

中國醫藥大學營養學系碩士班  
碩士論文

高油飲食或糖水誘發代謝症候群之作用及  
機制探討

**The inducing effect and action  
mechanism of a high fat diet and the  
sucrose-containing drinking water on  
metabolic syndrome**

研究生：陳姘君 撰 Gou - Chun Chen

指導教授：趙蓓敏 博士 Pei - Min Chao, Ph. D

中華民國九十七年五月

May, 2008

## 目 錄

---

縮寫對照表.....	I
組別縮寫意.....	III
摘要.....	IV
Abstract.....	V II
第一章 前言.....	1
第二章 文獻回顧.....	2
一、代謝症候群定義與盛行率.....	2
(一) 代謝症候群之定義.....	2
(二) 代謝症候群之判定.....	2
(三) 代謝症候群在台灣之判定標準與盛行率.....	3
二、代謝症候群的發生.....	5
(一) 胰島素訊息傳遞與胰島素阻抗.....	6
(二) 脂肪細胞激素與代謝症候群之關聯.....	7
1. leptin.....	7
2. adiponectin.....	8
3.resistin.....	8
4. TNF- $\alpha$ .....	9
5. IL-6.....	9
6. PAI-1.....	10
三、高糖（蔗糖）、高脂（飽和油脂）飲食與代謝症候群之相關性...10	
(一) 飲食誘發代謝症候群實驗動物模式.....	10
(二) 蔗糖(或其中果糖)引發代謝症候群的生化與分子機制.....	11
(三) 高油脂(飽和脂肪酸)引發代謝症候群的生化與分子機制.....	12

四、肝中脂質生合成之轉錄調控.....	13
(一) SREBP-1c與ChREBP轉錄因子.....	13
(二) 肝中SREBP-1c、ChREBP與胰島素敏感性.....	14
五、Paternally expressed 1(Peg1)/mesoderm specific transcript (Mest) 與肥胖之相關性.....	15
第三章 材料與方法.....	17
一、動物飼養.....	18
二、飼料配製.....	18
三、動物犧牲與樣品收集.....	20
四、禁食血清脂質分析.....	20
(一) 三酸甘油酯含量測定.....	20
(二) 膽固醇含量測定.....	21
五、肝臟、肌肉脂質分析.....	23
(一) 均質液製備.....	23
(二) 三酸甘油酯含量測定.....	23
(三) 膽固醇含量測定.....	24
六、禁食全血與血清葡萄糖含量分析.....	24
(一) 全血葡萄糖含量測定.....	24
(二) 血清葡萄糖含量測定.....	24
七、口服葡萄糖耐受測試 Oral Glucose Tolerance Test (OGTT).....	25
八、胰島素耐受測試 Insulin Tolerance Test (ITT).....	26
九、禁食血清胰島素含量測定.....	26
十、禁食血清瘦素含量測定.....	27
十一、禁食血清 adiponectin 含量測定.....	29
十二、禁食血清尿酸測定.....	30
十三、西方點墨法(Western blot)分析肝臟 SREBP-1c、ChREBP 蛋白質表現.....	31

十四、脂肪組織包埋切片.....	32
十五、Real-time PCR 分析肝臟、副睪脂 (EP) mRNA 含量.....	34
十六、統計分析.....	41
第四章 結果.....	42
第五章 討論.....	92
第六章 結論.....	102
第七章 參考文獻.....	104



## 表 目 錄

表 2-1 台灣代謝症候群之判定標準.....	3
表 2-2 台灣代謝症候群及組成因子盛行率.....	4
表 2-3 92 年國人代謝症候群相關疾病醫療費用.....	5
表 3-1 高脂飼料組成 .....	19
表 4-1 四組大鼠之攝食、飲水和能量攝取.....	50
表 4-2 大鼠餵食試驗飲食 5 個月之初、終體重及體重增加量.....	51
表 4-3 大鼠轉換正常飲食四週之初、終體重及體重增加量.....	52
表 4-4 大鼠餵食試驗飲食 5 個月之絕對與相對組織重.....	53
表 4-5 大鼠餵食試驗飲食 5 個月之肝臟、肌肉內脂質含量.....	63
表 4-6 大鼠餵食試驗飲食 5 個月之肝臟和脂肪組織內基因表現量.....	76
表 4-7 四組小鼠之攝食、飲水和能量攝取.....	77
表 4-8 小鼠餵食試驗飲食 5 個月之初、終體重及體重增加量.....	78
表 4-9 小鼠餵食試驗飲食 5 個月之絕對與相對組織重.....	79
表 4-10 小鼠餵食試驗飲食 5 個月之肝臟、肌肉內脂質含量.....	84
表 4-11 小鼠餵食試驗飲食 5 個月之肝臟和脂肪組織內基因表現量.....	91
表 5-1 大、小鼠餵食試驗飲食 5 個月誘發之代謝症候群症狀.....	100

## 圖目錄

圖 2-1 lipotoxicity 造成脂質異常累積.....	6
圖 2-2 高果糖的與代謝症候群之相關性.....	13
圖 2-3 SREBP-1c、ChREBP 在肝中調控脂質生合成基因.....	15
圖 3-1 高油飲食、糖水或兩者同時給予之下誘發代謝症候群模式.....	17
圖 4-1 大鼠餵食試驗飲食第 1、2 和 5 個月時禁食血清 Leptin .....	54
圖 4-2 大鼠轉換正常飲食四週之禁食血清 Leptin .....	55
圖 4-3 大鼠餵食試驗飲食第 5 個月時禁食血清 Adiponectin.....	56
圖 4-4 大鼠轉換正常飲食四週之禁食血清 Adiponectin.....	57
圖 4-5 大鼠餵食試驗飲食第 5 個月時禁食血清 Uric acid .....	58
圖 4-6 大鼠餵食試驗飲食第 0、1、2 和 5 個月時禁食 Triglyceride.....	59
圖 4-7 大鼠轉換正常飲食四週之禁食血清 Triglyceride.....	60
圖 4-8 大鼠餵食試驗飲食第 0、1、2 和 5 個月時禁食血清 Cholesterol .....	61
圖 4-9 大鼠轉換正常飲食四週之禁食血清 Cholesterol.....	62
圖 4-10 大鼠餵食試驗飲食第 0、1、2 和 5 個月時禁食血清葡萄糖.....	64
圖 4-11 大鼠轉換正常飲食四週之禁食血清葡萄糖.....	65
圖 4-12 大鼠餵食試驗飲食第 1 和 5 個月時禁食血清胰島素.....	66
圖 4-13 大鼠轉換正常飲食四週之禁食血清胰島素.....	67
圖 4-14 大鼠餵食試驗飲食第 5 個月時葡萄糖耐量試驗.....	68
圖 4-15 大鼠餵食試驗飲食第 5 個月時葡萄糖耐量試驗(OGTT)葡萄糖曲線下面 積.....	69
圖 4-16 大鼠餵食試驗飲食第 5 個月時胰島素耐量試驗.....	70
圖 4-17 大鼠餵食試驗飲食第 5 個月時胰島素耐量試驗(ITT)葡萄糖曲線下面積...71	
圖 4-18 大鼠餵食試驗飲食 5 個月之收縮壓 (Systolic)、舒張壓 (Diastolic) 和脈搏 (Pulse) .....	72
圖 4-19 以 Western bolt 分析大鼠餵食試驗飲食 5 個月之肝臟 mature (68 kD)/ immature (128 kD) SREBP-1c 蛋白質表現量.....	73

圖 4-20 以 Western bolt 定量分析大鼠餵食試驗飲食 5 個月之肝臟 nuclear / cytosol ChREBP 蛋白質表現量.....	74
圖 4-21 大鼠餵食試驗飲食 5 個月之腹膜後脂肪組織切片與脂肪細胞平均直徑...	75
圖 4-22 小鼠餵食試驗飲食第 5 個月時禁食血清 Leptin.....	80
圖 4-23 小鼠餵食試驗飲食第 5 個月時禁食血清 Adiponectin.....	81
圖 4-24 小鼠餵食試驗飲食第 0、1、2 和 5 個月時禁食血清 Triglyceride (TG) ..	82
圖 4-25 小鼠餵食試驗飲食第 0、1、2 和 5 個月時禁食血 Cholesterol (TC) ...	83
圖 4-26 小鼠餵食試驗第 0、1、2 和 5 個月時禁食血清葡萄糖.....	85
圖 4-27 小鼠餵食試驗第 5 個月時禁食血清胰島素.....	86
圖 4-28 小鼠餵食試驗飲食第 5 個月時葡萄糖耐量試驗.....	87
圖 4-29 小鼠餵食試驗飲食第 5 個月時葡萄糖耐量試驗 (OGTT) 葡萄糖曲線下面積.....	88
圖 4-30 小鼠餵食試驗飲食第 5 個月時胰島素耐量試驗.....	89
圖 4-31 小鼠餵食試驗飲食第 5 個月時胰島素耐量試驗(ITT)葡萄糖曲線下面積..	90
圖 5-1 大鼠餵食試驗飲食 5 個月之肝臟 ACC 蛋白質活性.....	101

## 縮寫對照表

縮 寫	全 名
ACC	Acetyl - CoA carboxylase
AMPK	AMP - activated protein kinase
ACO	Acyl CoA oxidase
ApoB	Apolipoprotein B
BP	Blood pressure
bHLH	Basic helix-loop-helix
cAMP	3' - 5'- Cyclic adenosine monophosphate
ChREBP	Carbohydrate response element binding protein
CPT - 1	Carnitine palmitoyltransferase - 1
DBP	Diastolic blood pressure
DAG	Diacylglycerol
FG	Fasting glucose
FAS	Fatty acid synthase
GK	Glucokinase
HDL	High density lipoprotein
IDF	International Diabetes Federation
IL-6	Interleukin -6
IRS	Insulin receptor substrates
ITT	Insulin tolerance Test
Mest	Mesoderm specific transcript
NCEP - ATP - III	National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel - III
OGTT	Oral glucose tolerance test
PKC	Protein kinase C
PTP-1B	Protein tyrosine phosphatase 1B
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PPAR- $\alpha$	Peroxisome proliferator activated receptor- $\alpha$
Peg1	Paternally expressed 1
PEPCK	Phosphoenolpyruvate carboxykinase



<b>SBP</b>	<b>Systolic blood pressure</b>
<b>SREBP-1c</b>	<b>Sterol regulatory element binding protein - 1c</b>
<b>TG</b>	<b>Triglyceride</b>
<b>TC</b>	<b>Total cholesterol</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>Tumor necrosis factor -<math>\alpha</math></b>
<b><u>VLDL</u></b>	<b><u>Very low density lipoprotein</u></b>

---



組別縮寫意義

<u>組別縮寫</u>	<u>縮寫意義</u>
LF	Low fat control diet (chow diet + plane water)
HF	High fat diet ( 30% butter oil + Plane water)
SW	chow diet + 30% sucrose containing water
<u>HF + SW</u>	<u>high fat diet + sucrose containing water</u>



# 高油飲食或糖水誘發代謝症候群之作用及機制探討

中國醫藥大學營養學系碩士班 陳姩君

## 摘要

代謝症候群 (Metabolic syndrome) 是全球普遍文明病，國人由於飲食西化，攝取過多高油食物及含糖飲料，再加上缺乏運動等因素，發生率逐年增加。本論文研究的目的是以動物模式比較高油飲食或/和糖水的攝食誘發代謝症候群之效果，並探討其可能作用之分子機制。實驗使用 C57BL/6J mice 及 Wistar rats，分別給予 30% 奶油之高油飼料 (HF; high fat diet + plane water)、30% 蔗糖糖水 (SW; chow diet + sucrose water) 或兩種同時給予 (HF + SW; high fat diet + sucrose water) 誘發出現代謝症候群症狀，另以接受正常飲食及飲水老鼠 (LF; chow diet + plane water) 做對照，飼養 21 週，比較 2 種變因(高油飲食或糖水)誘發之效果；另外在大鼠飼養第 17 週時將三組誘導組半數轉為正常飲食 (HF/C、HF+SW/C、SW/C)，為期四週，期望飲食的轉換可改善代謝症候群的症狀。

在評估代謝症候群症狀方面以體重及腹部脂肪堆積作為肥胖(特別是中央型肥胖)指標；以血糖、血清胰島素、oral glucose tolerance test (OGTT) 及 insulin tolerance test (ITT) 血糖變化評估是否胰島素阻抗；並量測血脂質 (Triglyceride; TG 及 Cholesterol; TC) 及血壓。另測量腹部脂肪細胞大小及血液脂肪細胞激素(包括 leptin、adiponectin) 濃度、肝臟與肌肉內脂質堆積、肝臟脂質代謝相關基因表現及脂肪組織 adipocytokines 基因表現。在大鼠肝臟並量測負責調控脂質生合成與糖解相關基因的轉錄因子--sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1c 與 carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) 蛋白質在細胞核/細胞質分布。

結果顯示在大鼠方面，三組誘導組體重、體脂堆積及脂肪細胞直徑皆顯著大於 LF ( $P < 0.0001$ )；HF+SW 與 SW 組的血清 Leptin 顯著高於 LF 組 ( $P < 0.0001$ )；SW

的血清 Uric acid 顯著高於 LF 組( $P < 0.005$ )；三組誘導組肝臟 TG 與 TC 均顯著高於 LF ( $P < 0.0001$ )；HF+SW 與 SW 肌肉內 TG 顯著高於 LF ( $P < 0.05$ )；SW 組的血清 TC 及 SW 與 HF+SW 組的血清 TG 顯著高於 LF 組( $P < 0.0001$ )；三組誘導組皆呈現高胰島素血症( $P < 0.05$ )，SW 組禁食血糖顯著高於 LF 組( $P < 0.05$ )；在 OGTT 與 ITT 可發現 SW 組血糖值高於 LF ( $P < 0.05$ )；收縮壓方面 HF+SW 顯著高於 LF ( $P < 0.005$ )，舒張壓方面 HF+SW 和 SW 皆顯著高於 LF ( $P < 0.05$ )；SREBP-1c、ChREBP 蛋白質 nuclear/cytosol 比例，SW 皆顯著高於 LF( $P < 0.08$ )；肝臟 fatty acid synthase(FAS)mRNA 量四組無顯著差異，但 SW 組有較高趨勢；Glucokinase(GK) mRNA 表現量在 HF+SW 顯著高於其它三組( $P < 0.08$ )；脂肪組織中 Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 與 resistin mRNA 在 HF 組皆顯著高於 LF( $P < 0.05$ )。Two-way ANOVA 顯示糖水因子對大鼠的體重增加、體脂堆積、肝脂堆積、肌肉內脂質堆積、高 Leptin 血症、高尿酸血症、血脂、血糖、胰島素及血壓有顯著作用，而高油因子僅對體重增加、體脂堆積、肝脂堆積及禁食血漿胰島素有顯著作用。

誘導組在為期四週飲食轉換後，各指標呈現不等程度改善：HF/C 的皮下脂肪、肝臟 TC、肝臟 GK mRNA 量、脂肪組織 TNF- $\alpha$ 、resistin、Plasminogen activated inhibitor-1 (PAI-1)、leptin mRNA 量皆顯著性低於 HF( $P=0.084$ ， $< 0.05$ ， $< 0.08$ ， $< 0.05$ ， $< 0.05$ ， $< 0.05$ ， $< 0.05$ )，HF+SW/C 的皮下脂肪、血清 Leptin 與 TG 顯著性低於 HF+SW( $P=0.0564$ ， $< 0.05$ ， $< 0.05$ )，SW/C 的血清 TG 與肝臟 FAS、GK mRNA 量顯著性低於 SW( $P < 0.05$  與  $< 0.05$ 、 $0.05$ )。

在小鼠方面，三組誘導組的體重、體脂及血清 Leptin 顯著高於 LF 組( $P < 0.0001$ )；SW 和 HF+SW 肝中 TG 含量顯著高於 LF( $P < 0.05$ )，HF 和 HF+SW 肝中 TC 含量顯著高於 LF ( $P < 0.05$ )；三組誘導組的血清 TC 及 TG 顯著高於 LF 組( $P < 0.0001$  與  $0.05$ )，HF 與 HF+SW 呈現高胰島素血症 ( $P < 0.05$ )，HF 組不但出現高血糖，且 OGTT 及 ITT 血糖變化顯著高於它組( $P < 0.0001$ ， $< 0.0001$ ， $< 0.05$ )；肝臟 carnitine palmitoyl CoA transferase 1 mRNA 量在 HF 與 HF+SW 顯著高於 LF ( $P < 0.0001$ )，acyl CoA oxidase 與 phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA 量 HF 顯著高於 LF( $P < 0.05$ )；脂肪組織中 TNF- $\alpha$ 、resistin mRNA 量在誘導組與對照組雖沒有顯著的差異但有高於對照組的趨勢，Leptin mRNA 量在三組誘導組皆顯著高於對照組( $P$

$<0.0001$ )，PAI-1 基因表現量在 HF 與 SW 顯著高於對照組( $P < 0.05$ )；HF 的 mesoderm specific transcript mRNA 量顯著高於 LF( $P < 0.0005$ )。Two-way ANOVA 顯示糖水因子對體重增加、體脂堆積、血脂有顯著上升作用，而高油因子則對體重增加、體脂堆積、肌肉內脂質堆積、高 Leptin 血症、血脂、血糖及血清胰島素均有顯著作用。總括以上的結果顯示高油或糖水飲食在大、小鼠分別有不同效果，在大鼠糖水誘發代謝症候群效果較佳，而小鼠則是對高油飲食較敏感。而在大鼠中也可看到代謝症候群因飲食的誘發也可因飲食的修正而得到改善。未來若要建立代謝症候群的動物模式應用於健康食品開發，Wistar 大鼠適合以糖水誘發，C57BL/6J 小鼠適合以高油飲食誘發。本研究也證實含糖飲料的攝取如同高油食物的確會增加代謝症候群之危險，近年國內杯裝飲料市場大幅成長，消費人口快速增加，其背後潛在的國民健康問題值得注意。

關鍵字：代謝症候群、高油飲食、蔗糖糖水



# **The inducing effect and action mechanism of a high fat diet and the sucrose-containing drinking water on metabolic syndrome**

**Gou - Chun Chen**

## **Abstract**

Metabolic syndrome is a global healthy problem with a soaring morbidity. In Taiwan, a dietary pattern change with an increased high fat diet or/and sucrose-sweetened beverage consumption, accompanies with an absence of exercise are considered to be the risk factors of metabolic syndrome. This study was designed to compare the effect of a high fat diet or / and sucrose-containing drinking water on inducing metabolic syndrome and the possible molecular mechanisms involved were also studied. Male C57BL6J mice and Wistar rats were each divided into one control (chow diet; LF) and three inducing groups, including HF, SW and HF+SW, to receive a 30% butter-containing diet, 30% sucrose in drinking water, or both, respectively. After 21 wks, the dietary effects of a high fat diet and the sucrose-containing drinking water were compared among the four groups. For evaluating if it is reversible for diet-induced-metabolic syndrome, half of rats in the three inducing groups were shifted to a control diet (HF/C, HF+SW/C, SW/C) at 17 wks. After 4 wks, the metabolic sequela was compared with HF, HF+SW and SW, respectively.

For assessing metabolic syndrome, body weight and visceral fat accumulation were used as an indicator of obesity, especially for central obesity. Fasting serum glucose and insulin, oral glucose tolerance (OGTT) and insulin tolerance test (ITT) were used as an indicator of insulin resistance. Serum lipid levels including triglyceride and cholesterol and blood pressure were also measured. For exploring the possible mechanism for diet-induced metabolic syndrome, adipocyte size in visceral fat, serum levels of adipocytokines (leptin and adiponectin), lipid accumulation in liver and muscle and the expression levels of genes participating in lipid metabolism in liver and as adipocytokines in adipose tissue were all measured.

The nuclear/cytosol distribution of sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1c and carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) proteins were also measured since the two transcription factors play an important role in regulating the lipogenic genes and glycolytic genes expression.

In Wistar rats, results showed the body weight gain, adiposity and the average diameter of adipocyte in three inducing groups were significantly higher than those in the LF group ( $P < 0.0001$ ). The HF+SW and SW groups had a significantly higher serum leptin level than the LF group ( $P < 0.0001$ ). The serum uric acid in SW group was significantly higher than that in the LF group ( $P < 0.005$ ). The TG and TC concentrations in liver of three inducing groups ( $P < 0.0001$ ) and the TG concentration in muscle of the HF+SW and SW groups ( $P < 0.05$ ) were all significantly higher than those in the LF group. As compared with the LF group, the serum TC level in SW group and the serum TG level in SW and HF+SW groups were significantly increased ( $P < 0.0001$ ). Hyperinsulinemia and hyperglycemia were happened in the three inducing groups and in the SW group, respectively. During the 2 hr period of OGTT and ITT, significantly higher serum glucose levels were observed in the SW group as compared with the LF group ( $P < 0.05$ ). The systolic blood pressure in HF+SW group ( $P < 0.005$ ) and the diastolic blood pressure ( $P < 0.05$ ) in HF+SW and SW groups were significantly higher than those in the LF group. The nuclear / cytosol ratios for SREBP-1c and ChREBP in SW group was significantly higher than that in the LF group ( $P < 0.08$ ). For gene expression levels in liver, a higher mRNA level of the fatty acid synthase (FAS) in the SW group was observed, though the difference didn't reach a statistical significance. The glucokinase (GK) in the HF+SW group was significantly higher than in the other groups ( $P < 0.08$ ). For gene expression levels in adipose tissue, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and resistin mRNA levels in the HF group were significantly higher than those in the LF group ( $P < 0.05$ ). Two-way ANOVA showed, the sucrose-containing drinking water has significant effects on body weight gains, adiposity, lipid accumulation in liver and muscle, serum levels of leptin, uric acid,

lipids, glucose and insulin. However, the high fat dietary factor only showed significant effects on body weight gains, adiposity, liver lipid accumulation and fasting serum insulin.

After shifting to a control diet for 4wk in inducing groups, most of the unfavorable effects were alleviated with different degrees by this dietary modification. The subcutaneous fat mass, TC concentration in liver, the mRNA levels of GK in liver and TNF- $\alpha$ , resistin, plasminogen activated inhibitor-1 (PAI-1) and leptin in adipose tissue were significantly reduced in the HF/C group as compared with the HF group ( $P=0.084$  ,  $<0.05$  ,  $<0.08$  ,  $<0.05$  ,  $<0.05$  ,  $<0.05$  ,  $<0.05$ ). The subcutaneous fat mass, serum leptin and TG concentrations was significantly reduced in the HF+SW/C group as compared with the HF+SW group ( $P=0.0564$  ,  $<0.05$  ,  $<0.05$ ). The serum level of TG and mRNA levels of FAS and GK in liver was significantly reduced in the SW/C group as compared with the SW group ( $P<0.05$  and  $<0.05$ ,  $0.05$ ).

In C57BL/6J mice, as compared with the LF group, the body weight gains, adiposity and serum leptin level in three inducing groups were significantly increased ( $P<0.0001$ ). The liver TG concentration in the SW and HF+SW groups and the TC concentration in HF and HF+SW groups were significantly higher than those in the LF group ( $P<0.05$ ). The hyperlipidemia (including TC and TG) was observed in the three inducing groups ( $P<0.0001$  and  $<0.05$ ) and the hyperinsulinemia was observed in the HF and HF+SW groups ( $P<0.05$ ). The HF group showed not only a hyperglycemia ( $P<0.0001$ ), but also a significantly higher serum glucose levels during the 2hr period of OGTT and ITT as compared with the other groups ( $P<0.0001$  and  $<0.05$ , respectively) . The mRNA levels of the carnitine palmitoyl CoA transferase 1 in liver of the HF and HF+SW groups ( $P<0.0001$ ) and the acyl CoA oxidase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in liver of the HF group ( $P<0.05$ ) were all significantly higher than those in the LF group. In adipose tissue, a higher trend of mRNA level of TNF- $\alpha$  and resistin in the three inducing groups was observed, though the differences didn't reach a statistically



significant level. The mRNA levels of the leptin in the three inducing groups ( $P < 0.0001$ ) and the PAI-1 in the HF and SW groups ( $P < 0.05$ ) were significantly higher than those in the LF group. The mesoderm specific transcript mRNA level in adipose tissue of the HF group was significantly higher than that in the LF group ( $P < 0.0005$ ). Two-way ANOVA showed, the sucrose-containing drinking water has significant effects on body weight gains, adiposity and serum lipids. However, a high fat diet has significant effects on body weight gains, adiposity, lipid accumulation in liver and muscle, serum levels of leptin, lipids, glucose and insulin. From those results, we concluded that a high fat diet and the sucrose-containing drinking water both can induce metabolic syndrome, though with different effects on rats and mice. The Wistar rats are prone to the sucrose water-induced metabolic syndrome, and the C57BL/6J mice are prone to a high fat diet-induced metabolic syndrome. As indicated by the results of dietary shift in rats, the metabolic syndrome induced by dietary factors can be reversed by dietary modulations.

**Key Words :** Metabolic syndrome · High fat diet · Sucrose-containing water

## 第一章 前言

由於現代人飲食不正常，攝取過多熱量（高油脂食物、含糖飲料），引起肥胖，再加上生活不規律、缺乏運動等因素，造就了現代人的文明病--代謝症候群 (Metabolic syndrome)，以往代謝症候群出現在較高的年齡層，但隨著飲食西化變遷，較低的年齡層也可能發生。代謝症候群主要是指腹部肥胖、高胰島素血症、高血壓及血脂異常多種特徵共存於一人身上，使其罹患動脈粥狀硬化心血管疾病與第 2 型糖尿病的風險特高。目前國民健康局 91 年公告國人代謝症候群盛行率：15 歲以上為 14.99%（男 16.9%，女 13.8%），且隨年齡上升而有增加的趨勢。又據衛生署統計顯示，代謝症候群所衍生之腦血管疾病、心臟病、糖尿病、高血壓等慢性疾病，皆年居台灣十大死因榜中，此現象也造就了國家對於醫療保健費用龐大的支出，因此如何預防代謝症候群已成為我國及世界之新興重要公共衛生議題。雖然高油脂食物與含糖飲料常被歸咎是現代飲食造成肥胖及慢性病禍首，但這兩種不良飲食型態單獨或合併存在引發代謝症候群之後果從未被比較並深入研究。因此本論文的目的在比較高油飲食或糖水誘發代謝症候群之作用及機制探討，此研究成果不僅有助建立代謝症候群的動物模式應用於健康食品開發，也對未來飲食政策推動提供可參考的科學佐證。

## 第二章 文獻回顧

### 一、代謝症候群定義與盛行率

#### (一) 代謝症候群之定義

1923年，代謝症候群最早被敘述為包括有高血壓(Hypertension)、高血糖(Hyperglycaemia)和高尿酸血症(Hyperuricaemia)的症候群。在1947年的研究指出腹部肥胖(Abdominal obesity)和脂質分佈與糖尿病及其他疾病的相關性；接著在1965年再次敘述到此症候群是含有高血壓、高血糖以及肥胖的症候群。Reaven於1988年將腹部肥胖、高胰島素血症(Hyperinsulinemia)、高三酸甘油酯血症(Hypertriglyceridemia)、高血壓以及Low - HDL - cholesterol，這一群對糖尿病和心血管疾病的危險因子命名為Syndrome X，並指出代謝症候群主因是與胰島素抗性有關(1)。也有其它學者將其命名為The Deadly Quartet (2)以及The Insulin Resistance Syndrome (3)。

#### (二) 代謝症候群之判定方法

根據2001美國國家膽固醇教育計畫 National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel - III (NCEP - ATP - III) 主要針對心血管疾病的危險所建立的判斷標準，建立造成代謝症候群五種危險因子：(I) 腹部肥胖，男性腰圍大於102 cm和女性腰圍大於88 cm；(II) 血中三酸甘油酯濃度大於150 mg / dl；(III) 高密度脂蛋白 - 膽固醇 (HDL - Cholesterol) 濃度，男性小於40 mg / dl和女性小於50 mg / dl；(IV) 血壓超過135 / 85 mmHg；(V) 禁食血糖濃度大於110 mg / dl。NCEP判定須符合五項因子的其中三項以上即認為有代謝症候群且增加罹患心血管疾病的風險(3, 4)。在美國成年人罹患代謝症候群比率為24%。且已知與動脈硬化及T2DM患者死亡率增加有正相關 (3, 5, 6)。

在2004年，International Diabetes Federation (IDF)建立出適用於任何國家的判斷標準。所建立的判斷標準包括有評估腹部脂肪堆積、胰島素抗性、atherogenic dyslipidaemia、血壓增加、proinflammatory state和pothrombotic state。目前 IDF在2005年又建立了最新的判斷標準，特別強調中央型肥胖是判定代謝症候群的必要條件，再加上高三酸甘油酯、低的高密度脂蛋白、高血壓、高空腹血糖，四項中兩項。而中央型肥胖的判定則是依各民族自訂之標準 (7)。

### (三) 代謝症候群在台灣之判定標準與盛行率

依行政院衛生署國民健康局在2006年對代謝症候群的判定標準建議採94年美國NECP-ATP-III的診斷標準，並將空腹血糖向下修正，於96年1月18日公告，即以下5項危險因子中，若包含3項或以上者可判定為代謝症候群。

表 2-1 台灣代謝症候群之判定標準

危險因子	異常值
腹部肥胖(Central obesity)	腰圍 (waist) : 男性 $\geq 90$ cm 女性 $\geq 80$ cm
血壓(BP)上升	SBP $\geq 130$ mmHg / DBP $\geq 85$ mmHg
高密度脂蛋白膽固醇(HDL-C)過低	男性 $< 40$ mg/dl 女性 $< 50$ mg/dl
空腹血糖值(Fasting glucose)上升	FG $\geq 100$ mg/dl
三酸甘油酯(Triglyceride)上升	TG $\geq 150$ mg/dl

備註：上項危險因子中「血壓上升」、「空腹血糖值上升」之判定，包括依醫師處方使用降血壓或降血糖等藥品(中、草藥除外)，血壓或血糖之檢驗值正常者。

在盛行率方面，國民健康局 91 年三高（高血壓、高血糖、高血脂）調查研究顯示，國人代謝症候群盛行率：15 歲以上為 14.99%（男 16.9%，女 13.8%），且隨年齡上升而有增加的趨勢，見表 2-1 所示。又據衛生署統計顯示，代謝症候群所衍生之腦血管疾病、心臟病、糖尿病、高血壓等慢性疾病，皆年居台灣十大死因榜中，此現象也造就了國家對於醫療保健費用龐大的支出，見表 2-2 所示。因此如何預防代謝症候群已成為我國及世界之新興重要公共衛生議題。

表 2-2 台灣代謝症候群及組成因子盛行率

		91*年三高盛行率調查		
		男	女	合計
代謝症候群*		16.9%	13.8%	14.99%
組成因子	高血壓(15 歲)	24.9%	18.2%	21.38%
	高三酸甘油酯	20.3%	11.3%	15.6%
	高低密度膽固醇	6.5%	6.3%	6.4%
	高血糖(19 歲↑)	8.8%	7.2%	8.0%
	高血糖(45 歲↑)	15.5%	14.0%	
	高血糖(65 歲↑)	18.8 %	22.8%	
	糖尿病前期	3.2%	3.2%	3.2%
	高膽固醇	10.8%	10.9%	10.9%

資料來源：行政院衛生署國民健康局

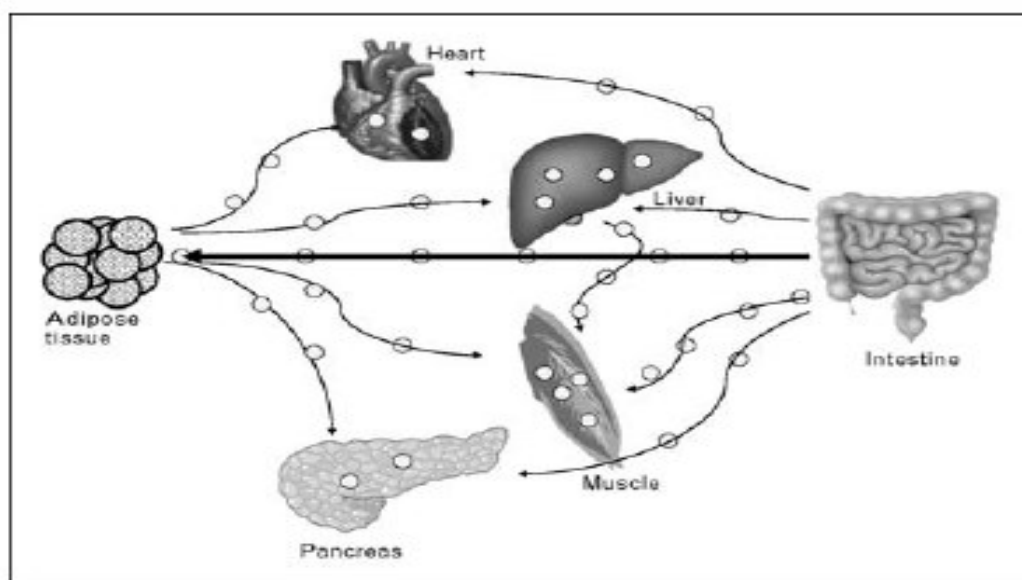
表 2-3 92年國人代謝症候群相關疾病醫療費用

項目	就診人數 (萬)	門診費用 (億點數)	住院費用 (億點數)	合計 (億點數)
糖尿病	98.6	95.0	18.2	113.2
高血壓	211.2	129.3	4.0	133.3
心臟病	119.5	57.6	86.1	143.7
腦中風	45.5	51.8	55.0	106.8
小計	474.8	333.7	163.3	497
癌症	31.7	93.0	127.6	220.6
佔率 (給付總計)	23.1%	17.3%	13.61%	15.9%
代謝症候群/癌症		3.59	1.28	2.25

資料來源：衛生署92年全民健康保險醫療統計年報

## 二、代謝症候群的發生

代謝症候群的發生，與現代人壓力過大、生活型態不正常，包括不正當的飲食（尤其是過度精緻化的糖類食品、含糖飲料、高油飲食等）、缺乏運動、肥胖（內臟型肥胖（visceral obesity））等因素有關。脂肪組織是脂質儲存的器官，但由於肥胖造成脂質異常的代謝，脂質儲存到其他非脂肪組織，例如肝臟、肌肉、胰臟、心臟等器官，而這樣的過程稱之為 lipotoxicity，造成身體各組織對胰島素產生抗性、第 2 型糖尿病、心血管疾病接踵而來(8)，並且因為肥胖造成脂肪組織肥大，一些由脂肪組織分泌調控身體各機能的細胞激素分泌失調也會影響代謝症候群的發生。



Dietary and hepatic lipids promote lipid accumulation in adipose tissue. As obesity progresses, however, lipid accumulation occurs in other organs (so-called ectopic sites). The lipid accumulation in these ectopic sites leads to insulin resistance (muscle, liver), impaired insulin secretion ( $\beta$ -cells), and possibly impaired cardiac function.

