

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

炸油對小鼠腸免疫細胞之影響 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型

計畫編號：NSC 96-2320-B-041-010-

執行期間：96年08月01日至97年10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：碩士班研究生-兼任助理人員：楊宗翰

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 98年01月30日

炸油對小鼠腸免疫細胞之影響

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC - 96 - 2320 - B - 041 - 010

執行期間：96 年 08 月 01 日至 97 年 10 月 31 日

計畫主持人：夏彩蘭

共同主持人：

計畫參與人員：楊宗翰

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 98 年 1 月 30 日

中文摘要

本研究是探討炸油對肝細胞 pIgR (polymeric immunoglobulin receptor)、皮耶氏班和腸繫膜淋巴結細胞細胞激素基因表現之影響。五週齡 C57BL/6J 雌性小鼠飼以含 7% 和 15% 的新鮮黃豆沙拉油或炸油之 AIN-93G 飼料六週。除高炸油組小鼠終體重小於高新鮮油組小鼠外，飼料中新鮮油和炸油含量對小鼠終體重沒有影響。不管飼料中油含量高低，炸油組小鼠飼料攝取量均低於新鮮油組小鼠。高炸油組小鼠糞便中 IgA 與高新鮮油組小鼠比較均顯著減少，但血清 IgA 濃度卻增加。炸油抑制負責運送血清雙聚體 IgA 至腸腔之肝細胞 pIgR mRNA 的表現。而且炸油含量愈高，肝細胞 pIgR mRNA 表現減少愈顯著。除了腸繫膜淋巴結的 IL-6 外，炸油不影響皮耶氏班和腸繫膜淋巴結細胞 IL-2、IL-4、IL-6 和 TNF- α mRNA 基準值的表現。實驗結果顯示，雖然炸油對皮耶氏班和腸繫膜淋巴結細胞細胞激素 mRNA 基準值表現大致上沒有影響，但高炸油組小鼠糞便 IgA 濃度減少和血清 IgA 濃度增加可能與肝 pIgR mRNA 減少有關。

關鍵詞：炸油、細胞激素、皮耶氏班、腸繫膜淋巴結、腸免疫系統、IgA、小鼠、多聚体免疫球蛋白受體

Abstract

This study was to investigate the effect of deep frying soybean oil on the gene expression of hepatic immunoglobulin receptor (pIgR), cytokine gene expression in Peyer's patches (PP) and mesenteric lymph nodes (MLN) 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 6 weeks. The feed intake was decreased in mice fed with the deep frying oil regardless of the oil level. The final body weight was decreased in HO group mice compared to the HC group mice. The high serum IgA level in concomitant with low fecal IgA concentration was also found in HO group mice. The hepatic pIgR, which is responsible for transport of blood dimeric IgA into the gut lumen, was inhibited by the deep frying oil. The hepatic pIgR mRNA was significantly reduced 40% and 58% in O and HO group mice, respectively. The deep frying oil exerted no effect on the basal level of IL-2, IL-4, IL-6 and TNF- α mRNA in PP. However, the IL-6 mRNA was significantly increased in MLN of HO group mice. These results suggested that the high serum IgA and low fecal IgA concentration may contribute by the low gene expression of hepatic pIgR in HO group mice.

Keywords: deep frying oil, gut immune system, cytokines, Peyer's patches, mesenteric lymph nodes, IgA, mice, polymeric immunoglobulin receptor

一、前言

腸免疫系統包括集合淋巴結 (Peyer's patches, PP)、固有層(lamina propria, LP)、上皮內淋巴球(intraepithelial lymphocytes, IEL) 和腸繫膜淋巴結(mesenteric lymph nodes, MLN)。PP 含有可誘發免疫反應所需的免疫細胞，即 B, T, 巨噬細胞(macrophages)和輔助細胞(accessory cells)。腸 LP 有分泌抗體的 B 細胞 (plasma cell)和 T helper cell。IEL 的 T cell receptor 主要由 γ 和 δ chain 所組成， $\alpha\beta$ IEL 只佔少數(2)。IEL 的功能還目前不是很瞭解，已知 $\gamma\delta$ -IEL 具有毒殺活性、調節腸上皮細胞的恒定和保護腸黏膜的作用，推測對黏膜免疫系統扮演重要的角色(4,7,23)。MLN 收集腸的淋巴液，是腸黏膜免疫系統(gut mucosal immune system)和系統性免疫系統(systemic immune system)交接的地方。

