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 ＊
＊ ： 杏仁對 DSS 誘發大鼠結腸炎之影響 ＊
＊ 名　稱 ＊
＊ ********* ** ＊

執行計畫學生： 張博勝
學生計畫編號： NSC 100-2815-C-041-012-B
研 究 期 間 ： 100 年 07 月 01 日至 101 年 02 月 28 日止，計 8 個月
指 導 教 授 ： 黃惠玲

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2 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 101 年 03 月 20 日

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 ＊

＊ ： **杏仁對 DSS 誘發大鼠結腸炎之影響** ＊

＊ 名 稱 ＊

＊ ********* ********** ＊

執行計畫學生： 張博勝

學生計畫編號： NSC 100-2815-C-041-012-B

研究 期 間 ： 100 年07 月01 日至101 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 101 年 03 月 19 日

杏仁對 DSS 誘發大鼠結腸炎之影響

張博勝　黃惠玲*
嘉南藥理科技大學保健營養系

摘要

背景與目的：國人十大癌症死因中 (2010) 大腸直腸癌已高居第三名，且癌症的發生病例中，結腸癌已成為國人發生人數最多的癌症。慢性發炎性腸道疾病 (Inflammatory bowel disease, IBD) 主要包括潰瘍性結腸炎 (Ulcerative colitis, UC) 與克隆氏症 (Crohn's disease, CD) 兩種，IBD 患者是大腸癌之高危險群之一。杏仁樹約在西元 3,000 年前即有文書記載，歷史相當悠久的物種，本實驗採用為中國的苦味杏仁（almond），一般廣稱「北杏」，其含有相當特殊的營養成分，具相當高的生理價值。預防腸炎發生與緩和其病程將有助於降低日後罹患大腸癌的機率，因此本實驗目的在於探討直接飲用杏仁茶是否有緩和腸炎病程發展。**實驗方法**：採用 7 週齡 Wistar 品系雄鼠 16 隻，隨機分成兩組，飼料採用 Chow diet (Laboratory Rodent Diet 5001)，分為控制組 (C group)、杏仁組 (A group)，杏仁組供給 5% 杏仁粉添加於飲用水直接飲用，而且每日新鮮配製，飼料與飲用水或杏仁飲皆採自由攝取 (*ad libitum*)。飼養 5 週，第 6 週開始於飲用水中添加 2% DSS (w/v) (Dextran sulfate sodium)，誘發腸道發炎，並計算疾病活動指數 (Disease activity index, DAI)，連續 5 天後換回一般飲用水 2 天，第 8 天犧牲，犧牲前禁食 24 小時，採集血液與大腸組織，分析脂質過氧化指標 (Thiobarbituric acid reactive substance, TBARS)、抗氧化分子、酵素活性。實驗結果均以平均值 ± 標準差 (mean ± SD) 表示，以 Student's *t* test 來檢定各組獨立樣本其組間差異性，將顯著水準設定為 $p < 0.05$，以 SAS 軟體進行各項統計分析。**結果**：給予 2% DSS 後，第 1~3 天急性結腸炎間，糞便潛血指數 A 組顯著低於 C 組，並且在 DAI 指數判定於第 2 天，A 組顯著低於 C 組，顯示杏仁具有減緩糞便潛血程度之功效。每日平均飼料攝取量顯示 A 組顯著低於 C 組，而在飼料利用率方面則顯示 A 組顯著高於 C 組，A 組的杏仁茶攝取量顯著高於 C 組，顯示每日平均飼料攝取量與杏仁攝取量呈負相關，兩組每日平均熱量攝取無顯著差異。另外杏仁的添加並不會影響到大鼠的生長狀況，由杏仁的攝取量得知其適口性極佳，很適合進一步調整杏仁劑量。**結論**：大鼠誘發結腸炎模式下餵食杏仁能改善糞便潛血程度並降低 DAI 指數，推測杏仁有輕微緩和腸炎效應，如果增加杏仁的劑量，可能會有更顯著的效果。

