17 ^a
18:2	15.95±16.39 ^{ab}	31.07±22.91 ^{bc}	19.12±4.07 ^{ab}	5.46±1.90 ^a	35.62±17.77 ^{bc}	41.94±13.09 ^c
18:3			5.32±0 ^a	2.92±0 ^a	4.7±2.88 ^a	22.45±12.47 ^b
19:0		0.95±0.05			0.77±0	3.46±3.79
20:0	0.71±0					
20:1	1.58±1.11 ^a	5.47±1.58 ^c	2.83±1.68 ^{ab}	0.82±0.17 ^a	3.73±2.2 ^{bc}	5.44±0.65 ^c
20:4	1.72±0.52 ^a	2.39±0.62 ^a	1.83±1.06 ^a	2.39±0.30 ^a	8.18±5.72 ^b	

【表 5-6】市售西式食品脂肪酸組成

Fatty acid	奶精 (area%)	西式喜餅 (area%)	薯條 (area%)	甜甜圈 (area%)	洋芋片 (area%)
8:0	1.82±0.97	1.02±0.37		1.11±0	
10:0	2.46±0.67 ^b	2.05±0.66 ^{ab}		1.27±0.08 ^a	
12:0	42.12±14.14 ^b	5.41±2.65 ^a		15.09±13.26 ^a	
14:0	16.83±3.99	7.82±4.53	0.83±0.11	4.7±4.51	1.16±0.27
14:1 C		1.03±0.25			
14:1 T		1.13±0.13			
16:0	21.67±7.48 ^a	34.19±4.06 ^b	34.07±5.96 ^b	35.36±10.94 ^b	33.03±16.64 ^b
16:1 C		0.83±		0.88±0.09	
16:1 T		0.71±0			
18:0	10.04±0.33 ^b	10.52±4.69 ^b	3.74±0.17 ^a	7.57±1.84 ^{ab}	4.08±0.15 ^a
18:1 T		14.64±2.36		19.99±17.13	
18:1 C	13.84±2.28 ^a	19.3±12.11 ^a	41.08±3.06 ^b	26.57±12.87 ^a	45.52±9.44 ^b
18:2	3.67±0.38 ^a	8.33±4.28 ^{ab}	16.18±4.67 ^c	9.47±4.94 ^{abc}	15.45±8.57 ^{bc}
18:3		3.54±1.35 ^a	7.97±0 ^b	3.38±1.09 ^a	
20:1		0.91±0.13 ^a	2.29±0.1 ^b	1.06±0.33 ^a	
20:4		2.69±1.09		2.59±1.56	1.28±0

第六章 討論

一、不同脂質對糖尿病小鼠胰島素和血糖之影響

由【表 5-3】可知本實驗所使用的反式脂肪奶油飼料含 TFA 約 8.6 %；飽和脂肪奶油飼料含 SFA 約 58 %。因此，餵食飽和脂肪奶油飼料會攝取到較高量的 SFA，而餵食反式脂肪奶油飼料相較於其他飼料則可能攝取到 TFA。

由先前文獻可知糖尿病鼠血糖及 HOMA-IR 值明顯比未誘發糖尿病鼠高，除此之外，糖尿病鼠給予高脂飲食與一般飲食相較，顯著增加其血糖值及胰島素阻抗性 (Zhang et al., 2008)。本實驗結果發現高脂飲食，不論飽和脂肪或反式脂肪都造成糖尿病小鼠血糖上升及胰島素阻抗性增加。高飽和脂肪酸，會降低 serine/threonine protein kinase 活性，使 phosphoinositide 3-kinase 不活化，進而使下游的 Akt 失活，損壞 GLUT4 運輸葡萄糖機制，產生高血糖及胰島素訊息傳導作用缺陷 (Kalupahana et al., 2012)。另有文獻顯示，高飽和脂肪與反式脂肪飲食改變血清 TG、TC 組成，並向下調節 GLUT4 mRNA 表現，進而降低胰島素敏感性。因此，本實驗結果支持餵食高飽和奶油及含反式脂肪奶油飲食皆會使糖尿病小鼠胰島素濃度下降，並增加血糖值及胰島素阻抗性指標，但兩種脂肪酸飲食對血糖值異常的影響並無顯著差異。

