

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

炸油對小鼠腸免疫功能之影響 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型

計畫編號：NSC 95-2320-B-041-011-

執行期間：95年08月01日至96年07月31日

執行單位：嘉南藥理科技大學保健營養系

計畫主持人：夏彩蘭

計畫參與人員：臨時工：朱婷鈺、葉妍劭

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 96年10月31日

炸油對小鼠腸免疫功能之影響

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC - 95 - 2320 - B - 041 - 011

執行期間：95 年 08 月 01 日至 96 年 07 月 31 日

計畫主持人：夏彩蘭

共同主持人：

計畫參與人員：朱婷鈺，葉妍劭

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：嘉南藥理科技大學保健營養系

中 華 民 國 96 年 10 月 30 日

中文摘要

本研究是探討炸油對腸體液免疫反應之影響。五週齡雌性小鼠飼以含 7% 和 15% 的新鮮黃豆沙拉油或炸油之 AIN-93G 飼料四週。飼養至第 7 天和第 21 天以管餵方式給予小鼠 5 µg cholera toxin (CT)。飼料中新鮮油和炸油含量對小鼠終體重沒有影響，但 15% 炸油組免疫小鼠終體重小於 15% 新鮮油組免疫小鼠。飼料攝取量則 7% 油脂組大於 15% 油脂組小鼠。無論是飼以 15% 或 7% 含量油脂之免疫小鼠，炸油組飼料攝取量均小於新鮮油組小鼠。不管飼料中油含量高低，炸油組小鼠腸內容物 anti-CT-IgA，糞便中 anti-CT-IgA 和總 IgA 濃度與新鮮油組小鼠比較均顯著減少。而且油含量愈高，特異性抗體減少愈顯著。炸油組和高新鮮油組小鼠之血清 anti-CT-IgA 濃度顯著低於低新鮮油組小鼠，但攝食炸油的免疫小鼠之血清總 IgA 濃度卻增加。實驗結果顯示，炸油對腸特異性體液免疫反應有抑制作用。

關鍵詞：IgA，炸油，腸道免疫，霍亂弧菌毒素，小鼠

Abstract

This study investigated the effect of deep frying soybean oil on anti-cholera toxin (CT) IgA immune response in mice. Five-week-old female C57BL/6J mice were fed C (7% fresh oil), CO (7% deep frying oil), HC (15% fresh oil) and HO (15% deep frying oil) diet for 4 weeks. Mice were orally given 5µg CT or vehicle solution on day 7 and 21 of the feeding period. The anti-CT IgA levels were significantly reduced in intestinal washes and fecal pellets in mice fed diet containing deep frying oil regardless of dietary oil level. In particular, the higher the level of dietary deep frying oil, the larger the level of inhibition effects were observed. By contrast, the dietary fresh oil level exerted no effect on anti-CT IgA immune response except fecal example. The fecal total IgA concentration was also decreased in deep frying oil group mice. Although the serum anti-CT IgA concentration was decreased in HO group mice when compared to the C group mice but serum total IgA was increased in the mice fed deep frying oil. Taken together, the results suggest that deep frying oil has an inhibitory effect on gut specific humoral immune response.

