

嘉南藥理科技大學  
營養與保健科技研究所

碩士論文

氧化炸油對大鼠維生素 E 代謝相關蛋白質與  
基因表現之影響

Effect of Oxidized Frying Oil on the Expression of  
Proteins and Genes Relative to Vitamin E  
Metabolism in Rats

指導教授：蕭 慧 美 博士

研 究 生：黃 玟 綺

中華民國九十七年六月十七日

嘉南藥理科技大學營養與保健科技研究所  
Institute of Nutrition and Health Science  
Chia-Nan University of Pharmacy and Science

碩士論文

Thesis for the Degree of Master

氧化炸油對大鼠維生素 E 代謝相關蛋白質與基因表現之影響  
Effect of Oxidized Frying Oil on the Expression of Proteins and  
Genes Relative to Vitamin E Metabolism in Rats

指導教授：蕭 慧 美 博士 (Dr. Huey-Mei Shaw)

研 究 生：黃 玟 綺 (Wen-Chi Huang)

中華民國九十七年六月十七日

June 17, 2008

**嘉南藥理科技大學**  
**碩士學位考試委員會審定書**

本校 營養與保健科技研究所 碩士班 黃 玟 綺 君

所提論文

氧化炸油對大鼠維生素 E 代謝相關蛋白質與基因表現之影響  
Effect of Oxidized Frying Oil on the Expression of Proteins and  
Genes Relative to Vitamin E Metabolism in Rats

合於碩士資格水準，業經本委員會評審認可。

考試委員：黃 青 真 博士  
台灣大學微生物與生化學所 教授

黃青真

夏 彩 蘭 博士  
嘉南藥理科技大學保健營養系 副教授

夏彩蘭

蕭 慧 美 博士  
嘉南藥理科技大學保健營養系 助理教授

蕭慧美

指導老師：蕭 慧 美 博士  
嘉南藥理科技大學保健營養系 助理教授

蕭慧美

系主任（所長）：

 蕭芳明

中華民國 九十七 年 六 月

☐ 同意立即開放

同意一年後開放，原因是： 投 稿

☐ 同意二年後開放，原因是：

☐ 同意三年後開放，原因是：

研究生簽名: 黃致翰

論文名稱：氧化炸油對大鼠維生素E代謝相關蛋白質與基因表現之影響

指導教授：蕭慧美博士

系所： 營養與保健科技研究所

學號： G9524008

日期：民國 97 年 6 月 17 日

1. 本授權書請填寫並以黑色筆親筆簽名後，裝訂於各紙本論文封面後之次頁。
2. 讀者基於非個人營利性質之線上檢索、閱覽、下載或列印上列論文，應依著作權法有關規定辦理。

## 中文摘要

維生素 E 為動物體內最重要的抗氧化劑，體內維生素 E 含量受到組織保留能力、氧化需求及代謝速率各層面所影響。前人研究指出炸油餵食會降低大鼠體內維生素 E 的營養狀況，但是至今其影響機制未明，本研究目的即欲探討炸油飲食影響維生素 E 營養狀況的可能機制。實驗一以二倍維生素 E 補充飼料，觀察炸油對維生素 E 代謝機制之影響，採用 21 隻離乳 Wistar 雄鼠，依飼料不同分成三組：控制組 (CO 組，新鮮油組) 和兩組炸油組 (FO 組和 FOE 組)，其中的炸油來源為新鮮大豆油以  $205\pm 5^{\circ}\text{C}$  油炸巧果 24 小時所製得；已知維生素 E 吸收率會因為炸油飲食而下降，因此特別設計 FOE 組，在炸油飼料中額外添加 50 ppm 維生素 E。大鼠飼養六週後於犧牲前收集 24 小時尿液以供  $\alpha$ -生育醇 ( $\alpha$ -TOH) 代謝產物 (2,5,7,8- tetramethyl- 2-(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman ;  $\alpha$ -CEHC) 之分析。FO 組和 FOE 組血漿  $\alpha$ -TOH 濃度顯著低於 CO 組 ( $P<0.05$ )，但肝臟  $\alpha$ -TOH 濃度則以 FO 組顯著最低，FOE 組次之 ( $P<0.05$ )。而肝臟 TBARS (Thiobarbituric acid- reactive substances) 含量與 Catalase (CAT) 蛋白質含量皆以兩炸油組顯著高於 CO 組；且炸油組的 CAT 蛋白質含量約增為控制組的三倍之多。肝臟 CYP3A2 蛋白質表現以 FO 組顯著最高 ( $P<0.05$ )，FOE 組次之。尿液中  $\alpha$ -CEHC 的排出量以 FO 組顯著低於其餘兩組 ( $P<0.05$ )。MDR 和  $\alpha$ -TTP 蛋白質含量於三

組間並無顯著差異。實驗二以注射方式給予維生素 E，觀察炸油對維生素 E 代謝機制之影響，並且額外分析 CYP3A 與 PXR mRNA 表現。炸油組肝臟  $\alpha$ -TOH 含量顯著較低、TBARS 含量與 CAT 蛋白質含量則顯著較高，此結果皆與實驗一相似 ( $P < 0.05$ )，炸油組 PXR mRNA 表現量顯著高於新鮮油組 ( $P < 0.05$ )，其下游基因 CYP3A 不論是蛋白質或是 mRNA 之表現皆不受炸油所影響，但兩個實驗皆指出炸油會顯著誘導 CYP4A1 蛋白質的表現。綜合本實驗結果，炸油餵食顯著誘導肝臟中 PXR mRNA 的表現量，但並未促進尿液中  $\alpha$ -CEHC 排出量以及肝中  $\alpha$ -TTP 與 MDR 之蛋白質表現

關鍵字：氧化炸油、大鼠、維生素 E

## Abstract

Vitamin E is the most important lipid-soluble antioxidant in the body . The previous study showed that the retention of dietary vitamin E in rat tissues was affected by dietary frying oil , but the mechanism is still unclear . The purpose of this study is to investigate the effects of oxidized frying oil on the expression of protein and genes relative to vitamin E metabolism in rat liver. In experiment 1 , three groups of male Wistar weanling rats were fed the control diet (CO , containing 15% fresh soyben oil ) or test diets (FO and FOE , containing 15% frying oil ) . Frying oil was obtained by frying dough sheet in fresh soybean oil at  $205\pm5^{\circ}\text{C}$  for four 6-periods . The FOE diet contained 100ppm vitamin E which is about 2 fold of normal vitamin E levels in control diet . After 6 weeks feeding , rats were then moved into metabolic cage to collect urine for 24 hours . Urine samples were analyzed for  $\alpha$ -CEHC ( 2,5,7,8 - tetramethyl -2-(2'-carboxyethyl) - 6 -hydroxychroman) content . At the end of the feeding period , the rats were sacrificed and blood collected and liver were excised for various biochemical analysis. The plasma  $\alpha$ -tocopherol concentration were significantly lower in FO and FOE groups than that of CO group . Liver  $\alpha$ -tocopherol levels were significantly lowest in FO group among the three groups . FO and FOE groups showed significantly higher liver TBARS

concentration when compared with the CO group ; The CAT protein levels in livers of rats fed FO and FOE diet showed significantly 3 fold higher than that of CO group . The amount of urine  $\alpha$ -CEHC in FO groups were significantly lower than that of CO and FOE groups . All the protein levels of  $\alpha$ -TTP , CYP3A1 and MDR protein in liver had no significant difference among the three groups . The frying oil diet could promote the lipid proxidation and induce the protein levels of CAT in liver ; but did not alter the protein levels of other proteins relative to vitamin E metabolism . In experiment 2 , rats were divided into 2 groups (oxidized frying oil , O ; vitamin E-stripped fresh oil , C) and  $\alpha$ -tocopherol were also collected . The results of liver  $\alpha$ -tocopherol , TBARS and protein levels of CAT were similar to that of experiment 1 . The O group showed a significantly increase in liver PXR mRNA expression . The mRNA expression of CYP3A , the downstream gene of PXR , showed no significant difference between the two groups . In conclusion , the mRNA expression levels of PXR were induced by oxidized frying oil in rat liver . The excretion amount of urine  $\alpha$ -CEHC , and the protein levels of  $\alpha$ -TTP and MDR in rat liver were not influeuced by oxidized frying oil feeding

Keywords : oxidized frying oil , rat , vitamin E



## 目錄

中文摘要 .....	I
英文摘要 .....	III
目錄 .....	V
表目錄 .....	XI
圖目錄 .....	XIII
縮寫表 .....	XIV
第一章 緒言 .....	1
第一節 前言 .....	1
第二節 文獻回顧 .....	2
一、維生素 E 介紹 .....	2
(一) 維生素 E 的功能 .....	2
(二) 維生素 E 的吸收、儲存及運送 .....	3
(三) 維生素 E 的排泄及代謝途徑 .....	6
(四) 維生素 E 營養狀況指標 .....	9
二、炸油 .....	9
(一) 油脂在油炸的化學變化 .....	9
(二) 炸油飲食對動物體之影響 .....	10

(三) 炸油飲食與動物體內維生素 E 之相關研究.....	11
三、研究動機 .....	12
第二章 材料與方法 .....	13
一、實驗假說與設計 .....	13
實驗一：以二倍維生素 E 補充飼料，觀察炸油對維生素 E 代謝機制之影響	
實驗二：以注射方式給予維生素 E，觀察炸油對維生素 E 代謝機制之影響	
二、炸油的製備 .....	17
三、脫除維生素 E 之新鮮黃豆油的製備 .....	17
四、試驗飼料的配製 .....	18
五、動物飼養 .....	19
六、動物犧牲 .....	20
七、尿液分析 .....	20
(一) 樣品收集 .....	20
(二) 尿液肌酸酐分析 .....	21
(三) 尿液 $\alpha$ -CEHC 含量分析 .....	22
八、血液分析 .....	24

(一) 血漿膽固醇含量測定 .....	24
(二) 血漿三酸甘油酯含量測定 .....	25
(三) 血漿白蛋白含量測定 .....	26
(四) 血漿維生素 E 含量測定 .....	26
九、肝臟分析 .....	28
(一) 樣品處理 .....	28
(二) 肝臟維生素 E 含量測定 .....	29
(三) 肝臟 CYP3A1、CYP3A2、CYP4A1、 $\alpha$ -TTP、MDR1、CAT 、SOD1 和 GPx1 蛋白質含量測定 .....	30
(四) 肝臟 TBARS 含量測定 .....	37
十、油脂品質分析 .....	38
(一) UV233 吸光值測定 .....	38
(二) 酸價測定 .....	39
(三) 羰基價測定 .....	40
(四) 過氧化物之含量測定 .....	42
(五) 油脂維生素 E 含量測定 .....	43
十一、肝臟 PXR、CYP3A mRNA 含量 .....	44
(一) 總 RNA 之抽取 .....	44
(二) RNA 電泳 .....	46

(三) 半定量逆轉錄聚合酶連鎖反應 ( RT-PCR ) .....	47
(四) DNA 電泳 .....	48
十二、統計分析 .....	49
 第三章結果 .....	 50
第一節實驗一:以二倍維生素 E 補充飼料，觀察炸油對維生素 E	
代謝機制之影響	
一、油脂分析 .....	50
二、體重變化 .....	50
三、飼料利用效率 .....	51
四、組織重量與相對組織重量 .....	51
五、血漿白蛋白、脂質含量 .....	51
六、血漿、肝臟維生素 E 與 TBARS 含量 .....	52
七、尿液肌酸酐、 $\alpha$ -CEHC 含量 .....	52
八、肝臟 CYP 蛋白質含量：CYP4A1、CYP3A1、CYP3A2 .....	53
九、肝臟 $\alpha$ -TTP 蛋白質含量 .....	53
十、肝臟 MDR1 蛋白質含量 .....	53
十一、肝臟 CAT、SOD 和 GPx 蛋白質含量 .....	54

## 第二節 實驗二：以注射方式給予維生素 E，觀察炸油對維生素

### E 代謝機制之影響

一、油脂分析 .....	54
二、體重變化 .....	54
三、飼料利用效率 .....	55
四、組織重量與相對組織重量 .....	55
五、血漿白蛋白、脂質含量 .....	55
六、血漿、肝臟維生素 E 與TBARS含量 .....	55
七、尿液肌酸酐、 $\alpha$ -CEHC含量分析 .....	56
八、肝臟CYP蛋白質含量：CYP4A1、CYP3A1、CYP3A2 .....	56
九、肝臟 CAT、SOD 和 GPx 蛋白質含量測定 .....	57
十、肝臟 PXR、 CYP3A1 及 CYP3A2 mRNA 含量 .....	57
第四章 討論 .....	58
一、油脂品質與動物生長 .....	58
二、炸油飲食對大鼠肝臟維生素 E 代謝機制之影響 .....	59
第五章 結論 .....	67
參考文獻 .....	69
附錄 .....	108

附圖 1.....	108
附圖 2.....	109

## 表目錄

實驗一：以二倍維生素 E 補充飼料，觀察炸油對維生素 E 代謝

機制之影響

表 1	油脂品質指標.....	80
表 2	油脂維生素 E 含量及飼料維生素 E 含量.....	81
表 3	試驗飼料之組成.....	82
表 4	大鼠之體重增加、總攝食量及飼料利用效率.....	83
表 5-1	大鼠之組織重量.....	84
表 5-2	大鼠之相對組織重量.....	85
表 6	大鼠血漿白蛋白、脂質的含量.....	86
表 7	大鼠血漿及肝臟中維生素 E 與 TBARS 的濃度.....	87
表 8	大鼠尿液中肌酸酐的含量.....	88
表 9	大鼠尿液中 $\alpha$ -CEHC 的含量.....	89

實驗二：以注射方式給予維生素 E，觀察炸油對維生素 E 代謝

機制之影響

表 10	試驗飼料之組成.....	90
表 11	大鼠之體重增加、總攝食量及飼料利用效率.....	91
表 12-1	大鼠之組織重量.....	92

表 12 – 2	大鼠之相對組織重量.....	93
表 13	大鼠血漿白蛋白、脂質的含量.....	94
表 14	大鼠血漿及肝臟中維生素 E 與 TBARS 的濃度.....	95
表 15	大鼠尿液中肌酸酐的含量.....	96
表 16	大鼠尿液中 $\alpha$ -CEHC 的含量.....	97



## 圖目錄

圖 1	大鼠餵食炸油後肝臟 CYP4A 蛋白質表現之情形.....	98
-----	-------------------------------	----

### 實驗一：以二倍維生素 E 補充飼料，觀察炸油對維生素 E 代謝 機制之影響

圖 2	大鼠餵食炸油後肝臟 CYP 3A 蛋白質表現之情形.....	99
圖 3	大鼠餵食炸油後肝臟 $\alpha$ -TTP 蛋白質表現之情形.....	100
圖 4	大鼠餵食炸油後肝臟 MDR1 蛋白質表現之情形.....	101
圖 5	大鼠餵食炸油後肝臟 CAT 蛋白質表現之情形.....	102
圖 6	大鼠餵食炸油後肝臟 SOD、GPx 蛋白質表現之情形.....	103

### 實驗二：以注射方式給予維生素 E，觀察炸油對維生素 E 代謝 機制之影響

圖 7	大鼠餵食炸油後肝臟 CYP3A 蛋白質表現之情形.....	104
圖 8	大鼠餵食炸油後肝臟 CAT 蛋白質表現之情形.....	105
圖 9	大鼠餵食炸油後肝臟 SOD、GPx 蛋白質表現之情形.....	106
圖 10	大鼠餵食炸油後肝臟 PXR、CYP3A mRNA 表現之情形.....	107

## 縮寫表

縮寫	全文
$\alpha$ -CEHC	2,5,7,8-tetramethyl-2(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman
$\alpha$ -TOH	$\alpha$ -tocopherol
$\alpha$ -TTP	$\alpha$ -tocopherol transfer protein
ACO	Acyl-CoA oxidase
CAT	Catalase
CYP	Cytochrome P450
GPx	Glutathione peroxidase
GST	Glutathione S-Transferase
HDL	High density lipoprotein
LDL	Low density lipoprotein
MDR	Multi-Drug Resistance
SOD	Superoxide dismutase
TBARS	Thiobarbituric acid- reactive substances
VLDL	Very low density lipoprotein

## 第一章 緒言

### 第一節 前言

現今由於人們飲食形態多以外食為主，而外食的烹調方式又以油炸類最吸引著大家的味蕾，像是便當店中油炸類之主菜（炸魚、炸雞腿、炸豬排等）或是台灣小吃鹹酥雞、炸雞排等，甚至到大人小孩都喜愛的洋芋片，全都是高脂高熱量的食物。雖然低油的健康飲食習慣持續在宣導，但大多數的民眾依然抵擋不了食物在油炸後的香、酥、脆。食物油炸的過程中，油脂經過高溫、水份、氧氣和金屬離子的介入，會產生氧化、水解、異構化及裂解等變化，而造成油脂的劣變。劣變的油脂會在油炸的過程中吸附於食物中，進而一起食入體內。

過去已有許多研究炸油之營養生理的報告，發現炸油與營養素、解毒酵素之交互作用以及癌症、發炎反應等皆有所關聯，也有研究調查指出人類攝取炸油飲食與高血壓呈正相關<sup>(1)</sup>。因此，高溫油炸食物對體內所造成之影響是不容忽視的。長期以氧化炸油餵食大鼠會有肝、腎腫大之現象<sup>(2)</sup>，而在營養充足條件下，肝及腎臟微粒體中 cytochrome P450 含量會增加<sup>(2,3)</sup>。此外亦發現到餵食炸油之老鼠血脂含量下降以及炸油餵食會顯著降低脂質與維生素 E 吸收率，並促進脂質過氧化且增加維生素 E 的汰換率進而降低維生素 E 的營養狀況。

炸油透過哪些維生素 E 代謝機轉影響其汰換率並未見有文獻進一步探討，因此本研究目的即欲探討炸油飲食降低維生素 E 營養狀況的可能機制。

## 第二節 文獻回顧

### 一、維生素 E 簡介

維生素 E 包含了八種植物合成之化合物，可分成具有飽和側鏈的 (tocopherols) 和具不飽和側鏈的生育三醇 (tocotrienols)。此兩類依 chroman 環上之甲基位置及數目的不同，各包含四種同質異構維生素 ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  和  $\delta$ )。而另一種人工合成的維生素 E 化合物為 all-rac- $\alpha$ -生育醇醋酸鹽 (all-rac - $\alpha$ -tocopheryl acetate)，亦具有維生素 E 的活性。活性最大的維生素 E 為  $\alpha$ -生育醇 ( $\alpha$ -tocopherol ； $\alpha$ -TOH)，其次是  $\beta$ 、 $\gamma$  和  $\delta$ 。

#### (一) 維生素 E 的功能

維生素 E 為動物體內重要的脂溶性抗氧化劑。可有效控制細胞膜上脂肪酸的游離基連鎖反應<sup>(4)</sup>，故被稱為「生物細胞膜上最重要的自由基清除者 (free radical scavenger)」，也有人稱之為「中斷連鎖反應之抗氧化劑 (chain-breaking antioxidant)」。當細胞膜受到游離基攻擊時，抗氧化劑是否能夠及時發揮保護作用，與其結構上的 chroman 環上之甲基位置及數目有

關。

維生素 E 被認為是生體內最重要的非酵素型抗氧化劑。生體內常會產生一些自由基，尤以粒腺體和內質網中的電子傳遞系統所生成的自由基量最多。此時組織除了脂溶性的維生素 E 當防線外，還有各種抗氧化酵素 (Superoxide dismutase、Catalase、Glutathione peroxidase) 及小分子物質如 Glutathione，維生素 C 等抗氧化物質共同來防禦保護細胞，使其免於受到氧化傷害。

## (二) 維生素 E 的吸收、儲存及運送

維生素 E 為脂溶性維生素，其吸收途徑與脂肪大致相同：維生素 E 會與食物中的脂肪一起進入小腸，在胰酯解酶的作用成為游離型的維生素 E，再與膽汁混合成乳糜微粒，由小腸吸收進入腸黏膜細胞。維生素 E 在腸道中的吸收型式為被動擴散作用，吸收率隨攝入量而有所不同，維生素 E 之總吸收率：大鼠為80-90%<sup>(5)</sup>、人類為50-85%<sup>(6)</sup>。部份飲食中的維生素 E 不會被吸收而隨著糞便排除<sup>(7)</sup>，過去有研究指出口服給予放射線標定  $\alpha$ -TOH，測量其糞便回收率，發現大約有 30%  $\alpha$ -TOH 沒有被吸收<sup>(6, 8)</sup>。在人體和大鼠實驗中發現有些  $\alpha$ -TOH 和  $\gamma$ -TOH 會經由膽汁迅速的排出體外<sup>(9, 10)</sup>。

人體全身維生素 E 含量最高的組織為脂肪組織，其次是腎上腺，分別

含 150 及 132  $\mu\text{g}$   $\alpha$ -TOH / 克組織重左右，其他組織的維生素 E 含量則為 2 - 40  $\mu\text{g}$  / 克組織重不等，肝臟與血漿中的維生素 E 含量則分別平均為 13 及 9.5  $\mu\text{g}$   $\alpha$ -tocopherol / 克組織重。除了脂肪細胞外，其他組織的維生素 E 主要都分佈在細胞膜上<sup>(11)</sup>。維生素 E 在全身分佈儲存的 pool 可分為兩類型式：labile pool 及 fixed pool。labile pool 的汰換率快速，血漿及肝臟中儲存的維生素 E 即為此類，可反應短期的維生素 E 營養狀況；fixed pool 則如脂肪組織，其內的維生素 E 含量不易耗損，在長時間下才能看出其變化。維生素 E 耗損的實驗即發現，在飲食缺乏維生素 E 的狀況下，labile pool 的維生素 E 含量迅速下降至幾乎消失，fixed pool (脂肪組織) 中的維生素 E 含量卻能維持數年不變<sup>(12)</sup>。