二、不同脂質對糖尿病小鼠體重及肝臟脂質組成之影響

1. 體重與副睪脂質

Kunjathoor 等人於 1996 年研究結果顯示連續五天腹腔注射 STZ 誘發糖尿病，小鼠在誘發後有明顯的體重減輕，給予糖尿病小鼠 30 kcal % 高脂飲食八週

後，體重明顯與未誘發糖尿病之一般飲食組相近。依本實驗研究結果顯示，糖尿病小鼠餵食飽和奶油及含反式脂肪奶油飲食後，皆造成糖尿病小鼠體重在短時間內快速上升，其中含反式脂肪奶油之高脂飲食所造成副羣脂質增加明顯大於一般飲食及飽和奶油飲食，此一結果暗示著含反式脂肪奶油飲食造成體脂肪組織大幅增加。文顯指出，高油飲食除了增加體重外，會促進腹部脂肪及皮下脂肪體積，產生胰島素阻抗性 (Kavanagh et al., 2007; Thompson et al., 2011)，飽和及反式脂肪使動物體內產生過多的脂肪組織，容易造成細胞缺氧、賀爾蒙 (leptin、adiponectin 及 resistin) 的改變，降低胰島素敏感性，促使產生前發炎物質 (IL-6 及 TNF- α)，造成發炎反應 (Saravanan et al., 2005; Shoelson et al., 2007; Hosogai et al., 2007; Schenk et al., 2008)，除此之外，發炎激素 (IL-6、TNF- α) 的釋放，會使得巨噬細胞聚集到受損的組織，增加細胞壓力、脂肪細胞凋亡及發炎反應 (Wang et al., 2007)。

因此，推測本實驗結果，餵食含反式脂肪奶油飲食相較於飽和奶油飲食，其副羣脂質重量大幅增加，可能是體脂肪組織的囤積造成細胞缺氧，引起體內發炎物質加重對胰島素標的細胞，如脂肪細胞、肝細胞所造成的胰島素阻抗，進而刺激脂肪細胞進行脂解作用，增加游離脂肪酸釋放至血液循環中，惡化糖尿病的病程，造成肝臟受損，進一步可能導致 NAFLD。

2. 肝臟脂質組成

糖尿病不僅是血糖代謝異常疾病，更會引發一連串複雜的新陳代謝異常，血脂異常是其中之一，最常見的是高濃度 TG 和低濃度 HDL，以及不正常 LDL 濃度 (Chahil and Ginsberg 2006; Mooradian, 2009)。本實驗中糖尿病小鼠肝臟中有顯著較高的 TC 及 LDL 濃度。Srinivasan 等人研究指出，STZ 誘發糖尿病，餵食高脂飲食後降低血漿胰島素濃度，並造成糖尿病鼠 TC 及 TG 濃度上升

