

國立臺灣大學生命科學院生化科技學系

碩士論文

Department of Biochemical Science and Technology

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

共軛脂肪酸對 C57BL/6J 雌鼠脂質代謝之影響

Effects of conjugated fatty acid on lipid metabolism in

C57BL/6J female mice

王麗卉

Li-Hui Wang

指導教授：黃青真 博士


Advisor: Ching-Jang Huang, Ph.D.

中華民國 102 年 07 月

July, 2013



## 中文摘要



共軛脂肪酸為一群特殊脂肪酸。共軛亞麻油酸 (conjugated linoleic acid, CLA) 混合物 (9*c*,11*t*-CLA 與 10*t*,12*c*-CLA) 或 10*t*,12*c*-CLA 可活化 PPAR  $\alpha$ 、降低體脂肪，但造成脂肪肝及胰島素抗性。本實驗室曾發現自山苦瓜分離之共軛次亞麻油酸 9*c*,11*t*,13*t*-conjugated linolenic acid (CLN) 可活化 PPAR  $\alpha$  及 PPAR  $\gamma$ 。本研究目的為探討 CLA 及 CLN 對小鼠脂質代謝之影響 (*in vivo*)。

C57BL/6J 雌鼠以實驗飼料分成四組並飼養五週：基礎飼料 (B 組，控制組)、1% CLA 混合物 (9*c*,11*t*-CLA: 10*t*,12*c*-CLA = 1:1) (A 組)、1% crude 9*c*,11*t*,13*t*-CLN (純度 76%) (N 組) 或 1% pure 9*c*,11*t*,13*t*-CLN (純度 99%) (H 組)。與 B 組小鼠相比，A 組肝臟重量增加、肝臟 TG 及 CHOL 含量較高 ( $p < 0.05$ )，但腎周圍脂肪組織(RWAT) TG 含量顯著較低。N 組與 H 組 RWAT 重量較大，但只有 N 組 RWAT 之 TG 含量較高 ( $p < 0.05$ )。H 組肝臟 TG 濃度及含量皆顯著低於 B 組 ( $p < 0.05$ )。新陳代謝儀分析顯示 H 組具較高呼吸商 (RQ)。N 組禁食血清之葡萄糖、TG 濃度顯著較高 ( $p < 0.05$ )。A 組非禁食血清胰島素濃度及禁食血清 CHOL 濃度顯著較高，但禁食血清 TG 濃度顯著較低 ( $p < 0.05$ )。

肝臟、RWAT、血清、肌肉以 GC-FID 分析脂肪酸組成。於四種組織中 N、H 組皆測得 9*c*,11*t*,13*t*-CLN 及 9*c*,11*t*-CLA，A 組皆測得 9*c*,11*t*-CLA 及 10*t*,12*c*-CLA。與 B 組相較，A 組肝臟 MUFA 含量較高、n-6 PUFA 含量較低。A 組肝臟 delta-5-desaturase (D5D)、delta-6-desaturase (D6D) mRNA 表現量與 D5D index (C20:4 n-6/C20:3n-6)、D6D index (C18:3n-6/C18:2n-6) 皆顯著低於 B 組 ( $p < 0.05$ )。N 組肝臟 SCD1 (delta-9-desaturase, D9D) mRNA 表現量顯著較低 ( $p < 0.05$ )，但 D9D index (C16:1n-7/C16:0) 則否。四組小鼠肝臟組織中，與脂質代謝相關基因之表現量皆無顯著差異。肝、血清、RWAT、尿液經 LC-MS 分析並預測代謝物。經標準品確認 A、H 組 Phe 於肝臟含量降低、於血清含量較高 ( $p < 0.05$ )。

本實驗結果顯示，CLA 混合物對脂肪組織重量無顯著差異，但造成脂肪肝；

CLN 增加脂肪組織重量，但無肝臟脂質堆積。CLA 混合物降低肝臟 D5D 及 D6D 酵素活性，但 CLN 則否。高純度 CLN 能降低肝脂並提高 RQ，低純度則否。兩組 CLN 餵食結果之差異，究與劑量或低純度 CLN 樣品含有其他活性成分有關，尚待進一步研究。

關鍵字: 共軛亞麻油酸(CLA)、共軛次亞麻油酸(CLN)、脂肪酸組成、脂質代謝

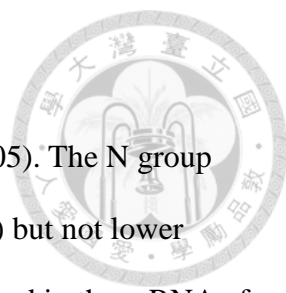
## Abstract

Conjugated linoleic acid (CLA) (a mixture of 9*c*,11*t*-CLA and 10*t*,12*c*-CLA or 10*t*,12*c*-CLA) were shown to activate peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)  $\alpha$ , decrease body fat mass (BFM), but lead to fatty liver and insulin resistance. Previous study of our Lab demonstrated that 9*c*,11*t*,13*t*-conjugated linolenic acid (CLN) isolated from bitter melon activated both PPAR  $\alpha$  and  $\gamma$ . This study aimed to examine effects of CLA and CLN on the lipid metabolism (*in vivo*).

Four groups of C57BL/6J female mice were respectively fed: a basal diet (control group, B group), basal diet supplemented with 1% CLA mixture (9*c*,11*t*-CLA: 10*t*,12*c*-CLA = 1:1) (A group), 1% crude CLN (76 % pure) (N group) or 1% pure CLN (99 % purity) (H group) for 5 weeks. Compared to the B group, the A group of mice had significantly higher liver weight and its TG and cholesterol content, but lower triglyceride (TG) concentration in the perirenal white adipose tissue (RWAT) ( $p < 0.05$ ). The N and H groups had higher adipose weight but only the N group had higher RWAT TG content ( $p < 0.05$ ). The H group showed significantly lower TG concentration and content in the liver ( $p < 0.05$ ). Indirect calorimetry analysis showed that the H group had significantly higher Respiratory quotient ( $p < 0.05$ ). The N group had higher fasting serum glucose and TG, while the A group had higher non-fasting serum insulin and fasting serum cholesterol, but lower fasting serum TG ( $p < 0.05$ ).

Fatty acid compositions in liver, RWAT, serum and muscle were analyzed by GC-FID. Both 9*c*,11*t*,13*t*-CLN and 9*c*,11*t*-CLA were detected in serum and all 3 tissues of the H and N groups, while both 9*c*,11*t*-CLA and 10*t*,12*c*-CLA were detected in the A group. Compared to the B group, the A group had higher MUFA and lower n-6 PUFA in the liver, while the N group had lower n-6 PUFA in the liver.

The hepatic mRNA expressions of delta-5-desaturase (D5D), delta-6-desaturase



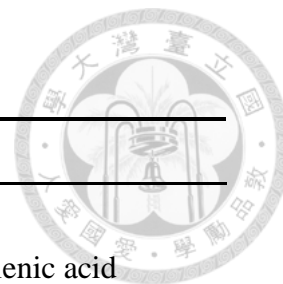
(D6D), fatty acids D5D index (C20:4 n-6/C20:3n-6) and D6D index (C18:3n-6/C18:2n-6) were significantly lower in the A group ( $p < 0.05$ ). The N group had lower SCD1 (delta-9-desaturase, D9D) hepatic mRNA ( $p < 0.05$ ) but not lower D9D index (C16:1n-7/C16:0). No significant differences were observed in the mRNA of remaining lipid metabolism related genes in the liver among the 4 groups. Metabolites in liver, serum, RWAT, and urine of the 4 groups of mice were analyzed by using LC-MS and the metabolomics approach. Confirmed by standard compounds, phenylalanine was lower in the liver, but higher in the serum in both of A and H groups ( $p < 0.05$ ).

In this study, the CLA mixture led to fatty liver without a reduction in the adipose mass. CLN increased adipose mass but not liver lipids. The CLA mixture also decreased liver D5D and D6D desaturation of fatty acids, but not CLN. Reduced liver lipids and elevated respiration quotient were only observed in mice fed pure CLN. Further study is needed to elucidate whether the dose or other constituents in the crude CLN sample might contribute to the differences between the crude and pure CLN fed mice.

Key words: conjugated linoleic acid (CLA), conjugated linolenic acid (CLN), fatty acid composition, lipid metabolism

## 縮寫對照表

### 縮寫對照表



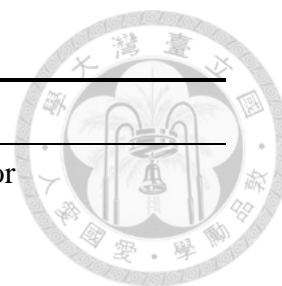
縮寫	全文
9 <i>c</i> ,11 <i>t</i> -CLA	<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 conjugated linoleic acid
9 <i>c</i> ,11 <i>t</i> ,13 <i>t</i> -CLN	<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11, <i>trans</i> -13 conjugated linolenic acid
10 <i>t</i> ,12 <i>c</i> -CLA	<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 conjugated linoleic acid
Acox	Acyl-Co A oxidase
BAT	brown adipose tissue
CHOL	cholesterol
CLA	conjugated linoleic acid
CLN	conjugated linolenic acid
CPT-1	Carnitine palmitoyltransferase-1
D5D	delta-5-desaturase
D6D	delta-6-desaturase
D9D	delta-9-desaturase
ERK	extracellular-signal regulated kinase
FA	fatty acid
FADS1	fatty acid desaturase1
FADS2	fatty acid desaturase2
FAME	fatty acid methyl ester
Fas	fatty acid synthase
FFA	free-fatty acid
GK	glucokinase
GLUT-4	glucose transport 4
GS	glycogen synthase
HSL	Hormone sensitive lipase
IFN- $\gamma$	interferon $\gamma$
LA	Linolenic acid
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MUFA	monounsaturated fatty acid
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide
Phe	phenylalanine

## 縮寫對照表

---

縮寫	全文
PPAR	peroxisome proliferator activated receptor
PUFA	polyunsaturated fatty acid
RQ	respiratory quotient
RWAT	retroperitoneal white adipose tissue
SCD-1	stearoyl-Co A desaturase-1
SREBP1c	sterol regulatory element binding transcription factor 1c
TG	triglyceride
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor-alpha
Trp	trptophan
Tyr	tyrosine
UWAT	uterine white adipose tissue
VLCFAs	very long chain fatty acids
WAT	white adipose tissue

---

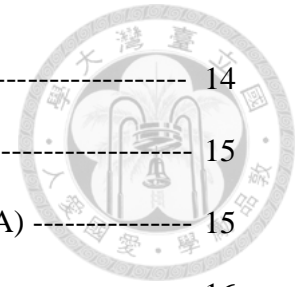


總目錄

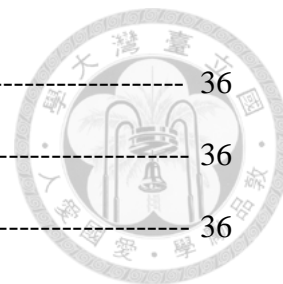


中文摘要-----	i
Abstract-----	iii
第一章 緒論-----	1
第一節 研究動機與目的-----	1
第二節 文獻回顧-----	1
一、肥胖-----	1
二、糖尿病-----	2
三、肝臟之醣類調控及脂質堆積-----	3
四、PPARs-----	4
五、共軛脂肪酸-----	6
(一) 共軛亞麻油酸(CLA)-----	6
1. 介紹-----	6
2. CLA 抗肥胖 (antiobesity)-----	8
(1) 降低攝食量-----	8
(2) 增加能量消耗-----	8
(3) 抑制脂肪細胞生合成-----	8
3. 促進發炎反應-----	10
4. 調控脂質代謝-----	11
(1) 抑制脂質合成 (lipogenesis)-----	11
(2) 促進脂肪細胞三酸甘油酯分解-----	11
5. 造成胰島素抗性-----	12
6. 促進 (pre)adipocyte 凋亡(apoptosis)-----	13
(二) 共軛次亞麻油酸(CLN)-----	14





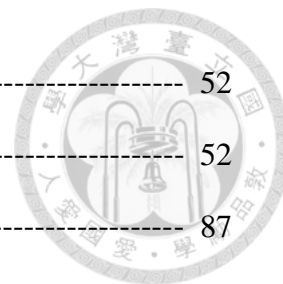
1. 介紹-----	14
2. 共軛次亞麻油酸之功效-----	15
3. 共軛次亞麻油酸 (CLN) vs 共軛亞麻油酸 (CLA) -----	15
4. 苦瓜中共軛次亞麻油酸之相關研究-----	16
六、代謝體學-----	16
七、CLA 及 CLN 文獻整理-----	18
第三節 實驗假說與設計-----	29
一、實驗假說-----	29
二、研究內容-----	29
第二章 前言-----	30
第三章 材料與方法-----	31
一、實驗大綱-----	31
二、動物飼養-----	32
三、飼料-----	32
(一) Basal diet-----	32
(二) CLA diet-----	32
(三) <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11, <i>trans</i> -13 conjugated linolenic acid (Crude, 76 % purity)-----	32
(四) <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11, <i>trans</i> -13 conjugated linolenic acid (high purity CLN, 99 % purity)-----	32
四、糞便、尿液收集-----	35
五、氧氣消耗量、二氧化碳排出量、呼吸商分析-----	35
六、飽食血清收集-----	35
七、動物犧牲-----	35
(一) 器具準備-----	35



(二) 實驗流程-----	36
七、血醣濃度分析-----	36
八、胰島素濃度分析-----	36
九、Folch method 組織萃取-----	37
(一) 內標配製-----	37
(二) 萃取前器具處理-----	37
(三) 肝臟、腎周圍脂肪組織、肌肉、血清萃取-----	37
(四) 水層再萃取 (去除蛋白)-----	38
十、三酸甘油酯含量分析-----	38
(一) 血清 (犧牲當天操作)-----	38
(二) 組織-----	39
十一、膽固醇含量分析-----	39
(一) 血清 (犧牲當天操作)-----	39
(二) 組織-----	39
十二、GC-FID 分析組織脂肪酸組成-----	40
(一) 無水甲醇製備-----	40
(二) 組織有機層萃取液甲基酯化-----	40
(三) GC-FID 脂肪酸分析-----	40
十三、尿液 creatinine 定量-----	41
十四、LC-MS 分析組織代謝物-----	41
十五、RNA 抽取-----	42
十六、RNA 轉錄成 cDNA-----	42
十七、Real-time qPCR 分析 PPARs 及其下游基因表現-----	43
十八、統計分析-----	43
第四章 實驗結果-----	44



一、體重變化、攝食量、攝食利用率、能量攝取及能量利用率-----	44
二、器官及組織絕對重量與相對重量-----	44
三、氧氣消耗量及二氧化碳排出量分析-----	45
四、血清分析結果-----	45
(一) 血清葡萄糖及胰島素分析-----	45
(二) 血清三酸甘油酯及膽固醇分析-----	46
五、組織三酸甘油酯及膽固醇含量分析-----	46
(一) 肝臟組織-----	46
(二) 腎臟週圍脂肪組織-----	46
(三) 肌肉組織-----	46
六、組織脂肪酸組成-----	47
(一) 肝臟脂肪酸組成(%)-----	47
(二) 腎周圍脂肪組織 (RWAT) 脂肪酸組成-----	47
(三) 血清脂肪酸組成-----	48
(四) 肌肉脂肪酸組成-----	49
七、肝臟 real-time PCR 基因表現-----	50
八、子宮周圍脂肪 (UWAT) 組織 real-time PCR 基因表現-----	50
九、組織代謝物與 B 組具顯著差異之代謝物/代謝途徑預測-----	50
(一) 肝臟組織代謝物預測-----	50
(二) 腎周圍脂肪組織代謝物預測-----	51
(三) 血清代謝物預測-----	51
(四) 尿液代謝物預測-----	51
十、A、N、H 組與 B 組具顯著差異之組織代謝途徑預測-----	51
(一) 肝臟組織代謝途徑預測-----	51
(二) 腎週圍脂肪組織代謝途徑預測-----	52



(三) 血清代謝途徑預測-----	52
(四) 尿液代謝途徑預測-----	52
第五章 討論-----	87
一、共軛脂肪酸影響組織脂質含量-----	87
(一) 10 <i>t</i> ,12 <i>c</i> -CLA 造成肝臟脂質堆積-----	87
(二) 9 <i>c</i> ,11 <i>t</i> ,13 <i>t</i> -CLN 未造成肝臟脂質堆積-----	88
二、CLA 與胰島素抗性-----	88
三、高純度 c9 <i>t</i> 11 <i>t</i> 13 CLN 增高呼吸商 (RQ)-----	89
四、共軛脂肪酸改變組織脂肪酸組成-----	89
(一) 9 <i>c</i> ,11 <i>t</i> ,13 <i>t</i> -CLN 轉變成 c9 <i>t</i> 11 CLA-----	89
(二) 共軛脂肪酸影響脂肪酸代謝-----	90
(三) t10 <i>c</i> 12 CLA 活化 PPAR $\alpha$ -----	91
(四) 共軛脂肪酸之代謝-----	91
1. 9 <i>c</i> ,11 <i>t</i> -CLA 與 10 <i>t</i> ,12 <i>c</i> -CLA 代謝-----	91
2. 共軛脂肪酸藉由競爭抑制脂肪酸合成-----	92
3. 共軛脂肪酸調控 desaturase 活性及表現量-----	92
五、共軛脂肪酸對肝臟及脂肪組織基因之調控-----	93
六、代謝體學結果分析-----	95
第六章 結論-----	97
第七章 參考文獻-----	98

表目錄



表 1-1、	2007 年行政院衛生署國民健康局所公佈之代謝症候群臨床定義----	2
表 1-2、	齧齒動物餵食CLA實驗飼料之影響 ( <i>in vivo</i> )-----	18
表 1-3、	人體補充 CLA 之體內生化值分析 ( <i>in vivo</i> )-----	21
表 1-4、	齧齒動物餵食 CLN 實驗飼料之影響 ( <i>in vivo</i> )-----	24
表 1-5、	人體補充 CLN 後之生化值影響 ( <i>in vivo</i> )-----	28
表 3-1、	實驗飼料配方-----	34
表 4-1、	C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週之體重、攝食量與能量利用率----	54
表 4-2、	C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後犧牲時器官絕對重量-----	55
表 4-3、	C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料五週後犧牲時器官相對重量-----	56
表 4-4、	C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後犧牲時脂肪組織及肌肉組織絕 對重量-----	57
表 4-5、	C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後犧牲時脂肪組織及肌肉組織相 對重量-----	58
表 4-6、	C57BL/6J 餵食雌鼠實驗飼料 4 週進食血清葡萄糖及 5 週後犧牲時禁 食血清葡萄糖濃度-----	62
表 4-7、	餵食 C57BL/6J 雌鼠實驗飼料四週進食及五週後犧牲之血清胰島素 濃度-----	63
表 4-8、	C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後血清中三酸甘油酯及膽固醇濃 度-----	65
表 4-9、	C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後肝臟三酸甘油酯及膽固醇含量	66
表 4-10、	C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後之 RWAT 三酸甘油酯及膽固醇 含量-----	67
表 4-11、	C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後肌肉三酸甘油酯及膽固醇含量	68

表 4-12、 C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後肝臟脂肪酸組成-----	69
表 4-13、 C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後腎周圍脂肪組織 (RWAT) 脂肪 酸組成-----	71
表 4-14、 C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後血清組織脂肪酸組成-----	72
表 4-15、 C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後肌肉細胞脂肪酸組成-----	73
表 4-16、 C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後與 B 組具顯著差異之肝臟代謝 物預測-----	76
表 4-17、 C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後與 B 組具顯著差異之腎周圍脂 肪組織代謝物預測-----	78
表 4-18、 C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後與 B 組具顯著差異之血清代謝 物預測-----	79
表 4-19、 C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後與 B 組具顯著差異之尿液代謝 物預測-----	81
表 4-20、 C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後與 B 組相較可能改變之肝臟代 謝途徑預測-----	82
表 4-21、 C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後與 B 組相較可能改變之腎週圍 脂肪組織代謝途徑預測-----	84
表 4-22、 C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後與 B 組相較可能改變之血清代 謝途徑預測-----	85
表 4-23、 C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後與 B 組相較可能改變之尿液代 謝途徑預測-----	86
表 5-1、 C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週之脂質代謝影響-----	96

## 圖目錄



圖 1-1、	PPAR $\alpha$ 影響肝臟脂肪酸氧化及能量代謝情形。	4
圖 1-2、	PPARs 與 PPARs cofactor 調控下游基因轉錄之 model。	5
圖 1-3、	亞麻油酸 (LA) 及共軛亞麻油酸 (9 <i>c</i> ,11 <i>t</i> -CLA 與 10 <i>t</i> ,12 <i>c</i> -CLA) 結構。	7
圖 1-4、	10 <i>t</i> ,12 <i>c</i> -CLA 抑制 PPAR $\gamma$ 活化之機制。	9
圖 1-5、	10 <i>t</i> ,12 <i>c</i> -CLA 抑制 PPAR $\gamma$ 活性之機制總覽。	10
圖 1-6、	10 <i>t</i> ,12 <i>c</i> -CLA 促進脂肪細胞 lipolysis。	12
圖 1-7、	10 <i>t</i> ,12 <i>c</i> -CLA 造成胰島素抗性的可能機制。	13
圖 1-8、	10 <i>t</i> ,12 <i>c</i> -CLA 促進脂肪細胞凋亡。	14
圖 1-9、	(A) 次亞麻油酸與 (B) 共軛次亞麻油酸之結構。	15
圖 1-10、	代謝體學常以不同分析方式共同推測最終代謝物。	17
圖 4-1、	C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週之生長曲線。	53
圖 4-2、	C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 3-5 週之氧氣消耗量。	59
圖 4-3、	C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 3-5 週之二氧化碳排出量。	60
圖 4-4、	C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 3-5 週之呼吸商曲線下面積。	61
圖 4-5、	C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後犧牲之胰島素抗性指標 (HOMA-IR index)。	64
圖 4-6、	C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後肝臟基因表現。	74
圖 4-7、	C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後子宮周圍脂肪組織基因表現。	75

