

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計 畫 *
* : 奇異果對 DSS-誘發小鼠結腸炎病程的影響 *
* 名 稱 *
* ***** *

執行計畫學生：張榮華
學生計畫編號：NSC 98-2815-C-041-008-B
研究期間：98年07月01日至99年02月28日止，計8個月
指導教授：黃惠玲

處理方式：本計畫可公開查詢

執行單位：嘉南藥理科技大學保健營養系

中華民國 99年03月16日

奇異果對DSS-誘發小鼠結腸炎病程的影響

Effects of kiwifruit on the pathogenesis of DSS-induced colitis in mice

張榮華¹ 蘇素慧² 蔡怡婷¹ 洪慧如¹ 張廉筠¹ 黃惠玲^{1*}

Jung-Hua Chang¹, Su-Hui Su², Yi-Ting Tsai¹, Hui-Ju Hung¹, Lian-Yun Zhang¹,
Hui-Ling Huang^{1*}

1.嘉南藥理科技大學保健營養系

2.嘉南藥理科技大學營養與保健科技研究所

摘要

背景與目的:國人罹患大腸癌的比率逐年攀升,而慢性潰瘍性結腸炎(ulcerative colitis, UC)患者是大腸癌之高危險群之一,蔬果的攝取量與發炎性腸道疾病罹患率成負相關,因此多吃蔬果可能具有降低大腸癌的保健功效。本實驗利用 DSS (dextran sulfate sodium) 誘發結腸炎之小鼠模式,目的在於探討高炸油飼料中添加奇異果是否具有緩和病程發展的效果。方法:將 7 週齡之 C57BL/6 品系雌鼠,適應三天後分成三組,分別為控制組(C組) 15%炸油組(O組)與奇異果組(OK組:飼料添加 10%奇異果凍乾粉末),每組 10 隻,飼料基本組成均為 AIN-93G 調整配方後的 15%高炸油飼料,採用高炸油飼料乃因高炸油具有顯著惡化結腸炎效應,飼料及水均採自由給食方式。飼養 4 週後,飲水換成 2% DSS,每天記錄糞便狀況與體重,計算疾病活動指數(Disease activity index, DAI),連續 6 天後恢復成一般飲水,再觀察 3 天於腸炎急性期犧牲,分析血液脂質含量與大腸抗氧化相關分子與酵素表現,而實驗結果皆以平均值 ± 標準偏差來示。所有結果以 Student's t-test 進行統計以檢定兩組間的差異,定 $p < 0.05$ 為顯著差異。結果:餵食四週後,給予 2% DSS(w/v)水後,小鼠體重開始明顯下降,並且有腹瀉及血便發生,在 DSS 急性發炎期結束後,發炎反應仍然持續進行中,此時進入慢性發炎/恢復期。進入 DSS 期的三組,即使停止 DSS 後,體重變化量依然呈現負值成長,表示 DSS 對小鼠體重有極大負面影響。腹瀉及血便程度也因餵食 DSS 後越來越嚴重,DAI (疾病活動指數)也持續攀升,而實驗結果發現每天餵食奇異果的 OK 組,對於餵食 DSS 誘發小鼠結腸炎嚴重程度高於其他兩組,存活率也是偏低。高炸油組及奇異果組,在第三天即出現中度血便;控制組則在第五天才有此現象出現。在實驗的三十六天,控制組則死掉兩隻;高炸油組死掉一隻;奇異果組則留下兩隻。生長相關結果發現,三組的最後體重高於初始體重,而高炸油組攝取的總熱量高於奇異果組與控制組。另外在血清相關指標裡,三組之間的抗氧化酵素,高炸油組有較高趨勢,但無統計上的差異,高炸油組中 α -tocopherol 及 Myeloperoxidase activity,具有明顯統計上的差異低於控制組,易造成體內長期的發炎反應,會造成脂質的過氧化,進而形成粥狀動脈硬化及心血管疾病,奇異果組的 TBARS 具有明顯統計上的差異,高於高炸油組, TBARS 值過高表示脂質過氧化物含量多,造成大腸發炎及損傷。結論:在餵食 DSS 期間,奇異果組別的存活率、DAI 指數、生長曲線、血清指標與大腸抗氧化等相關數據顯示,明顯的比控制組及高炸油組較為嚴重,即使換成水後也並沒有太大改善,表示餵食奇異果,不具有改善 DSS-誘發小鼠結腸炎效果。