腸和其他的黏膜場所對抗抗原最重要的抗體是 IgA，而且佔人體每天抗體生產總量的 60% (8,11)。IgA 在上皮下結締組織的漿細胞產生 IgA，因此 IgA 到達外黏膜層必需通過上皮細胞。位於上皮細胞底側的 pIgR 負責運送 IgA(12)。只有多體形式的 IgA 和 IgM 能與 pIgR 結合(3)。pIgR 和其它的細胞膜受體不同，與配體(ligand)結合後不再重覆使用或在細胞內分解，反而有部份的 pIgR 與受體形成複合物被釋出(1)。pIgR 獨特之處是沒有配體結合，跨膜 (transcytosis) 仍然發生，pIgR 原與配體結合一起釋出的部份仍會單獨被釋出稱 secretory

component (SC)。

小鼠和人的研究結果皆支持 T-helper cell (Th cell)可分為兩個 subset(20)。由抗原對 Th cell 刺激所產生的細胞激素(cytokine)種類，可把 Th cell 分為 Th1 cell 及 Th2 cell。Th1 cell 產生 interleukin(IL)-2，interferon- γ (IFN- γ)和 tumur necrosis factor- β (TNF- β)，可促進細胞性免疫反應(cell-mediated immune response)。相反，Th2 cell 分泌 IL-4、IL-5、IL-6 及 IL-10，主要促進體液(抗體)免疫反應(humoral immune response)。口服的免疫方式主要刺激 PP 產生 Th2 type 細胞激素而促進體液免疫反應(21)。

本研究室發現炸油對小鼠腸體液免疫反應有抑制作用。五週齡雌性 C57BL/6J 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 μ g cholera toxin (CT)。不管飼料中油含量高低，炸油組免疫小鼠糞便中 anti-CT-IgA 和總 IgA 濃度與新鮮油組免疫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。炸油組免疫小鼠之血清 anti-CT-IgA 濃度顯著低於 7% 新鮮油組免疫小鼠，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。由於口服 CT 在腸主要是引起 Th2 反應(22)，炸油可能抑制 Th2 細胞激素的分泌而降低腸 anti-CT IgA 反應。

二、研究目的

本研究計畫的目的是探討炸油是否經由影響腸免疫細胞 Th1 和 Th2 細胞激素表現而影響腸特異性體液免疫反應。另外炸油小鼠血清 IgA 濃度卻增加和糞便 IgA 濃度顯著減少是否與肝 pIgR 基因表現有關。

三、文獻探討

Orada et al. 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(13,14)、胸腺細胞 DNA 合成降低(16)、脾臟重量和白血球數目減少(15)。體外研究則發現 MLPH 抑制小鼠脾臟 lymphoblasts DNA 合成(18)、脾臟自然殺手細胞對標細胞的毒殺活性(19)和人類 polymorphonuclear leukocytes 的吞噬作用(17)。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(5)，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(9)。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(10)。目前除了本研究室從事炸油對腸免疫反應的研究，文獻上沒有炸油對腸免疫反應的研究報告。

四、研究方法

1. 炸油之製備

炸油之製備根據 Chao 氏等人(6)之方法。統一黃豆沙拉油於鐵鍋中以瓦斯加熱，加熱溫度維持在 $205 \pm 5^\circ\text{C}$ 。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 6 週。每週記錄體重和飼料攝取量，並在飼養至 28 天和犧牲前一天開始收集 24 小時糞便。以 CO_2 麻醉小鼠，眼窩採血後，以 CO_2 使小鼠窒息死亡，移除肝臟、皮耶氏班和腸繫膜淋巴結。血液於 3000rpm 離心 10 分鐘，血清保存於 -20°C 。

3. 分析方法

(1) Total RNA extraction 和 Real-time PCR

肝、皮耶氏班和腸繫膜淋巴結細胞之總 RNA 利用 RNAspin Mini RNA isolation kit (GE Healthcare)根據製造商之方法抽取。抽取 RNA 之品質以跑 RNA 電泳鑑定。cDNA 之製備採用 High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems)。RT-PCR 採用 Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) 定量肝 pIgR、皮耶氏班和腸繫膜淋巴結細胞 mRNA 之表現。以 36B4 (acidic ribosomal phosphoprotein P0)為 house keeping gene 作為 internal control。下表為使用之 primer sequences.