Keywords: IgA, deep frying oil, gut immunity, cholera toxin, mice

一、前言

食用油脂經高溫加熱烹調食物後，會發生水解、氧化、聚合、裂解、異構化等反應。生成初級氧化產物 hydroperoxides，再經裂解成可揮發的小分子醇、醛、酮、酸、碳氫化合物等，甚至產生 cyclic monomer、dimer 和 trimer 等聚合物，降低營養價值，對食用者可能產生不良的生理影響(6, 7)。雖然膳食油脂與免疫功能相關的研究甚多，但炸油與免疫功能之相關研究卻甚少。Enioutina et al. (5)在其報告的討論部份曾提到未發表之數據(p.2391)，2 至 4 月大之小鼠水中添加 dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA) 或飼料中添加 WY-14,643 ([4-Chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthio] acetic acid)，皮下注射 Hib-DT 疫苗並以 1,25(OH)₂D₃ 作佐劑，能增加系統性和黏膜性抗原特異性反應 2-3 倍。DHEA 和 WY-14,643 皆為 peroxisome proliferator activated receptor (PPAR α) 的活化劑。雖然另一篇報告發現飼料添加 WY-14,643 對小鼠的 anti-pMOG₃₃₋₅₅ IgG 免疫反應有抑制作用(3)，但此研究的 WY-14,643 劑量是 Enioutina et al. 的 2.64 倍(0.66mg/day/mouse v.s. 0.25mg/day/mouse)。由此推論，適度活化 PPAR α 能增加免疫反應，過度活化 PPAR α 則抑制免疫反應。炸油也含有 PPAR α 的活化物(2)，炸油是否具有 DHEA 和 WY-14,643 的效應，可調節腸體液免疫反應應是值得研究的題目。

二、研究目的

本研究計畫的目的是探討炸油對腸免疫功能之影響。以霍亂弧菌毒素 (CT) 作為黏膜抗原，以餵食含高低炸油量飼料之小鼠產生 anti-CT IgA 為指標，評估炸油對腸特異性抗體反應之影響。

三、文獻探討

Oarada 等人以 methyl linoleate hydroperoxides (MLHP)為 lipid hydroperoxides 的模式進行體內和體外的研究。體內研究發現小鼠口服 MLHP，胸腺出現壞死情形(10, 11)、胸腺細胞 DNA 合成降低(13)、脾臟重量和白血球數目減少(12)。體外研究則發現 MLPH 抑制小鼠脾臟 lymphoblasts DNA 合成(15)、脾臟自然殺手細胞對標細胞的毒殺活性(16)和人類 polymorphonuclear leukocytes 的吞噬作用(14)。Oarada 等人所發表的一系報告證實 lipid hydroperoxides 對免疫系統的不良影響，但是 hydroperoxide 不安定，易受熱分解，炸油中含量不高，而且炸油化學成份複雜(1)，故炸油有沒有 MLPH 對免疫系統的效應不易推論。國內也有學者研究炸油對免疫功能之影響。大鼠飼以含 15% 炸油飼料 6 週，脾臟細胞自然增殖和裂殖素 lipopolysaccharide 刺激 B 細胞增殖增加(8)。小鼠飼以 15% 炸油 18 週，並於飼養至 14 週和 16 週腹腔注射 ovalbumin，Th2 相關特異性抗體和發炎相關的細胞激素增加(9)。

四、研究方法

1. 炸油之製備

炸油之製備根據 Chao(2)之方法。統一黃豆沙拉油於鐵鍋中以瓦斯加熱，加熱度維持在 $205 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 。熱油鍋每次放入一片麵片，油炸至金黃色取出，每日油炸 6 小時後熄火冷卻，連續 4 天，共炸油 24 小時。炸油分裝並充氮氣，於 -20°C 保存，供日後飼料配製用。

2. 實驗設計

5 週齡的雌性 C57BL/6J 小鼠隨機分為 4 組，每組 14~15 隻，飼以含 7% 和 15% 的新鮮黃豆沙拉油或炸油之 AIN-93G 飼料。每週記錄體重和飼料攝取量，並在 28 天收集糞便。飼養 4 週後，以 CO_2 麻醉小鼠，眼窩採血後，以 CO_2 使小鼠窒息死亡，移除小腸，收集小腸內容物。

3. Cholera toxin 免疫流程

Cholera toxic (CT)的免疫流程是根據 Elson and Ealding (4)的方法。在飼養至第 7 天和第 21 天時每組半數小鼠以管餵的方式給與 0.1mL 含 $5\mu\text{g}$ CT 的 0.2M NaHCO_3 溶液，另一半小鼠管餵 0.1mL 0.2M NaHCO_3 溶液作為 negative control 組。

