嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CN9725
計畫名稱：糖水餵食對大鼠抗氧化酵素的影響

執行期間：97 年 1 月 1 日至 97 年 12 月 31 日

□整合型計畫　　☑ 個別型計畫
計畫總主持人：　　計畫主持人：黃惠玲
子計畫主持人：

中華民國 98 年 2 月 28 日

糖水餵食對大鼠抗氧化酵素的影響

張廉筠 蕭慧美 黃惠玲*
嘉南藥理科技大學保健營養系

摘要

由於國人不分男女老少都愛喝含糖飲料，特別是在炎炎夏日裡幾乎是「飲料當水喝」，但許多文獻均指出喝含糖飲料會增加罹患代謝症候群（X 症候群, metabolic syndrome）的危險，症狀包括：高胰島素血症、高血壓及血脂異常，上述病症均與體內氧化壓力（oxidative stress）升高有關。本實驗模擬「以含糖飲料取代水」的飲食模式，設計了喝蔗糖水（30% sucrose）的大鼠動物模式，目的在於探討糖水餵食對大鼠抗氧化酵素的影響。實驗設計將 250 克的 Wistar 品系公鼠依體重隨機分成三組，包括控制組 (control group, C)、糖水組 (30% sucrose water group, S) 與糖水對飼育組 (pair-fed sucrose group, SP)， 每組 8 隻，C 及 S 組飼料與水皆自由攝取 (*ad libitum*)，實驗全程供應 AIN-93G 基礎飼料與去離子水。飼養 7 週後取血液與肝臟，分析脂質過氧化指標 TBARS、抗氧化分子與酵素活性。結果顯示：糖水組顯著降低飼料攝取量，爲控制組的 65%，但總熱量攝取與控制組相當，終體重類似控制組，體脂肪比例方面，糖水組之腹壁後白色脂肪（retroperitoneal fat）量顯著高於控制組（p<0.05），副睪脂無此現象；而糖水對飼育組飼料攝取量爲控制組的 55%，相當於限食效應，生長遲緩，終體重顯著低於其他兩組，約爲 60%（p<0.05）。高蔗糖餵飼大鼠 7 周顯著誘發血清 TG 升高，分別爲 C 組與 SP 組的 1.64 倍、2.2 倍（p<0.05），此爲糖水獨特效應，非因攝食量降低所致；血清 α-生育醇含量、α-生育醇/TG 比率均因糖水餵食而顯著下降，血清 GSH 含量與紅血球抗氧化酵素活性三組之間無統計上的差異。肝臟方面，餵食糖水不影響 TBARS 與 GSH 含量，顯著降低 α-生育醇濃度（p<0.05），catalase、SOD 與 GPx 三種酵素活性也不受糖水餵食的影響；糖水對飼育組之 TBARS 與粒線體 aconitase 酵素活性顯著低於控制組，抗氧化酵素之 catalase 活性與蛋白質量（以 western blot 分析）均顯著升高，此爲限食獨特效應。結論：糖水餵食顯著增加大鼠血清 TG 含量與腹壁後白色脂肪量，此效應與糖水促進脂質生合成有關，糖水餵食 6 週顯著惡化維生素 E 營養狀況，但不影響紅血球與肝臟抗氧化酵素表現，限食會顯著降低大鼠體重、肝臟 TBARS，增加 catalase 表現量，此突顯限食除了可以減重外尚有其他效應存在，值得深入探討。

關鍵詞：蔗糖水、氧化壓力、抗氧化酵素、大鼠

前 言

高糖餵飼動物模式

改變飼料中的碳水化合物成份與增加比例（例如：60%蔗糖或果糖）會誘發大鼠代謝上的改變，產生類似代謝症候群（metabolic syndrome）等症狀，包括高胰島素血症 (hyperinsulinemia)、高血脂 (hyperlipidemia) 與高血壓 (hypertension)，因此高糖餵飼大鼠亦被視爲第二型糖尿病的動物模式，然而果糖或蔗糖爲何會造成這些疾病產生，詳細機制尚不明確，推測可能與氧化壓力(oxidative stress)有關，無論是高果糖與高蔗糖餵飼都會造成體內氧化壓力增加 (Bar-On & Stein, 1968; Reed et al., 2000)。