## 第一章 緒論



### 第一節 研究動機與目的

由於飲食及生活型態改變，近年全球肥胖人數有增加趨勢。肥胖為許多疾病之危險因子。例如：肥胖提高罹患第二型糖尿病、心血管疾病、高血壓等疾病的機率。

本實驗室研究顯示山苦瓜乙酸乙酯萃物中共軛次亞麻油酸 (*cis*-9, *trans*-11, *trans*-13 conjugated linolenic acid, 9*c*, 11*t*, 13*t*-CLN) 能活化 peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)  $\alpha$  及  $\gamma$  (*in vitro*) (Chuang et al. 2006, Hsu et al. 2012a)，推測 9*c*, 11*t*, 13*t*-CLN 藉由活化 PPARs 調控小鼠脂質代謝，因此本實驗研究 9*c*, 11*t*, 13*t*-CLN 於體內影響脂質代謝情形 (*in vivo*)。

### 第二節 文獻回顧

#### 一、肥胖

由於生活型態改變、運動量不足、飲食西化，肥胖人數逐年增加。肥胖 (obesity) 常導致罹患許多慢性疾病，例如：高血壓 (hypertension)、冠狀動脈心臟病 (cardiovascular disease, CVD)、第二型糖尿病 (Type 2 diabetes)、脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)、癌症 (cancer)。根據 2008 年世界衛生組織 (World Health Organization) 所供資料顯示，全球已超過 1 億人口體重過重、超過 3 億人口患肥胖相關疾病 (Hontecillas et al. 2008)。

代謝症候群 (metabolic syndrome) 是近幾十年來健康熱門議題，此名詞於 1988 年由 Reaven 提出，Reaven 指出腹部型肥胖與高血脂、高血壓、糖尿病密切相關，此類病人罹患心血管疾病機率較一般人高，因具臨床性意義，故歸納成一種症後群 (Reaven 1988)。根據 2007 年行政院衛生署國民健康局所提供之代謝症候群診斷標準 (表 1-1)，五項危險因子若含三項以上，即可判定為代謝症候群。



表 1-1、2007 年行政院衛生署國民健康局所公佈之代謝症候群臨床定義

Table 1-1. Taiwan clinical criteria for metabolic syndrome

以下 5 項危險因子中，若包含 3 項或以上者，即可判定為代謝症候群

危險因子	異常值
腹部肥胖 (Central obesity)	腰圍 (waist) : 男性 $\geq 90$ cm 女性 $\geq 80$ cm
血壓 (BP) 上升	SBP $\geq 130$ mmHg / DBP $\geq 85$ mmHg
高密度脂蛋白膽固醇 (HDL-C) 過低	男性 $< 40$ mg/dl 女性 $< 50$ mg/dl
空腹血糖值 (Fasting glucose) 上升	FG $\geq 100$ mg/dl
三酸甘油酯 (Triglyceride) 上升	TG $\geq 150$ mg/dl

備註：上述危險因子中「血壓上升」、「空腹血糖值上升」之判定，包括依醫師處方使用降血壓或降血糖等藥品（中、草藥除外），血壓或血糖之檢驗值正常者。（行政院衛生署國民健康局, 2007）

## 二、糖尿病 (Diabetes mellitus)

亞洲地區，例如：臺灣、香港、新加坡、中國大陸等地第二型糖尿病 (Type 2 diabetes) 患者占全球糖尿病患的 1/5，臺灣 2300 萬總人口第二型糖尿病患者達 150 萬人 (Chang et al. 2010)。根據 2000 年資料顯示全球已有 1.7 億人罹患第二型糖尿病，推估 2030 年患病人數會增至 3.7 億人口 (Wild et al. 2004)，因此如何在糖尿病前期控制、避免惡化為糖尿病即為現今重要議題。

糖尿病是一種因胰島素分泌、作用異常，導致高血糖症狀出現的慢性代謝疾病，會對眼睛、腎臟、神經、心血管造成損害，嚴重可致死。罹患糖尿病前的過渡期稱為糖尿病前期，判定標準為：(1) 空腹血糖異常 (impaired fasting glucose, IFG): 空腹血糖值在 100 mg/dL 至 125 mg/dL 之間；(2) 葡萄糖耐受性異常 (Impaired glucose tolerance, IGT): 口服葡萄糖耐量測試結果異常，血糖介 140 至 199 mg/dL 之間 (oral glucose tolerance test OGTT, 測試方法為攝入含 75 克葡

萄糖水，在 2 小時內測 4 次血糖)，若能在此時期進行控制，可避免惡化為糖尿病 (Charles 1967)。

### 三、肝臟之醣類調控及脂質堆積 (圖 1-1)

葡萄糖為許多細胞之能量來源，當血糖升高，肝臟可藉由肝醣合成 (glycogenesis) 將葡萄糖儲存，當血糖降低則會促使肝臟進行肝醣分解 (glycogenolysis) 及醣質新生 (gluconeogenesis)，將葡萄糖釋放至血液中，藉此維持血糖恆定。

當動物能量攝取過多，促使 (1)肝臟肝醣合成及儲存，(2)葡萄糖代謝物 Acetyl-CoA 合成脂肪酸及三酸甘油酯 (triglyceride, TG)，最終將 TG 儲存於白色脂肪組織 (Reddy and Hashimoto 2001)。參與醣質新生之主要酵素為 phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)、fructose-1,6-bisphosphatase (F1,6BP)、pyruvate kinase (PK)、6-phosphofructo-1-kinase (PFK)，而參與肝醣合成之酵素有 glucokinase (GK) (Nordlie, Foster and Lange 1999)。

肝臟脂肪堆積分為飲酒所引起之 alcoholic fatty liver disease (AFLD) 與非飲酒所造成之 nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)。脂肪肝 (hepatic steatosis) 可視為過多能量儲存於肝臟之結果，當肝臟脂質超過體內總脂質 5~10% 即為脂肪肝。

血液 free-fatty acid (FFA) 濃度過高、胰島素抗性 (insulin resistance)、氧化壓力 (oxidative stress)、發炎物質 Adiponectin 及 tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) 皆會促進肝臟脂質堆積 (Lewis and Mohanty 2010)。文獻指出 NAFLD 會增加罹患心血管疾病之機率 (Fukumoto et al. 2008)。76% 肥胖者與 50% 糖尿病患者皆造成 NAFLD，進而促進肝臟脂質合成及抑制脂肪酸  $\beta$ -oxidation。

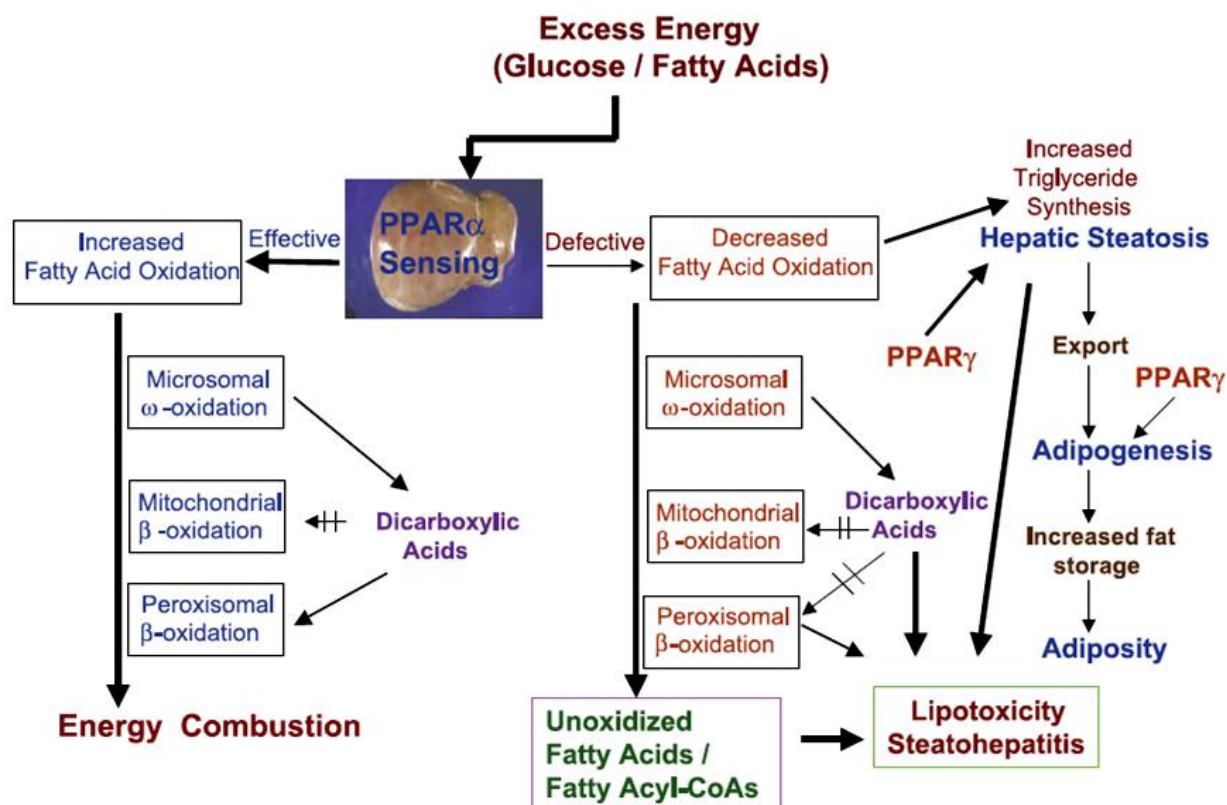


圖 1-1、PPAR $\alpha$  影響肝臟脂肪酸氧化及能量代謝情形。

Fig.1-1. Cross-talk between fatty acid oxidation systems and PPAR $\alpha$  in energy metabolism in the liver. (Reddy and Rao 2006)

#### 四、PPARs

PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors) 為轉錄因子 (transcription factor)，可調控下游基因表現。PPARs 依功能分為數種 isotype，PPAR $\alpha$ 、PPAR $\beta/\delta$ 、PPAR $\gamma$ ，其可參與葡萄糖、脂質代謝。

當 PPAR agonist (ligand) 與 PPAR 結合後，PPAR 會與 9-*cis*-retinoic acid receptor (RXR) 形成活化態之 PPAR/RXR heterodimers，PPAR/RXR 再與 DNA 序列上之 PPAR response elements (PPREs) 結合，促進下游基因轉錄 (圖1-2)。活化態之 PPAR 調控基因表現須 PPAR cofactor 參與。例如: steroid receptor coactivator (SRC)-1、PPAR-binding protein (PBP)、PPAR- $\gamma$ -coactivator-1 (PGC-1)、PPAR interaction protein (PRIP) (Zhu et al. 2000)。

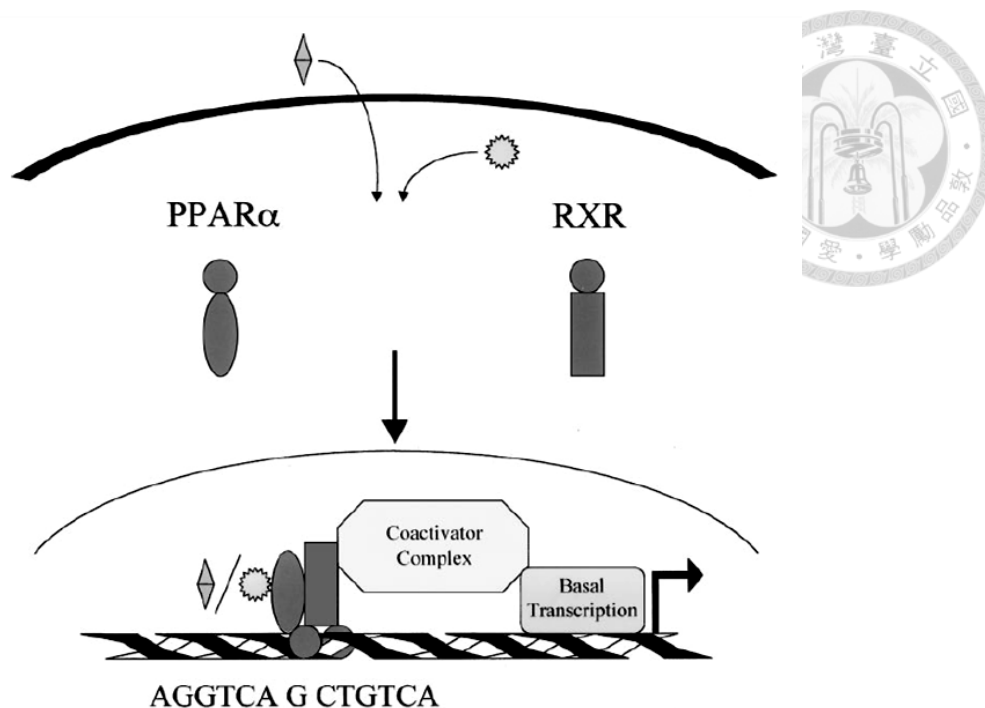


圖 1-2、PPARs 與 PPARs cofactor 調控下游基因轉錄之 model。

Fig.1-2. A model depicting the interaction of the PPAR $\alpha$  – coactivator complexes with basal transcription machinery, leading to enhances transcription of target genes.

(Reddy and Hashimoto 2001)

PPAR $\alpha$  在可氧化脂肪酸之許多組織皆有表現，例如：肝、腎、肌肉、睪丸、棕色脂肪等等。PPAR $\alpha$  會增加粒線體、過氧化體  $\beta$ -oxidation，使細胞能量來源偏向利用脂肪酸。PPAR $\alpha$  對於皮膚及中樞神經系統發育也具重要性 (Kliewer et al. 1994, Cullingford et al. 1998, Braissant and Wahli 1998)。PPAR $\beta$  在許多組織皆有表現，參與調控範圍較廣。

PPAR $\gamma$  主要表現於白色脂肪組織 (white adipose tissue, WAT) 及棕色脂肪組織 (brown adipose tissue, BAT)，腸黏膜細胞、脾臟也有顯著表現，但於肝臟、肌肉表現量低 (Tontonoz et al. 1994)。Insulin 及 corticosteroids 會促進 PPAR $\gamma$  表現，TNF $\alpha$  會抑制 PPAR $\gamma$  表現。文獻指出，當動物能量攝取過多，肝臟 TG 合成增加，此時 PPAR $\gamma$  促進脂肪細胞生合成 (adipogenesis)。(Xing et al. 1997, Hill et al. 1997)。

調控 PPARs 活性之 ligand 為自然存在或人工合成的化合物。治療第二型糖尿病之藥物 TZD (thiazolidinediones) 為 PPAR agonist，會活化 PPAR $\gamma$  並改善胰

島素抗性及葡萄糖耐受性，但服用此類藥物會導致體重增加、水腫等副作用情形產生 (Bajare et al. 2012)。某些脂肪酸，例如：C20:5n-3 (EPA)、C22:6n-3 (DHA) 及 phytanic acid 等長鏈多元不飽和脂肪酸 (very long chain fatty acids, VLCFAs) 為 PPAR $\alpha$  agonist (Gonzalez, Peters and Cattley 1998)。除 VLCFAs 之外，近年研究發現共軛脂肪酸能活化 PPARs。文獻指出 CLA 會活化 PPAR $\alpha$ 、抑制 PPAR $\gamma$  表現 (Moya-Camarena et al. 1999)。

本實驗室研究發現自苦瓜分離出的共軛次亞麻油酸 9*c*,11*t*,13*t*-CLN 能活化 PPAR $\alpha$  及  $\gamma$  (Chuang et al. 2006)。Bassaganya-Riera 等人指出另一種共軛次亞麻油酸 punicic acid (PA, 9*c*,11*t*,13*c*-CLN) 能活化 PPAR $\alpha$  (Bassaganya-Riera, Guri and Hontecillas 2011) 及 PPAR $\gamma$  (Hsu et al. 2012b, Lu et al. 2013)。

## 五、共軛脂肪酸

共軛脂肪酸 (conjugated fatty acids) 是一群具有幾何、位置不同造成結構不同之多元不飽和脂肪酸，具多種異構物，含共軛雙鍵結構，近年研究發現共軛脂肪酸對於改善生物體生理狀況具有很大潛力 (Arao K et al., 2004)。

共軛亞麻油酸 (conjugated linoleic acid, CLA) 在自然界含量少，含量低於總油脂百分之一。共軛次亞麻油酸 (conjugated linolenic acid, CLN) 於某些植物種子油脂中含量高，約占總油脂之 42~83%，例如： $\alpha$ -eleostearic acid (9*c*,11*t*,13*t*-CLN， $\alpha$ -ESA)、punicic acid (9*c*,11*t*,13*c*-CLN)、catalpic acid (9*t*,11*t*,13*c*-CLN) 及 calendic acid (8*t*,10*t*,12*c*-CLN) (Kohno H et al.,2002)。CLA 與 CLN 對動物體或人體之影響、比較，參照 (表1-2 ~ 1-5) 文獻整理。

### (一) 共軛亞麻油酸 (CLA)

#### 1. 介紹:

共軛亞麻油酸為 18 碳 2 個雙鍵的共軛脂肪酸，雙鍵依位置、順/反式結構不同而形成多種異構物。自然界中 CLA 異構物超過 25 種，其中以 *cis*-9, *trans*-11 CLA (9*c*,11*t*-CLA, 9*Z*11*E*-CLA) 及 *trans*-10, *cis*-12 CLA (10*t*,12*c*-CLA, 10*E*12*Z* CLA) 兩種異構物含量最多 (圖 1-3)，且具較高生物活性 (Steinhart H et al., 2003) (Benjamin S et al., 2005)。

自然界 CLA 主要存於牛乳、牛肉製品中，由牛腸道細菌將亞麻油酸

(C18:2n-6, linoleic acid, LA) 轉變而來，為 LA 之中間代謝物，90% 為 9*c*,11*t*-CLA (又稱 ruminic acid)，其次 3~5% 為 10*t*,12*c*-CLA (Hughes, Hunter and Tove 1982)。牛乳、牛肉製品中，CLA 含量依動物飼料、加工過程不同而異，約占牛肉總油脂 0.34% ~ 1.07%、乳製品總油脂 0.12% ~ 0.68%。(Khanal and Olson 2004)。

CLA 於自然界存量少，人類平均每日僅從牛肉、乳製品中獲得 150~200 mg CLA/day (血中 CLA 含量約為 10~70  $\mu\text{mol/L}$ )。若欲達到減重或降體脂目的，每日 CLA 攝取量須達 3~4g/day (Jiang, Wolk and Vessby 1999, Ritzenthaler et al. 2001)。

市售 CLA 補充劑是以富含 LA 的植物油製成。例如：以紅花籽油 (safflower oil) 製成主要含有 9*c*,11*t*-CLA 及 10*t*,12*c*-CLA 之 CLA mixture，CLA 主要以 TG、FFA 形式存在 (Chin et al. 1992, Wallace et al. 2007)。

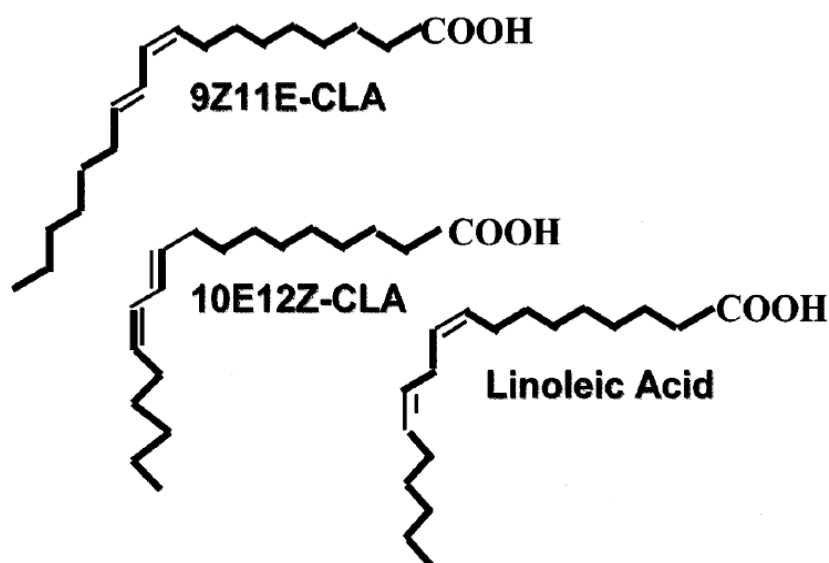


圖 1-3、亞麻油酸 (LA) 及共軛亞麻油酸 (9*c*,11*t*-CLA 與 10*t*,12*c*-CLA) 結構。  
Fig. 1-3. Structures of linoleic acid (LA) and conjugated linoleic acids (9*c*,11*t*-CLA and 10*t*,12*c*-CLA).