各種型式的維生素 E 異構物在腸道的吸收階段並沒有太大差別，但進入肝臟後便有顯著不同，於肝臟中各型維生素 E，會再重新包裝於 VLDL 進入血液循環，而實驗發現由 VLDL 釋出者多為  $\alpha$ -TOH 型，其他型式則較少。Traber 等人以重氫標示 50 mg *RRR*- $\alpha$ -tocopherol 及 *RRR*- $\gamma$ -tocopherol 給予正常受試者服用，結果發現二者在乳糜微粒中的含量相同，但血漿中存留下的  $\alpha$ -TOH 濃度顯著較  $\gamma$ -TOH 高<sup>(13)</sup>。

肝臟中有一個可專一性與  $\alpha$ -TOH 結合的特殊蛋白質，稱為  $\alpha$ -生育醇轉移蛋白 ( $\alpha$ -tocopherol transfer protein ;  $\alpha$ -TTP)<sup>(14)</sup>，目前推測其功能為篩選  $\alpha$ -TOH 存留以釋入血液循環。其他型式的 TOH 如  $\beta$ 、 $\gamma$  及  $\delta$ -TOH 則透

過膽汁從糞便排出而排除，或經由氧化代謝由尿液排出<sup>(10)</sup>。Hosomi 等人於 1997 年指出，各種維生素 E 異構物對  $\alpha$ -TTP 的親和力與其生物活性成正比。因此，推測  $\alpha$ -TTP 的親和力是決定各維生素 E 異構物生物活性的重要性因子之一，由於  $\alpha$ -TOH 與  $\alpha$ -TTP 的高親和力，所以使得  $\alpha$ -TOH 具有最高的生物活性<sup>(15)</sup>。

維生素 E (主要是  $\alpha$ -TOH) 隨著 VLDL (very low density lipoprotein) 移出肝臟後即進入血液循環，在脂蛋白脂解酶 (lipoprotein lipase ; LPL) 的作用下，有些 VLDL 形成 VLDL 殘餘物回到肝臟，其餘則轉變為 LDL (low density lipoprotein) 及 HDL (high density lipoprotein)，維生素 E 也隨著這些脂蛋白的變化而轉移。維生素 E 在大鼠、馬、雞及人類女性的血漿脂蛋白分佈上，70-80% 在 HDL、18-22% 在 LDL，< 8% 在 VLDL；人類男性則主要分佈於 LDL 上 (65%)<sup>(11)</sup>。正常成人血漿中的維生素 E 濃度約為 0.85 mg/dL，即使投予超高劑量維生素 E，血漿中的維生素 E 濃度也僅能上升至正常值之 2-4 倍<sup>(16)</sup>。此一恆定的達成，主要是源自於新吸收的維生素 E 與原先體循環內的維生素 E 之間的快速取代<sup>(17)</sup>。血漿中的維生素 E 則可透過 LPL、LDL 接受器以及其他未知途徑被週邊組織所吸收利用。

### (三) 維生素 E 的排泄及代謝途徑

維生素 E 代謝產物主要分兩類為 tocopheryl quinones (TQ) 和 carboxy ethyl-hydroxychromans (CEHC) (參考 Modern Nutrition in Health and Disease, 前者參與抗氧化, 後者才是非參與抗氧化的代謝產物<sup>(18, 19)</sup>) , 不論是何種形式的維生素 E 皆有著相同的代謝機制, 最後的代謝產物皆為 CEHC。形成 CEHC 的途徑仍未明確。維生素 E 之 phytyl side chain 縮短的反應途徑, 目前認為係先經由  $\omega$ -oxidation, 將末端甲基氧化成一級醇, 再氧化為酸, 續以  $\beta$ -oxidation 反應, 每次切除 2-3 個碳, 最後以 CEHC 或 CEHC-glucuronide 等形式排出。

Cytochrome P450 (CYP450) 是一種含鐵的血質蛋白質家族簡稱, 主要位於肝臟內質網膜、粒線體及分離之微粒體中並代謝外來物質, 屬於肝臟解毒酵素系統之一, 肝臟解毒酵素系統主要分為 phase I 和 phase II, phase I 主要將一些極性官能基加到低極性的受質上, 使之轉化成較具極性的分子, 參與的有氧化、還原、水解、氫化、去烷基等反應, 這部分反應主要即由受質特異性極低的 CYP450 酵素群參與; 而 phase II 主要是將極性大的分子, 如 sulfate、glutathione、glucuronic acid 等接至經 phase I 所產生的活性中間產物上, 以增加其水溶性而易於排出體外, 進而減少有毒物質對生物體的傷害, phase II 酵素包含 UGTs、sulfotransferases 等。目前已經發現 CYP450 至少有一百五十多種同功酶, 其中有七十多種的基因序列已



被訂出。各異構物之命名主要依胺基酸序列決定，若胺基酸序列有 40% 之相似性，則屬同一族(family)，同一族中若55% 以上胺基酸序列相同時，則屬同一亞族 (subfamily)；簡寫上，CYP表示 CYP450，其後的阿拉伯數字表示族，緊接的英文大寫字母表示亞族，最後的阿拉伯數字則表示特定的成員。例如 CYP1A1表示 CYP450第一族 A 亞族的一成員蛋白質<sup>(20)</sup>。

Parker 及 Swanson 等人以  $\alpha$ -、 $\gamma$ - 及  $\delta$ - 生育醇處理 HepG2/C3A 細胞株及大鼠初代肝細胞，同時加入 CYP3A 的選擇性抑制劑 ketoconazole 或芝麻種子萃取物 sesamin，發現皆能分別抑制  $\alpha$ -、 $\gamma$ -及  $\delta$ - CEHC 之排出達十倍之多，而加入 CYP2C 及 CYP27 的選擇性抑制劑(分別為 sulphaphenazole 及 cyclosporin) 則沒效果<sup>(21)</sup>。Ikeda 等人餵食大鼠富含  $\gamma$ -TOH 的飲食，並同時在飼料中添加 ketoconazole 或 sesamin/sesaminol (皆是芝麻種子中的主要萃取物)，發現皆能顯著抑制尿中的  $\gamma$ -CEHC 排出，進而提高  $\gamma$ -TOH 在肝臟及血漿中的保留量<sup>(22)</sup>。Birringer (2001) 等人以 CYP3A 活化劑 rifampicin 處理維生素 E-adapted HepG2 細胞株，發現能提高培養液中  $\alpha$ -CEHC 含量達對照組的五倍之多<sup>(23)</sup>。這些報告暗示 CYP 家族的特定成員可能與生育醇之代謝形成 CEHC 有關，但 CYP 所催化的  $\omega$ -oxidation 並不能進行將 phytyl side chain 縮短的反应，故其應非 CEHC 形成途徑中之唯一反應。

MDR (Multi-Drug Resistance ; P-glycoprotein ; ABCB1) 為 ABC

transporter protein 之其中一種，位於肝細胞小管膜上。大鼠與人類有兩種 MDR 蛋白質，包含 MDR1 和 MDR3 而小鼠 Mdr2 相當於大鼠和人類的 MDR3。MDR 在肝臟負責把許多藥物經由膽汁排泄，會使得藥物在體內累積減少，引起抗藥性<sup>(24)</sup>。有研究指出 MDR1 與 CYP3A 受到許多相同受質所誘導<sup>(25)</sup>，推測 MDR1 也有可能參與  $\alpha$ -TOH 的排泄作用。

類固醇 X 受體 (pregnane X receptor , PXR , NR1I2) 為細胞核接受器，屬於 Orphan nuclear receptors 族群之一，主要分佈在肝臟和小腸，目前發現它主要參與藥物代謝相關酵素的調控，包括 phase I 、phase II 酵素與 drug transporters 等<sup>(26)</sup>。

PXR會受 Pregnenolone、Dexamethasone 等藥物所誘導，同時活化 CYP3A的表現<sup>(27)</sup>。PXR可和 CYP3A promoter 結合，且剔除 PXR 基因的老鼠無法調控 CYP3A 之表現等，此研究結果顯示 PXR 是 CYP3A 酵素主要的轉錄調控因子<sup>(28)</sup>。Staudinger (2001) 與Synold (2001) 等人 指出 PXR/SXR 會調控在膜 (transmembrane)上轉運蛋白質如 Oatp2<sup>(29)</sup> 或 MDR1<sup>(30)</sup>等基因的表現。細胞色素 CYP3A4 及 MDR 兩者皆是 PXR 的下游基因，同時也是本論文推測與維生素E代謝相關之蛋白質，此外 Landes (2003) 等人在 HepG2 細胞中發現維生素 E 本身亦具有活化 PXR 之作用<sup>(28)</sup>。綜上所述，PXR 之表現應與維生素E代謝有十分密切關係，值得探討。

#### (四) 維生素 E 營養狀況指標

正常成人血清中總生育醇的範圍值為 0.8 至 1.2 mg/dL，若小於 0.5 mg/dL 則表示缺乏。由於血清中維生素 E 的濃度與血清中總脂質呈線性關係，因此於高或低脂蛋白血症的情況下，血清中維生素 E 的濃度並不能精確的反映出維生素 E 的營養狀況，為校正血清脂質濃度，有人建議以血清維生素 E 濃度 (mg) 與血清總脂質 (g) 的比值來表示。當 12 歲以下之孩童及成人之比值大於 0.8mg/g 時則表示正常<sup>(31)</sup>。

## 二、炸油

### (一) 油脂在油炸的化學變化

油脂在高溫及氧氣存在下，會發生氧化、水解、異構化、聚合及裂解等反應。在氧化起始步驟，生成了初級氧化產物，即 hydroperoxide，此等產物在高溫油炸過程中，可能繼續發生裂解、聚合、環化等反應，生成二級產物如：醇、醛、酮、酸、碳氫化合物等裂解產物；二聚體、三聚體等聚合產物；環化產物如五環、六環之環狀單體等。這些物質可能具揮發性或不具揮發性，揮發性物質形成油炸過程之油煙，而不具揮發性物質則堆積在油脂中，此即為油脂品質劣變及對動物體造成不良影響之主因<sup>(32, 33)</sup>。

油脂經油炸四天後會產生惡臭味，但加入高劑量  $\gamma$ -TOH 可防止油脂之劣敗<sup>(34)</sup>。

## (二) 炸油飲食對動物體之影響

炸油餵食會造成動物生長遲緩等現象<sup>(35)</sup>。此外亦會引發肝腎腫大現象，其原因可能是過氧化體增生及過氧化體、微粒體酵素增加所致。Huang 等人發現長期餵食大鼠炸油會誘發肝臟中 CYP 450 酵素及 phase II 酵素之活性<sup>(2)</sup>。湯氏論文指出，炸油會增加 CYP3A2 及 CYP2C11 之活性<sup>(3)</sup>。此外，CYP2B1 蛋白質、CYP4A1 蛋白質及 mRNA 表現亦受炸油所誘導<sup>(36, 37)</sup>。炸油還會促進 CYP3A1、CYP4A1、CYP4F、CYP2E1 及 GST 基因的表現<sup>(38)</sup>。因此炸油可能會透過 CYP 酵素之誘導進而影響其他藥物或營養素之代謝。

有研究指出炸油餵食會造成肝臟脂質以及血漿三酸甘油酯濃度之下降<sup>(39)</sup>。趙氏論文指出，炸油中含有 PPAR $\alpha$  活化物，會使老鼠肝臟 PPAR $\alpha$  下游基因 (Acyl-CoA oxidase 及 CYP4A1) mRNA 表現顯著增加，由此可見炸油亦影響了老鼠脂質之代謝<sup>(40)</sup>。

在許多研究發現炸油會促進脂質過氧化反應<sup>(41, 42)</sup>，進而影響組織抗氧化系統；除了在酵素方面造成大鼠肝臟抗氧化酵素 CAT 的活性上升<sup>(40, 43)</sup>、或使得 SOD 和 GPx 活性會下降<sup>(44)</sup>之外，還會降低維生素 E 營養狀況<sup>(42)</sup>。

### (三) 炸油飲食與動物體內維生素 E 之影響

高溫炸油會產生對身體有害的次級產物，許多研究指出炸油會增加組織脂質過氧化反應<sup>(42, 45)</sup>。Izaki 等人，發現大鼠餵食炸油飲食，會降低肝臟及血清維生素 E 含量，指出油脂品質惡化程度會影響到動物體內維生素 E 的營養狀況<sup>(45)</sup>。Liu 和 Huang 發現炸油餵食會降低脂質和維生素 E 之外表吸收率，尤其維生素 E 外表吸收率只有新鮮油組的 60% 左右，此外炸油組各組織中之  $\alpha$ -TOH 含量皆低於新鮮油組<sup>(42)</sup>可見吸收率之下降是炸油造成組織維生素 E 下降的重要原因。Liu 和 Huang 以注射方式給予大鼠放射性標定之維生素 E 以排除吸收差異時，發現炸油組之  $\alpha$ -TOH 仍顯著低於新鮮油組，而炸油鼠尿液及糞便中放射線維生素 E 之排出量皆明顯增加，約為對照組的 1.5 倍，體內組織維生素 E 之保留量也只有新鮮油組的 35%<sup>(46)</sup>。以上研究顯示炸油飲食不但降低了維生素 E 的吸收，且加速體內維生素 E 的代謝，但是其機制為何至今未明。

### 三、研究動機

由上述可知，炸油會降低體內維生素 E 營養狀況並促進組織脂質過氧化。炸油使得維生素 E 營養狀況下降之原因，目前已知其原因之一是炸油降低維生素 E 之吸收率，除此之外，其可能相關機制包括下列：(1) 促進維生素 E 的代謝：炸油具有誘發肝臟 CYP3A 表現之可能，藉此可能進而加速維生素 E 的代謝，並使尿液中維生素 E 代謝產物排出量增加。(2) 增加維生素 E 經由膽汁至糞便中的排泄量。研究指出，動物體內維生素 E 經膽汁排出應與 MDR 表現有關<sup>(9)</sup>，炸油可能透過影響 MDR 表現進而加速維生素 E 之排出。(3) 促進脂質過氧化增加維生素 E 的消耗以及影響肝臟  $\alpha$ -TTP 的表現量。已知  $\alpha$ -TTP 表現會受氧化壓力所影響<sup>(47)</sup>，亦有研究指出肝臟損傷時， $\alpha$ -TTP mRNA 表現會下降<sup>(48)</sup>。由於炸油會促進脂質過氧化情形，因此推測可能會透過影響  $\alpha$ -TTP 之表現進而影響維生素 E 的運送與汰換。

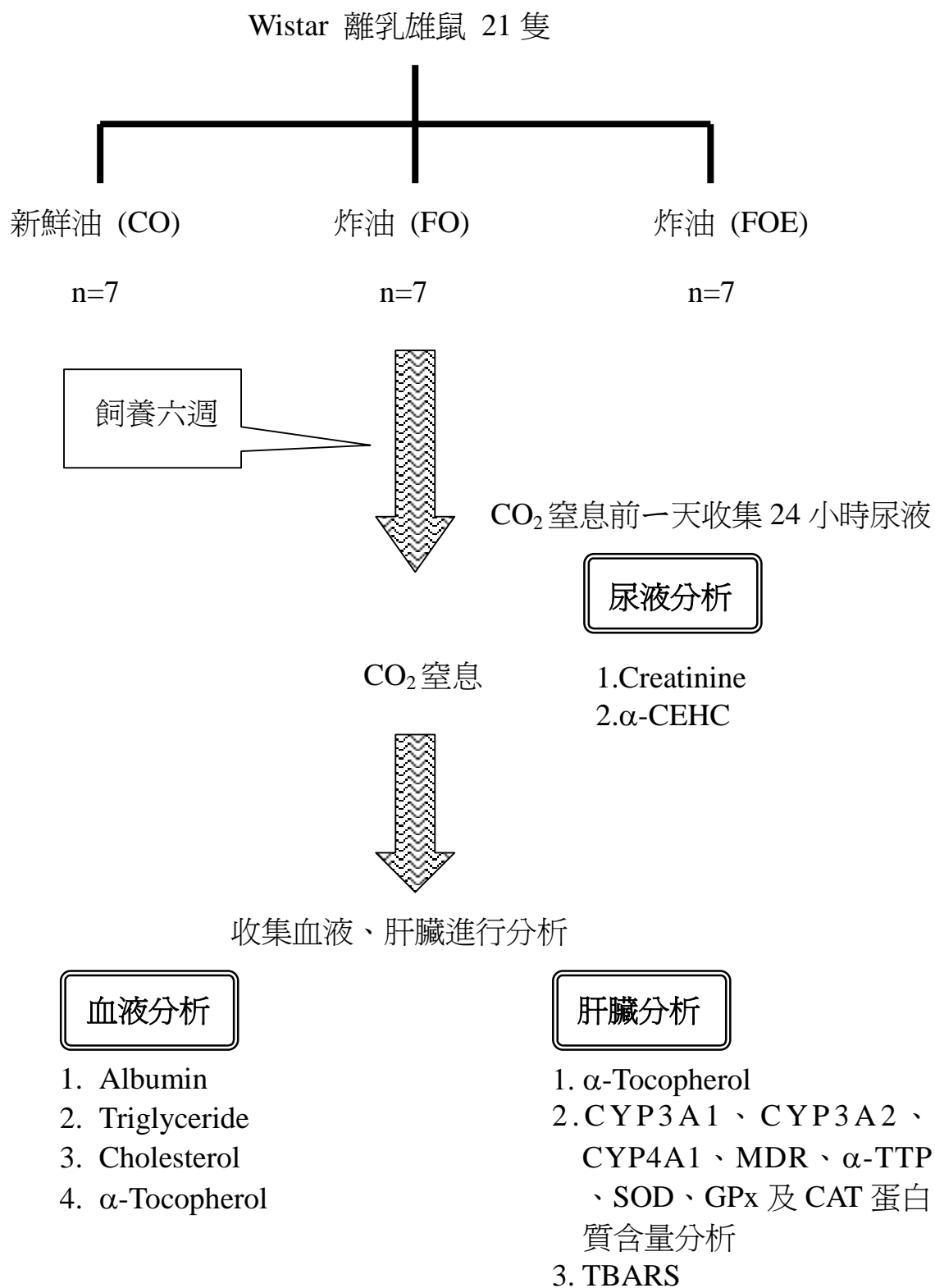
因此，本研究特別藉由二種不同的維生素 E 提供方式（給予兩倍維生素 E 飼料及腹腔注射維生素 E 方式），來探討氧化炸油飲食對大鼠維生素 E 代謝相關蛋白質與基因表現之影響。

## 第二章 材料與方法

### 一、 實驗假說與設計

#### 實驗一：以二倍維生素 E 補充飼料，觀察炸油對維生素 E 代謝機制之影響

前人研究顯示炸油確實降低維生素 E 的營養狀況，而炸油會影響維生素 E 代謝的何種層面並未有進一步探討。炸油具有類似 xenobiotics 性質，可誘發肝微粒體上藥物及外來物代謝系統的活性，可能因而加速了維生素 E 的代謝、降低體內維生素 E 的濃度。因此，本實驗目的欲探討炸油飲食影響維生素 E 營養狀況的可能機制。本研究假說為炸油飲食可能影響到維生素 E 的代謝機制、排泄機制或抗氧化機制，進而降低維生素 E 的營養狀況。由於炸油組維生素 E 吸收率只有新鮮油約一半左右，因此本實驗特別多設計一組以二倍維生素 E 補充於炸油之組別，實驗設計如下：



圖A 實驗一實驗設計



## **實驗二：以注射方式給予維生素 E，觀察炸油對維生素 E 代謝機制之影響**

由於實驗一是將維生素 E 添加於飼料中餵給大鼠，在許多實驗指出炸油會影響到油脂的吸收，導致維生素 E 吸收亦不佳。因此，設計實驗二，本實驗以不含維生素 E 飼料作為基礎飼料，將維生素 E 改以腹腔注射的方式供給大鼠，以觀察炸油對維生素E代謝機制之影響是否與實驗一有所不同。實驗設計如下：