高糖餵飼與氧化壓力 (oxidative stress)

Faure 等學者（1997） 利用 2 周齡的 Wistar 雄性大鼠，給予高果糖飼料 6 週，誘發高 TG 血症與胰島素阻抗，不影響血漿維生素 E，但 TBARS 與 GSSG/GSH 比率顯著上升，鋅與硒含量顯著下降，銅濃度不變；紅血球之 Cu,Zn-SOD 活性明顯下降了 33%，Se-GPx 不受影響，表示高果糖餵飼會造成大鼠氧化壓力升高；同時補充 20 倍維生素 E，可以改善胰島素阻抗，並顯著降低血漿 TBARS 與 GSSG/GSH 比率，回復紅血球 Cu,Zn-SOD 活性，但不影響血清礦物質與 TG，表示補充維生素 E 確實可以透過本身清除自由基的能力而降低氧化壓力。就組織氧化壓力方面，Cavarape 等學者（2001）餵食 Wistar 雄性大鼠（體重 200-220g）高果糖（fructose）飼料，果糖比例佔總熱量 60%，飼養 2 週後發現，果糖組對抗氧化酵素的 mRNA 含量影響具有組織特異性，顯著降低肝臟與心臟的 catalase mRNA，肌肉與脂肪組織則僅呈現較低趨勢；而 Cu,Zn-SOD mRNA 於肝臟中顯著降低，卻顯著增加於心臟中，肌肉與脂肪組織表現也是僅呈現較低趨勢，無統計上的差異。由於飼料中果糖會影響礦物質鐵、鋅與銅的生體可利用率，這可能也是抗氧化酵素 SOD、GPx 與 catalase 酵素活性變動的原因之一（O'Dell, B. L. 1993）。

Busserolles 等學者用 3 周齡離乳 Wistar 品系公鼠，飼以高蔗糖飼料 2 週，發現血漿、尿液、心臟、胸腺與胰臟之 TBARS 顯著升高，肝臟僅有升高之趨勢；血漿維生素 E 顯著降低，組織則無顯著差異；NOx（nitrite+nitrate）含量顯著增加，血漿銅濃度顯著降低、鋅含量顯著升高。心臟細胞質 Cu,Zn-SOD 酵素活性顯著下降，但 mRNA 含量卻顯著提高，而 Mn-SOD（存在粒線體中）、GPx 與 catalase 的酵素活性與 mRNA 則不受影響，而且心臟的銅濃度下降，鋅濃度不變（Busserolles et al., 2002a, b）。

由以上高糖大鼠動物實驗得知，兩週短期的飼養就會導致體內有較高的氧化壓力，而且公鼠效應比母鼠明顯（Busserolles et al., 2002c），而抗氧化酵素中又以 Cu, Zn-SOD 酵素活性下降最能反映氧化壓力，或許可視爲糖水模式氧化壓力升高的生物感應器（biosenser）。Cu, Zn-SOD 含有兩個次單元體，每個次單元體的活性區都有一個 Cu 和 Zn，Cu 位於催化中心，Zn 扮演共催化的角色（coactive or cocatalytic role），大白鼠缺銅會導致組織 Cu,Zn-SOD 活性下降，但不影響蛋白質量，表示缺銅可能主要影響在轉譯後層次（post-translational level）影響酵素活性，因此 Cu,Zn-SOD 活性常被視爲銅營養狀況的功能性指標（Taylor et al., 1988；Chung et al., 1988）。體外試驗證實 H_2O_2 會破壞 Cu, Zn-SOD 之 Zn 結合位置，降低對 superoxide 的清除能力，也會藉由氧化 histidine ligand 干擾 Cu 的鍵結，降低酵素活性（Sampson and Beckman, 2001），其中 Cu 在酵素穩定上扮演最主要的角色（Lynch and Colón ,2006）。至於高糖餵飼誘發的氧化壓力卻會增加組織 Cu,Zn-SOD mRNA，推測可能導因於增加活化因子 C/EBPα 表現 (Kim et al., 1997)，因此推測氧化壓力調控 Cu,Zn-SOD 表現可能在轉錄層次「活化」與轉譯後修飾「抑制活性」，導致增加 mRNA 量與總蛋白質量，但酵素活性卻降低。