關鍵詞：杏仁、DSS、結腸炎、大鼠

前言

近年來工商業的發展，便利速食產品充斥在我們生活中，加上生活忙碌與受到西方文化的影響，飲食習慣發生很大的變化。根據行政院衛生署的報告，指出近幾年公佈的國人十大癌症死因中 (2010) 大腸直腸癌已高居第三名，且癌症的發生病例中，大腸癌已成為國人發生人數最多的癌症。(Inflammatory bowel disease, IBD) 為慢性腸道黏膜發炎疾病，主要包括 (Ulcerative colitis, UC) 及 (Crohn's disease, CD) 兩種，其疾病的成因至今仍不明瞭，遺傳基因、環境因素(營養)及免疫病理機轉各方面因素都可能相關 [1,2]。歐洲的英國小孩 IBD 的盛行率為 5.2/100,000，北歐的區域成年人

的盛行率達 10~20/100,000 [2]，台灣大學王正一教授在發炎性腸道疾病病友會中發表慢性潰瘍性結腸炎在台灣的發生概況中指出 [3]，全美國潰瘍性結腸炎盛行率為 100/100,000，台灣 2009 年克隆氏症盛行率為 2.0/100,000；潰瘍性結腸炎盛行率為 17/100,000，平均一年約有 1～2 例潰瘍性結腸炎患者發現有大腸癌。

UC 主要影響直腸或乙狀結腸往回延伸至迴腸，侵犯黏膜下層較淺部分，但對直腸的影響尤其嚴重。CD 的影響由口腔至肛門的任何部位，侵犯任何黏膜層部位，對迴腸末端及結腸右半部的影響較為常見。IBD 臨床症狀包括陣發性腹痛、腹瀉或便祕、體重減輕、偶會發燒，患病時間愈長，容易讓腸黏膜發育不全，增加日後轉變成癌症的危險性，臨床研究顯示 UC 患者罹患結腸癌風險相較於一般人高出 2~8 倍，且會隨著罹患 UC 的時間增長而發展成惡性腫瘤的機率也隨之遞增 [4]。

本實驗室在建立結腸炎之疾病動物模式，由文獻中得知有多種方式可誘發實驗動物鼠之急性結腸炎 [1,5,6]，常見方式有：基因剔除 (IL-10 knockout、基因轉殖 (細胞激素的調控)、免疫缺陷 ($CD4^+$ T cells/SCID) 與化學藥劑誘 (Dextran sulfate sodium, DSS) 處理。(Dextran sulfate sodium, DSS) 誘導結腸炎是最常用也是最佳的 UC 症狀臨床前動物模式。IBD 的動物模式中已建立的囓齒類動物高達 30 種以上，近年來有文獻使用大鼠進行腸炎相關研究 [7]，並針對結腸的抗氧化酵素活性分析，脂質過氧化的程度或是疾病發展指數 (disease activity index, DAI) 的判定。許多文獻已經證實堅果類具有改善冠狀動脈心臟病之危險因子，特別是不飽和脂肪酸，堅果類中多酚類物質具有正面效益，杏仁皮中包含 flavonols、flavanones 和 phenolic acids 物質，具有減少慢性發炎疾病危險因子、抗衰老、抗氧化和清除自由基…等功能 [8-10]。

杏仁，屬於薔薇科草本植物。杏仁可分為源於中國的苦味杏仁，呈心臟型略扁，左右不對稱，種皮紅棕色或暗棕色，又稱為「北杏」，以及甜味杏仁，又稱為「南杏」，甜杏仁外型較大，左右對稱，種皮淡棕色至暗棕色，微甜而不苦。杏仁果特殊的營養成分 (表1)，含有多種維生素、微量元素、不飽和脂肪酸與多種胺基酸，藥用成分苦杏仁素使其具有優異的生理價值 [11,12]，主要的有效成分苦杏仁素為 Cyanogenic glycosides，此成分存在於薔薇科植物中，結構如 (圖1) 所示。

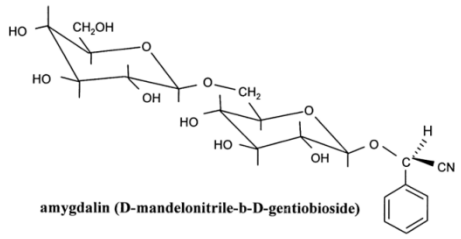


圖 1. 苦杏仁素結構式 [13]