前言

潰瘍性結腸炎 (ulcerative colitis, UC) 與克隆氏症 (Crohn's disease, CD) 是人類常見兩種主要的慢性發炎性腸道疾病 (chronic inflammatory bowel disease, IBD)，慢性潰瘍性結腸炎 (ulcerative colitis, UC) 患者是大腸癌之高危險群者之一，因此降低 UC 的病程將有助於減少將來罹患大腸癌的機率。結腸炎的發生原因不明，遺傳基因、環境與飲食因子交互作用均會影響病程的進展，其致病機制推測與局部黏膜免疫反應有關，而免疫細胞的活化、上皮黏膜損傷，伴隨產生許多非特異性的發炎介質，例如細胞激素 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、生長因子、花生四烯酸代謝產物 (PGE₂ ...)、活性氧物質 (ROS) 與活性氮物質 (RNS，如 NO)，這些分子助長了慢性發炎過程，也與組織損傷有關 (Podolsky, D., 2002)。

流行病學調查顯示罹病危險性與蔗糖、油脂 (單元不飽和與多元不飽和)、維生素 B6 攝取量成正相關，與果糖、鎂、維生素 C、水果攝取量呈負相關 (Reif et al., 1997; Geerling et al., 2000)。奇異果含有豐富的維他命 C 與膳食纖維，体外實驗證實奇異果 (Actinidia deliciosa, kiwi) 水萃取物與 70% 酒精萃取物具有良好的抗氧化活性，尚可部份抑制 ACE (angiotensin-I converting enzyme) 酵素活性與膽固醇合成速率限制酵素 HMG-CoA reductase 酵素活性，整體評估奇異果具有心血管保護潛能 (Jung et al., 2005)。韓國 Ko 等學者，進行人體試驗，給予奇異果汁後 30、60、90、120 分鐘抽血，發現喝奇異果汁的受試者血漿抗氧化活性很高，但葡萄汁的抗氧化持久性較強，顯示奇異果的確具有抗氧化效果 (Ko et al., 2005)。至於抗癌效果，由於奇異果富含膳食纖維，每 100 克中含 3.4 克食物纖維，具有緩解便秘功效，劉珍芳教授研究發現 (Chang & Liu, 2009)，奇異果具有改善腸胃道健康效應，受試者 70 人中包括 54 名便秘型大腸激躁症患者與 16 名健康者，平均年齡為 28.4 歲，隨機分配每天吃 2 顆奇異果或 2 顆安慰劑，結果顯示每天吃 2 顆奇異果連續 4 週，便秘者腸道蠕動時間顯著減少，腸道中糞便停留時間從 42.2 小時縮短為 35.4 小時，排便次數由每周 3.1 次增加到 4.3 次，糞便濕度、味道等也有顯著改善，由於奇異果除了膳食纖維豐富外，其特殊酵素 actinidin (一種含硫蛋白分解)，能與腸道中的接收器結合，促進腸道蠕動。關於抑制癌變的機轉，推測奇異果可有效阻斷致癌因子「亞硝酸胺」的形成、吸附致癌物質排出體外、抑制有害菌種繁殖，並降低活性氧物質 (reactive oxygen species, ROS) 生成和致癌物質對 DNA 造成損傷，可預防大腸直腸癌的形成 (Collins et al., 2001; Ferguson et al., 2004)。

近年來大腸癌的罹患率逐年攀升，雖然發生原因、致病機轉仍然不明，但認為與食物、遺傳密切相關，尤其是膳食因子，例如脂肪攝取量偏高，罹患腸癌機率升高，攝取纖維含量高的蔬果與罹病率成負相關。由於慢性潰瘍性結腸炎 (ulcerative colitis, UC) 患者屬於大腸癌之高危險群之一，若能降低或緩和 UC 的發生，將可減少將來得到大腸癌的

機率，因此選擇維生素 C 與膳食纖維含量高的奇異果 (kiwifruit) 作為研究食材，本研究目的在於探討天天吃奇異果是否可以降低 DSS-誘發小鼠結腸炎之病程發展。