## 2. CLA 抗肥胖

Ha 等人於 1987 年指出 CLA 能預防心血管疾病 (Ha, Grimm and Pariza 1987)。後因文獻指出 CLA 也具抗肥胖功效，CLA 開始被廣泛研究 (Benjamin S et al., 2009)。研究發現，CLA 具有預防動脈粥狀硬化、降低體脂肪、預防高血壓、免疫調節、細胞凋亡調控、抗癌等功效 (Arao K et al., 2004)。CLA 對細胞及動物體影響程度依劑量 (dose)、異構型式 (isomers) 而異。

文獻指出 CLA 可顯著降低小鼠、大鼠、豬等其他動物體脂肪，又以 CLA mixture (主要為 9*c*,11*t*-CLA 及 10*t*,12*c*-CLA) 及 10*t*,12*c*-CLA 具有較佳降體脂功效。例如: Perk (1997) 等人研究指出餵食 4 週 0.5 % CLA mixture 飼料之 ICR mice，CLA 會降低脂肪細胞脂質儲存及增加骨骼肌 fatty acid  $\beta$ -oxidation，進而降低 60 % 體脂肪 (body fat mass) (Park et al. 1997)。

### (1) 降低攝食量

Cao (2007) 等人指出大鼠注射 CLA mixture 後，下視丘之 neuropeptide Y(NPY) 及 agouti-related protein (AGRP) 基因表現被抑制，造成動物食慾降低 (Cao et al. 2007)。許多動物實驗發現，攝食 CLA 飼料之動物，其攝食量及體重不受影響，顯示 CLA 能降低體脂肪 (body fat) 非因食慾降低。

### (2) 增加能量消耗

位於粒線體內膜上之 uncoupling proteins (UCPs) 會促使 intermembrane space 的 H<sup>+</sup> 通過 UCP 蛋白進入 inner membrane 進而產生熱，因此 UCPs 表現量增加可提高熱能產生。UCP1 主要表現於 BAT。UCP2 為 UCPs 表現量最大者，表現在許多組織中，例如: WAT。UCP3 主要表現在肌肉和其他組織。

許多文獻指出啮齒動物餵食 t10c12 CLA 或 CLA mixture 後，可增加白色脂肪組織 UCP2 及 Carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1) 基因表現量，促進產熱及脂肪酸  $\beta$  氧化 (House et al. 2005, Takahashi et al. 2002, Kang et al. 2004)。

### (3) 抑制脂肪細胞生合成

Preadipocyte 分化成 adipocyte 須受 PPAR $\gamma$  及 CAAT/enhancer binding protein (C/EBP) 兩種轉錄因子調控 (Miller et al. 2008)。10*t*,12*c*-CLA 能抑制 PPAR $\gamma$  與 C/EBP 表現及活化，也能活化 NF $\kappa$ B、mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway，因此抑制 PPAR $\gamma$  下游基因表現 (圖 1-5) (Chung et al. 2005, Adams et al.

1997)。

10*t*,12*c*-CLA 活化 MAPK pathway 之 extracellular-signal regulated kinase (ERK), 使 PPAR $\gamma$ 2 Ser112 因磷酸化而降低活性、抑制 preadipocyte 分化 (Floyd and Stephens 2002)。

文獻指出 10*t*,12*c*-CLA 抑制 adipogenic gene、insulin-stimulated glucose uptake 主要受 ERK 及 NF $\kappa$ B 調控 (圖 1-4), 然而目前 NF $\kappa$ B 與其他 inflammatory transcription factor 抑制 PPAR $\gamma$  活性之機制未清楚了解 (Kennedy et al. 2010, Brown et al. 2004)。

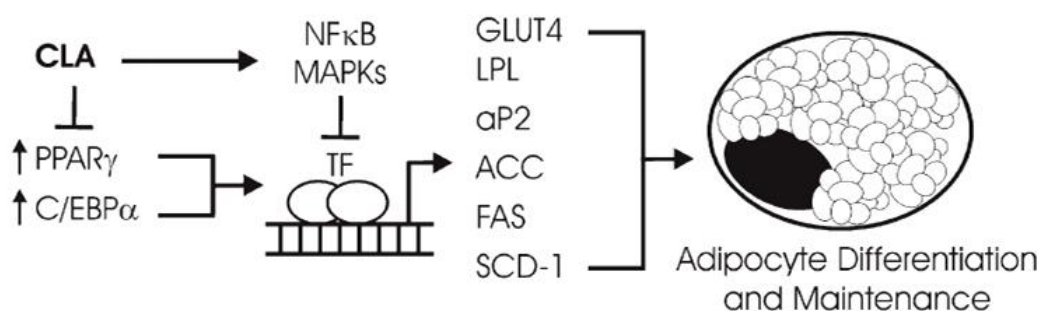


圖1-4、10*t*,12*c*-CLA 抑制 PPAR $\gamma$  活化之機制。

Fig. 1-4. 10*t*,12*c*-CLA antagonizes the expression and activity of PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$ , master regulators of adipocyte differentiation and maintenance. (Kennedy et al. 2010)



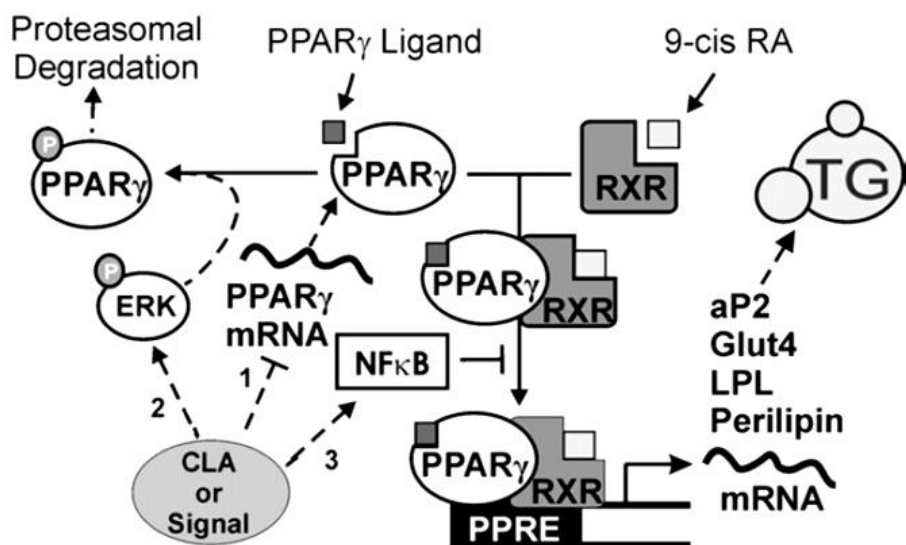


圖1-5、10*t*,12*c*-CLA抑制PPAR $\gamma$ 活性之機制總覽。

Fig. 1-5. 10*t*,12*c*-CLA may antagonize PPAR $\gamma$  activity by (1) decreasing PPAR $\gamma$  gene expression; (2) enhancing PPAR $\gamma$  degradation via phosphorylation, ubiquitination and proteasome degradation; or (3) increasing NF $\kappa$ B activation, which impairs PPAR $\gamma$  DNA binding and subsequent induction of adipogenic and lipogenic gene expression. (Kennedy et al. 2010)

### 3. 促進發炎反應

白色脂肪組織除儲存 TG，也分泌 proinflammatory cytokines，例如：TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )，這些由脂肪細胞分泌的 adipokines 會抑制脂肪細胞脂質合成 (lipid synthesis)、增加脂質分解 (lipolysis) 及造成胰島素抗性 (Brown et al. 2004)。

研究指出，經 10*t*,12*c*-CLA 刺激作用，可增加小鼠或人類脂肪細胞分泌 IL-6、IL-8、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ ，抑制 PPAR $\gamma$  活性及降低胰島素敏感性 (insulin sensitivity) (*in vitro*) (Purushotham et al. 2007)。

CLA 促進胰島素抗性及抑制脂肪細胞生合成的原因為 (1) IKK 活化使 I $\kappa$ B  $\alpha$  降解進而抑制 PPAR $\gamma$  活性 (2) 活化 MAPK pathway 之 ERK。

#### 4. 調控脂質代謝

##### (1) 抑制脂質合成

脂肪細胞主要功能為以 TG 形式儲存 FA，脂肪細胞中有許多酵素參與脂質合成，例如: acetyl-Co A carboxylase (ACC)、fatty acid synthase (FAS)、stearoyl-Co A desaturase (SCD)。

文獻指出 10*t*,12*c*-CLA 或 CLA mixture 會活化 PPAR $\gamma$ ，使 lipogenesis 酵素表現量降低 (LaRosa et al. 2006, Brown et al. 2003)。

CLA 可抑制脂肪細胞 SREBP-1 (lipogenic transtription factor) 及 glucose transport 4 (GLUT4) 基因表現。Choi (2000) 等人研究發現 t10c12 CLA 或 CLA mixture 可降低啮齒動物及 primary human adipocyte 之單元不飽和脂肪酸(monounsaturated fatty acid, MUFA) 含量 (*in vitro*)，推測 CLA 可抑制 SCD-1 表現，降低 MUFA 生合成 (Choi et al. 2000)。

Nestel (2006) 等人將 apoE 缺乏的糖尿病小鼠補充 c9t11 CLA 後，發現小鼠血中三酸甘油酯濃度降低而 HDL 濃度增加 (Nestel, Fujii and Allen 2006)。

##### (2) 促進脂肪細胞三酸甘油酯分解

CLA 抑制 cAMP 轉變成 5'AMP，促進 cAMP 活化 Hormone sensitive lipase (HSL)，促使白色脂肪細胞 lipolysis (圖 1-6)。脂肪細胞將儲存之 TG 分解成 glycerol 及 FA，釋放至血中的 FFA 再被具有代謝活性的組織 uptake (例如: liver、muscle) (Park et al. 1997)。LaRosa (2006) 等人研究發現 C57BL/6J mcie 餵食 3 天含有 10*t*,12*c*-CLA 之飼料，HSL mRNA 表現量增加，直至餵食第 17 天，HSL 表現才下降，推測脂肪細胞 lipolysis 持續進行、直到脂肪細胞 TG 耗盡 (LaRosa et al. 2006)。

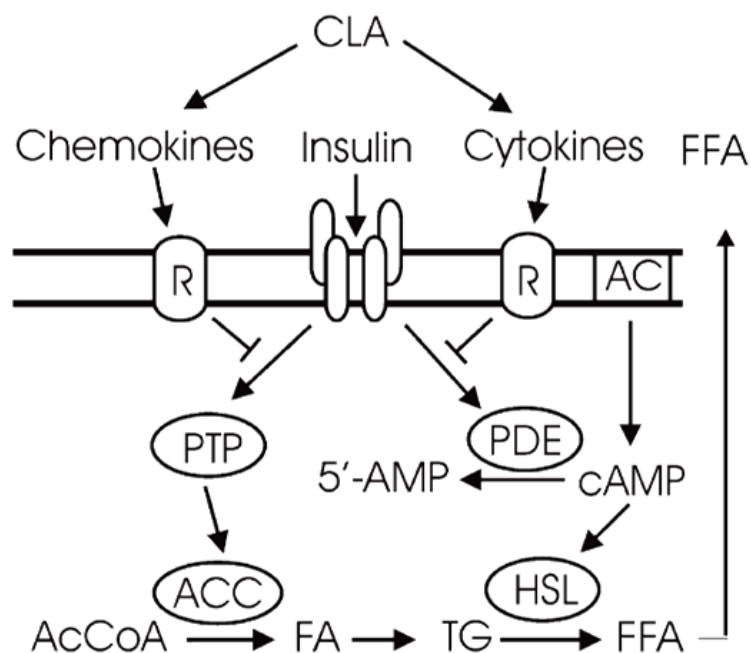


圖1-6、 $10t,12c$ -CLA促進脂肪細胞lipolysis。

Fig. 1-6.  $10t,12c$ -CLA increases lipolysis acutely and decreases lipogenesis chronically by decreasing phosphodiesterase (PDE) and ACC activities, respectively, key proteins regulated by insulin. (Kennedy et al. 2010)

## 5. 造成胰島素抗性

脂肪及肌肉細胞之葡萄糖汲取受 insulin 影響之 GLUT4 調控，當血糖濃度升高時，血液中葡萄糖會透過 GLUT4 進入脂肪及肌肉細胞。若胰島素訊號傳遞或 GLUT4 無法運至細胞膜，則造成胰島素抗性。文獻指出在人體或動物中，CLA mixture 或  $10t,12c$ -CLA 會增加血液胰島素濃度、造成胰島素抗性 (Wang and Jones 2004)，其原因為(1) CLA mixture 或  $10t,12c$ -CLA 抑制 insulin receptor substrate-1 (IRS-1) Ser307 位置磷酸化，使 IRS-1 被分解，進而破壞胰島素訊號傳遞及細胞汲取葡萄糖 (glucose uptake) (Ueki, Kondo and Kahn 2004)，或是(2) CLA mixture 或  $10t,12c$ -CLA 降低 GLUT4 及 glucose/fructose transporter 之 SLC2A5 基因表現 (LaRosa et al. 2007)。

目前已知 CLA 抑制胰島素訊號傳遞可能的機制為：(1) 活化 inflammatory pathways、stress kinases (2) 降低與 insulin signaling 及 glucose uptake pathways 相關之基因表現 (圖 1-7) (Kennedy et al. 2010)。

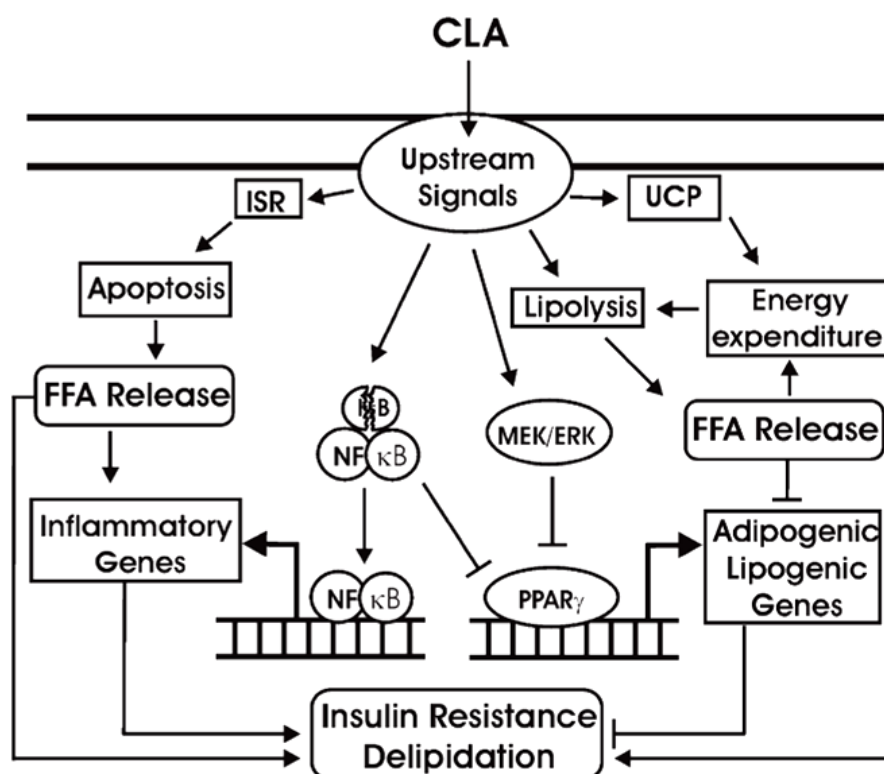


圖1-7、t10c12 CLA造成胰島素抗性的可能機制。

Fig. 1-7. Working model by which t10c12 CLA causes insulin resistance and delipidation in adipocytes. (Kennedy et al. 2010)

## 6. 促進 (pre)adipocyte apoptosis

影響 apoptosis 的因子有：(1) TNF $\alpha$ /death receptor (2) mitochondrial pathways (3) integrated stress response (ISR) (圖 1-8)。研究顯示 10*t*,12*c*-CLA 或 CLA mixture 能促進 3T3-L1 細胞及小鼠脂肪細胞凋亡 (apoptosis)。文獻指出，小鼠餵食 1.5% (w/w) CLA mixture 飼料，會增加 BAX (apoptosis inducer)/Bcl2 (apoptosis suppressor) 比值，促進 mitochondrial apoptosis。C57BL/6J mice 餵食 1% (w/w) CLA mixture 飼料，會降低體脂肪及增加白色脂肪組織中 TNF $\alpha$  (為 apoptosis 重要調控者) 基因表現，進而促進脂肪細胞 apoptosis。

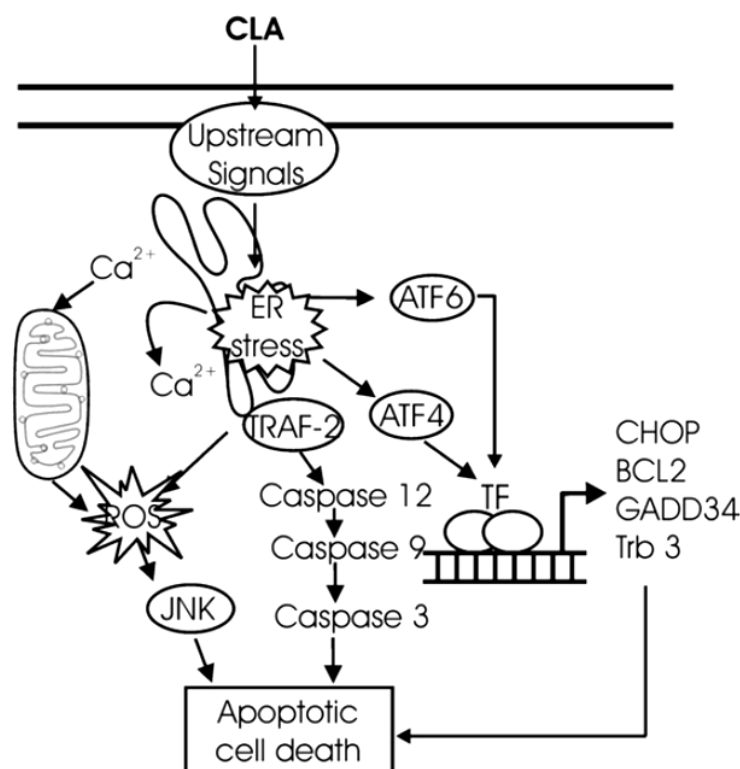


圖1-8、10*t*,12*c*-CLA 促進脂肪細胞凋亡。

Fig.1-8. 10*t*,12*c*-CLA increases apoptotic cell death of (pre)adipocytes by increasing ER stress.