(Srinivasan et al., 2005)。本研究結果顯示餵食含飽和脂肪及反式脂肪飲食相較於 DM 控制組，有增加肝臟 TC 及 LDL 濃度之趨勢，而餵食飽和脂肪飲食相較於反式脂肪飲食組，則有明顯加重肝臟 TC 及 LDL 濃度之效果。從流行病學及動物實驗研究已知高飽和脂肪飲食與含反式脂肪飲食皆會使血清 TC 及 LDL 上升，並使 LDL/HDL 比例增加，此為預測心血管疾病發生指標 (Mensink et al., 1990；Stampfer et al., 1991；Ascherio et al., 1999)。本實驗發現糖尿病小鼠餵食高脂飲食後，僅有飽和脂肪的攝取顯著增加肝臟 TC 及 LDL 濃度，並且由【表 5-4】可知飽和脂肪飲食對肝臟脂質組成影響較大。推測可能是飲食當中 KL 奶油成分含有大量中短鏈脂肪酸，經攝入後在體內容易代謝成膽固醇 (Geelen, 200)，且高飽和脂肪飲食會影響脂肪酸代謝，提升膽固醇合成之速率限制酵素 HMG-CoA reductase 蛋白質表現量，促進內生性膽固醇合成，造成糖尿病小鼠肝臟中有更高膽固醇濃度 (Koppe et al., 2009)。另外，膽固醇的排泄主要是先合成膽酸後排於糞便中，而不飽和脂肪酸可促進肝中膽固醇酯化作用，增加膽酸的形成 (Bravo et al., 1998)。相比之下飽和脂肪酸對膽酸代謝較不飽和脂肪酸差，故攝取飽和脂肪組有較高的 TC 濃度。體內 IL-6 及 TNF- α 濃度上升，也會增加 LDL 濃度，抑制 lipoprotein lipase 活性，進而影響脂質代謝 (Van, 1990；Walsh et al., 1999)。而本研究發現，兩個高脂飲食組肝中 IL-6 及 TNF- α 皆上升。因此，本研究支持糖尿病個體給予高脂飲食會改變糖尿病肝臟中脂質組成，其中飽和脂肪飲食對糖尿病脂質組成影響較反式脂肪飲食大。

三、不同脂質對糖尿病小鼠肝臟發炎指標之影響

1. 肝臟發炎指標之影響

前人的研究已指出糖尿病之高血糖狀態提升體內氧化壓力產生過多氧化物，促進細胞內 PKC 蛋白質表現量增加，造成大量促發炎因子如：TNF- α 、IL-6 之

分泌，且攝取高飽和或含反式脂肪奶油飲食後，兩者皆會加重血糖值的上升，提高體內氧化壓力，造成氧化物大量生成，增加發炎因子的產生 (Lee et al., 1989 ; Derubertis and Craven, 1994 ; Brownlee, 2001 ; Evans et al., 2002 ; Basta et al., 2004)。

本研究同意 STZ 誘發之糖尿病小鼠心臟氧化壓力增加，並且肝臟中大量生成 TNF- α 、IL-6 及 MCP-1，經餵食高脂奶油飲食後，相較於 DM 組，小鼠心臟氧化物及肝臟 IL-6 及 TNF- α 有顯著上升之趨勢，此一結果證明高油飲食會加重 DM 之發炎傷害。而餵食含反式脂肪奶油飲食與飽和奶油飲食相較之下，對糖尿病之發炎傷害並無明顯加重之趨勢。有研究發現，受試者被給予 30% en kcal 富含飽和脂肪與反式脂肪奶油飲食後，其 TNF- α 及 IL-6 濃度皆明顯增加，但兩種飲食之間並無顯著差異，此一結果與 LDL 濃度上升有關，進而提高粥狀動脈硬化之風險 (Han et al., 2002)。另外，有研究指出飽和脂肪酸於肝臟粒線體中氧化代謝效率較不飽和脂肪酸較差，故較容易誘發肝臟產生促發炎因子 (Leyton et al., 1987)。本結果支持給予高脂飲食後，皆可能加重糖尿病小鼠體內氧化壓力，但飽和及含反式脂肪飲食所造成之發炎程度並無顯著差異，當促發炎因子過度表現時則會對細胞造成損傷，促進併發症的發生，因而加重糖尿病小鼠之肝臟發炎反應。