圖 2-1 lipotoxicity 造成脂質異常累積

資料來源：Molavi et al, 2006 (8)

### (一) 胰島素訊息傳遞與胰島素阻抗

胰島素訊息傳遞是一連串且複雜的路徑，當胰島素與胰島素受器 (insulin receptor; IR) 結合後，主要活化 insulin receptor substrates 1、2 (IRS -1、2) 上酪氨酸磷酸化位點進而活化磷脂醯醇 3 激酶路徑 (phosphatidylinositol 3-kinase pathway)、serine/threonine kinase (Akt/PKB)，刺激了肌肉和脂肪組織的葡萄糖轉運體釋出，且使肝臟和肌肉肝醣合成量增加，脂肪組織脂質生合成旺盛。胰島素阻抗是指磷脂醯醇 3 激酶路徑受阻，主要是活化的 protein kinase C (PKC) 使得 IRS -1、2 酪氨酸磷酸化位點去磷酸化且磷酸化絲胺酸位點，導致身體利用、儲存和產生能量的組織無法正確有效地與血液中的胰島素反應。diacylglycerol (DAG) 或 triglyceride (TG) 會活化 PKC，亦會受 mitogen-activated protein kinase family 中

c-jun N-terminal kinase 所活化，而 JNK 可被 proinflammatory cytokines 所活化，如 tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )，最終導致胰島素抵抗(9-12)。

## (二) 脂肪細胞激素與代謝症候群之關聯

過去脂肪組織被認為和能量儲存有關的器官，但近幾年來發現脂肪細胞會分泌 peptide hormones，則也被歸於內分泌器官，脂肪細胞會分泌 hormones 包括 leptin, adiponectin, resistin、interleukin -6 (IL-6)，tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、plasminogen activated inhibitor-1 (PAI-1)，以上稱之為脂肪細胞激素 (adipocytokines) 脂肪細胞激素會調控食物的攝取、能量的消耗、代謝的平衡以及其他生理功能。當脂肪組織重量變化異常，如 obesity 或 lipodystrophy，則這些脂肪細胞激素分泌失調而影響生理機能，造成代謝上的紊亂(13)。

### 1. Leptin

Leptin 是 obese (ob) gene 的產物，由 167 個胺基酸所組成，分子量大小為 16kDa，主要由白色脂肪組織合成(14)。leptin 結合在中樞神經系統和周圍的器官上的專一性接受器經由活化 Janus kinase / signal transducer and activator of transcription pathway 來傳達訊息(15, 16)。leptin 可直接影響脂解作用、胰島素的分泌及敏感性(17, 18)，在短暫的禁食會降低其濃度而後再進食則會提高濃度，Kieffer 提出 adipoinsular axis 假說，認為 leptin 和胰島素呈現 feedback loop，當體脂增加時，增加的 leptin 會抑制胰島素合成和分泌，以侷限體脂無限擴增，若是 adipoinsular axis 失調，則會導致肥胖伴隨高胰島素血症(18)。leptin 增加胰島素敏感性主要是其可活化 AMP - activated protein kinase pathway 而抑制 ACC 降低 Malony-CoA 而增加脂肪酸氧化，透過這樣的機制減少了骨骼肌細胞內的脂質堆積改善胰島素敏感性(19-21)。然而 leptin 也會抑制胰島素的分泌主要是透過活化 JAK/STAT signaling 和干擾 cAMP pathway。leptin 被報導具有降低食物攝取、增加能量消耗和增加生熱作用，但事實上不論在實驗動物或臨床常發現血液中 leptin 濃度與體脂堆積成正相關，通常認為是一種 leptin 抵抗現象(22, 23)。



## 2. Adiponectin

Adiponectin 又名 Acrp30、AdipoQ、apM1 和 GBP28 是脂肪細胞分泌的蛋白質，由 244 個胺基酸所組成，分子量大小為 30 kDa(24)。低濃度的 adiponectin 和冠狀心臟疾病、心血管危險因子、葡萄糖不耐、第 2 型糖尿病、高三酸甘油酯有關(22, 25-27)肥胖者血漿中 adiponectin 濃度較低，而減重和降體脂可增加 adiponectin 的濃度(28)。在孩童和青少年中 adiponectin 和 Body mass index、體脂、腰圍成反比(28-32)，adiponectin 濃度也和內臟脂肪的累積成反比(33, 34)。Adiponectin 基因的表現和分泌會受到 TNF- $\alpha$ 、IL-6 所抑制(25, 26)。血漿中 adiponectin 和胰島素刺激肌肉細胞內胰島素受器上酪氨酸磷酸化有關(35)。在小鼠以 leptin 和 adiponectin 處理之下可逆轉胰島素阻抗的現象。在大鼠誘導肥胖和胰島素阻抗的模式之下，運用病毒載體將 adiponectin cDNA 送入大鼠體內，可降低體重和改善周邊組織對胰島素敏感性(36)。Adiponectin 和胰島素作用的標的器官有關，在骨骼肌可以增加葡萄糖的利用、脂肪酸的氧化，在肝臟可增加胰島素敏感性、提高脂肪酸氧化降低肝臟葡萄糖的釋出(22, 25, 35, 37)。

## 3. Resistin

Resistin 是一種脂肪細胞分泌和合成的蛋白質，分子量大小為 12 kDa。在飲食誘發的肥胖或 leptin 和 leptin receptor 缺乏的鼠類會增加 resistin 濃度(38)。小鼠給予西式高脂飲食會誘導高 resistin 濃度，但在 antisense oligodeoxynucleotides 處理之後，可以使 resistin 濃度回歸正常且改善肝臟胰島素阻抗的程度(39)。這樣的結果和 resistin 剔除的小鼠是一致的，儘管沒有改變小鼠體重和體脂，在 resistin 剔除的小鼠給予西式高脂飲食之後，比起 wild-type mice，葡萄糖不耐的現象顯著改善(39)。刪除 resistin 基因會增加肝臟中 AMPK 的活性而降低了糖質新生的酵素進而減少肝臟葡萄糖的產率(39)，而當 resistin 利用 transgenic overexpression 則會增加肝中葡萄糖產率、和葡萄糖不耐(40)。resistin 對於小鼠脂質的代謝也有關，在正常餵給 chow diet 小鼠以 adenovirus 感染促使 resistin 過度表現，血漿中 TG 增加且肝中 TG 分泌也增加(41)。但 resistin 在人類對於肥胖或胰島素阻抗的相關性是不一致的(42,

43), 脂肪細胞是 resistin 的合成來源是受爭議的(有人認為 resistin 其實來自脂肪組織中的 macrophages)(44)。人類的 resistin 只有 64%和鼠科是同源, 在胰島素阻抗上是否和鼠科扮演相同的角色仍有待觀察(44)。

#### 4. Tumor necrosis factor $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

TNF- $\alpha$  是一個分子量大小為 26 kDa 的穿膜蛋白。雖然 TNF- $\alpha$  和肥胖、胰島素阻抗的關係不是很清楚, 但在此兩種情形之下組織中 TNF- $\alpha$  的表現增加(45)。此外, 小鼠 TNF- $\alpha$  或接受器基因剔除後, 可增加胰島素敏感性和改善血漿中游離脂肪酸的含量(46)。TNF- $\alpha$  藉由 p44 / 42 和 JNK 使 perilipin (an oil droplet coating protein) 磷酸化, 脫離脂肪油滴表面, 以便 hormone-sensitive lipase 進行脂解, 釋出 free fatty acids(47)。在肝臟中過多的 TNF- $\alpha$  會干擾內生性的脂肪酸生合成, 而太少的 TNF- $\alpha$  則會干擾脂肪酸氧化。當急性的 TNF- $\alpha$  刺激之下, 肝臟的 Very low density lipoprotein (VLDL) 產出率增加, TNF- $\alpha$  和增加的 VLDL 結合而抑制脂肪組織的脂蛋白脂解酶, 使脂肪細胞內脂肪酸的利用不良, 血液當中呈現高三酸甘油酯血症(48)。TNF- $\alpha$  干擾胰島素傳訊是藉由活化 Ser / Thr kinases (nPKC) 使胰島素對於胰島素接受器或 IRS 上酪氨酸磷酸化減弱, 導致胰島素阻抗(49)。

#### 5. Interleukin-6 (IL-6)

IL-6 的分子量大約 22~27kDa, 循環中 IL-6 有 1/3 的量由脂肪細胞所分泌(50)。體脂肪堆積、胰島素阻抗和血漿中高游離脂肪酸和血漿中 IL-6 高濃度成正相關。肥胖者脂肪細胞分泌 IL-6 的增加負向調控 IRS, 正向調控 suppressor of cytokine signaling 3 造成肝臟中胰島素訊息傳遞訊息受阻, 且促進肥胖者脂肪細胞內 TG 的脂解作用增加造成高游離脂肪酸(51)。IL-6 並且抑制脂肪細胞分泌 adiponectin 使肝臟胰島素阻抗更加嚴重(52)。IL-6 也會間接促進血小板的聚集, 肝臟合成 fibrinogen、C-reactive protein 增加, 內皮細胞黏附因子表現量增加而造成血栓的形成(53, 54)。

## 6. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)

代謝症候群的肥胖患者並且罹患第 2 型糖尿病有著高濃度的 PAI-1，且男性比女性有著更高的趨勢(55)。很多研究指出隨著胰島素抵抗情形改善，PAI-1 濃度跟著降低，以低卡飲食有效降低體重、體脂肪後也觀察到 PAI-1 濃度的降低，血漿中 PAI-1 濃度增加和肥胖的促進有關(56)。此外，第 2 型糖尿病給予的胰島素增敏劑 metformin 或 troglitazone 後，PAI-1 的濃度也可回歸正常(57)。PAI-1 對於肥胖和胰島素抵抗大多數研究著重於 *PAI-1* 基因的 polymorphism，promoter 上 -675 位點的 4G / 5G，4G carriers 會促進肥胖、代謝症候群的發生(58-60)。研究者在纖維母細胞中發現 PAI-1 藉由阻止 vitronectin 和黏著分子  $\alpha_v\beta_3$  結合而抑制 PKC 的磷酸化，妨礙胰島素的訊息傳遞(61)。過度的 PAI-1 表現會抑制細胞分化(這可能又是一種身體防止脂肪組織過度擴增的機制)，在 *PAI-1*<sup>-/-</sup> 小鼠的前脂肪細胞可發現比 wild-type 分化程度較高，且可顯示出胰島素的刺激葡萄糖汲取增加(62)。PAI-1 由於會抑制 tissue plasminogen activator，則使得纖維蛋白(fibrinogen)溶解作用受阻，加速血栓的形成，在心血管疾病的病人當中 PAI-1 濃度也有顯著性的增加(43)。

### 三、高糖（蔗糖）、高脂（飽和油脂）飲食與代謝症候群之相關性

#### (一) 飲食誘發代謝症候群實驗動物模式

對於代謝症候群動物模式的建立，先前的研究多以高油、高糖添加於飼料或糖水的給予大、小鼠以模擬代謝症候群的發生。以高飽和油脂或高蔗糖添加於飼料給予 C57BL / 6J mice，發現高飽和油脂添加於飼料會誘發出肥胖、脂肪細胞肥大、葡萄糖不耐、胰島素抵抗、高 leptin 血症等現象，但高蔗糖添加於飼料僅出現短暫的葡萄糖不耐之現象(63, 64)。以高飽和油脂或高蔗糖添加於飼料給予 Wistar rats，發現高飽和油脂添加於飼料會誘發出腹部脂肪堆積、體重增加、禁食狀態下血漿中葡萄糖、胰島素濃度增加等現象，高蔗糖添加於飼料不會出現肥胖的現象(65)，但蔗糖添加於飲水中給予 Wistar rats 則會出現體重增加、腹部脂肪堆積、高胰島素

血症、血脂異常、高血壓等現象(66)。飲食在代謝症候群誘發模式中對於大、小鼠分別有不同效果，且程度也不同。

## (二) 蔗糖(或其中果糖)引發代謝症候群的生化與分子機制

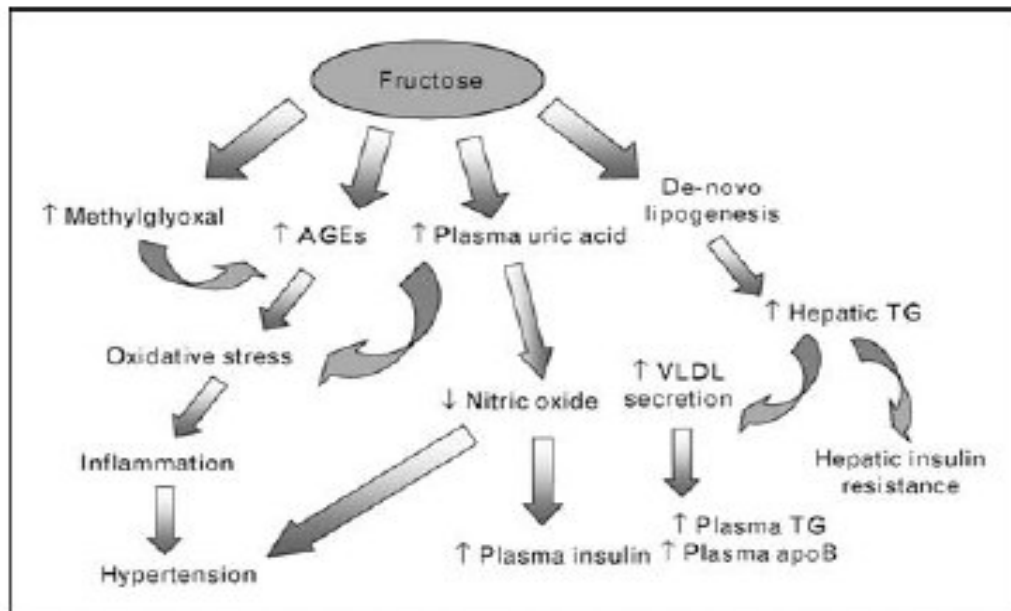
先前的研究指出，大鼠給予果糖的飲食會刺激大鼠的攝食量，但葡萄糖的給予則不會刺激攝食增加(67)，且雙醣類的蔗糖促進肥胖的效果比葡萄糖較好，因為蔗糖裡內含的果糖不會刺激生熱反應 (thermogenesis)，消耗能量(68)。在人體試驗當中果糖飲料攝取相對於葡萄糖飲料腹部脂肪的堆積有較明顯的現象(69)，而腹部脂肪堆積也就是內臟型肥胖和胰島素阻抗息息相關(70, 71)，由於內臟脂肪組織增大，對於胰島素的敏感性不好，但對於兒茶酚胺較敏感，脂解的能力較其他地方的脂肪組織強，游離出的脂肪酸經門脈循環運送至肝臟，造成肝臟三酸甘油酯堆積，導致胰島素阻抗。adiponectin 會增加肝臟脂質的異化和促進胰島素的敏感性，但增大的內臟脂肪組織 adiponectin 產出率較少，更加速了肝臟胰島素阻抗(72)。果糖的大量攝取會增加肝臟脂質生合成(73)，由於果糖在糖解的路徑中比葡萄糖少一限速步驟酶 phosphofructokinase 的作用，fructose-1-phosphate 快速的生成 acetyl-CoA 和 glycerol-3-phosphate，加速了肝臟中三酸甘油酯的堆積，造成肝臟中胰島素阻抗，而過多的三酸甘油酯和 Apolipoprotein B (apoB) 聚集成 VLDL 經由循環，血漿內 TG 增加，最後使得肌肉或脂肪組織累積更多的三酸甘油酯，使周邊組織也產生胰島素阻抗(74)。

由分子的層次來看，禁食再餵食高碳水化合物會促進肝臟中 Sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) 蛋白質表現量增加，SREBP-1c 是一轉錄因子，主要調控糖解、脂質生合成的相關基因，葡萄糖和胰島素會促進 SREBP-1c 表現增加，在肝臟產生胰島素阻抗時，雖然肝醣合成減少，但由於高濃度的胰島素，使得 SREBP-1c 表現量多，內生性的脂質不會因胰島素阻抗而減少(75, 76)。在果糖誘導脂質生合成方面，果糖雖不會促使胰島素分泌而誘導 SREBP-1c 增加，但果糖會促使 protein tyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) 過度表現，PTP-1B 會促進

SREBP-1c mRNA 表現增加，最後促使 SREBP-1c 促進肝中脂質合成基因表現量增加(77)。相對於其他的糖果糖的攝取會提高血漿中尿酸 (uric acid) 的濃度(78, 79)，血漿中尿酸和體重增加、內臟脂肪堆積也有相關(70)。血漿中尿酸的含量和血管舒張作用有關的一氧化氮有關，高尿酸則會使得一氧化氮濃度減少，進而造成高血壓(79)，而胰島素的濃度和一氧化氮也有關聯，因為胰島素的增加會使一氧化氮的 bioavailability 增加，促使血管擴張血流通透，使葡萄糖更順利的到達目的組織(78, 79)。果糖攝取產生的糖化終產物 advanced glycation end products、Methylglyoxal (果糖糖解途徑中間產物) 的增加會造成氧化壓力和發炎反應的產物增加，如 hydrogen peroxide、aortic nicotinamide adenine dinucleotide phosphateoxidase-4 和 vascular cell adhesion molecule-1 等，會增加血管收縮素 (angiotensin 1) 造成血壓的上升(80, 81)。

### (三) 高油脂(飽和脂肪酸)引發代謝症候群的生化與分子機制

高飽和脂肪酸對於胰島素阻抗有很強的關聯，由於過量的攝取飽和油脂造成的肥胖影響最大(82)，尤其是膳食之中的油脂直接儲存於內臟脂肪組織中，過多的 TG 堆積造成脂肪細胞的胰島素阻抗，脂肪細胞的脂解作用增加，循環中的游離脂肪酸增加造成肝臟 TG 儲存也增加，出現肝臟胰島素阻抗，肝臟肝糖分解速率快造成高胰島素血症，此外肝中過多 TG 也造成 VLDL 釋出過盛造成高三酸甘油酯血症，而高的三酸甘油酯也會提升心血管疾病的發生率(69)。由於脂肪細胞胰島素阻抗脂解作用旺盛，游離出的脂肪酸在肌肉內堆積成 TG、DAG 和 intramyocellular lipid 而影響了胰島素的訊息傳遞，降低胰島素刺激葡萄糖轉運體汲取葡萄糖最後造成胰島素阻抗(83, 84)。



High intake of dietary fructose has been shown to increase de-novo lipogenesis, which in turn increases hepatic lipid accumulation leading to insulin resistance, and stimulates production of hepatic very-low-density lipoprotein (VLDL), increasing plasma lipids. Fructose feeding also increases advanced glycation end products (AGEs) and plasma uric acid, which induce oxidative stress, inflammation, and hypertension. apo, apolipoprotein; TG, triglycerides.

圖 2-2 高果糖的與代謝症候群之相關性

資料來源：Miller & Adeli, 2008(85)

#### 四、肝中脂質生合成之轉錄調控

##### (一) SREBP-1c與ChREBP轉錄因子

SREBP-1c屬於SREBP family transcription factor中的一員，基本構造為basic helix-loop-helix (bHLH)，可與sterol responsive element 上的 E-box結合進行轉錄和脂質或糖解相關的基因，如：fatty acid synthase (FAS)、acetyl-CoA carboxylase (ACC)、stearoyl-coenzyme A desaturase、Spot 14、glucokinase (GK)。SREBP-1c表現在大部分的組織，尤其以肝臟、白色脂肪組織最多。在肝細

胞內，平時存在於細胞質中(precursor form；120 kDa)，一但受到禁食再餵食高碳水化合物、胰島素而活化則進入核內mature form；68 kD(86)，此mature form才具有功能進行轉錄脂質生合成基因作用。

Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP)，構造也有bHLH目前發現在肝臟中存在較多。低葡萄糖濃度（禁食）時，存於細胞質中，高濃度葡萄糖（飽食）時，葡萄糖經由糖解路徑增加了xylulose 5-phosphate而活化protein phosphatase 2 A，使得ChREBP去磷酸化而從細胞質轉位（translocation）至細胞核內與carbohydrate response element 結合後調控脂質或糖解相關的基因的轉錄，如：fatty acid synthase (FAS)、acetyl-CoA carboxylase (ACC)、liver pyruvate kinase(87)。

## (二) 肝中SREBP-1c、ChREBP與胰島素敏感性

已知過多的DAG、TG堆積在組織中會使胰島素訊息傳遞受阻，而在肝臟中調控脂質生合成基因（FAS、ACC、GK等）的轉錄因子主要是SREBP-1c、ChREBP，此兩轉錄因子皆受到葡萄糖或胰島素的刺激而表現，先前研究指出在已產生胰島素阻抗的動物中，SREBP-1c的表現量會增加，且會抑制肝臟中IRS - 2，使胰島素阻抗更據(88)。而在ChREBP knockdown *ob/ob* mice可發現在肝中TG堆積減少，肝臟的胰島素敏感性增強，改善了高血糖、高血脂，進而增進周邊組織對於胰島素的敏感性(89)。由此可見SREBP-1c、ChREBP在肝臟的表現似乎和胰島素的敏感性有相當的關係。

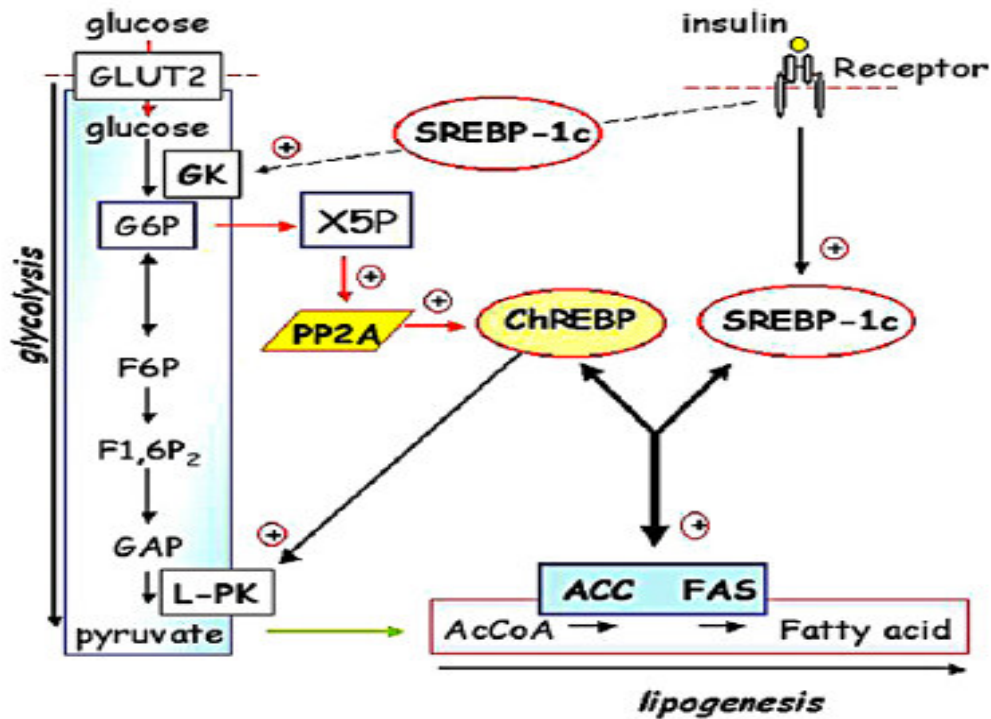


圖2-3 SREBP-1c、ChREBP在肝中調控脂質生合成基因

資料來源：Dentin *et al*, 2005(90)

## 五、Paternally expressed 1 (Peg1)/mesoderm specific transcript (Mest) 與肥胖之相關性

Peg1/ Mest 是屬於銘印基因(imprinted gene)，只有父系對偶基因(paternal allele)被表現，銘印基因在肥胖的脂肪組織中的表現研究並不多。Peg1/ Mest 在小鼠似乎可做為肥胖的指標，精確言之---與脂肪細胞的大小相關(91)。不論在飲食誘發肥胖或先天肥胖(db/db and ob/ob)小鼠均可發現脂肪組織 Peg1/ Mest 表現增加；但在給予 pioglitazone (治療糖尿病藥物) 的 db/db mice，伴隨脂肪細胞的減小(雖然體脂總量增加)，Mest 表現亦隨之降低 (91)。在脂肪組織過度表現 Peg1/ Mest 的基因轉殖鼠中發現脂肪細胞較 wild mice 來得肥大(91)。在 C57BL/6J 小鼠中發現即使尚未飲食誘發肥胖，脂肪組織中 Peg1/ Mest 的表現和日後肥胖發生機率有很高的相關性(92)，因此 Peg1/ Mest 除了做為脂肪細胞肥大(hypertrophic adipocytes)指標，或許



也與肥胖易感性(obesity susceptibility)有關(92)。Mest 雖然在胚胎及胚胎外組織高度表現，但在成鼠只有癌細胞可表現(93)，另外就是只有在肥胖的白色脂肪組織可表現，並且表現量與體脂堆積有高度正相關。



### 第三章 材料與方法

為探討高油飲食或糖水分別在誘發代謝症候群之效果,實驗採 2x2 設計,以 30% butter high fat diet、30% sucrose-containing water 或兩種同時給予誘發 C57BL/6J mice 及 Wistar rats 出現代謝症候群症狀,以接受正常飲食及飲水老鼠做對照,分別比較 2 種變因(高油飲食或糖水)誘發之效果;大鼠在誘發代謝症候群症後,一半轉換成正常飲食飲水,最後誘發組再與轉換組作比較,是否飲食的轉變可改善代謝症候群之症狀。

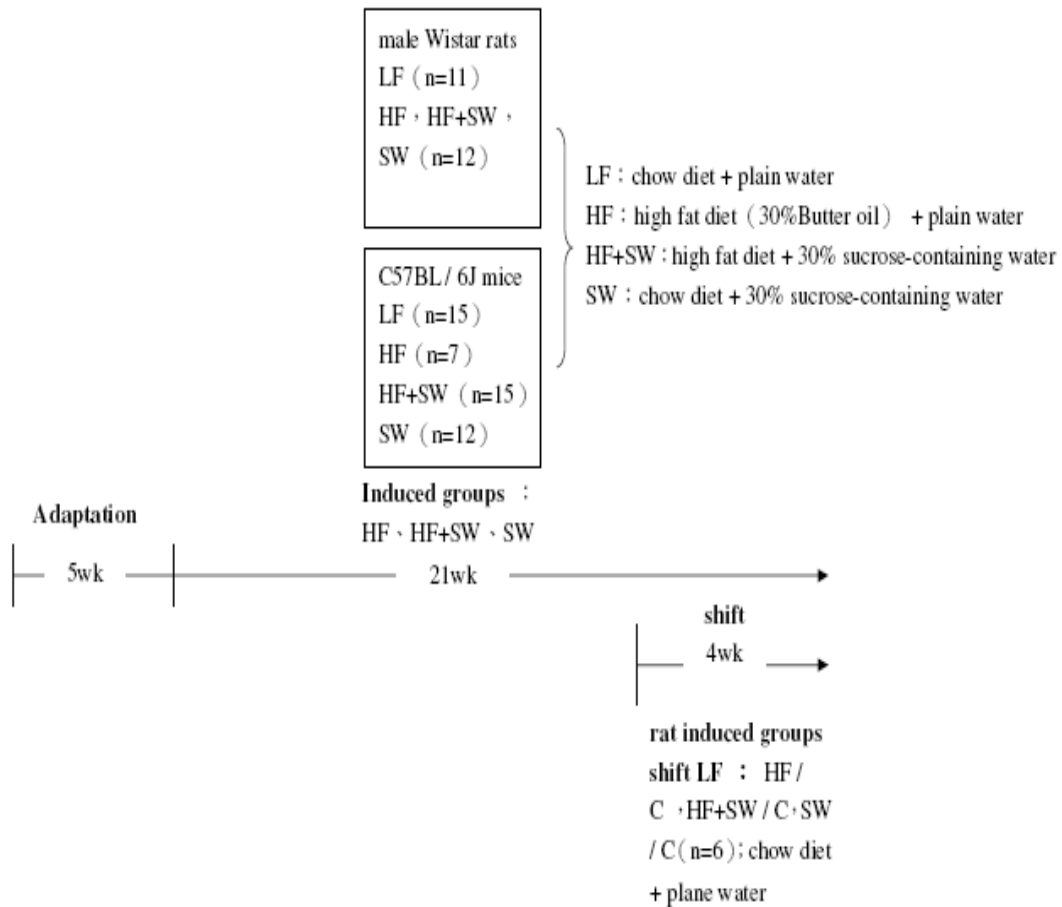


圖 3-1 高油飲食、糖水或兩者同時給予之下誘發代謝症候群模式

## 一、動物飼養

實驗動物採用三週齡雄性大鼠(Wistar)及小鼠(C57BL/6J)兩種品系，購自國家動物中心。所有老鼠先以 chow diet 餵養 5 週，再依據體重區分出 low gainer(亦即不易胖體質者)給予正常飲食飲水，作為 LF 組(chow diet + plane water)，其餘則隨體重平均分為三組誘發組：HF ( high fat diet + plane water) 、SW ( chow diet + sugar water) 及 HF + SW ( high fat diet + sugar water)。飲食設計主要先誘導老鼠發展代謝症候群之症狀 17 週後，再將大鼠的三組誘發組的隻數再分成一半，一半吃原來的飲食飲水，另一半換成正常飲食飲水，為期 4 週，最後誘發組再與轉換組作比較，是否飲食的轉變可改善代謝症候群。

受試動物飼養於標準規格塑膠籠，由本校動物中心提供，動物房溫度維持室溫 21 ~ 23°C，光照及黑暗各 12 小時( 08 : 00 - 20 : 00 為光照期，其餘為黑暗期)。大鼠每 2 隻養在一籠，小鼠每 5 隻養在一籠，採自由攝食，高脂飼料、糖水飲用量每隔 2 ~ 3 天記錄一次，chow diet 攝取量 1 個禮拜記錄一次，並且每週記錄體重。

## 二、飼料配製

飼料的基本組成依據 AIN - 93 (American Institute of Nutrition - 93) 配方。低脂飲食控制組(LF)為 chow diet，high fat diet 包含飼料重 30% 之 Butter (表 3-1)，糖水為 30% Sucrose。為了方便於記錄每隻每天飲食攝取量，將奶油飼料定形。將攪拌均勻後的飼料加入 30% 開水 ( 100 mL / 3 kg 飼料 ) 攪拌五分鐘後，以模型器具一塊一塊定型，以 40°C 低溫入烘箱烘乾水分 (約三天)，置於-20°C 冰箱凍存，以供動物飼養實驗之用。

表 3-1 高脂飼料組成

Table 3-3 The composition of high fat experimental diets<sup>1</sup>

飼料組成	%
Casein <sup>2</sup>	26
DL- Cystine <sup>2</sup>	0.3
Corn starch <sup>2</sup>	16
Sucrose <sup>2</sup>	16
Cellulose <sup>2</sup>	6.1
Butter oli <sup>2</sup>	30
Vitamin mixture <sup>3</sup>	1.2
Mineral mixture <sup>3</sup>	4.2
Choline bitartrate <sup>2</sup>	0.2
Caloric density (kcal / g)	5.02
Protein / calorie (g / 1000 kcal)	52
Vitamins / calorie (g / 1000 kcal)	2.6
Minerals / calorie ( g / 1000 kcal)	9

<sup>1</sup>High fat diet contained 30% butter oil .