目前已知高糖飲食扮演一個助氧化劑（pro-oxidant）的角色，增加體內氧化壓力（oxidative stress），但是機制不明（McDonald, 1995），可能透過降低抗氧化酵素表現與抗氧化分子含量，間接減弱細胞防禦能力，導致與活性氧物質（Reactive oxygen speices, ROS）之間的平衡失調，造成氧化壓力（oxidative stress）；而糖類代謝的正常過程就會產生許多活性氧物質，高糖飲食的熱量來源以糖類爲主，可能增加代謝性的自由基產量，促成氧化壓力，造成氧化傷害；另外高糖提供了熱量，因此大鼠攝食量下降，亦可能造成營養素失衡（鋅、銅、鐵），影響助氧化劑與氧化劑之間的動態平衡，加劇了氧化壓力。

本實驗模擬「以含糖飲料取代水」的飲食模式，設計了喝蔗糖水（30% sucrose）的大鼠動物模式，目的在於探討喝蔗糖水對大鼠抗氧化系統的影響。

材料及方法

1. 實驗設計：進行大白鼠動物實驗，將 250 克的 Wistar 品系公鼠，適應 3 天後，依體重隨機分成三組，包括控制組 (control group, C)、糖水組 (30% sucrose water group, S) 與糖水對飼育組 (pair-fed sucrose group, SP)， 每組 8 隻，C 及 S 組飼料與水皆自由攝取 (*ad libitum*)。由於喝糖水的大鼠有部分熱量來自於糖水，飼料攝取量會降低，因此我們設計了糖水對飼育組（SP），其攝食量控制與糖水組一樣，水則供應去離子水（自由攝取），目的在於區隔 S 組的變化是糖水 or 攝食量降低效應。實驗全程供應 AIN-93G 基礎飼料與去離子水（幾乎不含礦物質），飼養期間進行尾巴採血偵測相關指標變化，飼養 7 週後，分析血液、組織抗氧化酵素的表現。犧牲前禁食 8-12 小時以 CO_2 窒息犧牲，取血液與所有組織：肝臟、腎臟、心臟與腦進行稱重，取樣投入液態氮中，供日後分析，部分肝臟當天均質，進行 fractionation 分出細胞質，分裝保存於 -70℃，供日後酵素分析。

2. 實驗方法：

（1）血清分析： TG 含量採用市售試劑組（RANDOX, Antrim, UK）定量之；維生素 E 分析，取血漿 0.1 mL 加入 2 mL 絕對酒精 (含 1% pyrogallol)，0.1 mL HCL 混合均勻，再加 6 mL 正己烷 (n-hexane) 激烈振盪 5 分鐘，離心分層，抽取上面 Hexane 層 5 mL 進行冷凍乾燥，於減壓真空下去除溶劑。最後加入 200 μL 甲醇充份溶解殘留物，供 HPLC 分析定量。

（2）肝臟抗氧化分子與酵素分析：抗氧化分子分析維生素E、GSH含量；抗氧化酵素則分析超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase，Cu,Zn-SOD)（Flohe＆Otting, 1984）、過氧化氫酶 (觸酶，Catalase)（Aebi, H., 1984）與麩胱甘肽過氧化酶 (Glutathione peroxidase，GPx)酵素活性（Paglia＆Valentine, 1967）。