研究方法及步驟

1. 實驗目的：利用 DSS (dextran sulfate sodium) 誘發結腸炎之小鼠模式，探討高炸油飼料中添加奇異果是否具有緩和病程發展的效果。
2. 實驗設計：將 7 週齡之 C57BL/6 系雌鼠，適應三天後分成三組，分別為控制組 (C 組) 15% 炸油組 (O 組) 與奇異果組 (OK 組：飼料添加 10% 奇異果凍乾粉末)，每組 10 隻，飼料基本組成均為 AIN-93G 調整配方後的 15% 高炸油飼料，採用高炸油飼料乃因高炸油具有顯著惡化結腸炎效應，飼料及水均採自由給食方式。飼養 4 週後，飲水換成 2% DSS，每天記錄糞便狀況與體重，計算疾病活動指數 (Disease activity index, DAI)，連續 6 天後恢復成一般飲水，再觀察 3 天於腸炎急性期犧牲。
3. 動物飼養：老鼠個別飼養於不鏽鋼籠中，動物室的溫度維持在 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，每天光照及黑暗各為 12 小時，每兩天秤量體重與飼料攝取量。飼養 4 週，犧牲前一夜先行禁食約 12 小時，犧牲當天秤過老鼠體重後，以 CO_2 窒息再自下腔靜脈採血，並快速取下大腸進行觀察與取樣，液態氮急速冷凍後，凍於 -80°C 供日後分析氧化系統相關指標。血液靜置 30 分鐘凝固後，用 $3,500 \times \text{g}$ 轉速離心 15 分鐘，將血清分離出，分裝凍於 -20°C ，日後分析。
4. 分析項目與方法：
 - (1) 疾病活動指數 (Disease activity index, DAI) 分別有三個評分標準 (Melgar et al., 2005)：

$$\text{DAI} = (\text{Fecal blood score} + \text{Diarrhea score} + \text{Weight lose score}) \div 3$$

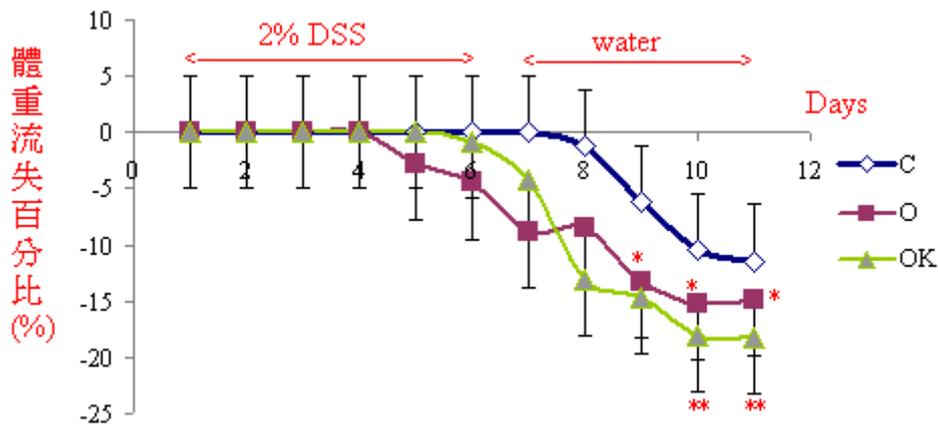
$$\text{DAI 指數} = (\text{血便程度} + \text{腹瀉程度} + \text{體重流失的程度}) \div 3$$

指數	程度	分數	註記
血便程度	正常	0	正常顏色為淡黃色 (控制組), 深黃色 (炸油組)
	輕度	1	只有 1~2 顆有些微紅色
	中度	2	只有少部分為正常顏色
	重度	3	顏色看起來像黑色或肛門嚴重出血
腹瀉程度	正常	0	正常為橢圓狀
	輕度	1	形狀像水滴 (前圓後尖)
	中度	2	報紙上有幾塊的濕便及濕漬
	重度	3	無完整的形狀, 皆為片狀
體重流失的程度	0%	0	依照流失的百分比打分數 公式: (今天體重 - 第 0 天體重) / 今天體重 × 100 = 體重流失的百分比
	1~5%	1	
	6~10%	2	
	11~15%	3	
	16~20%	4	
	21~25%	5	
	26~30%	6	
	30% 以上	7	