近年研究 Mandalari 等學者 (2011) 也針對杏仁皮指出，在 CD1 小鼠品系，每日以 4mg DNBS 經由肛門進入直腸 (約 4.5cm) 進行注射誘發小鼠腸炎連續四天，施 (dinitrobenzene sulfonic acid, DNBS) 後分別在第 1 小時與 6 小時後管餵 30mg/kg BW (杏仁皮粉末溶於生理食鹽水)，結果發現給予杏仁皮粉末組別在體重流失程度、組織病理學分數、促發炎相關細胞激素 (Tumor necrosis factor-α, TNF-α)、(Interleukin-1β, IL-1β)、脂質過氧化程度均有顯著下降 [10]。杏仁為天然食物來源，屬核果類富含單元不飽和脂肪酸，且含有多種生物活性的成份，於核果類中維生素 E 含量最為豐富，文獻顯示杏仁具降低血脂功能、氧化壓力的傷害與降低心血管疾病發生率…等生理效用，但目前文獻對於堅果類改善大鼠腸炎病症發展相關文獻十分有限，本實驗目的模擬善人類膳食中而外補充杏仁茶，對於結腸炎病程發展是否有減緩效果或是改善癒後的情況。

材料與方法

1. 動物飼養

實驗動物採用 wistar 品系 7 週齡雄性大鼠 16 隻，購自樂斯科生物科技公司。餵食粉末飼料適應三天後，依體重隨機分為兩組，控制組 (C 組 n=8，正常飲用水)與杏仁組 (A 組 n=8，5% 杏仁

茶)，餵食 Chow diet (Laboratory Rodent Diet 5001) 實驗飼料；受試動物均個別飼養於不鏽鋼網籠，動物房溫度維持在 23±2℃，光照及黑暗各 12 小時 (08:00～20:00 屬光照期，其於為黑暗期)，每日記錄飼料攝取量，每 3 日記錄體重，並觀察大鼠外觀與行為是否異常。全程供應蒸餾水，令其自由飲用。

2. 實驗設計

動物飼養 5 週後再於飲水中添加 2% DSS (MP Biomedicals. CAT NO. 160110) 誘發大鼠急性結腸炎，連續 5 天後換成蒸餾水，記錄體重、攝食量、糞便潛血及活動力，並計算疾病活動指數 DAI 指數，觀察杏仁對 DSS 誘發大鼠結腸炎病程之影響，以 CO_2 窒息犧牲收集血液與結腸組織進行相關分析。

3. 杏仁茶配製及成分

杏仁粉末採用順天堂藥廠製備 (表 1)，依據行政院衛生署－台灣地區食品營養成分資料庫表示，杏仁成分如 (表 2) 所示，飲用水添加 5% 杏仁粉末加熱以磁石攪拌加熱 80℃ 維持 1 小時，每日新鮮配製。

表 1. 杏仁粉末成分比例

成分	濃縮杏仁萃取物(%)	澱粉(%)
	60	40

順天堂藥廠製備

表 2. 杏仁粉末營養素成分 (每 100 g)

Calories (kcal)	396
Water(g)	5.9
Protein(g)	3.5
Fat(g)	5.2
Carbohydrates(g)	84.7
Fiber(g)	0.5
Dietary fiber(g)	0.7
Ash (g)	0.7
Cholesterol (mg)	-
Vitamin A (retinol equivalent)	0.5
Vitamin E (α-tocopherol equivalent)	0.13
Vitamin B1 (mg)	0.03
Vitamin B2 (mg)	0.18
Niacin (mg)	0.17
Vitamin B6 (mg)	0
Vitamin B12 (μg)	-
Vitamin C (mg)	0
Sodium (mg)	93
Potassium (mg)	64
Calcium (mg)	83
Magnesium (mg)	13
Phosphorus (mg)	88
Iron (mg)	0.8
Zinc (mg)	0.5

資料來源：行政院衛生署 (2003) －台灣地區食品營養成分資料庫

4. 疾病活動指數 [6]

DAI 評分指標，分別為：(1) 腹瀉程度 (2)糞便潛血程度 (3) 體重流失程度，三者加總分數平均後即為 DAI 指數。

(1) 腹瀉程度：正常值為 0 分；輕度為軟便形狀像水滴 (前圓後尖) 1 分；中度為紙上有幾塊的濕便及濕漬 2 分；重度為無完整的形狀皆為片狀 3 分。

(2) 糞便潛血程度：正常值為糞便潛血檢驗為陽性 (－) 0 分；輕度為糞便潛血檢驗為陰性 (＋) 或 (＋＋) 1 分；中度為糞便潛血檢驗為陽性 (＋＋＋) 或 (＋＋＋＋) 2 分；重度為糞便潛血檢驗為陽性 (＋＋＋＋＋) 或肛門嚴重出血 3 分。