## (二) 共軛次亞麻油酸 (CLN)

### 1. 介紹

共軛次亞麻油酸為 18 個碳 3 個雙鍵之共軛脂肪酸 (Octadecatrienoic acid)，為次亞麻油酸 ( $\alpha$ -linolenic acid, LN, C18:3n-3) 的異構物 (圖 1-9)。CLN 主要存於植物種子油脂中 (約占 0.2% 濕重、主要以 TG 形式存在) (Yurawecz et al. 1993)，例如：苦瓜 (*Momordica charantia* L.) 與油桐 (*Aleurites fordii*) 含有  $\alpha$ -eleostearic acid ( $\alpha$ -ESA, 9*c*,11*t*,13*t*-CLN)；石榴 (*Punica granatum* L.) 含有 punicic acid (9*c*,11*t*,13*c*-CLN, PA) (Elibal et al. 2011)。其他 CLN isomers 尚有 calendic acid (8*t*,10*t*,12*c*-CLN)、jacaric acid (8*c*,10*t*,12*c*-CLN) 及 catalpic acid (9*t*,11*t*,13*c*-CLN)。文獻指出苦瓜含有高量 CLN，苦瓜子油約有 63~68% 9*c*,11*t*,13*t*-CLN (Tan et al. 2008)。

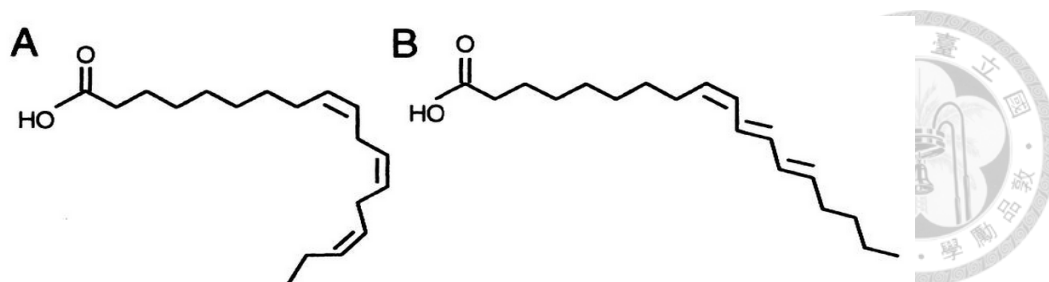


圖 1-9、(A) 次亞麻油酸與 (B) 共軛次亞麻油酸之結構。

Fig. 1-9. Comparison of the structures of fatty acids with methylene interrupted double bonds (A) vs. those that contain conjugated double bonds (B), Shown are (A)  $\alpha$ -linolenic acid ( $18:3\Delta^{9c,12c,15c}$ ), (B)  $\alpha$ -eleostearic acid ( $18:3\Delta^{9c,11t,13t}$ )

## 2. 共軛次亞麻油酸之功效

文獻指出 CLN 可抑制多種人類癌細胞 (human tumour cells) (Igarashi and Miyazawa 2000, Suzuki et al. 2001)。Koba (2002) 等人研究發現 CLN 可降低大鼠體脂肪含量 (Koba et al. 2002a)。Dhar (1998) 等人指出餵食 karela oil (富含  $9c,11t,13t$ -CLN) 之大鼠血液 TG 及膽固醇 (cholesterol, CHOL) 濃度顯著高於餵食 linseed oil (富含  $\alpha$ -linolenic acid, C18:3n-3) 之大鼠 (Dhar and Bhattacharyya 1998)。

許多文獻指出 CLNs 具有許多生物活性，例如：Dhar (2006) 等人以體外試驗證實， $9c,11t,13t$ -CLN 可隨著劑量的增加而降低發生心血管疾病以及糖尿病的風險 (Dhar et al. 2006)。Saha SS (2012) 等人研究發現，以 sodium arsenite (Sa) 誘發具氧化壓力之大鼠經口服 CLN isomers 後，可降低 HMG-CoA reductase 的活性 (Saha et al. 2012)。Pal M 及 Ghosh M (2012) 指出，CLN isomers 可改善 mercury chloride (MeHgCl) 誘發具氧化壓力大鼠之脂質氧化 (Pal and Ghosh 2012)。

## 3. 共軛次亞麻油酸 (CLN) vs 共軛亞麻油酸 (CLA)

CLA 是目前常見的健康食品，會藉由活化 PPAR $\alpha$  達到降體脂功效。但齧齒類動物補充 CLAs (尤其為  $10t,12c$ -CLA) 後，會造成脂肪肝及胰島素阻抗等代謝疾病。然而目前尚無發現文獻提及  $9c,11t$ -CLA 對動物有不佳的影響。

文獻指出  $9c,11t,13t$ -CLN 被大鼠吸收後，約 21 %  $9c,11t,13t$ -CLN 可轉化為  $9c,11t$ -CLA (Tsuzuki et al., 2006)，推測此轉化由具有 NADPH-dependent 特性的酵素，將  $9c,11t,13t$ -CLN 經由  $\delta$ -13-saturase 代謝成  $9c,11t$ -CLA (Tsuzuki et al., 2006)。

#### 4. 苦瓜中共軛次亞麻油酸之相關研究

Noguchi (2001) 等人指出以含有苦瓜籽油 (bitter melon oil, BMO) 之飼料餵食大鼠 4 週，大鼠除了血液 HDL 濃度增加外，肝臟脂肪酸  $9c,11t$ -CLA 與 C22:6n-3 (DHA) 含量也有增加 (Noguchi et al. 2001)。

本實驗室先前研究指出，山苦瓜乙酸乙酯萃物成分之一  $9c,11t,13t$ -CLN 能活化 PPAR $\alpha$ ，且  $9c,11t,13t$ -CLN 會增加大鼠 H4IIEC3 細胞 (肝癌細胞) 之 acyl CoA oxidase (ACO) 酵素活性。因此  $9c,11t,13t$ -CLN 在生物體內是否因 PPAR $\alpha$  活化增加其下游脂肪酸氧化之基因，以及或許  $9c,11t,13t$ -CLN 有其他可助保健的功效仍須進一步研究 (Chuang et al. 2006)。

## 六、代謝體學

代謝體學 (metabolomics) 用以研究細胞、組織或是整個生物體內代謝物分子的所有組成內容，為基因體學 (genomics) 和蛋白質體學 (proteomics) 之後新興研究領域 (Rochfort 2005)。

代謝體學研究可以大量且快速的比較出組別間代謝物之差異，藉由代謝物之差異分析最真實的生物狀態 (Murch et al. 2004)。代謝體學研究的範圍廣，可分析細胞、組織、器官組間狀態 (Kaddurah-Daouk, Kristal and Weinshilboum 2008)。組織代謝物可透過質譜儀，搭配強大的資料分析軟體，快速且大規模的檢測、比對組別之間差異性，有利於找出生物疾病標記或是做新藥的開發。

代謝體學常用的分析儀器有質譜儀 (Mass spectroscopy) (GC/MS, LC/MS, FTICR-MS)、核磁共振儀 (nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)、紅外光光譜儀 (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) 等等。預測的代謝物可經由 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 或 *MetaCore*<sup>TM</sup> database 分析可能參與的代謝路徑 (圖 1-10) (Trygg et al. 2005)。

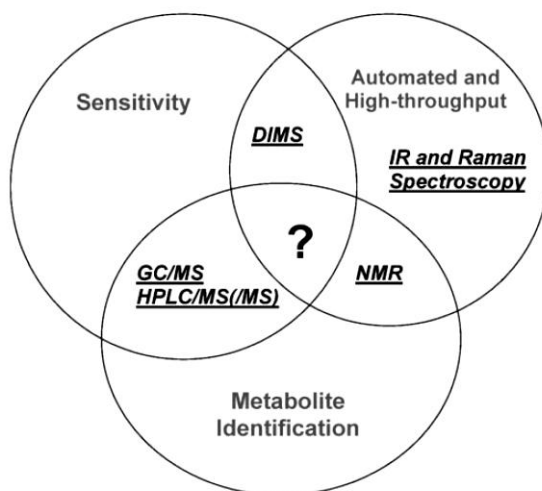


圖1-10、代謝體學常以不同分析方式共同推測最終代謝物。

Fig. 1-10. The 'payoff' between analytical technologies and the objectives of metabolomics.





### 七、共軛亞麻油酸 (CLA) 及共軛次亞麻油酸 (CLN) 文獻整理

將 CLA 或 CLN isomers 對小鼠、大鼠或人體影響之結果進行文獻整理，比較共軛脂肪酸對動物/人體之影響。

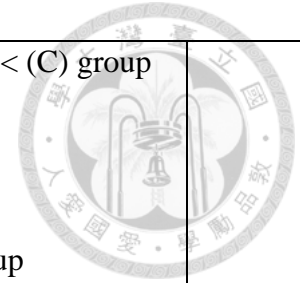
下方表格文獻整理欲比較共軛脂肪酸 (CLA、CLN) 與小鼠/大鼠/人體之體重、體脂肪、血液生化值或組織脂肪酸組成之差異，故以此當作搜尋文獻之依據 (表1-2 ~ 1-5)。

表 1-2、齧齒動物餵食CLA實驗飼料之影響 (*in vivo*)

Table. 1-2 Lists of effects of rodents fed test diet.

上升/增加或下降/減少：皆指 **test group** 與 **control group** 有顯著差異 ( $p < 0.05$ )

品系	飼料&飼養過程	結果	參考文獻	
ICR mice (male) (4 週齡)	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 5 天適應期</li> <li>✓ 分組:               <ul style="list-style-type: none"> <li>(1) 5.5% corn oil diet (control group)</li> <li>(2) 0.5% CLA+5% corn oil diet (test group)</li> </ul> </li> <li>✓ 實驗飼料飼養32天(實驗一)</li> <li>✓ 實驗飼料飼養 1 週(實驗二)</li> </ul>	<b>Test group v.s. control group:</b> <b>(實驗一)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ body weight、food intake:無差異</li> <li>✓ 體組成份改變:               <ul style="list-style-type: none"> <li>(1) Fat (%):減少</li> <li>(2) Protein、water、ash (%):增加</li> </ul> </li> </ul>	<b>CLA group v.s. control:</b> <b>(實驗二)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 實驗飼料飼養1週(實驗二)</li> <li>✓ 犧牲前禁食overnight</li> <li>✓ CPT activity:               <ul style="list-style-type: none"> <li>(1) Liver、脂肪組織:無差異</li> <li>(2) 肌肉組織:增加</li> </ul> </li> </ul>	(Park et al. 1997)
ICR mice (female) (7 週齡)	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 5 天適應期</li> <li>✓ 分組:               <ul style="list-style-type: none"> <li>(1) 5.5% corn oil diet (control group)</li> <li>(2) 0.5% CLA+5% corn oil diet (test group)</li> </ul> </li> <li>✓ 實驗飼料飼養28天(實驗一)</li> <li>✓ 實驗飼料飼養1週(實驗二)</li> </ul>	<b>Test group v.s. control group:</b> <b>(實驗一)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ body weight、food intake:無差異</li> <li>✓ 體組成份改變:               <ul style="list-style-type: none"> <li>(1) Fat (%):減少</li> <li>(2) Protein、water (%):增加</li> <li>(3) Ash (%):無差異</li> </ul> </li> </ul>		(Park et al. 1997)
Harlan Sprague-Dawley rat (6 週齡)	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 分組:               <ul style="list-style-type: none"> <li>(1) 0% CLA diet (control group)</li> <li>(2) 0.5% CLA diet -----(A) group</li> <li>(3) 1.0% CLA diet----- (B) group</li> </ul> </li> </ul>	<b>Test groups v.s. control group:</b> <b>(實驗一)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ body weight: 1.0%、1.5% CLA group 減輕</li> <li>✓ food intake、feed efficiency:無差異</li> </ul>		(Belury and Kempa-Steczko 1997)



	<p>(4) 1.5% CLA diet------(C) group</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 實驗飼料飼養6週</li> <li>✓ 飼料中CLA isomers: 43% 9c,11t-CLA and 9t,11c-CLA、45% 10t,12c-CLA, 6% 9c,11c-CLA, 10c,12c-CLA, 9t,11t-CLA, 10t,12t-CLA, 2% linoleate and 4% unidentified compound</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 肝臟 lipid (mg lipid/g liver): control group &lt; (A) &lt; (B) &lt; (C) group</li> <li>✓ <b>FA composition (%) (in liver): (Neutral lipids)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>(1) C18:0、C18:2n-6: (B)、(C) group 降低</li> <li>(2) C18:1n-9、C20:4n-6: (B)、(C) group 增加</li> <li>(3) C18:2(9,11-CLA): control group &lt; (A) &lt; (B)、(C) group</li> <li>(4) C18:2(10,12-CLA): control group &lt; (A) &lt; (B)、(C) group</li> </ul> </li> <li>✓ <b>FA composition (%) (in liver): (Phospholipids)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>(1) C18:2n-6: (C) group 降低</li> <li>(2) C18:2 (9,11-CLA): control group &lt; (A)、(B) &lt; (C) group</li> </ul> </li> </ul>	
<p>Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats (male) (4 週齡)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ OLETF rat 為 Type 2 diabetes 的 animal model: obesity、hypertriacylglycerolemia (6 wk)、insulin resistance (12 wk)、Type 2 diabete (30 wk)</li> <li>✓ 1 週適應期</li> <li>✓ 分組: (1)OLETF rats:     (A) 6.5% sunflower oil of diet (control)     (B) 5.5% sunflower oil + 1 % TG-CLA diet     (C) 5.5% sunflower oil + 1% FFA-CLA diet (2) LETF rats (control)</li> <li>✓ 實驗飼料飼養 4 週</li> <li>✓ 飼料含 CLA isomers: 33.2%</li> </ul>	<p><b>Test groups (B).(C) v.s. control group (A): (OLETF rats)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ body weight: 減輕</li> <li>✓ food intake: 無差異</li> <li>✓ RWAT (g)、EWAT(g): 降低</li> <li>✓ Serum leptin: 降低</li> <li>✓ Serum insulin、total CHOL、phospholipid: 無差異</li> <li>✓ CPT activity (in BAT): (B)、(C) 增加</li> </ul> <p><b>Test group (B) v.s. control group (A): (OLETF rats)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Serum TG、glucose: 無差異</li> <li>✓ CPT activity: 增加 (in 肌肉、肝); 無影響 (in RWAT)</li> </ul> <p><b>Test group (C) v.s. control group (A): (OLETF rats)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Serum TG、glucose: 降低</li> </ul> <p><b>OLETF rat (control) v.s. LETF rat:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ body weight、food intake: 增加</li> </ul>	<p>(Rahman et al. 2001)</p>

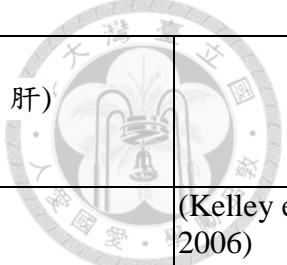

	<p>9<i>c</i>,11<i>t</i>-CLA、34% 10<i>t</i>,12<i>c</i>-CLA、3% 9<i>c</i>,11<i>c</i>-CLA and 10<i>c</i>,12<i>c</i>-CLA</p>	<p>✓ RWAT (g):降低                  ✓ CPT activity:增加(in BAT、RWAT)；無影響(in 肌肉、肝)</p>	
<p>C57BL/6N mice (female)(8 週齡)</p>	<p>✓ 分組:                  (1) (control group)                  (2) 0.5% 9<i>c</i>,11<i>t</i>-CLA diet                  (3) 0.5% 10<i>t</i>,12<i>c</i>-CLA diet                  ✓ 實驗飼料飼養7-56天                  ✓ CLA: 85-88 % pure</p>	<p><b>0.5 % 9<i>c</i>,11<i>t</i>-CLA group v.s. control group:</b>                  ✓ 組織重量、Lipid (mg/g tissue):                  ✓ 肝、脾臟、心臟、脂肪組織(Retroperitoneal adipose tissue):無差異                  ✓ FA composition (%):                  (1) 肝: C16:1n-7、C18:1n-9、C18:1n-7 降低，C18:2n-6 增加，9<i>c</i>,11<i>t</i>-CLA = 1%，10<i>t</i>,12<i>c</i>-CLA = 0.1%；MUFA:SFA ratio 降低                  (2) 脂肪組織: C18:0、C18:1n-9 降低，C14:0、C18:2n-6 增加，9<i>c</i>,11<i>t</i>-CLA = 3.9%，10<i>t</i>,12<i>c</i>-CLA = 0.3%</p> <p><b>0.5 % 10<i>t</i>,12<i>c</i>-CLA group v.s. control group:</b>                  ✓ 組織重量、Lipid (mg/g tissue):                  (1) 脾臟、心臟: 無影響 (2) 肝: 增加 (3) 脂肪組織 (Retroperitoneal adipose tissue):下降                  ✓ FA composition(%):                  (1) 肝: C18:2n-6、C20:4n-6、C22:6n-3 降低，C16:1n-9、C18:1n-9、C18:1n-7 增加，c9t11CLA = 0.1%，t10c12 CLA = 0.2%；MUFA:SFA ratio 增加                  (2) 脂肪組織: C18:0、C16:1n-7 降低，C16:0、C16:1n-9 增加，9<i>c</i>,11<i>t</i>-CLA = 0.2%，10<i>t</i>,12<i>c</i>-CLA = 1.2%</p>	<p>(Kelley et al. 2006)</p>

表 1-3、人體補充 CLA 之體內生化值分析 (*in vivo*)

Table 1-4. Lists of effects of conjugated linolenic acids in human.

升/增加或下降/減少：皆指 **test group** 與 **control group** 有顯著差異 ( $p < 0.05$ )

受試者	劑量&受試過程	結果	參考文獻
60 位過重受試者 (BMI = 25-35 kg/m <sup>2</sup> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 分組:</li> <li>(1) 9g olive oil/day (control group)</li> <li>(2) 1.7g CLA/day------(A) group</li> <li>(3) 3.4g CLA/day------(B) group</li> <li>(4) 5.1g CLA/day------(C) group</li> <li>(5) 6.8g CLA/day------(D) group</li> <li>✓ CLA 補充 12 週</li> </ul>	<b>Test groups v.s. control group:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Age、hight、weight、BMI: 無差異</li> <li>✓ Body fat mass: (B)、(D)降低</li> <li>✓ Lean body mass: (D)增加</li> <li>✓ Blood lipid:               <ul style="list-style-type: none"> <li>(1) TG、lipase activity、lipoprotein: 無影響</li> <li>(2) total CHOL、LDL-C: (A)、(B)降低</li> <li>(3) HDL-C: (D)降低</li> </ul> </li> </ul>	(Blankson et al. 2000)
17 位受試者 (20-41 歲, 女)	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 30 天適應期(3g sunflower oil/day)</li> <li>✓ 分組:</li> <li>(1) 3g sunflower oil/day (control group) (n=7)</li> <li>(2) 3g CLA/day (n=10)</li> <li>✓ CLA 補充 64 天</li> <li>✓ 飼料含 CLA isomers: 17 % 9c,11t-CLA、24 % 11c,13t-CLA、23 % 10t,12c-CLA、16 % 8t,10c-CLA、8 % 9t,11t-CLA and 10t,12t-CLA、12 % isomers</li> <li>✓ VO<sub>2</sub>、VCO<sub>2</sub> 計算能量消耗 (kcal/min) 及脂肪氧化 (fat oxidation) (g/min)</li> </ul>	<b>CLA group v.s. control group:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Age、hight、weight、BMI、body fat(%): 無差異</li> <li>✓ RQ(VCO<sub>2</sub>/VO<sub>2</sub>): 無差異 (CLA group: RQ = 0.85 ; control group: RQ = 0.84)</li> <li>✓ 能量消耗(kcal/min)(活動、休息時): 增加(走路時、休息時能量消耗無顯著差異)</li> <li>✓ 脂肪氧化(g/min):增加</li> </ul>	(Zambell et al. 2000)
22 位受試者 (19-24 歲) (BMI <30 kg/m <sup>2</sup> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 分組:</li> <li>(1) soybean oil (control group)</li> <li>(2) CLA group (市售CLA)</li> <li>✓ CLA 補充 8 週:</li> <li>1-4 週補充 0.7g CLA/day (<b>period 1</b>)、5-8 週補充 1.4g CLA/day (<b>period 2</b>)</li> </ul>	<b>Period 1、2 v.s. baseline: (CLA group)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 每日攝取醣類、脂質、蛋白質(% energy):無差異</li> <li>✓ Weight:無差異</li> <li>✓ Body fat(%): period 2 顯著比 baseline 低</li> <li>✓ 血液 TG、total CHOL、creatine kinase (U/L, 37°C): 無差異</li> </ul>	(Mougios et al. 2001)

	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 市售 CLA 膠囊每顆含 350mg CLA (49 % 9<i>c</i>,11<i>t</i>-CLA、51 % 10<i>t</i>,12<i>c</i>-CLA)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ HDL-C: Period 1、2 皆下降</li> <li>✓ FA(mmol/L)組成: (in serum)                             <ul style="list-style-type: none"> <li>(1) non-esterified fatty acids、TG: FA 含量無影響</li> <li>(2) phospholipid: C20:4n-6 減少 (in period 2)</li> </ul> </li> </ul> <p><b>Period 1、2 v.s. baseline: (control group)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ period1、2 與 baseline 相比，以上生化值檢測皆無顯著差異</li> </ul>	
<p>17 位受試者(女) (BMI ~22 kg/m<sup>2</sup>)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 分組:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>(1) sunflower oil (73 % linoleic acid) (control group)</li> <li>(2) 3.9g CLA/day</li> </ul> </li> <li>✓ CLA 補充 64 天</li> <li>✓ CLA 組成: 65 % 10<i>t</i>,12<i>c</i>-CLA、22.6 % 9<i>c</i>,11<i>t</i>-CLA、17.6% 11<i>c</i>,13<i>t</i>-CLA、23.6% 8<i>t</i>,10<i>c</i>-CLA、16.6% 9<i>t</i>,11<i>t</i>-CLA and 10<i>t</i>,12<i>t</i>-CLA、7.7% others</li> </ul>	<p><b>CLA group v.s. control group:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ weight、body fat(%): 無差異</li> <li>✓ blood lipid:無差異</li> </ul>	<p>(Zambell et al. 2000)</p>
<p>20 位受試者(10 男 10 女) (BMI ~23 kg/m<sup>2</sup>)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 分組:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>(1) 1.8g Hydrogel/day (control group)</li> <li>(2) 1.8g CLA/day (市售 CLA)</li> </ul> </li> <li>✓ CLA 補充 12 週</li> </ul>	<p><b>CLA group v.s. control group:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ weight: 無差異</li> <li>✓ body fat (%): 降低</li> </ul>	<p>(Thom, Wadstein and Gudmundsen 2001)</p>

<p>53 位受試者(27 男 26 女) (BMI ~25 kg/m<sup>2</sup>)</p>	<p>✓ 分組: (1) 4.2g olive oil/day (control group) (2) 4.2g CLA/day (市售CLA) ✓ CLA 補充 12 週</p>	<p><b>CLA group v.s. control group:</b> ✓ weight: 無差異 ✓ body fat (%): 降低 ✓ blood lipid、血醣:無差異</p>	<p>(Balkan et al. 2002)</p>
<p>24 位受試者(14 男 10 女) (BMI ~25 kg/m<sup>2</sup>)</p>	<p>✓ 分組: (1) soybean oil (control group) (2) 0.7~1.4g CLA/day (市售CLA) ✓ CLA 補充 8 週</p>	<p><b>CLA group v.s. control group:</b> ✓ weight、body fat (%): 無差異 ✓ blood lipid: HDL 降低</p>	<p>(Riserus, Berglund and Vessby 2001)</p>

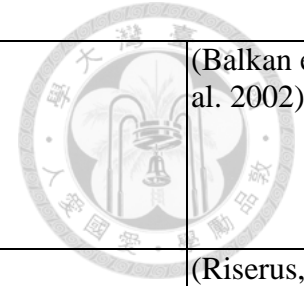


表 1-4、齧齒動物餵食 CLN 實驗飼料之影響 (*in vivo*)

Table 1-4. Lists of effects of rodents fed test diets.