（3）氧化傷害指標分析：脂質過氧化指標TBARS測定：脂質過氧化時，會產生MDA (malondialdehyde)，1分子MDA會與2分子TBA(thiobarbituric acid)結合形成粉紅色TBARS（thiobarbituric acid reactive substance），測定TBARS生成量來代表脂質過氧化程度，以TMP（1,1,3,3-tetramethoxypropane）當標準品換算出組織內MDA的濃度。

（4）抗氧化酵素之蛋白質分析 以西方轉漬法（western blot）進行分析定量。

（5）統計分析：實驗結果均以平均值 ± 標準偏差（Mean ± SD）表示，先確認數據爲常態分佈後，以 Duncan's Multiple Range test 來檢定各組獨立樣本其組間差異之顯著性，將顯著性水準設定爲 $p < 0.05$；相關性採 Pearson correlation 分析。各項統計分析係用 SAS 軟體以電腦執行。

結果及討論

一、生長狀況（表1、表2）

體重與攝食量方面，如表1所示，糖水組的體重增加狀況與控制組相當，外觀與活動力均無異狀，雖然其飼料攝取量顯著降低，爲控制組的65%，但因總熱量攝取與控制組相當，終體重類似控制組，兩組間沒有統計上的差異；而糖水對飼育組（SP組），飼料攝取量爲控制組的55%，相當於限食效應，第一周即出現生長遲緩現象，脾氣暴躁、不安，飼養7周後，終體重顯著低於其他兩組，約爲60%（$p<0.05$）。

組織重量及組織相對重量如表2所示，除了體脂肪比例之外，糖水組的組織重量均與控制組相當，糖水餵食顯著增加腹壁後白色脂肪（retroperitoneal fat）量，顯著比控制組高35%（$p<0.05$），組織相對重量也高於控制組33%（$p<0.05$），副睪脂（EP）無此現象。糖水對飼育組（SP組）除了腦之外，所有組織重量均顯著低於其他兩組，腎臟、心臟與腦之組織相對重量顯著最高（$p<0.05$），由於SP組體重只有其他兩組的60%，體型小組織相對較小屬正常現象，由此得知，攝食量與總熱量均爲體重及組織大小的影響因子，糖水組雖然生長正常，但是在營養不均衡的狀況下，由蔗糖水提供熱量改變正常代謝，例如促進脂質生合成效應（lipogenesis），所以腹壁後白色脂肪量顯著增加。

表 1 餵食糖水與限食對大鼠體重、體重增加量、總熱量及飼料利用效率的影響

	C	S	SP
n	8	8	8
Initial body weight *(g/rat)*	278 ± 7^a	278 ± 7^a	278 ± 7^a
Final body weight *(g/rat)*	496 ± 40^a	504 ± 23^a	308 ± 59^b
Total caloric intake *(Kcal)*	4487 ± 260^a	4750 ± 239^a	2492 ± 520^a
Feed efficiency	19.1 ± 2.5^a	30.9 ± 5.0^a	3.5 ± 8.2^a

1. Each value represents Mean ±S.D.
2. Values not sharing the same superscript letters in the same horizontal row are significantly different from on another by Duncan's Multiple Range Test ($p<0.05$)
3. Feed efficiency = Body weight gain (g) / Food intake (g)