<sup>2</sup>Sources of ingredient: casein, ICN (Aurora, Ohio); corn starch, Samyang (Seoul Korea); sucrose, TAIWAN SUGAR (Kaohsiung, Twiwan); cellulose, ICN (Aurora Ohio); butter oil, Anchor (New Zealand); cystine and choline, Sigma Chemical Co (St. Louis, Mo).

<sup>3</sup>AIN – 76 mineral mixture and AIN – 93 vitamin mixture.

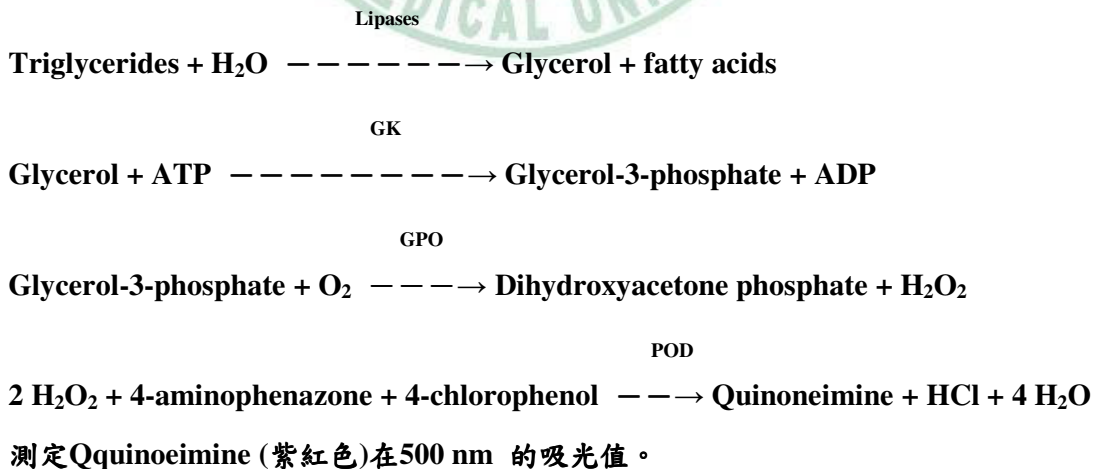
### 三、動物犧牲與樣品收集

動物在處理的第 0、1、2、5 個月，取禁食尾巴血測血糖、胰島素、三酸甘油酯、膽固醇、瘦素、adiponectin，在處理第 5 個月後犧牲，犧牲前一天先秤取小鼠體重，小鼠犧牲前予以禁食隔夜(16 小時)，先用 CO<sub>2</sub> 昏迷後迅速以毛細管採集眼窩血，再完全窒息。大鼠犧牲未禁食，犧牲當天用 CO<sub>2</sub> 將動物窒息，秤取動物犧牲前之體重，以不含抗凝劑的採血管(SPECIMEN TUBES, SUN MIN)自下腔大靜脈取血，並迅速取出組織包括肝臟、腹膜後脂肪 (Retroperitoneal fat, RE)及腹睪脂(Epididymal fat, EP)、皮下脂肪、左右小腿腓腸肌、腎臟、睪丸等，秤重記錄後立即投入液態氮中，部分保存於-80℃，供日後 RNA 之抽取及分析。其餘取下後，以 Saline 清洗漬乾後秤重裝入封口袋中，保存於-20℃，供日後脂質分析。RE 剪下約 0.5cm<sup>3</sup> 泡在 10% 甲醛中，以供日後切片用。

### 四、禁食血清脂質分析

#### (一) 三酸甘油酯含量測定

##### 1. 原理：



## 2. 方法：

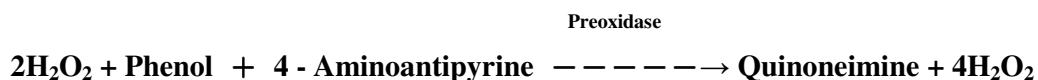
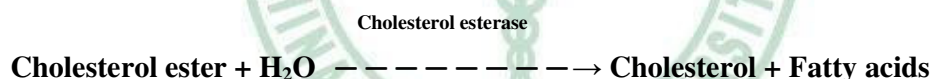
採用市售試劑組(RANDOX TR 213, Amtrim, UK)。將Buffer 1 (含Pipes buffer, pH 7.5、4 - chloro - phenol、Magnesium - ions)與Enzyme Reagent 2 (含4 - aminophenazone、ATP、Lipases、Glycerol - kinase、Glycerol - 3 - phosphate oxidase、Peroxidase)混合，配成Enzyme Reagent，取10  $\mu$ L Samples或Triglycerides standard (200 mg / dL)置於玻璃試管中，加入1 mL Enzyme Reagent，於室溫反應10分鐘，以1 mL Enzyme Reagent做為Blank。測500 nm之吸光值，即可得樣品血清之三酸甘油酯含量。

## 3. 計算：

$$\text{三酸甘油酯濃度(mmol / L)} = \frac{\Delta A_{\text{sample}}}{\Delta A_{\text{standard}}} \times \text{Standard 濃度(2.29 mmol / L)}$$

## (二) 膽固醇含量測定

## 1. 原理：



測定Quinoneimine(紫紅色)在500 nm 的吸光值。

## 2. 方法：

採用市售試劑組(RANDOX CH 201, Amtrim, UK)。取4  $\mu$ L Samples或Cholesterol standard (200 mg / dL)於96孔透明盤中，加入200  $\mu$ L反應試劑(含Phosphate buffer pH 6.5、Surfactant、4 - aminoantipyrine、Phenol、Peroxidase、

Cholesterol esterase、Cholesterol oxidase)，室溫反應10分鐘，以4  $\mu\text{L}$ 二次水加200  $\mu\text{L}$ 反應試劑做為Blank，測定500 nm之吸光值，即可得樣品血清之膽固醇含量。

4. 計算：

$$\text{膽固醇濃度}(\text{mmol/L}) = \frac{\Delta A_{\text{sample}}}{\Delta A_{\text{standard}}} \times \text{Standard 濃度}(5.17 \text{ mmol/L})$$



## 五、肝臟、肌肉脂質分析

### (一) 肝臟、肌肉脂質均質液製備

#### 1. 藥品配製：

萃取液(Chloroform : Methanol = 2 : 1)

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

將氯仿和甲醇以 2 : 1 的比例混合均勻。

#### 2. 方法：

採 Folch 等學者(1957)之方法((94))。取 0.2 g 組織並記錄實際稱取量。加入少量萃取液於冰浴中以均質機(Polytron, IKA LABORTECHNIK)均質磨碎。將均質液以濾紙過濾到 15 mL 離心管中，以萃取液定量至 10 mL。

### (二) 肝臟、肌肉三酸甘油酯含量測定

分析原理同血清三酸甘油酯之分析。取 100  $\mu$ L 均質液在玻璃試管中，置於通風櫥使有機溶劑完全揮發，加入 reagent 後，室溫下反應 10 分鐘，以 1 mL reagent 作為 blank，使用分光光度計於 60 分鐘內測 500 nm 之 O.D 值，計算三酸甘油酯濃度。

### (三) 肝臟、肌肉膽固醇含量測定

分析原理同血清三酸甘油酯之分析。取 200  $\mu$ L 均質液在玻璃試管中，再加入 10  $\mu$ L Triton X-100，置於通風櫥使有機溶劑完全揮發，再加入 reagent 後，室溫下反應 10 分鐘，以 1 mL reagent 作為 blank，使用分光光度計於 60 分鐘內測 500 nm 之 O.D 值，計算膽固醇濃度



## 六、禁食全血與血清葡萄糖含量分析

### (一) 全血葡萄糖含量測定

採用市售血糖機 (MediSense® Optium™ 血糖機, ABBOTT) 與市售血糖試紙 (MediSense® Optium™ 血糖試紙) 測量小鼠處理 0、1、2 個月時全血血糖值。

### (二) 血清葡萄糖含量測定

#### 1. 原理：



#### 2. 方法：

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

#### 3. 計算

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

## 七、口服葡萄糖耐受測試 Oral Glucose Tolerance Test (OGTT)

### (一) 藥品配製：

#### Glucose solution

##### 1. 4.5 M Glucose solution (用於 6 - 9 週之大鼠)

取 81 g Glucose (Riedel - deHaën) 以 2 次水定量至 100 mL。

##### 2. 1.5 M Glucose solution (用於 6 - 9 週之小鼠)

取 27 g Glucose (Riedel - deHaën) 以 2 次水定量至 100 mL。

#### 劑量給予

1.5g / kg body weight

### (二) 方法：

動物在給予試驗飼料第 5 個月時進行口服葡萄糖耐受測試，於採血前將老鼠禁食 12-14hr。先採集 0 分鐘血液，給糖後，再採集 30、60、90、120 分鐘之血液，隨後 24hr 內用市售試劑組測量各時間點血清葡萄糖濃度值。

## 八、胰島素耐受測試 Insulin Tolerance Test (ITT)

### (一) 藥品配製：

藥品	最終濃度
Human insulin (Actrapid <sup>®</sup> HM) 100 U / mL	0.1 (mU / $\mu$ L)

### 劑量給予

0.75 U / kg body weight

### (二) 方法：

採血前不需禁食，於採血前一天秤量體重並計算每隻小鼠給予劑量，先採集 0 分鐘血液，腹腔注射胰島素後，再採集 30、60、90、120 分鐘之血液，隨後 24hr 內用市售試劑組測量各時間點血清葡萄糖濃度值。

## 九、禁食血清胰島素含量測定

### (一) 原理

此分析是利用定量的三明治酵素免疫分析技術 (Sandwich enzyme immunoassay)。將專一性的 Monoclonal mouse anti-rat insulin antibodies 事先塗在 Microplate 上，當 Standards、Blank 和 Samples 注入 well 中，Mouse insulin 會和 Immobilized antibody 結合，洗去沒有結合的物質，再加入對 Mouse 專一性的 biotinylated polyclonal antibodies 到 Well 中，接著 wash 第二次，再加入 horseradish peroxidase，接著洗去移除掉未結合的 enzyme conjugates，再加入受質溶液 (Substrate solution) 到 Well 中反應呈色。酵素反應後，加入強酸終止反應，讀取其吸光質即可套入標準曲線換算出 insulin 濃度。

## (二) 方法

大、小鼠尾部取得之全血以 3,000 xg、20 分鐘、4°C 下離心(himac CR21, Hitachi)，將血漿與血球分開，取得之血清少量分裝後置於-20 °C 保存，以供日後分析。採用市售試劑組 (LINCO Rat / Mouse insulin ELISA kit)。以二次水將 Wash buffer concentrate 製備成 Wash buffer。其它試劑市售套組皆配好可直接使用。Well 中先以 300 µL 的 Wash buffer 清洗 3 次。加入 10 µL 的 Assay buffer 到 blank 和 sample 的 well 中，接著加入 10 µL Matrix solution 到 Blank、Standard 和 Quality control 1、2 的 Well 中。將 10 µL 的 Standard、Blank、Quality control 1、2、Sample 加入到每一個 Well 中，再加入 Detection antibody。貼上膠膜於室溫下搖晃反應 2 小時。吸出 Well 中的溶液以 300 µL 的 Wash buffer 清洗 3 次。加入 100 µL 的 Enzyme solution 到每一個 Well 中，貼上新的膠膜於室溫下搖晃反應 30 分鐘。吸出 Well 中的溶液以 300 µL 的 Wash buffer 清洗 6 次。加入 100 µL 的 Substrate solution (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) 到每一個 well 中，於室溫下避光反應 15 分鐘。加入 100 µL 的 Stop solution(含 Hydrochloric acid solution)到每一個 well 中，慢慢地輕拍 plate 確定混合均勻(或放在 Microplate vortex 上混勻)。測量 450 nm 之吸光值(波長校正設定 540 nm 或 570 nm)，以標準曲線來換算 Sample 內 Insulin 濃度。

## 十、禁食血清瘦素含量測定

### (一) 原理：

此分析是利用定量的三明治酵素免疫分析技術(Sandwich enzyme immunoassay)。將 Goat anti-mouse leptin 事先塗在 Microplate 上，加入 Block buffer 降低非專一性的抗體結合。當 Standards、Blank 和 Samples 注入 well 中，Goat anti-mouse leptin 會和 Immobilized antibody 結合，之後洗去沒有結合的受質，再加入 biotinylated goat anti-mouse leptin 到 Well 中，接著洗去移除掉未結合的 biotinylated goat anti-mouse leptin，加入 Streptavidin conjugated to

horseradish-peroxidase (Streptavidin-HRP) 洗去移除掉未結合的 Streptavidin-HRP，再加入受質溶液 (Substrate solution) 到 Well 中。酵素反應會生成藍色產物，當終止溶液 (Stop Solution) 加入之後會轉變成黃色，顏色強度代表樣品中 Leptin 結合量的比例。

(二) 方法：

大、小鼠尾部取得之全血以 3,000 xg、20 分鐘、4°C 下離心 (himac CR21, Hitachi)，將血漿與血球分開，取得之血清少量分裝後置於 -20 °C 保存，以供日後分析。採用市售試劑組 (R&D Systems Mouse Leptin)。PBS 和 Capture antibody 混勻即得 goat anti-mouse leptin。Reagent diluent 與 Detection antibody 混勻而得 biotinylated goat anti-mouse leptin。Tween 20 加入 PBS 製備成 Wash buffer。Color reagent A (含 Hydrogen peroxide) 和 B (Tetramethylbenzidine) 以等體積的比例混合均勻即得 Substrate solution。

加入 100  $\mu$ L 的 Standard 或 Sample 加入到每一個 Well 中 (已 coating 好 Goat anti-mouse leptin)，貼上膠膜於室溫下搖晃反應 2 小時。吸出 Well 中的溶液以 400  $\mu$ L 的 Wash buffer 清洗 5 次。加入 100  $\mu$ L 的 biotinylated goat anti-mouse leptin 到每一個 Well 中，貼上新的膠膜於室溫下搖晃反應 2 小時。吸出 Well 中的溶液以 400  $\mu$ L 的 Wash buffer 清洗 5 次。加入 100  $\mu$ L 的 Streptavidin-HRP 到每一個 well 中，貼上新的膠膜於室溫下避光反應 20 分鐘。吸出 Well 中的溶液以 400  $\mu$ L 的 Wash buffer 清洗 5 次。加入 100  $\mu$ L 的 Substrate solution 到每一個 well 中，貼上新的膠膜於室溫下避光反應 20 分鐘。加入 50  $\mu$ L 的 Stop solution (含 sulfuric acid) 到每一個 well 中，慢慢地輕拍 plate 確定混合均勻 (或放在 Microplate vortex 上混勻)。測量 450 nm 之吸光值 (波長校正設定 540 nm 或 570 nm)，以標準曲線來換算 Sample 內 Leptin 濃度。

## 十一、禁食血清 adiponectin 含量測定

### (一) 原理：

此分析是利用定量的三明治酵素免疫分析技術(Sandwich enzyme immunoassay)。將 Mouse adiponectin 專一性的 Monoclonal antibody 事先塗在 Microplate 上，當 Standards、Blank 和 Samples 注入 well 中，Mouse adiponectin 會和 Immobilized antibody 結合，之後洗去沒有結合的受質，再加入對 Mouse adiponectin 專一性的 Enzyme - linked polyclonal antibody 到 Well 中，接著洗去移除未結合的 Antibody - enzyme reagent 再加入受質溶液(Substrate solution)到 Well 中。酵素反應會生成藍色產物當終止溶液(Stop Solution)加入之後會轉變成黃色，顏色強度代表樣品中 Adiponectin 結合量的比例。

### (二) 方法：

大、小鼠尾部取得之全血以 3,000 xg、20 分鐘、4°C 下離心(himac CR21, Hitachi)，將血漿與血球分開，取得之血清少量分裝後置於-20 °C 保存，以供日後分析。採用市售試劑組(R&D Systems Mouse Adiponectin)。混合 Conjugate concentrate (含 Polyclonal antibody)和 Conjugate diluent 即得 Mouse adiponectin conjugate。以二次水將 Wash buffer concentrate 製備成 Wash buffer。取 Calibrator diluent RD5-26 concentrate 加二次水製備成 Calibrator diluent RD5 - 26 (1 x)。Color reagent A (含 Hydrogen peroxide)和 B (Tetramethylbenzidine)以等體積的比例混合均勻即得 Substrate solution。

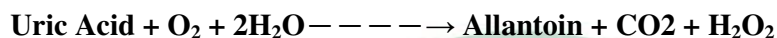
加入 50  $\mu$ L 的 Assay diluent 到每一個 well 中，將 50  $\mu$ L 的 Standard 或 Sample 加入到每一個 Well 中，慢慢地輕拍 Plate 一分鐘。貼上膠膜於室溫下搖晃反應 3 小時。吸出 Well 中的溶液以 400  $\mu$ L 的 Wash buffer 清洗 5 次。加入 100  $\mu$ L 的 Diluted mouse Adiponectin Conjugate 到每一個 Well 中，貼上新的膠膜於室溫下搖晃反應 1 小時。吸出 Well 中的溶液以 400  $\mu$ L 的 Wash buffer 清洗 5 次。加入 100  $\mu$ L 的

Substrate solution 到每一個 well 中，於室溫下避光反應 30 分鐘。加入 100  $\mu\text{L}$  的 Stop solution(含 Hydrochloric acid solution)到每一個 well 中，慢慢地輕拍 plate 確定混合均勻(或放在 Microplate vortex 上混勻)。測量 450 nm 之吸光值(波長校正設定 540 nm 或 570 nm)，以標準曲線來換算 Sample 內 Adiponectin 濃度。

## 十二、尿酸測定

### 1. 原理

Uricase



peroxidase



### 2. 方法：

採用市售試劑組(RANDOX UA 1613, Amtrim, UK)。取 4  $\mu\text{L}$  Samples 或 uric acid standard ( 595  $\mu\text{mol} / \text{L}$  )，4  $\mu\text{L}$  二次水做為 Blank，於 96 孔透明盤中加入 200 $\mu\text{L}$  Reagent，，在 20-25 $^{\circ}\text{C}$  反應 15 分鐘，15 分鐘內測量 520 nm 之吸光值，即可得樣品血清尿酸之含量。

### 3. 計算

$$\text{尿酸濃度}(\text{mg} / \text{dL}) = \frac{\Delta A_{\text{sample}}}{\Delta A_{\text{standard}}} \times \text{Standard 濃度} ( 595 \mu\text{mol} / \text{L} )$$

### 十三、西方點墨法(Western blot)分析肝臟 SREBP-1c、ChREBP 蛋白質表現

#### (一) 肝臟蛋白質萃取與定量

SREBP-1c、ChREBP 肝臟細胞質 / 核蛋白質萃取方式採用市售試劑組 NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (PIERCE,USA)，在均質液當中需加入均質液量的 1/100 protease inhibitor cocktail (Sigma, USA)，以避免蛋白質降解。蛋白質定量則是以 Lowry's method，以 660 nm 之吸光值，即可得樣品蛋白質含量。

#### (二) SREBP-1c、ChREBP 蛋白質含量

以西方點墨法(Western blot)檢定 SREBP-1c、ChREBP 蛋白含量，將細胞質液蛋白質定量為 80µg 和細胞核液白質定量為 50µg 以 10%SDS-PAGE 進行蛋白質電泳，接著蛋白質轉印後 PVDF 膜以 Ponceau S solution (Sigma, USA) 染色，檢驗蛋白質是否轉印成功。使用 SREBP-1c 一抗 (Rabbit polyclonal anti-SREBP-1；稀釋 1：500) (Affinity Bioreagents, USA)、ChREBP 一抗 (Rabbit polyclonal anti-ChREBP；稀釋 1：1000) 及結合 HRP 之二抗 (donkey anti - rabbit IgG；稀釋 1:10000) (Amersham Biosciences,)，利用呈色劑 Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Amersham Biosciences, USA) 偵測細胞質與細胞核的分子量。SREBP-1c 在細胞質的分子量為~120 kDa，細胞核的分子量為~68 kDa。ChREBP 細胞質與細胞核的分子量皆為~95 kDa。



## 十四、脂肪組織包埋切片

### (一) 藥品配置

#### 10%福馬林固定液

Reagent	需要量	終濃度
Formaldehyde solution 37% (Merck)	27 mL	10%

加入二次水定量至 100 mL，儲存於室溫備用。

### (二) 檢體製備

大鼠犧牲後取下之 Retroperitoneal fat (RE) 浸泡於固定液中。

### (三) 方法

#### 1. 組織脫水

先將泡過 10%福馬林之 RE 放進塑膠包埋盒中，再將包埋盒放進組織脫水專用鐵籠中，以流水的方式沖洗浸泡時間至少 30 分鐘，以洗去固定 RE 之福馬林，接下來進行脫水。以流水沖洗 30 分鐘將固定液沖洗掉，至入自動脫水機中，將檢體中的水分以酒精置換出來，在浸泡 Xylene 中使檢體變透明後，再將檢體浸潤於 Paraffin 中，其自動脫水機設定流程：檢體先浸置於 70%酒精中 1 小時，再換入第一道 80%酒精中 1.5 小時（共 2 次）；換入第二到 95%酒精中 2 小時（共 2 次）；換入第三到 100%酒精中 1.5 小時（共 2 次）；最後浸置於液態 Paraffin 中 1 小時後，即可進行包埋步驟。

## 2. 組織包埋

預先將鐵盒放入包埋機 (Tissue Block System TBS88, medite medizintechnik, made in west Germany) 的預熱槽中 (約 65°C)，並將以脫水好的 RE 放進包埋機的蠟槽中保溫及平衡。以包埋機將鐵盒下方充滿一層薄薄液態 Paraffin，迅速將檢體要切的面放平固定於下方後，再放上包埋盒並充滿液態 Paraffin 至完全覆蓋到檢體。小心將整個鐵盒放置冷盤上，凝固後將鐵盒拆下，最後修整包埋盒邊上多餘的 Paraffin。

## 3. 組織切片

以迴轉式切片機 (AS325 RETRACTION, SHANDON) 先進行粗切 (20~30  $\mu\text{m}$ )，切至預切的檢體表面出來，在作細切 (10 $\mu\text{m}$ )。將目標之切片放在冷水盆中，使其紓張開來，再以玻片撈至熱水浴 (50°C) 中使其平整，將石蠟切片平整地鋪在載玻片上，放入烘箱烘至石蠟溶至透明狀可使檢體固定的更好，烘乾後室溫下保存即可。

## 4. 脂肪細胞計數

每組隨機選取 3 隻已浸泡於固定液中的大鼠 RE 做為檢體，每個檢體製作 5 片切片，用顯微鏡 (Olympus) 放大 100 倍觀察切片，以照相機 (Diagnostic) 將所得影像拍攝下來，再利用影像處理系統 (Spot advanced) 在每個切片上圈選 3 個不同區塊，計數細胞數目。

## 5. 脂肪細胞平均直徑計算

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

$$\text{直徑}(\mu\text{m}) = \left[ \sqrt{(\text{平均細胞面積}/3.14)} \right] \times 2$$

## 十五、real-time PCR 分析肝臟、副睪脂 (EP) mRNA 含量

### (一) 總 RNA 之抽取

肝臟 total RNA 以 TRIZOL reagent (Invitrogen) 抽取。於均質管中放入冷凍組織及 10 倍組織體積之 TRIZOL 試劑，以組織均質機(homogenizer, Clas-Col, USA) 均質，肝臟組織直接取 1 mL 均質液至 1.5 mL 微量離心管，加入 0.2 mL 氯仿 (TEDIA)，副睪脂因富含油脂，均質液必須先離心 (12,000×g 於 4°C 下 10 分鐘) 去除脂肪，取粉紅層加 0.2 倍體積之氯仿。震盪均勻後室溫下靜置 2-3 分鐘，離心後上層為無色水層，下層為紅色之 phenol-chloroform 層，小心吸取上層液至新的微量離心管中，加入 0.5 倍體積 isopropanol (Sigma) 混勻，於室溫靜置 30 分鐘，以 12,000×g 於 4°C 下離心 20 分鐘，吸除上清液，沉澱之 pellet 加入 0.4 mL DEPC-H<sub>2</sub>O 震盪溶解 pellet，再以 12,000×g 於 4°C 下離心 5 分鐘，取上層水層加入 0.4 mL 氯仿，震盪後，以 12,000×g 於 4°C 下離心 5 分鐘，吸取上層液定量體積，加入 0.1 倍體積之 3 M sodium acetate (pH 5.2) 與 2 倍體積之絕對酒精，混勻後至於 -80°C 進行 RNA 沉澱，1 小時後以 12,000×g 於 4°C 下離心 20 分鐘，吸除上清液，以 DEPC-H<sub>2</sub>O 配置的 70% 酒精清洗 RNA，於室溫下晾乾 RNA 後，以 10 μL 之 DEPC-H<sub>2</sub>O 溶解 RNA。取 1 μL 溶液經 1000 倍 DEPC-H<sub>2</sub>O 稀釋後，測 260、280 nm 波長之吸光值，以吸光值 1 unit = 40 μg RNA / mL 公式計算 RNA 濃度。

## (二) RNA 電泳

## 1. 藥品配置

## 10X MOPS

藥品	需要量	最終濃度
MOPS (MERK)	41.2 g	0.2 M
Sodium acetate (USB)	6.56 g	0.08 M
0.5 M EDTA (pH 8) (Sigma)	20 mL	0.01 M

加 DEPC-H<sub>2</sub>O 至 800 mL，以 2N NaOH 調整 pH 至 7.0，再以 DEPC-H<sub>2</sub>O 定量至 1 L，滅菌後即可使用（溶液呈黃色）。

## Formaldehyde gel loading buffer

藥品	需要量
Glycerol	7.5 mL
1 mM EDTA (pH 8) (Mw = 292.24)	30 $\mu$ l
Bromophenol blue (Mw = 669.99)	37.5 mg
Xylene cyanol FF (Mw = 538.6)	37.5 mg

加 DEPC-H<sub>2</sub>O 定量至 15 mL，混勻後即可使用。

## 電泳緩衝液 (1 X MOPS)

取 10X MOPS 50 mL 以滅菌水定量至 500 mL。

## 2. 鑄膠

藥品	需要量	最終濃度
Agarose (GibcoBRL)	0.35 g	1%
DEPC-H <sub>2</sub> O	25.8 mL	
10X MOPS	3.5 mL	1 x
37% formaldehyde (Merck)	6.25 mL	3.7%

先將 agarose 加 DEPC-H<sub>2</sub>O 後，加熱使其溶解，待溫度降至 60°C 左右再加入其於藥品，將此混合溶液倒入小片 RNA gel 鑄膠器，待其凝固後即可用於 RNA 電泳。

### 3. 樣品前處理

藥品	需要量	最終濃度
RNA	a $\mu$ L	
DEPC-H <sub>2</sub> O	(4.5 - a) $\mu$ L	
10X MOPS	2 $\mu$ L	1 x
37% formaldehyde	3.5 $\mu$ L	0.22 M
Formamide	10 $\mu$ L	50%

混合均勻後，70°C 水浴 10 分鐘再冰浴 3 分鐘，最後將 2  $\mu$ L RNA gel loading dye (10X) 和 1  $\mu$ L 之 1  $\mu$ g / mL EtBr 加在蓋子上然後，震盪均勻後再 spin down，混勻後即可用於 RNA 電泳。

### 4. 方法

首先製備 1% 洋菜膠 (agarose gel)，內含有 1% agarose，3.7% formaldehyde，1X MOPS (20 mM MOPS, 8 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, pH 7.0)。分別取 10  $\mu$ g RNA 進行樣品前處理：於 RNA 溶液中加入 2  $\mu$ L 10X MOPS、3.5  $\mu$ L 37% formaldehyde 及 10  $\mu$ L formamide，以 DEPC-H<sub>2</sub>O 補體機至 20  $\mu$ L，混勻後 70°C 下水浴 10 分鐘，隨即冰浴 3 分鐘，避免 RNA 回復二級結構，最後加入 2  $\mu$ L RNA gel loading dye (10X) 和 1  $\mu$ L 之 1  $\mu$ g / mL EtBr，混勻後即可注入洋菜膠體中，以 50-70 伏特電壓進行電泳，當泳動至洋菜膠體之 3/4 時停止，取出膠體置於 UV box 上觀察 rRNA 28S/18S 的比例，倘若相當於 2:1 表示良好，無降解現象即可直接進行逆轉錄反應 (Reverse Transcription; RT reaction) 轉成 cDNA。

**(三) RNA 轉 cDNA—逆轉錄反應 (Reverse Transcription; RT reaction)****1. 原理**

逆轉錄反應(Reverse Transcription; RT reaction)是利用逆轉錄酶(reverse transcriptase)，將單股 RNA (single-stranded RNA)逆轉錄為互補 DNA (complementary DNA; cDNA)。逆轉錄作用即為第一股 cDNA 之合成(first strand cDNA synthesis)。此 cDNA 可用來進行後續的逆轉錄聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction; PCR)。

**2. 藥品配置****(1) 50 ng / $\mu$ L Random hexamer**

藥品	需要量	最終濃度
Random hexamer (Promega C1181) (500 $\mu$ g / mL)		50 ng / $\mu$ L
DEPC-H <sub>2</sub> O		

以 DEPC-H<sub>2</sub>O 將 500  $\mu$ g / mL stock 稀釋為 50 ng / $\mu$ L 的 Random hexamer。分裝於 Eppendorf 儲存於-20 $^{\circ}$ C。避免重複冷凍解凍。

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

**(200 U / $\mu$ L) (Promega M1701)**

儲存於-20 $^{\circ}$ C，於使用前才取出。避免重複冷凍解凍。

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

儲存於-20 $^{\circ}$ C，使用前 vortex 均勻。避免重複冷凍解凍。

## (4) 10 mM dNTP mixture

藥品	需要量	最終濃度
100 mM dATP mixture stock (Promega U120A,400 $\mu$ L)	20 $\mu$ L	10 mM
100 mM dGTP mixture stock (Promega U121A,400 $\mu$ L)	20 $\mu$ L	10 mM
100 mM dCTP mixture stock (Promega U122A,400 $\mu$ L)	20 $\mu$ L	10 mM
100 mM dTTP mixture stock (Promega U123A,400 $\mu$ L)	20 $\mu$ L	10 mM
DEPC-H <sub>2</sub> O	720 $\mu$ L	

以 DEPC-H<sub>2</sub>O 將 100 mM stock 稀釋為 10 mM 的 dNTP mixture。分裝於 Eppendorf 儲存於-20°C。

## 3. 操作步驟

## (1)

藥品	需要量	working conc.
Total RNA	2 $\mu$ g	
Random hexamer	2 $\mu$ L	50 ng / $\mu$ L

以 DEPC-H<sub>2</sub>O 補體積至 28 $\mu$ L，震盪均勻後於 70°C 加熱 10min 後迅速冰浴 3 分鐘。

## (2) 再依序加入以下試劑

藥品	需要量	working conc.
5x M-MLV RT buffer	8 $\mu$ L	1x
10 mM dNTP mixture	2 $\mu$ L	0.5 mM
M-MLV RT	2 $\mu$ L	10 U / $\mu$ L
總體積	40 $\mu$ L	

震盪均勻後於室溫下反應 10 分鐘，42°C 下反應 50 分鐘，95°C 下反應 5 分鐘終止反應，最後置於 4°C 10 分鐘，此即完成了第一股 cDNA 之合成，分裝於滅菌 Eppendorf 中凍於-80°C 備用。

## (四) Real-time polymerase chain reaction

## 1. 原理

SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix 是 PCR 試劑套組，內含有一種能與雙股 DNA minor groove 結合而發光的螢光染料。其與雙股 DNA 結合後，會釋出螢光，極為適合檢測 PCR 產物。因此，SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix 的螢光信號強度與雙股 DNA 的數量成正相關，可以根據螢光信號檢測出 PCR 反應中存在的雙股 DNA 數量。

## 2. 反應試劑製備

(1) 1x SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix

藥品	需要量	最終濃度
2x SYBR <sup>®</sup> Green PCR Master Mix(Applied Biosystems 4309159)	12.5 $\mu$ L	1x

第一次開封後即進行分裝為透明液體，並用錫箔紙包覆避光，儲存於 4 $^{\circ}$ C。

(2) Primer (10  $\mu$ M)

藥品	需要量	最終濃度
Primer Stock (100 $\mu$ M)	10 $\mu$ L	10 $\mu$ M
滅菌二次水	90 $\mu$ L	

將 Primer Stock 與滅菌二次水混合均勻儲存於-20 $^{\circ}$ C。



(3) 假設固定 Primer 濃度為 100 nM / in 25  $\mu$ L reaction mixture，則先製備 1  $\mu$ M Primer mixture，每次使用 2.5  $\mu$ L