2. 肝功能之影響

ALT 和 AST 主要分布在肝細胞內，ALT 主要在細胞質中，而 AST 則分布在細胞質和粒線體中，ALT 和 AST 會隨著肝細胞的受損而釋放於血液中，對於急性肝損傷而言，ALT 是敏感指標，當 ALT 升高程度異常於 AST 時，則可能罹患慢性肝炎、脂肪肝、中毒性肝炎、病毒性肝炎等疾病 (Green and Flamm, 2002 ; Holt et al., 2006)。臨床發現，糖尿病患因肥胖及血糖調控機制失衡，以致肝醣製造及代謝脂肪的功能也會發生異常，致使脂肪容易囤積在肝臟內，因此糖尿病

患出現 NAFLD 的危險，比一般人要高 2 倍 (Younossi et al., 2004)。另外，T2DM 患者 AST 或 ALT 輕微上升但無臨床症狀者，最常見的肝病是 NAFLD，更進一步可能發展成肝硬化 (Elizabeth and Harris, 2005)。

前人文獻指出 STZ 誘發之糖尿病鼠有肝損傷之 ALT 及 AST 升高現象，在本實驗結果中亦觀察到同樣情形 (Zafar et al., 2009 ; Lo et al., 2011)。本實驗中，相較於 DM 組，餵食高脂飲食後皆有增加血清 AST 及 ALT 之趨勢，且餵食含反式脂肪奶油飲食明顯加重血清 AST 濃度之影響，此一情形暗示 TFA 可能會造成更嚴重的肝損傷。

四、市售食品脂肪酸組成

本研究發現在中式食品中鹹酥雞含有最高量 TFA，鳳梨酥及月餅皮則為富含 SFA；在西式食品中，甜甜圈及西式喜餅皆含有 TFA 及高含量的 SFA。已有文獻顯示，食用油(如未氫化菜籽油、棕櫚油和葵花油)在高溫 180 °C 油炸過程中會生成 elaidic acid，而食物經高溫油炸後會形成更多 TFA，主要亦為 elaidic acid，其中炸物所含的 TFA 會在油炸過程中進入炸油當中，故可在炸油及油炸食品中測得高含量的 TFA (Bansal et al., 2009 ; Tsuzuki et al., 2010)。因此，油炸食品如鹹酥雞及甜甜圈可能含較多 TFA。而此 TFA 可能是炸油經高溫處理或重覆使用而產生。鳳梨酥、月餅皮及西式喜餅製作過程中加入大量 shortening、butter 或 margarine。文獻指出此三種油脂皆富含 SFA 及少量 TFA，其 SFA 主要為 palmitic acid (Lichtenstein et al., 1999)。有研究將酥餅類食品經高溫 180 °C 20 分鐘烘烤後，發現 SFA 含量並無改變，其所含有的 trans isomers 也無發生明顯的氧化或水解變化 (Regulska-Iłow et al., 2001 ; Żbikowska and Kowalska, 2007)。因此推論此類烘焙食品所含之 TFA 是來自其製作過程中加入的油脂。

第七章 結論

本研究由動物實驗結果支持糖尿病小鼠餵食高飽和脂肪奶油飲食及含反式脂肪奶油飲食，會惡化糖尿病之高血糖、胰島素阻抗性，增加肝臟發炎反應。因此糖尿病個體若給予高飽和脂肪及含反式脂肪飲食皆會加重糖尿病之發炎反應對血管、臟器所造成之併發症。市售食品分析結果顯示經高溫油炸、添加奶油或酥油之烘焙食物如鹹酥雞、燒餅、月餅、甜甜圈、西式喜餅皆是富含反式脂肪之食物來源。故為了避免加重糖尿病的惡化，這些食材皆不宜攝取。