4. 分析方法

(1) 小腸內容物之收集

小腸內容物以含 protease inhibitor cocktail 之 ice cold phosphate-buffered saline (0.01M, pH7.4)洗出，洗出液在 4°C 下以 10,000rpm 離心 10 分鐘，收集上清液。上清液和血清儲藏於 -80°C 。

(2) 粪便抽出物的製備

糞便冷凍乾燥後稱重，貯存於 -20°C 。糞便置入離心管，每克糞便加入 20 mL PBS，在室溫下靜置 30 分鐘。把糞便打散後，vortex 震動 20 秒，於 4°C 離心 ($9,700 \times g$) 10 分鐘。沉澱再加入 PBS 作 2 次萃取，取上清液定體積至 10 ml，貯存於 -20°C 。

(3) 總 IgA 濃度的測定

96-well flat-bottom plate 以 affinity-purified goat anti-mouse IgA (α -chain specific, $1\mu\text{g}/\text{well}$ in $100\mu\text{l}$ PBS, Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) 在 4°C coating 過夜。Plate 以 PBS 含 0.05% Tween 20 (washing buffer)洗三次後，以 blocking buffer (0.5% gelatin in PBS) 在 37°C blocking 一小時。樣品以 PBS 做適當稀釋後，取 $100\mu\text{l}$ 加入 well 在 37°C 反應 90 分鐘。接著以 washing buffer 洗五次，每一個 well 加入 $100\mu\text{l}$

peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgA (α -chain specific, Sigma Chemical Co.) 在 37 °C 反應一小時，以 washing buffer 洗五次，每一個 well 再加入 100 μ L 含 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine tablets (0.1mg/ml, Sigma Chemical Co.) 和 0.017 μ l H₂O₂ (35%) 的 phosphate-citrate buffer (0.05M, pH=5.0) 反應 10 分鐘。反應以 50 μ l 2N H₂SO₄ 終止。在 450nm 讀 peroxidase 的產物濃度。以 mouse myeloma IgA (clone:TEPC 15, Sigma Chemical Co.) 作標準曲線。

(3) Specific anti-cholera toxin IgA 的測定

小腸內容物，糞便和血清 specific anti-CT IgA 與總 IgA 濃度的測定相似。96-well flat-bottom plate 加入含 100 μ l CT (5 μ g/mL) 的 0.1 M carbonate buffer, pH 9.6。於 4 °C 靜置過夜後，以 washing buffer 洗三次，再加入 blocking buffer, 37°C 靜置一小時。接著以 washing solution 洗三次，加入 100 μ L 經適當稀釋的樣品，於 37°C 反應 90 分鐘。以 washing buffer 洗五次後，加入適當稀釋的 peroxidase conjugated goat anti-mouse IgA (α -chain specific)。Peroxidase 活性的測定如前述。用小鼠 IgA 作標準曲線以換算樣品中的 anti-CT IgA 的濃度。

5.統計方法

實驗數據以 SAS 統計軟體作統計分析。數據以 three-way ANOVA 分析後，以 Duncan's Multiple Range test 找出各組之間的顯著差異 (P<0.05)。血清 anti-CT-IgA 和總 IgA 濃度結果為非常態分佈之數據，以 Wilcoxon 2-sample test 統計分析。

五、結果與討論

炸油對小鼠終體重和飼料攝取量之影響如表一。油脂品質對小鼠體重之影響大於油脂含量。15%炸油免疫組(HO)小鼠終體重顯著低於 15%新鮮油免疫組(HC)小鼠。油脂含量對飼料攝取量之影響大於油脂之品質。高油組免疫小鼠(HC, HO)的飼料攝取量顯著小於低油組免疫小鼠(C, O)。飼以炸油之小鼠(O, HO)其小腸內容物和糞便中 anti-CT-IgA 抗體含量顯著低於新鮮油小鼠(C, HC)。炸油含量愈高，抑制效果愈顯著(Fig.1,2)。攝食炸油組小鼠(O, HO)血清的 anti-CT-IgA 濃度與新鮮低油組小鼠(C)比較有顯著的降低，但血清總 IgA 濃度則有顯著增加(Fig. 3)。