上升/增加或下降/減少：皆指 **test group** 與 **control group** 有顯著差異 ( $p < 0.05$ )

品系	飼料&飼養過程	結果	參考文獻
C57BL/6J mice (4 週齡)	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 5 天適應期</li> <li>✓ 分組: (CAT = 9t,11t,13c-CLN)               <ul style="list-style-type: none"> <li>(1) low-fat control diet</li> <li>(2) low-fat CAT (1 g/100 g) diet</li> <li>(3) high-fat control diet</li> <li>(4) high-fat CAT (1 g/100 g) diet</li> </ul> </li> <li>✓ 實驗飼料飼養 78 天</li> <li>✓ Control group 為 AIN-93G modified diet</li> </ul>	<p><b>low-fat diet: (CAT v.s. control)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ body weight、血糖、insulin、WAT (g)、BAT (g): 無差異</li> <li>✓ 葡萄糖耐受性(GTT) (0,15,30,60 min):無差異</li> </ul> <p><b>high-fat diet: (CAT v.s. control)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ body weight:無差異</li> <li>✓ 血糖、insulin 濃度、WAT(g):下降</li> <li>✓ BAT (g):無差異</li> <li>✓ 葡萄糖耐受性 (GTT) (0,15,30,60 min): 15min, 60min 時 glucose 濃度降低</li> <li>✓ Real-time qRT-PCR (基因表現):               <ul style="list-style-type: none"> <li>(1) PPAR<math>\alpha</math> 及下游基因 SCD-1(stearoyl-coenzyme A desaturase)、ECH(enoyl-coenzyme A hydratase)表現量增加</li> <li>(2) PPAR<math>\beta</math>、<math>\gamma</math> 表現量無差異</li> </ul> </li> </ul>	(Hontecillas et al. 2008)
db/db mice	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ db/db mice 為肥胖、第二型糖尿病的 genetic model</li> <li>✓ 分組: (CAT = 9t,11t,13c-CLN)               <ul style="list-style-type: none"> <li>(1) high-fat control diet</li> <li>(2) high-fat CAT (1 g/100 g) diet</li> </ul> </li> <li>✓ 實驗飼料飼養 28 天</li> </ul>	<p><b>high-fat diet: (CAT v.s. control)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ body weight:無差異</li> <li>✓ WAT(g):減少</li> <li>✓ Plasma HDL cholesterol:增加</li> <li>✓ Plasma TG:降低</li> <li>✓ 血糖(0, 7, 14, 21, 28 天):14,21,28 天所測血糖降低</li> <li>✓ 葡萄糖耐受性(GTT) (0,15,30,60,90,120,180 min):各時間點 glucose 濃度降低</li> <li>✓ insulin (0, 7, 14, 21, 28 天):降低 (除了第 7 天, 其他無顯著差)</li> </ul>	(Hontecillas et al. 2008)



		<p>異)                  ✓ Real-time qRT-PCR                  ✓ PCR (基因表現):                  (1) PPAR<math>\alpha</math>、SCD-1 表現量增加                  (2) ECH 表現量無差異</p>	
<p>Golden Syrian hamsters (male)(10 週齡)</p>	<p>✓ 分組:                  (1) control                  (2) 2% diet (&gt;70 % purity)                  (3) 2% 9<i>c</i>, 11<i>t</i>, 13<i>t</i>-CLN diet (&gt;70 % purity)                  (4) 2% LN(<math>\alpha</math>-linolenic acid) diet (80 % purity)</p> <p>✓ 實驗飼料飼養 6 週                  ✓ 9<i>c</i>, 11<i>t</i>, 13<i>c</i>-CLN 來源: pomegranate seed oils                  ✓ 9<i>c</i>, 11<i>t</i>, 13<i>t</i>-CLN 來源: tung seed oils</p>	<p><b>各組 v.s. control:</b>                  ✓ body weight、food intake、腎臟(g)、腦(g):無差異                  ✓ Liver (g)、肝臟中 CHOL:降低</p> <p><b>2% 9<i>c</i>, 11<i>t</i>, 13<i>c</i>-CLN v.s. control:</b>                  ✓ 心臟(g):無差異                  ✓ Serum total cholesterol (CHOL)、HDL-C、TG:無差異                  ✓ 脂肪組織(Adipose tissue) CHOL:無差異</p> <p><b>2% 9<i>c</i>, 11<i>t</i>, 13<i>t</i>-CLN v.s. control:</b>                  ✓ 心臟(g):無差異                  ✓ Serum total cholesterol (CHOL)、HDL-C、TG:無差異                  ✓ 脂肪組織(Adipose tissue) CHOL:無差異</p> <p><b>2% 9<i>c</i>, 11<i>t</i>, 13<i>t</i>-CLN v.s. control:</b>                  ✓ 心臟(g):減輕                  ✓ Serum total cholesterol (CHOL)、HDL-C、TG:降低                  ✓ 脂肪組織(Adipose tissue) CHOL:降低</p>	<p>(Yang et al. 2005)</p>



<p>albino rats (male)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 分組: (70–80 g body weight) (20% fat of diet)</li> <li>(1) control (sunflower oil)</li> <li>(2) 0.5 % 9c,11t,13t-CLN diet</li> <li>(3) 2 % 9c,11t,13t-CLN diet</li> <li>(4) 10 % 9c,11t,13t-CLN diet</li> <li>✓ 實驗飼料飼養 4 週</li> <li>✓ 9c,11t,13t-CLN 來源:Karela (<i>Momordica charantia</i>) seed oil</li> </ul>	<p><b>各組 v.s. control:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ body weight、plasma total CHOL、HDL-C:無差異</li> <li>✓ plasma lipid peroxidation (nmole of MDA/ml of plasma)、liver lipid peroxidation (nmole of MDA/mg of tissue lipid): 0.5% 9c,11t,13t-CLN group 顯著低於 control 及 0.5%、2%、10% 9c,11t,13t-CLN group</li> <li>✓ lipoprotein oxidation susceptibility (LOS)(nmole of MDA/mg of non-HDL-cholesterol): 0.5%、2%、10% 9c,11t,13t-CLN 顯著低於 control 組</li> </ul>	<p>(Dhar, Ghosh and Bhattacharyya 1999)</p>
<p>Sprague–Dawley rats (male) (4 週齡)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 適應 3 天</li> <li>✓ 分組:</li> <li>(1) LA (C18:2n-6)</li> <li>(2) LNA (C18:3n-3)</li> <li>(3) CLA (C18:2, 9c,11t-CLA: 10t,12c-CLA = 1:1)</li> <li>(4) CLNA (Conjugated diene : triene = 3:2)</li> <li>✓ 實驗飼料飼養 4 週</li> <li>✓ CLA 及 CLNA 分別由 LA 及 LNA 經 alkaline isomerization. 而來</li> </ul>	<p><b>各組 v.s. LA group:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ body weight:無差異</li> <li>✓ 腦、肺、BAT、附睪脂 (EWAT) (% BW):無差異</li> <li>✓ 心臟 (% BW):CLN、CLNA 組增加</li> <li>✓ RWAT (RWAT) (% BW): CLA、CLNA 組降低</li> <li>✓ liver CHOL: LNA 組增加</li> <li>✓ serum TNF-<math>\alpha</math>:均增加</li> <li>✓ serum leptin: LNA group 高於 LA group (p&gt;0.05); CLNA group 顯著低於 LNA group</li> </ul> <p><b>CLNA group v.s. LA group:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Liver (% BW):增加</li> <li>✓ liver TG:增加</li> <li>✓ serum total CHOL、HDL-C:降低</li> <li>✓ serum TG、FFA、TBARS:增加</li> <li>✓ CPT activity (Mit.、peroxisome):增加</li> </ul>	<p>(Koba et al. 2002b)</p>

<p>Sprague-Dawley (SD) Rats(male) (4 週齡)</p>	<p>✓ 適應 1 週                  ✓ 犧牲前 0 ~ 24hr 管餵 1g tung oil，分析 9c,11t,13t-CLN 代謝情形                  ✓ 分組:                  (1) 犧牲前 0 hr (control group)                  (2) 犧牲前 3 hr 管餵 1g tung oil----- (A) group                  (3) 犧牲前 6 hr 管餵 1g tung oil----- (B) group                  (4) 犧牲前 24 hr 管餵 1g tung oil---- (C) group</p>	<p>✓ Plasma、肝、腎、小腸(Small intestine mucosa)、盲腸中的 9c,11t-CLA:增加                  ✓ 9c,11t-CLA: (肝、小腸 9c,11t-CLA 含量較高, 盲腸 9c,11t-CLA 微量)                  (1) Plasma、肝、腎、小腸(Small intestine mucosa): 增加情形(A) &lt; (B) &lt; (C)                  (2) 盲腸: (A)無測得 c9t11CLA，(B) &lt; (C)                  ✓ 9c,11t,13t-CLN (<math>\alpha</math>-ESA): (小腸 9c,11t,13t-CLN 量較高)                  (1)小腸: 增加情形(A) &lt; (B) &lt; (C)                  (2)盲腸: 增加情形(B) &lt; (A) &lt; (C)                  ✓ <b>delta 13 saturase activity:</b>                  (1) 9c,11t,13t-CLN (substrate) → (肝臟均質液 (enzyme)+NADPH) → 9c,11t-CLA (product)                  ✓ (2) 肝 &gt; 腎 &gt; 小腸 &gt; serum</p>	<p>(Tsuzuki et al. 2004)</p>
--	--	---	------------------------------

表 1-5、人體補充 CLN 後之生化值影響 (*in vivo*)

Table 1-5. Lists of effects of conjugated linolenic acids in human. 上升/增加或下降/減少: 皆指 test group 與 control group 有顯著差異 ( $p < 0.05$ )

受試者	劑量&受試過程	結果	參考文獻
✓ 分組: (1) Control group: 15人 (13男2女) (2) PA (9 <i>c</i> ,11 <i>t</i> ,13 <i>c</i> -CLN) group: 15人 (11男4女)	✓ 實驗期間避免攝取乳肉製品 (避免攝取到CLA) ✓ 7天適應期: 每天攝取23.4 g 的sunflower seed kernels (12.5 g of fat mainly in the form of TAG) ✓ 28天試驗期: (1) Control group:每天攝入每天攝入23.4 g of sunflower seed kernels (12.5 g of fat mainly in the form of TAG) (2) Test group: 每天攝入20.8 g TK seed (12.5 g of fat with 3 g of Punicic acid (PA)) ✓ 脂肪酸組成: (1) sunflower seed kernels : 18:2 <i>n</i> -6 (81.2%),18:1 <i>n</i> -9 (11.4%) (2) TK ( <i>Trichosanthes kirilowii</i> ) seed kernels: 18:2 <i>n</i> -6 (36.1%), 18:1 <i>n</i> -9 (28.0%), PA (9 <i>c</i> ,11 <i>t</i> ,13 <i>c</i> -CLN, 24.3%)	試驗期 28 天後(Test group): ✓ BW:無差異 ✓ Serum ApoB、血糖、Insulin: 無差異 ✓ HOMA-IR index:無差異 ✓ 脂肪酸組成(in plasma phospholipids): (1) 9 <i>c</i> ,11 <i>t</i> -CLA 增加( $p = 0.000$ ) (2) PA 增加 ( $p = 0.000$ )	(Yuan et al. 2009)

### 第三節 實驗假說與設計

#### 一、實驗假說

許多研究指出 CLA 能活化 PPAR  $\alpha$ 、降低體脂肪 (*in vivo*)。本實驗室過去以 H4IIEC3 細胞進行轉染實驗 (transactivation assay) 發現山苦瓜乙酸乙酯 (ethyl acetate, EA) 萃物中 9*c*,11*t*,13*t*-CLN 能活化 PPAR  $\alpha$ 、 $\gamma$  (*in vitro*)，因此推測 9*c*,11*t*,13*t*-CLN 在活體中可藉活化 PPARs 調控脂質代謝 (*in vivo*)。

#### 二、研究內容

研究共軛脂肪酸對 C57BL/6J 雌鼠代謝之影響

1. 呼吸商檢測
2. 血糖、胰島素濃度分析
3. 組織脂質含量分析
4. 組織脂肪酸組成分析
5. 以 real-time qRT-PCR 分析 PPARs 及其下游基因表現
6. 以代謝體學分析推測受影響之代謝途徑

## 第二章 前言

肥胖是造成許多疾病的危險因子,例如: 造成心血管疾病、動脈硬化、糖尿病、高血壓等等, 因此肥胖問題是近代人期望解決的問題 (Hontecillas et al. 2008)。

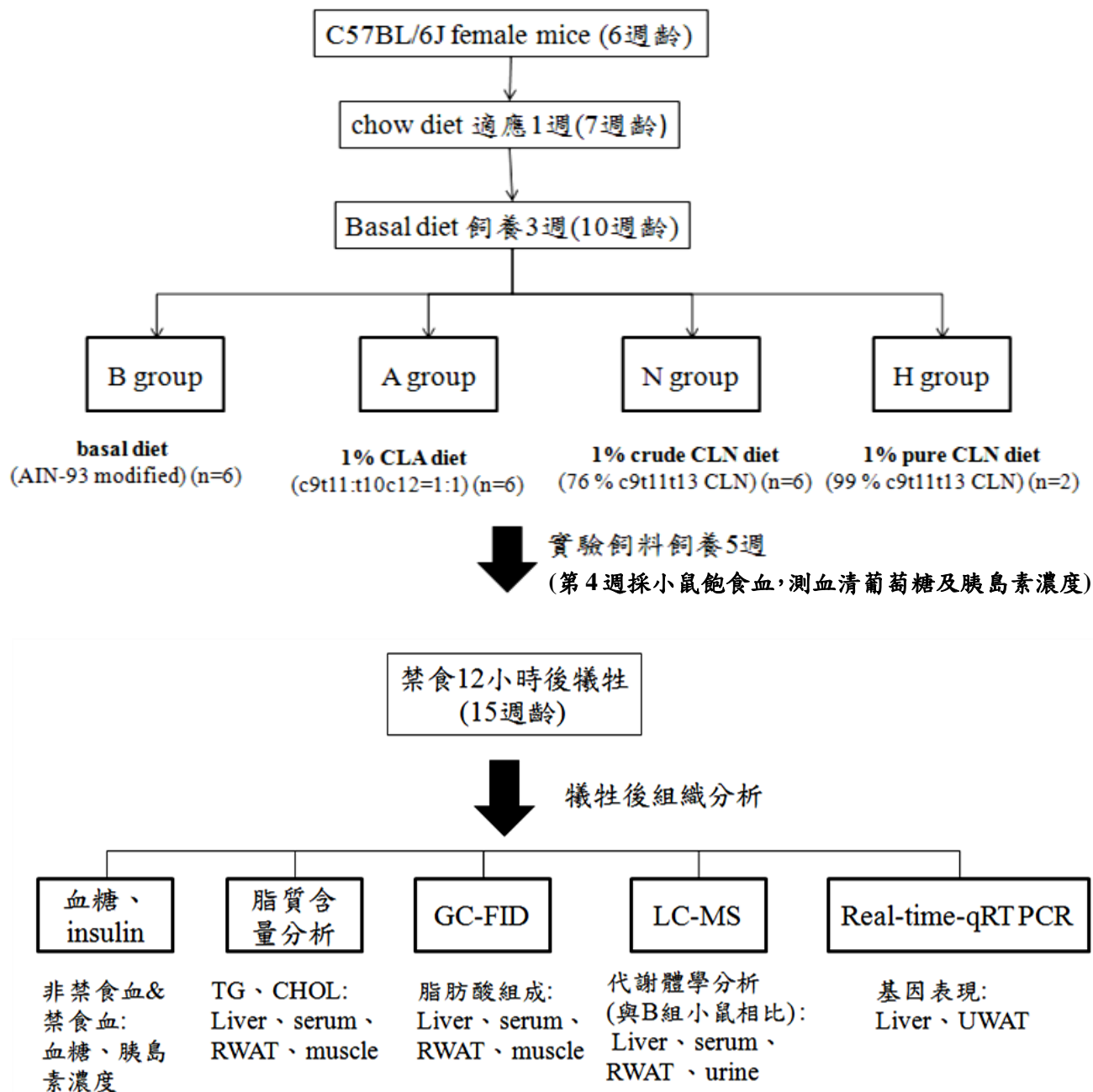
許多文獻指出 CLA mixture 及 10*t*,12*c*-CLA 具有降體脂、活化 PPAR  $\alpha$  之功效。CLA 主要存於牛乳、牛肉製品油脂中, CLA isomers 中 9*c*,11*t*-CLA 占 90 % 以上, 10*t*,12*c*-CLA 僅占 3~5 %。自然界 CLA 存量少, 因此市售 CLA mixture (含 9*c*,11*t*-CLA 及 10*t*,12*c*-CLA) 由富含 LA 之紅花籽油製成。

本實驗室研究發現山苦瓜乙酸乙酯萃物分離出的 9*c*,11*t*,13*t*-CLN 可以活化 PPAR $\alpha$ 、PPAR $\gamma$  (*in vitro*)。9*c*,11*t*,13*t*-CLN 可以活化 PPAR $\alpha$ , 此結果與許多文獻指出 10*t*,12*c*-CLA 可以活化 PPAR $\alpha$  之結果相同。推測 9*c*,11*t*,13*t*-CLN 在活體中可藉活化 PPARs 調控脂質代謝 (*in vivo*)。



### 第三章 材料與方法

#### 一、實驗大綱



## 二、動物飼養

實驗動物購買來自樂斯科生物科技股份有限公司之 6 週齡 C57BL/6J 品系雌鼠 20 隻。chow diet 適應一週，再以 basal diet 進行飼養。受試動物各別飼養於不鏽鋼絲網，採用自由攝食飼料及水，動物房溫度控制在  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，12 小時光照週期 (08:00-20:00 為光照期，20:00-08:00 為黑暗期)。在飼養過程中，每 3-4 天記錄攝食量、每週記錄一次體重。小鼠 10 週齡時，依體重隨機分為四組，分別餵食 Basal diet、1 % CLA diet、1 % crude CLN diet 及 1 % pure CLN diet，以實驗飼料飼養小鼠 5 週後犧牲 (15 週齡)。

## 三、飼料

### (一) Basal diet

Basal diet 依其配方 (表 3-1) 均勻混合各成分，將飼料粉末過篩兩次並均勻混合，裝入雙層密封袋並儲存於  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱。添加小鼠飼料前，再將飼料自冰箱中取出、回溫。

### (二) CLA diet

CLA 為市售共軛亞麻油酸 (9*c*,11*t*-CLA: 10*t*,12*c*-CLA =50:50, Calarinol, Holland)，CLA diet 依其配方 (表 3-1) 均勻混合各成分，將飼料粉末過篩兩次並均勻混合，裝入雙層密封袋並儲存於  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱。添加小鼠飼料前，再將飼料自冰箱中取出、回溫。

### (三) *cis*-9, *trans*-11, *trans*-13 conjugated linolenic acid (Crude, 76%)

將加拿大合作方提供自皂化反應之桐油中純化分離之 crude CLN (內含 76 % 9*c*,11*t*,13*t*-CLN, 其他組成分別為 2.1 % C16:0, 2.3% C18:0, 4.8% C18:1, 6.1% C18:2, 0.8 % C20:1, 2.5% 9*t*,11*t*,13*c*-CLN, 5.1% 9*t*,11*t*,13*t*-CLN)，共 11 g，crude CLN diet 依其配方 (表 3-1) 均勻混合各成分，將飼料粉末過篩兩次並均勻混合，裝入雙層密封袋並儲存於  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱。添加小鼠飼料前，再將飼料自冰箱中取出、回溫。

(四) *cis-9, trans-11, trans-13 conjugated linolenic acid (high purity CLN, 99%)*

將 1 g 市售 CLN (Cayman, Cat. No.10008349, 純度大於 98%) 及 1 g 加拿大合作方提供自皂化反應之桐油中純化分離之 pure 9*c*,11*t*,13*t*-CLN (99%)，共 2 g，High purity CLN diet 依其配方 (表 3-1) 均勻混合各成分，將飼料粉末過篩兩次並均勻混合，裝入雙層密封袋並儲存於 -20 °C 冰箱。添加小鼠飼料前，再將飼料自冰箱中取出、回溫。



表 3-1、實驗飼料配方

Table 3-1. Composition of the test diets

Ingredient of diet (g/100g)	Basal diet (AIN-93G modified diet)	1 % CLA	1 % CLN (76 % crude)	1 % CLN (99 % purity)
Corn starch (g)	12.95	12.95	12.95	12.95
Casein (g)	20	20	20	20
Cellulose (g)	5	5	5	5
<b>Sucrose (g)</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>
Soybean oil (g)	7	6	6	6
CLN (g)	-	-	1	-
CLA (g)	-	1	-	1
AIN-93 Mineral mix (g)	3.5	3.5	3.5	3.5
AIN-93 Vitamin mix (g)	1	1	1	1
L-Cysteine (g)	0.3	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate (g)	0.25	0.25	0.25	0.25
<b>總重 (g)</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
Total calorie (kcal/100g)	396.0	396.0	396.0	396.0
calorie density (kcal/g)	3.96	3.96	3.96	3.96
CHO/calorie (%)	63.59	63.59	63.59	63.59
Protein/calorie (%)	20.51	20.51	20.51	20.51
Fat/calorie (%)	15.91	15.91	15.91	15.91

1. The composition of AIN-93 Vitamin Mixture and AIN-93 Mineral Mixture is as described in J,Nur,123:1939-1951 (1993) (Reeves et al., 1993)

2. 材料購買來源: 玉米澱粉 (Samayang henex, Korea)、酪胺酸 (ICN, USA)、半胱氨酸 (Wako, Japan)、纖維素(JRS, Germany)、AIN-93G 維生素預混物 (ICN, USA)、AIN-93G 礦物質預混物 (ICN, USA)、膽鹼 (Sigma, USA)與大豆油(台糖)