第八章 參考文獻

- ADA. 2003. Management of dyslipidemia in adults with diabetes. *Diabetes Care*. 26, S83-86.
- Aro, A., Jauhiainen, M., Partanen, R., Salminen, I., Mutanen, M., 1997. Stearic acid, trans fatty acids, and dairy fat: effects on serum and lipoprotein lipids, apolipoproteins, lipoprotein(a), and lipid transfer proteins in healthy subjects. *Am J Clin Nutr*. 65, 1419-1426.
- Ascherio, A., Katan, M.B., Zock, P.L., Stampfer, M.J., Willett, W.C., 1999. Trans fatty acids and coronary heart disease. *N Engl J Med*. 340, 1994-1998.
- Atkinson, M.A., Eisenbarth, G.S., 2001. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet*. 358, 221-229.
- Bansal, V., Kalita, J., Misra, U.K., 2006. Diabetic neuropathy. *Postgrad Med J*. 82, 95-100.
- Bansal, G., Zhou, W.B., Tan, T.W., Neo, F.L., Lo, H.L., 2009. Analysis of trans fatty acids in deep frying oils by three different approaches. *Food Chemistry*. 116, 535-541.
- Bastard, J.P., Maachi, M., Lagathu, C., Kim, M.J., Caron, M., Vidal, H., Capeau, J., Feve, B., 2006. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw*. 17, 4-12.
- Basta, G., Schmidt, A.M., De Caterina, R., 2004. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc Res*. 63, 582-92.
- Bravo, E., Flora, L., Cantafora, A., De Luca, V., Tripodi, M., Avella, M., Botham, K.M., 1998. The influence of dietary saturated and unsaturated fat on hepatic cholesterol metabolism and the biliary excretion of chylomicron cholesterol in the rat. *Biochim Biophys Acta*. 1390, 134-148.
- Brownlee M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 414, 813-820.
- Campbell, I.W., 2000. Epidemiology and clinical presentation of type 2 diabetes. *Value Health*. 3, 3-6.

- Ceriello, A., Motz, E., 2004. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? the common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24, 816-823.
- Chahil, T.J., Ginsberg, H.N., 2006. Diabetic dyslipidemia. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 35, 491-510.
- Christiansen, E., Schnider, S., Palmvig, B., Tauber-Lassen, E., Pedersen, O., 1997. Intake of a diet high in trans monounsaturated fatty acids or saturated fatty acids. Effects on postprandial insulinemia and glycemia in obese patients with NIDDM. *Diabetes Care.* 20, 881-887.
- Curat, C.A., Miranville, A., Sengenès, C., Diehl, M., Tonus, C., Busse, R., Bouloumié, A., 2004. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes.* 53, 1285-1292.
- Dandona, P., Weinstock, R., Thusu, K., Abdel-Rahman, E., Aljada, A., Wadden, T., 1998. Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients: fall with weight loss. *J Clin Endocrinol Metab.* 83, 2907-2910.
- Derubertis, F.R., Craven, P.A., 1994. Activation of protein kinase C in glomerular cells in diabetes. Mechanisms and potential links to the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. *Diabetes.* 43,1-8.
- Elizabeth, H., Harris, M.D., 2005. Elevated Liver Function Tests in Type 2 Diabetes. *Clin diabetes.* 23, 115-119.
- Eto, D., Lao, C., DiToro, D., Barnett, B., Escobar, T.C., Kageyama, R., Yusuf, I., Crotty, S., 2011. IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (T_{fh}) differentiation. *PLoS One.* 6, e17739.
- Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A., Grodsky, G.M., 2002. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev.* 23, 599-622.
- Fu, H., Yang L, Yuan, H., Rao, P., Lo, Y.M., 2008. Assessment of trans fatty acids content in popular Western-style products in China. *J Food Sci.* 2008. 73, 383-391.
- Geelen, M.J., 1994. Medium-chain fatty acids as short-term regulators of hepatic lipogenesis. *Biochem J.* 302, 141-146.