(3) 體重流失程度：依照流失的百分比計算公式：(今天體重－第 0 天體重) / 第 0 天體重 × 100% = 體重流失的百分比 (%)，正常值為 0 分；體重流失 1～5%為 1 分；體重流失 6～

10%為 2 分；體重流失 11～15%為 3 分；體重流失 16～20%為 4 分；體重流失 21～25%為 5 分；體重流失 26～30%為 6 分；體重流失 30% 以上為 7 分。

5. 統計分析

實驗結果均以平均值 ± 標準差 (mean ± SD) 表示，以 Student's *t* test 來檢定各組獨立樣本其組間差異性，將顯著水準設定為 $p < 0.05$，以 SAS 軟體進行各項統計分析。

結果與討論

1.生長狀況

(1) 生長體重與飼料利用率

本實驗採用 7 週齡 wistar 雄鼠初始的平均體重均，給予 2% DSS 前，每日平均飼料攝取量的結果 A 組為 C 組的 86%，飼料利用率的結果 A 組為 C 組的 1.15 倍，給予杏仁的第 2~5 週，A 組攝取量皆顯著高於 C 組，分別為 C 組的 1.16、1.47、1.46、1.70 倍，終體重、每日平均體重與熱量攝取皆無顯著差異 (表 3、圖 2)。

表 3. 添加杏仁對 DSS 處理大鼠之小鼠生長狀況

	C	A
n	8	8
Initial body weight (g)	103 ± 8.05	101 ± 9.27
Final body weight (g)	315 ± 22.6	314 ± 8.81
Gross energy (kcal/day)	92.1 ± 7.13	94.5 ± 4.96
Body weight gain (g/day)	6.06 ± 0.47	6.09 ± 0.30
Food intake (g/day)	22.8 ± 1.83 [a]	19.6 ± 0.48 [b]
Feed efficiency (%)	0.27 ± 0.01 [b]	0.31 ± 0.13 [a]

1. Each value represents Mean ± S.D.
2. Feed efficiency (%) = [Body weight gain (g) / Food intake (g)] × 100%
3. Values not sharing a same superscript letters in the horizontal row are significantly different from one another by Duncan's Multiple Range Test (p<0.05)

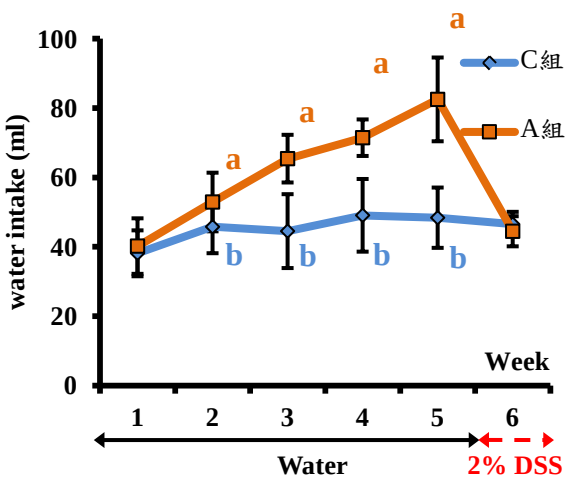


圖 2. 杏仁與飲用水攝取量

綜合以上結果顯示，每日平均飼料攝取量與杏仁攝取量呈負相關，推測受到杏仁的熱量影響。另外杏仁茶的給予並不會影響到大鼠的生長狀況，由杏仁的攝取量得知其適口性極佳，且在每日平均熱量攝取是一樣的，所以很適合進一步調整杏仁劑量。