表2　餵食糖水與限食對大鼠之組織重量及組織相對重量

	C	S	SP
		(g)	
n	8	8	8
Liver	13.3 ± 2.1^{a}	14.3 ± 0.8^{a}	8.37 ± 2.46^{b}
Kidney	3.26 ± 0.34^{a}	3.06 ± 0.34^{a}	2.21 ± 0.38^{b}
Heart	1.29 ± 0.08^{a}	1.34 ± 0.09^{a}	0.86 ± 0.13^{b}
Brain	1.80 ± 0.18^{a}	1.92 ± 0.09^{a}	1.85 ± 0.10^{a}
epididylmal fat pad (EP)	11.4 ± 3.2^{a}	10.3 ± 1.6^{a}	2.96 ± 2.11^{b}
retroperitoneal fat (RE)	12.7 ± 2.2^{b}	17.2 ± 4.3^{a}	2.7 ± 2.0^{c}
WAT#	24.1 ± 4.8^{a}	27.5 ± 4.8^{a}	6.0 ± 4.0^{b}
	Relative tissue weight (%) 【 *tissue weight (g) / body weight (g)* 】		
Liver	2.74 ± 0.27^{a}	2.92 ± 0.12^{a}	2.78 ± 0.34^{a}
Kidney	0.68 ± 0.05^{b}	0.62 ± 0.06^{c}	0.75 ± 0.03^{a}
Heart	0.27 ± 0.01^{b}	0.27 ± 0.02^{b}	0.29 ± 0.02^{a}
Brain	0.37 ± 0.04^{b}	0.39 ± 0.03^{b}	0.64 ± 0.13^{a}
epididylmal fat pad (EP)	2.33 ± 0.47^{a}	2.09 ± 0.26^{a}	0.93 ± 0.52^{b}
retroperitoneal fat (RE)	2.64 ± 0.42^{b}	3.5 ± 0.81^{a}	0.81 ± 0.51^{c}
WAT#	4.98 ± 0.69^{a}	5.59 ± 0.84^{a}	1.84 ± 0.97^{b}

1. Each value represents Mean ±S.D.
2. Values not sharing the same superscript letters in the same horizontal row are significantly different from on another by Duncan's Multiple Range Test ($p<0.05$)
3. #白色脂肪（White adipose tissue, WAT）＝副睪脂（epididylmal fat pad）＋腹腔脂（retroperitoneal fat）

二、血液相關指標（表3）

血紅素濃度三組之間無統計上的差異，血清三酸甘油酯濃度在糖水餵食第4周即顯著高於其他兩組，第7周比控制組高64% ($p<0.05$)，由此得知血清三酸甘油酯濃度升高是糖水餵食的獨特效應，非攝食量降低所致。血清維生素E（α-生育醇）濃度，控制組顯著高於其他兩組，α-生育醇/TG比值以糖水鼠顯著最低，表示維生素E在糖水餵食組有缺乏之虞，可能不足以發揮保護功效。血清GSH與鹼性磷解酶活性三組之間無統計上的差異；抗氧化酵素方面，紅血球catalase、SOD與GPx酵素活性均不受糖水餵食與限食的影響。

表 3 餵食糖水與限食對大鼠血液指標的影響

	C	S	SP
n	8	8	8
Hemoglobin *(mmol/L)*	16.7 ± 1.7^{a}	16.6 ± 1.2^{a}	16.3 ± 2.7^{a}
Serum			
TG *(mmol/L)*	1.07 ± 0.31^{b}	1.75 ± 0.34^{a}	0.80 ± 0.23^{b}
α-tocopherol *(μmol/L)*	11.3 ± 3.6^{a}	7.7 ± 2.0^{b}	6.5 ± 3.4^{b}
α-tocopherol/TG ratio *(μmol/mmol)*	10.9 ± 3.6^{a}	4.5 ± 1.4^{b}	8.4 ± 3.3^{a}
GSH *(mmol/L)*	0.64 ± 0.13^{a}	0.61 ± 0.11^{a}	0.64 ± 0.17^{a}
Alkaline phosphatase activity *(U/L)*	60.0 ± 6.4^{a}	63.1 ± 11.9^{a}	72.1 ± 16.7^{a}
RBC			
Catalase activity *(k/μmol Hb)*	1.25 ± 0.91^{a}	1.08 ± 0.35^{a}	1.28 ± 0.70^{a}
SOD activity *(unit/μmol Hb)*	67.4 ± 11.1^{a}	66.6 ±7.2^{a}	71.4 ± 10.9^{a}
Glutathione peroxidase activity *(unit/μmol Hb)*	2.55 ± 0.22^{a}	2.53 ± 0.35^{a}	2.49 ± 0.34^{a}