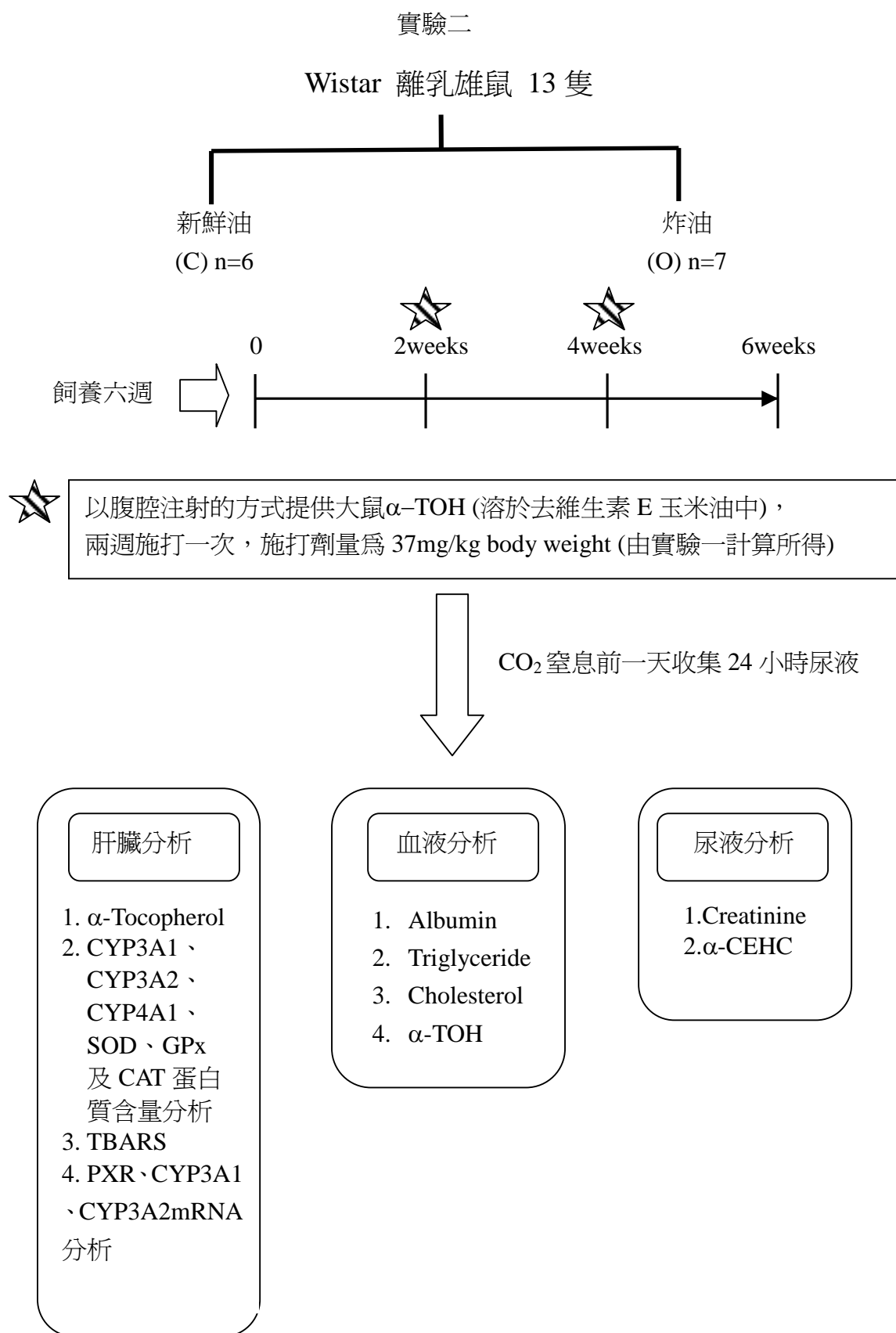


圖 B 實驗二實驗設計

## 二、炸油的製備

將新鮮黃豆油 (2.6 公升裝，統一) 倒入口徑 40 公分，深度 9 公分的生鐵鍋中，以瓦斯爐加熱，溫度維持在  $205\pm 5^{\circ}\text{C}$ ，供油炸麵片。麵片製作一天份的原料為 1500 公克高筋麵粉、200 公克白砂糖、5 公克發粉和 600 毫升水混勻，以攪拌器拌勻成麵糰，再以桿麵機桿成厚度 0.15 公分的麵皮，切割成長 10 公分、寬 4.5 公分的麵片，切開中間反摺成巧果狀，投入前述熱油鍋中，每次一片，油炸至麵片呈金黃色後取出，每天連續油炸六小時後熄火冷卻，隔天再炸，連續四天，共炸 24 小時，即得實驗炸油。將炸油分裝充氮氣，置於  $-20^{\circ}\text{C}$  保存，供飼料配製<sup>(3)</sup>。

## 三、脫除維生素 E 之新鮮黃豆油的製備

500mL 新鮮黃豆油，加入等體積 500mL n-hexane 及 (3~5%) 30g 的活性碳 3~5 小時，然後以濾紙過濾 2 次。(第一次單層，第二次雙層) 在  $37^{\circ}\text{C}$  下再以減壓真空除去溶劑 (直到沒 n-hexane 味道，約三小時)，剩下的油即為脫除維生素 E 之新鮮黃豆油。將其存放於  $-20^{\circ}\text{C}$  冷凍中，以作為對照飼料用油<sup>(49)</sup>。

#### 四、試驗飼料的配製

##### 實驗一

飼料的基本組成依據 AIN-76 (American Institute of Nutrition ,1977) 配方作適度調整，飼料成分包括酪蛋白 (MP Biomedicals)、玉米澱粉 (MP Biomedicals)、纖維素 (MP Biomedicals)、AIN-76 礦物質混合物 (MP Biomedicals)、AIN-76 維生素混合物 (MP Biomedicals)、甲硫胺酸 (Sigam)、膽鹼 (Sigma)、all-rac- $\alpha$ -tocopherol acetate (MP Biomedicals)，將各種粉狀材料依照表 3 比例先行混合均勻，再依配方比例分別拌入 15% 的各種試驗油脂。

##### 實驗二

飼料的基本組成依據 AIN-93G (American Institute of Nutrition,1993) 配方作適度調整，飼料成分包括酪蛋白 (MP Biomedicals)、玉米澱粉 (MP Biomedicals)、蔗糖 (台糖)、纖維素 (MP Biomedicals)、AIN-93 礦物質混合物 (MP Biomedicals)、去維生素 E 之維生素混合物 (MP Biomedicals)、胱胺酸 (ICN Biomedicals)、膽鹼 (MP Biomedicals)、TBHQ (MP Biomedicals)，將各種粉狀材料依照表 10 比例先行混合均勻，再依配方比例分別拌入 15%的各種試驗油脂。

## 五、動物飼養

### 實驗一

實驗動物採用 Wistar 品系離乳雄性大鼠 21 隻，購自樂斯科生物科技公司。適應三天餵予顆粒飼料，再依體重隨機分為三組，每組 7 隻，分別餵食 CO、FO 及 FOE 等三組實驗飼料；受試動物均個別飼養於不鏽鋼絲網籠，動物房溫度維持於  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，光照及黑暗各 12 小時。飼料及飲水均使其自由攝取，每 2-3 天記錄飼料攝取量，每週記錄一次體重，飼養 42 天。

### 實驗二

實驗動物採用 Wistar 品系離乳雄性大鼠 13 隻，購自樂斯科生物科技公司。適應三天餵予顆粒飼料，再依體重隨機分為二組，C 組 6 隻、O 組 7 隻，分別餵食 C 及 O 等二組實驗飼料；受試動物均個別飼養於不鏽鋼絲網籠，動物房溫度維持於  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，光照及黑暗各 12 小時。飼料及飲水均使其自由攝取，每 2-3 天記錄飼料攝取量，每週記錄一次體重，飼養 42 天。

飼養第二週及第四週，以腹腔注射方式給予老鼠  $\alpha$ -tocopherol (ICN)， $\alpha$ -tocopherol 之配製是將  $\alpha$ -tocopherol 溶於去維生素 E 玉米油 (MP Biomedicals) 中，配製成濃度 20 mg/mL 待注射用。注射劑量由實驗一計算所得，其計算如下：實驗一 CO 組及 FO 組每日維生素 E 攝取量為 2.65

mg/kg body weight，而兩週之維生素 E 攝取量為 37 mg/kg body weight，此即為當天注射劑量。

## 六、動物犧牲

動物於飼養 42 天後犧牲。犧牲前一天收集 24 小時尿液（前 12 小時一樣給予飼料及水、後 12 小時予以禁食）。當天早上用 CO<sub>2</sub> 將動物窒息，秤取動物體重，以含有 EDTA 的採血管（9mL monovette, LH Luer, Sarstedt, Germany）自下腔靜脈取血，在無菌下迅速剪下 3 塊約 0.1 克重的肝臟分別裝入已滅菌的 1.5mL 離心管內，立即投入液態氮中，保存於 -80，供日後 RNA 之抽取及分析。將肝臟取下秤重紀錄後，另剪下 3.5g 肝臟於當天進行均質，以供當日測肝臟 TBARS 及製備肝臟微粒體之用。分別再取下脾臟、心臟、睪丸、副睪脂、肺臟等組織秤重。取得之血液與 EDTA 混勻後，用 3000×g 離心 10 分鐘分離血漿分裝後置於 -20℃ 以供日後分析。

## 七、尿液分析

### （一）樣品收集

收集尿液前先將大鼠移置代謝籠中，24 小時尿液之收集過程如下：  
集尿瓶先以維生素 C (100mg/mL) 噴濕，在管口套上濾紙後並置於冰上每

12 小時收集紀錄一次，集尿後秤取粉狀維生素 C (Final 10mg/mL) 調整 pH 值至 4，再充氮氣置於 -20℃ 儲存。先將兩次收集尿液混合，再進行分析。

## (二) 尿液肌酸酐分析

### 1、原理

尿液中肌酸酐的分析是以市售之試劑組 (cat. NO. CR510,Randox,UK)。原理為肌酸酐在鹼性溶液存在下會和苦味酸 (picric acid) 形成有顏色的複合物，此複合物的生成與肌酸酐的濃度成正比，在 492nm 可測得最大吸光。因生物體每天所排出之肌酸酐量很穩定，因此，當在瘦體組織不變之情形下，以肌酸酐排出量來校正尿中成分排出狀況。

### 2、方法

先將尿液於 12000rpm 離心 5 分鐘，以純水稀釋 50 倍。取 1 mL 肌酸酐標準液 (2mg/dL) 或已稀釋之樣品，加入 1mL 以 picric acid (35mmol/L) 和 sodium hydroxide (0.32mol/L) 等體積混合之試劑，混合後於 30 秒時測吸光值，得吸光值 A1，2 分鐘後測得吸光值 A2。

### 3、計算

$$A_{\text{standard}} \text{ or } A_{\text{sample}} = A2 - A1$$

$$\text{Creatinine concentration (mg/dL)} = (A_{\text{sample}} / A_{\text{standard}}) \times 2$$

### (三) 尿液 $\alpha$ -CEHC 含量分析 (total $\alpha$ -CEHC)

#### 酸加熱處理法

##### 1、方法

取 1mL 鼠尿置於 50 mL 磨砂有蓋玻璃瓶內，加入 1 mL 之 12 M HCl，混合均勻後，以氮氣充滿玻璃瓶內空間，迅速蓋上蓋子用封口膜將蓋子封緊，置於 60°C 水浴反應 1 小時。冰浴冷卻，再加入 9mL diethyl ether 進行萃取，劇烈震盪 1 分鐘後，以 2000 rpm 離心 5 分鐘。取上層 6mL 至玻璃試管中，置於抽氣櫃中將溶劑去除後，以 200 $\mu$ L 流動相回溶，適量稀釋進行 HPLC 分析。

##### 2、Mobile phase 配製

Methanol / H<sub>2</sub>O = 43 / 57，水相含 50 mM sodium acetate，pH 4.5；水相配製的方法為取 12.31 g sodium acetate (Merck) 溶於適量二次水中（此時 pH 約為 8.6），以冰醋酸調整 pH 值至 4.5，再以二次水定量至 3L，之後以 0.2 $\mu$ m 過濾膜過濾去除雜質，置於陰涼處保存備用。配製流動相時，取 1140mL 水相，加入 860mL methanol(Merck,LC 級)，總體積為 2L，以 stir bar 混合攪拌 1 小時後，以超音波震盪機去除氣泡，即可供 HPLC 使用。



### 3、HPLC

Jasco PU-980 intelligent pump

Jasco 851-AS autosampler

Column: Keystone BetaBasic™ 18(5μm)column

Flow rate = 1mL/min

Injection volume = 20μL

此條件下α-CEHC 之滯留時間 (retention time) 約 23.58±1.83 分鐘

### 4、Electrochemical detection

ESA Coulochem II 5200A electro-chemical detector

Guard cell = 250 mV

E1 = 40 mV

E2 = 150 mV

R = 50 nA

### 5、數據擷取及處理

採用訊華公司之訊號擷取卡及層析處理軟體 SISC3.1 版進行積分及計算。

### 6、計算

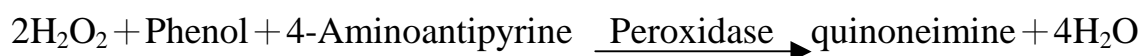
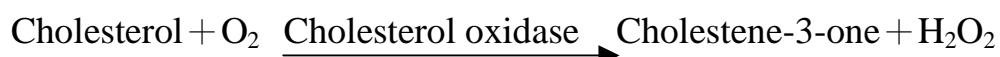
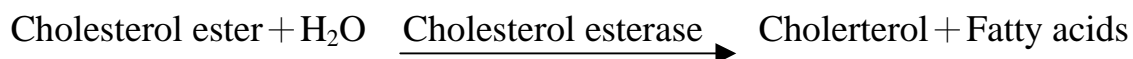
$$\alpha\text{-CEHC}\epsilon_{289\text{nm}} = 3230 \text{ cm}^{-1}(\text{mol/L})^{-1}, \text{MW}=279$$

## 八、血漿分析

### (一) 膽固醇含量測定

#### 1、原理

採用 Enzymatic Endoint Method 以市售之試劑 RANDOX(含 Cholesterol esterase, Cholesterol oxidase, peroxidase, Phenol 及 4-aminoantipyrine), 把 Cholesterol ester 水解、氧化, 並將氧化產物( $H_2O_2$ )轉變成粉紅色的 Quinoneimine, 於 500nm 下測吸光值。



#### 2、方法

取血漿 10 $\mu$ L 或 10 $\mu$ L 標準品, 加入 1mL 反應試劑 (需先回溫) 混合於室溫靜置 10 分鐘後, 測定 500nm 之吸光值 (須於 1 小時內測完)。

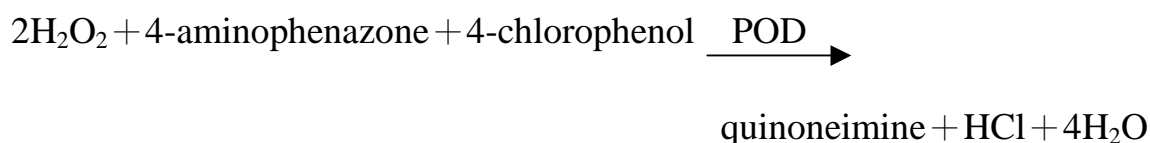
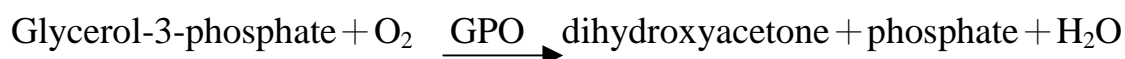
#### 3、計算

$$\text{Cholesterol (mmol/L)} = (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}} / A_{\text{standard}} - A_{\text{blank}}) \times 5.17 \text{ (mmol/L)}$$

## (二) 三酸甘油酯含量測定

### 1、原理

採用 Enzymatic Endoint Method 以市售之試劑 RANDOX (含 Triglycerides, Glycerol-3-phosphate, 4-aminophenazone 及 4 chlorophenol), 把 Triglycerides 水解、氧化, 並將氧化產物 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 轉變成粉紅色的 Quinoneimine, 於 500nm 下測吸光值。



### 2、方法

取血漿 10 $\mu\text{L}$  或 10 $\mu\text{L}$  標準品, 加入 1mL 反應試劑 (需先回溫) 混合於室溫靜置 10 分鐘後, 測定 500nm 之吸光值 (須於 1 小時內測完)。

### 3、計算

$$\text{Triglycerides (mmol/L)} = (\text{A}_{\text{sample}} - \text{A}_{\text{blank}} / \text{A}_{\text{standard}} - \text{A}_{\text{blank}}) \times 2.29 \text{ (mmol/L)}$$

### (三) 白蛋白含量測定

#### 1、方法

採用 Enzymatic Endoint Method 以市售之試劑 RANDOX Cat No. AB362 (含 Succinate buffer, Bromocresol green, Brij 35 及 Preservative) 先將 BCG concentrate 稀釋 7.5 倍即為反應試劑，取血漿 10 $\mu$ L 或 10 $\mu$ L 標準品，加入 3mL 反應試劑混合於室溫靜置 5 分鐘後，測定 630nm 之吸光值。

#### 2、計算

$$\text{Albumin (g/dL)} = (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}} / A_{\text{standard}} - A_{\text{blank}}) \times 45 \text{ (g/dL)}$$

### (四) 血漿維生素 E 含量測定

#### 1、方法

取 0.2 mL 血漿於有蓋玻璃試管中，加入 2mL 絕對酒精(含 1% pyrogallol，當天配製)，1mL 去離子水，0.1mL 6N HCl 溶液震盪 30 秒，再加 6mL 正己烷 (含 0.00125% BHT) 激烈震盪 1 分鐘後，離心 3000rpm 10 分鐘，取上層有機層 5mL 至入玻璃試管，於抽氣櫃中吹乾去除溶劑。最後加入 1mL 甲醇回溶，進行 HPLC 分析<sup>(50)</sup>。

## 2、HPLC

HITACHI L-2130 pump

HITACHI L-2200 autosampler

HITACHI L-2480 FL detector

Column: Mightysil RP-18 GP 250 -4.6 (5 $\mu$ m) column

Flow rate = 1 mL/min

Injection volume = 20 $\mu$ L

Mobile phase = Pure methanol (J.T.Baker,LC 級)

螢光波長 Excitation 285 nm / Emission 330 nm

## 3、數據處理

採用 HITACHI EZChrom Elite software 3.1 版進行積分。

## 4、計算

$$\alpha\text{-TOH}\epsilon_{292\text{nm}} = 3260 \text{ cm}^{-1}(\text{mol/L})^{-1}, \text{MW}=430.72$$

## 九、肝臟分析

### (一) 樣品處理

#### 1、肝均質液

25% (w/v) Homogenate (3.5g 肝臟定量至 14mL)

均質緩衝液 (0.01M Potassium phosphate buffer)

藥品	需要量	濃度
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (J.T.Baker)	1.07 g	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (J.T.Baker)	0.53 g	
KCl (Sigma)	11.5 g	1.15%

溶於 800mL 蒸餾水，以 KOH 調 pH 至 7.6 再以蒸餾水定量至 1000mL

#### 2、PMS

取 9mL 肝均質液，以 4°C 10000×g (12000rpm) 20min，取上清即為 PMS

#### 3、Cytosol

將 PMS 取 6 mL 至超高速離心管置於超高速離心機 (Beckmen) 中，於 4°C 100,000×g (47000rpm) 離心 1 小時，取上清即為細胞質 (cytosol)

#### 4、Microsome

經超高速離心後，所得 pellet 即為 microsome 加入 1mL microsome suspension buffer 以 parafilm 封住，置於 -80°C 保存。

## Microsome suspension buffer (0.05M Potassium phosphate buffer)

含 1mM EDTA

藥品	需要量
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (J.T.Baker)	6.2292 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (J.T.Baker)	1.9376g
EDTA(Riedel-de Haen)	0.372g

溶於 800mL 蒸餾水，以 KOH 調 pH 至 7.6 再以蒸餾水定量至 1000mL

## (二) 肝臟維生素 E 含量測定

### 1、方法

取 0.2mL 肝均質液於有蓋玻璃試管中，加入 2mL 絕對酒精(含 1% pyrogallol，當天配製)，0.2mL KOH (60% KOH) 混勻以 70℃ 水浴加熱 30 分鐘後冰浴冷卻，再加 1mL 去離子水，6mL 正己烷 (含 0.00125% BHT) 激烈震盪 1 分鐘後，離心 3000rpm 10 分鐘，取上層有機層 5mL 至入玻璃試管，於抽氣櫃中吹乾去除溶劑。最後加入 1mL 甲醇回溶，進行 HPLC 分析。

### 2、HPLC

HITACHI L-2130 pump

HITACHI L-2200 autosampler

HITACHI L-2480 FL detector

Column: Mightysil RP-18 GP 250 -4.6 (5 $\mu$ m) column

Flow rate = 1 mL/min

Injection volume = 20 $\mu$ L

Mobile phase = Pure methanol (J.T.baker,LC 級)

螢光波長 Excitation 285 nm / Emission 330 nm

### 3、數據處理

採用 HITACHI EZChrom Elite software 3.1 版進行積分。

### 4、計算

$$\alpha\text{-TOH}\varepsilon_{292\text{nm}} = 3260 \text{ cm}^{-1}(\text{mol/L})^{-1}, \text{MW}=430.72$$

(三) 以西方轉漬法 (Western blot) 分析肝臟 CYP3A1、CYP3A2、

CYP4A、 $\alpha$ -TTP、MDR1、CAT、SOD 和 GPx 蛋白質含量

總蛋白質測定

#### 1、原理

總蛋白質以 Lowry method (1951) 測定<sup>(51)</sup>。此法為 Biuret 法的延伸，銅離子與多肽鍵形成複合物後 ( $\text{Cu}^{2+}$  與 carbonyl group 結合)，可再與 Folin-Ciocalteu 試劑中的 phosphomolybdic-phosphotungstate 作用產生藍色物質，於 660nm 具有吸光性。反應會受硫酸銨及硫醇化合物干擾。



## 2、藥品

Reagent A : 0.5g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  + 1.0g  $\text{Na}_3\text{-Citrate}$

以蒸餾水定量至 100mL

Reagent B: 20g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + 4g  $\text{NaOH}$  以蒸餾水定量至 1 L

Reagent C: 1mL Reagent A + 50mL Reagent B

※需當天配，隔夜不可使用

Reagent D: 10mL Folin-Ciocalteu's phenol reagent + 10mL  $\text{H}_2\text{O}$

※需當天配，隔夜不可使用

## 3、方法

樣品或標準品取 0.5mL+Reagent C 2.5mL 震盪混合後，靜置 8-10 分鐘，再加入 Reagent D 0.25mL 震盪混合後，靜置 20-30 分鐘，測吸光值 OD660nm。

## 蛋白質電泳

### 1、原理

蛋白質分子的淨電荷受環境 pH 值所影響。當環境 pH 值高於其 pI 時，此蛋白質帶負電，反之則帶正電；若剛好等於其 pI 值，則不帶電。帶電分子在電場中會被移動稱為泳動，泳動率與蛋白質的分子量成反比，與蛋白質的電荷密度成正比。