- Green, R.M., Flamm, S., 2002. AGA technical review on the evaluation of liver chemistry tests. *Gastroenterology*. 123, 1367-1384.
- Han, S.N., Leka, L.S., Lichtenstein, A.H., Ausman, L.M., Schaefer, E.J., Meydani, S.N., 2002. Effect of hydrogenated and saturated, relative to polyunsaturated, fat on immune and inflammatory responses of adults with moderate hypercholesterolemia. *J Lipid Res*. 43, 445-452.
- 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.
- Holt, M.P., Ju, C., 2006. Mechanisms of drug-induced liver injury. *AAPS J*. 8, 48-54.
- Hosogai, N., Fukuhara, A., Oshima, K., Miyata, Y., Tanaka, S., Segawa, K., Furukawa, S., Tochino, Y., Komuro, R., Matsuda, M., Shimomura, I., 2007. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes*. 56, 901-911.
- Hu, F.B., Manson, J.E., Willett, W.C., 2001. Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a critical review. *J Am Coll Nutr*. 20, 5-19.
- HuangR, C.J., Lin, C.Y., Haataja, L., Gurlo, T., Butler, A.E., Rizza, R.A., Butler, P.C., 2007. High Expression Rates of Human Islet Amyloid Polypeptide Induce Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated β -Cell Apoptosis, a Characteristic of Humans With Type 2 but Not Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 56, 2016-2027.
- Ibrahim, A., Natrajan, S., Ghafoorunissa, R., 2005. Dietary trans fatty acid alter adipocyte plasma membrane fatty acid composition and insulin sensitivity in rats. *Metabolism*. 54, 240-246.
- Jay, D., Hitomi, H., Griendling, K.K., 2006. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complication. *Free Radic Biol Med*. 40, 183-192.
- Kalupahana, N.S., Moustaid-Moussa N, Claycombe KJ. 2012. Immunity as a link between obesity and insulin resistance. *Mol Aspects Med*. 33, 26-34.
- Kavanagh, K., Jones, K.L., Sawyer, J., Kelley, K., Carr, J.J., Wagner, J.D., Rudel, L.L., 2007. Trans fat diet induces abdominal obesity and changes in insulin sensitivity in monkeys. *Obesity (Silver Spring)*. 15, 1675-1684.
- Khan, H.B., Vinayagam, K.S., Moorthy, B.T., Palanivelu, S., Panchanatham, S., 2012. Anti-inflammatory and anti-hyperlipidemic effect of *Semecarpus anacardium* in a

- High fat diet: STZ-induced Type 2 diabetic rat model. *Inflammopharmacology*. Jan 25. [Epub ahead of print]
- King, G.L., 2008. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *J Periodontol*. 79, 1527-34.
- Koppe, S.W., Elias, M., Moseley, R.H., Green, R.M., 2009. Trans fat feeding results in higher serum alanine aminotransferase and increased insulin resistance compared with a standard murine high-fat diet. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 297, 378-384.
- Król, E., Krejpcio, Z., 2011. Evaluation of anti-diabetic potential of chromium(III) propionate complex in high-fat diet fed and STZ injected rats. *Food Chem Toxicol*. 49, 3217-3223.
- Kummerow, F.A., 2009. The negative effects of hydrogenated trans fats and what to do about them. *Atherosclerosis*. 205, 458-465.
- Kunjathoor, V.V., Wilson, D.L., LeBoeuf, R.C., 1996. Increased atherosclerosis in streptozotocin-induced diabetic mice. *J Clin Invest*. 97, 1767-1773.
- Lagathu, C., Bastard, J.P., Auclair, M., Maachi, M., Capeau, J., Caron, M., 2003. Chronic interleukin-6 (IL-6) treatment increased IL-6 secretion and induced insulin resistance in adipocyte: prevention by rosiglitazone. *Biochem Biophys Res Commun*. 311, 372-379.
- Lagathu, C., Yvan-Charvet, L., Bastard, J.P., Maachi, M., Quignard-Boulangé, A., Capeau, J., Caron, M., 2006. Long-term treatment with interleukin-1beta induces insulin resistance in murine and human adipocytes. *Diabetologia*. 49, 2162-2173.
- Landon, M.B., Gabbe, S.G., 2011. Gestational Diabetes Mellitus. *Obstet Gynecol*. 118,1379-1393.
- Lee, T.S., Saltsman, K.A., Ohashi, H., King, G.L., 1989. Activation of protein kinase C by elevation of glucose concentration: proposal for a mechanism in the development of diabetic vascular complications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86, 5141-5145.
- Leyton J, Drury PJ, Crawford MA. 1987. Differential oxidation of saturated and unsaturated fatty acids in vivo in the rat. *Br J Nutr*. 57, 383-393.
- Lichtenstein, A.H., Ausman, L.M., Jalbert, S.M., Schaefer, E.J., 1999. Effects of different