#### 四、小鼠糞便、尿液收集

實驗飼料飼養 4~5 週時，將小鼠移入代謝籠飼養 6 天。小鼠於代謝籠內飼養期間自由攝取飼料和水，代謝籠底部設有糞尿收集處，可將動物糞尿分開收集，其中尿液收集處旁放置冰包降低尿液溫度，小鼠以代謝籠飼養期間每天必須更換冰包及清洗代謝籠。前 3 天為小鼠適應期，後 3 天每天分開收集尿液及糞便，尿液紀錄其尿量體積並裝入 15 ml 離心管、糞便裝入夾鏈袋，儲存於  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱。

#### 五、氧氣消耗量、二氧化碳排出量、呼吸商分析

實驗飼料餵食雌鼠第 3~5 週時，小鼠分別輪流以新陳代謝儀測量 7 天，第 1~4 天為適應期，採用第 5~6 天之 data 計算。動物飼養在與代謝儀有氣體管線相接的透明玻璃箱中 7 天(隻/箱)，在飼養期間動物自由攝取飼料和水，代謝儀可以偵測雌鼠氧氣消耗 ( $\text{VO}_2 \text{ ml/ g BW/ hr}$ )、二氧化碳排出量 ( $\text{VCO}_2 \text{ ml/ g BW/ hr}$ ) 及呼吸商 ( $\text{VCO}_2 \text{ ml/ VO}_2 \text{ ml}$ )，每小時其數值會紀錄一次。計算光照期 (8:00~20:00) 及黑暗期 (20:00~08:00) 氧氣消耗量與二氧化碳排出量曲線下面積(AUC)，以及計算光照期與黑暗期平均呼吸商 (Respiratory quotient, RQ) 分別。

#### 六、飽食血清收集

實驗飼料飼養 4 週時 (犧牲的前一週) 進行小鼠眼窩採血。小鼠禁食 (fasting) 12 hr 後，讓其自由攝食 5 小時，再以乙醚迷昏小鼠並採取眼窩血。將採集所得血液裝入 1.5ml 離心管，離心取上清液，即飽食血清 (feeding serum)，將血清裝至新 1.5 ml 離心管，儲存在  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱。日後將禁食血清進行葡萄糖及胰島素濃度分析。

#### 七、動物犧牲

##### (一) 器具準備

將小鼠犧牲過程中會使用到的器具 (1.5 ml 離心管、小/大剪、小/大鑷) 以殺菌釜進行 30 分鐘  $121^{\circ}\text{C}$  滅菌處理，並配製 0.9 % saline 及 75 % 酒精供動物犧牲時



使用。

## (二) 實驗流程

小鼠以實驗飼料飼養 5 週後，先禁食 12 小時再以 CO<sub>2</sub> 窒息法犧牲小鼠。小鼠秤重後，將胸腹腔用大剪剖開、以 1 ml 針筒進行心臟採血（禁食血液），將血液裝於 1.5 ml 離心管，再放至冰上。剪下四份約 0.1g 肝臟組織，裝入 1.5 ml 離心管，丟入液態氮中，再將剩餘肝臟裝入密封袋，放置冰上存放。

將大腿肌、小腿肌、腓腸肌、BAT、腎臟周圍脂肪組織（RWAT 左、RWAT 右）、子宮周圍脂肪（UWAT 左、UWAT 右）剪下後放至 1.5 ml 離心管，秤重後丟入液態氮中使其快速冷凍。犧牲過程中一律以抽 RNA 規格來處理各個組織。各個器官摘下後秤重。最後將丟入液態氮的組織最後儲存在 -80 °C 的冰箱中。犧牲完迅速將血液離心取上清液，即禁食血清（fasting serum），分裝至 1.5 ml 離心管再以 -80 °C 儲存。

### 七、血糖濃度分析：

使用市售試劑組（Randox Cat.No GL2623）。Glucose oxidase 和 peroxidase 反應作用後會產生粉紅色，可藉此測量其吸光值、計算求得血液 glucose 含量。

將標準液以一次水序列稀釋（0,6.25,12.5,25,50,100 mg/dL）及將雌鼠血液離心所得到的上清液（血清）用一次水稀釋 4 倍後，分別加 10 µl 至 96-well plate 中，標準液及樣品皆做二重覆，再在每個 well 中加入 200 µl 反應試劑，再將 96-well plate 放置 37 °C 培養箱反應 10 分鐘，再測 450 nm 吸光值。將每個樣品平均吸光值代入由序列標準液製成的標準曲線，在乘回稀釋倍數即可得知每個血清樣品中葡萄糖濃度。

### 八、胰島素濃度分析

採用市售試劑組，血清樣品依照標準曲線可信範圍內以 solution A (calibrator 0) 稀釋，將標準品 0.025, 0.075, 0.2, 0.5, 1.5 (ug/L) 及稀釋過後的血清樣品分別加 25 µl 至試劑組所提供的 96-well plate 中，標準品做二重覆。每個 well 再加入 100 µl

solution B (enzyme conjugate 1X)，將 plate 放在 shaker 上室溫反應 2 hr。每個 well 再加入 350  $\mu$ l solution C (washing buffer)洗 5 次，最後將 96-well plate 內 washing buffer 倒掉去除，每個 well 加入 200  $\mu$ l solution D (substrate TMB)，在 shaker 上室溫震盪反應 15 min，再在每個 well 中加入 50  $\mu$ l solution E (stop solution)，即可測 490 nm 吸光值。將吸光值代入標準曲線方程式並乘回稀釋倍數，即可得知血清中胰島素濃度 (ng/ml)。

## 九、Folch method 組織萃取

### (一) 內標配製

以 LC 級 hexane 配成高濃度內標 (800  $\mu$ g 17:0 FAME + 200  $\mu$ g 19:0 FAME) / ml 及低濃度內標 (200  $\mu$ g 17:0 FAME + 50  $\mu$ g 19:0 FAME) / ml，做為脂肪酸含量分析判定依據。萃取過程中依照不同組織添加不同濃度內標，肝臟、脂肪組織、肌肉使用高濃度內標，血液使用低濃度內標。

### (二) 萃取前器具處理

將鑷子、藥匙、研鉢以殺菌釜進行 30 分鐘 121°C 滅菌處理，研鉢冰在 -20 °C 備用。有蓋玻璃試管依序以丙酮、甲醇、一次水、二次水依序超音波震盪、洗淨，再放入烘箱烘乾 (清洗玻璃管過程中勿以清潔劑刷洗);玻璃管蓋子則泡在甲醇中，再以超音波震盪洗淨後放在塑膠盒內自然晾乾。

### (三) 肝臟、脂肪組織、肌肉、血清萃取

採用 1957 年由 Folch 等學者所發表之方法 (Folch *et al.*, 1957)。取約 0.1 克的組織，在研鉢內添加液態氮將組織磨碎，以已滅菌藥匙將粉末取至玻璃有蓋玻璃試管，添加 6 ml CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 2:1 混合液，再以 1 ml 玻璃針筒加入 0.1 ml FAME (fatty acid methyl ester) 內標 (含有 800 $\mu$ g C17:0 FAME + 200 $\mu$ g C19:0 FAME /ml)，vortex 均勻混合後，加入 1.5 ml 二次水，每個樣品 vortex 4 次(每次 30 秒)，接著將樣品置於已添加碎冰的超音波震盪機內震盪 10 分鐘，以 2500 rpm 離心 15 分鐘。樣品離心後分成兩層，上層為水層，下層為有機層，兩層間介面蛋白質塊狀物以

針頭將其攪散藉此提高萃取率，再將樣品以 2500 rpm 離心 15 分鐘。

樣品離心後以 10 ml 針筒將 3 ml 水層及 4 ml 下層有機層分裝至不同有蓋玻璃試管，吸取上層水層時，不同樣品之間針頭依序以甲醇、二次水進行洗針，吸取下層有機層時，不同樣品之間針頭依序以甲醇、氯仿依序洗針。從裝有有機層的試管取 0.5 ml 至另一新有蓋玻璃試管做為脂肪酸甲基酯化用，剩餘的有機層以另一有蓋玻璃試管收集待用，有機層封上 parafilm 後於 -20 °C 儲存。裝在試管的水層，以氮氣吹至剩約 1ml，用玻璃滴管將水層 transfer 至 1.5 ml 離心管 (Gilson)，再以氮氣吹乾，放至 -80 °C 冰箱儲存。有機層經脂肪酸甲基酯化後，以 GC-FID 分析脂肪酸組成；水層以 LC-MS 進行代謝體學分析。

#### (四) 水層再萃取 (去除蛋白)

由於萃取一次的水層仍含有大量蛋白質，故將已用氮氣吹乾之水層物質再次萃取。首先加入 1 ml 75 % MeOH (以 LC 級 MeOH 及一次水配製) 並 vortex 使物質回溶，將回溶溶液 transfer 至有蓋玻璃試管，加入 1 ml chloroform 後，每個樣品 vortex 4 次(每次 30 秒)，樣品以超音波震盪機震盪 10 分鐘，2500 rpm 離心 10 分鐘，樣品離心後以 10 ml 針筒吸取上層水層，不同樣品之間針頭以甲醇、二次水進行洗針，樣品以氮氣吹至剩約 1ml，用玻璃滴管將水層 transfer 至 1.5 ml 離心管 (Gilson)，以氮氣吹乾後放至 -80 °C 冰箱儲存。

#### 十、三酸甘油酯含量分析:

採用市售試劑組 (Randox Cat. No. TR213)，將 Buffer (pipes buffer pH7.6, 4-chloro-phenol, magnesium) 與 Enzyme Reagent (4-aminophenzone, ATP, lipase, glycerol-kinase, glycerol-3-phosphate oxidase, peroxidase) 均勻混合配成反應試劑。

##### (一) 血清(犧牲當天操作)

標準液以一次水序列稀釋 (0,12.5,25,50,100,200 mg/dL) 及將小鼠禁食血清以一次水稀釋 4 倍後，分別加 10  $\mu$ l 至 96-well plate 中，標準液及樣品皆做二重覆。每個 well 中加入 200  $\mu$ l 反應試劑後，96-well plate 於室溫下靜置反應 10 分鐘，



再測 490 nm 吸光值。

將每個樣品平均吸光值代入由序列標準液製成的標準曲線，再乘回稀釋倍數得血清樣品中三酸甘油酯濃度。

## (二) 組織

以耐有機溶劑之 Tip (Gilson) 吸取 20  $\mu$ l 肝臟有機層萃取液至無蓋試管，放至通風櫥使試劑完全揮發。準備兩管無蓋試管，一管試管做為空白對照，另一管試管添加 40  $\mu$ l 標準液 (含有 200 mg/dL 三酸甘油酯)，將兩管試管與含有樣品的試管各加入 1ml 反應試劑，vortex 混勻，室溫下反應 10 分鐘，再將各試管溶液取 200  $\mu$ l 至 96-well plate 中，以針頭去除氣泡後，測 490 nm 吸光值。

吸光值代入計算可得肝臟 TG 含量 (mg/g Liver) 及 Total TG 含量 (mg/Liver)。

## 十一、膽固醇含量分析:

採用市售試劑組 (Randox Cat. No. CH201)。

### (一) 血清(犧牲當天操作)

將標準液以一次水序列稀釋 (0,12.5,25,50,100,200 mg/dL) 及將小鼠犧牲當天所收集的血液離心所得到的血清以一次水稀釋 4 倍後，分別加 10  $\mu$ l 至 96-well plate 中，標準液及樣品皆做二重覆，再在每個 well 中加入 200  $\mu$ l 反應試劑，將 96-well plate 於室溫下靜置反應 10 分鐘，再測 490 nm 吸光值。

將每個樣品平均吸光值代入由序列標準液所製成的標準曲線，再乘以稀釋倍數即可得知每個血清樣品中膽固醇濃度。

### (二) 組織

以耐有機溶劑之 Tip (Gilson) 吸取 40  $\mu$ l 肝臟有機層萃取液至無蓋試管，並加入 10  $\mu$ l Triton X-100，以 pipetting 方式混勻，移至通風櫥使試劑完全揮發。準備兩管試管，一管試管做為空白對照，另一管試管添加 40  $\mu$ l 標準液 (含有 200 mg/dL 膽固醇)，將兩管試管與含有樣品的試管各加入 1 ml 反應試劑，vortex 混勻，室溫下

反應 10 分鐘，再將各試管溶液取 200  $\mu$ l 至 96-well plate 中，以針頭去除氣泡後，測 490 nm 吸光值。

將吸光值代入計算可得肝臟 Cholesterol (mg / g Liver) 及 total cholesterol (mg / total Liver)。

## 十二、GC-FID 分析組織脂肪酸組成

### (一) 無水甲醇製備

吸水珠以烘箱烘 4 小時，裝入血清瓶，將試藥級甲醇倒入瓶中並蓋上蓋子，放至通風儲隔夜使殘餘水分吸除。

### (二) 組織有機層萃取液甲基酯化:

本實驗甲基酯化使用甲醇鈉法 (NaOCH<sub>3</sub>)/ Methanol method，將肝臟 (Liver)、脂肪組織 (RWAT)、肌肉 (Muscle)、血清 (serum) 組織萃取時所分裝之甲基酯化用的 0.5 ml 有機層以氮氣吹乾，加入 2 ml NaOCH<sub>3</sub>/MeOH (1M) 並 vortex，室溫靜置 5 分鐘，加入 3 ml 飽和食鹽水及 5 ml hexane (試藥級) 後進行 vortex，因兩層溶液分層明顯，故省略離心步驟、以玻璃滴管吸取上清液至 20 ml 樣品瓶，再加入 5 ml hexane (試藥級) 並 vortex，以玻璃滴管吸取上清液至 20 ml 樣品瓶，將樣品瓶內的 hexane 以減壓濃縮機抽乾，以 HPLC 之 1 ml 針筒吸取 LC 級 hexane (肝臟、脂肪組織用 200  $\mu$ l 回溶，血清及肌肉組織用 100  $\mu$ l 回溶) 至樣品瓶中，最後以玻璃滴管 transfer 至 GC-FID 專用樣品瓶，封上 parafilm 後，在上機前樣品以 -20 °C 儲存。

### (三) GC-FID 脂肪酸分析

將組織樣品以氣相層析儀 (Gas chromatography flame - ionization detector, GC-FID, Agilent 7820A) 分析組織脂肪酸組成。管柱選用可分離 CLA 及 CLN 的 DB-1 column (Agilent 122-1601, 60m x 0.25 mm x 0.10  $\mu$ )。

分析組織樣品前先打標準品 (FAME) (例如: 5 mix (C13:0、C17:0、C19:0、C23:0、C27:0)，藉各 peak 面積比為 5 mix 內各脂肪酸(FAME)濃度比，確認機器脂肪酸定

量的準確性，將標準品 37FAME (37 種脂肪酸)上機，藉由 peak 出現時間及面積對出對應脂肪酸，供組織樣品之 data 進行比對、分析組織脂肪酸組成。

每次檢測時可注入 1~5  $\mu\text{l}$  容量的樣品，依組織脂肪酸含量多寡調整樣品所注入的體積，本實驗肝臟組織樣品每次注射 2.5 $\mu\text{l}$ 、脂肪組織每次注射 0.5  $\mu\text{l}$ 、血清及肌肉組織每次注射 2.5 $\mu\text{l}$ 。將樣品 data 各 peak 面積除以總脂肪酸 peak 面積計算脂肪酸組成百分比(%)。

### 十三、尿液 creatinine 定量

將儲存於  $-80^{\circ}\text{C}$  之尿液各個樣品各取 1 ml 至 1.5 ml 離心管，以 14000 rpm 離心 10 分鐘，吸取上清液至新 1.5 ml 離心管，將 10  $\mu\text{l}$  尿液原液稀釋 25 倍 (10  $\mu\text{l}$  原液加上 240  $\mu\text{l}$  一次水)，加上反應試劑之後在反應第 30 秒以及 2 分鐘時，測 A490 吸光值，在將其吸光值待入公式求得 creatinine 含量，以供樣品定量後至 LC-MS 進行代謝體學分析。Creatinine (mg/ml) = [sample (A490 nm 2 min later - A490 nm 30 sec later)/ standard (A490 nm 2 min later - A490 nm 30 sec later)] X 10 X 25

### 十四、LC-MS 分析組織代謝物

將 liver、serum 以 LC-MS (Agilent) 分析代謝物 MW，每個樣品進行 5 重複分析(由徐璿學姐進行儀器分析、操作)。RWAT、urine 以 LC-MS (Bruker) 分析，尿液樣品正、負電各進行 5 重複分析 (樣品注射 3 $\mu\text{l}$ /次)，尿液正電使用 ACQUITY UPLC® BEH C18 column，負電使用 kinetex 2.6u XB-C18 100A column；脂肪組織 (RWAT)使用 HSST3(2.1x100mm) column，以正電進行 5 重複分析 (樣品注射 4 $\mu\text{l}$ /次)。

將 LC-MS data (analysis.baf 檔) 轉成 mzXML 檔，以中研院林可軒博士提供的軟體 Metab-Q 分析兩組小鼠間(A 組 v.s. B 組；N 組 v.s. B 組；H 組 v.s. B 組) 各個樣品所有 peak 的 intensity、retention time 及 MW，再將 Metab-Q 分析結果以軟體 Metab-ID 預測兩組小鼠間含量具顯著差異之化合物。將預測所得之化合物以 HMDB (Human Metabolome Database, <http://www.hmdb.ca/spectra/ms/search>) 查詢此



化合物於各資料庫資料 (例如: SMILES、InChI、CAS Number、KEGG number、PubChem Compound ID)，將兩組間含量顯著差異之代謝預測物資料整理完畢，以 metacore 網站分析、比對組織可能受共軛脂肪酸影響之代謝物及代謝途徑。

### 十五、RNA 抽取

使用 RNeasy Plus Universal mini kit 進行組織 RNA 抽取。將組織 (liver、RWAT 約 0.1g) 自 -80 °C 冰箱取出，快速放入液態氮中。均質管(存有均質珠並已滅菌)先添加 900µl QIA zol，再將組織用已滅菌鑷子夾取至均質管，以均質機均質 3 次(15 sec/次)。室溫靜置 5 分鐘後加入 100µl gDNA solution (去除 genomic DNA)，vortex 15 sec，加入 180 µl chloroform 並 vortex 15 sec，室溫靜置 3 min，以 4 °C、12000 rpm 離心 15 min (以下離心皆為 25°C、12000 rpm 離心 1 min)，取上清液 (約 600µl) 至已滅菌之 1.5 ml 離心管，添加等量 70 % EtOH 並 vortex 混勻，分兩次、每次取約 600µl 混合液至 kit 所附 spin down column，離心 1 min，倒掉收集管液體。加 700µl Buffer RWT 至 spin down column，離心 1 min，倒掉收集管液體。加 500µl Buffer RPE 至 spin down column，離心 1 min，倒掉收集管的液體後，加 500µl Buffer RPE、離心、倒掉收集管液體，換上新的收集管，再離心 1 min，此時丟棄收集管，換上已滅菌 1.5 ml 離心管，最後加 30µl RNase-free water 至 spin down column 後，離心 1min，此時離心管內即為抽出之 RNA 溶液。

將測 RNA 溶液 260 nm 吸光值並計算 RNA 濃度( $\text{ug}/\mu\text{l}$ ) =  $A_{260} \times 40 \times$  稀釋倍數 (1 unit = 40 ug RNA/ml)，同時測  $A_{260}/A_{280}$  來判定 RNA 品質，若比值接近 2.0 表示為純化的 RNA。

### 十六、RNA 轉錄成 cDNA

Total RNA 以 DEPC-H<sub>2</sub>O 稀釋為 0.2 ug/µl，再取 10 µl 加入 10µl 2x Reverse Transcription Master Mix (2 µl 10 x RT buffer, 0.8 µl 25x dNTP mix, 2 µl 10x RT Random Primers, 1 µl MultiScribe™ RTase, 4.2 µl ddH<sub>2</sub>O)，以 2 ug/20 µl 進行反轉

錄，條件為 25 °C, 10 min、37 °C, 120 min、85 °C, 5 sec，最後維持在 4°C，取出 cDNA 後儲存於 -20 °C。

#### 十七、Real-time qRT-PCR 分析 PPARs 及其下游基因表現

將 cDNA 以無菌水 (ddH<sub>2</sub>O) 稀釋至 1 ng/μl，取 10 μl cDNA(1 ng/μl)，加入 12.5 μl Taqman® Universal PCR Master Mix (2X, Part NO. K00861, Applied Biosystems, USA)、1.25 μl Probe/Primer Mixture 及 1.25 μl 無菌水，總體積為 25μl。注入 ABI PRISM® Optical Strip 放置於 96-well MicroAmp Optical Cap，再蓋上 MicroAmp Optical Cap。離心去除氣泡後即可上機、進行定量分析，上機條件為 50 °C, 2 min (Step 1)，90 °C, 10 min (Step 2)，95 °C, 15 sec (Step 3)，60 °C, 1 min (Step 4)，再回到(Step 3)重複 40 次 cycle。

#### 十八、統計分析

數據皆以 mean ± SD 表示，採 one-way ANOVA 比較組間差異，並以 Duncan's multiple test 作為各組間差異比較， $p < 0.05$  時表示兩組間具有顯著差異。

此外以 Microsoft Office 2007/EXCEL 軟體進行統計分析，以 Student's t test 作為各組與 B 組之比較，\* 表示  $p < 0.05$ ，\*\* 表示  $p < 0.001$ 。

