

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

逆式-肉桂酸在老鼠肝臟代謝之速率與脂肪肝的相關性及肉鹼與脂肪肝之因果關係的研究

The relationships of the metabolic rates of trans-cinnamic acid in rat's liver and the occurrence of fatty liver in rats with/without supplemental of carnitine in rats diet

計畫編號：NSC 90-2313-B-041-009

執行期限：90年8月1日至91年7月31日

主持人：孫芳明 嘉南藥理科技大學保健營養系

一、中文摘要

在此實驗中我們證實低蛋白飲食將造成老鼠產生脂肪肝，且老鼠肝臟所累積的總脂肪及三醯甘油脂的量隨著飲食中蛋白質的含量的減少而呈直線增加，這些因低蛋白飲食所飲起的肝臟不正常的變化同時也可藉由血漿中上升的總脂肪量及膽固醇量來測知；此外由低蛋白飲食所引起的脂肪肝症狀並無法藉由在飲食中額外補充肉鹼來改善，此項發現建議由低蛋白飲食所造體內肉鹼量下降，並不是造成低蛋白飲食者肝臟脂肪代謝受阻的唯一原因；不同程度之低蛋白質飲食造成不同程度脂肪肝之老鼠其肝臟代謝逆式-肉桂酸至馬尿酸之效率有顯著差異，而此項差異可作為臨床上檢測脂肪肝之有無及程度的另一項方法。

關鍵詞：低蛋白飲食、脂肪肝、肉鹼、逆式-肉桂酸、馬尿酸

Abstract:

The data from this study demonstrated that low protein diet will cause fatty liver and the amount of total lipid and triglyceride accumulated in the liver are increased with the decreasing of the protein content in diet. These abnormal changes in liver can also be detected in the increasing amount of total lipid and

cholesterol in serum but not in serum's triglyceride. These fatty liver syndrome did not alter with the extra supplement of carnitine in the low protein diet. This finding suggests that the low carnitine level caused by the low protein diet was not the only reason to impair the lipid metabolism in rat's liver. However, the different amount of the accumulated lipid in rat's liver caused by the different low protein diet did affect the efficiency for rat's liver to metabolize trans-cinnamic acid to hippuric acid. This significant difference of the metabolic rate of trans-cinnamic acid in the experiment groups, therefore, can be used as an alternative tool for detecting the happening and level of fatty liver in rats.

Keywords: Low Protein Diet、Fatty Liver、Carnitine、trans-Cinnamic acid、Hippuric acid

二、緣由與目的：

脂肪肝(Fatty liver)是在臺灣相當普遍的一種成人疾病之一 [1]，造成脂肪肝的原因有很多，如病毒感染、飲酒過量、黃麴毒素和環境污染物在身體的累積、及蛋白質-能量攝取不足(Protein-Energy Malnutrition; PEM)等因素 [2, 3, 4, 5]；在臨床上醫生大多以超音波

來診斷脂肪肝的有無，但是超音波只能判斷出晚期的脂肪肝症狀(肝臟腫大、潰瘍或異常)，對於早期的脂肪肝症狀(肝細胞代謝脂肪的效率下降、肝細胞中的脂肪累積)則缺乏一個正確診斷的工具 [6, 7]；因此在此實驗中我們將以簡單的逆式-肉桂酸在老鼠肝臟代謝的效率來找出肉鹼與脂肪肝的關係，並希望這些數據能作為診斷出早期脂肪肝的臨床依據。