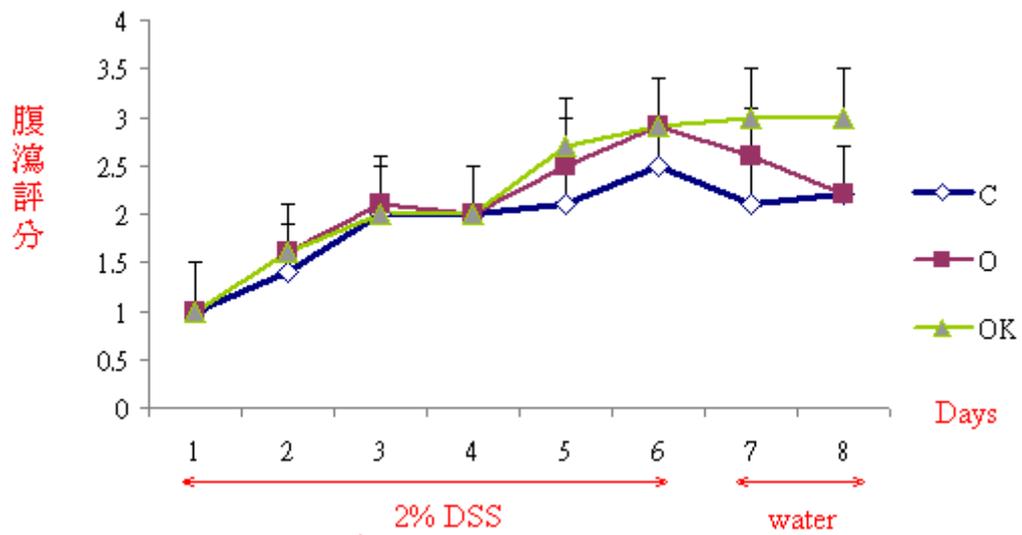
- (2) 大腸發炎分數：肉眼觀察下列幾項，分數加總所得。Stiffness 硬度：0-1-2；Edema 水腫：0-1-2-3；Visible ulceration 潰瘍：0-1；Thickness 厚度：0-1-2-3-4
- (3) 血清脂質：以商用試劑套組測定三酸甘油酯、膽固醇濃度。
- (4) 大腸之抗氧化系統：分析脂質過氧化指標TBARS，抗氧化分子GSH、維生素E與抗氧化酵素活性。
- (5) 實驗結果皆以平均值 ± 標準偏差來表示。所有結果以 Student's t-test 進行統計以檢定兩組間的差異，定 $p < 0.05$ 為顯著差異。

實驗結果與討論

(A)



(B)



(C)