(2) 相對組織重量

本實驗的大鼠各部位的相對組織重量、小腸長度與結腸長度，皆沒有顯著差異 (表 4、圖 3)。

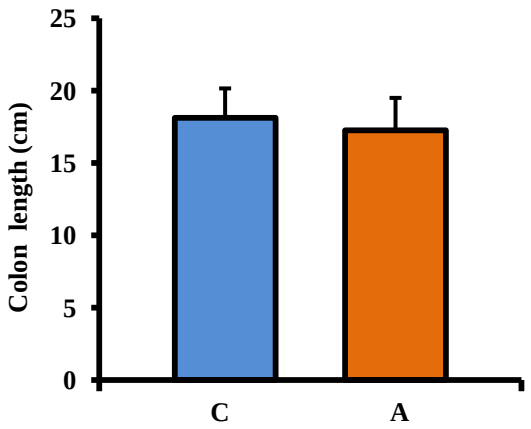
表 4. 添加杏仁對 DSS 處理大鼠之組織重量與相對組織重

	C	A
n	8	8
	tissue weight (g)	
Heart	1.01 ± 0.06	0.97 ± 0.05
Thymus	0.46 ± 0.09	0.45 ± 0.06
Lung	1.17 ± 0.12	1.28 ± 0.16
Liver	10.6 ± 0.65	11.0 ± 0.75
kidney	2.82 ± 0.28	2.63 ± 0.37
Spleen	0.77 ± 0.07	0.81 ± 0.08
Small intenstine	9.13 ± 1.90	9.17 ± 0.48
RE	2.30 ± 0.75	3.17 ± 1.17

EP	4.09 ± 0.70	3.94 ± 0.44
Testis	2.93 ± 0.20	3.04 ± 0.13
prostate	0.37 ± 0.03	0.36 ± 0.04
	relative tissue weight (%)	
Heart	0.003 ± 0.000	0.003 ± 0.000
Thymus	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.000
Lung	0.004 ± 0.000	0.004 ± 0.000
Liver	0.032 ± 0.001	0.033 ± 0.002
kidney	0.009 ± 0.001	0.008 ± 0.001
Spleen	0.002 ± 0.000	0.002 ± 0.000
Small intenstine	0.028 ± 0.005	0.027 ± 0.001
RE	0.007 ± 0.002	0.009 ± 0.003
EP	0.012 ± 0.001	0.012 ± 0.001
Testis	0.009 ± 0.001	0.009 ± 0.001
prostate	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.000

1. Each value represents Mean ± S.D.
2. Values not sharing a same superscript letters in the horizontal row are significantly different from one another by Duncan's Multiple Range Test (p<0.05)
3. Relative tissue weight (%) = [Tissue weight (g) / Body weight (g)] × 100.

(A)



(B)

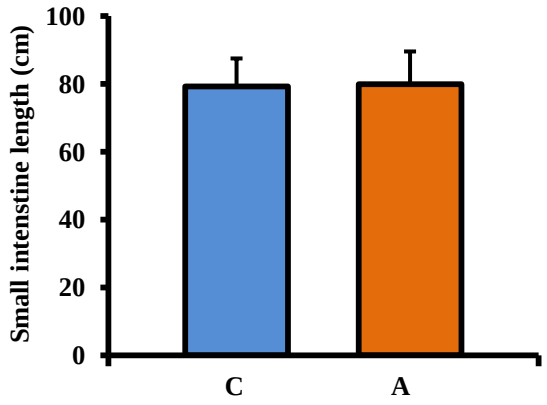


圖 3. (A) 結腸長度 (B) 小腸長度

(3) DAI 指數與結腸炎發展

病程餵食 2% DSS 誘導結腸炎期間，第 1~3 天急性結腸炎間，糞便潛血指數 A 組顯著低於 C 組 (p<0.05)，並且在 DAI 指數判定於第 2 天，A 組顯著低於 C 組 (p<0.05)，另外在腹瀉程度及體重流失程度上兩組並沒有顯著差異(圖 4、圖 5、圖 6、圖 7、圖 8)。