## 2、藥品

### SDS 膠體電泳樣品溶液 (SDS-PAGE sample buffer, 2X)

藥品	需要量	濃度
Tris-Base (J.T.Baker)	3.0 g	125mM × 2
EDTA·2Na (Riedel-de Haen)	14.8 mg	2mM × 2
SDS (Sigma)	4.0 g	2% × 2
β-mercaptoethanol (Sigma)	10 mL	5% × 2

加水 80 mL 溶解，調整 pH 值至 6.8 之後，再加水定量至 100 mL。

### SDS 通用電泳緩衝液 (5X stock)

藥品	需要量	濃度
Tris-Base (J.T.Baker)	54.5 g	90mM × 5
Boric acid (J.T.Baker)	24.8 g	80mM × 5
EDTA·2Na (Riedel-de Haen)	4.7 g	2.5mM × 5

加水 800 mL 溶解，以 HCl 調整 pH 值至 8.4，再定量至 1000mL。

使用時稀釋 5 倍，並加入 0.1% SDS。

### 丙醯胺膠體溶液 (A+B)

40% (w/v) Acrylamide-Bisacrylamide (29:1) solution (amresco)

### 分離膠體緩衝液 (Separation buffer)

藥品	需要量	濃度
Tris-Base (J.T.Baker)	90.8 g	1.5M
TEMED (Sigma)	1.8 mL	

加水 300 mL 溶解後，以 HCl 調整 pH 值至 8.8，再定量至 500mL，

儲存於 4°C 備用。(TEMED=*N,N,N',N'*-Tetramethyl-Ethylenediamine)

### 焦集膠體緩衝液 (Stacking buffer)

藥品	需要量	濃度
Tris-Base (J.T.Baker)	6 g	0.5M
TEMED (Sigma)	0.4 mL	

加水 80 mL 溶解後，以 HCl 調整 pH 值至 6.8，再定量至 100 mL，儲存於 4°C 備用。

### 20 % SDS 溶液

取 20 g Sodium Dodecyl Sulfate (SDS, Sigma) 溶於 100 mL 蒸餾水。

### 10 % APS 溶液

取 1 g Ammonium persulfate 溶於 1 mL 蒸餾水中，需新鮮配製。

### 鑄膠：膠體溶液成分 (2 gel plates)

	Separation	Separation	Separation	Stacking
Component	12%	10%	7%	4%
A+B(C40)	2.4mL	2mL	1.4mL	0.6mL
Separation buffer	2.0mL	2.0mL	2.0mL	—
Stacking buffer	—	—	—	1.125mL
SDS(20%)	40μL	40μL	40μL	23μL
H <sub>2</sub> O	3.5mL			3.58mL
APS(0.05%)	50μL	50μL	50μL	50μL
Final vol.	8mL	8mL	8mL	6mL

### 3、電泳

取肝臟微粒體、細胞質或 PMS 蛋白質加入等體積之 2 倍 SDS 膠體電泳樣本緩衝液，於 95°C 水浴 5 分鐘，再加入 1/7 體積的追蹤染料，最終蛋白質之注入量為 10  $\mu$ g - 50  $\mu$ g，於 150 伏特電壓下以 SDS-PAGE 進行蛋白質電泳，直到色帶泳出膠片，約需 70 分鐘。

### 蛋白質轉印

#### 1、原理

利用蛋白質經 SDS 處理後帶負電會向正極泳動的原理，將膠體上的蛋白質轉印到 PVDF (polyvinylidene difluoride) 膜上，PVDF 膜是一種疏水性材質，蛋白質可藉由本身的疏水性部分與其結合。

#### 2、藥品

##### 轉印緩衝液 (Blotting buffer, 5X stock)

藥品	需要量	濃度
Tris-Base (J.T.Baker)	15.15 g	25mM $\times$ 5
Glycine(Riedel-de Haen)	72 g	0.192M $\times$ 5

加水 800 mL 溶解，以 HCl 調整 pH 值至 8.3，再定量至 1000 mL，使用時稀釋 5 倍，並加入 10% (v/v) 甲醇。

### 3、方法

將膠體及 PVDF 膜 (先以甲醇潤溼增加其親水性) 浸泡在轉印緩衝液 (Blotting buffer : 25mM Tris , 192mM glycine , pH 8.3 , 含 10% Methanol) 30 分鐘，將膠片與 PVDF 膜組合好後 (轉印三明治)，利用半乾式(semi-dry) 轉印槽 (Amersham) 以 65 毫安培電流進行轉印 50 分鐘。

### 免疫染色

#### 1、藥品

##### **10X Phosphate buffered saline (PBS, pH 7.0)**

藥品	需要量
NaCl (Riedel-de Haen)	15.21g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Riedel-de Haen)	3.12 g

加水 800 mL 溶解，以 HCl 調整 pH 值至 7.6，再定量至 1000 mL，配成 10X stock 溶液，儲存於 4°C 備用。

##### **PBST (含 0.05% Tween)**

將 10X stock PBS 溶液，以二次水稀釋 10 倍，再加入 0.05% Tween (J.T.Baker) 混合均勻。

## 明膠 (NET)

藥品	需要量	濃度
Gelatin (J.T.Baker)	5.0g	0.25%
NaCl (Riedel-de Haen)	17.5g	0.15M
EDTA.2Na (Riedel-de Haen)	3.4g	5mM
Tween 20 (J.T.Baker)	1mL	0.05%
Tris base (J.T.Baker)	12.1g	50mM

溶解於 1800mL 水中，調整pH值為 8.0，再定量至 2000mL。

\*Gelatin需先溶於水中，加熱溶解

## 2、方法

轉印完後取出 PVDF 膜以 PBST 洗三次，每次 10 分鐘，再於NET 在 4°C 反應過夜，進行填塞作用。隔日，倒除 NET，加入一級抗體室溫反應 1 小時後，以 PBST 洗 3 次，每次 5 分鐘，再加入二級抗體室溫反應 1 小時後，以 PBST 洗 5 次，每次 5 分鐘，最後，與 2 mL ECL-Plus 冷光基質 (Amersham) 反應 5 分鐘後即可壓片顯影、定影。西方轉漬法分析結果均以 UVP 影像處理系統定量分析之。

## 3、抗體種類及稀釋配方

稀釋條件 (抗體皆用NET稀釋，室溫反應 1 小時)

(1) 一級抗體：CYP3A1、CYP3A2 (Chemicon)

CAT、SOD1、GPX1 (Abcam)

$\alpha$ -TTP<sup>(52)</sup>

二級抗體：HRP-Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Conjugate (Zymed)

(2) 一級抗體：CYP4A1 (Daichi pure chemicals)

二級抗體：anti-goat HRP (KPL)

(3) 一級抗體：MDR1、 $\beta$ -actin (Abcam)

二級抗體：Mouse IgG antibody (Abcam)

#### (四) 肝臟 TBARS 含量之分析

##### 1、原理

測量組織中脂質氧化的多寡，可作為脂質過氧化的指標。

脂質過氧化時，會產生 MDA (malondialdehyde)，而 MDA 會與 TBA (thiobarbituric acid) 反應產生 TBARS (TBA reactive substance)，即  
 $\text{MDA} + \text{TBA} \rightarrow \text{TBARS}$ 。

##### 2、藥品

0.4% TBA：溶於 0.2N HCl 需要加熱助溶，避光

10% TCA：溶於蒸餾水

0.2% BHT：溶於 95% 酒精

標準品 TMP (1,1,3,3-tetraethoxypropane) 溶於 0.01N HCl

### 3、方法

取 1mL 肝臟均質液或標準品，加入 1mL 10% TCA 震盪混勻，離心 10,000  $\times g$  10 分鐘，取上清液 1mL，加入 1mL TBA 及 0.1mL BHT 震盪，置於 50°C 1 小時。冷卻後加入 2mL Isobutanol 震盪萃取反應物，離心 (10,000  $\times g$  10 分鐘)，吸取上層反應物以螢光偵測器測定，波長設定：Ex 515，Em550<sup>(53)</sup>。

## 十、油脂品質分析

### (一) UV233 吸光值測定

#### 1、原理

油脂氧化時，會產生 conjugated dienoic acid，其在 233 nm 會有吸光；UV233 吸光值即代表產生 conjugated dienoic acid 的比例。

#### 2、方法

於定量瓶中精稱適量的油脂樣品  $\omega$  克 (約 0.1 g)，以 n-hexane 稀釋至定量 V 毫升；以 n-hexane 作為 blank 對照，測溶液於 233 nm 的吸光值。

#### 3、計算

$$\text{UV233 (Abs. / g)} = A \times V/\omega$$



A : 233 nm 吸光值

V : 定量體積

$\omega$ : 油脂樣品稱取量 (g)

## (二) 酸價 (Acid Value, AV) (依 A.O.C.S. official method 8-53 方法)

### 1、定義

中和 1 克油脂中游離脂肪酸所需氫氧化鉀的毫克數，稱為酸價。

### 2、藥品

酒精及乙醚混合劑

將 95% 酒精及乙醚以體積比 1:1 混合。

**Phenolphthalein 指示劑**

取 phenolphthalein 1 g 溶於 100 mL 95% 酒精中。

**0.1 N KOH 酒精溶液**

取 6.4 g KOH 加少量水溶解，以 95% 酒精定量至 1 L。(需以 0.1 N HCl 溶液進行標定，計算其力價)

### 0.1 N HCl 溶液

取 0.83 mL 12 N HCl 溶液 (J.T.baker) 加二次水定量至 100 mL。

## 3、方法

稱取適量之油脂樣品  $\omega$  克 (約 10-20 g)，加入酒精及乙醚 (1:1) 混合劑 20 mL，混合均勻使油樣品完全溶解，再加入 2-3 滴的 phenolphthalein 指示劑，以 0.1 N 的 KOH 酒精溶液滴定至指示劑的粉紅色保持 30 秒為滴定終點。

## 4、計算

$$AV (\text{mg KOH} / \text{g oil}) = [56.108 \times (a - b) \times N \times F] / \omega$$

a: 油脂樣品 KOH 溶液消耗量 (mL)

b: 空白試驗 KOH 溶液消耗量 (mL)

N: KOH 的當量濃度

F: KOH 溶液的力價

$\omega$ : 油脂樣品的稱取量 (g)

## (三) 羰基價 (Carbonyl Value, CV)

### 1、原理

利用羰基化合物 (carbonyl compound) 與 2,4-dinitrophenyl hydrazine

作用生成衍生物 (2,4-dinitrophenyl hydrazone)，加鹼酒精溶液即呈黃色，進行比色定量。

## 2、藥品

### 4.3% trichloroacetic acid 苯溶液

取 4.3 g trichloroacetic acid (Sigma) 溶解於適量苯中，加苯定量至 100 mL。

### 0.05% 2,4-dinitrophenyl hydrazine 苯溶液

取 0.05 g 2,4-dinitrophenyl hydrazine (Alfa Aesar) 溶解於適量苯中，加苯定量至 100 mL。

### 4% KOH 絕對酒精溶液

取 4 g KOH 加於絕對酒精中，緩慢地加溫溶解，再定量至 100 mL (需新鮮配製)。

## 3、方法

稱取油脂樣品  $\omega$  克 (約 0.1 g) 置於試管中，將油脂溶解於苯溶液中，並以苯溶液作適當稀釋，至終體積為 1 mL，之後，加入 4.3% trichloroacetic acid 苯溶液 0.6 mL、0.05% 2,4-dinitrophenyl hydrazine 苯溶

液 1 mL，蓋上玻璃彈珠，60°C 水浴中反應 30 分鐘（在抽風櫥中進行）；待冷卻至室溫後加入新鮮配置的 4% KOH 絕對酒精溶液 2 mL，呈色 10 分鐘後，測 440 nm 波長的吸光值，另做空白試驗，以其相差為油脂樣品的吸光值<sup>(37)</sup>。

#### 4、計算

$$CV \text{ (meq/kg)} = (\Delta A / \omega) \times 23.42$$

$\Delta A$ :吸光值差

$\omega$ :油脂樣品稱取量 (mg)

#### (四) 過氧化物之含量 (Thiobarbituric acid, TBA)

##### 1、藥品

##### TBA試劑

取Thiobarbituric acid 0.67 g，加蒸餾水且於 50°C 水浴中加熱溶解，定量至 100mL，使用前加等量的冰醋酸，為TBA試劑

$$\text{TBA試劑的使用量 (mL)} = \text{樣品量 (g)} \times 4$$

##### 2、方法

秤取約 3g 油脂樣品，溶於 10mL 苯且移到分液漏斗中，加入適當的 TBA 溶劑，塞緊蓋子且劇烈震盪 2 分鐘。取出水層於

乾淨的試管中，且置於沸水浴中 30 分鐘，待冷卻倒室溫時，測 530nm 的吸光值。

### 3、計算

TBA value = 吸光度×100

## (五) 油脂維生素 E 分析

### 1、方法

取 0.05 g 油脂於有蓋玻璃試管中，加入 2mL 絕對酒精(含 1% pyrogallol，當天配製)，1 mL KOH (60% KOH) 混勻以 70℃ 水浴加熱 30 分鐘後冰浴，再加 1 mL 去離子水，4 mL 正己烷 (含 0.00125% BHT) 激烈震盪 1 分鐘後，離心 3000 rpm 10 分鐘，取上層有機層 3.5 mL 至入另一有蓋玻璃試管，剩餘下層再加 2.5 mL 正己烷，震盪 1 分鐘後，取上層 2.5mL 至入前述之同一有蓋玻璃試管，再加入 1mL 去離子水，震盪 30 秒鐘後，離心 3000 rpm 10 分鐘，加入 2mL 絕對酒精震盪 30 秒鐘後，離心 3000 rpm 10 分鐘，取上清 5mL 至於抽氣櫃中吹乾去除溶劑。最後加入 1.5mL 甲醇回溶，進行 HPLC 分析。

### 2、HPLC

HITACHI L-2130 pump

HITACHI L-2200 autosampler

HITACHI L-2480 FL detector

Column: Mightysil RP-18 GP 250 -4.6 (5 $\mu$ m) column

Flow rate = 1 mL/min

Injection volume = 20 $\mu$ L

Mobile phase = Pure methanol (J.T.Baker, LC 級)

螢光波長 Excitation 285 nm / Emission 330 nm

### 3、數據處理

採用 HITACHI EZChrom Elite software 3.1 版進行積分。

4、計算  $\alpha$ -TOH  $\epsilon_{292\text{nm}} = 3260 \text{ cm}^{-1}(\text{mol/L})^{-1}$ , MW=430.72

$\gamma$ -TOH  $\epsilon_{298\text{nm}} = 3260 \text{ cm}^{-1}(\text{mol/L})^{-1}$ , MW=416.7

## 十一、肝臟 mRNA 含量測定

### (一) 總 RNA 之抽取

#### 1、藥品

##### 0.1%DEPC-H<sub>2</sub>O

藥品	需要量
DEPC ； diethyl pyrocarbonate (Sigma)	1 mL
滅菌水	1000 mL

攪拌 over night ，滅菌後才能使用。

### 3 M Na • acetate pH 5.2

藥品	需要量
Na • acetate (Mw = 82.03)	49.22 g
2 次水	160 mL

以冰醋酸調整 pH 至 5.2，定量至 200mL 然後滅菌。

## 2、方法

以 TRIzol 試劑抽取 RNA。於均質管中放入冷凍組織及 10 倍組織體積之 TRIzol 試劑，以組織均質機均質之，肝臟組織直接取 1mL 均質液至 1.5mL 微量離心管，加入 0.2mL chloroform。震盪均勻後室溫靜置 2-3 分鐘，離心後上層為無色水層，下層為紅色之 phenol-chloroform 層，小心吸取上層液至新的微量離心管中，加入 0.5 倍體積 isopropanol 混勻，於室溫靜置 10 分鐘，以 12,000×g 於 4°C 下離心 15 分鐘，倒去上清液，沉澱之 pellet 加入 0.4mL DEPC-H<sub>2</sub>O saturated phenol，劇烈震盪 30 秒後，以 12,000×g 於 4°C 下離心 5 分鐘，取上層水層加入 0.4mL chloroform，劇烈震盪 30 秒後，以 12,000×g 於 4°C 下離心 5 分鐘，吸取上層液定體積，加入 0.1 倍體積之 3M sodium acetate (pH5.2) 與 2 倍體積之絕對酒精，混勻置於 -20°C 進行 RNA 沉澱，1 小時後，以 12,000×g 於 4°C 下離心 20 分鐘，倒去上清液，以 70% 酒精清洗 RNA 沉澱一次，於室溫下晾乾 RNA 後，以 20-30μL 之 DEPC-H<sub>2</sub>O 溶解 RNA。取少量溶液經適當稀釋後，測 260nm 波長之吸收值，以吸光值

1unit=40 $\mu$ g RNA/mL 公式計算 RNA 濃度。

## (二) RNA 電泳

### 1、藥品

#### 10X MOPS

藥品	需要量	最終濃度
MOPS (J.T.Baker)	41.2 g	0.2 M
Sodium acetate	6.56 g	0.08 M
0.5 M EDTA (pH 8)	20 mL	0.01 M

溶於 DEPC-H<sub>2</sub>O 調 pH 至 7.0，以 DEPC-H<sub>2</sub>O 定量至 1 L，滅菌後即可使用

#### Formaldehyde gel loading buffer (DNA or RNA gel loading dye — 6 x stock)

藥品	需要量
Glycerol	4.5 mL
1 mM EDTA (pH 8)	18 $\mu$ L
Bromophenol blue	22.5 mg
Xylene cyanol FF	22.5 mg

加 DEPC-H<sub>2</sub>O 定量至 15 mL，混勻後即可使用

### 鑄膠

藥品	需要量 (1 小片)	最終濃度
Agarose (amresco)	0.35 g	1%
DEPC-H <sub>2</sub> O	25.8 mL	
10 x MOPS (需避光)	3.5 mL	1 x
37% formaldehyde	6.25 mL	3.7%



## 2、方法

爲確定所抽取之 RNA 是否完整，先以甲醛膠體電泳進行 RNA 分析。首先製備 1% 洋菜膠體(agarose gel)，取約 10 $\mu$ g 的 RNA，加 2 $\mu$ g 10x MOPS，1 $\mu$ g 4.4M formaldehyde，10 $\mu$ L formamide 至微量離心管中，以 DEPC-H<sub>2</sub>O 將體積補至 20 $\mu$ L，70°C 下作用 10 分鐘後，冰浴三分鐘，再加入 3.3 $\mu$ L 6x loading buffer 及 1 $\mu$ L EtBr (1 $\mu$ g/mL)，混合均勻。以 1x MOPS 蓋過膠體，注入 RNA 樣品，以 150 伏特電壓進行電泳(盡可能再抽氣櫃中進行)。當色帶泳動至洋菜膠片的 2/3 時停止，取出膠體置於 UV table 上觀察，28s:18s=2:1 表示 RNA 完整。

### (三) 半定量逆轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)

以大鼠總 RNA 約 2 $\mu$ g 當作模板(template)，加入 1 $\mu$ g random hexamer (50ng/ $\mu$ L)，以 DEPC-H<sub>2</sub>O 補體積至 31 $\mu$ L，將此混合物於 70°C 加熱 10 分鐘後迅速冰浴，Spin down 依序加入 4 $\mu$ L 5x M-MLV RT buffer、4 $\mu$ L 2.5mM dNTP mixture、1 $\mu$ L (200U/ $\mu$ L) MMLV-RT (Promega, Madison, WI)，spin down，於室溫下反應 10 分鐘，42°C 下反應 50 分鐘，再以 95°C 下 5 分鐘將 RT 去活化以終止反應，最後置於 4°C 下 10 分鐘。此即完成了第一股 cDNA 之合成，凍於 -20°C 備用。

## PCR

PCR 條件為 95℃ 30 秒、55℃ 30 秒及 72℃ 30 秒，重複 30 cycle (引子如下表)。放大產物以 2% 洋菜膠進行電泳，以 UVP 影像系統 (USA) 進行分析定量。

Primer	Sequence(5' to 3')	Referance
PXR(F)	GATCAAGAGGAAGAAGAGGG	(54)
PXR(R)	ATCTGGTCCTCGATAGGCAG	
CYP3A1(F)	GATGTTGAAATCAATGGTGTGT	(55)
CYP3A1(R)	AAGTCTCCATAGACACAAAGG	
CYP3A2(F)	AGTAGTGACGATTCCAACATAT	(55)
CYP3A2(R)	TCAGAGGTATCTGTGTTTCCT	
GAPDH(F)	TCGGAGTCA ACGGATTTGGTCGTA	
GAPDH(R)	ATGGACTGTGGTCATGAGTCCTTC	

(F) : forward      (R) : reverse

## (四) DNA 電泳

### 1、藥品

#### 鑄膠 (2%)

藥品	需要量(1 大片)	需要量(1 小片)
Agarose (amresco)	0.7g	0.35g
50 x TAE	0.7 mL	0.35 mL
1µg/mL EtBr(需避光)	17.5µL	8.75 µL
總量 (水補至總量)	35mL	17.5mL

## 2、方法

首先製備 2% 洋菜膠體，經微波加熱溶解，待溫度降至 60°C 左右加入適當的 EtBr，混合均勻後倒入鑄膠器使冷卻凝膠。DNA 樣品加入 6x loading buffer 後，注入樣品槽，以 100 伏特進行電泳，直到色帶泳動至膠體的 2/3 時停止通電。將膠片取出置於 UV table 上觀察同時比對適當的 DNA marker 以評估 DNA 片段之長度。