逆式-肉桂酸大量的存在於各類的植物性食品中，它是植物細胞合成木質素(lignin)、類黃酮(flavonoids)、及酚類物質(phenolic compounds)的先驅物 [8, 9]，人類已有很長的歷史暴露在逆式-肉桂酸下，因此比較不會有毒性的產生，而含逆式-肉桂酸的食物也被歸類於天然食品之一(General Recognized as Natural Product)；逆式-肉桂酸的化學結構為一苯環(benzene ring)加上一個不飽和的丙烯酸(propenic acid)，根據研究顯示，它的物理及化學特性與中、長鏈的脂肪酸非常類似 [10]，當逆式-肉桂酸隨著植物性食品進入消化管道候，它會跟著鈉離子一起被小腸的絨毛細胞所吸收(Na^+ - dependent process)，並由肝門靜脈運送至肝臟代謝 [11]，其在肝臟細胞的代謝途徑和中、長鏈的不飽和脂肪酸一樣；先經 β -oxidation 去除掉丙烯酸上的兩個碳後形成苯甲酸(benzoic acid)，在與甘氨酸(glycine)結合成馬尿酸(hippuric acid)，最後馬尿酸將由尿液排出體外；根據文獻報導脂肪肝形成的主要原因是因為脂肪酸無法在肝細胞的粒腺體代謝，而使得中性脂肪(三醯甘油)及其它的脂肪大量累積在肝臟所造成的 [12]；很不幸的是這些油脂累積在肝臟無法排出體外，除非作活體肝臟的採樣(biopsy)、否則無法得知肝臟細胞代謝脂肪的功能是否異常(早期的脂肪肝症狀) [13]，雖然脂肪肝的形成通常不會致命，但脂肪肝已被證實與肝硬化、肝細胞壞死、和肝癌等致命性疾病的發生有很密切的關係；因此如果能早期診斷出脂肪

肝的存在並給予治療，即可降低這些致命性的肝臟疾病發生的機率 [14]；以我們對於逆式-肉桂酸在肝臟的代謝途徑中知道：逆式-肉桂酸在與 CoA 結合後會被運送至粒腺體內作 β -oxidation 並形成苯甲酸，苯甲酸會被打出粒腺體外在細胞質轉變為馬尿酸 [15]，馬尿酸並不累積在肝臟而是隨著尿液排出體外，因此我們只要收集其所排放的尿液並定量出馬尿酸的濃度，就可知道逆式-肉桂酸在肝臟是否代謝正常，從逆式-肉桂酸在肝臟的代謝程度，我們可以免掉活體肝臟採樣的不便及痛苦，進一步的推論是否有脂肪肝症狀的存在。

在此實驗中我們希望由不同程度的低蛋白質飲食造成患不同程度脂肪肝的老鼠，並藉由其代謝逆式-肉桂酸速率之不同，來評估此差異是否可作為臨床診斷脂肪肝的有無及其輕重程度之依據。

三. 實驗材料及研究方法

不同蛋白質含量的低蛋白質老鼠飼料與老鼠脂肪肝的形成及老鼠肝臟代謝逆式-肉桂酸的速率的動物實驗：

25 隻 4 個星期大的 Male Sprague-Dawley rats 將被隨機分成五組，其安排及老鼠編號如下：

Group A (sample#)	Group B (sample#)	Group C (sample#)	Group D (sample#)	Group E (sample#)
1-5)	6-10)	11-15)	16-20)	21-25)
control group	experimental group	experimental group	experimental group	experimental group
NPD	LPD1	LPD2	LPD3	LPD4

NPD : Normal Protein Diet

LPD : Low Protein Diet

老鼠飼料的配方(normal protein diet 及 low protein diet)如下表：

Dietary Group					
Group	A (NPD)	B (LPD1)	C (LPD2)	D (LPD3)	E (LPD4)
	g/kg diet				
Lactalbumin	200	80	60	40	20
Corn starch	570	690	710	730	710
Soybean oil	150	150	150	150	150
Cellulose	30	30	30	30	30
Vitamin mixture	10	10	10	10	10
Mineral mixture	35	35	35	35	35
Choline-HCl	3	3	3	3	3