實驗結果顯示炸油對腸 anti-CT-IgA 免疫反應有抑制的作用。細胞激素對免疫作用扮演重要的調節角色，炸油是否值由影響腸免疫細胞分泌細胞激素而影響體液免疫反應需作進一步研究探討。另一方面，文獻報告炸油含有 PPAR α 的活化物(2)，也有可能炸油經由過度活化 PPAR α 而達成抑制腸的體液免疫反應。

六、成果自評

本研究計畫的執行大致與原計畫相同。結果顯示炸油有抑制腸體液免疫反應的作用，符合計畫預期之結果。炸油對腸免疫功能之影響相關研究甚少，本研究提供初步炸油對腸體液免疫功能有抑制作用，結果適合在學術期刊發表。

References

- 1.Chang, S., Peterson, R.J. and Ho, C-T. (1978) Chemical reactions involved in the deep-fat frying of foods. J. Amer. Oil. Chem. Soc. 55:718-727.
- 2.Chao, P.M., Chao, C.Y., Lin, F.J. and Huang, C. (2001) Oxidized frying oil up-regulates hepatic acyl-CoA oxidase and cytochrome P450 4 A1 genes in rats and activates PPAR α . J. Nutr. 131:3166-3174.
- 3.Cunard, R., DiCampli, D., Archer, D.C., Stevenson, J.L., Ricote, M., Glass, C.K. and Kelly, C.J. (2002) WY14,643, a PPAR α ligand, has profound effects on immune responses in vivo. J. Immunol. 169:6806-6812.
- 4.Elson, C.O. and Ealding, W. (1984) Generalized systemic and mucosal immunity in mice

- after mucosal stimulation with cholera toxin. *J. Immunol.* 132:2736-2741.
5. Enioutina, E.Y., Visic, D.M. and Daynes, R.A. (2000) Enhancement of common mucosal immunity in aged mice following their supplementation with various antioxidants. *Vaccine* 18:2381-2393.
 6. Kubow, S. (1992) Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods. *Free Radical Biol. Med.* 12:63-81.
 7. Kubow, S. (1993) Lipid oxidation products in food and atherogenesis. *Nutr. Rev.* 51:33-40.
 8. Lin, B.L., Wu, Y.J., Chiang, B.L., Liu, J.F. and Huang, C.J. (1997) Effects of dietary oxidized frying oil on immune responses of spleen cells in rats. *Nutr. Res.* 17:729-740.
 9. Lin, B.L., Lai, C.C., Lin, K.W and Chiang, B.L. (2000) Dietary oxidized oil influences the levels of type 2 T-helper cell-related antibody and inflammatory mediators in mice. *Br. J. Nutr.* 84:911-917.
 10. Orada, M., Ito, E., Terao, K., Miyazawa, T., Fujimoto, K. and Kaneda, T. (1988a) The effect of dietary lipid hydroperoxide on lymphoid tissue in mice. *Biochem. Biophys. Acta* 960:229-235.
 11. Orada, M., Ito, E., Miyazawa, T., Fujimoto, K., Ito, E., Terao, K. and Kaneda, T. (1988b) Degeneration of lymphoid tissues in mice with the oral intake of low molecular weight compounds formed during oil autoxidation. *Agric. Biol. Chem.* 52:2101-2102.
 12. Orada, M., Miyazawa, T., Fujimoto, K., and Kaneda, T. (1988) Decreases in spleen weight and blood leucocytes number with long-term feeding of oxidized oil in mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 34:163-166.
 13. Orada, M., Majima, T., Miyazawa, T., Fujimoto, K. and Kaneda, T. (1989) the effect of dietary autoxidized oils on immunocompetent cells in mice. *Biochim. Biophys. Acta* 1012:156-60.
 14. Orada, M., Kurita, Miyaji, M. and Terao, K. (1991) Depression of phagocytic activity of human polymorphonuclear leukocytes by methyl linoleate hydroperoxides. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 37:625-628.
 15. Orada, M. and Terao, K. (1992) Injury of mouse lymphocytes caused by exogenous methyl linoleate hydroperoxides in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 1165:135-140 *Biochim. Biophys. Acta*. 1012:156-60..
 16. Orada, M., Kurita, N., Terao, K. and Miyaji, M. (1995) Effect of methyl linoleate hydroperoxides on murine natural killer cell-mediated cytotoxicity. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 41:701-711.