藥品	需要量	最終濃度
10 $\mu$ M 之(F) Primer	5 $\mu$ L	1 $\mu$ M
10 $\mu$ M 之(R) Primer	5 $\mu$ L	1 $\mu$ M
滅菌二次水	40 $\mu$ L	
總體積	50 $\mu$ L	

大量使用時，可先算好濃度，與 2x SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix 預先混合好，每次使用 15  $\mu$ L。

(4) 假設固定 cDNA 濃度為 50 ng / in 10  $\mu$ L，則先製備 5 ng /  $\mu$  L cDNA。

藥品	需要量	最終濃度
cDNA Stock (50 ng / $\mu$ L)	1 $\mu$ L	5 ng / $\mu$ L
滅菌二次水	9 $\mu$ L	

### 3. 反應操作步驟

藥品	需要量	最終濃度
Primer mixture	2.5 $\mu$ L	100 nM
2x SYBR <sup>®</sup> Green PCR Master	12.5 $\mu$ L	1x
cDNA	10 $\mu$ L	50 ng / in 10 $\mu$ L
總體積	25 $\mu$ L	

以 36B4 作為 Endogeneous control。依照順序混合試劑，貼上光學膜後將 Well 內液體 spin down。使用 ABI PRISM<sup>™</sup> 7900HT sequence detection system 上機定量結果。

#### 4. 計算

$C_t$  值(Threshold Cycle)：C 代表 Cycle，T 代表 threshold (閾值)， $C_t$  值是每個反應管內的螢光信號到達設定的閾值時所經過的 PCR 循環數。因此當  $C_t$  值小表示 cDNA 量多基因表現量多。PCR 產物與起始放入的 cDNA 量成正比， $C_t$  值與 input cDNA 濃度之對數值成反比，當 input cDNA 量固定，產物量與  $2^n$  成正比。

$$\text{Step 1. } C_t \text{ Targen gene} - C_t \text{ Endogeneous control} = \Delta C_t$$

$$\text{Step 2. } \Delta C_t \text{ Sapmle} - \Delta C_t \text{ Calibrator} = \Delta\Delta C_t$$

Step 3. 基因表現量以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  表示

#### 十六、統計分析

實驗結果以 mean  $\pm$  SD 表示，利用 Two-way ANOVA 比較兩種因子(高脂飲食、糖水)對代謝症候群指標影響，當兩因子交互作用存在時則以 Duncan's multiple range test 比較組間差異。轉換組與誘導組則是以 Dunnett's tests 比較組間差異。所有數據通過常態分佈檢定，若非常態則轉為對數值。統計分析以 SAS (version 9.0, SAS institute, Cary, NC) 套裝軟體進行，當  $p < 0.05$  是為顯著差異。

## 第四章 結果

### 一、大鼠

#### (一) Wistar 大鼠攝食、體重、肝重與脂肪組織重

表 4-1 說明大鼠攝食狀況。顯示攝取糖水相對降低大鼠固體食物攝食量，飼料攝取降低一半，由於熱量來源包括糖水或固體飼料，因此總熱量的攝取 HF+SW 為四組當中最高其次為 HF 及 SW，LF 最低。表 4-2 為四組大鼠體重增加的結果，體重增加皆受高油與糖水因子所影響，而兩因子具有交互作用，且 HF、SW、HF+SW 體重增加均顯著大於 LF ( $P < 0.0001$ )，而三組間並無顯著差異；轉換一般飲食四週後，轉換組的之末體重雖與誘導組無顯著差異，但有降低的趨勢(表 4-3)。在絕對肝重的結果上(表 4-4)，受高油和糖水兩個別因子所影響，兩因子不具交互作用三組誘導組皆顯著重於 LF ( $P < 0.005$ )；轉換一般飲食四週後，轉換組的之肝臟絕對重雖與誘導組無顯著差異，但有降低的趨勢(表 4-4)；相對肝重的結果上(表 4-4)，不受高油和糖水個別因子所影響，兩因子不具交互作用；轉換一般飲食四週後，轉換組的之肝臟相對重與誘導組無顯著差異(表 4-4)。脂肪組織(Subcutaneous、Retroperitoneal、Epididymal fat)方面，不論在絕對組織重或相對組織重，誘導組皆受到高油和糖水兩個別因子所影響，兩因子並具交互作用，且三組誘導組體脂肪堆積量皆顯著多於 LF ( $P < 0.0001$ ) (表 4-4)，三組誘導組在轉換成一般飲食四週之後，脂肪組織堆積情形均有降低趨勢，唯僅有 HF/C 及 HF+SW/C 組皮下脂肪堆積分別與 HF 及 HF+SW 組達顯著差異( $P=0.084$  與  $0.0564$ ) (表 4-4)。

#### (二) 飲食誘發大鼠血清中 Leptin、Adiponectin、Uric acid 之影響

血清 Leptin 方面，受高油與糖水因子個別影響，第 1 個月時已誘導增加，並誘導穩定( $P < 0.0001$ ) (圖 4-1)，誘導第 5 個月，HF+SW 及 SW 顯著大於 HF，HF 又顯著大於 LF( $P < 0.0001$ )；轉換正常飲食後，血清 leptin 均有降低趨勢，其中

HF+SW/C 顯著低於 HF+SW ( $P < 0.05$ ) (圖 4-2)。血清 Adiponectin 只測量五個月結果，Two-way ANOVA 顯示不受到高油或糖水因子的影響，三組誘導組與 LF 無統計上差異 (圖 4-3)，飲食轉換後，雖然 adiponectin 均有增加，但並無達顯著差異 (圖 4-4)。血清 Uric acid (圖 4-5) 受高油與糖水因子個別影響，SW 顯著高於 LF ( $P < 0.005$ )。

### (三) 飲食誘發大鼠血脂之影響

血清 TG，受糖水的因子影響較大，SW 與 HF+SW 在第 1 個月時，相對於 LF 顯著增加 ( $P < 0.0001$ ) (圖 4-6)，並穩定呈現；飲食轉換後，HF+SW/C 與 SW/C 顯著性分別低於 HF+SW 與 SW ( $P < 0.05$ ) (圖 4-7)。血清 TC 方面，在第 5 個月時，受糖水因子影響較高，SW 顯著高於 LF ( $P < 0.05$ ) (圖 4-8)；飲食轉換四週後，誘導組與轉換組並無顯著性差異 (圖 4-9)。

### (四) 飲食誘發大鼠肝臟、肌肉內脂質堆積之影響

實驗處理 21 週，犧牲取下組織，評估肝臟、肌肉內脂質含量。肝中 TG、TC 含量受高油因子影響較顯著；糖水與高油有顯著交互作用，三組誘導組肝臟 TG 與 TC 均顯著高於 LF ( $P < 0.0001$ ) (表 4-5)；飲食轉換後，肝脂堆積均有降低趨勢，但僅 HF/C 對於肝中 TC 含量顯著性低於 HF ( $P < 0.05$ )。肌肉內 TG 受到糖水因子影響較顯著，HF+SW、SW 顯著高於 LF ( $P < 0.05$ )；同樣的飲食轉換後，肌肉 TG 堆積均有降低趨勢，可惜未達統計意義 (表 4-5)。

### (五) 飲食誘發對於大鼠胰島素敏感性之影響

#### 1. 禁食血糖與胰島素

禁食血糖方面(圖 4-10)，受糖水因子影響較顯著，糖水對於大鼠較能誘發血糖上升，在第 2 個月時，SW 組已顯著高於 LF ( $P < 0.05$ )並持續至第五個月，HF 與

HF+SW 則從未顯著高於 LF 組；在飲食轉換四週後，雖然 SW/C 組相較於 SW 有降低趨勢，但所有轉換組與其誘導組均無顯著性差異(圖 4-11)。血清胰島素方面(圖 4-12)，受高油、糖水因子顯著影響，三組誘導組皆顯著高於 LF，在第 1 個月時 HF+SW > SW = HF > LF ( $P < 0.05$ )，在第 5 個月時，HF = SW = HF+SW > LF；飲食轉換後，轉換組與誘導組無顯著性差異(圖 4-13)。

## 2. OGTT 與 ITT

實驗處理 5 個月時，以 OGTT 與 ITT 評估是否出現葡萄糖不耐與胰島素抵抗之現象。OGTT 方面，SW 在 0~120min 時，血糖皆顯著高於 HF；在 0 與 120min 時顯著高於 LF ( $P < 0.05$ ) (圖 4-14)，OGTT-AUC 中，受糖水因子影響較顯著，SW 也顯著高於 HF 和 LF ( $P < 0.05$ ) (圖 4-15)，HF+SW 介於中間，但與它組無顯著差異。ITT 方面，SW 在 30~120min 血糖顯著高於其他 3 組(30 min,  $P < 0.005$ ；60~120 min,  $P < 0.05$ ) (圖 4-16)，ITT-AUC 中，受糖水因子影響較顯著，SW 顯著高於其他 3 組 ( $P < 0.05$ )，HF、HF+SW 與 LF 組無顯著差異(圖 4-17)。

### (六) 飲食誘發對於大鼠血壓之影響

實驗處理 5 個月時，測量大鼠的血壓。收縮壓、舒張壓均受糖水因子顯著的影響，並且兩因子不具交互作用，在收縮壓方面 HF+SW 顯著高於 LF 與 HF ( $P < 0.005$ )，SW 亦稍高於 LF 與 HF，但無顯著差異；在舒張壓方面 HF+SW 和 SW 皆顯著高於 LF ( $P < 0.05$ )，HF 稍高於 LF 但無顯著性；而脈搏則受高油與糖水各別因子所影響，兩因子不具交互作用，HF+SW 和 SW 皆顯著高於 LF ( $P < 0.005$ ) (圖 4-18)。

(七) 飲食誘發大鼠肝中調控脂質生合成與糖解相關基因之轉錄因子蛋白質表現量之影響

實驗處理 5 個月時大鼠在飽食狀態下犧牲，以 Western blot 定量分析肝臟組織中的 SREBP-1c(圖 4-19)、ChREBP(圖 4-20)蛋白質表現量(計算 mature/immature 或 nuclear/cytosol 比例)，比例增加表示具有較高轉錄活性，糖水因子具有顯著性的影響 SREBP-1c、ChREBP 蛋白質 nuclear/cytosol 比例，SW 皆顯著高於 LF( $P < 0.08$ )。

(八) 飲食誘發對於飽食大鼠肝臟中醣類、脂質代謝基因表現量之影響

大鼠在飽食狀態下犧牲，因此肝臟脂質生合成及醣解相關基因表現以 real-time PCR 測定並列於表 4-4，FAS、ACC 為脂質生合成基因，表現量四組無顯著差異，但 SW 的 FAS 基因有升高的趨勢；飲食轉換後，轉換組與誘導組 ACC 基因表現量亦無顯著性差異，SW/C 的 FAS 基因表現量顯著低於 SW( $P < 0.05$ )。GK 為糖解酵素，基因表現量在 HF+SW 顯著高於其它三組( $P < 0.08$ )；飲食轉換後，HF/C 和 SW/C 分別顯著的高於 HF 和 SW ( $P < 0.08$  ;  $P < 0.05$ )。

(九) 飲食誘發對於大鼠脂肪細胞大小之影響

圖 4-21 是腹膜後脂肪組織經包埋、切片，直接在顯微鏡下觀察一定面積內脂肪細胞數目，再換算成脂肪細胞直徑，以評估平均脂肪細胞大小。脂肪細胞大小受高油與糖水各別因子影響，且兩因子具有交互作用，三組誘導組脂肪細胞直徑皆顯著大於 LF( $P < 0.0001$ )， $SW > HF+SW=HF > LF$ 。

(十) 飲食誘發對於大鼠脂肪細胞激素與脂質堆積基因表現量之影響

表 4-4 說明以 real-time PCR 定量分析大鼠脂肪組織中脂肪細胞激素基因表現量，TNF- $\alpha$ 、resistin 會受到高油因子顯著影響，且 HF 基因表現量皆顯著高於 LF( $P < 0.05$ )，在飲食轉換四週後，HF/C 與 HF 相較有顯著性降低( $P < 0.05$ )。PAI-1、leptin

受高油因子影響和高油、糖水兩者交互作用的影響，HF 中這兩基因表現量顯著高於 LF( $P < 0.05$ )，且飲食轉換後 HF/C 顯著低於 HF( $P < 0.05$ )。Adiponectin 基因表現量四組無顯著差異且飲食轉換後無顯著差異。脂質堆積基因—Mest 受糖水的影響較顯著，SW 與 HF+SW 皆顯著低於 LF( $P < 0.05$ )；飲食轉換後，SW/C、HF+SW/C 顯著高於 SW、HF+SW ( $P < 0.05$ )。

## 二、小鼠

### (一) C57BL/6J 小鼠攝食、體重、肝重與脂肪組織重

表 4-7 為四組小鼠熱量攝取，同樣的在小鼠的結果也顯示攝取糖水相對降低固體食物攝食量，飼料攝取降低一半，由於熱量來源包括糖水或固體飼料，因此總熱量攝取 SW 為四組當中最高其次為 HF+SW，HF 及 LF 最低。表 4-8 為四組小鼠體重增加的結果，體重的增加受高油與糖水個別因子顯著影響，兩因子具有交互作用，結果顯示 HF、HF+SW 體重增加均顯著大於 SW，SW 又顯著大於 LF( $P < 0.0001$ )，且 HF 及 HF+SW 兩組體重增加無顯著性差異。在絕對肝重的結果上(表 4-9)，受高油和糖水兩個別因子所影響，兩因子不具交互作用三組誘導組皆顯著重於 LF ( $P < 0.0001$ )，相對肝重的結果上(表 4-9)，受糖水因子所影響，高油與兩糖水因子具交互作用，HF+SW > LF > SW > HF ( $P < 0.001$ )。在脂肪組織方面，Subcutaneous、Epididymal fat，不論在絕對組織重或相對組織重，受高油與糖水個別因子顯著影響，兩因子具有交互作用，三組誘導組體脂肪堆積量皆顯著多於 LF( $P < 0.0001$ )，尤以 HF 和 HF+SW 增加最顯著(表 4-9)；Retroperitoneal fat 相對組織重，受高油與糖水個別因子顯著影響，兩因子具有交互作用，三組誘導組體脂肪堆積量皆顯著多於 LF( $P < 0.0001$ )，絕對組織重則受高油因子顯著影響且受高油與糖水交互作用顯著影響，三組誘導組體脂肪堆積量皆顯著多於 LF( $P < 0.0001$ ) (表 4-9)。

## (二) 飲食誘發小鼠血清中 Leptin、Adiponectin 之影響

在實驗第 5 個月時，血清 Leptin 方面受高油與糖水個別因子顯著影響，三組誘導組皆顯著高於 LF ( $P < 0.0001$ )， $HF+SW = HF > SW > LF$  (圖 4-22)。血清 Adiponectin 在 Two-way ANOVA 的統計顯示不具任何因子影響且不具交互作用，實驗處理第 5 個月時四組間無顯著差異，但 LF Adiponectin 的濃度具有較高的趨勢 (圖 4-23)。

## (三) 飲食誘發小鼠血脂之影響

血脂方面血清 TG (圖 4-24)，受高油與糖水個別因子顯著影響，兩因子具交互作用，在處理第 1 個月時，誘導組即顯著高於 LF ( $P < 0.0001$ )，且誘導穩定，但 HF+SW 始終低於另兩組誘導組。血清 TC 方面 (圖 4-25)，受高油與糖水個別因子顯著影響，處理第 1 個月時，誘導組即顯著的增加，並且誘導穩定，在處理第 5 個月時，受糖水因子顯著影響，高油因子邊緣化之影響，且兩因子具交互作用， $HF+SW > HF > SW > LF$  ( $P < 0.05$ )。

## (四) 飲食誘發小鼠肝臟、肌肉內脂質堆積之影響

表 4-10 說明肝中小鼠肝臟、肌肉內脂質堆積含量。肝中 TG 含量受糖水因子影響較顯著，SW 和 HF+SW 顯著高於 LF ( $P < 0.05$ )，肝中 TC 含量受高油與糖水個別因子影響，HF 和 HF+SW 顯著高於 LF ( $P < 0.05$ )。肌肉中 TG 含量，高油因子影響較顯著； $HF = SW > HF+SW > LF$  ( $P < 0.005$ )。



### (五) 飲食誘發對於小鼠胰島素敏感性之影響

#### 1. 禁食血糖與胰島素

圖 4-26 說明飲食對於禁食血糖值的影響，第 0~2 個月是以血糖機測量的全血血糖值，第 5 個月則是使用市售檢驗套組測量血漿中葡萄糖濃度。在試驗第 1 和 5 個月時，受高油因子影響血糖升高較顯著，HF 顯著高於 LF ( $P < 0.0001$ )，受糖水因子影響血糖降低較顯著，SW 雖然和 LF 無顯著差異但血糖值與 LF 相比有較低的趨勢，在第 2 個月時，各組血糖值雖無顯著差異但誘導組的血糖值是高於 LF。血清胰島素方面，實驗處理 5 個月時，受高油因子影響較顯著，高油與糖水兩因子不具交互作用，HF+SW 及 HF 顯著高於 LF ( $P < 0.05$ )；HF+SW > HF > SW > LF (圖 4-27)。

#### 2. OGTT 與 ITT

實驗處理 5 個月時，測量 OGTT 與 ITT 評估小鼠是否受到飲食的誘導而產生葡萄糖不耐或胰島素阻抗的現象。OGTT 方面，HF 在 0~120min，血糖皆顯著高於 LF、HF、HF+SW、SW ( $P < 0.0001$ ) (圖 4-28)；OGTT-AUC 中 (圖 4-29) 受到高油與糖水各別因子顯著影響，HF 也顯著大於 LF ( $P < 0.0001$ )，而 SW 與 LF 相比有較低的趨勢。ITT 方面，HF、HF+SW 在 30~120min 血糖皆顯著高於 LF ( $P < 0.05$ ) (圖 4-30)。ITT-AUC 中 (圖 4-31)，受高油因子的影響較顯著，HF、HF+SW 皆顯著大於 LF ( $P < 0.005$ )。

### (六) 飲食誘發對於禁食的小鼠肝臟中醣類、脂質代謝基因表現量之影響

小鼠是禁食狀態之下犧牲，因此肝臟中脂肪酸氧化及糖質新生相關基因表現以 real-time PCR 測定並列於表 4-11，CPT-1、ACO 為脂肪酸氧化基因；CPT-1 基因表現量受高油、糖水個別因子所影響，兩因子無交互作用，HF+SW > HF > SW

= LF( $P < 0.0001$ )，ACO 基因表現量受高油的獨立因子較顯著，高油、糖水兩因子無交互作用，HF 基因表現量顯著高於 LF( $P < 0.05$ )，PEPCK 則是糖質新生基因，基因表現量受高油、糖水個別因子所影響，兩因子無交互作用，HF 顯著高於 LF( $P < 0.05$ )，SW 與 LF 無顯著差異，但與 LF 相比有較低的趨勢。

(七) 飲食誘發對於小鼠脂肪細胞激素與脂質堆積基因表現量之影響

表 4-11 說明以 real-time PCR 定量分析小鼠脂肪組織中脂肪細胞激素基因表現量，TNF- $\alpha$ 、resistin 基因表現量在誘導組與對照組雖沒有顯著的差異但基因表現量有高於對照組的趨勢。Leptin 基因表現量受到高油、糖水個別因子所影響，且兩因子具交互作用，且三組誘導組基因表現量顯著高於對照組，HF+SW > HF = SW > LF( $P < 0.0001$ )。高油與糖水兩因子對於 PAI-1 基因表現量具有影響的潛力，受兩因子相互作用而影響，SW = HF > HF+SW = LF( $P < 0.05$ )。脂質堆積基因—Mest 基因表現量受到高油因子顯著影響，高油與糖水兩因子具交互作用，HF > HF+SW = SW = LF( $P < 0.0005$ )。

表 4-1 四組大鼠之攝食、飲水和能量攝取

Table 4-1 Food, water and calory intake of rats in four groups<sup>1</sup>

Treatment Group	LF	HF	HF+SW	SW
number	11	11	12	11
Food intake (g/d)	26.06	22.81	12.95	11.08
Water intake (mL/d)	68.42	62.27	68.9	59.03
Total Calory intake (Kcal/d)	88.60	114.51	147.69	108.34

<sup>1</sup> Calory content for chow diet: 3.4 kcal/g; for high fat diet: 5 kcal/g; for sucrose-containing drinking water: 1.2 kcal/mL.

表 4-2 大鼠餵食試驗飲食 5 個月之初、終體重及體重增加量<sup>4</sup>

Table 4-2 The initial and final body weight and body weight gain of rats fed experimental diets for 5 months

Treatment Group	LF	HF	HF+SW	SW	<i>p</i> values from Two-way ANOVA		
					fat	sugar	fat × sugar
<sup>1</sup> Initial body weight (g)	275±3	299±15	299±14	299±13			
<sup>2</sup> Final body weight (g)	536±40 <sup>b</sup>	751±94 <sup>a</sup>	769±111 <sup>a</sup>	768±103 <sup>a</sup>	0.0003	0.0003	0.0034
<sup>3</sup> Body weight gain (g / d)	1.75±0.27 <sup>b</sup>	3.01±0.55 <sup>a</sup>	3.12±0.71 <sup>a</sup>	3.1±0.63 <sup>a</sup>	0.0005	0.0006	0.0061

<sup>1</sup>Initial body weight : at 0 month (n=11 for LF, HF and SW; n=12 for HF+SW)

<sup>2</sup>Final body weight : at 5 month (n=11 for LF, n=5 for HF and SW; n=6 for HF+SW)

<sup>3</sup>Body weight gain : ( final body weight-initial body weight) / 150d. Values are means ± SD.

<sup>4</sup>*P*-values for fat, sugar and their interaction were analyzed by two-way ANOVA among LF, HF, HF+SW and SW groups. The significance of differences among the four groups was analyzed statistically by Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letter are significantly different, *p* < 0.05.

表 4-3 大鼠轉換正常飲食四週之初、終體重及體重增加量<sup>4</sup>

Table 4-3 The initial and final body weight and body weight gain of rats when they were shift to the control diet for 4 wk.

Treatment Group	HF	HF/C	HF+SW	HF+SW/C	SW	SW/C
<sup>1</sup> Initial body weight (g)	576.1±59.84	557.76±44.01	592.17±51.13	603.13±59.59	578±71.50	579.52±46.59
<sup>2</sup> Final body weight (g)	751±94	666.25±130.50	769±111	755.64±111.05	768±103	730.8±86.45
<sup>3</sup> Body weight gain (g/d)	5.84±1.48	5.13±1.14	5.90±2.06	5.08±1.93	6.34±1.82	5.04±1.42

<sup>1</sup>Initial body weight : at 16 week (n=6 for HF, HF+SW, SW and HF+SW / C; n=5 for HF / C and SW / C)

<sup>2</sup>Final body weight : at 21 week (n=6 for HF, HF+SW, SW and HF+SW / C; n=5 for HF / C and SW / C)

<sup>3</sup>Body weight gain : ( final body weight-initial body weight) / 30d. Values are means ± SD.

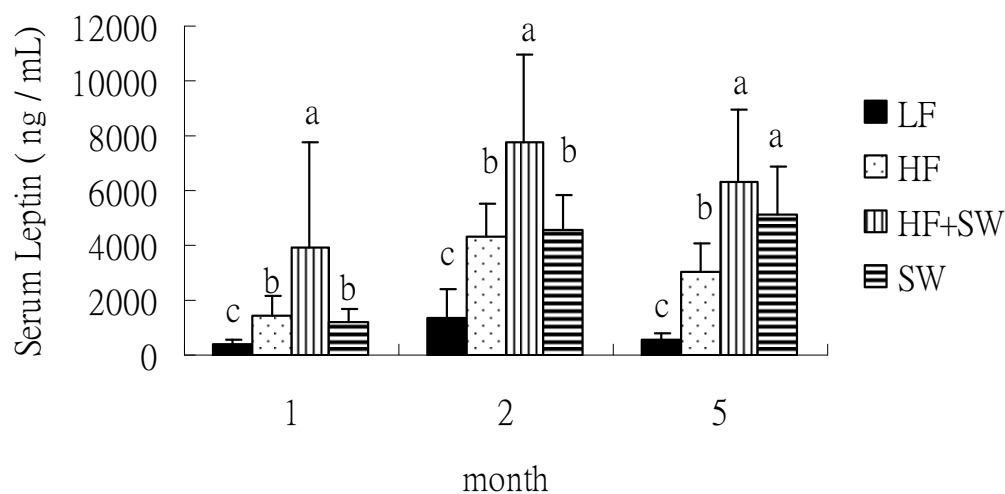
<sup>4</sup>The significance of differences between the induced group and shift group (HF vs. HF/C; HF+SW vs. HF+SW/C; SW vs. SW/C) respectively was analyzed statistically by Dunnett's tests, \* $P < 0.05$ .

表 4-4 大鼠餵食試驗飲食 5 個月之絕對與相對組織重<sup>1</sup>

Table 4-4 The absolute and relative tissue weights of rats fed experimental diets for 5 months.

Treatment Group	LF	HF	HF/C	HF+SW	HF+SW/C	SW	SW/C	<i>p</i> values from Two-way ANOVA		
								fat	sugar	fat × sugar
Liver										
liver (g)	14.75±0.83 <sup>b</sup>	21.65±4.08 <sup>a</sup>	19.62±3.15	22.96±3.66 <sup>a</sup>	19.48±1.54	20.71±3.21 <sup>a</sup>	19.11±1.37	0.0088	0.0167	0.1214
liver weight/final body weight×100%	3.06±0.25	2.84±0.33	2.93±0.67	2.78±0.19	2.88±0.33	2.76±0.32	2.82±0.43	0.6086	0.2329	0.6056
Adipose tissue										
subcutaneous (g)	10.60±3.89 <sup>b</sup>	46.90±14.93 <sup>a</sup>	31.12±11.22	51.12±24.12 <sup>a</sup>	26.95±4.43*	52.03±24.56 <sup>a</sup>	31.60±13.76	0.0040	0.0016	0.0129
subcutaneous weight/final body weight×100%	2.03±0.76 <sup>b</sup>	6.07±1.25 <sup>a</sup>	4.48±1.11*	6.42±2.23 <sup>a</sup>	3.96±0.52*	6.67±2.38 <sup>a</sup>	4.47±1.55	0.0015	0.0004	0.0036
epididymal fat (g)	8.65±2.17 <sup>b</sup>	24.59±6.86 <sup>a</sup>	21.11±6.03	25.03±6.97 <sup>a</sup>	21.21±3.15	23.53±4.22 <sup>a</sup>	18.98±4.01	0.0003	0.0012	0.0284
epididymal fat weight/final body weight×100%	1.66±0.43 <sup>b</sup>	3.20±0.62 <sup>a</sup>	3.06±0.61	3.23±0.41 <sup>a</sup>	3.12±0.41	3.15±0.76 <sup>a</sup>	2.74±0.31	<0.0001	0.0001	0.0070
retroperitoneal fat (g)	9.62±3.33 <sup>b</sup>	36.03±10.42 <sup>a</sup>	31.34±9.07	41.06±19.15 <sup>a</sup>	27.96±5.42	35.33±9.79 <sup>a</sup>	29.01±7.65	<0.0001	0.0004	0.0015
retroperitoneal fat weight/final body weight×100%	1.83±0.57 <sup>b</sup>	4.67±0.87 <sup>a</sup>	4.54±0.81	5.19±1.61 <sup>a</sup>	4.09±0.49	4.64±0.76 <sup>a</sup>	4.17±0.69	<0.0001	0.0004	0.0012

<sup>1</sup>Values are means ± SD. *P*-values for fat, sugar and their interaction were analyzed by two-way ANOVA among LF, HF, HF+SW and SW groups. The significance of differences among the four groups was analyzed statistically by Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letter are significantly different, *p* < 0.05. The significance of differences between the induced group and shift group (HF vs, HF/C; HF+SW vs. HF+SW/C; SW vs. SW/C) respectively was analyzed statistically by Dunnett's tests, \**P* < 0.05



<i>p</i> values from Two-way ANOVA			
	fat	sugar	fat × sugar
1 month	<.0001	<.0001	0.0315
2 month	<.0001	<.0001	0.0049
5 month	0.0075	<.0001	0.3886

圖 4-1 大鼠餵食試驗飲食第 1、2 和 5 個月時禁食血清 Leptin

Fig 4-1 The Fasting serum leptin levels of rats fed experimental diets for 1, 2 and 5 months. Values are means  $\pm$  SD. *P*-values for fat, sugar and their interaction were analyzed by two-way ANOVA among LF, HF, HF+SW and SW groups. The significance of differences among the four groups was analyzed statistically by Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$ .

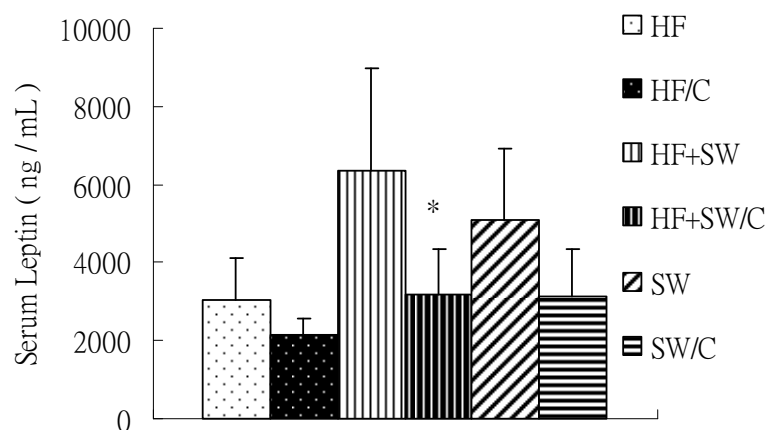
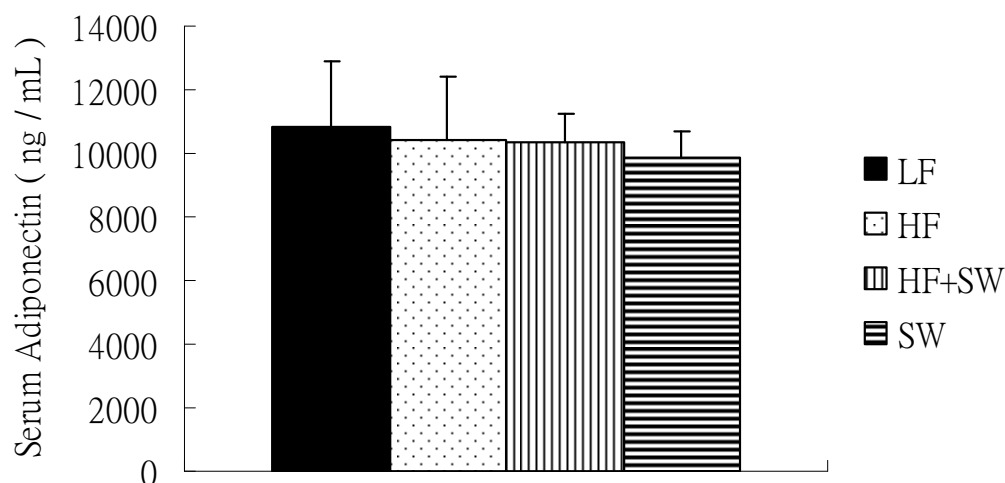


圖 4-2 大鼠轉換正常飲食四週之禁食血清 Leptin

**Fig 4-2 The Fasting serum leptin levels of rats when they were shift to the control diet for 4 wk. The significance of differences between the induced group and shift group (HF vs, HF/C; HF+SW vs. HF+SW/C; SW vs. SW/C) respectively was analyzed statistically by Dunnett's tests, \* $P < 0.05$ .**





<i>p</i> values from Two-way ANOVA			
	fat	sugar	fat × sugar
5 month	0.9475	0.6459	0.6022

圖 4-3 大鼠餵食試驗飲食第 5 個月時禁食血清 Adiponectin

Fig 4-3 Fasting serum adiponectin levels of rats fed experimental diets for 5 months. Values are means  $\pm$  SD. *P*-values for fat, sugar and their interaction were analyzed by two-way ANOVA among LF, HF, HF+SW and SW groups. The significance of differences among the four groups was analyzed statistically by Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$ .