## 第四章 實驗結果



### 一、體重變化、攝食量、攝食利用率、能量攝取及能量利用率 (圖 4-1)(表 4-1)

如表 4-1 所示，C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料前，四組小鼠體重無顯著差異。以實驗飼料餵食 5 週後，Basal (B 組)、1% CLA (A 組)、1% crude CLN (N 組)、1% pure CLN (N 組) 體重分別為  $22.11 \pm 1.34$  g、 $22.80 \pm 1.37$  g、 $24.59 \pm 2.27$  g、 $22.94 \pm 0.81$  g，N 組體重顯著高於 B 組 ( $p < 0.05$ )，A 組、H 組小鼠體重與 B 組無顯著差異。如圖 4-1 所示，實驗飼料飼養 3 週後，H 組小鼠體重顯著高於 B 組 ( $p < 0.05$ )，但 4、5 週後體重與 B 組相比則無顯著差異。實驗飼料飼養 4、5 週後，N 組小鼠體重顯著高於 B 組。A 組小鼠 5 週餵食期間，體重與 B 組相比皆無顯著差異。

實驗飼料飼養 5 週後，A、N、H 組與 B 組小鼠攝食量 (Feed intake) (g/day)、攝食利用率 (Feed efficiency) (g BW/100 g diet)、能量攝取 (Energy intake) (kcal/day)、能量利用率 (Energy efficiency) (g BW/1000 kcal) 皆無顯著差異 (表 4-1)。

### 二、器官及組織絕對重量與相對重量 (表 4-2 ~ 4-5)

C57BL/6J 雌鼠以實驗飼料飼養 5 週後犧牲，取其小鼠器官及組織秤重。A、N、H 組小鼠心臟、肺臟、腎臟、脾臟、子宮、盲腸絕對重量與 B 組無顯著差異，A 組肝臟絕對重量顯著高於 B 組 ( $p < 0.01$ ) (表 4-2)。相對重量 (器官重/體重(%)) 方面，A 組肝臟相對重量顯著高於 B 組 ( $p < 0.01$ )，N 組小鼠肺臟相對相對重量顯著低於 B 組 ( $p < 0.05$ )，A 組腎臟相對重量顯著高於 B 組 ( $p < 0.05$ )。A、N、H 組小鼠心臟、脾臟、子宮、盲腸相對重量與 B 組無顯著差異 (表 4-3)。

A、N、H 組小鼠 muscle、BAT 絕對重量與 B 組無顯著差異。N 組 UWAT、RWAT 絕對重量為 B 組小鼠的 2~3 倍 ( $p < 0.05$ )。H 組 RWAT 絕對重量約為 B 組 2 倍 ( $p < 0.05$ )。A 組 UWAT、RWAT 絕對重量與 B 組無顯著差異 (表 4-4)。N 組 UWAT、RWAT 絕對重量為 B 組小鼠的 2~3 倍 ( $p < 0.05$ )。H 組 RWAT 絕對重量約為 B 組 2 倍 ( $p < 0.05$ )。A 組 UWAT、RWAT 絕對重量與 B 組無顯著差

異 (表 4-4)。A 組小鼠 muscle、UWAT、RWAT、BAT 相對重量與 B 組無顯著差異，N 組小鼠 UWAT、RWAT 相對重量顯著高於 B 組 ( $p < 0.05$ )，H 組小鼠 RWAT 相對重量顯著高於 B 組 ( $p < 0.05$ ) (表 4-5)。

### 三、氧氣消耗量、二氧化碳排出量及呼吸商 (圖 4-2 ~ 4-4)

B、A、N、H 四組小鼠光照期氧氣消耗量較低 (B 組為  $64.65 \pm 11.45 \text{ VO}_2 \text{ ml/g BW}$ )，黑暗期氧氣消耗量較高 (B 組為  $89.30 \pm 11.72 \text{ VO}_2 \text{ ml/g BW}$ ) (圖 4-2)。光照期 A 組小鼠氧氣消耗量 AUC 顯著低於 B 組 ( $p < 0.05$ )，N、H 組與 B 組無顯著差異；黑暗期 A、N、H 組小鼠氧氣消耗量與 B 組皆無顯著差異。

B、A、N、H 四組小鼠光照期二氧化碳排出量較低 (B 組為  $51.37 \pm 7.30 \text{ VO}_2 \text{ ml/g BW}$ )，黑暗期二氧化碳排出量較高 (B 組為  $79.89 \pm 14.26 \text{ VO}_2 \text{ ml/g BW}$ ) (圖 4-3)。A 組小鼠光照期及黑暗期二氧化碳排出量 AUC 皆顯著小於 B 組 ( $p < 0.05$ )，N、H 組光照期及黑暗期二氧化碳排出量 AUC 與 B 組無顯著差異。

B、A、N、H 四組小鼠光照期 RQ 較低 (B 組為  $0.80 \pm 0.05$ )，黑暗期 RQ 較高 (B 組為  $0.88 \pm 0.05$ ) (圖 4-4)。B、A、N、H 組小鼠光照期平均 RQ 值分別為  $0.84 \pm 0.03$ 、 $0.85 \pm 0.03$ 、 $0.88 \pm 0.06$ 、 $1.00 \pm 0.04$ ；黑暗期平均 RQ 值分別為  $0.88 \pm 0.05$ 、 $0.87 \pm 0.04$ 、 $0.92 \pm 0.04$ 、 $1.00 \pm 0.07$ 。H 組光照期平均 RQ 值 ( $p < 0.01$ ) 與黑暗期平均 RQ 值 ( $p < 0.05$ ) 顯著高於 B 組小鼠。A、N 組小鼠光照期與黑暗期平均 RQ 值與 B 組無顯著差異。

### 四、血清分析結果

#### (一) 血清葡萄糖及胰島素分析 (表 4-6、4-7) (圖 4-5)

A、N、H 組飽食血糖濃度與 B 組無顯著差異 (表 4-6)。飽食胰島素濃度 A 組顯著高於 B 組 ( $p < 0.05$ )，N、H 組與 B 組無顯著差異 (表 4-7)。

禁食血糖濃度，N 組小鼠顯著高於 B 組 ( $p < 0.05$ )，A、H 組與 B 組無顯著差異 (表 4-6)。禁食胰島素濃度，A、H 組與 B 組無顯著差異，N 組顯著高於 B 組 ( $p < 0.05$ ) (表 4-7)。

HOMA-IR 結果顯示，N 組顯著高於 B 組 ( $p < 0.05$ )，A、H 組與 B 組無顯著差異 (圖 4-5)。

## (二) 血清三酸甘油酯及膽固醇濃度分析 (表 4-8)

血清 TG 濃度，A 組小鼠顯著低於 B 組 ( $p < 0.01$ )，N 組顯著高於 B 組 ( $p < 0.05$ )，H 組與 B 組無顯著差異。A 組血清膽固醇顯著高於 B 組 ( $p < 0.01$ )，N、H 組與 B 組無顯著差異。

## 五、組織三酸甘油酯及膽固醇含量分析

### (一) 肝臟組織 (表 4-9)

肝臟單位 TG 含量 (TG mg / g Liver) 方面，A 組顯著高於 B 組 ( $p < 0.05$ )，N 組與 B 組無顯著差異，H 組顯著低於 B 組 ( $p < 0.05$ )。肝臟總 TG 含量 (TG mg / Total Liver) 方面，A 組為 B 組小鼠的 2.6 倍 ( $p < 0.01$ )，N 組與 B 組無顯著差異，H 組顯著低於 B 組 ( $p < 0.05$ )。H 組肝臟總 TG 含量比 B 組小鼠降低約 40%。

肝臟單位 CHOL 含量 (CHOL mg / g Liver) 及總 CHOL 含量 (CHOL mg / g Total Liver) 方面，皆為 A 組顯著高於 B 組 ( $p < 0.01$ )，N、H 組與 B 組無顯著差異。

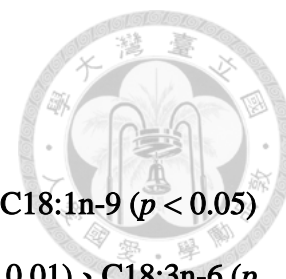
### (二) 腎臟週圍脂肪組織 (表 4-10)

RWAT 單位 TG 含量 (TG mg / g RWAT) 方面，A 組顯著低於 B 組 ( $p < 0.05$ )，N、H 組與 B 組無顯著差異。RWAT 總 TG 含量 (TG mg / Total RWAT) 方面，A、H 組與 B 組皆無顯著差異，N 組顯著高於 B 組 ( $p < 0.05$ )。

RWAT 單位 CHOL 含量 (CHOL mg / g RWAT) 方面，A、N、H 組與 B 組皆無顯著差異。RWAT 總 CHOL 含量 (CHOL mg / Total RWAT) 方面，A 組與 B 組無顯著差異，N、H 組顯著高於 B 組 ( $p < 0.05$ )。

### (三) 肌肉組織 (表 4-11)

A、N、H 組小鼠 muscle 單位 TG 含量 (TG mg / g muscle) 與單位 CHOL 含量 (CHOL mg / g muscle) 與 B 組皆無顯著差異。



## 六、組織脂肪酸組成

### (一) 肝臟脂肪酸組成(%) (表 4-12)

A 組小鼠肝臟 C16:0 ( $p < 0.01$ )、C16:1n-9 ( $p < 0.05$ )、C18:1n-9 ( $p < 0.05$ ) 含量百分比顯著高於 B 組，C14:0 ( $p < 0.05$ )、C18:2n-6 ( $p < 0.01$ )、C18:3n-6 ( $p < 0.01$ ) 顯著低於 B 組。N 組小鼠 C16:1n-7 ( $p < 0.01$ )、C20:1n-9 ( $p < 0.05$ )、C20:3n-6 ( $p < 0.01$ ) 含量百分比顯著高於 B 組，C18:2n-6 ( $p < 0.01$ )、C20:5n-3 ( $p < 0.05$ ) 顯著低於 B 組。H 組小鼠 C18:0 ( $p < 0.05$ )、C20:3n-6 ( $p < 0.01$ ) 顯著高於 B 組。

肝臟 CLA 組成百分比分析結果，B 組小鼠無測得 9*c*,11*t*-CLA 及 10*t*,12*c*-CLA；A 組 9*c*,11*t*-CLA 及 10*t*,12*c*-CLA 兩種 CLA isomer 分別為  $0.47 \pm 0.07\%$  及  $0.08 \pm 0.03\%$ ，9*c*,11*t*-CLA 含量約為 10*t*,12*c*-CLA 之 6 倍；N、H 組無測得 10*t*,12*c*-CLA，但 9*c*,11*t*-CLA 含量百分比分別為  $0.89 \pm 0.12\%$ 、 $0.67 \pm 0.22\%$ 。

肝臟 CLN 組成百分比分析結果，B、A 組小鼠無測得 9*c*,11*t*,13*t*-CLN，N、H 組 9*c*,11*t*,13*t*-CLN 分別為  $0.69 \pm 0.13\%$ 、 $0.51 \pm 0.39\%$ 。

A 組小鼠肝臟 SFA、MUFA 顯著高於 B 組 ( $p < 0.05$ )，PUFA 顯著低於 B 組 ( $p < 0.01$ )，n-6 PUFA 顯著低於 B 組 ( $p < 0.01$ )；N、H 組小鼠 SFA、MUFA 及 PUFA 與 B 組無顯著差異，N 組 n-6 PUFA 顯著低於 B 組 ( $p < 0.01$ )。

以脂肪酸組成百分比含量計算 delta-6-desaturation index (D6D index) (C18:3 n-6/ C18:2 n-6) 及 delta-5-desaturation index (D5D index) (C20:4 n-6/ C20:3 n-6)，作為 desaturase 活性預測。A 組小鼠 D6D index 顯著低於 B 組 ( $p < 0.01$ )；N、H 組 D6D index 與 B 組無顯著差異。A ( $p < 0.05$ )、N ( $p < 0.01$ )、H ( $p < 0.05$ ) 組小鼠 D5D index 皆顯著低於 B 組。

### (二) 腎周圍脂肪組織脂肪酸組成 (表 4-13)

A 組小鼠 RWAT 之 C16:0 ( $p < 0.01$ ) 含量百分比顯著高於 B 組 (A 組

C16:0 含量約比 B 組增加 6%)、C18:0 ( $p < 0.01$ )、C16:1n-7 ( $p < 0.05$ )、C20:1n-9 ( $p < 0.01$ ) 顯著低於 B 組。N 組小鼠 RWAT 之 C16:1n-7 ( $p < 0.01$ )、C22:6n-3 ( $p < 0.05$ ) 顯著高於 B 組，C18:0 ( $p < 0.01$ )、C16:1n-9 ( $p < 0.05$ )、C18:1n-9 ( $p < 0.01$ ) 顯著低於 B 組 (N 組 C18:1n-9 含量約比 B 組低 6%)。

RWAT 之 CLA 組成百分比分析結果，B 組小鼠無測得 9*c*,11*t*-CLA 及 10*t*,12*c*-CLA；A 組 9*c*,11*t*-CLA 及 10*t*,12*c*-CLA 兩種 CLA isomer 分別為  $1.06 \pm 0.13\%$ 、 $0.64 \pm 0.08\%$ ；N、H 組無測得 10*t*,12*c*-CLA，9*c*,11*t*-CLA 含量百分比分別為  $2.08 \pm 0.18\%$ 、 $0.76 \pm 0.10\%$ ，N 組小鼠脂肪組織 9*c*,11*t*-CLA 含量百分比約為肝臟的 2 倍。

RWAT 之 CLN 組成百分比分析結果，B、A 組小鼠無測得 9*c*,11*t*,13*t*-CLN，N、H 組 9*c*,11*t*,13*t*-CLN 分別為  $0.35 \pm 0.18\%$ 、 $0.02 \pm 0.02\%$ 。

A 組小鼠 RWAT 之 SFA 含量百分比顯著高於 B 組 ( $p < 0.01$ )，SFA 增加約 21%；A 組 MUFA 含量顯著低於 B 組 ( $p < 0.05$ )。N 組小鼠 RWAT 之 MUFA 含量顯著低於 B 組 ( $p < 0.01$ )、PUFA 含量顯著高於 B 組 ( $p < 0.01$ )，而 N 組 SFA 含量與 B 組無顯著差異。

### (三) 血清脂肪酸組成 (表 4-14)

A 組小鼠血清 C20:3n-6 ( $p < 0.01$ )、C20:4n-6 ( $p < 0.01$ )、C20:5n-3 ( $p < 0.05$ )、C22:6n-3 ( $p < 0.05$ ) 含量百分比顯著高於 B 組，C14:0 ( $p < 0.05$ )、C16:0 ( $p < 0.05$ ) 顯著低於 B 組。N 組小鼠血清 C18:2n-6 ( $p < 0.05$ )、C20:3N-6 ( $p < 0.01$ ) 含量顯著高於 B 組，C16:0 ( $p < 0.01$ )、C18:0 ( $p < 0.01$ ) 含量顯著低於 B 組。H 組小鼠血清 C20:3n-6 ( $p < 0.05$ )、C20:4n-6 ( $p < 0.01$ )、C22:6n-3 ( $p < 0.05$ ) 含量顯著高於 B 組，C16:0 ( $p < 0.05$ )、C18:1n-9 ( $p < 0.05$ ) 含量顯著低於 B 組。

血清 CLA 組成百分比分析結果，B 組小鼠無測得 9*c*,11*t*-CLA 及 10*t*,12*c*-CLA；A 組 9*c*,11*t*-CLA 及 10*t*,12*c*-CLA 兩種 CLA isomer 分別為  $0.41 \pm 0.16\%$ 、 $0.12 \pm 0.04\%$ ；N、H 組無測得 10*t*,12*c*-CLA，9*c*,11*t*-CLA 含



量百分比分別為  $0.69 \pm 0.10\%$ 、 $0.36 \pm 0.05\%$ 。

血清 CLN 組成百分比分析結果，B、A 組小鼠無測得  $9c,11t,13t\text{-CLN}$ ，N、H 組  $9c,11t,13t\text{-CLN}$  分別為  $0.20 \pm 0.02\%$ 、 $0.19 \pm 0.01\%$ 。

A 組小鼠血清 SFA、MUFA 含量百分比顯著低於 B 組 ( $p < 0.05$ )，PUFA 含量顯著高於 B 組 ( $p < 0.01$ )，其中 n-3 PUFA 顯著增加 ( $p < 0.01$ )、n-6 PUFA 顯著降低 ( $p < 0.05$ )。N 組小鼠血清 SFA 顯著低於 B 組 ( $p < 0.01$ )，PUFA 顯著高於 B 組 ( $p < 0.05$ )，n-6 PUFA 顯著高於 B 組 ( $p < 0.05$ )。H 組小鼠 SFA、MUFA 顯著低於 B 組 ( $p < 0.05$ )，PUFA 顯著高於 B 組 ( $p < 0.05$ )，其中 n-3 PUFA 及 n-6 PUFA 含量皆顯著高於 B 組 ( $p < 0.05$ )。

#### (四) 肌肉脂肪酸組成 (表 4-15)

A 組小鼠肌肉組織 C14:0 ( $p < 0.05$ )、C16:0 ( $p < 0.01$ )、C16:1n-7 ( $p < 0.05$ ) 含量百分比顯著高於 B 組，C18:1n-9 ( $p < 0.01$ )、C18:1n-7 ( $p < 0.05$ ) 顯著低於 B 組。N 組小鼠肌肉組織 C14:0 ( $p < 0.01$ )、C16:1n-7 ( $p < 0.01$ ) 含量顯著高於 B 組，C18:1n-7 ( $p < 0.05$ )、C20:1n-9 ( $p < 0.01$ )、C18:2n-6 ( $p < 0.05$ ) 含量顯著低於 B 組。H 組小鼠肌肉組織 C16:1n-7 ( $p < 0.01$ ) 含量顯著高於 B 組，C20:1n-9 ( $p < 0.05$ ) 含量顯著低於 B 組。

肌肉組織 CLA 組成百分比分析結果，B 組小鼠無測得  $9c,11t\text{-CLA}$  及  $10t,12c\text{-CLA}$ ；A 組  $9c,11t\text{-CLA}$  及  $10t,12c\text{-CLA}$  兩種 CLA isomer 分別為  $0.54 \pm 0.27\%$ 、 $0.30 \pm 0.16\%$ ；N、H 組無測得  $10t,12c\text{-CLA}$ ， $9c,11t\text{-CLA}$  含量百分比分別為  $1.13 \pm 0.10\%$ 、 $0.58 \pm 0.07\%$ 。

肌肉組織 CLN 組成百分比分析結果，B、A 組小鼠無測得  $9c,11t,13t\text{-CLN}$ ，N、H 組  $9c,11t,13t\text{-CLN}$  分別為  $0.06 \pm 0.01\%$ 、 $0.02 \pm 0.01\%$ 。

A 組小鼠肌肉組織 SFA 含量百分比顯著高於 B 組 ( $p < 0.05$ )，MUFA 含量顯著低於 B 組 ( $p < 0.01$ )，PUFA 含量與 B 組無顯著差異。N 組小鼠肌肉組織 SFA、MUFA、PUFA 含量與 B 組無顯著差異，但 n-6 PUFA 含量顯著低於



B 組 ( $p < 0.05$ )。H 組小鼠肌肉組織 SFA、MUFA、PUFA 含量與 B 組無顯著差異。



#### 七、肝臟 **real-time qRT-PCR** 基因表現 (圖 4-6)

A、N、H 組小鼠 Fas (fatty acid synthase)、SREBP1c (sterol regulatory element binding transcription factor 1c)、Gk (glucokinase)、GS (glycogen synthase)、Acox (Acyl-Co A oxidase)、CPT-1 $\alpha$  (carnitine palmitoyltransferase 1)、PPAR $\alpha$  (peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$ )、PPAR $\beta$ 、PPAR $\gamma$  基因表現量與 B 組無顯著差異。

A 組小鼠 Fads1 (delta 5 desaturase)、Fads2 (delta 6 desaturase) 基因表現量顯著低於 B 組 ( $p < 0.05$ )，Scd1 (stearoyl-Coenzyme A desaturase 1) 基因表現量與 B 組無顯著差異。N 組小鼠 Fads1、Fads2 基因表現量與 B 組無顯著差異，Scd1 顯著低於 B 組 ( $p < 0.05$ )。H 組小鼠 Fads1、Fads2 及 Scd1 基因表現量與 B 組無顯著差異。

#### 八、子宮周圍脂肪 (UWAT) 組織 **real-time qRT-PCR** 基因表現 (圖 4-7)

A 組小鼠 GLUT4 (glucose transport 4) ( $p < 0.01$ )、HSL (Hormone sensitive lipase) ( $p < 0.01$ )、PPAR $\gamma$  ( $p < 0.05$ ) 表現量顯著低於 B 組。N、H 組小鼠 GLUT4、HSL、PPAR $\gamma$  基因表現量與 B 組無顯著差異。

#### 九、A、N、H 組與 B 組具顯著差異之組織代謝物預測

##### (一) 肝臟組織代謝物預測 (表 4-16)

A、N、H 組小鼠肝臟代謝預測產物可能受氨基酸代謝的影響 (例如: leucine、phenylalanine (Phe)、glutamine、tyrosine (Tyr)、trptophan) 以及 biotin、3'AMP、5'AMP 及 GDP-glucose 的影響。