## 十二、統計分析

實驗結果皆以平均值  $\pm$  標準差 (Mean $\pm$ SD) 表示，實驗一：以鄧肯式多變域測驗 (Duncan's Multiple Range Test) 檢定組間差異之顯著性，若數據沒有常態分布，則將數據轉為 log 值進行統計分析。實驗二：以 Student's T test 檢定兩組獨立樣本其組間差異之顯著性。統計分析以 SAS 軟體進行 ( $P < 0.05$  為具顯著差異)。

### 第三章 結果

#### 第一節 實驗一：以二倍維生素 E 補充飼料，觀察炸油對維生素 E 代謝機制之影響

##### 一、油脂分析 (表 1、表 2)

表 1 為新鮮大豆油、脫除維生素 E 之新鮮大豆油 (利用活性碳與正己烷將維生素 E 去除) 及大豆油經  $205 \pm 5^{\circ}\text{C}$  24小時油炸麵片的油脂品質變化。由結果得知，炸油的酸價、TBA 值、羰基化合物及共軛雙烯 (conjugated diene) 均較新鮮大豆油與脫除維生素 E 之新鮮大豆油高，表示在油炸過程中確實造成油脂的氧化以及水解反應。

表 2 為油脂維生素 E 含量，脫除維生素 E 之新鮮大豆油其  $\alpha$ -TOH 含量為  $14 \mu\text{g/g oil}$ 、 $\gamma$ -TOH 含量為  $129 \mu\text{g/g oil}$ ，炸油  $\alpha$ -TOH 含量為  $26 \mu\text{g/g oil}$ 、 $\gamma$ -TOH 含量為  $43 \mu\text{g/g oil}$ 。若將  $\gamma$ -與  $\alpha$ -相除，脫除維生素 E 之新鮮大豆油  $\gamma$ -TOH 為  $\alpha$ -TOH 的 9.2倍、炸油  $\gamma$ -TOH 為  $\alpha$ -TOH 的 1.7倍。結果顯示上述油脂經處理後  $\alpha$ -TOH 已降低許多。

##### 二、體重變化 (表 4)

本實驗採用平均體重  $80.16 \text{ g}$  之 Wistar 離乳雄性大鼠，實驗的第一週 FO 組和 FOE 組大鼠有腹瀉的現象。各組大鼠之初體重無差異 (表 4)，但經飼料餵食之後，發現大鼠終體重及體重增加量受到油脂油炸所影響；炸油組 (FO 和 FOE) 大鼠之終體重及體重增加量皆顯著低於

新鮮油組 ( $P < 0.05$ ) ; 炸油組終體重降低 11% , 體重增加量降低 16% ( $P < 0.05$ ) 。

### 三、飼料攝取與利用效率 (表 4)

飼料餵食期間, 各組大鼠之每日攝食量並無顯著差異, 但飼料利用效率卻顯著受到炸油餵食所影響; 炸油組 (FO 和 FOE) 之飼料利用效率皆顯著低於新鮮油組 ( $P < 0.05$ ) , 約降低了 8% ( $P < 0.05$ ) 。

### 四、組織重量與相對組織重量 (表5-1、表5-2)

表 5-1 為大鼠組織重量, 炸油組 (FO 和 FOE) 肝臟重量顯著高於新鮮油組 (CO) ( $P < 0.05$ ) 。脾臟是 CO 組顯著高於 FO 組( $P < 0.05$ ) , 而其他組織間無顯著差異。

表 5-2 為相對組織重量, 炸油組大鼠之肝臟相對重量皆顯著高於其新鮮油組, 增加了 41% ( $P < 0.05$ ) , 出現了肝臟腫大的現象。其它組織, 如心臟、肺臟、脾臟、腎臟、副睪脂肪、及腹腔脂肪之相對重量, 各組間皆無明顯差異。睪丸及腦則以炸油組顯著高於新鮮油組 ( $P < 0.05$ ) 。

### 五、血漿白蛋白、脂質含量 (表6)

大鼠血漿白蛋白含量、血漿三酸甘油酯及膽固醇含量各組間並無顯著差異。表示血漿白蛋白、脂質含量並未受炸油所影響。

## 六、血漿、肝臟維生素 E 與 TBARS 含量(表 7)

血漿  $\alpha$ -TOH 含量以炸油組顯著低於控制組 ( $P < 0.05$ )，FOE 組其血漿  $\alpha$ -TOH 含量有高於 FO 組的趨勢 ( $P > 0.05$ )。肝臟  $\alpha$ -TOH 含量以 FO 組顯著最低 FOE 組次之 ( $P < 0.05$ )。因炸油組有肝臟腫大之情形，因此另以總肝  $\alpha$ -TOH 含量來表示，結果顯示與每克肝臟  $\alpha$ -TOH 含量之結果一致。FO 組總肝  $\alpha$ -TOH 只有新鮮油的 31%，而 FOE 組  $\alpha$ -TOH 只有新鮮油的 46%；FO 組血漿維生素 E 含量為新鮮油組的 45%，FOE 組則為 CO 組的 59%。

將  $\gamma$ -TOH 含量除以  $\alpha$ -TOH 所得之比值，於血漿跟肝臟的結果是一致的皆約為 6%。而炸油組血漿和肝臟  $\gamma$ -TOH 含量很少，幾乎測不到因此表 7 並無此資料。

肝臟 TBARS 含量炸油組顯著高於控制組 ( $P < 0.05$ )，FO 組 TBARS 含量為 CO 組的 1.36 倍，而 FOE 組則為 CO 組的 1.28 倍。在炸油中補充二倍維生素 E 並未能降低肝臟 TBARS 的含量。

## 七、尿液肌酸酐、 $\alpha$ -CEHC 含量 (表 8 、表 9)

大鼠尿液肌酸酐含量主要用於校正  $\alpha$ -CEHC 含量之用，在各組間並無顯著差異。

尿液  $\alpha$ -CEHC 含量則以 FO 組顯著低於其它兩組 ( $P$

$<0.05$ ), FO 組只有 CO 組的 55%; 以  $\alpha$ -CEHC 總量除以體重(排除炸油鼠體重較輕的問題)來表示之後, 結果亦同。

FOE 組尿液  $\alpha$ -CEHC 含量與 CO 組相當, 並不如預期會因炸油餵食而增加。

#### 八、肝臟 CYP 蛋白質含量: CYP4A1(圖 1)、CYP3A1、CYP3A2 (圖 2)

肝臟 CYP4A1 蛋白質之表現量, 炸油組顯著高於新鮮油組, 以此說明炸油之效應。肝臟微粒體 CYP3A1 蛋白質之表現量在各組間並無顯著差異。肝臟 CYP3A2 蛋白質之表現量, 以 FO 組顯著高於 CO 組 ( $P<0.05$ ), 但與 FOE 組之間並無顯著差異, 而 FOE 組和 CO 組之間亦無顯著差異。

#### 九、肝臟 $\alpha$ -TTP 蛋白質含量 (圖 3)

肝臟細胞質  $\alpha$ -TTP 蛋白質之表現量在各組間並無顯著差異。表示炸油組血漿維生素 E 的下降並非透過降低  $\alpha$ -TTP 蛋白質表現量所造成。

#### 十、肝臟 MDR1 蛋白質含量 (圖 4)

肝臟微粒體 MDR1 蛋白質之表現量在各組間並無顯著差異。炸油並未透過誘導 MDR1 蛋白質表現量而加速體內維生

素 E 自膽汁排出。

## 十一、肝臟 CAT、SOD 和 GPx 蛋白質含量 (圖 5、圖 6)

肝臟細胞質 CAT、SOD 和 GPx 蛋白質含量，其中受炸油所影響之抗氧化酵素蛋白質為 CAT，兩組炸油組皆顯著高於控制組 ( $P < 0.05$ )，且高達新鮮油組約三倍。

## 第二節 實驗二：以注射方式給予維生素 E，觀察炸油對維生素 E 代謝機制之影響

### 一、油脂分析(表 1、表 2)

油脂品質變化 (表 1) 結果與實驗一有相同趨勢。表 2 為油脂維生素 E 含量，脫除維生素 E 之新鮮大豆油其  $\alpha$ -TOH 含量為  $4.8 \mu\text{g/g oil}$ 、 $\gamma$ -TOH 含量為  $175 \mu\text{g/g oil}$ ，炸油  $\alpha$ -TOH 含量為  $19 \mu\text{g/g oil}$ 、 $\gamma$ -TOH 含量為  $54 \mu\text{g/g oil}$ 。脫除維生素 E 之新鮮大豆油  $\gamma$ -TOH 為  $\alpha$ -TOH 的 36 倍、炸油  $\gamma$ -TOH 為  $\alpha$ -TOH 的 2.8 倍。

### 二、體重變化(表 11)

實驗二採用平均體重 72.6g 之 Wistar 離乳雄性大鼠，餵食炸油 (O 組) 期間與實驗一一樣在第一週有腹瀉的現象。表 11 指出各組大鼠之初體重無差異，經過 42 天試驗飼料餵食之後，發現大鼠終體重及體重增加量不受到油脂油炸的影響。



### 三、飼料利用效率 (表 11)

由表 11 可知，大鼠之總攝食量、飼料利用效率，在各組間皆無顯著差異。實驗二之炸油組飼料利用效率並沒有比新鮮油組低的情形。

### 四、組織重量與相對組織重量 (表12-1、表12-2)

大鼠組織重量及相對組織重量，在各組間皆無顯著差異。實驗二之炸油組老鼠並無肝腫大的現象，結果與實驗一不同。

### 五、血漿白蛋白、脂質含量 (表13)

大鼠血漿白蛋白、三酸甘油酯及膽固醇含量，各組間並無顯著差異。此結果與實驗一相同。

### 六、血漿、肝臟維生素 E、TBARS 含量 (表 14)

實驗二血漿  $\alpha$ -TOH 含量兩組間並無顯著差異，結果與實驗一有所不同，而油脂維生素 E ( $\alpha$ -TOH、 $\gamma$ -TOH) 含量可能為主要之影響因素。肝臟  $\alpha$ -TOH 含量炸油組顯著低於新鮮油組 ( $P < 0.05$ )，炸油組肝臟  $\alpha$ -TOH 為新鮮油的 25%，此結果與實驗一相似 (FO 組肝臟  $\alpha$ -TOH 只有新鮮油的 25%)。實驗二以注射方式給予維生素 E，由結果得知炸油組體內維生素 E 仍較新鮮油組低。

$\gamma$ -TOH 除以  $\alpha$ -TOH 所得之比值，血漿和肝臟的結果是一致的皆約為 49 %。實驗一與實驗二雖然算出  $\gamma$ -TOH /  $\alpha$ -TOH 的比值相差很大 (實

驗一約6%)，但兩實驗皆指出血漿的  $\gamma$ -TOH / $\alpha$ -TOH 比值與肝臟是一致的。

肝臟 TBARS 含量炸油組顯著高於新鮮油組 ( $P < 0.05$ )，O 組為 C 組的 1.26 倍。與實驗一結果相同，兩者皆指出炸油促進了脂質過氧化情形。

#### 七、尿液肌酸酐、 $\alpha$ -CEHC 含量 (表 15、表 16)

大鼠尿液肌酸酐含量在各組間並無顯著差異。尿液  $\alpha$ -CEHC 含量，結果則與實驗一相似，但由於實驗二新鮮油組個體差異太大導致並無統計差異。每天的  $\alpha$ -CEHC 含量 O 組為 C 組的 53%，用肌酸酐校正後 O 組為 C 組的 50%，而若排除體重的因素 O 組為 C 組的 58%。所以，以注射的方式給予維生素 E，其尿液  $\alpha$ -CEHC 含量的排出情形與實驗一以餵食的方式給予維生素 E 結果相似。

#### 八、肝臟 CYP 蛋白質含量：CYP4A1(圖 1)、CYP3A1、 CYP3A2 (圖 7)

為確認兩實驗的炸油效應是否一致，因此測定 CYP4A1，其顯著受炸油所誘導，此結果與實驗一相符。肝臟微粒體 CYP3A1 與 CYP3A2 蛋白質含量之表現在各組間並

無顯著差異。

#### 九、肝臟 CAT、SOD 和 GPx 蛋白質含量(圖 8、圖 9)

肝臟細胞質 CAT、SOD 和 GPx 蛋白質含量，其中受炸油影響之抗氧化酵素蛋白質為 CAT，炸油組皆顯著高於控制組 ( $P < 0.05$ )，此結果與實驗一相同。

#### 十、肝臟 PXR、CYP3A1 及 CYP3A2 mRNA 含量(圖 10)

炸油飲食顯著誘發肝臟 PXR mRNA ( $P < 0.05$ ) 的表現量。PXR 之下游基因 CYP3A1、CYP3A2 其 mRNA 之表現量並未受到炸油所誘導。

## 第四章 討論

### 一、油脂品質與動物生長

炸油餵食常會影響動物飼料效率與終體重<sup>(3, 40)</sup>，本論文在實驗一亦觀察到相同的結果，亦即炸油組大鼠飼料攝取量於組間無顯著差異，但飼料利用效率與體重增加量皆較新鮮油組低，此原因可能是由於炸油組對油脂吸收率較低造成生長較為緩慢。然而在實驗二的結果發現，炸油組飼料攝取、飼料利用效率與終體重雖然皆有較新鮮油組低的趨勢( $P > 0.05$ )，但在兩組間並沒有顯著差異。從油脂（炸油、脫除維生素 E 大豆油與新鮮大豆油）之酸價、TBA 值、羰基化合物及共軛雙烯 (conjugated diene) 含量的結果指出，由於兩個實驗所採用的兩批油脂在油脂品質指標的數值是相當的，且與前人研究結果相符<sup>(40)</sup>，所以兩實驗所觀察到動物生長狀況不一致並非是油脂品質不一致所造成的。

在過去一些有關炸油之相關研究中也都顯示，餵食炸油會有肝、腎腫大的情形<sup>(2)</sup>。而造成肝臟腫大的原因，一般認為是肝細胞中過氧化體增生及過氧化體、微粒體酵素增加所造成的。餵食炸油鼠肝微粒體內 cytochrome P450 含量是增加的<sup>(56)</sup>。實驗一在兩炸油組(FO 和 FOE) 皆觀察到大鼠有肝

臟腫大情形 ( $P < 0.05$ )；然而實驗二卻未見有肝臟腫大之情形，因此使人懷疑實驗二是否未有炸油餵食之效應出現。由於 CYP4A 是炸油所誘導之最主要的酵素<sup>(37, 40)</sup>，因此我們分析了兩個實驗的肝臟微粒體 CYP4A 蛋白質之誘導情形，結果指出兩個實驗皆有顯著的 CYP4A 誘導表現量，且實驗二的炸油組誘導量並未較實驗一弱。

雖然許多研究皆發現炸油會降低肝臟三酸甘油酯及膽固醇含量，可能原因包含炸油抑制脂質合成能力<sup>(57)</sup>、飲食脂肪吸收率下降<sup>(2)</sup>、趙氏則推測炸油經由增加 ACO (Acyl-CoA oxidase) 與 CYP4A 表現，加速  $\beta$ -及  $\omega$ -氧化代謝<sup>(40)</sup>。但是，趙氏論文指出大鼠餵食炸油其血漿三酸甘油酯及膽固醇並沒有顯著差異<sup>(40)</sup>，此點與本論文結果相符，我們在兩個實驗中皆發現血漿三酸甘油酯含量雖以炸油組有較低之趨勢，但是各組間並無顯著差異。

## 二、炸油飲食對大鼠肝臟維生素 E 代謝機制之影響

劉氏指出，老鼠經炸油餵食六週後各組織中之  $\alpha$ -TOH 含量均顯著低於新鮮油組<sup>(39)</sup>。本論文即根據其研究結果來進一步探討炸油對動物體內維生素 E 之影響，兩個實驗結果皆指出肝臟  $\alpha$ -TOH 含量顯著以炸油

組較新鮮油組為低。然而炸油顯著降低血漿  $\alpha$ -TOH 含量的情形則僅見於實驗一，實驗二的血漿  $\alpha$ -TOH 含量並未因炸油餵食而有低於新鮮油組之現象，而且新鮮油組血漿中  $\gamma$ -TOH 含量比例（占  $\alpha$ -TOH 含量的 48%）高於實驗一新鮮油血漿中  $\gamma$ -TOH 含量比例（占  $\alpha$ -TOH 含量的 6%）約達 8 倍之多。推其原因，可能與兩實驗所採用之飼料新鮮油脂中  $\alpha$ -TOH 與  $\gamma$ -TOH 含量比例不同有關。

實驗二的飼料為不含維生素 E 之飼料，唯一提供飼料維生素 E 來源為油脂。從實驗用油中的維生素 E 種類與含量來看，實驗二所使用之脫除維生素 E 之新鮮大豆油其  $\gamma$ -TOH 濃度約為  $\alpha$ -TOH 的 36.6 倍，遠比實驗一（ $\gamma$ -TOH 濃度約為  $\alpha$ -TOH 的 9.2 倍）高出 4 倍之多。雖然實驗二所製備的脫除維生素 E 之新鮮大豆油  $\alpha$ -TOH 只有實驗一的 34%，但是卻未能有效去除  $\gamma$ -TOH，因此造成實驗二的血漿  $\gamma$ -TOH 含量偏高。雖然，此實驗亦有腹腔注射方式來提供  $\alpha$ -TOH，但是因為每兩週才施打一次，所以在血漿中的分布情形不如每日飼料中所提供的維生素 E 更具影響力。

至於炸油飲食是如何透過影響肝臟維生素 E 代謝機制進而降低維生素 E 營養狀況是本實驗所要探討的，其機制包括：(1) 維生素 E 代謝機制、(2) 維生素 E 排泄機制、(3) 氧化消耗機制。

#### (1) 維生素 E 代謝機制

本實驗首先想探討的是炸油是否增加維生素 E 代謝酵素的表現，才加速體內維生素 E 之代謝。Liu 和 Huang 以放射性維生素 E 注射大鼠的研究指出，炸油會加速維生素 E 之汰換率，且發現尿液之放射性維生素 E 排出量增加<sup>(46)</sup>，故推測炸油可能促進肝臟維生素 E 代謝率而使尿液中維生素 E 代謝產物增加進而降低維生素 E 營養狀況。

目前認為  $\alpha$ -CEHC 是  $\alpha$ -TOH 在肝臟中生成最主要的代謝產物，所以先觀察尿液中  $\alpha$ -CEHC 排出量是否受炸油餵食所影響。由於炸油餵食會使維生素 E 之吸收率降為約新鮮油組的 60% 左右<sup>(46)</sup>，所以進入體內的維生素 E 量勢必會低於新鮮油組，而  $\alpha$ -CEHC 之排出量又與維生素 E 量呈正相關<sup>(58-60)</sup>，所以在實驗一特別設計添加兩倍維生素 E 的 FOE 組，假設 FOE 組與 CO 組進入體內的維生素 E 量是相當的，因此可藉由兩組  $\alpha$ -CEHC 排出量來觀察炸油之效應。然而 FOE 組尿液  $\alpha$ -CEHC 排出量並未顯著高於 CO 組；由於 FOE 組體型較小，所以以體重進行校正後用每克體重來表示尿液  $\alpha$ -CEHC 排出量時，兩組間亦無顯著差異，此點說明  $\alpha$ -CEHC 排出量與進入體內的維生素 E 含量相當，且並未因炸油之餵食而有排出增加之現象。至於 Liu 和 Huang 1996 放射性實驗所觀察到

炸油組尿中放射性增加之原因，有可能是因為維生素 E 在保護組織以避免脂質過氧化過程所產生的氧化代謝產物增加所致，如Simmon's Metabolite<sup>(46)</sup>。

在實驗二改以注射方式提供大鼠  $\alpha$ -TOH，結果炸油組尿液  $\alpha$ -CEHC 排出量則低於新鮮油組，此點與實驗一結果並不一致(實驗二並無顯著差異)，推其原因如下：可能是在實驗前沒有先將老鼠體內之維生素 E 耗盡，所以炸油組的體內維生素 E 持續消耗，而新鮮油組則持續自飼料油脂中的維生素 E 吸收累積，造成兩組體內維生素 E 含量出現更大的差距，如前所述， $\alpha$ -CEHC之排出量與維生素 E 攝入量成正相關<sup>(58-60)</sup>，因此造成目前所觀察到的炸油組有較低的尿液  $\alpha$ -CEHC 排出量。另一個原因，可能是  $\gamma$ -CEHC 排出量增加所致，有研究指出  $\gamma$ -CEHC 較 $\alpha$ -CEHC 容易形成並排出體外<sup>(61)</sup>，這可能與  $\alpha$ -TTP 之專一性有關，大部份之 $\alpha$ -TOH 皆被保留下來進入血液中，其他型式的 TOH 則多被代謝成為 CEHC 由尿液排除。

研究指出，CYP3A 與 CYP4F 酵素可能參與維生素E之代謝，亦即與  $\alpha$ -CEHC 此代謝產物之生成相關<sup>(62)</sup>。在實驗一雖然觀察到 CYP3A2有顯著被炸油所誘導，但並未造成  $\alpha$ -CEHC排出增加。另外CYP3A1則未受炸油所顯著誘導，有



文獻指出CYP3A1是誘導型，而CYP3A2則是constitutive 型<sup>(63)</sup>，似乎前者應較容易受到外來物質所誘導，但是本實驗的觀察則是相反的，其原因則不得而知。由於CYP3A是透過細胞核內PXR所調控<sup>(28)</sup>，所以我們在實驗二以RT-PCR測定PXR mRNA之表現，發現確實有顯著受炸油誘導之情形，但是CYP3A蛋白質及 mRNA 表現量則不受炸油所影響，此點與實驗一有所不同，是否炸油可透過促進PXR mRNA之表現進而調節其他蛋白質之表現，而 CYP3A 剛好並非是顯著受其調控之蛋白質。畢竟在本論文的兩個實驗中因為維生素E給予方式之不同亦造成了肝臟重量以及血漿維生素 E 量、尿液 $\alpha$ -CEHC 排出量不完全一致之結果，所以 CYP3A2 誘導狀況之不一致性或許與上述幾個指標以及其他因素有關。