Table 2. Sequences of the polymerase chain reaction primers

Gene	Sequence
pIgR	F: 5'-GGACGACACTGGGAGCTAC-3' R: 5'-GTCACTCGGCAACTCAGGAAC-3'
36B4	F: 5'-ATGCCAGGGAAAGACAGG-3' R: 5'-TCTGCTGCATCTGCTTGGAG-3'
IL-2	F: 5'-TGAGCAGGATGGAGAATTACAGG-3' R: 5'-GTCCAAGTTCATCTCTAGGCAC-3'
IL-4	F: 5'-GGTCTCAACCCCCAGCTAGT-3' R: 5'-GCCGATGATCTCTCAAGTGAT-3'
IL-6	F: 5'-TAGTCCTCCTACCCCAATTTC-3' R: 5'-TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC-3'
TNF- α	F: 5'-CCCTCACACTCAGATCATCTTCT-3' R: 5'-GCTACGACGTGGGCTACAG-3'

F, forward; R, reverse; pIgR, polymeric immunoglobulin receptor ; 36B4, acidic ribosomal phosphoprotein P0

(2)糞便抽出物的製備

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。以均質機把糞便打散後，vortex 震動 20 秒，於 4°C 離心(9,700 x g)10 分鐘。取上清液定體積至 10 ml，保存於-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 μ g/well in 100 μ 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 μ 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 μ 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。

4. 統計方法

實驗數據以 SAS 統計軟體作統計分析。數據以 ANOVA 分析後，以 Duncan's Multiple Range test 找出各組之間的顯著差異 (P<0.05)。開始體重、四週糞便 IgA 濃度、皮耶氏班細胞激素和腸繫膜淋巴結 IL-2 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。高炸油組(HO)小鼠終體重顯著低於高

新鮮油組(HC)小鼠。油脂含量與品質對飼料攝取量皆有影響。炸油組小鼠(O, HO)的飼料攝取量顯著低於新鮮油組小鼠(C, HC)，高油組小鼠的飼料攝取量也顯著低於其對照新鮮油組之小鼠。低炸油組小鼠飼養六週之糞便和血清 IgA 濃度與低新鮮油組小鼠比較無顯著差異，但高炸油組小鼠 4 週和 6 週糞便 IgA 濃度顯著低於高新鮮油組小鼠，血清 IgA 則顯著高於新鮮油組(表二)。炸油影響小鼠肝 pIgR mRNA 之表現，低炸油和高炸油組小鼠 pIgR mRNA 之表現與新鮮組小鼠比較分別降低 40% 和 58%(表二)。炸油對皮耶氏班細胞之細胞激素 mRNA 表現無影響，腸繫膜淋巴結的結果與皮耶氏班大致相同，只有高炸油小鼠腸繫膜淋巴結細胞 IL-6 mRNA 顯著增加(表三)。

實驗結果顯示炸油對皮耶氏班和腸繫膜淋巴結細胞激素 mRNA 表現無影響，可能是本實驗未使用 LPS、PHA 等裂殖素刺激皮耶氏班和腸繫膜淋巴結細胞。在裂殖素刺激情況下，炸油是否能影響皮耶氏班和腸繫膜淋巴結細胞細胞激素 mRNA 表現有待進一步的研究。攝食高低炸油小鼠肝細胞 pIgR mRNA 的表現都有減少，但只有高炸油組小鼠血清 IgA 顯著增加。pIgR 在沒有配體的情況下仍然進行跨膜運送，在腸腔中也有 secretory component，表示肝 pIgR 的表現量是高於運送血中雙體 IgA 的需求數目。由此推測，低炸油小鼠肝 pIgR mRNA 雖然降低 40%，但仍有足夠的 pIgR 數目維持正常運送血中雙聚體 IgA。另一方面，糞便 IgA 的來源有二途徑:1)腸上皮細胞 pIgR 從固有層(lamina propria)運送雙聚體 IgA 至腸腔，2)肝細胞 pIgR 運送血中雙眾體 IgA 至腸腔。高炸油組小鼠肝 pIgR mRNA 降低 58% 可部分解釋糞便 IgA 濃度減少之原因，至於炸油對腸 pIgR 的影響則有待探討。由於炸油有降低小鼠之飼料攝取量，未來進行的實驗需要包括有對飼育組，以釐清所觀察的炸油現象不是降低飼料攝取而造成。