1. Each value represents Mean ±S.D.
2. Values not sharing the same superscript letters in the same horizontal row are significantly different from on another by Duncan's Multiple Range Test (p<0.05)

三、肝臟相關指標（表4）

肝臟方面，餵食糖水不影響TBARS與GSH含量，顯著降低α-生育醇濃度（p<0.05），catalase、SOD與GPx三種酵素活性也不受糖水餵食的影響；糖水對飼育組之TBARS與粒線體aconitase酵素活性顯著低於控制組，抗氧化酵素之catalase活性與蛋白質量（以western blot分析）均顯著升高，此為限食獨特效應。有文獻指出限食可以降低細胞凋亡，延緩老化，其理論之一就是自由基理論，此結果顯示限食除了可以減重外尚有其他效應存在，例如抗老化..等，這部分議題值得進一步探討。

表 4 餵食糖水與限食對大鼠肝臟TBARS、抗氧化分子與酵素的影響

	C	S	SP
n	8	8	8
TBARS *(μmol/g liver)*	24.1 ± 3.6^{a}	22.1 ± 2.0^{ab}	18.8 ± 4.8^{b}
Mitochondrial aconitase acitivity *(unit/mg mitochondrial protein)*	5.99 ± 3.2^{a}	4.46 ± 1.8^{ab}	3.52 ± 1.1^{b}
Antioxidative molecular			
GSH *(mmol/g liver)*	3.53 ± 1.10^{a}	3.73 ± 0.69^{a}	4.01 ± 0.52^{a}
α-tocopherol *(μmol/ g liver)*	15.0 ± 3.4^{a}	11.6 ± 1.8^{b}	8.1 ± 1.7^{c}
Antioxidative enzyme			
Catalase activity *(k/μmol Hb)*	0.67 ± 0.13^{b}	0.67 ± 0.11^{b}	0.87 ± 0.11^{a}
Catalase protein abundance *(catalase/β-actin)*	1.42 ± 0.38^{ab}	1.18 ± 0.35^{b}	1.98 ± 0.83^{a}
SOD activity *(unit/μmol Hb)*	17.1 ± 2.4^{a}	17.8 ± 2.1^{a}	18.1 ±2.1^{a}
Glutathione peroxidase activity *(unit/μmol Hb)*	0.64 ± 0.10^{a}	0.67 ± 0.10^{a}	0.67 ± 0.03^{a}

1. Each value represents Mean ±S.D.
2. Values not sharing the same superscript letters in the same horizontal row are significantly different from one another by Duncan's Multiple Range Test (p<0.05)

結　論

糖水餵食顯著增加大鼠血清 TG 含量與腹壁後白色脂肪量，此效應與糖水促進脂質生合成有關。糖水餵食 6 週顯著惡化維生素 E 營養狀況，但不影響紅血球與肝臟抗氧化酵素表現，限食會顯著降低大鼠體重、肝臟 TBARS，增加 catalase 表現量，此結果顯示限食除了可以減重外尚有其他效應存在，值得深入探討。

誌　謝

本實驗承蒙「嘉南藥理科技大學九十七年度教師專題研究」計畫（計畫編號 CN9725）經費補助，謹致謝忱，感謝團隊所有同仁全心投入，讓研究得以順利完成。最後謝謝偉大的老鼠寶寶們，因爲您們的犧牲奉獻，讓學生獲得寶貴的實驗經驗，由衷感謝！

參考文獻

Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. Methods of Enzymatic Analysis. 3:273-286. Academic Press, New York.