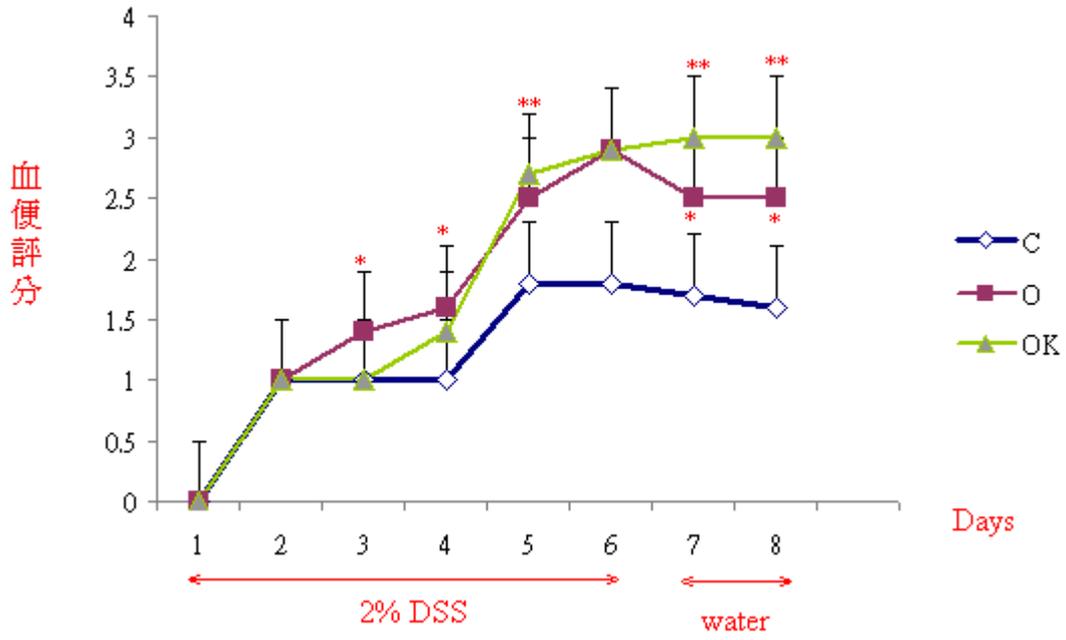


圖 1. (A) : DSS-誘發小鼠結腸炎之體重流失百分比

(B) : DSS-誘發小鼠結腸炎之腹瀉評分

(C) : DSS-誘發小鼠結腸炎之血便評分

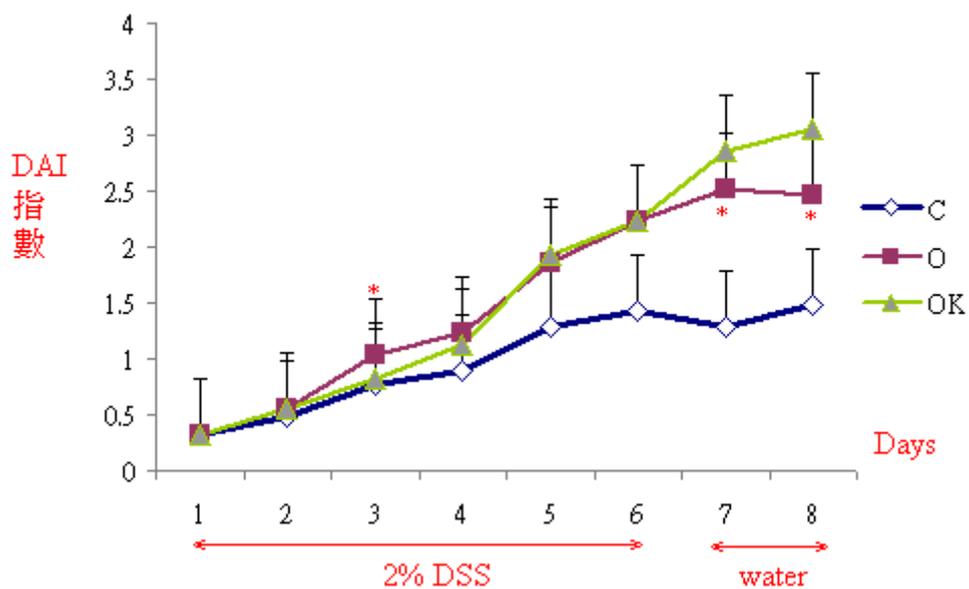


圖 2. DSS-誘發小鼠結腸炎之疾病活動指數 (DAI)