炸油會降低血漿維生素 E 濃度<sup>(42)</sup>，而血漿維生素 E 之恆定被認為是由肝臟  $\alpha$ -TTP 所調控<sup>(64)</sup>。炸油餵食不但會促進肝臟脂質過氧化<sup>(2, 42)</sup>且亦觀察到會造成肝細胞損傷<sup>(65)</sup>，由於文獻指出  $\alpha$ -TTP 會受氧化壓力所影響<sup>(47, 48, 66)</sup>，因此推測炸油亦可能透過影響  $\alpha$ -TTP 表現，進而影響血漿維生素E濃度。本實驗雖然觀察到炸油組確實有較高的脂質過氧化情形，但是肝臟  $\alpha$ -TTP 蛋白質之表現量並未受影響。老鼠肝臟

$\alpha$ -TTP 蛋白質及 mRNA 在蛋白質營養不良時表現量會顯著較低<sup>(52)</sup>，若以血漿白蛋白作為蛋白質營養指標，本實驗結果得知，炸油鼠並無蛋白質營養不良的情形，所以炸油鼠血漿維生素 E 下降可能不是透過抑制  $\alpha$ -TTP 蛋白質的表現所造成。

## (2) 維生素E排泄機制

Liu 和 Huang (1996)指出將餵食炸油的大鼠注射放射性標定維生素 E，糞便中放射性維生素 E 排出量高於新鮮油組<sup>(46)</sup>。此點說明炸油餵食會促進維生素 E 自糞便排出之量。自糞便排出的維生素 E 包括未吸收的、自膽汁排出的以及隨腸細胞脫落的。由於上述實驗是以注射方式進行，所以排除了吸收不良之可能原因。因此我們假設炸油會透過影響膽汁排泄相關蛋白質進而增加維生素 E 自膽汁排入糞便中。膽汁的排出與 ABC transporter protein (例如MDR1) 有關，因為它們參與膜間物質之轉運。有文獻指出以高劑量維生素 E 注射老鼠，會顯著增加肝臟 MDR1 蛋白質的表現<sup>(67)</sup>，因此推測 MDR1之表現應與維生素 E 之排泄有關。然而在實驗一結果顯示MDR1蛋白質並未受炸油所影響，表示炸油若會促進維生

素 E 自膽汁排泄應與MDR1此蛋白質無直接相關。除了MDR1能將外來物經由膽汁排出體外，另外還有許多個transporter與膽汁運送有關，其中以蛋白質MRP2在肝臟的表現量最多。實驗二已經證明肝臟 PXR mRNA 會顯著受炸油餵食所誘導的。而MRP2、MDR1等蛋白質皆會受PXR所調控<sup>(68)</sup>，所以我們並不排除炸油可能透過影響MRP2或其他蛋白質而加速維生素E自膽汁的排出。

### (3)氧化消耗機制

許多文獻指出，炸油餵食會增加脂質過氧化的發生<sup>(42)</sup>，本實驗觀察亦不例外。因此維生素 E 在抗氧化過程中會被大量消耗，此亦為炸油造成維生素 E 營養狀況下降的原因之一。在抗氧化酵素方面，Narasimhamurthy (1999) 指出，長期餵食大鼠炸油飲食，肝臟抗氧化酵素 CAT 的活性上升、SOD 和 GPX 活性會下降<sup>(69)</sup>。趙氏 (2002) 飼養大鼠炸油飲食六週，不論是 5% 或 20%之炸油鼠，其CAT活性皆是顯著高於新鮮油組的<sup>(40)</sup>。本實驗以Western blot 測定肝臟抗氧化酵素蛋白質之表現。兩個實驗之結果皆顯示 CAT 蛋白質的表現顯著受到炸油所誘導，與前人所測定之 CAT 活性<sup>(40, 43)</sup>的表現一致。CAT 是過氧化體中含量豐富的酵素其表現增加可表示過氧化體有增生之情形。研究指出炸油會誘導 PPAR 之表現<sup>(40)</sup>，因此 CAT 受炸油所

誘導有可能是與 PPAR $\alpha$  活化有關<sup>(70)</sup>，而不單是氧化壓力所造成的補償效應。SOD 和 GPx 都是細胞質中重要的抗氧化酵素，其中GPx 基因具有 oxygen responsive element，所以易受氧化壓力所影響<sup>(71)</sup>，劉氏論文指出 Se-GPx 活性會受炸油餵食所下降<sup>(39)</sup> 而本實驗則發現 GPx 蛋白質表現量並未受炸油所影響，兩種調控層次之不一致有可能是炸油本身的某些成分抑制或破壞了GPx蛋白質的活化或結構所致。

## 第五章 結論

本實驗目的在於探討炸油飲食對大鼠肝臟維生素 E 代謝相關蛋白質之影響。經上述二個實驗可得以下結果：

- 1、炸油為降低肝臟維生素 E 含量，並促進脂質過氧化情形。
- 2、炸油飲食並未增加尿液中維生素 E 代謝產物  $\alpha$ -CEHC 之排出。
- 3、炸油飲食會誘導抗氧化酵素 CAT 以及 CYP3A2 蛋白質的表現量，但對於肝臟  $\alpha$ -TTP 及 MDR 之蛋白質則未有明顯影響。
- 4、炸油飲食會誘導 PXR mRNA 表現，此為本論文之重要發現。

綜上所述，炸油餵食會顯著誘導肝臟 PXR mRNA 之表現量，雖然炸油會顯著誘導 CYP3A 蛋白質含量，但是並未促進尿中  $\alpha$ -CEHC 之排出量，而 MDR 與  $\alpha$ -TTP 蛋白質則不受炸油餵食所影響。



## 參考文獻

1. Soriguer F, Rojo-Martinez G, Dobarganes MC, et al. Hypertension is related to the degradation of dietary frying oils. *Am J Clin Nutr.* 2003;78(6):1092-1097.
2. Huang CJ. Effects of Deteriorated Frying Oil and Dietary Protein Levels on Liver Microsomal Enzymes in Rats. *JAOCs.* 1988;65(11):1796-1803.
3. 湯雅理。炸油餵食對老鼠肝中維生素 A 含量及肝微粒體 *cytochrome P-450* 酵素活性之影響。國立台灣大學農業化學研究所碩士論文。1994。
4. Burton GW, Ingold KU. Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. *Ann N Y Acad Sci.* 1989;570:7-22.
5. Cheeke PR, Oldfield JE. Influence of selenium on the absorption, excretion, and plasma levels of tritiumlabeled vitamin E in the rat. *Can. J. Anim. Sci.* 1969;49:169-179.
6. Kelleher J, Losowsky MS. The absorption of alpha-tocopherol in man. *Br J Nutr.* 1970;24(4):1033-1047.
7. Herrera E, Barbas C. Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *J Physiol Biochem.* 2001;57 (1):43-56.
8. MacMahon MT, Neale G. The absorption of alpha-tocopherol in control

- subjects and in patients with intestinal malabsorption. *Clin Sci*. 1970;38(2):197-210.
9. Mustacich DJ, Shields J, Horton RA, Brown MK, Reed DJ. Biliary secretion of alpha-tocopherol and the role of the mdrl P-glycoprotein in rats and mice. *Arch Biochem Biophys*. 1998;350(2):183-192.
  10. Traber MG, Kayden HJ. Preferential incorporation of alpha-tocopherol vs gamma-tocopherol in human lipoproteins. *Am J Clin Nutr*. 1989;49(3):517-526.
  11. Combs GF, Jr. Emerging relationships of vitamins and cancer risks. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 1998;1(6):519-523.
  12. Machlin LJ, Keating J, Nelson J, Brin M, Filipski R, Miller ON. Availability of adipose tissue tocopherol in the guinea pig. *J Nutr*. 1979;109(1):105-109.
  13. Traber MG, Burton GW, Hughes L, et al. Discrimination between forms of vitamin E by humans with and without genetic abnormalities of lipoprotein metabolism. *J Lipid Res*. 1992;33(8):1171-1182.
  14. Catignani GL. An alpha-tocopherol binding protein in rat liver cytoplasm. *Biochem Biophys Res Commun*. 1975;67(1):66-72.
  15. Hosomi A, Arita M, Sato Y, et al. Affinity for alpha-tocopherol transfer



- protein as a determinant of the biological activities of vitamin E analogs. *FEBS Lett.* 1997;409(1):105-108.
16. Dimitrov NV, Meyer C, Gilliland D, Ruppenthal M, Chenoweth W, Malone W. Plasma tocopherol concentrations in response to supplemental vitamin E. *Am J Clin Nutr.* 1991;53(3):723-729.
17. Traber MG, Ramakrishnan R, Kayden HJ. Human plasma vitamin E kinetics demonstrate rapid recycling of plasma RRR-alpha-tocopherol. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(21):10005-10008.
18. Maurice E. Shils, Moshe Shike, A.Catharine Ross, Benjamin Caballero, Robert J. Cousins. *Modern Nutrition in Health and Disease*. Tenth ed: Lippincott Williams & Wilkins.
19. Wu JH, Croft KD. Vitamin E metabolism. *Mol Aspects Med.* 2007;28(5-6):437-452.
20. Nebert DW, Nelson DR, Coon MJ, et al. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol.* 1991;10(1):1-14.
21. Sontag TJ, Parker RS. Cytochrome P450 omega-hydroxylase pathway of tocopherol catabolism. Novel mechanism of regulation of vitamin E status. *J Biol Chem.* 2002;277(28):25290-25296.

22. Ikeda S, Tohyama T, Yamashita K. Dietary sesame seed and its lignans inhibit 2,7,8-trimethyl- 2(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman excretion into urine of rats fed gamma-tocopherol. *J Nutr*. 2002;132(5):961-966.
23. Birringer M, Drozan D, Brigelius-Flohe R. Tocopherols are metabolized in HepG2 cells by side chain omega-oxidation and consecutive beta-oxidation. *Free Radic Biol Med*. 2001;31(2):226-232.
24. Borst P, Elferink RO. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem*. 2002;71:537-592.
25. Christians U. Transport proteins and intestinal metabolism: P-glycoprotein and cytochrome P4503A. *Ther Drug Monit*. 2004;26(2):104-106.
26. Xie W, Uppal H, Saini SP, et al. Orphan nuclear receptor-mediated xenobiotic regulation in drug metabolism. *Drug Discov Today*. 2004;9(10):442-449.
27. Waxman DJ. P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch Biochem Biophys*. 1999;369(1):11-23.
28. Kliewer SA. The nuclear pregnane X receptor regulates xenobiotic detoxification. *J Nutr*. 2003;133(7 Suppl):2444S-2447S.

29. Staudinger JL, Goodwin B, Jones SA, et al. The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(6):3369-3374.
30. Synold TW, Dussault I, Forman BM. The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nat Med*. 2001;7(5):584-590.
31. 謝明哲。營養生化學。華騰出版社。2004。
32. Artman NR. The chemical and biological properties of heated and oxidized fats. *Adv Lipid Res*. 1969;7:245-330.
33. Kanazawa K, Kanazawa E, Nataka M. Uptake of secondary autoxidation products of linoleic acid by the rat. *Lipids*. 1985;20(7):412-419.
34. Warner K, Neff WE, Eller FJ. Enhancing quality and oxidative stability of aged fried food with gamma-tocopherol. *J Agric Food Chem*. 2003;51(3):623-627.
35. Raju NV, Rao MN, Rajagopalan R. Nutritive value of heated vegetable oils. *J Am Oil Chem Soc*. 1965;42(9):774-776.
36. Chao P-M. The Up-Regulation of Hepatic Acyl-CoA Oxidase and Cytochrome P450 4A1 mRNA Expression by Dietary Oxidized Frying Oil Is Comparable Between Male and Female Rats. *Lipids*.

2004;39(3):233-238.

37. 李亦臻。比較黃豆油、芥花油及牛脂油炸後對大鼠肝臟中 *PPAR $\alpha$*  下游基因及 *Cytochrome P-450* 同功酶表現之影響效應。國立台灣大學農業化學研究所碩士論文。2001。
38. Sulzle A, Hirche F, Eder K. Thermally oxidized dietary fat upregulates the expression of target genes of *PPAR alpha* in rat liver. *J Nutr.* 2004;134(6):1375-1383.
39. 劉珍芳。炸油餵食對老鼠體內維生素 *E* 代謝的影響。國立台灣大學農業化學研究所博士論文。1993。
40. 趙蓓敏。氧化炸油活化 *PPAR $\alpha$*  之探討。國立台灣大學農業化學研究所博士論文。2002。
41. Sheehy PJ, Morrissey PA, Flynn A. Consumption of thermally-oxidized sunflower oil by chicks reduces alpha-tocopherol status and increases susceptibility of tissues to lipid oxidation. *Br J Nutr.* 1994;71(1):53-65.
42. Liu JF, Huang CJ. Tissue alpha-tocopherol retention in male rats is compromised by feeding diets containing oxidized frying oil. *J Nutr.* 1995;125(12):3071-3080.
43. 黃惠玲。膳食油脂與 *Clofibrate* 改變大鼠鐵代謝及其相關蛋白質表現。國立台灣大學農業化學研究所博士論文。2001。

44. Narasimhamurthy K, Raina PL. Long term feeding effects of heated and fried oils on lipids and lipoproteins in rats. *Mol Cell Biochem.* 1999;195(1-2):143-153.
45. Izaki Y, Yoshikawa S, Uchiyama M. Effect of ingestion of thermally oxidized frying oil on peroxidative criteria in rats. *Lipids.* 1984;19(5):324-331.
46. Liu JF, Huang CJ. Dietary oxidized frying oil enhances tissue alpha-tocopherol depletion and radioisotope tracer excretion in vitamin E-deficient rats. *J Nutr.* 1996;126(9):2227-2235.
47. Ban R, Takitani K, Kim HS, et al. alpha-Tocopherol transfer protein expression in rat liver exposed to hyperoxia. *Free Radic Res.* 2002;36(9):933-938.
48. Takenaka A, Kita A, Ikeya M, Arai H, Igarashi K. Galactosamine-induced acute liver injury in rats reduces hepatic alpha-tocopherol transfer protein production. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2007;53(4):366-371.
49. Mohri K, Dohmoto C, Ikesu H, Igarashi O. A simple elimination method of vitamin E from vegetable and fish oils for the preparation of vitamin E deficient diet. *Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science (Japan).* 1983;36(2):122-124.

50. 蕭慧美。蛋白質營養不良影響老鼠組織維生素 E 含量之機制探討。國立台灣大學農業化學研究所博士論文。1998。
51. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-275.
52. Shaw HM, Huang C. Liver alpha-tocopherol transfer protein and its mRNA are differentially altered by dietary vitamin E deficiency and protein insufficiency in rats. *J Nutr.* 1998;128(12):2348-2354.
53. Tatum VL, Changchit C, Chow CK. Measurement of malondialdehyde by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Lipids.* 1990;25(4):226-229.
54. Swales K, Plant N, Ayrton A, Hood S, Gibson G. Relative receptor expression is a determinant in xenobiotic-mediated CYP3A induction in rat and human cells. *Xenobiotica.* 2003;33(7):703-716.
55. Konno Y, Sekimoto M, Nemoto K, Degawa M. Sex difference in induction of hepatic CYP2B and CYP3A subfamily enzymes by nicardipine and nifedipine in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004;196(1):20-28.
56. Chao PM, Hsu SC, Lin FJ, Li YJ, Huang CJ. The up-regulation of hepatic acyl-CoA oxidase and cytochrome P450 4A1 mRNA expression by

- dietary oxidized frying oil is comparable between male and female rats. *Lipids*. 2004;39(3):233-238.
57. Eder K, Kirchgessner M. The effect of dietary vitamin E supply and a moderately oxidized oil on activities of hepatic lipogenic enzymes in rats. *Lipids*. 1998;33(3):277-283.
58. Chiku S, Hamamura K, Nakamura T. Novel urinary metabolite of d-delta-tocopherol in rats. *J Lipid Res*. 1984;25(1):40-48.
59. Schultz M, Leist M, Petrzika M, Gassmann B, Brigelius-Flohe R. Novel urinary metabolite of alpha-tocopherol, 2,5,7,8-tetramethyl-2(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman, as an indicator of an adequate vitamin E supply? *Am J Clin Nutr*. 1995;62(6 Suppl):1527S-1534S.
60. 李宜靜。尿中  $\alpha$ -CEHC 對飲食維生素 E 攝取量之反映評估。台灣大學微生物與生化學研究所碩士論文。2004。
61. Lodge JK, Ridlington J, Leonard S, Vaule H, Traber MG. Alpha- and gamma-tocotrienols are metabolized to carboxyethyl-hydroxychroman derivatives and excreted in human urine. *Lipids*. 2001;36(1):43-48.
62. Brigelius-Flohe R. Vitamin E and drug metabolism. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;305(3):737-740.

63. Riley RJ, Smith G, Wolf CR, Cook VA, Leeder JS. Human Antiendoplasmic Reticulum Autoantibodies Produced in Aromatic Anticonvulsant Hypersensitivity Reactions Recognize Rodent CYP3A Proteins and a Similarly Regulated Human P450 Enzyme(s). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1993;191(1):32-40.
64. Hentati A, Deng HX, Hung WY, et al. Human alpha-tocopherol transfer protein: gene structure and mutations in familial vitamin E deficiency. *Ann Neurol*. 1996;39(3):295-300.
65. Totani N, Ojiri Y. Mild ingestion of used frying oil damages hepatic and renal cells in Wistar rats. *J Oleo Sci*. 2007;56(5):261-267.
66. Wu CG, Hoek FJ, Groenink M, Reitsma PH, van Deventer SJ, Chamuleau RA. Correlation of repressed transcription of alpha-tocopherol transfer protein with serum alpha-tocopherol during hepatocarcinogenesis. *Int J Cancer*. 1997;71(4):686-690.
67. Mustacich DJ, Leonard SW, Devereaux MW, Sokol RJ, Traber MG. Alpha-tocopherol regulation of hepatic cytochrome P450s and ABC transporters in rats. *Free Radic Biol Med*. 2006;41(7):1069-1078.
68. Harmsen S, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JH. The role of nuclear receptors in pharmacokinetic drug-drug interactions in oncology. *Cancer*



*Treat Rev.* 2007;33(4):369-380.

69. Narasimhamurthy K, Raina PL. Long-term feeding effect of thermally oxidised oils on antioxidant enzymes in rats. *Indian J Exp Biol.* 1999;37(10):1042-1045.
70. Schrader M, Fahimi HD. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1763(12):1755-1766.
71. Cowan DB, Weisel RD, Williams WG, Mickle DA. Identification of oxygen responsive elements in the 5'-flanking region of the human glutathione peroxidase gene. *J Biol Chem.* 1993;268(36):26904-26910.
72. Brigelius-Flohe R. Induction of drug metabolizing enzymes by vitamin E. *J Plant Physiol.* 2005;162(7):797-802.

表 1 油脂品質指標

實驗一

	Acid value (mg KOH/g)	TBA value	Carbonyl value	UV 233 (OD/g)
Fresh oil	0.084	3.95	99.99	581.07
Frying oil	2.748	23.4	111.39	3390.33
Vit E. Stripped oil	0.042	2.05	97.44	603.97

實驗二

	Acid value (mg KOH/g)	TBA value	Carbonyl value	UV 233 (OD/g)
Fresh oil	0.056	2.23	81.49	591.31
Frying oil	2.505	19.85	106.70	3648.06
Vit E. Stripped oil	0.028	1.73	86.25	633.40

表 2 油脂維生素 E 含量及飼料維生素 E 含量

實驗一

	$\alpha$ -Tocopherol	$\gamma$ -Tocopherol	$\alpha$ -Tocopherol	$\gamma$ -Tocopherol
	$\mu\text{g/g oil}$		$\text{mg/kg diet}$	
Fresh oil	69	188	60	28
Vitamin E stripped oil	14	129	52	19
Frying oil	26	43	54	6

CO 組 (Vitamin E stripped oil) 、FO 組 (Frying oil) 、FOE 組 (Frying oil 額外添加  $\alpha$ -TOH 50 mg/kg diet)

實驗二

	$\alpha$ -Tocopherol	$\gamma$ -Tocopherol	$\alpha$ -Tocopherol	$\gamma$ -Tocopherol
	$\mu\text{g/g oil}$		$\text{mg/kg diet}$	
Fresh oil	42	191	6.3	29
Vitamin E stripped oil	4.8	175	0.7	26
Frying oil	19	54	2.9	8

C 組 (Vitamin E stripped oil) 、O 組 (Frying oil)

表 3 試驗飼料之組成 (實驗一)

Group/ Ingredient	CO	FO	FOE
	g/kg Diet		
Fresh Oil	150		
Frying Oil		150	150
Corn starch	572	572	572
Casein	200	200	200
Cellulose	30	30	30
*AIN-76Vitamin mixture	10	10	10
AIN-76Mineral mixture	35	35	35
Choline	3	3	3
D,L-Methionine	3	3	3
all-rac- $\alpha$ -tocopheryl acetate (mg/kg)	0	0	50

\* AIN-76Vitamin mixture 中，含 50ppm Vitamin E

**表 4 餵食新鮮油(脫除維生素 E 黃豆油，CO)、炸油 (FO) 或補充維生素 E 之炸油(補充 50ppm 維生素 E 之炸油，FOE)飼料六週後，大鼠體重增加、總攝食量及飼料利用效率之影響 (實驗一)**

Group	Initial body weight		Final body weight		Body weight gain		Food intake		Feed efficiency	
	g		g		g/d		g/d		B.W.gain/food intake(%)	
CO	80.13±7.68		400.51±28.30 <sup>a</sup>		7.55±0.84 <sup>a</sup>		20.81±1.40		36±2 <sup>a</sup>	
FO	80.53±3.00		354.50±14.39 <sup>b</sup>		6.37±0.56 <sup>b</sup>		19.21±1.52		33±2 <sup>b</sup>	
FOE	79.83±5.64		361.30±15.78 <sup>b</sup>		6.35±1.67 <sup>b</sup>		19.72±1.45		33±1 <sup>b</sup>	

1. Each value represents Mean ± SD of seven rats.

2. Values not sharing common a superscript letters are significantly different from one another among CO, FO and FOE group by one way ANOVA and Duncan's Multiple Range Test ( $P < 0.05$ ).