Bar-On, H. and Stein, Y. (1968) Effect of glucose and fructose administration on lipid metabolism in the rat. J. Nutr. 94: 95-105.

Belay, A., Ota, Y., Miyakawa, K., Shimamatsu, H.（1993）Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. J. Appl. Phycol. 5: 235-241

Busserolles, J., Rock, E., Gueux, E. Mazur, A., Grolier, P. and Rayssiguier, Y. (2002a) Short-term consumption of a high-sucrose diet has a pro-oxidant effect in rats. Br. J. Nutr. 87 :337-42.

Busserolles, J., Zimowska, W., Rock, E., Rayssiguier, Y. and Mazur, A. (2002b) Rats fed a high sucrose diet have altered heart antioxidant enzyme activity and gene expression. Life Sci. 71: 1303-1312.

Busserolles, J., Mazur, A., Gueux, E., Rock, E. and Rayssiguier, Y. (2002c) Metabolic syndrome in the rat: females are protected against the pro-oxidant effect of a high sucrose diet. Exp. Biol. Med. 227: 837-842.

Cavarape, A., Feletto, F., Mercuri, F., Quagliaro, L. and Damante, G. (2001) High-fructose diet decrease catalase mRNA levels in rat tissues. J. Endocrinol. Invest. 24: 838-845.

Chung, K., Romero, N., Tinker, K., Keen, C. L., Amemiya, K. and Rucker, R. (1988) Role of copper in the regulation and accumulation of superoxide dismutase and metallothionein in rat liver. J. Nutr. 118 : 859-864.

Faure, P., Rossini, E., Lafond, J. L., Richard, M. J., Favier, A. and Halimi, S. (1997) Vitamin E improves the free radical defense system potential and insulin sensitivity of rats fed high fructose diets. J. Nutr. 127: 103-107.

Flohe, L. and Otting, F. (1984) Superoxide dismutase assays. Methods Enzymol. 105: 93-105.

Kim, Y. H., Yoo, H. Y., Chang, M. S., Jung, G. and Rho, H. M. (1997) C/EBP alpha is a major activator for the transcription of rat Cu/Zn superoxide dismutase gene in liver cell. FEBS Lett. 401: 267-270.

Lynch, S. M. and Colón, W. (2006) Dominant role of copper in the kinetic stability of Cu/Zn superoxide dismutase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 340 : 457-461.

McDonald, R. B. (1995) Influence of dietary sucrose on biological aging. Am. J. Clin. Nutr. 128 : 1442-1449.

O'Dell, B. L. (1993) Fructose and mineral metabolism. Am. J. Clin. Nutr. 58(5 Suppl): 771S-778S.

Paglia, D. E. and Valentine, W. N. (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J. Lab. Clin. Med. 70: 158-169.

Reed, M. J., Meszaros, K., Entes, L. J., Claypool, M. D., Pinkett, J. G., Gadbois, T. M. and Reaven, G. M. (2000) A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. Metabolism 49: 1390-1394.

Rose, I. A. and O'Connell, E. L. (1967) Mechanism of aconitase action. I. The hydrogen transfer reaction. J. Biol. Chem. 242: 1870-1879.

Sampson, J. B. and Beckman, J. S. (2001) Hydrogen peroxide damages the zinc-binging site of zinc-deficient Cu, Zn superoxide dismutase. Arch. Biochem. Biophy. 392 : 8-13.

Schosinsky, K. H., Lehmann, H. P. and Beeler, M. F. (1974) Measurement of Ceruloplasmin from Its Oxidase Activity in Serum by Use of *o*-Dianisdine Dihydrochloride. Clin. Chem. 20: 1556-1563.
Taylor, C. G, Bettger, W. J., Bray, T. M. (1988) Effect of dietary zinc or copper deficiency on the primary free radical defense system in rats. J. Nutr. 118:613-62100.