NPD: Normal protein diet

LPD: Low protein diet

Vitamin mixture: AIN 76

Mineral mixture: AIN 76

在老鼠移至代謝籠前先禁食 8 個小時，8 個小時後 0.1 ml 400 mM 的逆式-肉桂酸將由腹部注射入老鼠的體內，並馬上移入代謝籠內。

樣品的處理：

1. 老鼠在移入代謝籠後，我們將收集老鼠在 8 個小時內所排出的尿液、所收集的尿液將移至冷凍乾燥瓶內，以冷凍乾燥去除水份，其殘留物將溶於 500 μ l 的甲醇中後，以 0.45 μ m 的濾膜過濾，再用 Micropipette 移入 1.5ml 的 Eppendroff tube 標示後分別儲存於 -80 $^{\circ}$ C，以備將來的分析實驗。
2. 在 8 個小時後老鼠將被移出代謝籠以乙醚麻醉後馬上解剖，並自腹腔大靜脈抽出血液及摘取肝臟；肝臟以 saline 清洗瀆乾後秤重並先剪取 1.5 克供脂質萃取之需外，其餘的肝臟則在標示、包裝後儲存於 -80 $^{\circ}$ C 以供日後分析之用。至於所取得之全血將到入離心管內，以 8,000 x g 之轉速離心十分鐘，在將血漿與血球分開，血漿分裝標示後儲存於 -80 $^{\circ}$ C 以供日後分析之用。

樣品的分析與數據的統計分析：

1. 老鼠尿液中馬尿酸的定性和定量分析：以本系的 Hitachi L7100 高效液相層析儀及 Hitachi L7455 photodiode array 檢測器再加上分析級的 C₁₈ 可逆相管柱來分析，並依馬尿酸的標準品取得之線性迴歸曲線求出各檢體馬尿酸的濃度。
2. 肝臟殘留的逆式-肉桂酸的定性和定量分析：從各組樣品中各取出一克的肝臟並加入 5 ml 的去離子水，於 20 ml 的試管內以均質機(Polytron)粉碎 3 分鐘，再加入 10 ml 的 ethylacetate 萃取兩次，移出上層液至另外一個乾淨的試管後以氮氣吹乾，加入 500 μ l 的甲醇、過濾再以上述的高效液相層析法來分析。
3. 老鼠肝臟中之總脂肪量、三醯甘三醯甘油酯及膽固醇的測定則以蕭慧美等研發之方法來定性及定量（蕭慧美著；台大農化所博士論文）
4. 血液中總脂肪量、三醯甘油酯及膽固醇的含量係採用 Randox 的套裝組合試劑 (Randox, UK) 來測定。
5. 統計分析：針對由化學及生化分析所得各組之有關數據，我們將以 SigmaPlot 和 Spss 電腦套裝軟體來作繪圖、交叉統計，以此結果找出逆式-肉桂酸不同的代謝速率及老鼠肝臟不同的脂肪累積量的相關性以及肉鹼是否會影響脂肪在老鼠肝臟的代謝速率。

四. 結果與討論：

老鼠再飼養一個月後其肝臟中的總脂肪、三醯甘油酯及膽固醇之含量（如表一），其中肝中總脂肪量及三醯甘油酯量經統計分析後有顯著差異 (p<0.05)，顯示出在實驗組中的低蛋白飲食的確造成了老鼠肝臟總脂肪量三醯甘油酯及膽固醇的增加，而肝臟總脂肪量隨著蛋白質含量的減少而呈線性增加

($R^2=0.9999$), 而 LPD3 及 LPD4 組中老鼠的肝臟總脂肪量則無明顯差異, 至於肝臟三醯甘油酯的量則隨著飼料中蛋白質含量減少而呈線性增加至 LPD4 ($R^2=0.9299$), 而肝臟膽固醇含量之增加則無法與飼料中蛋白質含量之減少找

表一：肝臟及血漿總脂肪量、三醯甘油酯量、膽固醇量的測定：

組別	NPD	LPD 1	LPD 2	LPD 3	LPD 4
肝臟總脂肪量 (mg/g liver)	51.34±4.77	67.22±7.00	82.07±6.20	96.32±7.60	100.91±5.83
血漿總脂肪量 (mg/dl)	25.56±6.30	52.53±4.81	65.33±3.03	78.67±3.48	69.33±9.00
肝臟三醯甘油酯量 (mg/g liver)	1.76±0.11	2.12±0.21	2.66±0.43	3.17±0.26	3.26±0.33
血漿三醯甘油酯量	46.55±8.62	55.52±17.83	67.93±13.52	54.83±9.47	58.28±17.39
肝臟膽固醇量 (mg/g liver)	0.30±0.12	0.23±0.05	0.23±0.05	0.22±0.03	0.27±0.04
血漿膽固醇量	75.79±13.56	113.34±12.36	170.00±6.83	195.71±10.90	201.43±30.95