- forms of dietary hydrogenated fats on serum lipoprotein cholesterol levels. *N Engl J Med.* 340, 1933-1940.
- Lo, L., McLennan, S.V., Williams, P.F., Bonner, J., Chowdhury, S., McCaughan, G.W., Gorrell, M.D., Yue, D.K., Twigg, S.M., 2011. Diabetes is a progression factor for hepatic fibrosis in a high fat fed mouse obesity model of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol.* 55, 435-444.
- Lusis, M.J., Mar, R., Pajukanta, I., 2004. Genetics of atherosclerosis. *Annu Rev Genom Hum G.* 5, 189-218.
- Matthan, N.R., Welty, F.K., Barrett, P.H., Harausz, C., Dolnikowski, G.G., Parks, J.S., Eckel, R.H., Schaefer, E.J., Lichtenstein, A.H., 2004. Dietary hydrogenated fat increases high-density lipoprotein apoA-I catabolism and decreases low-density lipoprotein apoB-100 catabolism in hypercholesterolemic women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24, 1092-1097.
- Mauger, J.F., Lichtenstein, A.H., Ausman, L.M., Jalbert, S.M., Jauhiainen, M., Ehnholm, C., Lamarche, B., 2003. Effect of different forms of dietary hydrogenated fats on LDL particle size. *Am J Clin Nutr.* 78, 370-375.
- Mendis, S., Cruz-Hernandez, C., Ratnayake, W.M., 2008. Fatty acid profile of Canadian dairy products with special attention to the trans-octadecenoic acid and conjugated linoleic acid isomers. *J AOAC Int.* 91, 811-819.
- Mensink, R.P., Katan, M.B. 1990. Effect of dietary trans fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. *N Engl J Med.* 323, 439-445.
- Mitmesser, S.H., Carr, T.P., 2005. Trans fatty acids alter the lipid composition and size of apoB-100-containing lipoproteins secreted by HepG2 cells. *J Nutr Biochem.* 16, 178-183.
- Mooradian, A.D., 2009. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 5, 150-159.
- Mozaffarian, D., Pischon, T., Hankinson, S.E., Rifai, N., Joshipura, K., Willett, W.C., Rimm, E.B., 2004 Dietary intake of trans fatty acids and systemic inflammation in women. *Am J Clin Nutr.* 79, 606-612.
- Mozaffarian, D., Katan, M.B., Ascherio, A., Stampfer, M.J., Willett, W.C., 2006. Trans