八、圖表

Table 1. Growth indices for mice fed AIN-93G diet containing fresh or deep frying soybean oil for 28 d¹

Treatment groups ²	n	Weight (g/mouse)		Feed intake (g/mouse for 28 days)
		Initial	Final	
NC	7	16.9±1.4	20.5±1.2 ^{abc}	89.9±6.3 ^a
C	7	16.9±1.2	19.9±1.4 ^{abcd}	89.1±3.9 ^{ab}
NHC	7	16.8±1.2	20.7±1.0 ^a	83.9±4.1 ^{bcd}
HC	8	16.8±0.9	20.6±0.7 ^{ab}	80.6±3.6 ^{cd}
NO	7	16.8±0.9	19.2±1.3 ^{bcd}	86.0±3.8 ^{abc}
O	7	16.8±0.9	18.7±0.6 ^d	81.8±4.0 ^{cd}
NHO	6	17.1±0.8	20.0±1.9 ^{abcd}	79.2±5.9 ^{de}
HO	8	16.9±0.7	19.0±1.7 ^{cd}	74.9±5.1 ^e

¹Mean±SD. Within a column, values not sharing a superscript letter are significant differences (P<0.05) according to Duncan's Multiple Range test.

²NC and C: 7% fresh soybean oil; NHC and HC: 15% fresh soybean oil; NO and O: 7% deep frying soybean oil; NHO and HO: 15% deep frying soybean oil. Animals were orally given either 5 µg cholera toxin in 0.1 ml of 0.2 M NaHCO₃ (C, HC, O and HO) or vehicle (NC, NHC, NO, NHO) only at d 7 and d 21 of the 28-d feeding period.

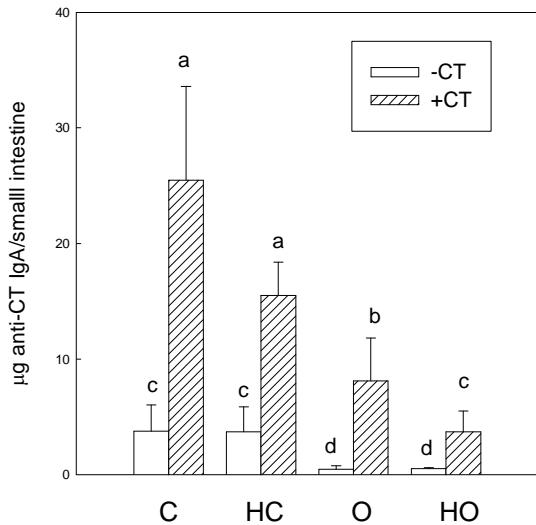


Figure 1. The anti-cholera toxin (CT) IgA in the luminal contents of small intestine in mice fed diets containing 7 (C) and 15% (HC) fresh soybean oil or 7 (O) and 15% (HO) deep frying soybean oil. Mice were either orally immunized with 5 μg CT on 0.2 M sodium bicarbonate or vehicle only on day 7 and 21 of a 28-day feeding period. Bars not sharing same letter are different ($P < 0.05$) according to the Duncan's Multiple Range test.