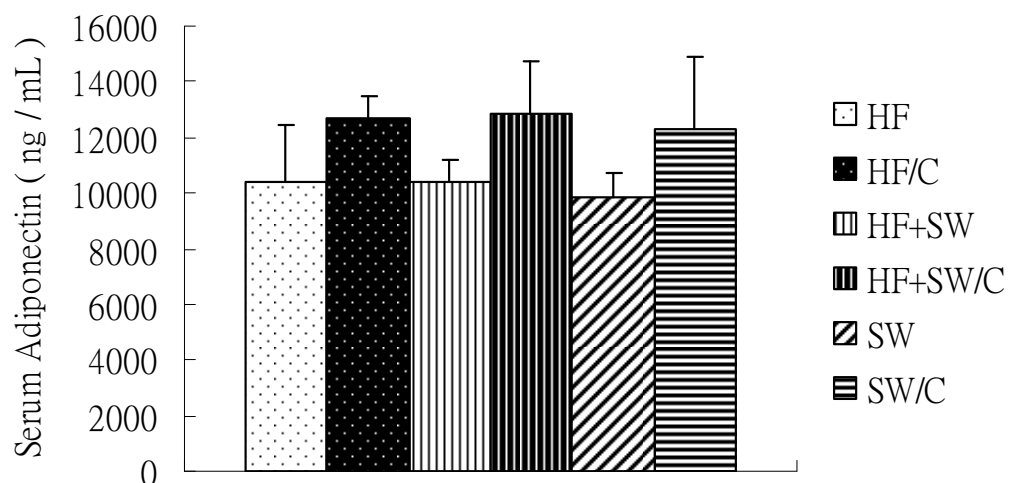
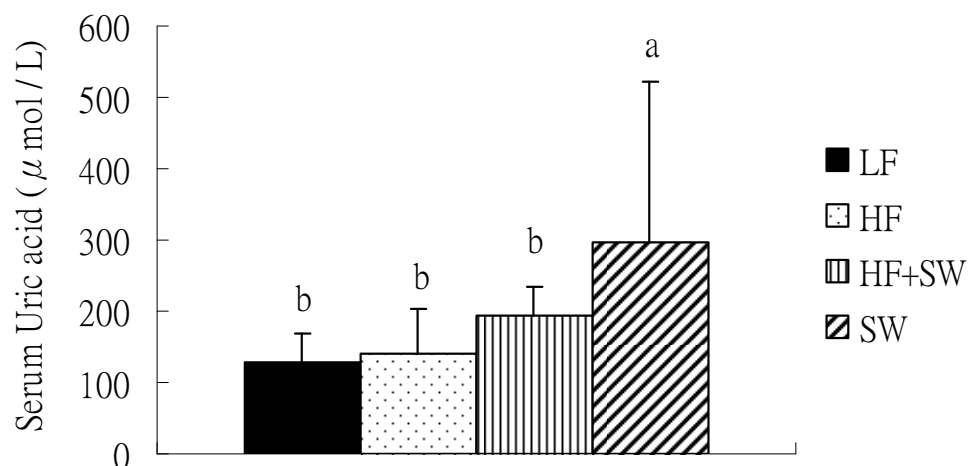


圖 4-4 大鼠轉換正常飲食四週之禁食血清 Adiponectin

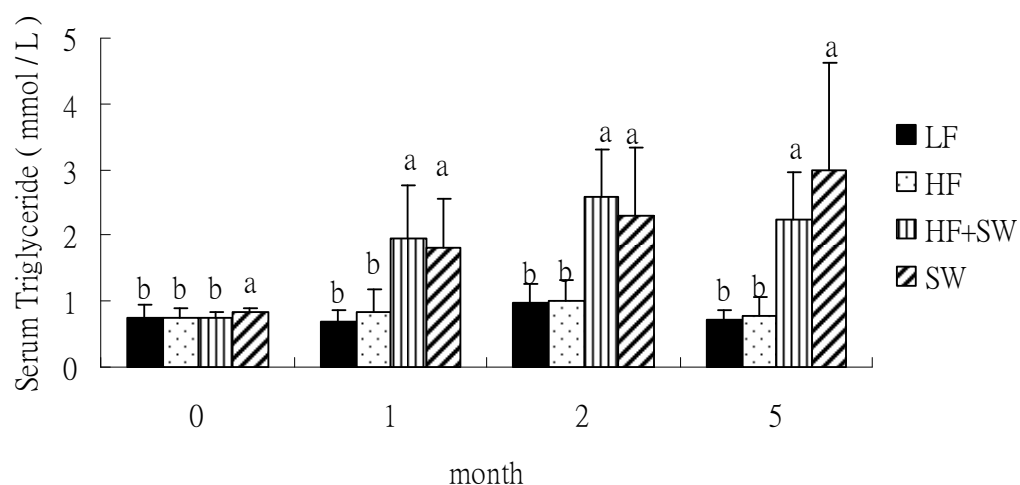
Fig 4-4 Fasting serum adiponectin levels of rats when they were shift to the control diet for 4 wk. The significance of differences between the induced group and shift group (HF vs, HF/C; HF+SW vs. HF+SW/C; SW vs. SW/C) respectively was analyzed statistically by Dunnett's tests,  $*P < 0.05$ .



<i>p</i> values from Two-way ANOVA			
	fat	sugar	fat × sugar
5 month	0.8194	0.0037	0.3949

圖 4-5 大鼠餵食試驗飲食第 5 個月時禁食血清 Uric acid

Fig 4-5 Fasting serum uric acid levels of rats fed experimental diets for 5 months. Values are means  $\pm$  SD. *P*-values for fat, sugar and their interaction were analyzed by two-way ANOVA among LF, HF, HF+SW and SW groups. The significance of differences among the four groups was analyzed statistically by Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$ .



<i>p</i> values from Two-way ANOVA			
	fat	sugar	fat × sugar
1 month	0.3037	<0.0001	0.7956
2 month	0.2460	<0.0001	0.4633
5 month	0.3084	<0.0001	0.2833

圖 4-6 大鼠餵食試驗飲食第 0、1、2 和 5 個月時禁食血清 Triglyceride (TG)

Fig 4-6 Fasting serum triglyceride levels of rats fed experimental diets for 0, 1, 2 and 5 months. Values are means  $\pm$  SD. *P*-values for fat, sugar and their interaction were analyzed by two-way ANOVA among LF, HF, HF+SW and SW groups. The significance of differences among the four groups was analyzed statistically by Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$ .

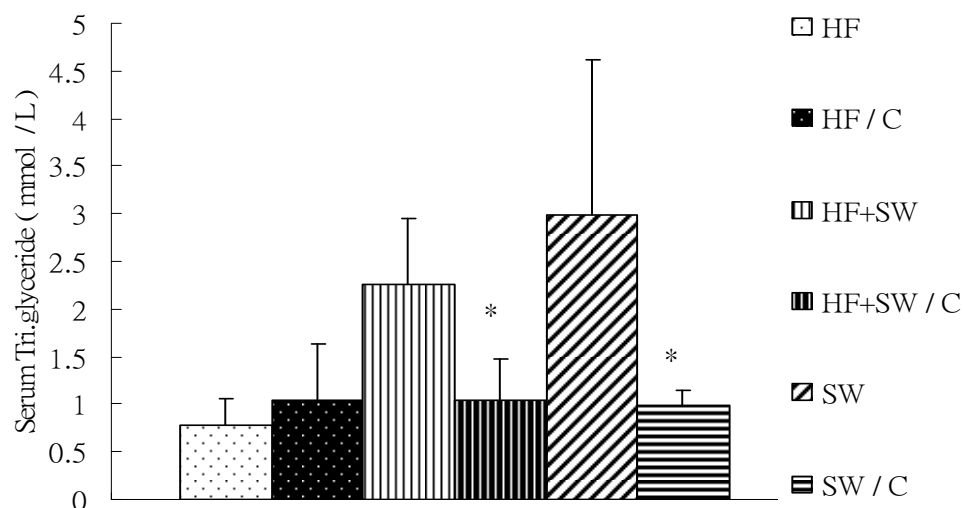
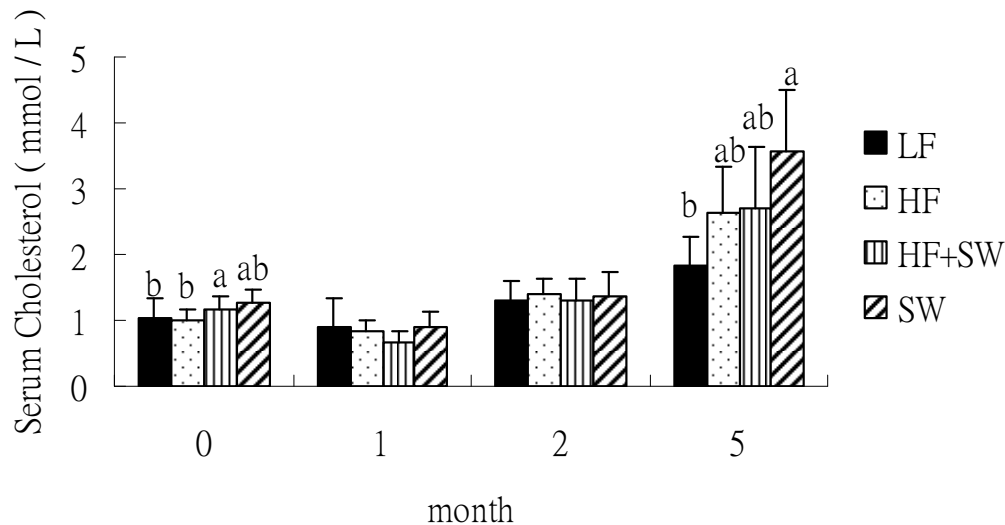


圖 4-7 大鼠轉換正常飲食四週之禁食血清 Triglyceride (TG)

Fig 4-7 Fasting serum triglyceride levels of rats when they were shift to the control diet for 4 wk. The significance of differences between the induced group and shift group (HF vs, HF/C; HF+SW vs. HF+SW/C; SW vs. SW/C) respectively was analyzed statistically by Dunnett's tests, \* $P < 0.05$ ..



<i>p</i> values from Two-way ANOVA			
	fat	sugar	fat × sugar
1 month	0.0640	0.4158	0.1650
2 month	0.7283	0.8585	0.4432
5 month	0.8801	0.0137	0.0159

圖 4-8 大鼠餵食試驗飲食第 0、1、2 和 5 個月時禁食血清 Cholesterol (TC)

Fig 4-8 Fasting serum cholesterol levels of rats fed experimental diets for 0, 1, 2 and 5 months. Values are means  $\pm$  SD. *P*-values for fat, sugar and their interaction were analyzed by two-way ANOVA among LF, HF, HF+SW and SW groups. The significance of differences among the four groups was analyzed statistically by Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$ .

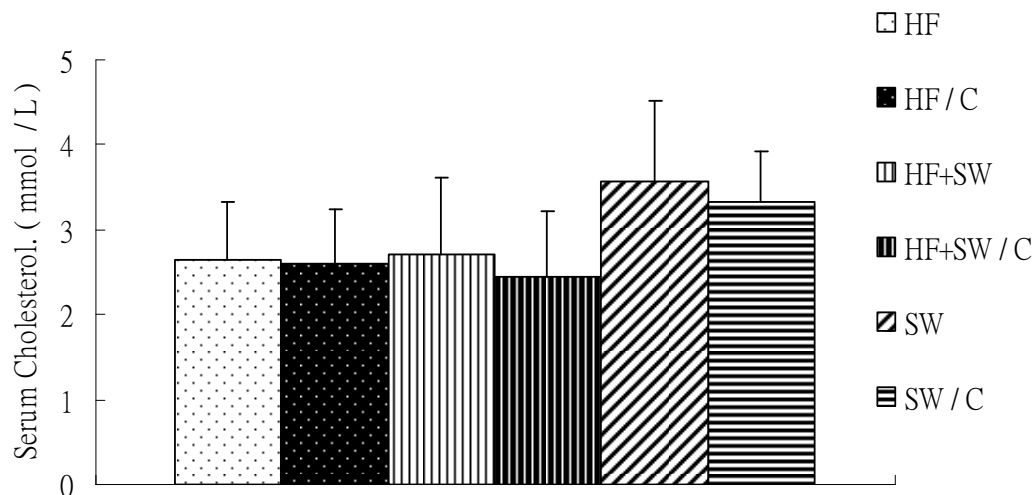


圖 4-9 大鼠轉換正常飲食四週之禁食血清 Cholesterol (TC)

Fig 4-9 Fasting serum cholesterol levels of rats when they were shift to the control diet for 4 wk. The significance of differences between the induced group and shift group (HF vs, HF/C; HF+SW vs. HF+SW/C; SW vs. SW/C) respectively was analyzed statistically by Dunnett's tests,  $*P < 0.05$ .

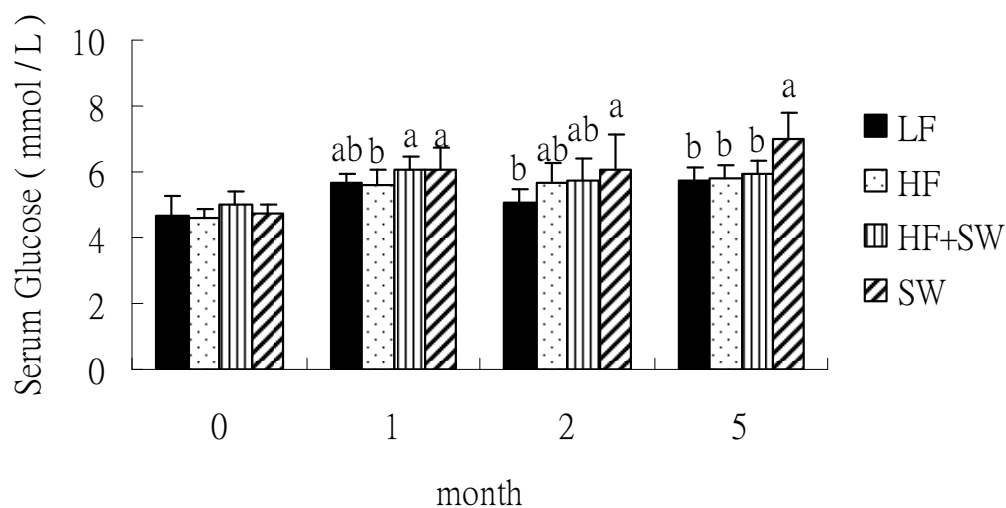
表 4-5 大鼠餵食試驗飲食 5 個月之肝臟、肌肉內脂質含量<sup>1</sup>

Treatment Group	LF	HF	HF/C	HF+SW	HF+SW/C	SW	SW/C	<i>p</i> values from Two-way ANOVA		
								fat	sugar	fat × sugar
<b>Liver</b>										
TG mg/total liver	93.62±20.83 <sup>b</sup>	227.64±38.27 <sup>a</sup>	182.46±49.58	191.50±79.89 <sup>a</sup>	183.98±56.51	195.21±50.71 <sup>a</sup>	171.58±37.75	0.0013	0.0720	0.0021
TG mg/g liver	6.01±1.34 <sup>b</sup>	10.80±2.56 <sup>a</sup>	9.29±1.89	9.25±3.06 <sup>a</sup>	8.90±1.77	9.33±1.33 <sup>a</sup>	8.97±1.85	0.0003	0.0018	0.0032
TC mg/total liver	35.16±4.34 <sup>c</sup>	95.16±19.34 <sup>a</sup>	52.75±10.59*	64.44±20.49 <sup>b</sup>	58.22±9.74	56.08±16.04 <sup>b</sup>	48.90±10.73	<.0001	0.6114	0.0004
TC mg/g liver	2.25±0.22 <sup>c</sup>	4.51±1.23 <sup>a</sup>	2.69±0.35*	3.11±0.44 <sup>b</sup>	2.85±0.32	2.67±0.41 <sup>bc</sup>	2.56±0.55	<.0001	0.1100	0.0022
<b>Muscle</b>										
TG mg/total muscle	3.91±0.44 <sup>b</sup>	4.71±0.72 <sup>ab</sup>	4.84±1.04	5.63±0.92 <sup>a</sup>	5.14±2.01	5.91±1.28 <sup>a</sup>	4.50±1.33	0.4453	0.0019	0.1829
TG mg/g muscle	1.24±0.41	1.40±0.26	1.46±0.15	1.59±0.22	1.54±0.25	1.45±0.35	1.35±0.34	0.2035	0.1272	0.9191

Table 4-5 The absolute and relative liver and muscle lipid concentrations of rats fed experimental diets for 5 months.

<sup>1</sup>Values are means ± SD. *P*-values for fat, sugar and their interaction were analyzed by two-way ANOVA among LF, HF, HF+SW and SW groups. The significance of differences among the four groups was analyzed statistically by Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letter are significantly different, *p* < 0.05. The significance of differences between the induced group and shift group (HF vs, HF/C; HF+SW vs. HF+SW/C; SW vs. SW/C) respectively was analyzed statistically by Dunnett's tests, \**P* < 0.05.





<i>p</i> values from Two-way ANOVA			
	fat	sugar	fat × sugar
1 month	0.9143	0.0043	0.7913
2 month	0.6513	0.0194	0.0311
5 month	0.2019	0.0012	0.0091

圖 4-10 大鼠餵食試驗飲食第 0、1、2 和 5 個月時禁食血清葡萄糖

Fig 4-10 Fasting serum glucose levels of rats fed experimental diets for 0, 1, 2 and 5 months. Values are means  $\pm$  SD. *P*-values for fat, sugar and their interaction were analyzed by two-way ANOVA among LF, HF, HF+SW and SW groups. The significance of differences among the four groups was analyzed statistically by Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$ .

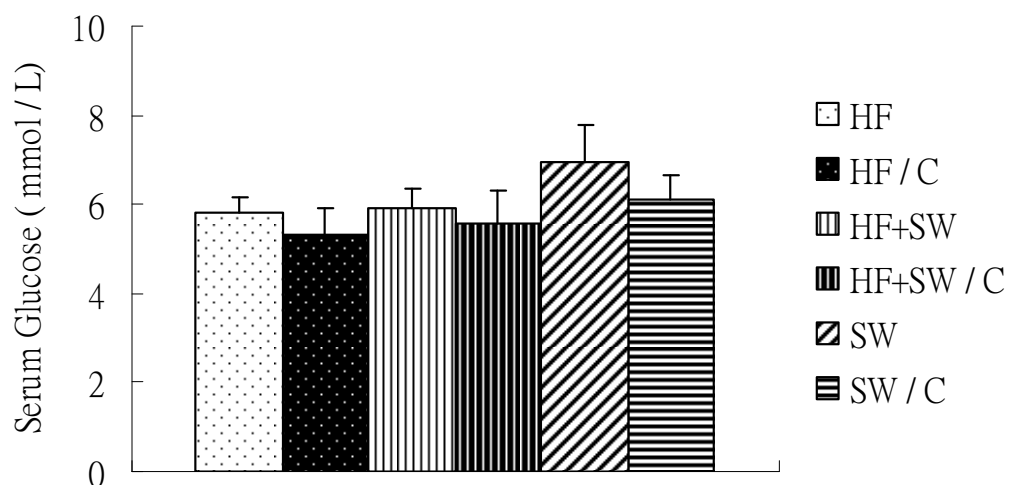
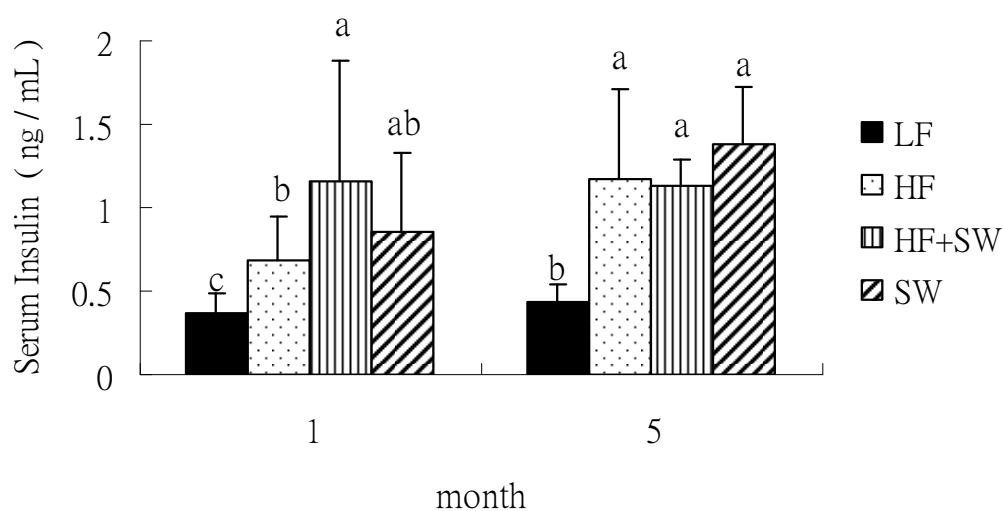


圖 4-11 大鼠轉換正常飲食四週之禁食血清清葡萄糖

Fig 4-11 Fasting serum glucose levels of rats when they were shift to the control diet for 4 wk. The significance of differences between the induced group and shift group (HF vs, HF/C; HF+SW vs. HF+SW/C; SW vs. SW/C) respectively was analyzed statistically by Dunnett's tests, \* $P < 0.05$ ..



<i>p</i> values from Two-way ANOVA			
	fat	sugar	fat × sugar
1 month	0.0030	<0.0001	0.3299
5 month	0.0005	0.0053	0.0048

圖 4-12 大鼠餵食試驗飲食第 1 和 5 個月時禁食血清胰島素

Fig 4-12. Fasting serum insulin levels of rats fed experimental diets for 1 and 5 months. Values are means  $\pm$  SD. *P*-values for fat, sugar and their interaction were analyzed by two-way ANOVA among LF, HF, HF+SW and SW groups. The significance of differences among the four groups was analyzed statistically by Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$ .

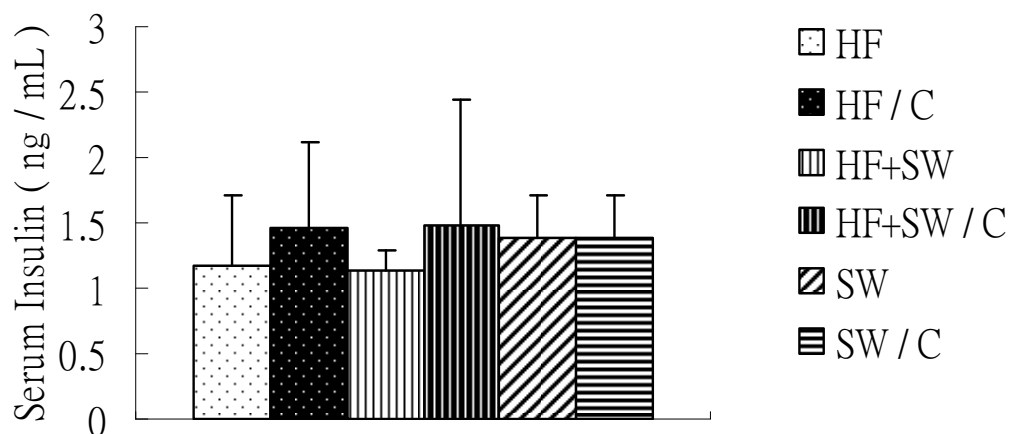


圖 4-13 大鼠轉換正常飲食四週之禁食血清胰島素

**Fig 4-13.** Fasting serum insulin levels of rats when they were shift to the control diet for 4 wk. The significance of differences between the induced group and shift group (HF vs, HF/C; HF+SW vs. HF+SW/C; SW vs. SW/C) respectively was analyzed statistically by Dunnett's tests, \* $P < 0.05$ ..

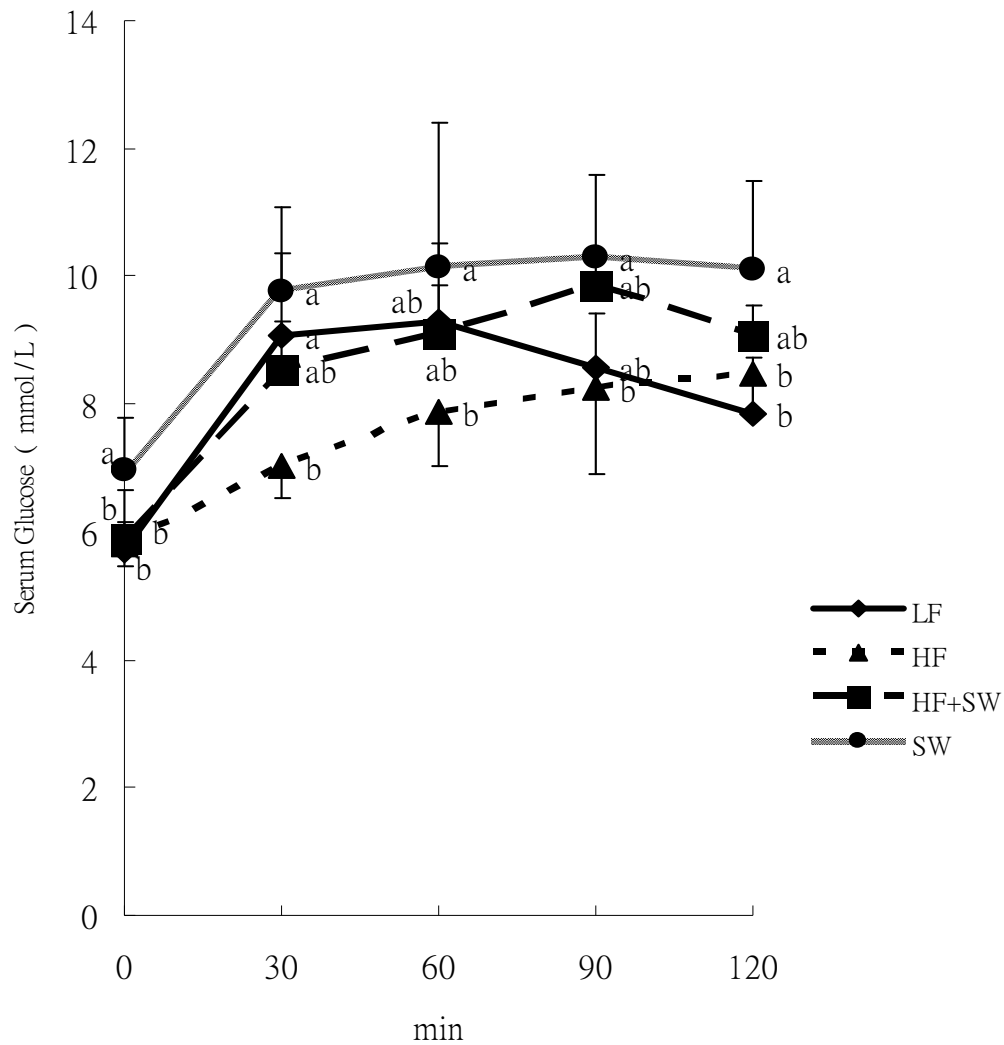
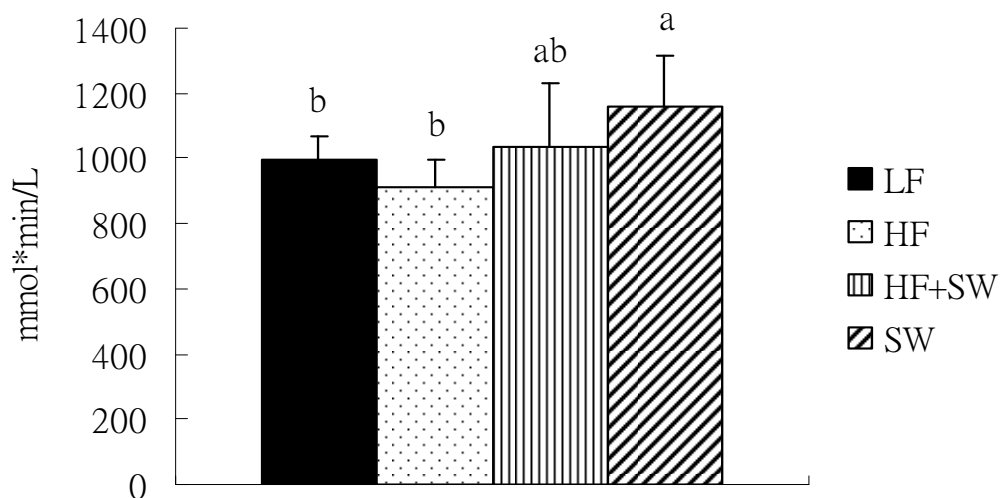


圖 4-14 大鼠餵食試驗飲食第 5 個月時葡萄糖耐量試驗

**Fig 4-14 Oral glucose tolerance tests (OGTT) performed on rats fed experimental diets for 5 months. A glucose load was given and then, at the indicated time points, serum glucose levels were measured. Values are means  $\pm$  SD. The significance of differences among the four groups was analyzed statistically by Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$ .**



<i>p</i> values from Two-way ANOVA			
	fat	sugar	fat × sugar
OGTT AUC	0.0925	0.0183	0.9953

圖 4 - 15 大鼠餵食試驗飲食第 5 個月時葡萄糖耐量試驗 (OGTT) 葡萄糖曲線下面積

Fig 4-15 The areas under the curve for glucose (AUC) over 2h in the OGTT of rats fed experimental diets for 5 months. Values are means  $\pm$  SD. *P*-values for fat, sugar and their interaction were analyzed by two-way ANOVA among LF, HF, HF+SW and SW groups. The significance of differences among the four groups was analyzed statistically by Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$ .

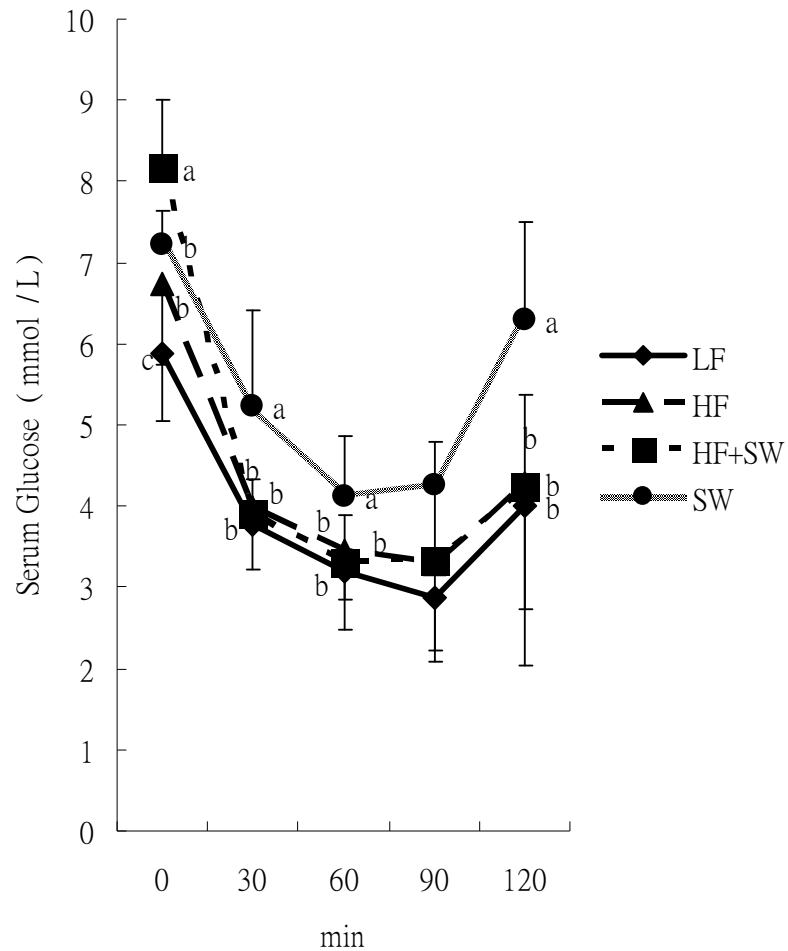
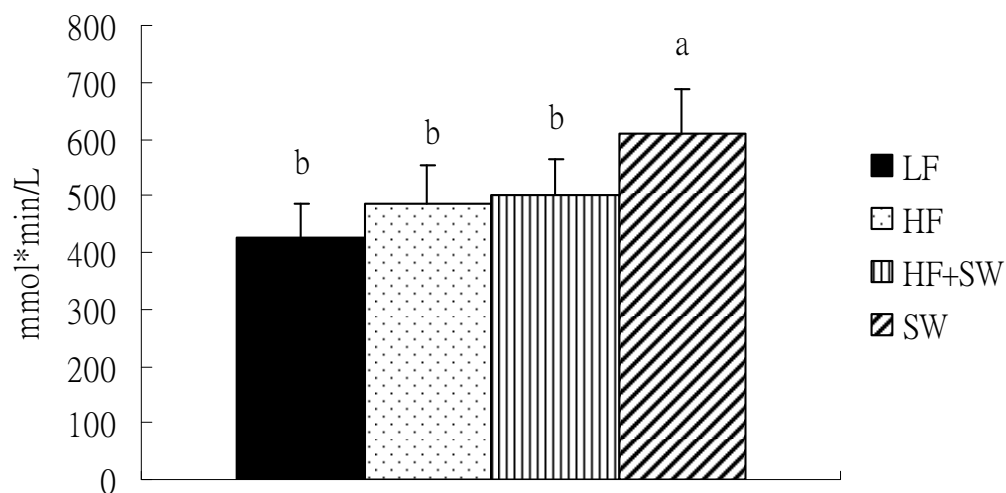


圖 4-16 大鼠餵食試驗飲食第 5 個月時胰島素耐量試驗

**Fig 4-16 Insulin tolerance tests (ITT) performed on rats fed experimental diets for 5 months. An insulin load was given and then, at the indicated time points, serum glucose levels were measured. Values are means  $\pm$  SD. The significance of differences among the four groups was analyzed statistically by Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$ .**

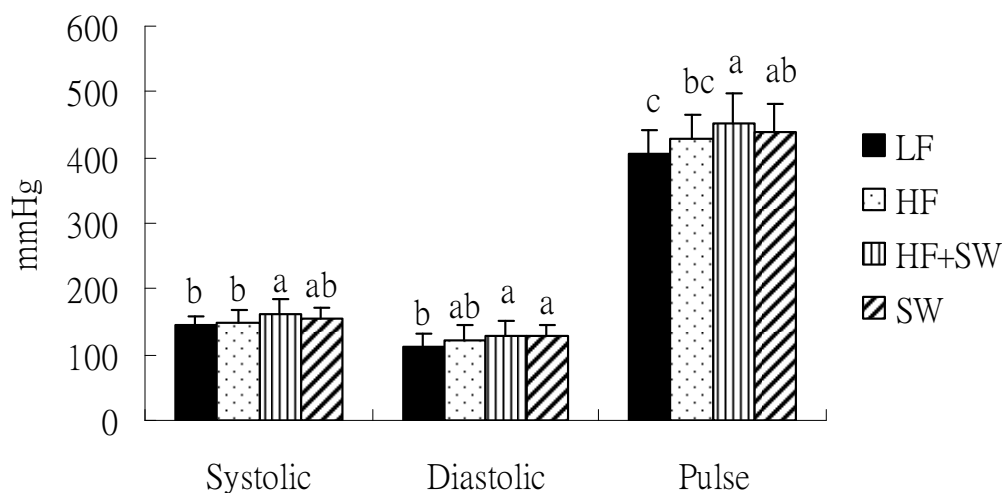


<i>p</i> values from Two-way ANOVA			
	fat	sugar	fat × sugar
ITT AUC	0.2908	0.0061	0.0364

圖 4-17 大鼠餵食試驗飲食第 5 個月時胰島素耐量試驗(ITT)葡萄糖曲線下面積

Fig 4-17 The areas under the curve for glucose (AUC) over 2h in the ITT of rats fed experimental diets for 5 months. Values are means  $\pm$  SD. *P*-values for fat, sugar and their interaction were analyzed by two-way ANOVA among LF, HF, HF+SW and SW groups. The significance of differences among the four groups was analyzed statistically by Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$





<i>p</i> values from Two-way ANOVA			
	fat	sugar	fat × sugar
Systolic	0.2330	0.0004	0.4918
Diastolic	0.2248	0.0178	0.2662
Pulse	0.0155	0.0002	0.7895

圖 4-18 大鼠餵食試驗飲食 5 個月之收縮壓(Systolic)、舒張壓(Diastolic)和脈搏(Pulse)

Fig 4-18 Systolic, diastolic and pulse of rats fed experimental diets for 5 months. Values are means  $\pm$  SD. *P*-values for fat, sugar and their interaction were analyzed by two-way ANOVA among LF, HF, HF+SW and SW groups. The significance of differences among the four groups was analyzed statistically by Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$ .