NPD : Normal Protein Diet (200 g protein/Kg diet)

LPD 1: Low Protein Diet 1 (80 g protein/Kg diet)

LPD 2: Low Protein Diet 1 (60 g protein/Kg diet)

LPD 3: Low Protein Diet 1 (40 g protein/Kg diet)

LPD 4: Low Protein Diet 1 (20 g protein/Kg diet)

表二：尿液、肝臟、及血漿中肉桂酸、馬尿酸濃度的測定

組別	NPD	LPD 1	LPD 2	LPD 3	LPD 4
尿液馬尿酸含量 (µg/ml)	2817.47±286.55	2455.60±365.45	2079.98±388.24	1423.90±247.43	835.44±235.93
尿液肉桂酸含量 (µg/ml)	ND	ND	76.28±17.18	98.12±19.35	367.33±135.26
肝臟馬尿酸含量 (µg/ml)	1208.87±69.45	1476.12±112.23	1566.84±231.35	1975.32±321.31	1623.04±247.48
肝臟肉桂酸含量 (µg/ml)	ND	12.56±4.78	46.72±12.47	267.15±54.76	521.33±102.16
血漿馬尿酸含量 (µg/ml)	ND	ND	ND	ND	ND
血漿肉桂酸含量 (µg/ml)	ND	ND	ND	ND	ND
Total Recovery (%)	68.01	66.63	63.68	63.59	56.54

出線性關係, 至於血漿中總脂肪隨飼料中蛋白質減少的增加趨勢與肝中總脂肪含量的變化趨勢相同 ($R^2=0.9999$) (表一), 而各組別老鼠血漿中三醯甘油酯的變化經統計分析後並無顯著差異 (表一), 此項數據不同後肝臟中三醯甘油酯含量隨飼料蛋白質含量減少而呈線性增加; 而血漿中膽固醇含量的變化 (表一) 則隨著飼料中蛋白質含量的減少而呈線性增加 ($R^2=0.8903$), 這又和肝臟膽固醇量的變化相反。由以上各項數據顯示低蛋白飲食的確造成了實驗組中的老鼠產生了不同程度的脂肪肝現象, 其中 LPD3 及 LPD4 (40 g protein/kg diet, 20 g protein/kg diet) 組別中的老鼠脂肪肝的程度一樣嚴重, 至於肝臟三醯甘油酯的代謝也因脂肪肝的形成而上升, 但其在肝臟中的含量並無法如血漿中膽固醇含量的增加如此明確, 至於脂肪肝嚴重的程度也能由血漿中總脂肪量的改變來得知。

老鼠在禁食 8 小時後, 經腹部注射 0.1 ml 的 400mM 的逆式-肉桂酸後; 移至代謝籠後, 經收集其 12 小時的尿液後, 其尿液血液及肝臟中馬尿酸、逆式-肉桂酸的含量經 HPLC 分析後呈現於表二。

我們發現其中以尿液中馬尿酸含量的肝臟總脂肪含量的增加而影響最大, 顯示出脂肪肝之形成抑制得逆式-肉桂酸在肝臟的代謝。

以上的數據建議除了檢測血漿總脂質含量外, 逆式-肉桂酸在肝臟代謝的效率的確可以用來判定脂肪肝之有無及輕重程度之不同, 而此二項方法不但可避免活體採樣之不便且可彌補超音波檢測脂肪肝的不足。