**表 5-1 餵食新鮮油(脫除維生素 E 黃豆油，CO)、炸油 (FO) 或補充維生素 E 之炸油 (補充 50ppm 維生素 E 之炸油，FOE) 飼料六週後，大鼠組織重量之影響 (實驗一)**

Group	weight(g)						
	Liver	Kidney	Lung	Spleen	Heart	Testis	EP RE Brain
CO	13.44±2.12 <sup>b</sup>	3.25±0.38	1.93±0.32	0.85±0.08 <sup>a</sup>	1.36±0.14	3.28±0.27	6.86±1.71 7.43±2.18 <sup>a</sup> 1.86±0.10
FO	16.32±0.80 <sup>a</sup>	2.91±0.20	2.14±0.52	0.73±0.09 <sup>b</sup>	1.25±0.13	3.39±0.21	5.82±1.16 5.35±1.82 <sup>b</sup> 1.79±0.06
FOE	16.77±1.79 <sup>a</sup>	3.11±0.22	1.76±0.26	0.78±0.06 <sup>b</sup>	1.25±0.07	3.36±0.12	5.89±1.21 5.34±2.31 <sup>b</sup> 1.87±0.13

1. Each value represents Mean ± SD of seven rats.

2. Values not sharing common a superscript letters are significantly different from one another among CO, FO and FOE group by one way ANOVA and Duncan's Multiple Range Test ( $P < 0.05$ ).

3. EP (Epididymal fat pad), RE (Retroperitoneal fat pad)

**表 5-2 餵食新鮮油 (脫除維生素 E 黃豆油，CO)、炸油 (FO)或補充維生素 E 之炸油 (補充 50ppm 維生素 E 之炸油，FOE) 飼料六週後，大鼠組織相對重量之影響 (實驗一)**

Group	Liver	Kidney	Lung	Spleen	Heart	Testis	EP	RE	Brain
Relative tissue weight(%)									
CO	3.47±0.37 <sup>b</sup>	0.84±0.09	0.50±0.10	0.22±0.02	0.34±0.02	0.85±0.06 <sup>b</sup>	1.76±0.29	1.91±0.43	0.48±0.02 <sup>b</sup>
FO	4.87±0.24 <sup>a</sup>	0.87±0.04	0.64±0.17	0.22±0.02	0.38±0.05	1.02±0.07 <sup>a</sup>	1.74±0.31	1.60±0.51	0.54±0.04 <sup>a</sup>
FOE	4.90±0.57 <sup>a</sup>	0.91±0.05	0.51±0.07	0.23±0.02	0.37±0.02	0.98±0.06 <sup>a</sup>	1.71±0.32	1.54±0.62	0.55±0.03 <sup>a</sup>

1.Each value represents Mean ± SD of seven rats.

2.Values not sharing common a superscript letters are significantly different from one another among CO,FO and FOE group by one way ANOVA and Duncan's Multiple Range Test ( $P < 0.05$ ).

3.EP (Epididymal fat pad), RE (Retroperitoneal fat pad)

**表 6 餵食新鮮油 (脫除維生素 E 黃豆油, CO)、炸油 (FO) 或補充維生素 E 之炸油 (補充 50ppm 維生素 E 之炸油, FOE) 飼料六週後, 大鼠血漿中白蛋白、三酸甘油酯及膽固醇含量之影響 (實驗一)**

Group	Albumin (g/dL)	Triglyceride (mmol/L)	Cholesterol (mmol/L)
CO	3.869±0.224	0.711±0.146	2.026±0.389
FO	4.207±0.244	0.698±0.147	2.354±0.344
FOE	4.034±0.292	0.615±0.196	2.104±0.600

1. Each value represents Mean ± SD of seven rats.

2. Values not sharing common a superscript letters are significantly different from one another among CO, FO and FOE group by one way ANOVA and Duncan's Multiple Range Test ( $P < 0.05$ ).



表 7 餵食新鮮油(脫除維生素 E 黃豆油，CO)、炸油 (FO) 或補充維生素 E 之炸油 (補充 50ppm 維生素 E 之炸油，FOE) 飼料六週後，大鼠血漿及肝臟中維生素 E 與 TBARS 濃度之影響 (實驗一)

Group	Plasma		Plasma		Liver		Liver		Liver	
	$\alpha$ -tocopherol $\mu\text{mol/L}$	$\gamma$ -tocopherol $\mu\text{mol/L}$	$\alpha$ -TOH/TG $\mu\text{mol}/\text{mmol}$	$\alpha$ -tocopherol $\text{nmol/g}$	$\gamma$ -tocopherol $\text{nmol/g}$	$\alpha$ -tocopherol $\text{nmol}/\text{Liver}$	$\gamma$ -tocopherol $\text{nmol}/\text{Liver}$	TBARS $\text{nmol/g}$		
CO	17.77 $\pm$ 4.81 <sup>a</sup>	1.06 $\pm$ 0.42	24.76 $\pm$ 2.94 <sup>a</sup>	39.32 $\pm$ 3.03 <sup>a</sup>	2.49 $\pm$ 0.92	527.7 $\pm$ 93.4 <sup>a</sup>	34.7 $\pm$ 18.5	19.44 $\pm$ 2.26 <sup>b</sup>		
FO	7.96 $\pm$ 3.21 <sup>b</sup>	—	12.04 $\pm$ 6.51 <sup>b</sup>	9.94 $\pm$ 1.32 <sup>c</sup>	—	162.1 $\pm$ 28.6 <sup>c</sup>	—	26.44 $\pm$ 2.04 <sup>a</sup>		
FOE	10.41 $\pm$ 4.11 <sup>b</sup>	—	17.28 $\pm$ 6.30 <sup>b</sup>	14.58 $\pm$ 2.64 <sup>b</sup>	—	244.9 $\pm$ 50.7 <sup>b</sup>	—	24.79 $\pm$ 2.7 <sup>a</sup>		

1. Each value represents Mean  $\pm$  SD of seven rats.  
2. Values not sharing common a superscript letters are significantly different from one another among CO, FO and FOE group by one way ANOVA and Duncan's Multiple Range Test ( $P < 0.05$ ).

**表 8 餵食新鮮油 (脫除維生素 E 黃豆油，CO)、炸油 (FO) 或補充維生素 E 之炸油 (補充 50ppm 維生素 E 之炸油，FOE) 飼料六週後，大鼠收集一天尿液體積及肌酸酐含量之影響 (實驗一)**

Group	Urine volume		Creatinine Concentration		Creatinine excretion		Creatinine excretion/body weight	
	mL		mmol/L		mmol		μmol/g	
CO	41.5±18.0		188.6±64.3		7.01±2.13		17.59±5.60	
FO	30.3±12.0		232.5±75.4		6.45±1.62		18.14±4.26	
FOE	36.4±20.7		265.7±123.5		7.84±1.82		21.74±5.26	

1. Each value represents Mean ± SD of seven rats.

2. Values not sharing common a superscript letters are significantly different from one another among CO, FO and FOE group by one way ANOVA and Duncan's Multiple Range Test ( $P < 0.05$ ).

**表 9 餵食新鮮油 (脫除維生素 E 黃豆油，CO)、炸油 (FO) 或補充維生素 E 之炸油 (補充 50ppm 維生素 E 之炸油，FOE)飼料六週後，大鼠一天尿液中  $\alpha$ -CEHC 含量之影響 (實驗一)**

Group	Concentration	Total excretion/ d	Total excretion/ creatinine	Total excretion/ Body weight
	$\mu\text{mol/L}$	$\mu\text{mol/d}$	nmol/mmol	nmol/g
Total $\alpha$ -CEHC				
CO	4.24 $\pm$ 2.93	0.132 $\pm$ 0.024 <sup>a</sup>	21.30 $\pm$ 9.84 <sup>a</sup>	0.33 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>
FO	2.70 $\pm$ 1.38	0.073 $\pm$ 0.023 <sup>b</sup>	11.26 $\pm$ 2.43 <sup>b</sup>	0.20 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>
FOE	5.67 $\pm$ 4.91	0.142 $\pm$ 0.020 <sup>a</sup>	19.16 $\pm$ 6.11 <sup>a</sup>	0.39 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>

1.Each value represents Mean  $\pm$  SD of seven rats.

2.Values not sharing common a superscript letters are significantly different from one another among CO,FO and FOE group by one way ANOVA and Duncan’s Multiple Range Test ( $P<0.05$ ).

表 10 試驗飼料之組成 (實驗二)

Group/ Ingredient	C O	
	g/kg Diet	
Fresh Oil	150	
Frying Oil		150
Corn starch	449.5	449.5
Sucrose	100	100
Casein	200	200
Cellulose	50	50
AIN Vitamin E free Vit mix	10	10
AIN-93 G Mineral mixture	35	35
Choline bitarate	2.5	2.5
L-Cystine	3	3
Tert-Butylhydroquinone (TBHQ)	0.014	0.014

**表 11 餵食新鮮油 (C)、炸油 (O) 飼料六週後，老鼠體重增加、總攝食量及飼料利用效率之影響 (實驗二)**

Group	Initial body weight	Final body weight	Body weight gain	Food intake	Feed efficiency
	g	g	g/d	g/d	B.W.gain/food intake(%)
C	72.48±1.94	421.32±52.09	7.93±1.17	19.08±1.42	41±3
O	72.75±2.89	394.97±36.74	7.32±0.78	17.38±1.77	42±2

1. Each value represents Mean ± SD of 6-7 rats.

2. Values not sharing common a superscript letters are significantly different from one another among C and O group by Student's T test ( $P < 0.05$ ).

**表 12-1 餵食新鮮油 (C)、炸油 (O) 飼料六週後，老鼠組織重量之影響 (實驗二)**

Group	Liver	Kidney	Lung	Spleen	Heart	Testis	EP	RE
weight(g)								
C	15.45±1.94	3.04±0.36	1.72±0.43	0.93±0.12	1.24±0.13	3.22±0.27	7.45±1.93	9.84±4.26
O	15.95±2.03	3.18±0.38	1.90±0.81	0.83±0.12	1.30±0.13	3.47±0.22	6.06±1.88	7.89±3.09

1. Each value represents Mean ± SD of 6-7 rats.

2. Values not sharing common a superscript letters are significantly different from one another among C and O group by Student's T test ( $P < 0.05$ ).

3. EP (Epididymal fat pad), RE (Retroperitoneal fat pad)

表 12-2 餵食新鮮油 (C)、炸油 (O) 飼料六週後，老鼠組織相對重量之影響 (實驗二)

Group	Liver	Kidney	Lung	Spleen	Heart	Testis	EP	RE
Relative tissue weight(%)								
C	3.84±0.55	0.76±0.12	0.43±0.14	0.23±0.04	0.31±0.05	0.81±0.14	1.86±0.51	2.45±1.12
O	4.27±0.37	0.84±0.04	0.48±0.18	0.21±0.02	0.34±0.04	0.91±0.13	1.57±0.31	1.99±0.59

1. Each value represents Mean ± SD of 6-7 rats.

2. Values not sharing common a superscript letters are significantly different from one another among C and O group by Student's T test ( $P < 0.05$ ).

3. EP (Epididymal fat pad), RE (Retroperitoneal fat pad)

表 13 餵食新鮮油 (C)、炸油 (O) 飼料六週後，老鼠血漿中白蛋白、三酸甘油酯及膽固醇含量之影響 (實驗二)

Group	Albumin (g/dL)	Triglyceride (mmol/L)	Cholesterol (mmol/L)
C	3.424±0.199	0.976±0.183	2.178±0.498
O	3.605±0.199	0.891±0.241	2.959±0.969

1. Each value represents Mean ± SD of 6-7 rats.  
2. Values not sharing common a superscript letters are significantly different from one another among C and O group by Student's T test ( $P < 0.05$ ).



**表 14 餵食新鮮油 (C)、炸油 (O) 飼料六週後，老鼠血漿及肝臟中維生素 E 與 TBARS 濃度 之影響 (實驗二)**

Group	Plasma		Plasma		Liver		Liver		Liver	
	$\alpha$ -tocopherol $\mu\text{mol/L}$	$\gamma$ -tocopherol $\mu\text{mol/L}$	$\alpha$ -TOH/TG $\mu\text{mol}/\text{mmol}$	$\alpha$ -tocopherol $\text{nmol/g}$	$\gamma$ -tocopherol $\text{nmol/g}$	$\alpha$ -tocopherol $\text{nmol}/\text{Liver}$	$\gamma$ -tocopherol $\text{nmol}/\text{Liver}$	TBARS $\text{nmol/g}$		
C	5.76 $\pm$ 1.26	2.80 $\pm$ 1.24	5.99 $\pm$ 1.49	39.17 $\pm$ 3.01*	19.00 $\pm$ 4.68	498.0 $\pm$ 115.6*	237.4 $\pm$ 57.1	24.90 $\pm$ 5.17		
O	5.20 $\pm$ 1.55	—	6.01 $\pm$ 1.74	9.91 $\pm$ 1.36	—	161.7 $\pm$ 29.0	—	31.37 $\pm$ 3.24*		

1. Each value represents Mean  $\pm$  SD of 6-7 rats.

2. Values not sharing common a superscript letters are significantly different from one another among C and O group by Student's T test ( $P < 0.05$ ).

表 15 餵食新鮮油 (C)、炸油 (O) 飼料六週後，老鼠收集一天尿液體積及肌酸酐含量之影響 (實驗二)

Group	Urine volume		Creatinine Concentration		Creatinine excretion/ body weight	
	mL		mmol/l	mmol	μmol/g	
C	36.5±17.9		208.0±81.8	6.80±2.30	15.88±4.71	
O	34.4±13.3		238.6±115.4	6.96±1.41	17.59±4.65	

1. Each value represents Mean ± SD of 6-7 rats.

2. Values not sharing common a superscript letters are significantly different from one another among C and O group by Student's T test ( $P < 0.05$ ).

**表 16 餵食新鮮油 (C)、炸油 (O) 飼料六週後，老鼠一天尿液中  $\alpha$ -CEHC 含量之影響 (實驗二)**

Group	Concentration	Total excretion/ d	Total excretion/ creatinine	Total excretion/ Body weight
	$\mu\text{mol/L}$	$\mu\text{mol/d}$	$\text{nmol/mmol}$	$\text{nmol/g}$
Total $\alpha$ -CEHC				
C	3.93 $\pm$ 2.13	0.143 $\pm$ 0.106	22.28 $\pm$ 16.06	0.328 $\pm$ 0.219
O	2.27 $\pm$ 0.87	0.076 $\pm$ 0.031	11.09 $\pm$ 4.78	0.191 $\pm$ 0.074

1. Each value represents Mean  $\pm$  SD of 6-7 rats.

2. Values not sharing common a superscript letters are significantly different from one another among C and O group by Student's T test ( $P < 0.05$ ).

### 實驗一



### 實驗二

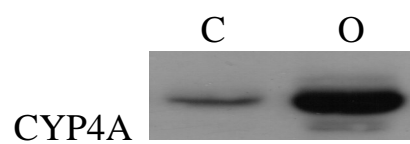
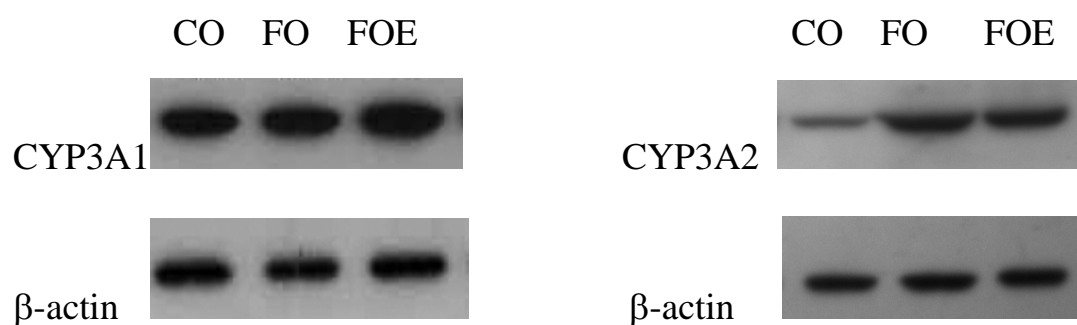


圖 1 大鼠肝臟 CYP4A1 蛋白質表現之情形。圖為 Western blot 之結果

(A)



(B)

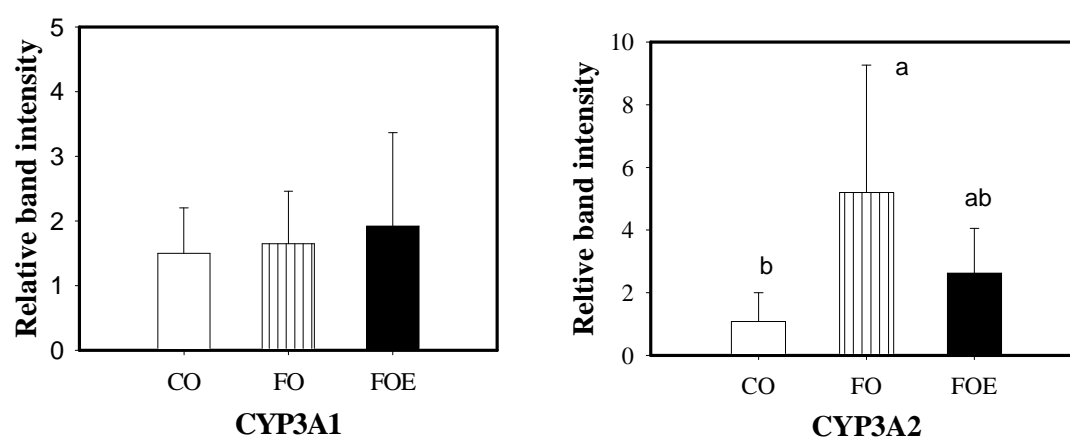


圖 2 餵食新鮮油（脫除維生素 E 黃豆油，CO）、炸油（FO）或補充維生素 E 之炸油（補充 50ppm 維生素 E 之炸油，FOE）飼料六週後，大鼠肝臟 CYP3A1、CYP3A2 蛋白質表現之情形。(A) 圖為 Western blot 結果，(B)圖為量化的結果（實驗一）

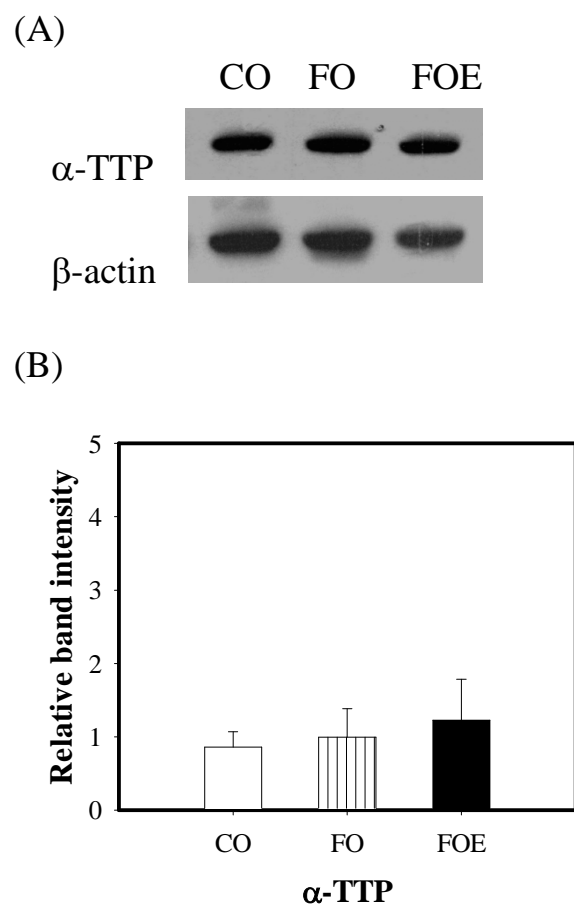


圖 3 餵食新鮮油（脫除維生素 E 黃豆油，CO）、炸油（FO）或補充維生素 E 之炸油（補充 50ppm 維生素 E 之炸油，FOE）飼料六週後，大鼠肝臟  $\alpha$ -TTP 蛋白質表現之情形。(A)圖為 Western blot 結果，(B)圖為量化的結果（實驗一）