六、成果自評

本研究計畫較原計畫增加肝細胞 pIgR mRNA、血清和糞便 IgA 的分析項目。結果顯示炸油對腸體液免疫反應之抑制作用與皮耶氏班和腸繫膜淋巴結細胞激素 mRNA 基準值表現無關。在有刺激物下炸油對皮耶氏班和腸繫膜淋巴結細胞激素 mRNA 表現之影響則有探討的必現，而且可進一步了解炸油對細胞繳素之影響。此研究的另一發現攝食高炸油的小鼠肝細胞 pIgR mRNA 表現減少 58% 的結果可初步解釋炸油小鼠血清總 IgA 濃度的增加和糞便 IgA 濃度的減少。研究結果証實炸油對腸免疫功能有影響，結果適合在學術期刊發表。

References

- 1.Ahnen, D.J., Brown, W.R. and Kloppel, T.M. (1985) Secretory component: the polymeric immunoglobulin receptor. What's in it for the gastroenterologist and hepatologist? *Gastroenterology* 89:667-682.
- 2.Boismenu, R. and Havran, W.L. (1998) $\gamma\delta$ T cells in host defense and epithelial cell biology. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 86:121-133.
- 3.Brandtzaeg, P. (1981) Transport models for secretory IgA and secretory IgM. *Clin. Exp. Immunol.* 44:221-232.
- 4.Cerf-Bensussan, N. and Guy-Grand, D. (1991) Intestinal intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterol. Clin. North Amer.* 20:549-576.
- 5.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.
- 6.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 PPARalpha. *J. Nutr.* 131:3166-3174.
- 7.Chen, Y., Chou, K., Fuchs, E., Havran, W.L. and Boismenu, R. (2002) Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial $\gamma\delta$ T cells. *PNAS* 99:14338-14343.
- 8.Johansen, F.E., Yen, E.H., Dickinson, B., Yoshida, M., Claypool, S., Blumberg, R.S. and Lencer, W.I. (2006) Biology of gut immunoglobulins. In "Physiology of the Gastrointestinal Tract", eds by Johnson, L.R., pp.1067-1090, Academic Press, New York.

9. 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.
10. 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.
11. McGhee, J.R., Mestecky, J., Elson, C. and Kiyono, H. (1989) Regulation of IgA synthesis and immune response by T cells and interleukins. *J. Clin. Immunol.* 9:175-199.
12. Mestecky, J., Lue, C. and Russell, M.W. (1991) Selective transport of IgA. Cellular and molecular aspects. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 20:441-471.
13. 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.
14. 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.
15. Orada, M., Miyazawa, T., Fujimoto, K., and Kaneda, T. (1988c) 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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..
19. 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.
20. Romagnani, S. (1992) Induction of Th1 and Th2 responses: a key role for the 'natural' immune response? *Immunol. Today* 13:379-381.
21. Xu-Amano, J., Aicher, W.K., Taguchi, T., Kiyono, H. and McGhee, J.R. (1992) Selective induction of Th2 cells in murine Peyer's patches by oral immunization. *Int. Immunol.* 4:433-445.
22. Xu-Amano, J., Kiyono, H., Jackson, R.J., Staats, H.F., Fujihashi, K., Burrows, P.D., Elson, C.O., Pillai, S. and McGhee, J.R. (1993) Helper T cell subsets for immunoglobulin A responses: oral immunization with tetanus toxoid and cholera toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in mucosa associated tissues. *J. Exp. Med.* 178:1309-1320.
23. Yoshikai, Y. (1999) The interaction of intestinal epithelial cells and intraepithelial lymphocytes in host defense. *Immunol. Res.* 20:219-235.