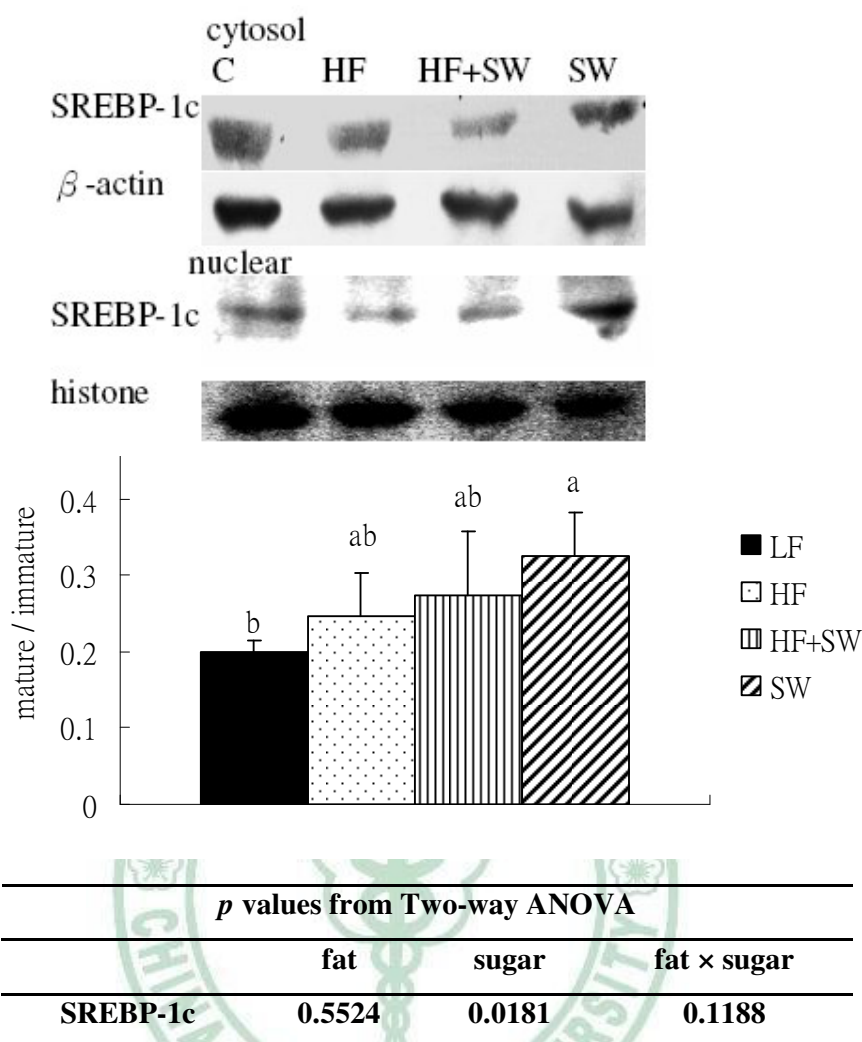


圖 4 - 19 以 Western bolt 分析大鼠餵食試驗飲食 5 個月之肝臟 mature (68 kD)/ immature (128 kD) SREBP-1c 蛋白質表現量

Fig 4-19 Western blot analysis of immature (membrane; 128 kDa) and mature (nuclear; 68 kDa) SREBP-1c protein in liver of rats fed experimental diets for 5 months. Values are means  $\pm$  SD. *P*-values for fat, sugar and their interaction were analyzed by two-way ANOVA among LF, HF, HF+SW and SW groups. The significance of differences among the four groups was analyzed statistically by Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$ .

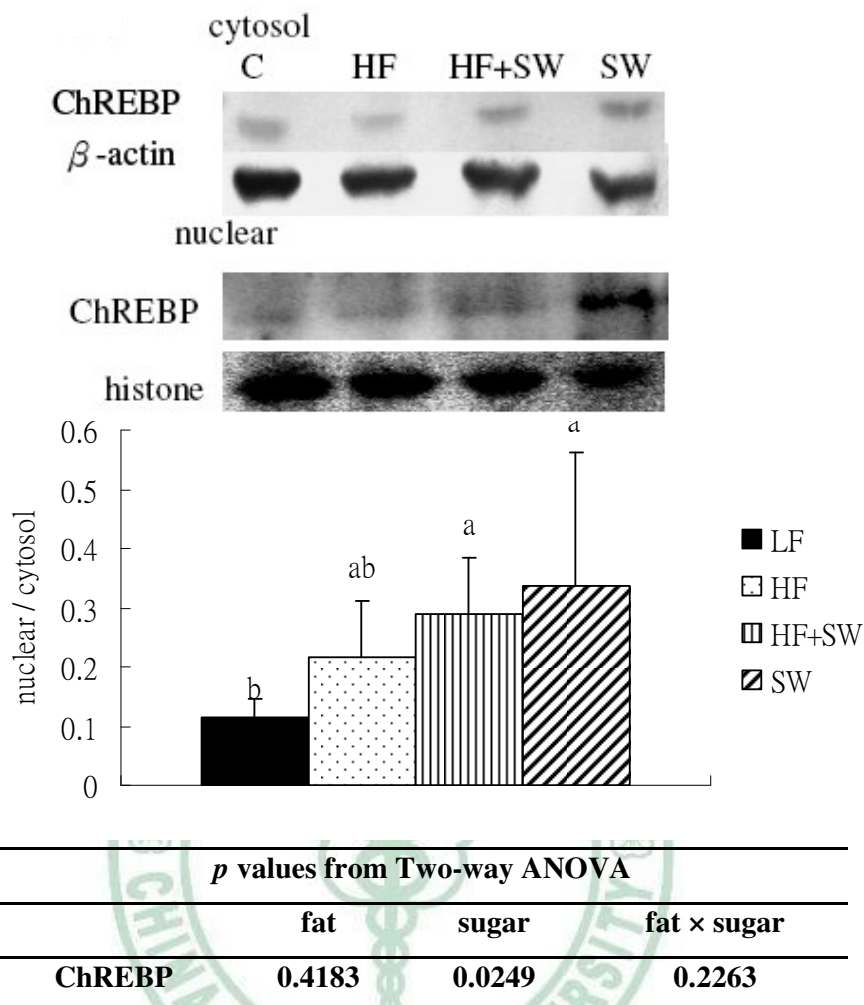
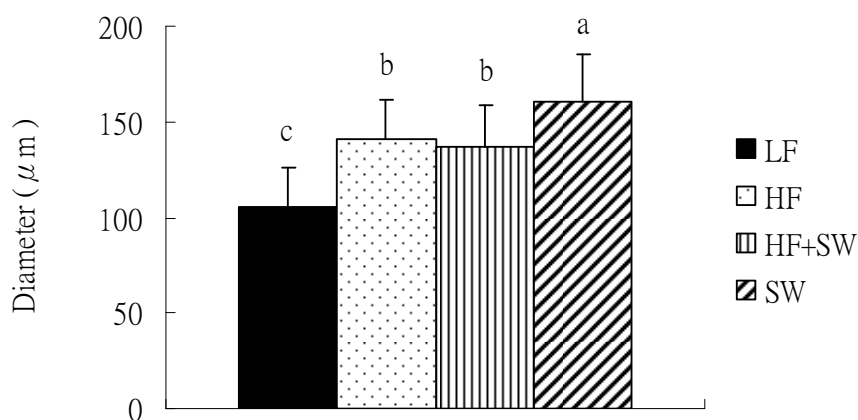
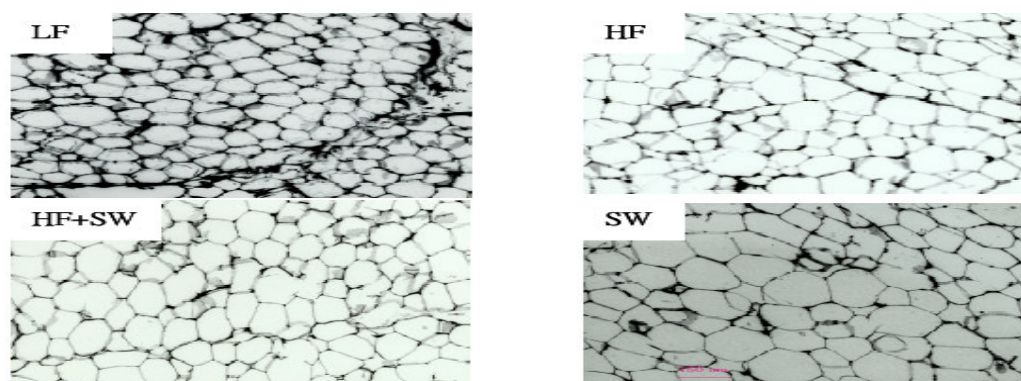


圖 4 - 20 以 Western bolt 定量分析大鼠餵食試驗飲食 5 個月之肝臟 nuclear / cytosol ChREBP 蛋白質表現量

Fig 4-20 Western blot analysis of nuclear and cytosol ChREBP protein in liver of rats fed experimental diets for 5 months. Values are means  $\pm$  SD. *P*-values for fat, sugar and their interaction were analyzed by two-way ANOVA among LF, HF, HF+SW and SW groups. The significance of differences among the four groups was analyzed statistically by Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$ .



<i>p</i> values from Two-way ANOVA			
	fat	sugar	fat × sugar
RE diameter	<0.0001	<0.0001	<0.0001

圖 4-21 大鼠餵食試驗飲食 5 個月之腹膜後脂肪組織切片與脂肪細胞平均直徑

Fig 4-21 Average diameter of adipocyte in retroperitoneal fat of rats fed experimental diets for 5 months. Values are means  $\pm$  SD. *P*-values for fat, sugar and their interaction were analyzed by two-way ANOVA among LF, HF, HF+SW and SW groups. The significance of differences among the four groups was analyzed statistically by Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$ .

表 4-6 大鼠餵食試驗飲食 5 個月之肝臟和脂肪組織內基因表現量<sup>1,2,3</sup>Table 4-6 The gene expression levels of rats fed experimental diets for 5 months.<sup>1,2,3</sup>

Treatment Group	LF	HF	HF / C	HF+SW	HF+SW / C	SW	SW / C	<i>p</i> value from Two-way ANOVA		
								fat	sugar	fat × sugar
<b>liver</b>										
FAS	1.04±0.35	1.52±0.81	0.57±0.27	1.05±0.03	0.60±0.31	2.27±1.00	0.36±0.21*	0.5707	0.7948	0.5392
ACC	1.03±0.31	1.50±0.65	1.04±0.44	1.26±0.19	1.02±0.43	1.60±0.77	1.01±0.56	0.7046	0.7012	0.2188
GK	1.00±0.10 <sup>b</sup>	0.84±0.18 <sup>b</sup>	6.81±0.35*	2.43±1.22 <sup>a</sup>	6.35±1.19	1.03±0.32 <sup>b</sup>	3.91±0.10*	0.2176	0.0562	0.0647
<b>adipose tissue</b>										
Adiponectin	1.04±0.23	0.90±0.20	1.94±0.81	0.59±0.32	0.82±0.5	0.91±0.12	1±0.66	0.1764	0.1464	0.5122
TNF- $\alpha$	1.03±0.27 <sup>b</sup>	3.71±2.07 <sup>a</sup>	0.91±0.08*	4.20±5.11 <sup>ab</sup>	2.09±0.61	1.09±0.38 <sup>b</sup>	0.40±0.25	0.0078	0.7538	0.623
Resistin	1.06±0.38 <sup>b</sup>	4.54±0.81 <sup>a</sup>	3.05±0.29*	3.25±3.34 <sup>a</sup>	1.36±1.29	0.88±0.11 <sup>b</sup>	0.58±0.16	0.0001	0.1453	0.2897
PAI-1	1.03±0.25 <sup>c</sup>	7.84±1.34 <sup>a</sup>	0.75±0.52*	2.23±1.07 <sup>bc</sup>	1.87±0.76	2.87±1.21 <sup>b</sup>	1.44±0.80	0.0306	0.4569	0.0003
Leptin	1.11±0.55 <sup>b</sup>	3.15±0.45 <sup>a</sup>	0.37±0.20*	2.22±0.07 <sup>ab</sup>	2.05±0.56	2.96±1.61 <sup>ab</sup>	1.08±1.01	0.0430	0.4131	0.0312
Mest	1.07±0.39 <sup>a</sup>	0.69±0.34 <sup>ab</sup>	0.75±0.52	0.49±0.23 <sup>b</sup>	1.87±0.76*	0.52±0.26 <sup>b</sup>	1.44±0.80*	0.1419	0.0110	0.1859

<sup>1</sup>mRNA levels of target genes were normalized to 36B4.. The mRNA level is expressed as a fraction of that in the LF group assigned a value of 1

<sup>2</sup>Values are means  $\pm$  SD. *P*-values for fat, sugar and their interaction were analyzed by two-way ANOVA among LF, HF, HF+SW and SW groups. The significance of differences among the four groups was analyzed statistically by Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letter are significantly different, *p* < 0.05. The significance of differences between the induced group and shift group (HF vs, HF/C; HF+SW vs. HF+SW/C; SW vs. SW/C) respectively was analyzed statistically by Student's *t* tests, \**P* < 0.05.

<sup>3</sup>FAS : fatty acid synthase ; ACC : acetyl-CoA carboxylase ; GK : glucokinase ; TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor- $\alpha$  ; PAI-1 : plasminogen activated inhibitor-1 ; Mest : mesoderm specific transcript.

表 4-7 四組小鼠之攝食、飲水和能量攝取<sup>1</sup>Table 4-5 Food, water and calory intake of mice in four groups.<sup>1</sup>

Treatment Group	LF	HF	HF+SW	SW
number	15	15	15	15
Food intake (g/d)	3.3	2.1	1.03	1.9
Water intake (mL/d)	4.28	4.31	11.5	10.91
Total Calory intake (Kcal/d)	11.22	10.54	18.98	19.55

<sup>1</sup> Calory content for chow diet: 3.4 kcal/g; for high fat diet: 5 kcal/g; for sucrose-containing drinking water : 1.2 kcal/mL.

表 4-8 小鼠餵食試驗飲食 5 個月之初、終體重及體重增加量<sup>4</sup>

Table 4-8 The initial and final body weight and body weight gain of mice fed experimental diets for 5 months

Treatment Group	LF	HF	HF+SW	SW	<i>p</i> values from Two-way ANOVA		
					fat	sugar	fat × sugar
<sup>1</sup> Initial body weight (g)	20.5±0.67 <sup>b</sup>	22.53±1.02 <sup>a</sup>	22.5±1.05 <sup>a</sup>	22.5±0.99 <sup>a</sup>			
<sup>2</sup> Final body weight (g)	26.16±1.24 <sup>c</sup>	36.98±1.87 <sup>a</sup>	37.42±4.63 <sup>a</sup>	32.39±3 <sup>b</sup>	<0.0001	0.0022	0.0071
<sup>3</sup> Body weight gain (g / d)	0.03±0.01 <sup>c</sup>	0.09±0.01 <sup>a</sup>	0.10±0.03 <sup>a</sup>	0.06±0.02 <sup>b</sup>	<0.0001	0.0151	0.0294

<sup>1</sup>Initial body weight : at 0 month (n=15 for LF, HF, HF+SW and SW)

<sup>2</sup>Final body weight : at 5 month (n=15 for LF, HF+SW ; n=7 for HF, SW)

<sup>3</sup>Body weight gain : ( final body weight-initial body weight) / 150d. Values are means ± SD.

<sup>4</sup>*P*-values for fat, sugar and their interaction were analyzed by two-way ANOVA among LF, HF, HF+SW and SW groups. The significance of differences among the four groups was analyzed statistically by Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letter are significantly different, *p* < 0.05.

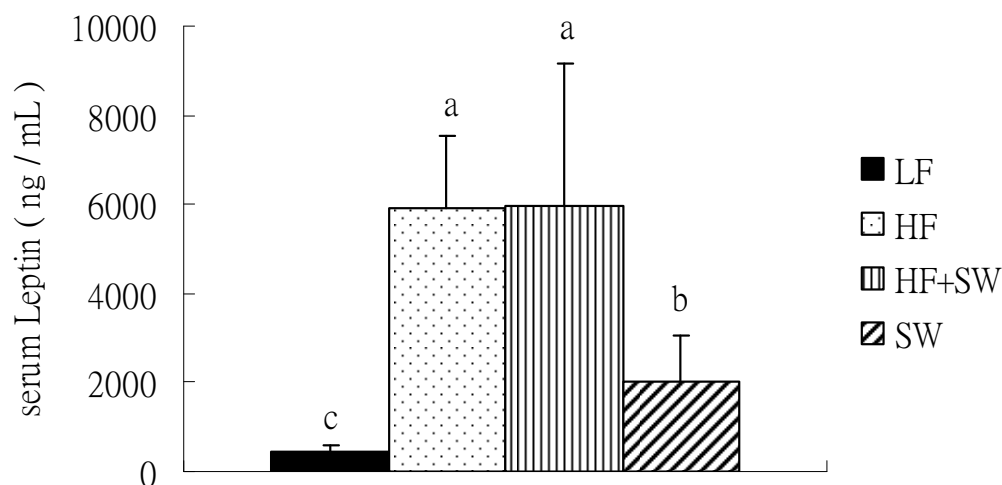
表 4-9 小鼠餵食試驗飲食 5 個月之絕對與相對組織重<sup>1</sup>

Table 4-9 The absolute and relative tissue weights of mice fed experimental diets for 5 months.

Treatment Group	LF	HF	HF+SW	SW	<i>p</i> values from Two-way ANOVA		
					fat	sugar	fat × sugar
<b>Liver</b>							
liver (g)	1.14±0.13 <sup>c</sup>	1.40±0.22 <sup>b</sup>	1.84±0.50 <sup>a</sup>	1.39±0.13 <sup>a</sup>	<0.0001	0.0007	0.6619
liver weight/final body weight×100%	4.8±0.49 <sup>a</sup>	3.99±0.45 <sup>b</sup>	5.02±0.52 <sup>a</sup>	4.58±0.26 <sup>a</sup>	0.4017	0.0110	0.0010
<b>Adipose tissue</b>							
subcutaneous (g)	0.33±0.15 <sup>c</sup>	1.75±0.59 <sup>a</sup>	1.65±0.55 <sup>ab</sup>	1.24±0.66 <sup>b</sup>	<0.0001	0.0175	0.0028
subcutaneous weight/final body weight×100%	1.41±0.62 <sup>b</sup>	5.00±1.68 <sup>a</sup>	4.88±1.22 <sup>a</sup>	4.11±21.10 <sup>a</sup>	<0.0001	0.0041	0.0021
epididymal fat (g)	0.45±0.19 <sup>c</sup>	1.88±0.29 <sup>a</sup>	1.64±0.51 <sup>a</sup>	1.13±0.33 <sup>b</sup>	<0.0001	0.0207	0.0002
epididymal fat weight/final body weight×100%	1.92±0.70 <sup>c</sup>	5.35±0.61 <sup>a</sup>	4.81±1.00 <sup>a</sup>	3.30±0.36 <sup>b</sup>	<0.0001	0.0045	<0.0001
retroperitoneal fat (g)	0.13±0.04 <sup>c</sup>	0.65±0.12 <sup>a</sup>	0.55±0.20 <sup>b</sup>	0.43±0.16 <sup>b</sup>	<0.0001	0.0807	0.0004
retroperitoneal fat weight/final body weight×100%	0.54±0.16 <sup>c</sup>	1.91±0.25 <sup>a</sup>	1.65±0.48 <sup>ab</sup>	1.41±0.47 <sup>b</sup>	<0.0001	0.0244	<0.0001

<sup>1</sup>Values are means ± SD. *P*-values for fat, sugar and their interaction were analyzed by two-way ANOVA among LF, HF, HF+SW and SW groups. The significance of differences among the four groups was analyzed statistically by Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letter are significantly different, *p* < 0.05.

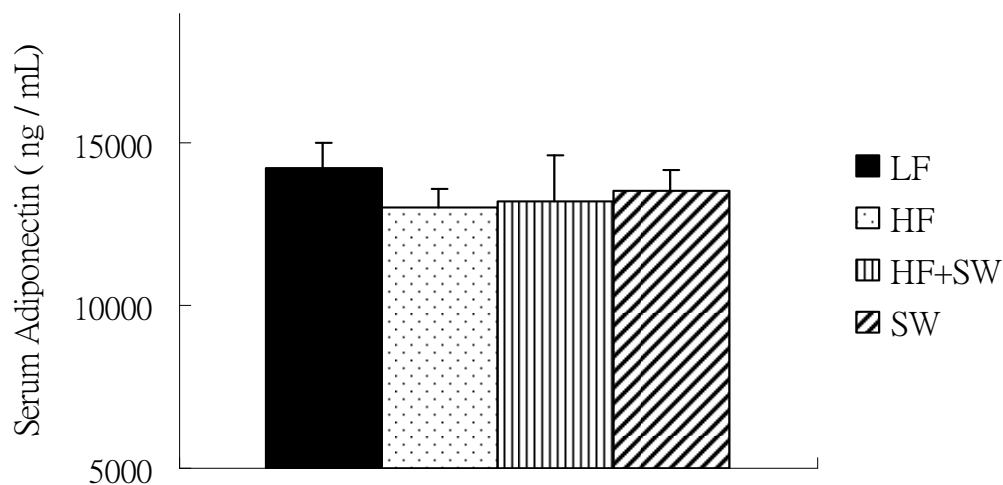




<i>p</i> values from Two-way ANOVA			
	fat	sugar	fat × sugar
5 month	<0.0001	0.0021	0.0010

圖 4-22 小鼠餵食試驗飲食第 5 個月時禁食血清 Leptin

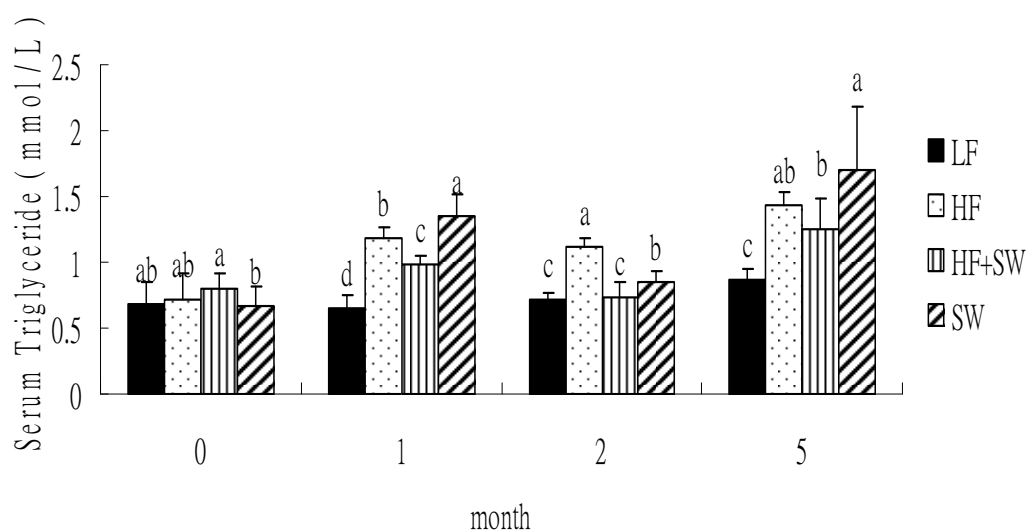
Fig 4-22 The fasting serum leptin levels of mice fed experimental diets for 5 months. Values are means  $\pm$  SD. *P*-values for fat, sugar and their interaction were analyzed by two-way ANOVA among LF, HF, HF+SW and SW groups. The significance of differences among the four groups was analyzed statistically by Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$ .



<i>p</i> values from Two-way ANOVA			
	fat	sugar	fat × sugar
5 month	0.1441	0.5667	0.4086

圖 4-23 小鼠餵食試驗飲食第 5 個月時禁食禁食血清 Adiponectin

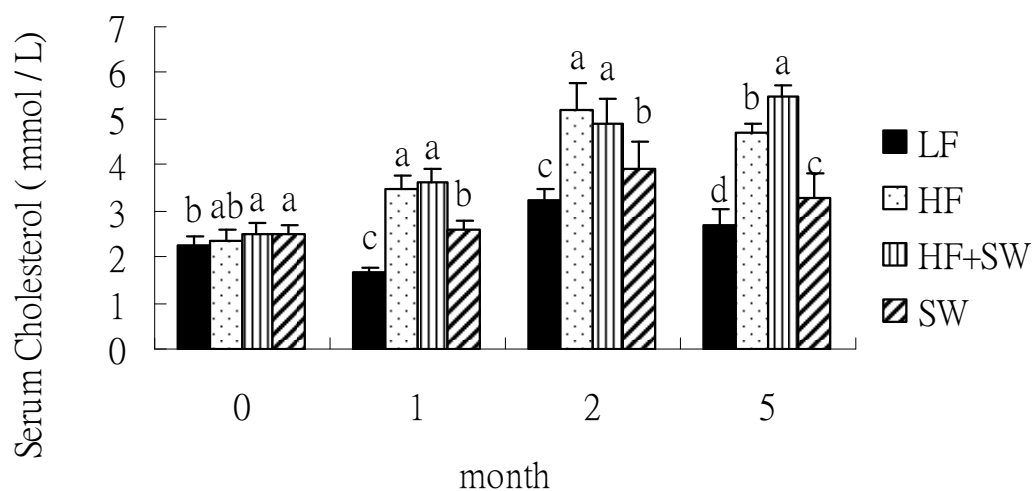
Fig 4-23 The fasting serum adiponectin levels of mice fed experimental diets for 5 months. Values are means  $\pm$  SD. *P*-values for fat, sugar and their interaction were analyzed by two-way ANOVA among LF, HF, HF+SW and SW groups. The significance of differences among the four groups (LF, HF, HF +SW and SW) was analyzed statistically by Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$ .



<i>p</i> values from Two-way ANOVA			
	fat	sugar	fat × sugar
1 month	0.0023	<0.0001	<0.0001
2 month	0.0009	<0.0001	<0.0001
5 month	0.0572	0.0116	<0.0001

圖 4-24 小鼠餵食試驗飲食第 0、1、2 和 5 個月時禁食血清 Triglyceride (TG)

Fig 4-24 The fasting serum triglyceride levels of mice fed experimental diets for 0, 1, 2 and 5 months. Values are means  $\pm$  SD. *P*-values for fat, sugar and their interaction were analyzed by two-way ANOVA among LF, HF, HF+SW and SW groups. The significance of differences among the four groups was analyzed statistically by Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$ .



<i>p</i> values from Two-way ANOVA			
	fat	sugar	fat × sugar
1 month	<0.0001	<0.0001	<0.0001
2 month	<0.0001	0.0817	0.0010
5 month	<0.0001	<0.0001	0.3793

圖 4-25 小鼠餵食試驗飲食第 0、1、2 和 5 個月時禁食血 Cholesterol (TC)

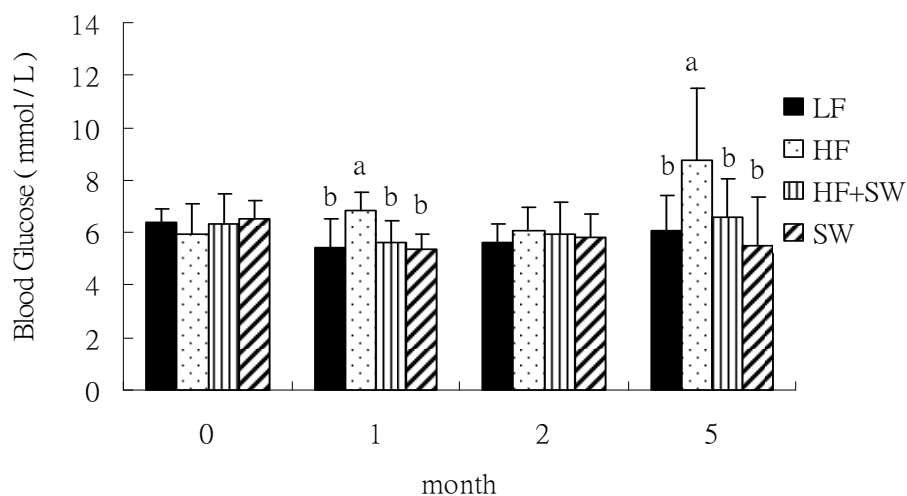
Fig 4-25 The fasting serum cholesterol levels of mice fed experimental diets for 0, 1, 2 and 5 months. Values are means  $\pm$  SD. *P*-values for fat, sugar and their interaction were analyzed by two-way ANOVA among LF, HF, HF+SW and SW groups. The significance of differences among the four groups was analyzed statistically by Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$ .

表 4-10 小鼠餵食試驗飲食 5 個月之肝臟、肌肉內脂質含量<sup>1</sup>

Table 4-8 The absolute and relative liver and muscle lipid concentrations of mice fed experimental diets for 5 months.