五. 成果自評：

我們在一年的時間完成此項計劃, 並達到預期的目標; 如能在以後的研究中得知①注射量之多寡是否會影響其代謝之速率。②以及其他肝功能的障礙是否也會影響其代謝之速率, 則可進一步的進行其他的活體試驗。

五. 參考文獻:

1. Liu T-Y, S-N Lu, W-P Su, W-Y Chang, L-Y Wang, M-Y Hsieh, W-L Chuang, S-C Chen, and C-J Chen. 1990. Predication of fatty liver from serum triglyceride levels and body weight indexes. *Kaohsiung J. Medical Science*. 6:289-294.
2. Chlji H., K. Harayama, and S. Kiriyama. 1990. Effects of feeding rats low protein diets containing casein or soy protein isolate supplemented with methionine or oligo-L-methionine. *J. of Nutrition*. 120:166-171.
3. Chow, C. K.(ed.). 1992. Food science and technology, vol. 53. Fatty acids in foods and their health implications. Marcel Dekker, inc., NY. pp. 67-79.
4. Sachan D. S. and A. M. Yatim. 1992. Suppression of Aflatoxin B-1-induced lipid abnormalities and macromolecule-adduct formation by L-carnitine. *J. of Environmental Pathological and Toxicological Oncol*. 11:205-210.
5. Eaton S., C. O. Record, and K. Bartlett. 1997. Multiple biochemical effects in pathogenesis of alcoholic fatty liver. *European J. of Clinical Investigation*. 27:719-722.
6. Lian J., and K-Y Chou. 1991. Determination of fatty liver ultrasonic attenuation. *Chin J. Ultrasound Medication*. 7:5-6.
7. Wang C-C, G-T Huang, and P-M Yang. Hepatic tumor in fatty liver: Diagonstic difficulty in ultrasonography. *J. of Medical Ultrasound*. 5:124-128.
8. Floss, H. G. 1979. The Shkimate pathway. In: *Biochemistry of plant phenolics*. T. Swain, J. B. Harborne and C. F. Van Sumeze(eds). Plenum Press. NY. pp. 40-87.
9. Bell-Lelong D. H., J. C. Cusumano, K. Meyer and C. Capple. 1997. Cinnamate-4-hydroxylase expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 113:729-738.
10. Sun, F. M., J. L. Smith, B. M. Vittimberga, and R. W. Traxler. 2002. A new method for separation and identification of cis-cinnamic acid from its racemic mixture. *ACS Symposium series*. 816:228-240.
11. Wolffram, S., T. Weber, B. Grenacher and E. Scharrer. 1994. A Na⁺-dependent mechanism is involved in mucosal uptake of cinnamic acid across the jejunal brush border in rats. *Nutrient Metabolism*. 113:1300-1308.
12. Grimbert S., B. Fromenty, C. Fisch, P. Letteron, A. Berson, A. M. Durand-Schneider, G. Feldmann, and D. Pessayre. 1993. Decreased mitocjondrial oxidation of fatty acids in pregnant mice possible relevance to development of acute fatty liver of pregnancy. *Hepatology*. 17:628-637.
13. Chawak M. M., M. V. L. N. Raju, S. V. R. Rao, C. Srilatha, and N. K. Praharaj. 1997. Experimental induction of fatty liver hemorrhagic syndrome in layers. *Indian Veterinary J*. 74:290-293.
14. Liu T-Y, S-N Lu, W-P Su, W-Y Chang, L-Y Wang, M-Y Hsieh, W-L Chuang, S-C Chen, and C-J Chen. 1990. Predication of fatty liver from serum triglyceride levels and body weight indexes. *Kaohsiung J. Medical Science*. 6:289-294.
15. Sun, F. M., J. S. Wang, and R. W. Traxler. 2000. A novel ortho-dehalogenation reaction of 2-chlorocinnamic acid catalyzed by the pink yeast *Rhodotorula rubra* Y-1529. *Chemosphere*. 40:199-207.
16. Shaw Huey-Mei. 1998. The effect of protein insufficiency on tissue Vitamin E content: Mechanism Investigation. Ph.D. Dissertation, National Taiwan University.