八、圖表

Table 1. Growth indices for mice fed AIN-93G diet containing fresh or deep frying soybean oil for 6 weeks¹

Treatment groups ²	n	Weight (g/mouse)		Feed intake (g/mouse for 6 weeks)
		Initial ³	Final	
C	15	15.8±1.3	20.3±1.3 ^{ab}	133.4±7.8 ^a
O	15	15.6±0.9	19.6±2.4 ^{ab}	122.9±9.3 ^b
HC	14	15.8±1.1	20.8±1.0 ^a	123.6±5.3 ^b
HO	15	15.6±0.9	19.4±1.7 ^b	111.4±8.2 ^c

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

² C: 7% fresh soybean oil; HC: 15% fresh soybean oil; O: 7% deep frying soybean oil; HO: 15% deep frying soybean oil.

³Values are not significant differences (P<0.05) according to Wilcoxon 2-sample test.

Table 2. Fecal and serum IgA concentrations and pIgR/36B4 ratio for mice fed AIN-93G diet containing fresh or deep frying soybean oil for 6 weeks¹

Treatment groups ²	n	fecal pellets IgA (μg/g)		Serum IgA (μg/ml)	pIgR/36B4 ⁴
		4 wk ³	6 wk		
C	15	448.9±98.2 ^a	401.5±81.2 ^a	135.2±27.5 ^{ab}	1.00±0.12 ^b
O	15	345.1±71.7 ^b	394.1±166.8 ^a	145.1±41.8 ^{ab}	0.60±0.12 ^c
HC	14	479.9±80.9 ^a	440.4±171.6 ^a	121.5±20.8 ^b	1.09±0.12 ^a
HO	15	268.2±106.2 ^c	291.1±108.2 ^b	173.2±84.4 ^a	0.42±0.07 ^d

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

² C: 7% fresh soybean oil; HC: 15% fresh soybean oil; O: 7% deep frying soybean oil; HO: 15% deep frying soybean oil.

³Values are significant differences (P<0.05) according to Wilcoxon 2-sample test.

⁴Results expressed in relative abundance mRNA ratio between pIgR (polymeric immunoglobulin receptor) and 36B4 (acidic ribosomal phosphoprotein P0)

Table 3. Cytokines mRNA of Peyer's patches and mesenteric lymph nodes cells in mice fed AIN-93G diet containing fresh or deep frying soybean oil for 6 weeks¹

groups ²	C	O	HC	HO
Peyer's patches ³				
IL-2	1.05±0.35	1.05±0.35	1.09±0.55	1.37±0.77
IL-4	1.13±0.57	1.54±1.07	1.23±0.62	2.69±2.66
IL-6	1.25±0.71	1.73±1.29	1.61±1.12	4.43±5.00
TNF-α	1.04±0.30	1.03±0.24	1.06±0.50	1.13±0.51
Mesenteric lymph nodes ⁴				
IL-2 ³	1.03±0.26	1.04±0.32	0.95±0.40	1.10±0.53
IL-4	1.63±1.19	1.77±1.43	1.61±1.12	2.96±2.63
IL-6	1.63±1.08 ^b	1.69±1.38 ^b	1.47±0.74 ^b	3.08±2.76 ^a
TNF-α	1.01±0.20	1.04±0.32	1.09±0.57	1.04±0.29

¹Mean±SD. n=15 per group except n=14 for group HC. Results expressed in relative abundance mRNA ratio between pIgR (polymeric immunoglobulin receptor) and 36B4 (acidic ribosomal phosphoprotein P0).

² C: 7% fresh soybean oil; HC: 15% fresh soybean oil; O: 7% deep frying soybean oil; HO: 15% deep frying soybean oil.

³ Within each cytokine, values are not significant differences(P<0.05) according to Wilcoxon 2-sample test.

⁴ Within each cytokine, values not sharing a superscript letter are significant differences (P<0.05) according to Duncan's Multiple Range test.