Treatment Group	LF	HF	HF+SW	SW	<i>p</i> values from Two-way ANOVA		
					fat	sugar	fat × sugar
<b>Liver</b>							
TG mg/total liver	14.41±1.84 <sup>b</sup>	18.56±5.43 <sup>ab</sup>	24.3±7.16 <sup>a</sup>	21.89±8.40 <sup>a</sup>	0.0894	0.0094	0.7174
TG mg/g liver	12.27±1.92	13.2±3.32	13.5±3.53	15.76±5.49	0.5758	0.2411	0.2498
TC mg/total liver	7.98±1.33 <sup>c</sup>	16.05±8.01 <sup>b</sup>	26.00±7.24 <sup>a</sup>	11.43±4.63 <sup>bc</sup>	<0.0001	0.0065	0.1842
TC mg/g liver	6.77±1.34 <sup>b</sup>	10.19±4.34 <sup>a</sup>	12.59±5.0 <sup>ab</sup>	10.03±5.86 <sup>ab</sup>	0.0245	0.1157	0.8244
<b>Muscle</b>							
TG mg/total muscle	0.08±0.06 <sup>b</sup>	0.15±0.03 <sup>a</sup>	0.11±0.37 <sup>ab</sup>	0.14±0.03 <sup>a</sup>	0.0214	0.0519	0.0088
TG mg/g muscle	0.88±0.70 <sup>b</sup>	1.66±0.16 <sup>a</sup>	1.42±0.32 <sup>a</sup>	1.76±0.28 <sup>a</sup>	0.0800	0.0554	0.0006

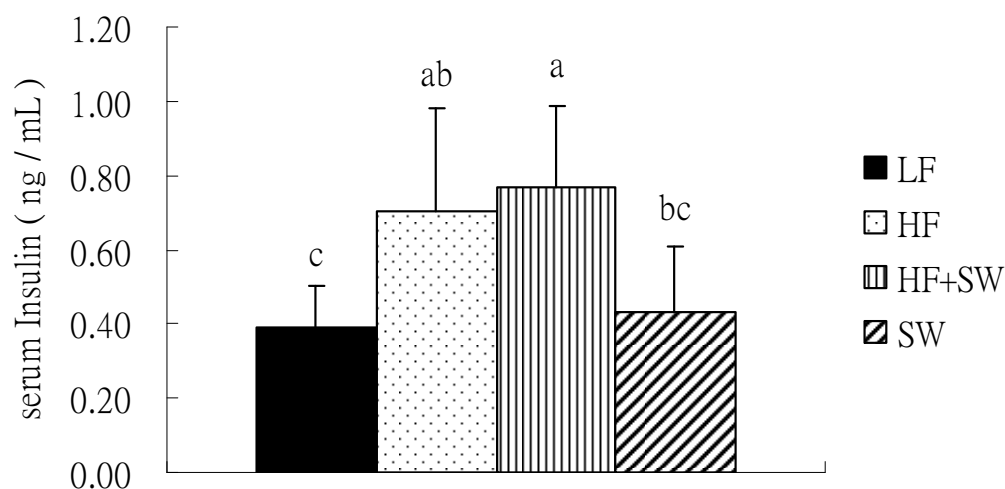
<sup>1</sup>Values are means ± SD. *P*-values for fat, sugar and their interaction were analyzed by two-way ANOVA among LF, HF, HF+SW and SW groups. The significance of differences among the four groups was analyzed statistically by Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letter are significantly different, *p* < 0.05.



<i>p</i> values from Two-way ANOVA			
	fat	sugar	fat × sugar
1 month	0.0004	0.0062	0.0077
2 month	0.2423	0.8674	0.6019
5 month	0.0014	0.0032	0.0451

圖 4-26 小鼠餵食試驗第 0、1、2 和 5 個月時禁食血清葡萄糖

Fig 4-26 The fasting blood glucose levels of mice fed experimental diets for 0, 1, 2 months. The fasting serum glucose levels of mice fed experimental diets for 5 month. Values are means  $\pm$  SD. *P*-values for fat, sugar and their interaction were analyzed by two-way ANOVA among LF, HF, HF+SW and SW groups. The significance of differences among the four groups was analyzed statistically by Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$ .



<i>p</i> values from Two-way ANOVA			
	fat	sugar	fat × sugar
5 month	0.0030	0.5697	0.8894

圖 4-27 小鼠餵食試驗第 5 個月時禁食血清胰島素

Fig 4-27 Fasting serum insulin levels of mice fed experimental diets for 5 month. Values are means  $\pm$  SD. *P*-values for fat, sugar and their interaction were analyzed by two-way ANOVA among LF, HF, HF+SW and SW groups. The significance of differences among the four groups was analyzed statistically by Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$ .

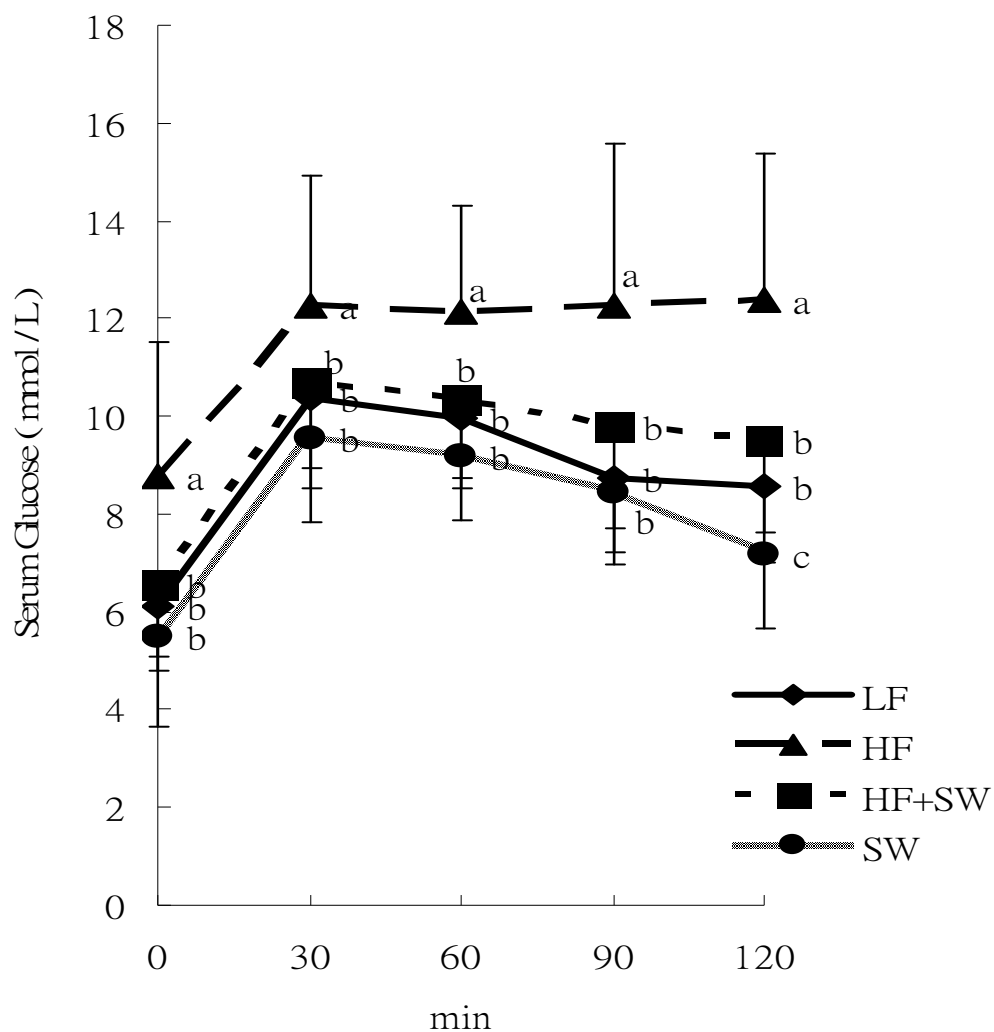
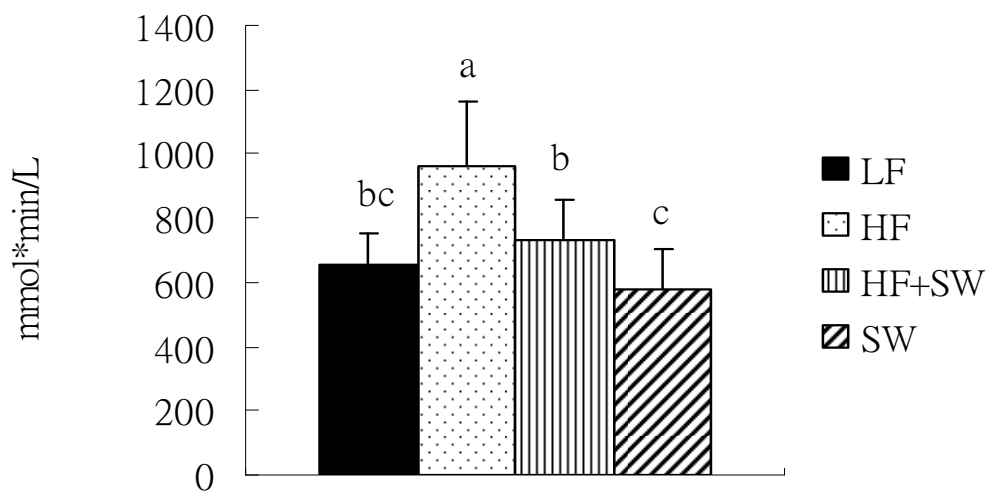


圖 4-28 小鼠餵食試驗飲食第 5 個月時葡萄糖耐量試驗

Fig 4-28 Oral glucose tolerance tests (OGTT) performed on mice fed experimental diets for 5 months. A glucose load was given and then, at the indicated time points, serum glucose levels were measured. Values are means  $\pm$  SD. The significance of differences among the four groups was analyzed statistically by Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$ .





<i>p</i> values from Two-way ANOVA			
	fat	sugar	fat × sugar
OGTT AUC	0.0003	0.0019	0.0951

圖 4-29 小鼠餵食試驗飲食第 5 個月時葡萄糖耐量試驗 (OGTT) 葡萄糖曲線下面積

Fig 4-29 The areas under the curve for glucose (AUC) over 2h in the OGTT of mice fed experimental diets for 5 months. Values are means  $\pm$  SD. *P*-values for fat, sugar and their interaction were analyzed by two-way ANOVA among LF, HF, HF+SW and SW groups. The significance of differences among the four groups was analyzed statistically by Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$ .

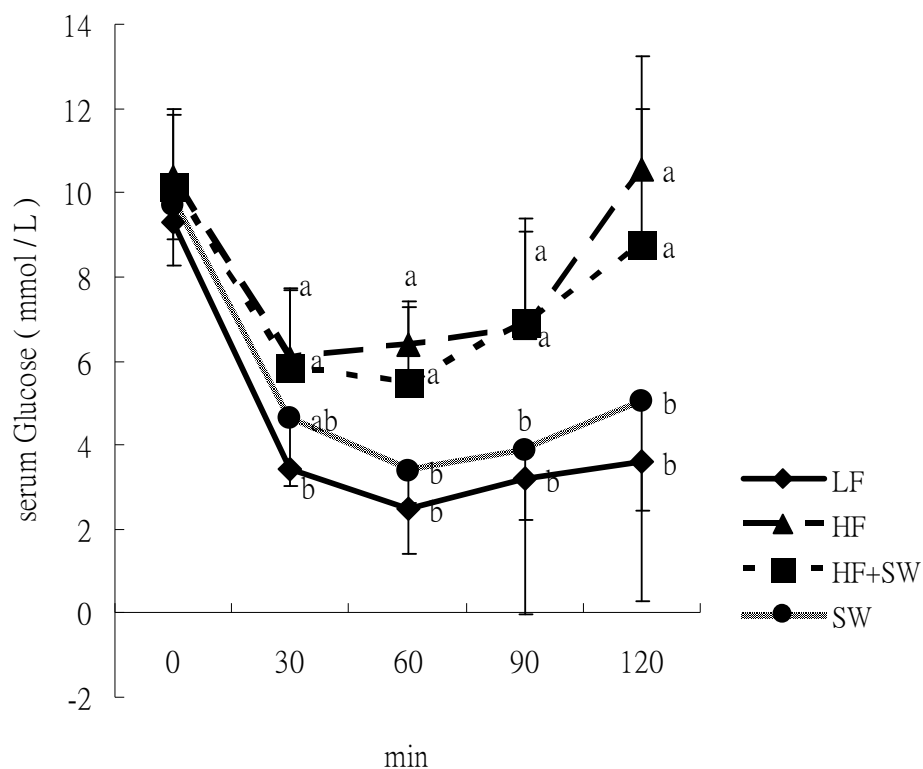
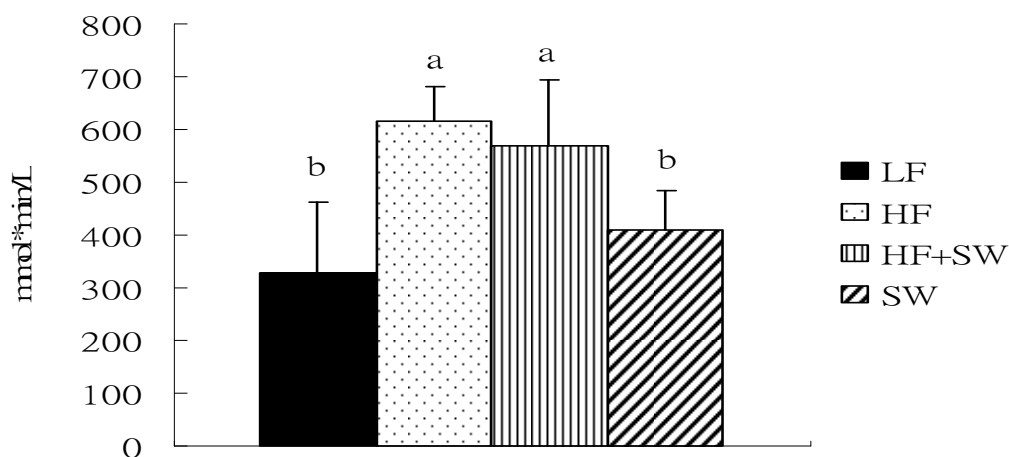


圖 4-30 小鼠餵食試驗飲食第 5 個月時胰島素耐量試驗

**Fig 4-30 Insulin tolerance tests (ITT) performed on mice fed experimental diets for 5 months. An insulin load was given and then, at the indicated time points, serum glucose levels were measured. Values are means  $\pm$  SD. The significance of differences among the four groups was analyzed statistically by Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$ .**



<i>p</i> values from Two-way ANOVA			
	fat	sugar	fat × sugar
ITT AUC	<0.0001	0.9265	0.1555

圖 4-31 小鼠餵食試驗飲食第 5 個月時胰島素耐量試驗 (ITT) 葡萄糖曲線下面積

Fig 4-31 The areas under the curve for glucose (AUC) over 2h in the ITT of rats fed experimental diets for 5 months. Values are means  $\pm$  SD. *P*-values for fat, sugar and their interaction were analyzed by two-way ANOVA among LF, HF, HF+SW and SW groups. The significance of differences among the four groups was analyzed statistically by Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$

表 4 - 11 小鼠餵食試驗飲食 5 個月之肝臟和脂肪組織內基因表現量<sup>1,2,3</sup>

Table 4 - 11 The gene expression levels of mice.

Treatment Group	LF	HF	HF+SW	SW	<i>p</i> value from Two-way ANOVA		
					fat	sugar	fat × sugar
liver							
PEPCK	1.04±0.30 <sup>bc</sup>	2.02±1.11 <sup>a</sup>	1.43±0.77 <sup>ab</sup>	0.53±0.29 <sup>c</sup>	0.0407	0.0126	0.1190
ACO	1.22±0.78 <sup>b</sup>	2.99±1.55 <sup>a</sup>	1.43±0.73 <sup>b</sup>	1.27±0.34 <sup>b</sup>	0.0356	0.0917	0.0752
CPT-1	1.11±0.66 <sup>c</sup>	2.82±0.98 <sup>b</sup>	4.78±0.61 <sup>a</sup>	1.71±0.42 <sup>c</sup>	0.0005	0.0926	0.0574
adipose tissue							
TNF- $\alpha$	1.05±0.36	1.54±0.06	1.85±0.63	1.83±0.93	0.2512	0.0721	0.4316
Resistin	1.06±0.44	1.48±0.66	1.61±0.77	1.26±0.46	0.2313	0.5741	0.9116
PAI-1	1.07±0.44 <sup>b</sup>	7.46±4.54 <sup>a</sup>	2.39±0.32 <sup>b</sup>	6.57±1.54 <sup>a</sup>	0.06847	0.0608	<0.0001
Leptin	1.13±0.70 <sup>c</sup>	6.41±0.83 <sup>b</sup>	14.61±2.46 <sup>a</sup>	4.47±1.20 <sup>b</sup>	<0.0001	<0.0001	0.0135
Mest	1.10±0.46 <sup>b</sup>	3.97±1.34 <sup>a</sup>	2.23±0.79 <sup>b</sup>	2.30±0.28 <sup>b</sup>	0.0104	0.4026	0.0006

<sup>1</sup>mRNA levels of target genes were normalized to 36B4. The mRNA level is expressed as a fraction of that in the LF group assigned a value of 1.

<sup>2</sup>Values are means  $\pm$  SD. *P*-values for fat, sugar and their interaction were analyzed by two-way ANOVA among LF, HF, HF+SW and SW groups. The significance of differences among the four groups was analyzed statistically by Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letter are significantly different, *p* < 0.05.

<sup>3</sup>PEPCK : phosphoenolpyruvate carboxykinase ; ACO : acyl CoA oxidase ; CPT-1 : carnitine palmitoyl CoA transferase 1 ; TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor- $\alpha$  ; PAI-1 : plasminogen activated inhibitor-1 ; Mest : mesoderm specific transcript.

## 第五章 討論

已知肥胖與代謝相關疾病的發生受基因與環境因子交互作用，本實驗結果顯示高油飲食和含糖飲料攝取均會增加代謝症候群發生危險，但不同基因背景的 Wistar 大鼠與 C57BL/6J 小鼠對高油飼料和蔗糖飲水誘發代謝症候群有不同敏感性，前者對含糖飲料較敏感，攝取五個月成功誘發肥胖、腹部脂肪堆積、高 leptin 血症、肝脂堆積、肌肉內脂質堆積、高尿酸血症、高脂血症、高血糖、高胰島素血症、葡萄糖不耐、胰島素抵抗、高血壓等症狀；後者對高油飲食較敏感，攝取五個月成功誘發肥胖、腹部脂肪堆積、高 leptin 血症、肝脂堆積、肌肉內脂質堆積、高脂血症、高血糖、高胰島素血症、葡萄糖不耐、胰島素抵抗等症狀，這些結果整理於表 5-1。高油飲食在大鼠只成功誘發肥胖和高胰島素血症，不能明顯誘發高脂血症、高血糖、葡萄糖不耐和胰島素抵抗，糖水在小鼠只能誘發肥胖與高血脂，不能明顯誘發高血糖、高胰島素血症、葡萄糖不耐和胰島素抵抗，Two-way ANOVA 結果顯示高油飲食加上糖水攝取並不會更進一步惡化症狀。

由攝食的狀況可以看出不論大小鼠 HF+SW 和 SW 飼料攝食的量較少，但總熱量的攝取卻分別比 HF 及 LF 多，這是因為 HF+SW 和 SW 有大部份熱量來源來自糖水。已知含糖飲料引起的飲食代償反應 (dietary compensatory response) 較弱，容易導致正能量平衡並引起肥胖 (86)。Dimeglio & Mattes (95) 以液態(含糖飲料)和固態(糖果)型式額外提供人體熱量，結果發現以固體型式提供的額外熱量會引起明顯的飲食待償反應，受試者自動減少食物攝取，熱量恆定精確的被控制；反之以液體型式提供的額外熱量無法誘出待償反應，累積的多餘熱量一段時間後造成受試者體重增加。本實驗之大、小鼠在提供糖水這項額外熱量來源後雖然飼料攝取降低，但減少的量不足以彌補來自糖水大量增加的熱量，造成總熱量攝取增加。相對的高脂飲食(熱量密度高於正常飼料)組可見飼料攝取降低，尤其在小鼠最明顯，攝食量被體內機制精確調控，以致總熱量攝取接近正常對照。但出乎意外的是，在小鼠 HF 組雖然沒有較高的熱量攝取卻出現顯著的肥胖及代謝失調症狀，反應更甚於在四組中熱量攝取最高的 SW 組。同樣的在大鼠也印證總熱量攝取並不是決定肥胖及代謝

疾病發生唯一因素，因為在大鼠有最高能量攝取的 HF+SW 組誘發代謝症候群效果並不大於 SW 組。

Aguilera 等人在 2004(66)年的研究當中，使用 30% sucrose-induced model，也是給予 Wistar 大鼠 30% 蔗糖加入飲水當中（為期 21 週），體重、腹部脂肪等相較於對照組皆顯著性的增加，因此我們仿照 Aguilera 的糖水模式來誘導，結果和他們的一致。而 2006 年 Sumiyoshi 等人(63)在建立高糖飲食模式誘導代謝症候群時，是給予 C57BL/6J 小鼠 50% 蔗糖添加於飼料當中（為期 55 週），卻無法誘使小鼠肥胖與體脂增加。這項矛盾的結果印證高糖來自固體食物或液體飲料有不同後果，正如 Dimeglio & Mattes (95)提出飲食代償反應來自含糖飲料不似來自含糖固體食物明顯，在 Sumiyoshi 的實驗顯示高糖飼料餵食的小鼠並沒有較高的熱量攝取，因此也沒有明顯的肥胖發生。此外本實驗結果顯示供應糖水之動物其飼料(唯一營養來源)攝取只有對照組之一半，表示除了碳水化合物之外其餘的營養素相對攝取不足，推測除熱量過剩外，營養素不足也可能促進代謝症候群的發生。在高脂的誘發飲食我們是仿照 Hsu & Huang (96)的模式，利用 30% butter oil 添加於飼料，而不論在 Hsu & Huang 的結果或本實驗均顯示此種高飽和脂肪酸組成的飲食可成功誘發肥胖。

在本實驗我們採用組織切片法觀察大鼠脂肪細胞大小（圖 4-21），腹膜後脂肪（RE）細胞直徑在誘導組與 LF 相比皆有顯著的差異，脂肪細胞明顯的增大，在三組中尤以 SW 最大，由此可知高油或糖水給予大鼠會促進脂肪細胞脂質堆積而肥大(Hypertrophy)。由於脂肪細胞也是屬於分泌器官，許多文獻已證實當脂肪細胞肥大其所分泌的脂肪細胞激素量亦會異常而使體內的代謝不平衡。我們測了血漿 leptin 與 adiponectin 濃度，只有血漿 leptin 符合預期，在三組誘導組均有顯著增加；但 adiponectin 並沒有如預期的因為脂肪細胞肥大而分泌量降低。在大鼠副睪脂內的脂肪細胞激素的基因表現量（表 4-6）：adiponectin 四組也皆無顯著差異，與血清 adiponectin 濃度結果一致；leptin mRNA 在 HF 顯著高於 LF，HF+SW 與 SW 也有高於 LF 趨勢，此結果與血清 leptin 濃度相符；TNF- $\alpha$ 、resistin、PAI-1 的 mRNA 則是在 HF 中表現量較高，HF+SW 的 resistin 及 SW 組的 PAI-1 mRNA 也有增加。

這些結果顯示肥大的脂肪細胞的確伴隨有脂肪細胞激素分泌異常現象，此可能導致胰島素傳訊不正常及增加血栓生成機會(見後)。

小鼠我們並未測量脂肪細胞大小，但推測誘導組也有脂肪細胞肥大情形。已知血清 leptin 濃度反映體脂堆積程度，高油飲食或糖水皆會使得小鼠血清中 leptin 濃度增高(圖 4-22)，試驗在第 5 個月時，只要有高油給予的小鼠血清中 leptin 濃度高於糖水給予的小鼠約 3 倍，高於對照組約 12 倍。測量小鼠副睪脂內的脂肪細胞激素的基因表現量(表 4-11): leptin mRNA 在誘導組亦顯著高於 LF; PAI-1 mRNA 則是在 HF 和 SW 中表現量較高。在小鼠同樣觀察到誘導組有異常的脂肪細胞激素基因表現。一般認為脂肪細胞激素的分泌失衡和胰島素抵抗、心血管疾病、高血壓等代謝性疾病相關。

由於許多的人體試驗建議血液中 adiponectin 濃度減少也是代謝症候群發生的指標之一(24, 33, 70)，在肥胖者的個體內 adiponectin 濃度減少，而 adiponectin 的分泌量減少是和胰島素的訊息傳遞受阻是有關的。我們的試驗結果無論大鼠或小鼠皆無法以飲食誘發出低濃度的 adiponectin；在飲食為期 5 個月的誘發下，接受高油飲食或糖水的大鼠血清 adiponectin 濃度與對照組無顯著差異(圖 4-3)。在小鼠三組誘導組與對照組相較血清 adiponectin 濃度也沒有顯著的差異(圖 4-23)，在 2006 年 Sumiyoshi 等人(63)建立為期 55 週高脂飲食(45% milk fat)或高糖飲食(50% 蔗糖添加於飼料)誘發代謝症候群模式的小鼠中，血清 adiponectin 與對照組相比也無顯著性差異，因此排除我們誘導時間不夠久(21 週)的因素，可能 adiponectin 的改變發生於初期，或者在鼠類誘發代謝症候群的過程中 adiponectin 不是一個明顯的指標。

MEST 近來發現在小鼠似乎可做為肥胖的指標，也就是與脂肪細胞的大小相關(91)。本研究結果顯示 Mest mRNA 的表現量在肥胖的大鼠和小鼠有不同的結果，在小鼠 HF 組的 Mest mRNA 表現量顯著高於 LF，HF+SW 與 SW 雖與 LF 無顯著差異，但也有較高趨勢，此結果與文獻相符--飲食誘發肥胖小鼠脂肪組織有較高 Mest

基因表現(92)，也暗示了三組誘發組脂肪細胞有肥大情形。而大鼠的 *Mest* 基因表現在 HF+SW 與 SW 顯著的低於 LF，HF 則是與 LF 無顯著差異，完全不符合體脂堆積結果，由於目前 *Mest* 與脂肪細胞肥大相關文獻研究皆用小鼠(91-93, 97, 98)，*Mest* 在大鼠是否與脂肪細胞肥大有關或者 *MEST* 蛋白質在脂肪細胞的功能目前為止並不清楚。

在大鼠可觀察到糖水給食組有顯著的高血脂與肝脂堆積發生，不只 TG 也包括 cholesterol，由於 SW 組攝取的是 chow diet (內含 4.5% crude fat)，且大部份熱量來源是蔗糖水，因此體內大量堆積的 TG 與 cholesterol 推測應多數來自內生性合成。為證明此假設，我們將大鼠在飽食狀態下犧牲，測定肝臟 SREBP-1c 與 ChREBP 蛋白質在細胞核/細胞質分布。已知 SREBP-1c 與 ChREBP 是調控糖解、脂質生合成的相關基因表現之轉錄因子(90)，已知葡萄糖和胰島素會促進 SREBP-1c 表現增加，葡萄糖代謝物會促進 ChREBP 位移至細胞核並增加轉錄活性，蔗糖由於是雙糖(葡萄糖+果糖)，餵食糖水大幅增加葡萄糖 input，再加上 SW 組有高胰島素血症，因此很可能藉由增加 SREBP-1c 與 ChREBP 轉錄活性，促進肝臟 glycolysis 及 lipogenesis 途徑。我們的實驗結果證實 SW 組有最高的肝臟 SREBP-1c 與 ChREBP 蛋白質細胞核/細胞質比率。因此糖水給食確實活化了轉錄因子 SREBP-1c 與 ChREBP。

經由 SREBP-1c 與 ChREBP 活化，推測其下游基因 *FAS*、*ACC*、*GK* 表現增加，*GK* 是醣解酵素，結果增加 acetyl - CoA 產出，加上果糖代謝跳脫 phosphofructokinase 關卡，導致 acetyl-CoA 產出失控(74)，輔以增加的 *ACC* 及 *FAS*，將大幅促進肝臟內 TG 的生成，過多的 acetyl - CoA 也可能轉成 HMG-CoA 而增加了膽固醇生成。果糖雖不會直接活化 SREBP-1c，但會活化 PTP1B，PTP1B 會促進 SREBP-1c mRNA 表現增加(77)，最後促使肝中 *FAS*、*ACC*、*GK* 增加，且 PTP1B 會抑制 endoplasmic reticulum (ER-60) (cysteine protease)，進而抑制了 apoB 降解，最後促使肝臟釋出更多 VLDL 至血液當中，增加了血液中 TG 及 TC (99)。



我們的實驗結果顯示大鼠肝中 FAS 和 ACC 在各組中雖沒有顯著的差異，但在 SW 有增加的趨勢，且本實驗室已證明給予 30% 糖水的大鼠肝中 ACC 酵素活性確實有增加(圖 5-1)，已知 ACC 是催化細胞質中脂質生合成的關鍵步驟 (Rate limiting reaction) 之羧化反應，將受質 acetyl - CoA 反應生成產物 malonyl - CoA，而 malonyl - CoA 是 Fatty acid synthase (FAS) 必需受質，也是脂肪酸鏈延長的原料，當攝入過多葡萄糖轉成 TG 貯存時 ACC 尤其扮演重要角色，所以大鼠 SW 組的 ACC 和 FAS 基因表現量有增加的趨勢是符合預期的，也與 SREBP-1c 及 ChREBP 轉錄活性增加的結果一致，因為 FAS、ACC 與 GK 均是 SREBP 及 ChREBP 之 target genes。Glucokinase (GK) 在 HF+SW 也顯著高於 LF，SW 也有增加的趨勢，已知 GK 是肝臟中糖解步驟的第一個關鍵酵素，在飽食的狀態下，葡萄糖攝入增加，糖解作用旺盛，因此給予糖水的組別 GK 基因表現量增加。由此可知糖水的給予能夠藉由影響 SREBP-1c 及 ChREBP 細胞核細胞質分布進而增加 lipogenesis 與 glycolysis 途徑相關基因表現。由以上分子的層次來看，確實肝中脂質生合成與糖解相關基因受糖水刺激而增加，呼應肝脂堆積的部份，在血液中呈現了高 TG 與 TC。小鼠的 SW 組也出現顯著的高血脂及肝脂堆積，雖然我們沒有測定小鼠肝臟 SREBP 與 ChREBP，但相信與此分子機制有關。

高油飲食造成高血脂及肝脂堆積可能來源包括外源性飲食及內生性合成。高油的飼料組成份奶油(安佳動物奶油)本身含有膽固醇，加上奶油富含 SFA，相較於 PUFA 更易提高 SREBPs 轉錄活性，進而增加了肝中內生性的 TG 及膽固醇。再加上 SFA 活化 PPAR $\alpha$  的能力低於 PUFA，相對抑制了 fatty acid oxidation，促進 lipogenesis，肝中大量 TG 及 TC 堆積，使得 VLDL 產出率增加，相對的造成血液中高濃度的 TG 和 TC。

由於飲食的誘發造成肥胖，但由於肥胖造成脂質異常的代謝，脂質儲存到其他非脂肪組織，這樣的過程稱之為 lipotoxicity，過多的脂質囤積到肝臟或肌肉內則造成胰島素阻抗的現象，先前的研究指出肝臟、肌肉或脂肪組織內 TG 或 DAG 的堆積會造成 PI3K 的胰島素訊息傳遞受阻，而導致胰島素阻抗。而在 1991 年 Kraegen

等人(100)說明肝臟或脂肪組織先產生胰島素阻抗後，由於脂肪組織脂解旺盛，肝臟葡萄糖過度的釋出，最後導致肌肉內堆積大量脂質而走向胰島素阻抗。我們的實驗結果顯示大鼠的 SW 組有葡萄糖不耐及胰島素阻抗，小鼠的 HF 組有葡萄糖不耐及胰島素阻抗。大鼠雖然所有誘導組皆有肝脂堆積，但肌肉內 TG 堆積只發生在糖水給食組(SW 及 HF+SW)較明顯，顯示葡萄糖不耐及胰島素阻抗的確與肌肉 TG 堆積有關；小鼠肝臟 TG 堆積見於 SW 及 HF+SW 組，肌肉 TG 堆積見於 HF 及 SW 組，令人好奇的是雖然給食糖水的小鼠有最高的熱量攝取並造成顯著的肝臟與肌肉 TG 堆積及高三酸甘油酯血症，卻只有輕微肥胖(相較於 HF 及 HF+SW)且沒有明顯的胰島素阻抗。C57BL/6J 小鼠透過何種機制抵抗糖水誘發的不利影響(尤其在胰島素阻抗方面)值得探討。

由分子的層次來看，若是在胰島素阻抗的情況下，由於周邊組織對於葡萄糖汲取不良，則使肝中糖質新生作用增加，Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) 是肝臟負責 gluconeogenesis 之關鍵酵素，預期表現將會增加。而當肝細胞對於糖的利用不佳，則會促使細胞脂肪酸氧化旺盛以產生 ATP，Carnitine palmitoyl-transferase 1 (CPT-1) 是負責把游離脂肪酸帶入粒線體內行  $\beta$ -oxidation 之關鍵酵素；而 Acetyl-CoA oxidase (ACO) 是在過氧化體進行脂肪酸  $\beta$ -oxidation 第一步驟關鍵酵素，預期二者也可能增加。由我們的結果發現(表 4-11)，在小鼠 PEPCK 基因表現量以 HF 顯著高於 LF，SW 與 LF 無顯著差異數值甚至稍低，此結果和禁食血糖也是一致的，且和 OGTT、ITT 的結果相呼應，SW 並沒有因為糖水的刺激而引發葡萄糖不耐或胰島素阻抗。HF、HF+SW 中 CPT-1 的表現量顯著高於 LF，HF 的 ACO 表現量也顯著高於 LF，或許是由於長期的高油飲食狀態下小鼠發展出來的 adaptation response，因此增加了 CPT-1 與 ACO 的表現量，也有可能小鼠在高油飲食誘導下已具有胰島素阻抗情形，因此改變肝臟能量代謝途徑。本研究顯示給予高油的小鼠在禁食的狀態下有較高的醣質新生、脂質氧化代謝基因表現量。給予高油的小鼠亦呈現空腹高血糖或高胰島素血症的症狀，綜合 OGTT 及 ITT 結果，清楚顯示高油飲食才能誘發小鼠胰島素阻抗。前人研究將高蔗糖添加於飼料當中給予小鼠無法引發胰島素阻抗(63)，在我們的試驗中也發現給予糖水試驗