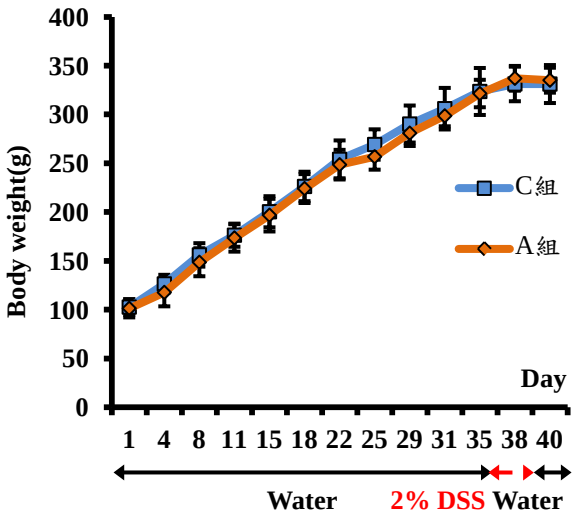


圖 4. 生長曲線

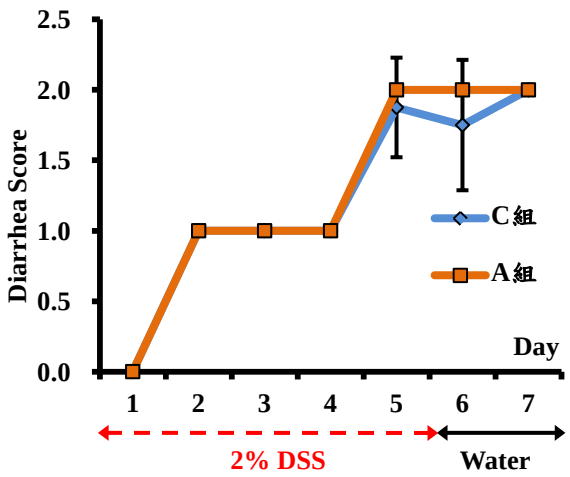


圖 5. 餵食 DSS 急性結腸炎之臨床分析-腹瀉程度

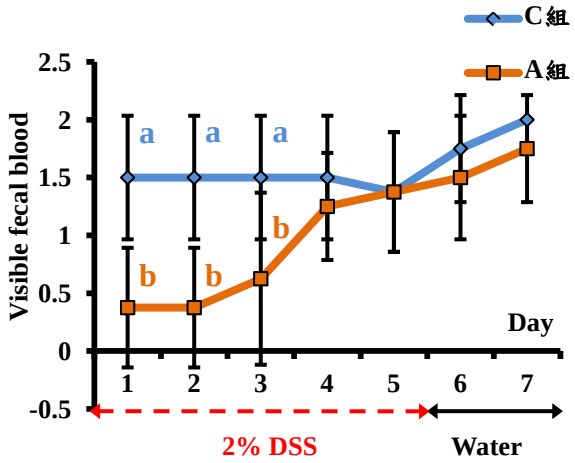


圖 6. 餵食 DSS 急性結腸炎之臨床分析-血便程度

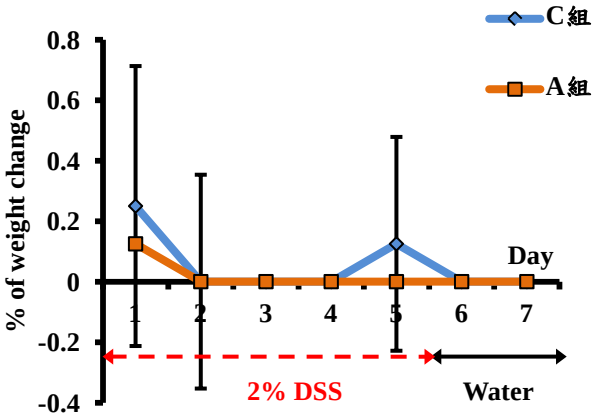


圖 7. 餵食 DSS 急性結腸炎之臨床分析-體重改變

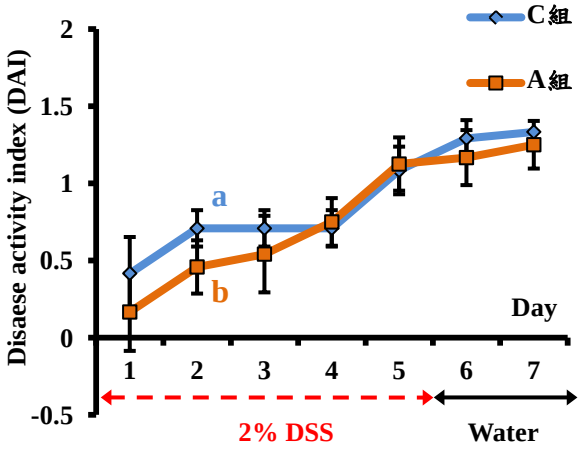


圖 8. 餵食 DSS 急性結腸炎之臨床分析-DAI

綜合以上結果顯示，杏仁有輕微緩和腸炎病程的發展，特別對於糞便潛血的改善有很大的效果，推測可能是杏仁中的膳食纖維有關，能間接增加改善腸道菌叢平衡，對於腸黏膜有保護效應，日後杏仁的濃度提高可能保護腸道效果更好。