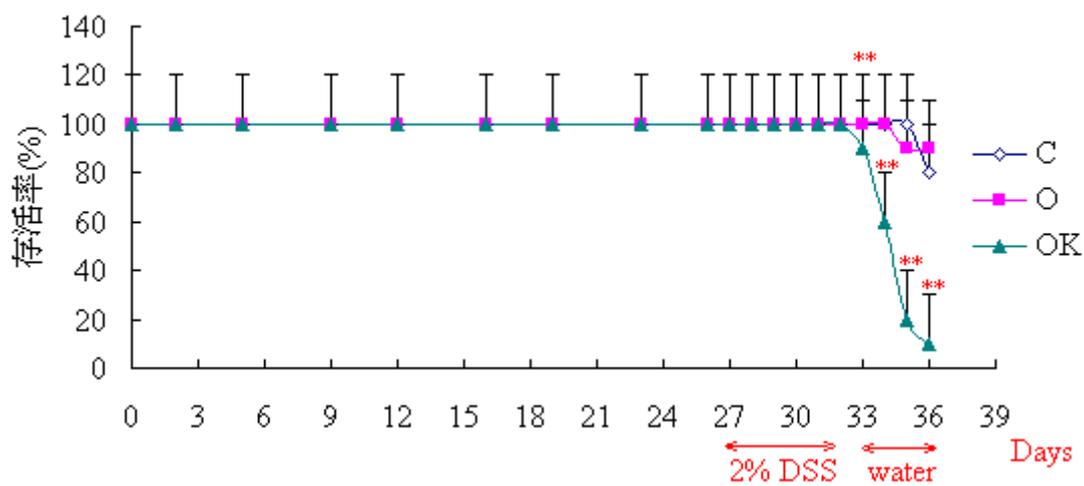


圖 3. DSS-誘發小鼠結腸炎之存活率

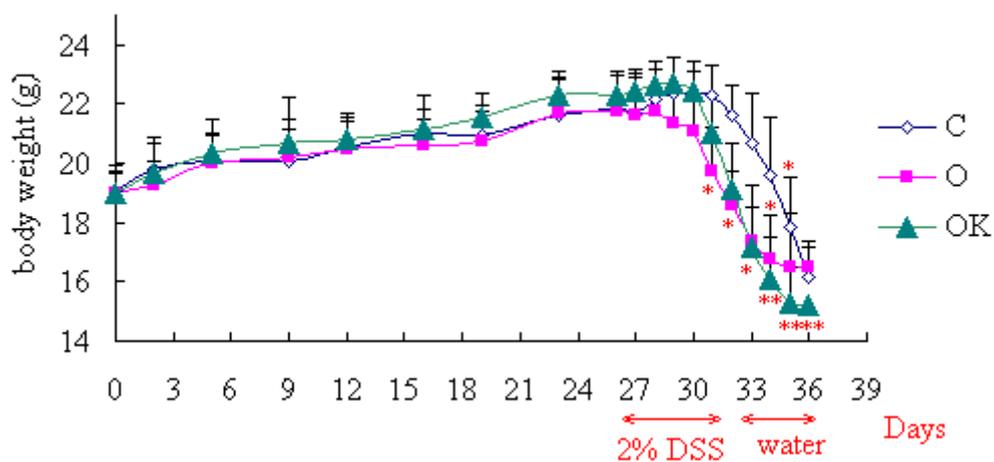


圖 4. DSS-誘發小鼠結腸炎之生長曲線

表 1. 生長相關結果

	C	O	OK
n	10	10	10
Initial body weight (g/mice)	19.1 ± 0.9	19.0 ± 0.7	19.0 ± 0.7
Final body weight (g/mice)	21.8 ± 1.3	21.7 ± 1.2	22.3 ± 0.8
Total caloric intake (Kcal)	1282 ± 217	1825 ± 309	1773 ± 301
Feed efficiency (%)	6.86 ± 0.06	6.78 ± 0.03	6.97 ± 0.10

1. Each value represents Mean ±S.D.

2. * 表示 O 與 C 組比較有統計上的差異, $p < 0.05$

** 表示 O 與 OK 組比較有統計上的差異, $p < 0.05$

3. Feed efficiency (%) = [Body weight gain (g) / Food intake (g)] x 100

表 2. 組織重與組織相對重

	C	O	OK
n	8	9	2
Tissue weight (g)			
Colon (g)	0.16 ± 0.02	0.21 ± 0.15	0.15 ± 0.00
Liver (g)	0.79 ± 0.08	1.02 ± 0.15*	0.81 ± 0.10
Kidney (g)	0.23 ± 0.04	0.24 ± 0.02	0.27 ± 0.05
Spleen (g)	0.06 ± 0.03	0.05 ± 0.02	0.03 ± 0.00
Small intestine (g)	0.66 ± 0.13	1.01 ± 0.13*	0.87 ± 0.14
Thymus (g)	0.02 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.00
Heart (g)	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01
Lung (g)	0.11 ± 0.04	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01
Brain (g)	0.42 ± 0.03	0.41 ± 0.03	0.42 ± 0.01
R.W. # (%)			
Colon (%)	1.01 ± 0.16	1.32 ± 0.95	1.08 ± 0.12
Liver (%)	4.88 ± 0.32	6.51 ± 0.55*	5.65 ± 0.24
Kidney (%)	1.40 ± 0.22	1.53 ± 0.08	1.87 ± 0.17**
Spleen (%)	0.39 ± 0.16	0.33 ± 0.09	0.20 ± 0.03
Small intestine (%)	4.08 ± 0.49	6.48 ± 0.47*	6.06 ± 0.48
Thymus (%)	0.14 ± 0.08	0.15 ± 0.06	0.07 ± 0.02
Heart (%)	0.55 ± 0.05	0.56 ± 0.07	0.55 ± 0.01
Lung (%)	0.69 ± 0.27	0.76 ± 0.04	0.86 ± 0.03**
Brain (%)	2.60 ± 0.38	2.64 ± 0.31	2.95 ± 0.14