- fatty acids and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 354, 1601-1613.
- Regulska-How, B., How, R., Biernat, J., 2001. Changes in fats during conventional and microwave banking of cakes. *Bromat Chem.* 34, 99-104.
- Ritz, E., Orth, S.R., 1999. Nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 341, 1127-1133.
- Sahin, K., Onderci, M., Tuzcu, M., Ustundag, B., Cikim, G., Ozercan, I.H., Sriramoju, V., Juturu, V., Komorowski, J.R., 2007. Effect of chromium on carbohydrate and lipid metabolism in a rat model of type 2 diabetes mellitus: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism.* 56, 1233-1240.
- Samuelson, G., Bratteby, L.E., 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.
- Saravanan, N., Haseeb, A., Ehtesham, N.Z., Ghafoorunissa., 2005. Differential effects of dietary saturated and trans-fatty acids on expression of genes associated with insulin sensitivity in rat adipose tissue. *Eur J Endocrinol.* 153, 159-165.
- Schenk, S., Saberi, M., Olefsky, J.M., 2008. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest.* 118, 2992-3002.
- Semenkovich, C.F., Heinecke, J.W., 1997. The mystery of diabetes and atherosclerosis: time for a new plot. *Diabetes.* 46, 327-334.
- Semenkovich, C.F., 2006. Insulin resistance and atherosclerosis. *J Clin Invest.* 116, 1813-1822.
- Sharma, S., Kulkarni, S.K., Chopra, K., 2006. Curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*), ameliorates diabetic nephropathy in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 33, 940-945.
- Shoelson, S.E., Herrero, L., Naaz, A., 2007. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology.* 132, 2169-2180.
- Soskolne, W.A., Klinger, A., 2001. The relationship between periodontal diseases and diabetes: an overview. *Ann Periodontol.* 6, 91-98.
- Srinivasan, K., Viswanad, B., Asrat, L., Kaul, C.L., Ramarao, P., 2005. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2

- diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res.* 52, 313-320.
- Stampfer, M.J., Sacks, F.M., Salvini, S., Willett, W.C., Hennekens, C.H., 1991. A prospective study of cholesterol, apolipoproteins, and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med.* 325, 373-381.
- Tai, T.Y., Chuang, L.M., Wu, H.P., Chen, C.J., 1992. Association of body build with non-dependent diabetes mellitus and hypertension among Chinese adults: a 4-year follow-up study. *In J Epidemiol.* 21, 511-517.
- Thompson, A.K., Minihane, A.M., Williams, C.M., 2011. Trans fatty acids and weight gain. *Int J Obes (Lond)* 35, 315-324.
- Tsuzuki, W., Matsuoka, A., Ushida, K., 2010. Formation of trans fatty acids in edible oils during the frying and heating process. *Food Chemistry.* 123, 976-982.
- USDA., HHS., 2010. *Dietary Guidelines for Americans.*
- Van Snick, J., 1990. Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol.* 8, 253-278.
- Walsh, B.A., Mullick, A.E., Walzem, R.L., Rutledge, J.C., 1999. 17 beta-estradiol reduces tumor necrosis factor-alpha-mediated LDL accumulation in the artery wall. *J Lipid Res.* 40, 387-396.
- Wang, B., Wood, I.S., Trayhurn, P., 2007. Dysregulation of the expression and secretion of inflammation-related adipokines by hypoxia in human adipocytes. *Pflugers Arch.* 455, 479-492.
- Winkler, G., Lakatos, P., Salamon, F., Nagy, Z., Speer, G., Kovacs, M., Harnos, G., Dworak, O., Cseh, K., 1999. Elevated serum TNF-alpha level as a link between endothelial dysfunction and insulin resistance in normotensive obese patients. *Diabet Med.* 16, 207-211.
- Yorek, M.A., 2003. The role of oxidative stress in diabetic vascular and neural disease. *Free Radic Res.* 37, 471-480.
- Younossi, Z.M., Gramlich, T., Matteoni, C.A., Boparai, N., McCullough, A.J., 2004. Nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2, 262-265.
- Zafar, M., Naeem-ul-hassan naqvi, S., Ahmed, M., Kaimkhani, Z. A., 2009. Altered liver morphology and enzymes in streptozotocin induced diabetic rats. *Int. J. Morphol.*

27, 719-725.

Żbikowska, A., Kowalska, M., 2007. Influence of trans unsaturated fatty acid content on chemical changes in the shortening during baking and storage of cakes. *Pol J Food Nutr Sci.* 57, 451-455.

Zhang, M., Lv, X.Y., Li, J., Xu, Z.G., Chen, L., 2008. The characterization of high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model. *Exp Diabetes Res.* 704045-704054.