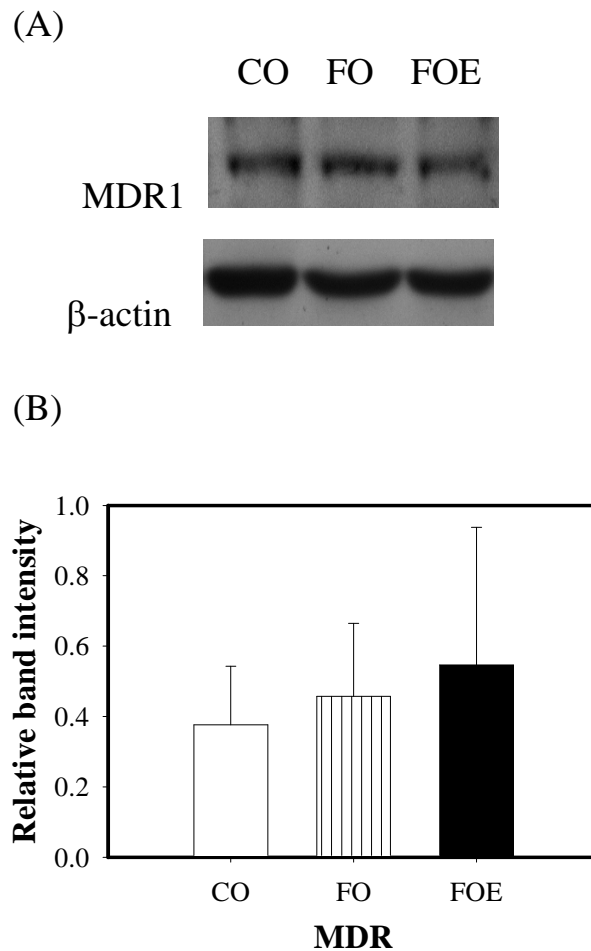


圖 4 餵食新鮮油（脫除維生素 E 黃豆油，CO）、炸油（FO）或補充維生素 E 之炸油（補充 50ppm 維生素 E 之炸油，FOE）飼料六週後，大鼠肝臟 MDR1 蛋白質表現之情形。(A)圖為 Western blot 結果，(B)圖為量化的結果（實驗一）

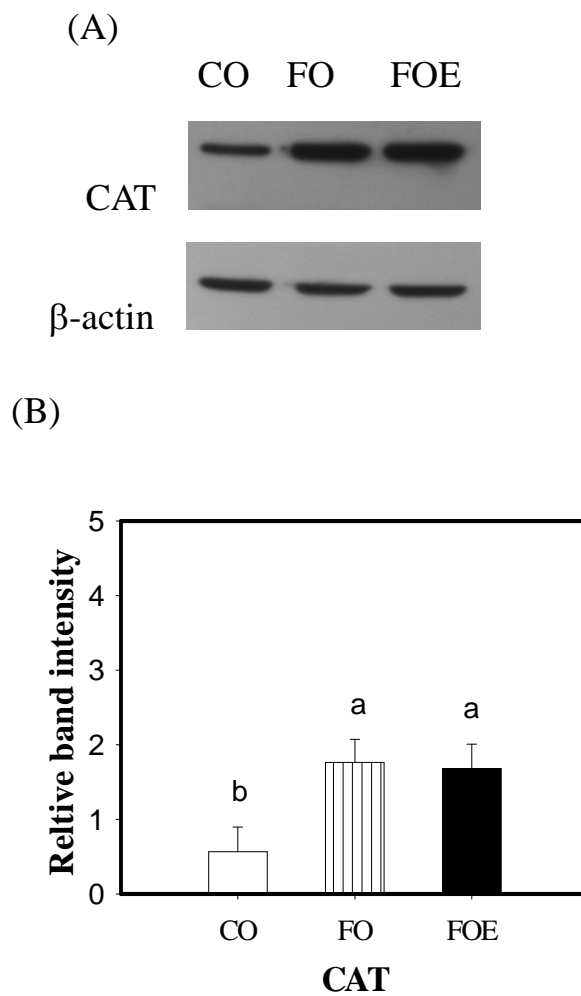


圖 5 餵食新鮮油（脫除維生素 E 黃豆油，CO）、炸油（FO）或補充維生素 E 之炸油（補充 50ppm 維生素 E 之炸油，FOE）飼料六週後，大鼠肝臟 CAT 蛋白質表現之情形。(A)圖為 Western blot 結果，(B)圖為量化的結果（實驗一）



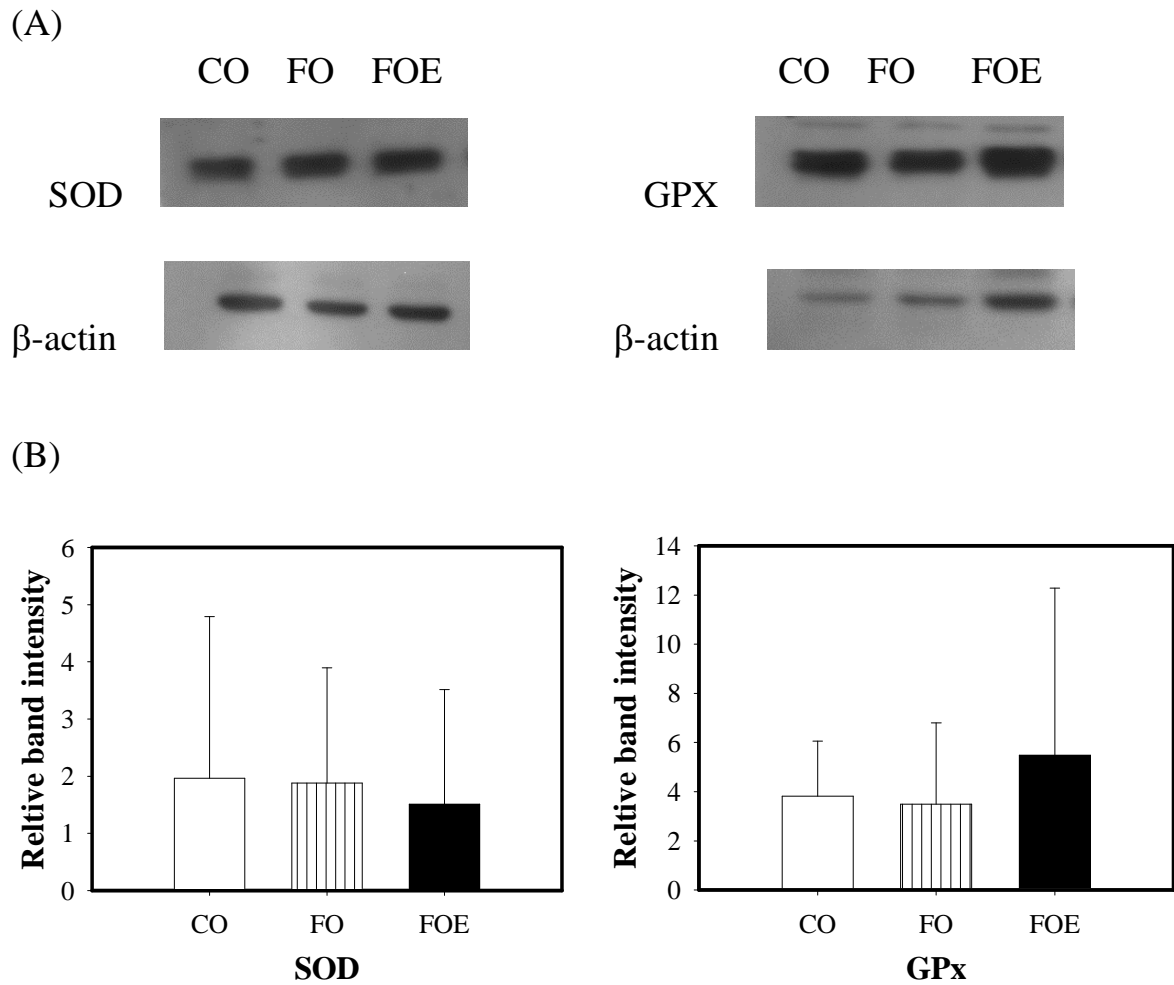
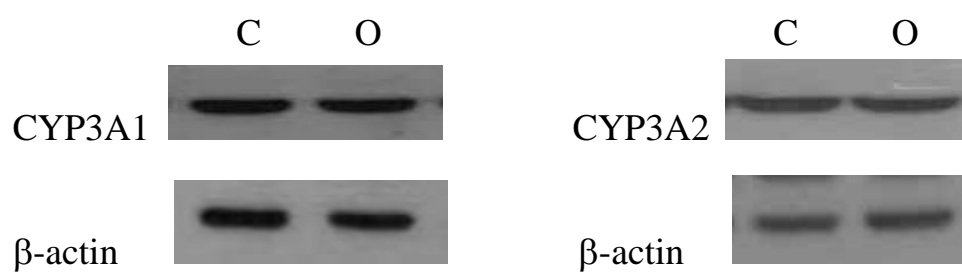


圖 6 餵食新鮮油 (脫除維生素 E 黃豆油, CO)、炸油 (FO) 或補充維生素 E 之炸油 (補充 50ppm 維生素 E 之炸油, FOE) 飼料六週後, 大鼠肝臟 SOD、GPx 蛋白質表現之情形。(A)圖為 Western blot 結果, (B)圖為量化的結果 (實驗一)

(A)



(B)

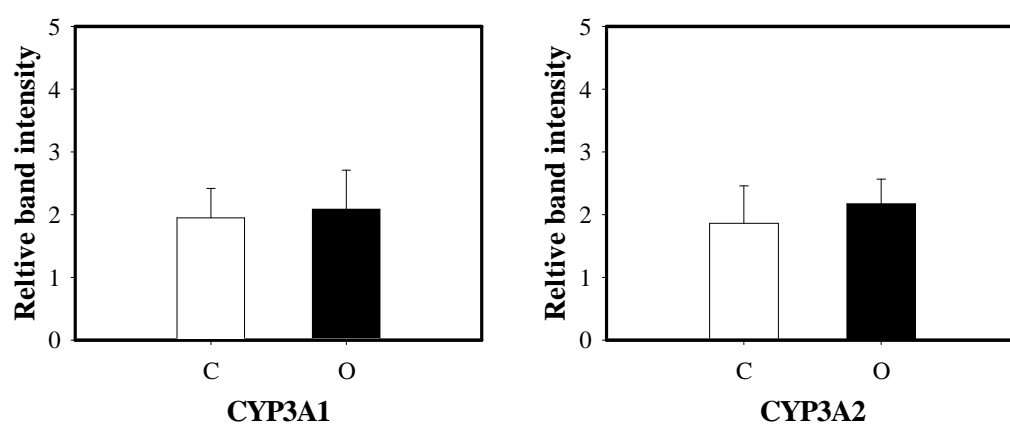


圖 7 餵食新鮮油 (C)、炸油 (O) 飼料六週後，大鼠肝臟 CYP3A1、CYP3A2 蛋白質表現之情形。(A) 圖為 Western blot 結果，B 圖為量化的結果 (實驗二)

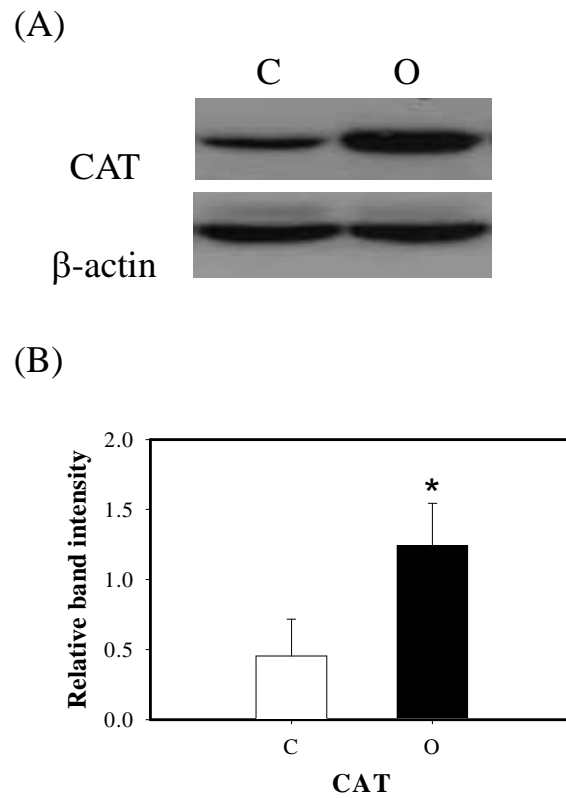


圖 8 餵食新鮮油 (C)、炸油 (O) 飼料六週後，大鼠肝臟 CAT 蛋白質表現之情形。(A) 圖為 Western blot 結果，(B) 圖為量化的結果 (實驗二)

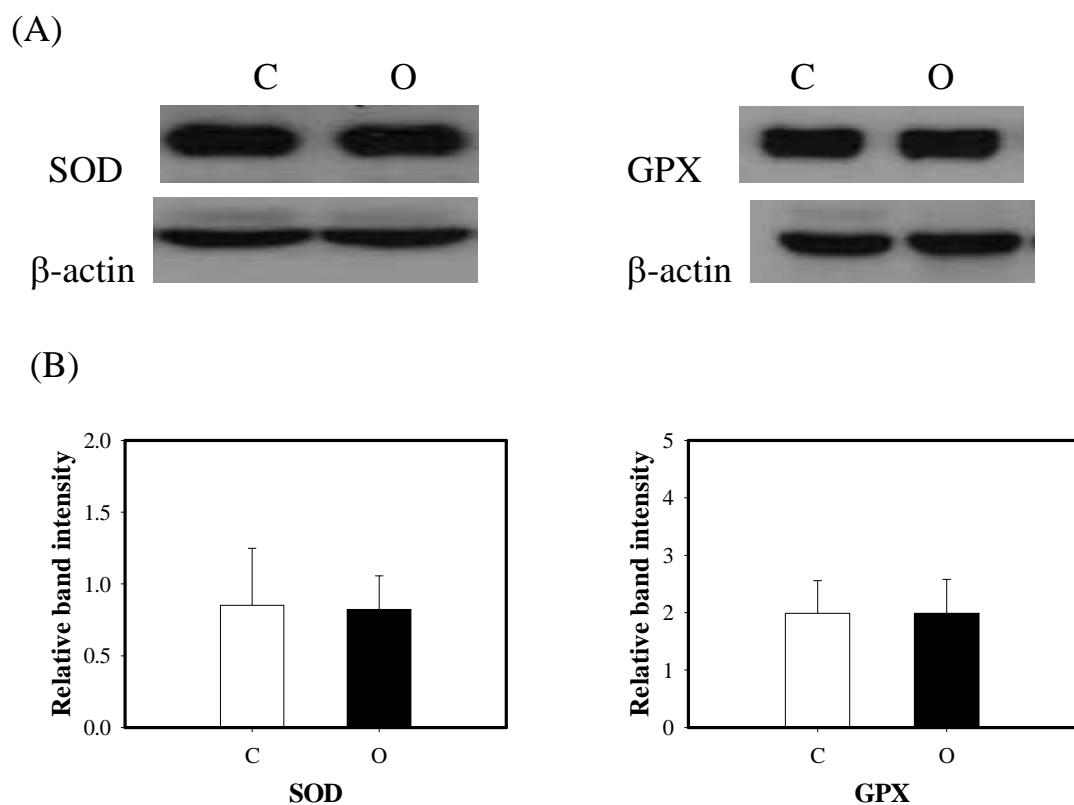
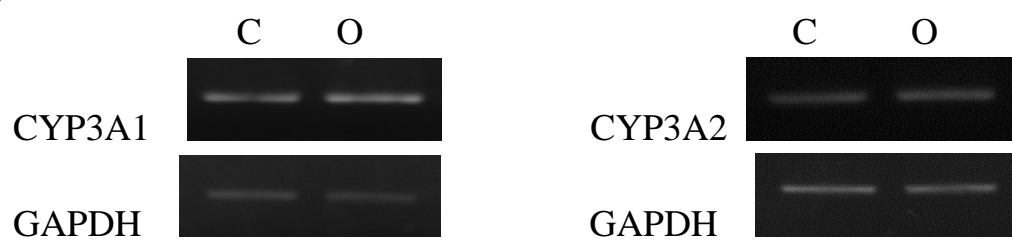
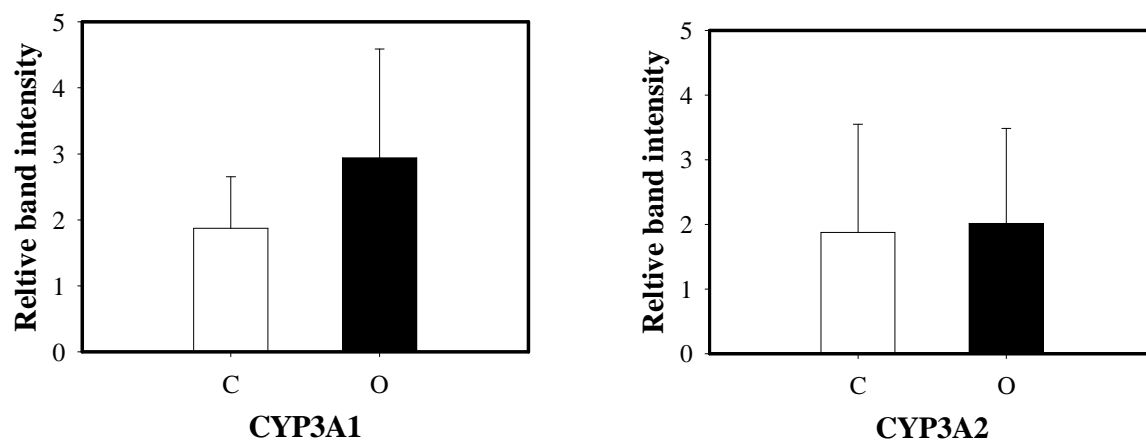


圖 9 餵食新鮮油 (C)、炸油 (O) 飼料六週後，大鼠肝臟 SOD 和 GPx 蛋白質表現之情形。(A) 圖為 Western blot 結果，(B) 圖為量化的結果 (實驗二)

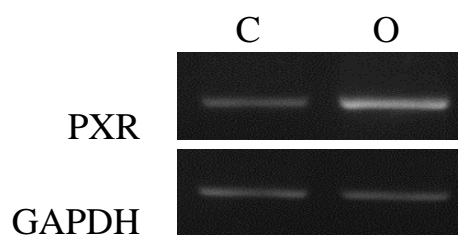
(A)



(B)



(A)



(B)

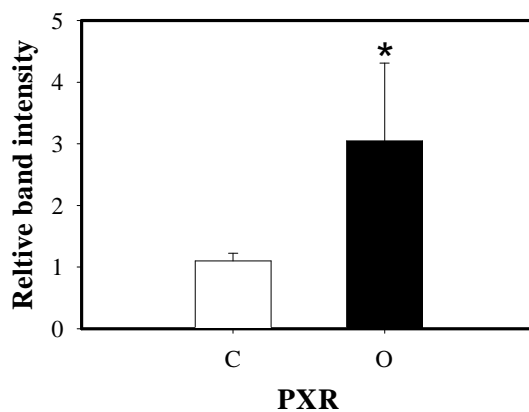
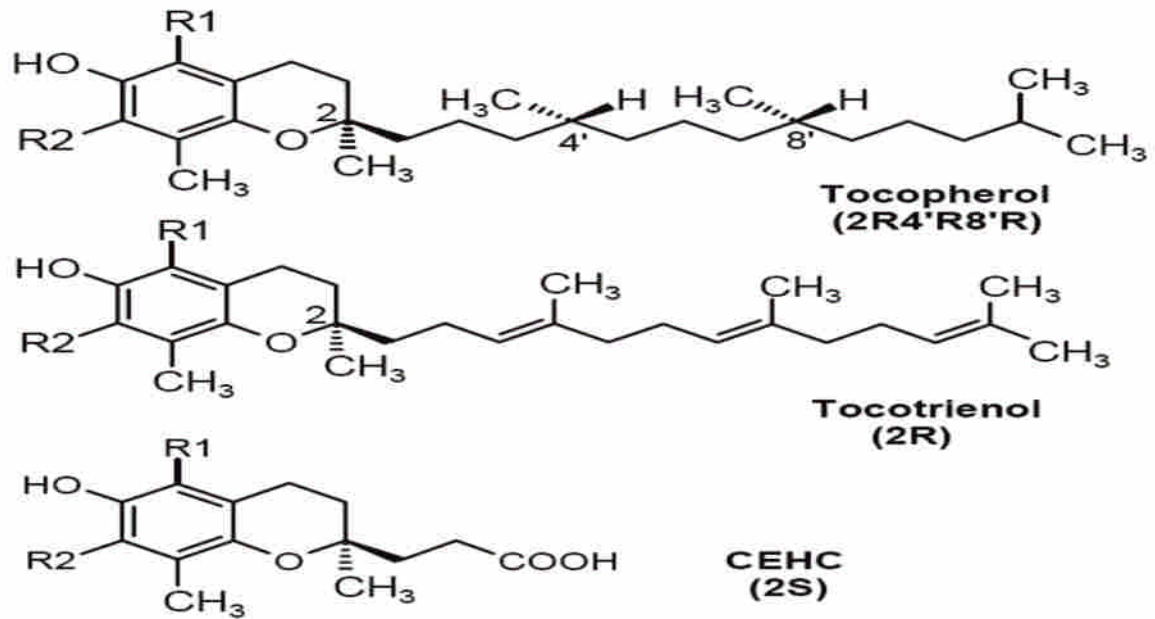


圖 10 餵食新鮮油 (C)、炸油 (O) 飼料六週後，大鼠肝臟 PXR、CYP3A mRNA 表現之情形 (A) 圖為 RT-PCR 結果，(B) 圖為量化的結果 (實驗二)

## 附錄



	R1	R2	
$\alpha$ - Toco-	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	- pherol/-trienol
$\beta$ - Toco-	CH <sub>3</sub>	H	- pherol/-trienol
$\gamma$ - Toco-	H	CH <sub>3</sub>	- pherol/-trienol
$\delta$ - Toco-	H	H	- pherol/-trienol

附圖 1 維生素 E 與 CEHC 之構造<sup>(72)</sup>



附圖 2 代謝籠