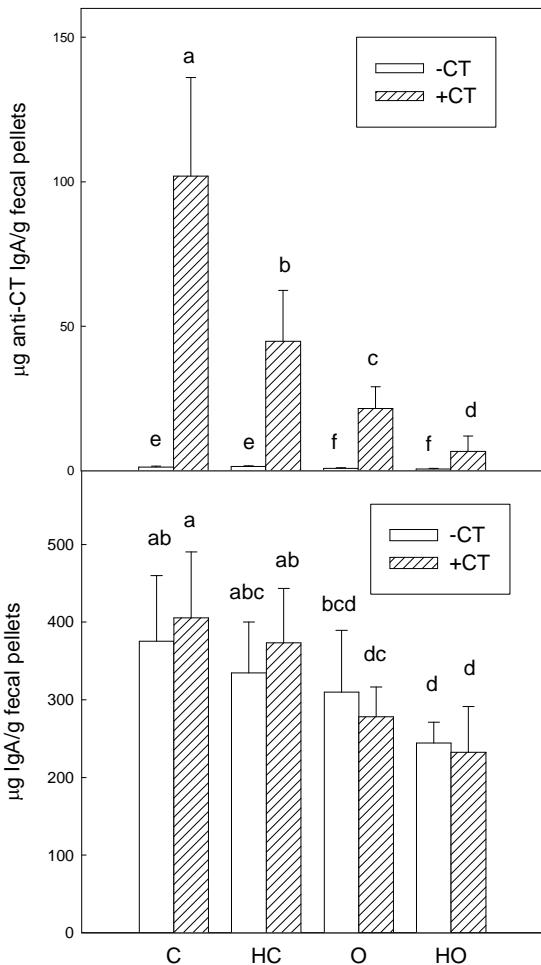


Figure 2. The total and anti-cholera toxin (CT) IgA in fecal pellets in mice fed diets containing 7 (C) and 15% (HC) fresh soybean oil or 7 (O) and 15% (HO) deep frying soybean oil. Results are reported as in Figure 1.

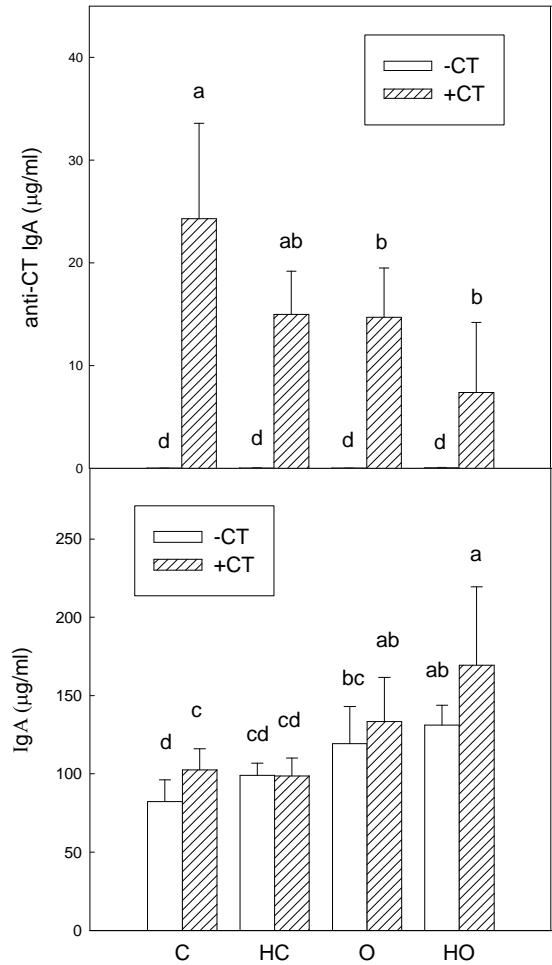


Figure 3. The total and anti-cholera toxin (CT) IgA in serum in mice fed diets containing 7 (C) and 15% (HC) fresh soybean oil or 7 (O) and 15% (HO) deep frying soybean oil. Results are reported as in Figure 1 except using Wilcoxon 2-sample test for statistical analysis.