的小鼠並無法有效誘發胰島素阻抗。高油或糖水誘導胰島素阻抗在大小鼠呈現截然不同的結果，或許是和大小鼠的基因背景不同導致不同感受性。

由於飲食的誘發之下，肥胖、胰島素阻抗、脂肪細胞肥大而脂肪細胞激素分泌量異常等因素皆會造成血壓的上升，且在高糖或高油飲食挑戰下的大小鼠有高膽固醇、高三酸甘油酯血症的現象，這些膽固醇、三酸甘油酯堆積在血液中阻塞了血管壁，使血流通透性變小，造成血壓的上升，心輸出率增加，同時糖水（果糖）的攝取過量，造成血液內 uric acid 增加，高尿酸則會使得一氧化氮濃度減少，進而造成高血壓(79)。我們的實驗結果顯示血壓或是脈搏在 HF+SW 與 SW 皆是顯著的高於 LF，由此可知糖水給予較易誘發大鼠高血壓的現象。此外大鼠 SW 組的脂肪組織 PAI-1 mRNA 也顯著高於 LF（表 4-6），小鼠雖沒有測量血壓的部份，但 HF 與 SW 組的脂肪組織 PAI-1 mRNA 亦顯著高於 LF（表 4-11）。PAI-1 是一種 adipocytokines，它會抑制 tissue plasminogen activator (tPA)，使得纖維蛋白 (fibrinogen) 溶解作用受阻，增加血栓形成，因此從高血脂、高血壓、高 PAI-1 的結果，我們可預期兩種飲食因子均會提高動脈粥狀硬化及心血管疾病危險性。

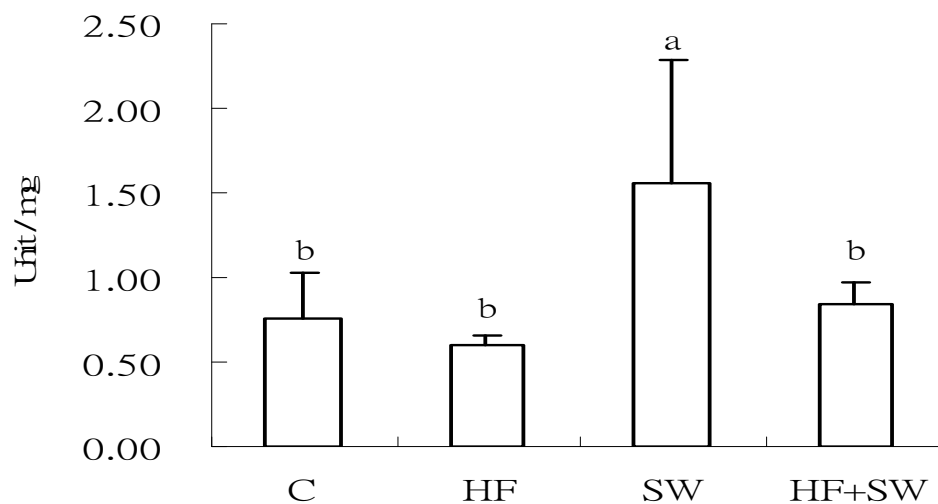
在大鼠因為糖水誘發代謝症候群效果顯著，所以進一步追蹤糖水如何誘導代謝症候群。有文獻指出蔗糖中的果糖誘發代謝症候群是經由 uric acid 增加(73, 101)，因此我們嘗試測定大鼠禁食血漿尿酸。結果顯示大鼠飲食誘導 5 個月時血清 Uric acid 高低依序為 SW > HF+SW > HF > LF，確定糖水給食的確會導致高尿酸血症。依據前人研究，其原因為大量攝入的糖水產生果糖，果糖增加了 lactate 產生，在代謝上過多的 lactate 與 uric acid 競爭，使得 uric acid 無法排除體外，而呈現高尿酸血症。血漿中尿酸的含量和血管舒張作用有關的一氧化氮有關，高尿酸則會使得一氧化氮濃度減少，進而造成高血壓(79)，而胰島素的濃度和一氧化氮也有關聯，因為胰島素的增加會使一氧化氮的 bioavailability 增加，促使血管擴張血流通透，使葡萄糖更順利的到達目的組織，相對的高尿酸反而使得一氧化氮濃度減少而增加了葡萄糖利用不良(78, 79)。

近年國內杯裝飲料市場大幅成長，消費人口快速增加，尤其在青少年常隨處可見人手一杯，這些含糖飲料大部分添加果糖或蔗糖，在大量攝取下常取代正餐，類似本實驗中的糖水給食模式，現證實糖水給食的確會增加代謝症候群危險，因此在含糖飲料市場快速增加的同時，其背後潛在的國民健康問題值得注意。

最後為觀察飲食誘導代謝症候群的症狀是否可逆，在飲食的誘發下第四個月時，將每組誘發組半數大鼠轉為吃 LF diet (chow diet + plain water) 為期一個月。在皮下脂肪方面 HF/C 與 HF+SW/C 顯著低於 HF 與 HF+SW (表 4-4)；血清 leptin 濃度 HF+SW/C 顯著低 HF+SW (圖 4-1)；血清 adiponectin 濃度雖然轉換組與誘導組無顯著差異，但濃度皆有上升的趨勢 (圖 4-3)；肝中的脂質堆積情形，HF/C 肝中 TC 顯著低於 HF (表 4-5)；血清中 TG 濃度 HF+SW/C 與 SW/C 顯著低於 HF 與 SW (圖 4-7)；血清中 TC、glucose、insulin 轉換組與誘導組無顯著差異，但 TC、glucose 有改善的趨勢，也許是轉換時間不夠久所以才無顯著的差異 (圖 4-9、11、13)；肝中 GK 基因表現量 HF/C 與 SW/C 顯著高於 HF 與 SW，HF+SW/C 也高於 HF+SW 只是無統計上的差異 (表 4-6)，或許飲食轉換後可增加葡萄糖的利用進行糖解作用；HF/C 在脂肪組脂中脂肪細胞激素基因表現量：TNF- $\alpha$ 、Resistin、PAI-1、Leptin 顯著低於 HF，HF+SW/C、SW/C 則與 HF+SW、SW 無顯著差異，但有降低的趨勢 (表 4-6)，由此可知高油飲食再轉為正常飲食後可降低脂肪細胞激素基因表現量。以上結果顯示代謝症候群因飲食的誘發後也可因飲食的修正而得到改善。

表 5-1 大、小鼠餵食試驗飲食 5 個月誘發之代謝症候群症狀

	rats			mice		
	HF	SW	HF+SW	HF	SW	HF+SW
肥胖	↑	↑	↑	↑	↑	↑
腹部脂肪堆積	↑	↑	↑	↑	↑	↑
高 leptin 血症	↑	↑ ↑	↑ ↑	↑		↑
肝脂堆積	↑	↑	↑	↑	↑	↑ ↑
肌肉內脂質堆積		↑	↑	↑	↑	↑
高 TG		↑	↑	↑	↑ ↑	↑
高 TC		↑		↑ ↑	↑	↑ ↑ ↑
高尿酸血症		↑		—	—	—
高禁食血糖		↑		↑		
高胰島素血症	↑	↑	↑	↑		↑ ↑
葡萄糖不耐		↑		↑		
胰島素阻抗		↑		↑		↑
高血壓		↑	↑	—	—	—



<i>p</i> values from Two-way ANOVA			
	fat	sugar	fat × sugar
ACC	0.0057	0.0052	0.1742

圖 5-1 大鼠餵食試驗飲食 5 個月之肝臟 ACC 活性

**Fig 5-1 Liver ACC activity of rats fed experimental diets for 5 months.** Values are means  $\pm$  SE. *P*-values for fat, sugar and their interaction were analyzed by two-way ANOVA among LF, HF, HF+SW and SW groups. The significance of differences among the four groups was analyzed statistically by Duncan's multiple range tests. Values not sharing the same superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$ .

(感謝林毓舜同學提供)

## 六 結論

本研究目的在比較高油飲食或糖水誘發代謝症候群之作用及機制探討，此研究成果不僅有助建立代謝症候群的動物模式應用於健康食品開發，也對未來飲食政策推動提供可參考的科學佐證。所得到的重要結果如下：

- (一) 高油飲食和糖水攝取均會誘發代謝症候群，Wistar 大鼠對糖水誘發較敏感，C57BL/6J 小鼠對高油飲食較敏感，兩種飲食因子共存(高油飲食加糖水)並不會更加惡化症狀。以糖水誘發大鼠 (Wistar rat) 出現代謝症候群症狀包括：腹部肥胖(Central obesity)、高血壓、高血糖(hyperglycemia)、高血脂(hyperlipidemia)及胰島素阻抗；高油飲食對於小鼠(C57BL/6J)可成功誘發：腹部肥胖、高血糖、高血脂和胰島素阻抗(血壓未測)。在大鼠高油飲食餵食五個月只成功誘發肥胖和高胰島素血症；在小鼠糖水給食五個月只誘發小鼠肥胖與高血脂，與對照組相較並無胰島素阻抗現象。
- (二) 本研究結果顯示，能量攝取過剩並不是導致肥胖及代謝失調的唯一解釋，例如在大鼠 HF+SW 組有最高的能量攝取，但誘發代謝症候群效果並不大於 SW 組；在小鼠雖然 HF 組熱量攝取與 LF 組相似，均低於糖水供應組(SW 及 HF+SW)，卻有最顯著的誘發代謝症候群效果。
- (三) 在大鼠糖水誘發代謝症候群可能與促進肝臟脂質生合成有關，證據包括 SW 組肝臟負責脂質生合成基因轉錄因子 SREBP-1c 及 ChREBP 蛋白質細胞核/細胞質比例增加，其調控之下游脂質生合成和糖解基因 mRNA (FAS、ACC、GK) 表現量有增加趨勢，解釋我們觀察到的肝脂堆積及血脂增加，由於從肝臟輸出 TG 增加，堆積於其它組織(肌肉及內臟脂肪)，造成組織胰島素阻抗。另一方面脂肪細胞肥大及胰島素阻抗，可能脂解出更多脂肪酸堆積在非脂肪組織(肝臟、肌肉、胰臟等)更加惡化胰島素阻抗，也可能改變 adipocytokines 分泌影響胰島素敏感性、發炎、凝血等反應。糖水誘發大鼠

代謝症候群也可能與 Uric acid 堆積有關。

- (四) 在小鼠高油飲食誘發代謝症候群可能與過多油脂攝取直接堆積於組織造成肥胖及胰島素阻抗，但令人好奇的是雖然給食糖水的小鼠有最高的熱量攝取並造成顯著的肝臟 TG 堆積及高三酸甘油酯血症，卻只有輕微肥胖(相較於 HF 及 HF+SW)且沒有明顯的胰島素阻抗。C57BL/6J 小鼠透過何種機制抵抗糖水誘發的不利影響值得探討。
- (五) Mest 在小鼠脂肪組織表現量確實可做為肥胖指標，但似乎並不適用於大鼠。
- (六) 在高油、糖水或合併給予的飲食誘發大鼠產生代謝症候群症狀後，再轉回正常的飲食四週，肥胖、高血脂、肝脂堆積與高血糖等症狀均有不等程度之改善。肝臟脂質生合成基因表現有降低趨勢，脂肪組織 adipocytokines 表現也有改善趨勢，因此代謝症候群因飲食的誘發也可因飲食的修正而獲得改善。

由以上結果得知，本實驗驗證大、小鼠對高油飲食或糖水誘發代謝症候群症狀有不同敏感性，未來若要建立代謝症候群的動物模式應用於健康食品開發，Wistar 大鼠適合以糖水誘發，C57BL/6J 小鼠適合以高油飲食誘發。本研究也證實含糖飲料的攝取如同高油食物的確會增加代謝症候群之危險，近年國內杯裝飲料市場大幅成長，消費人口快速增加，其背後潛在的國民健康問題值得注意。



## 第七章 参考文献

1. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988 Dec;37(12):1595-607.
2. Kaplan N.M. The deadly quartet. upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension.. *Arch Intern Med*. 1989 Jul;149(7):1514-20.
3. Haffner SM, Valdez RA, Hazuda HP, Mitchell BD, Morales PA, Stern MP. Prospective analysis of the insulin-resistance syndrome (syndrome X). *Diabetes*. 1992 Jun;41(6):715-22.
4. Ford E.S., Giles W.H., Dietz W.H. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: Findings from the third national health and nutrition examination survey. . *JAMA*. 2002 Jan 16;287(3):356-9.
5. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, Taskinen M.R., Groop L. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. . *Diabetes Care*. 2001 Apr 24;24(4):683-9.
6. Trevisan M, Liu J, Bahsas F.B., Menotti A. Syndrome X and mortality: A population-based study. risk factor and life expectancy research group. *Am J Epidemiol*. 1998 Nov 15;148(10):958-66.
7. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A consensus statement from the international diabetes federation.[see comment]. *Diabetic Med*. 2006 May;23(5):469-80.
8. Molavi B, Rasouli N, Kern PA. The prevention and treatment of metabolic syndrome and high-risk obesity. *Curr Opin Cardiol*. 2006 Sep;21(5):479-85.
9. Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF. Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem*. 2002 Jan 11;277(2):1531-7.

10. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. 2002 Nov 21;420(6913):333-6.
11. Weston CR, Lambright DG, Davis RJ. Signal transduction. MAP kinase signaling specificity. *Science*. 2002 Jun 28;296(5577):2345-7.
12. Davis RJ. Signal transduction by the c-jun N-terminal kinase. *Biochemical Society Symposia*. 1999;64:1-12.
13. Garg A. Adipose tissue dysfunction in obesity and lipodystrophy. *Clin Cornerstone*. 2006;8(supple 4):S7-S13.
14. ShklyaeV S, Aslanidi G, Tennant M, Prima V, Kohlbrenner E, Kroutov V, Campbell-Thompson M, Crawford J, Shek EW, et al. Sustained peripheral expression of transgene adiponectin offsets the development of diet-induced obesity in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Nov 25;100(24):14217-22.
15. Juge-Aubry CE, Henrichot E, Meier CA. Adipose tissue: A regulator of inflammation. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2005 Dec;19(4):547-66.
16. Seufert J. Leptin effects on pancreatic beta-cell gene expression and function. *Diabetes*. 2004 Feb;53(Suppl 1):S152-8.
17. Siegrist-Kaiser CA, Pauli V, Juge-Aubry C. E., Boss O, Pernin A, Chin WW, Cusin I, Rohner-Jeanrenaud F, Burger AG, et al. Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue. *J Clin Invest*. 1997 Dec 1;100(11):2858-64.
18. Kieffer TJ, Habener JF. The adipoinsular axis: Effects of leptin on pancreatic beta-cells. *American Journal of Physiology - Endocrinology & Metabolism*. 2000 Jan;278(1):E1-E14.
19. Weiss R, Taksali SE, Dufour S, Yeckel CW, Papademetris X, Cline G, Tamborlane WV, Dziura J, Shulman GI, Caprio S. The "obese insulin-sensitive" adolescent: Importance of adiponectin and lipid partitioning. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Jun;90(6):3731-7.

20. Muoio DM, Dohm GL, Fiedorek FT, Jr, Tapscott EB, Coleman RA. Leptin directly alters lipid partitioning in skeletal muscle. *Diabetes*. 1997 Aug;46(8):1360-3.
21. Moran O, Phillip M. Leptin: Obesity, diabetes and other peripheral effects—a review. *Pediatr Diabetes*. 2003 Jun;4(2):101-9.
22. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004 Jun;89(6):2548-56.
23. Faraj M, Lu HL, Cianflone K. Diabetes, lipids, and adipocyte secretagogues. *Biochem Cell Biol*. 2004 Feb;82(1):170-90.
24. Gable DR, Hurel SJ, Humphries SE. Adiponectin and its gene variants as risk factors for insulin resistance, the metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2006 Oct;188(2):231-44.
25. Meier U, Gressner AM. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem*. 2004 Sep;4:1511-25.
26. Havel P. J. Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: leptin, acylation stimulating protein, and adiponectin. *Curr Opin Lipidol*. 2002 Feb;13(1):51-9.
27. Pischon T, Girman CJ, Hotamisligil GS, Rifai N, Hu FB, Rimm EB. Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA*. 2004 Apr;291(14):1730-7.
28. Balagopal P, George D, Yarandi H, Funanage V, Bayne E. Reversal of obesity-related hypoadiponectinemia by lifestyle intervention: A controlled, randomized study in obese adolescents. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Nov;90(11):6192-7.
29. Stefan N, Bunt JC, Salbe AD, Funahashi T, Matsuzawa Y, Tataranni PA. Plasma adiponectin concentrations in children: relationships with obesity and insulinemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Oct;87(10):4652-6.

30. Nemet D, Wang P, Funahashi T, Matsuzawa Y, Tanaka S, Engelman L, Cooper DM. Adipocytokines, body composition, and fitness in children.. *Pediatr Res.* 2003 Jan;53(1):148-52.
31. Morales A, Wasserfall C, Brusko T, Carter C, Schatz D, Silverstein J, Ellis T, Atkinson M. Adiponectin and leptin concentrations may aid in discriminating disease forms in children and adolescents with type 1 and type 2 diabetes.. *Diabetes Care.* 2004 Aug;27(8):2010-4.
32. Retnakaran R, Zinman B, Connelly P, Harris SB, Hanley AJ. Nontraditional cardiovascular risk factors in pediatric metabolic syndrome.. *J Pediatr.* 2006;148(2):176-82.
33. Bacha F, Saad R, Gungor N, Arslanian SA. Adiponectin in youth: relationship to visceral adiposity, insulin sensitivity, and beta-cell function.. *Diabetes Care.* 2004;27(2):547-52.
34. Weiss R, Dufour S, Groszmann A, Petersen K, Dziura J, Taksali SE, Shulman G, Caprio S. Low adiponectin levels in adolescent obesity: A marker of increased intramyocellular lipid accumulation.. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 88;5:2014-8.
35. Stefan N, Vozarova B, Funahashi T, Matsuzawa Y, Weyer C, Lindsay RS, Youngren JF, Havel PJ, Pratley RE, et al. Plasma adiponectin concentration is associated with skeletal muscle insulin receptor tyrosine phosphorylation, and low plasma concentration precedes a decrease in whole-body insulin sensitivity in humans. *Diabetes.* 2002;51(6):1884-8.
36. ShklyaeV S, Aslanidi G, Tennant M, Prima V, Kohlbrenner E, Kroutov V, Campbell-Thompson M, Crawford J, Shek EW, et al. Sustained peripheral expression of transgene adiponectin offsets the development of diet-induced obesity in rats.. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(24):14217-22.
37. Chen H, Montagnani M, Funahashi T, Shimomura I, Quon MJ. Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells.. *J Biol Chem.* 2003 278;45:45021-6.
38. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature.* 2001 Jan 18;409(6818):307-12.

39. Muse ED, Obici S, Bhanot S, Monia BP, McKay RA, Rajala MW, Scherer PE, Rossetti L. Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest*. 2004 Jul;114(2):232-9.
40. Rangwala SM, Rich AS, Rhoades B, Shapiro JS, Obici S, Rossetti L, Lazar MA. Abnormal glucose homeostasis due to chronic hyperresistinemia. *Diabetes*. 2004 Aug;53(8):1937-41.
41. Sato N, Kobayashi K, Inoguchi T, Sonoda N, Imamura M, Sekiguchi N, Nakashima N, Nawata H. Adenovirus-mediated high expression of resistin causes dyslipidemia in mice. *Endocrinology*. 2005 Jan;146(1):273-9.
42. Banerjee RR, Lazar MA. Resistin: Molecular history and prognosis. *J Mol Med*. 2003;81(4):218-26.
43. Ahima RS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity*. 2006 Aug;14(Suppl 5):242S-9S.
44. Steppan CM, Brown EJ, Wright CM, Bhat S, Banerjee RR, Dai CY, Enders GH, Silberg DG, Wen X, et al. A family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jan 16;98(2):502-6.
45. Itai T, Tanaka M, Nagata S. Processing of tumor necrosis factor by the membrane-bound TNF-alpha-converting enzyme, but not its truncated soluble form.. *Eur J Biochem*. 2001;268(7):2074-82.
46. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature*. 1997 Oct 9;389(6651):610-4.
47. Zhang HH, Halbleib M, Ahmad F, Manganiello VC, Greenberg AS. Tumor necrosis factor-alpha stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP. *Diabetes*. 2002 Oct;51(10):2929-35.
48. Grunfeld C, Feingold KR. Tumor necrosis factor, interleukin, and interferon induced changes in lipid metabolism as part of host defense. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1992 Jun;200(2):224-7.

49. Peraldi P, Hotamisligil GS, Buurman WA, White MF, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase. *J Biol Chem.* 1996 May 31;271(22):13018-22.
50. Gross V, Andus T, Castell J, Vom Berg D, Heinrich PC, Gerok W. O- and N-glycosylation lead to different molecular mass forms of human monocyte interleukin-6. *FEBS Lett.* 1989 Apr 24;247(2):323-6.
51. Rieusset J, Bouzakri K, Chevillotte E, Ricard N, Jacquet D, Bastard JP, Laville M, Vidal H. Suppressor of cytokine signaling 3 expression and insulin resistance in skeletal muscle of obese and type 2 diabetic patients. *Diabetes.* 2004 Sep;53(9):2232-41.
52. Fasshauer M, Kralisch S, Klier M, Lossner U, Bluher M, Klein J, Paschke R. Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Feb 21;301(4):1045-50.
53. Havel PJ. Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: Leptin, acylation stimulating protein, and adiponectin. *Curr Opin Lipidol.* 2002 Feb;13(1):51-9.
54. Ziccardi P, Nappo F, Giugliano G, Esposito K, Marfella R, Cioffi M, D'Andrea F, Molinari AM, Giugliano D. Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. *Circulation.* 2002 Feb 19;105(7):804-9.
55. Henry M, Tregouet DA, Alessi MC, Aillaud MF, Visvikis S, Siest G, Tiret L, Juhan-Vague I. Metabolic determinants are much more important than genetic polymorphisms in determining the PAI-1 activity and antigen plasma concentrations: A family study with part of the stanislas cohort. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998 Jan;18(1):84-91.
56. Folsom AR, Qamhieh HT, Wing RR, Jeffery RW, Stinson VL, Kuller LH, Wu KK. Impact of weight loss on plasminogen activator inhibitor (PAI-1), factor VII, and other hemostatic factors in moderately overweight adults. *Arterioscler Thromb.* 1993 Feb;13(2):162-9.

57. Kruszynska YT, Yu JG, Olefsky JM, Sobel BE. Effects of troglitazone on blood concentrations of plasminogen activator inhibitor 1 in patients with type 2 diabetes and in lean and obese normal subjects. *Diabetes*. 2000 Apr;49(4):633-9.
58. Hoffstedt J, Andersson IL, Persson L, Isaksson B, Arner P. The common -675 4G/5G polymorphism in the plasminogen activator inhibitor -1 gene is strongly associated with obesity. *Diabetologia*. 2002 Apr;45(4):584-7.
59. Lopes C, Dina C, Durand E, Froguel P. PAI-1 polymorphisms modulate phenotypes associated with the metabolic syndrome in obese and diabetic caucasian population. *Diabetologia*. 2003 Sep;46(9):1284-90.
60. Bouchard L, Mauriege P, Vohl MC, Bouchard C, Perusse L. Plasminogen-activator inhibitor-1 polymorphisms are associated with obesity and fat distribution in the quebec family study: Evidence of interactions with menopause. *Menopause*. 2005 Mar;12(2):136-43.
61. Lebrun P, Baron V, Hauck CR, Schlaepfer DD, Van Obberghen E. Cell adhesion and focal adhesion kinase regulate insulin receptor substrate-1 expression. *J Biol Chem*. 2000 Dec 8;275(49):38371-7.
62. Liang X, Kanjanabuch T, Mao SL, Hao CM, Tang YW, Declerck PJ, Hasty AH, Wasserman DH, Fogo AB, Ma LJ. Plasminogen activator inhibitor-1 modulates adipocyte differentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006 Jan;290(1):E103-13.
63. Sumiyoshi M, Sakanaka M, Kimura Y. Chronic intake of high-fat and high-sucrose diets differentially affects glucose intolerance in mice. *J Nutr*. 2006(136):582-7.
64. Surwit RS, Feinglos MN, Rodin J, Sutherland A, Petro AE, Opara EC, Kuhn CM, Rebuffé-Scrive M. Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. *Metabolism*. 1995 May;44(5):645-51.

65. Ferrer-Martínez A, Marotta M, Turini M, Mace K, Gomez-Foix AM. Effect of sucrose and saturated-fat diets on mRNA levels of genes limiting muscle fatty acid and glucose supply in rats.. *Lipids*. 2006 Jan;41(1):55-62.
66. Aguilera AA, Díaz GH, Barcelata ML, Guerrero OA, Ros RM. Effects of fish oil on hypertension, plasma lipids, and tumor necrosis factor-alpha in rats with sucrose-induced metabolic syndrome.. *J Nutr Biochem*. 2004 Jun;15(6):350-7.
67. Miller CC, Martin RJ, Whitney ML, Edwards GL. Intracerebroventricular injection of fructose stimulates feeding in rats. *Nutr Neurosci*. 2002 Oct;5(5):359-62.
68. Levine R. Monosaccharides in health and disease.. *Annu Rev Nutr*. 1986;6:211-24.
69. Stanhope KL, Havel PJ. Fructose consumption: Potential mechanisms for its effects to increase visceral adiposity and induce dyslipidemia and insulin resistance. *Curr Opin Lipidol*. 2008 Feb;19(1):16-24.
70. Abate N, Garg A, Peshock RM, Stray-Gundersen J, Grundy SM. Relationships of generalized and regional adiposity to insulin sensitivity in men. *J Clin Invest*. 1995 Jul;96(1):88-98.
71. Bjorntorp P. Regional fat distribution--implications for type II diabetes. *International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*. 1992 Dec;16(Suppl 4):S19-27.
72. Havel PJ. Update on adipocyte hormones: Regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes*. 2004 Feb;53(Suppl 1):S143-51.
73. Mayes PA. Intermediary metabolism of fructose. *Am J Clin Nutr*. 1993 Nov;58(5 Suppl):754S-65S.
74. Olofsson SO, Boren J. Apolipoprotein B: A clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis. *J Intern Med*. 2005 Nov;258(5):395-410.



75. Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Tomita S, et al. Insulin-independent induction of sterol regulatory element-binding protein-1c expression in the livers of streptozotocin-treated mice. *Diabetes*. 2004 Mar;53(3):560-9.
76. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: Activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*. 2002 May;109(1125):1131.
77. Shimizu S, Ugi S, Maegawa H, Egawa K, Nishio Y, Yoshizaki T, Shi K, Nagai Y, Morino K, et al. Protein-tyrosine phosphatase 1B as new activator for hepatic lipogenesis via sterol regulatory element-binding protein-1 gene expression.. *J Biol Chem*. 2003 Oct 31;278(44):43095-101.
78. Heinig M, Johnson RJ. Role of uric acid in hypertension, renal disease, and metabolic syndrome. *Cleve Clin J Med*. 2006 Dec;73(12):1059-64.
79. Nakagawa T, Tuttle KR, Short RA, Johnson RJ. Hypothesis: Fructose-induced hyperuricemia as a causal mechanism for the epidemic of the metabolic syndrome. *Nature Clinical Practice Nephrology*. 2005 Dec;1(2):80-6.
80. Nyby MD, Abedi K, Smutko V, Eslami P, Tuck ML. Vascular angiotensin type 1 receptor expression is associated with vascular dysfunction, oxidative stress and inflammation in fructose-fed rats. *Hypertens Res*. 2007 May;30(5):451-7.
81. Jia X, Wu L. Accumulation of endogenous methylglyoxal impaired insulin signaling in adipose tissue of fructose-fed rats. *Molecular & Cellular Biochemistry*. 2007 Dec;306(1-2):133-9.
82. Riccardi G, Giacco R, Rivellese AA. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin Nutr*. 2004 Aug;23(4):447-56.
83. Morino K, Petersen KF, Shulman GI. Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. *Diabetes*. 2006 Dec;55(2):S9-S15.
84. Holland WL, Knotts TA, Chavez JA, Wang LP, Hoehn KL, Summers SA. Lipid mediators of insulin resistance. *Nutr Rev*. 2007 Jun;65(6 Pt 2):S39-46.

85. Miller A, Adeli K. Dietary fructose and the metabolic syndrome. *Curr Opin Gastroenterol*. 2008 Mar;24(2):204-9.
86. Malik VS, Schulze MB, Hu FB. Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: A systematic review. *Am J Clin Nutr*. 2006 Aug;84(2):274-88.
87. Uyeda K, Yamashita H, Kawaguchi T. Carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP): A key regulator of glucose metabolism and fat storage. *Biochem Pharmacol*. 2002 Jun 15;63(12):2075-80.
88. Ide T, Shimano H, Yahagi N, Matsuzaka T, Nakakuki M, Yamamoto T, Nakagawa Y, Takahashi A, Suzuki H, et al. SREBPs suppress IRS-2-mediated insulin signalling in the liver. *Nat Cell Biol*. 2004 Apr;6(4):351-7.
89. Dentin R., Benhamed F., Hainault I., Fauveau V., Foufelle F., Dyck J. R., Girard J., Postic C. Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes*. 2006 Aug;55(8):2159-70.
90. Dentin R, Girard J, Postic C. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): Two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. *Biochimie*. 2005 Jan;87(1):81-6.
91. Takahashi M, Kamei Y, Ezaki O. Mest/Peg1 imprinted gene enlarges adipocytes and is a marker of adipocyte size. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005 Jan;288(1):E117-24.
92. Koza RA, Nikonova L, Hogan J, Rim JS, Mendoza T, Faulk C, Skaf J, Kozak LP. Changes in gene expression foreshadow diet-induced obesity in genetically identical mice. *PLoS Genet*. 2006 May;2(5):e81.
93. Pedersen IS, Dervan PA, Broderick D, Harrison M, Miller N, Delany E, O'Shea D, Costello P, McGoldrick A, et al. Frequent loss of imprinting of PEG1/MEST in invasive breast cancer. *Cancer Res*. 1999 Nov 1;59(21):5449-51.

94. Folch J, Lees M, Sloane Stanley, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides form animal tissues. *J Biol Chem.* 1957(226):497-509.
95. DiMeglio DP, Mattes RD. Liquid versus solid carbohydrate: Effects on food intake and body weight. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000 Jun;24(6):794-800.
96. Hsu SC, Huang CJ. Reduced fat mass in rats fed a high oleic acid-rich safflower oil diet is associated with changes in expression of hepatic PPARalpha and adipose SREBP-1c-regulated genes. *J Nutr.* 2006 Jul;136(7):1779-85.
97. Kamei Y, Suganami T, Kohda T, Ishino F, Yasuda K, Miura S, Ezaki O, Ogawa Y. Peg1/Mest in obese adipose tissue is expressed from the paternal allele in an isoform-specific manner. *FEBS Lett.* 2007 Jan 9;581(1):91-6.
98. Lefebvre L, Viville S, Barton SC, Ishino F, Surani MA. Genomic structure and parent-of-origin-specific methylation of Peg1. *Hum Mol Genet.* 1997 Oct;6(11):1907-15.
99. Taghibiglou C, Rashid-Kolvear F, Van Iderstine SC, Le-Tien H, Fantus IG, Lewis GF, Adeli K. Hepatic very low density lipoprotein-ApoB overproduction is associated with attenuated hepatic insulin signaling and overexpression of protein-tyrosine phosphatase 1B in a fructose-fed hamster model of insulin resistance. *J Biol Chem.* 2002 Jan 4;277(1):793-803.
100. Kraegen EW, Clark PW, Jenkins A. B., Daley EA, Chisholm D. J., Storlien LH. Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat-fed rats. *Diabetes.* 1991(40):1397-430.
101. Cirillo P, Sato W, Reungjui S, Heinig M, Gersch M, Sautin Y, Nakagawa T, Johnson RJ. Uric acid, the metabolic syndrome, and renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2006 Dec;17(12 Suppl 3):S165-8.