1. Each value represents Mean ±S.D.

2. * 表示 O 與 C 組比較有統計上的差異, $p < 0.05$

** 表示 O 與 OK 組比較有統計上的差異, $p < 0.05$

3. # R.W.(relative weight, %) = (tissue weight / body weight) * 100

表 3. 血清相關指標

	C	O	OK
n	7	9	2
Albumin (g/dL)	2.68 ± 0.19	2.90 ± 0.22	3.14 ± 0.26
Triglyceride (mg/dL)	50.1 ± 19.2	72.9 ± 12.2*	127.8 ± 46.8**
Haptoglobin (µg/mL)	335 ± 25	907 ± 134*	1380 ± 268**
TNF-α (pg/mL)	591 ± 451	530 ± 177	745 ± 593

1. Each value represents Mean±S.D.

2. * 表示 O 與 C 組比較有統計上的差異, $p < 0.05$

** 表示 O 與 OK 組比較有統計上的差異, $p < 0.05$

表 4. 大腸抗氧化分子酵素與 MPO 活性

	C	O	OK
n	7	9	2
GSH (umol/g)	1.48 ± 0.61	2.17 ± 0.99	1.44 ± 0.38
TBARS (nmol/g)	6.94 ± 1.63	7.05 ± 2.65	13.8 ± 6.0**
α-tocopherol (µmol/g)	10.27 ± 1.45	4.36 ± 1.14*	6.49 ± 1.94
Myeloperoxidase activity (mU/mg)	0.70 ± 0.24	0.24 ± 0.13*	1.21 ± 1.48
Glutathione peroxidase activity (unit/mg)	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.08 ± 0.01
Glutathione S-transferase activity (unit/mg)	0.32 ± 0.03	0.30 ± 0.05	0.33 ± 0.05
Glutathione reductase activity (unit/mg)	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01

1. Each value represents Mean±S.D.

2. * 表示 O 與 C 組比較有統計上的差異, $p < 0.05$

** 表示 O 與 OK 組比較有統計上的差異, $p < 0.05$

結果

1.生長狀況:

由圖 1.(A)與圖 4 發現，給予 DSS 之前三組的生長曲線，奇異果組體重略高於控制組與高炸油組，而在餵食 DSS 後各組體重逐漸下降，高炸油組於換水後的第 3 天開始，體重流失具有明顯統計上的差異，高於控制組，而奇異果組於換水後的第 4 天開始，體重流失具有明顯統計上的差異，高於高炸油組，表示餵食奇異果不具有改善 DSS-誘發小鼠結腸炎之體重流失百分比。由表 1.生長相關結果發現，三組的最後體重高於初始體重，而高炸油組攝取的總熱量高於奇異果組與控制組。

2.以 DSS-誘發結腸炎之臨床表現:

由圖 1.(B)發現，餵食 DSS 後腹瀉程度逐漸升高，高炸油組及控制組，於換水後腹瀉程度有漸改善趨勢，而奇異果組不具有改善的效果，表示餵食奇異果不具有改善 DSS-誘發小鼠結腸炎之腹瀉評分。由圖 1.(C)發現，高炸油組於餵食 DSS 第三天開始，血便程度具有明顯統計上的差異，高於控制組，換成水後具有改善的趨勢，而奇異果組於餵食 DSS 第五天開始，血便程度具有明顯統計上的差異，高於高炸油組，換成水後血便程度不具有改善效果，表示餵食奇異果不具有改善 DSS-誘發小鼠結腸炎之血便評分。由圖 2.發現，高炸油組於餵食 DSS 第三天及換成水後 DAI 指數具有明顯統計上的差異，高於控制組。由圖 3.發現，給予 DSS 之前與給予 DSS 期間，三組的存活率相當，而在奇異果組於換水的前一天開始，存活率逐漸降低，且具有明顯統計上的差異，高於高炸油組，表示餵食奇異果不具有改善 DSS-誘發小鼠結腸炎之存活率。