第二節 抗氧化/助氧化系統

(1) 杏仁對結腸抗氧化酵素與脂質過氧化指標

餵飼 5% 杏仁茶後，結腸 GSH 與 SOD 兩組間並沒有顯著差異，脂質過氧程度也沒有顯著差異，serum 的 ALT 與 AST 也沒有顯著差異 (表 5)。

表 5. 添加杏仁對 DSS 處理之大鼠抗氧化酵素與脂質過氧化程度之分析

	C	A
n	8	8
ALT (U/L)	15.8 ± 3.99	15.6 ± 6.91
AST (U/L)	31.6 ± 3.14	29.8 ± 4.13
SOD (unit/mg PMS protein)	9.31 ± 2.29	6.99 ± 2.21
GSH (umol/g)	1.52 ± 1.25	1.02 ± 0.46
TBARS (nmol/g)	14.5 ± 7.27	16.1 ± 4.66

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

綜合以上結果顯示，本實驗給予5% 杏仁茶，對於大腸組織抗氧化酵素沒有影響，推測也可能與杏仁的劑量有關。本次實驗的抗氧化酵素種類僅有一種，由文獻得知腸道黏膜容易受到氧化壓力的活性氧自由基刺激，可以使腸道內細胞受損，且氧化壓力具有能夠影響 IBD 病程之重要能力 [10]，由此得知若是能增加測定項目更能判定性能對於抗氧化酵素影響。

結論

大鼠誘發結腸炎模式下餵食杏仁能改善糞便潛血程度並降低 DAI 指數，推測杏仁有輕微緩和腸炎效應，如果增加杏仁的劑量，可能會有更顯著的效果。

參考文獻

1. Boismenu R, Chen Y. Insights from mouse models of colitis. *J Leukoc Biol.* Mar 2000;67(3):267-278.
2. Epstein J, Docena G, MacDonald TT, Sanderson IR. Curcumin suppresses p38 mitogen-activated protein kinase activation, reduces IL-1beta and matrix metalloproteinase-3 and enhances IL-10 in the mucosa of children and adults with inflammatory bowel disease. *Br J Nutr.* Mar 2010;103(6):824-832.
3. 王正一. 慢性潰瘍性結腸炎在台灣的發生概況. 台灣發炎性腸道疾病病友會 http://www.ibdpg.tw/health.php. 2009.
4. Clapper ML, Cooper HS, Chang WC. Dextran sulfate sodium-induced colitis-associated neoplasia: a promising model for the development of chemopreventive interventions. *Acta Pharmacol Sin.* Sep2007;28(9):1450-1459.
5. Melgar S, Bjursell M, Gerdin AK, Svensson L, Michaelsson E, Bohlooly YM. Mice with experimental colitis show an altered metabolism with decreased metabolic rate. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* Jan 2007;292(1):G165-172.
6. Melgar S, Karlsson A, Michaelsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* Jun 2005;288(6):G1328-1338.
7. Lenoir L, Rossary A, Joubert-Zakeyh J, et al. Lemon verbena infusion consumption attenuates oxidative stress in dextran sulfate sodium-induced colitis in the rat. *Dig Dis Sci.* Dec 2011;56(12):3534-3545.
8. Garrido I, Monagas M, Gomez-Cordoves C, Bartolome B. Polyphenols and antioxidant properties of almond skins: influence of industrial processing. *J Food Sci.* Mar 2008;73(2):C106-115.
9. Mandalari G, Bisignano C, D'Arrigo M, et al. Antimicrobial potential of polyphenols extracted from almond skins. *Lett Appl Microbiol.* Jul 2010;51(1):83-89.
10. Mandalari G, Bisignano C, Genovese T, et al. Natural almond skin reduced oxidative stress and inflammation in an experimental model of inflammatory bowel disease. *Int Immunopharmacol.* Aug 2011;11(8):915-924.
11. 張家瑋. 不同加工條件對苦杏仁品質之影響.*國立屏東科技大學食品科學系所碩士論文*. 2008.
12. 劉燕樺. 杏仁果飲食介入對第 2 型糖尿病患者之心血管疾病危險因子的影響 *臺北醫學大學保健營養學系碩士論文*. 2008.
13. Campa C, Schmitt-Kopplin P, Cataldi TR, Bufo SA, Freitag D, Kettrup A. Analysis of cyanogenic glycosides by micellar capillary electrophoresis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* Feb 28 2000;739(1):95-100.