3.組織重量結果:

由表 2.發現，高炸油組的肝臟及小腸組織重，都具有明顯統計上的差異，高於控制組，而導致肝腫大及小腸發炎的情形，而奇異果組的腎臟及肺的組織相對重，具有明顯統計上的差異，高於炸油組。

4.血清指標與大腸抗氧化結果:

由表 3.發現，高炸油組血清中，TG 與 Haptoglobin 都具有明顯統計上的差異高於控制組，而在奇異果組血清中，TG 與 Haptoglobin 都具有明顯統計上的差異，高於高炸油組，然而 TG 過高易造成心血管疾病，表中 Haptoglobin 奇異果明顯較高於其他兩組，表示易處於發炎期而使白血球釋出。由表 4.發現，三組之間的抗氧化酵素，高炸油組有較高趨勢，但無統計上的差異，高炸油組中 α -tocopherol 及 Myeloperoxidase activity，具有明顯統計上的差異低於控制組，易造成體內長期的發炎反應，會造成脂質的過氧化，進而形成粥狀動脈硬化及心血管疾病，奇異果組的 TBARS 具有明顯統計上的差異，高於高炸油組，TBARS 值過高表示脂質過氧化物含量多，造成大腸發炎及損傷。

討論

起始體重都差不多的三組小鼠中，在未餵食 DSS 之前，奇異果組的體重比控制組與高炸油組有稍微的升高，原因可能是奇異果的香氣及甜度吸引小鼠的食慾，平均每日食量在未餵食 DSS 之前也是稍高。在餵食 DSS 期間每日記錄的 DAI(疾病活動指數)中，奇異果血便程度不容易去判斷，因為糞便顏色都普遍偏黑色，經過幾天下來發現奇異果組，腹瀉程度越來越嚴重，這時才有明顯發現血漬，而導致奇異果組死亡率這麼高的因素，不外乎之前的分析項目中有所提到；另外長期食用奇異果，內含的特殊成分是否對小鼠腸道有特殊不良影響，仍須進一步探討。

結論

在餵食DSS期間，奇異果組別的存活率、DAI指數、生長曲線、血清指標與大腸抗氧化等相關數據顯示，明顯的比控制組及高炸油組較為嚴重，即使換成水後也並沒有太大改善，表示餵食奇異果，不具有改善DSS-誘發小鼠結腸炎效果。

參考文獻

- Chang, W.H., and Liu, J.F. (2009). Effects of kiwifruit consumption on serum lipid profiles and antioxidative status in hyperlipidemic subjects. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 1-8.
- Collins, B.H., Horska, A., Hotten, P.M., Riddoch, C., and Collins, A.R. (2001). Kiwifruit protects against oxidative DNA damage in human cells and in vitro. *Nutr. Cancer* 39, 148-153.
- Ferguson, L.R., Philpott, M., and Karunasinghe, N. (2004). Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicology* 198, 147-159.
- Geerling, B.J., Dagnelie, P.C., Badart-Smook, A., Russel, M.G., Stockbrugger, R.W., and Brummer, R.J. (2000). Diet as a risk factor for the development of ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.* 95, 1008-1013.
- Jung, K.A., Song, T.C., Han, D., Kim, I.H., Kim, Y.E., and Lee, C.H. (2005). Cardiovascular protective properties of kiwifruit extracts in vitro. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 1782-1785.
- Ko, S.H., Choi, S.W., Ye, S.K., Cho, B.L., Kim, H.S., and Chung, M.H. (2005). Comparison of the antioxidant activities of nine different fruits in human plasma. *J. Med. Food* 8, 41-46.
- Reif, S., Klein, I., Lubin, F., Farbstein, M., Hallak, A., and Gilat, T. (1997). Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 40, 754-760.