A、H 組小鼠 phenylalanine (Phe)、tyrosine (Tyr)、trptophan (Trp)、biotin 含量顯著低於 B 組 ( $p < 0.05$ )，NAD (Nicotinamide adenine dinucleotide) 含量顯著高於 B 組 ( $p < 0.05$ )。N 組小鼠 Tyr、biotin 含量顯著低於 B 組 ( $p < 0.05$ )，

NAD 顯著高於 B 組 ( $p < 0.05$ )。A、N 組小鼠 3'AMP、5'AMP 含量顯著高於 B 組 ( $p < 0.05$ )。

(二) 腎周圍脂肪組織代謝物預測 (表 4-17)

A、N 組小鼠 Trp 含量顯著低於 B 組 ( $p < 0.05$ )。A、H 組小鼠 taurocholate 顯著低於 B 組 ( $p < 0.05$ )，N 組小鼠 taurocholate 顯著高於 B 組 ( $p < 0.05$ )。N 組 CDP-choline 顯著低於 B 組 ( $p < 0.05$ )。

(三) 血清代謝物預測 (表 4-18)

A 組小鼠 Phe、Tyr、Trp、taurocholate 含量顯著高於 B 組 ( $p < 0.05$ )，Adenosine 含量顯著低於 B 組 ( $p < 0.05$ )。N 組小鼠 Tyr、cytidine、taurocholate 含量顯著高於 B 組 ( $p < 0.05$ )。H 組小鼠 Phe、Tyr 含量顯著高於 B 組 ( $p < 0.05$ )。

(四) 尿液代謝物預測 (表 4-19)

A 組小鼠 biotin、dehydrocholic acid 含量顯著低於 B 組 ( $p < 0.05$ )。N 組小鼠 Pyridoxamine (Vit. B6) 含量顯著高於 B 組 ( $p < 0.05$ )，biotin 含量顯著低於 B 組 ( $p < 0.05$ )。

十、A、N、H 組與 B 組具顯著差異之組織代謝途徑預測

(一) 肝臟組織代謝途徑預測 (表 4-20)

A 組小鼠 ATP metabolism、NAD metabolism、taurine and hypotaurine metabolism 較 B 組增加 ( $p < 0.05$ )，biotin metabolism、tyrosine metabolism、CTP/UTP metabolism 較 B 組降低 ( $p < 0.05$ )。N 組小鼠 ATP metabolism、NAD metabolism、ATP/ITP metabolism、oxidative phosphorylation 較 B 組增加 ( $p < 0.05$ )，biotin metabolism、CTP/UTP metabolism 較 B 組降低 ( $p < 0.05$ )。H 組小鼠 NAD metabolism 較 B 組增加 ( $p < 0.05$ )，taurine and hypotaurine metabolism 較 B 組降低 ( $p < 0.05$ )。A、H 組小鼠 Regulation of lipid metabolism – RXR - dependent regulation of lipid metabolism via PPAR, RAR and VDR 較 B 組降低 ( $p < 0.05$ )。



(二) 腎週圍脂肪組織代謝途徑預測 (表 4-21)

A 組小鼠 taurine and hypotaurine metabolism、Serotonin - melatonin biosynthesis and metabolism、bile acid biosynthesis、tryptophan metabolism 較 B 組降低 ( $p < 0.05$ )，biotin metabolism、tyrosine metabolism、CTP/UTP metabolism 較 B 組降低 ( $p < 0.05$ )。N 組小鼠 taurine and hypotaurine metabolism、bile acid biosynthesis 較 B 組增加 ( $p < 0.05$ )，serotonin - melatonin biosynthesis and metabolism、tryptophan metabolism 較 B 組降低 ( $p < 0.05$ )。H 組小鼠 taurine and hypotaurine metabolism、bile acid biosynthesis 較 B 組降低 ( $p < 0.05$ )。

(三) 血清代謝途徑預測 (表 4-22)

A、H 組小鼠 phenylalanine metabolism、tyrosine metabolism、tryptophan metabolism 較 B 組增加 ( $p < 0.05$ )。N 組小鼠 phenylalanine metabolism、tyrosine metabolism、glutathione metabolism 較 B 組增加 ( $p < 0.05$ )。

(四) 尿液代謝途徑預測 (表 4-23)

A 組小鼠 biotin metabolism 較 B 組降低 ( $p < 0.05$ )，ubiquinone metabolism 較 B 組增加 ( $p < 0.05$ )。N、H 組小鼠 ubiquinone metabolism 較 B 組降低 ( $p < 0.05$ )。

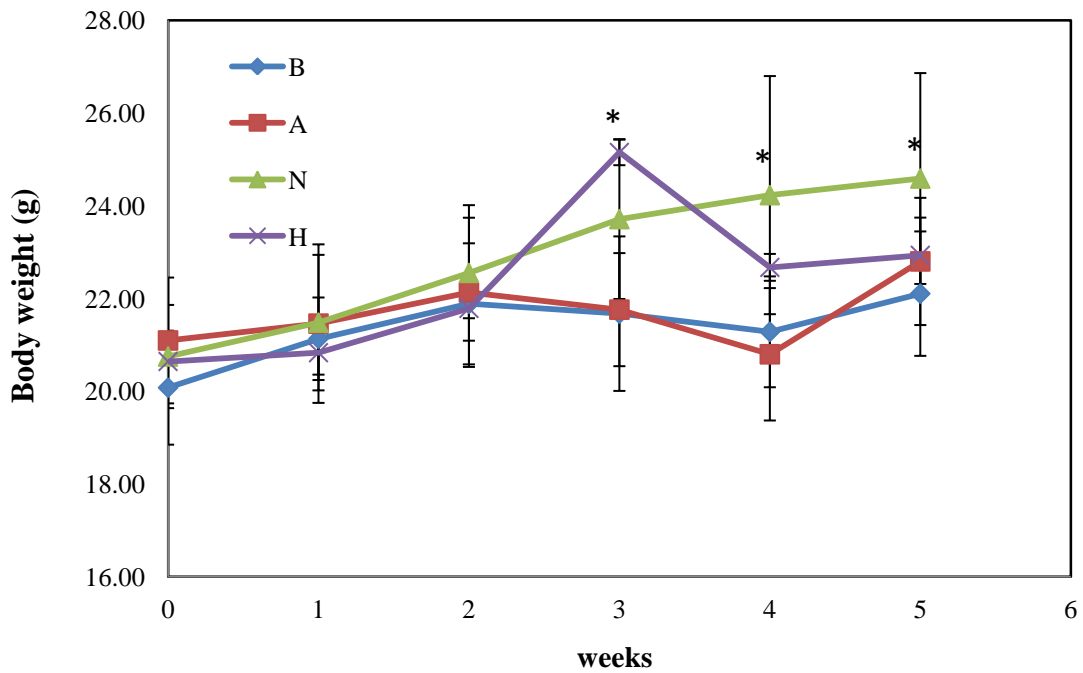


圖 4-1、C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週之生長曲線。

Fig. 4-1. The growth curve of C57BL/6J female mice fed test diets for 5 weeks.

The diet were (1) Basal group: AIN-93 modified basal diet (50 % sucrose) (2) A group: basal diet supplemented with 1% CLA (c9t11 CLA : t10c12 CLA = 1:1) (3) N group: basal diet supplemented with 1% crude CLN ( 76 % 9c,11t,13t-CLN, 2.1 % C16:0, 2.3 % C18:0, 4.8 % C18:1, 6.1 % C18:2, 0.8 % C20:1, 2.5 % t9t11c13 CLN, 5.1 % t9t11t13 CLN) (4) H group: basal diet supplemented with 1% pure CLN (99 % 9c, 11t, 13t-CLN). The values represented mean of 2 ~ 6 mice each group.

Data were analyzed by Student's *t* test. \* indicated significant different from B group by Student's *t* test, \**p* < 0.05.

表 4-1、C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週之體重、攝食量與能量利用率

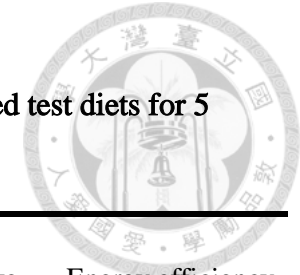


Table 4-1. The body weight, feed intake, feed efficiency, energy intake, and energy efficiency of C57BL/6J female mice fed test diets for 5 weeks

Dietary groups		Initial body weight	Final body weight	Body weight gain	Food intake	Feed efficiency	Energy intake	Energy efficiency
	<i>n</i>	<i>g</i>	<i>g</i>	<i>g/day</i>	<i>g/day</i>	<i>g BW/100 g diet</i>	<i>kcal/day</i>	<i>g BW/1000 kcal</i>
B	6	20.08 ± 1.23	22.11 ± 1.34	2.03 ± 0.99	3.05 ± 0.22	1.82 ± 0.96	12.07 ± 0.87	4.59 ± 2.43
A	6	21.10 ± 1.36	22.80 ± 1.37	1.71 ± 0.80	3.36 ± 0.44	1.39 ± 0.67	12.92 ± 1.71	3.58 ± 1.73
N	6	20.75 ± 1.11	24.59 ± 2.27*	3.84 ± 2.13	3.35 ± 0.45	3.01 ± 1.37	13.00 ± 1.73	7.77 ± 3.54
H	2	20.65 ± 0.02	22.94 ± 0.81	2.54 ± 0.79	3.06 ± 0.09	2.01 ± 0.64	11.85 ± 0.34	5.20 ± 1.66

a. The values represent mean ± SD

b. The diet were (1) Basal group: AIN-93 modified basal diet (50 % sucrose) (2) A group: basal diet supplemented with 1% CLA (9*c*,11*t*-CLA : 10*t*,12*c*-CLA = 1:1) (3) N group: basal diet supplemented with 1% crude CLN ( 76 % 9*c*,11*t*,13*t*-CLN, 2.1 % C16:0, 2.3 % C18:0, 4.8 % C18:1, 6.1 % C18:2, 0.8 % C20:1, 2.5 % 9*t*,11*t*,13*c*-CLN, 5.1 % 9*t*,11*t*,13*t*-CLN) (4) H group: basal diet supplemented with 1% pure CLN (99 % 9*c*, 11*t*,13*t*-CLN). The values represented mean of 2 ~ 6 mice each group. Data were analyzed by Student's *t* test. \* indicated significant different from B group by Student's *t* test, \**p* < 0.05.

表 4-2、C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後犧牲時器官絕對重量

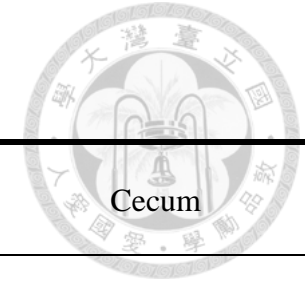


Table 4-2. The absolute organ weight of C57BL/6J female mice fed test diets for 5 weeks

Dietary groups		Liver	Heart	Lung	Kidney	Spleen	Uterus	Cecum	
	<i>n</i>	<i>g</i>							
B	6	0.86 ± 0.08	0.10 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.28 ± 0.03	0.08 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.12 ± 0.03	
A	6	1.35 ± 0.29 **	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.32 ± 0.05	0.09 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.15 ± 0.03	
N	6	0.88 ± 0.13	0.11 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.30 ± 0.05	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.15 ± 0.03	
H	2	0.85 ± 0.07	0.10 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.02	0.17 ± 0.03	

a. The values represent mean ± SD

b. The diet were (1) Basal group: AIN-93 modified basal diet (50 % sucrose) (2) A group: basal diet supplemented with 1% CLA (9*c*,11*t*-CLA : 10*t*,12*c*-CLA = 1:1) (3) N group: basal diet supplemented with 1% crude CLN ( 76 % 9*c*,11*t*,13*t*-CLN, 2.1 % C16:0, 2.3 % C18:0, 4.8 % C18:1, 6.1 % C18:2, 0.8 % C20:1, 2.5 % 9*t*,11*t*,13*c*-CLN, 5.1 % 9*t*,11*t*,13*t*-CLN) (4) H group: basal diet supplemented with 1% pure CLN (99 % 9*c*,11*t*,13*t*-CLN). The values represented mean of 2 ~ 6 mice each group. Data were analyzed by Student's *t* test. \* indicated significant different from B group by Student's *t* test, \**p* < 0.05,\*\**p* < 0.01.

表 4-3、C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後犧牲時器官相對重量

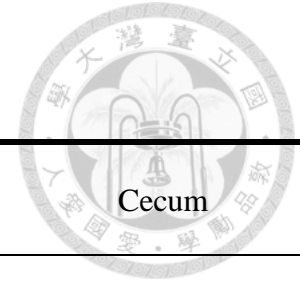


Table 4-3. The relative organ weight of C57BL/6J female mice fed test diets for 5 weeks

Dietary groups		Liver	Heart	Lung	Kidney	Spleen	Uterus	Cecum
	<i>n</i>	%						
B	6	4.38 ± 0.22	0.53 ± 0.03	0.64 ± 0.04	1.41 ± 0.06	0.39 ± 0.09	0.28 ± 0.06	0.58 ± 0.14
A	6	6.68 ± 1.14 **	0.58 ± 0.08	0.66 ± 0.03	1.60 ± 0.16 *	0.47 ± 0.08	0.32 ± 0.07	0.73 ± 0.10
N	6	4.02 ± 0.93	0.50 ± 0.03	0.55 ± 0.05 **	1.36 ± 0.09	0.32 ± 0.03	0.25 ± 0.06	0.68 ± 0.11
H	2	4.07 ± 0.47	0.50 ± 0.05	0.61 ± 0.09	1.35 ± 0.08	0.31 ± 0.01	0.27 ± 0.12	0.83 ± 0.09

a. The values represent mean ± SD

b. The diet were (1) Basal group: AIN-93 modified basal diet (50 % sucrose) (2) A group: basal diet supplemented with 1% CLA (9*c*,11*t*-CLA : 10*t*,12*c*-CLA = 1:1) (3) N group: basal diet supplemented with 1% crude CLN ( 76 % 9*c*,11*t*,13*t*-CLN, 2.1 % C16:0, 2.3 % C18:0, 4.8 % C18:1, 6.1 % C18:2, 0.8 % C20:1, 2.5 % 9*t*,11*t*,13*c*-CLN, 5.1 % 9*t*,11*t*,13*t*-CLN) (4) H group: basal diet supplemented with 1% pure CLN (99 % 9*c*,11*t*,13*t*-CLN). The values represented mean of 2 ~ 6 mice each group. Data were analyzed by Student's *t* test. \* indicated significant different from B group by Student's *t* test, \**p* < 0.05,\*\**p* < 0.01.

表 4-4、C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後犧牲時脂肪組織及肌肉組織絕對重量

Table 4-4. The absolute weight of adipose tissue and muscle of C57BL/6J female mice fed test diets for 5 weeks

Dietary groups		Muscle	UWAT	RWAT	BAT
	<i>n</i>				
			<i>g</i>		
B	6	0.07 ± 0.02	0.31 ± 0.10	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.02
A	6	0.07 ± 0.01	0.24 ± 0.11	0.06 ± 0.02	0.05 ± 0.01
N	6	0.08 ± 0.01	0.59 ± 0.26 *	0.20 ± 0.12 *	0.09 ± 0.03
H	2	0.08 ± 0.00	0.44 ± 0.15	0.13 ± 0.08 *	0.05 ± 0.01

a. The values represent mean ± SD

b. The diet were (1) Basal group: AIN-93 modified basal diet (50 % sucrose) (2) A group: basal diet supplemented with 1% CLA (9*c*,11*t*-CLA : 10*t*,12*c*-CLA = 1:1) (3) N group: basal diet supplemented with 1% crude CLN ( 76 % 9*c*,11*t*,13*t*-CLN, 2.1 % C16:0, 2.3 % C18:0, 4.8 % C18:1, 6.1 % C18:2, 0.8 % C20:1, 2.5 % 9*t*,11*t*,13*c*-CLN, 5.1 % 9*t*,11*t*,13*t*-CLN) (4) H group: basal diet supplemented with 1% pure CLN (99 % 9*c*,11*t*,13*t*-CLN). The values represented mean of 2 ~ 6 mice each group. Data were analyzed by Student's *t* test. \* indicated significant different from B group by Student's *t* test, \**p* < 0.05. c.UWAT = uterine white adipose tissue, RWAT = retroperitoneal white adipose tissue, BAT = brown adipose tissue.



表 4-5、C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後犧牲時脂肪組織及肌肉組織相對重量

Table 4-5. The relative organ weight of adipose tissue and muscle of C57BL/6J female mice fed test diets for 5 weeks

Dietary groups		Muscle	UWAT	RWAT	BAT
	<i>n</i>		%		
B	6	0.36 ± 0.13	1.57 ± 0.41	0.32 ± 0.08	0.32 ± 0.09
A	6	0.37 ± 0.06	1.19 ± 0.51	0.32 ± 0.09	0.24 ± 0.07
N	6	0.37 ± 0.07	2.58 ± 0.89 *	0.88 ± 0.44*	0.39 ± 0.11
H	2	0.37 ± 0.00	2.10 ± 0.64	0.64 ± 0.35*	0.25 ± 0.04

a. The values represent mean ± SD

b. The diet were (1) Basal group: AIN-93 modified basal diet (50 % sucrose) (2) A group: basal diet supplemented with 1% CLA (9*c*,11*t*-CLA : 10*t*,12*c*-CLA = 1:1) (3) N group: basal diet supplemented with 1% crude CLN ( 76 % 9*c*,11*t*,13*t*-CLN, 2.1 % C16:0, 2.3 % C18:0, 4.8 % C18:1, 6.1 % C18:2, 0.8 % C20:1, 2.5 % 9*t*,11*t*,13*c*-CLN, 5.1 % 9*t*,11*t*,13*t*-CLN) (4) H group: basal diet supplemented with 1% pure CLN (99 % 9*c*,11*t*,13*t*-CLN). The values represented mean of 2 ~ 6 mice each group. Data were analyzed by Student's *t* test. \* indicated significant different from B group by Student's *t* test, \**p* < 0.05. c.UWAT = uterine white adipose tissue, RWAT = retroperitoneal white adipose tissue, BAT = brown adipose tissue.

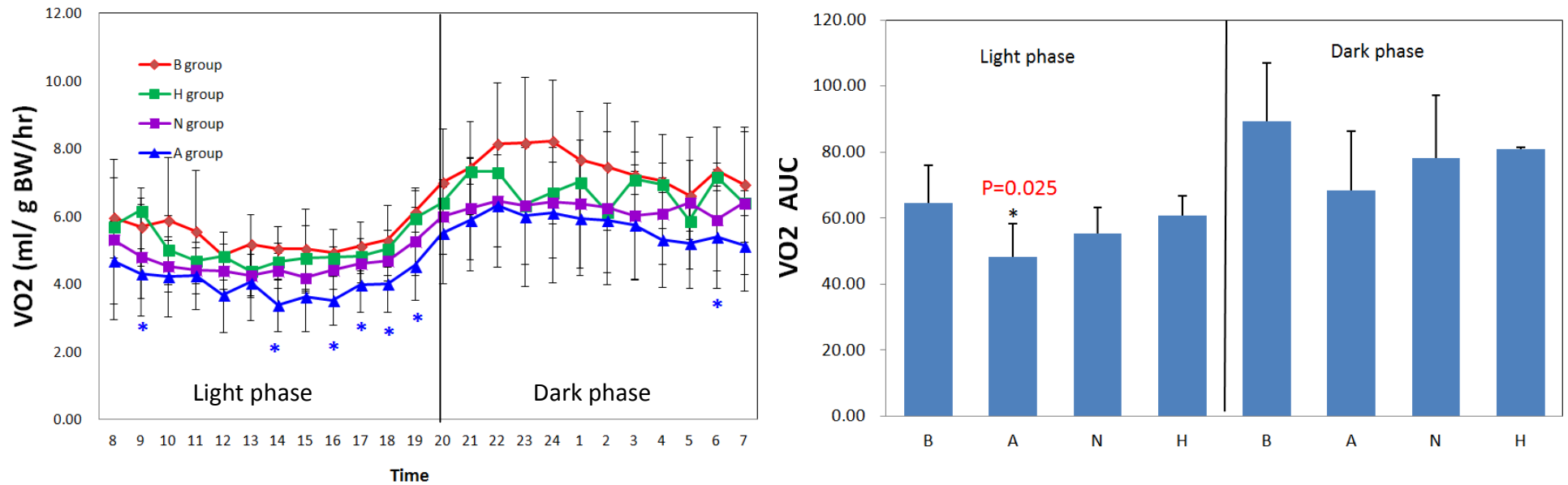


圖 4-2、C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 3 - 5 週之氧氣消耗量。

Fig. 4-2. The O<sub>2</sub> consumption of C57BL/6J female mice fed test diets at week 3~5.

a. AUC = area under curve, b. The diet were (1) Basal group: AIN-93 modified basal diet (50 % sucrose) (2) A group: basal diet supplemented with 1% CLA (9*c*,11*t*-CLA : 10*t*,12*c*-CLA = 1:1) (3) N group: basal diet supplemented with 1% crude CLN ( 76 % 9*c*,11*t*,13*t*-CLN, 2.1 % C16:0, 2.3 % C18:0, 4.8 % C18:1, 6.1 % C18:2, 0.8 % C20:1, 2.5 % 9*t*,11*t*,13*c*-CLN, 5.1 % 9*t*,11*t*,13*t*-CLN) (4) H group: basal diet supplemented with 1% pure CLN (99 % 9*c*,11*t*,13*t*-CLN). The values represented mean of 2 ~ 6 mice each group. Data were analyzed by Student's *t* test. \* indicated significant different from B group by Student's *t* test, \**p* < 0.05.

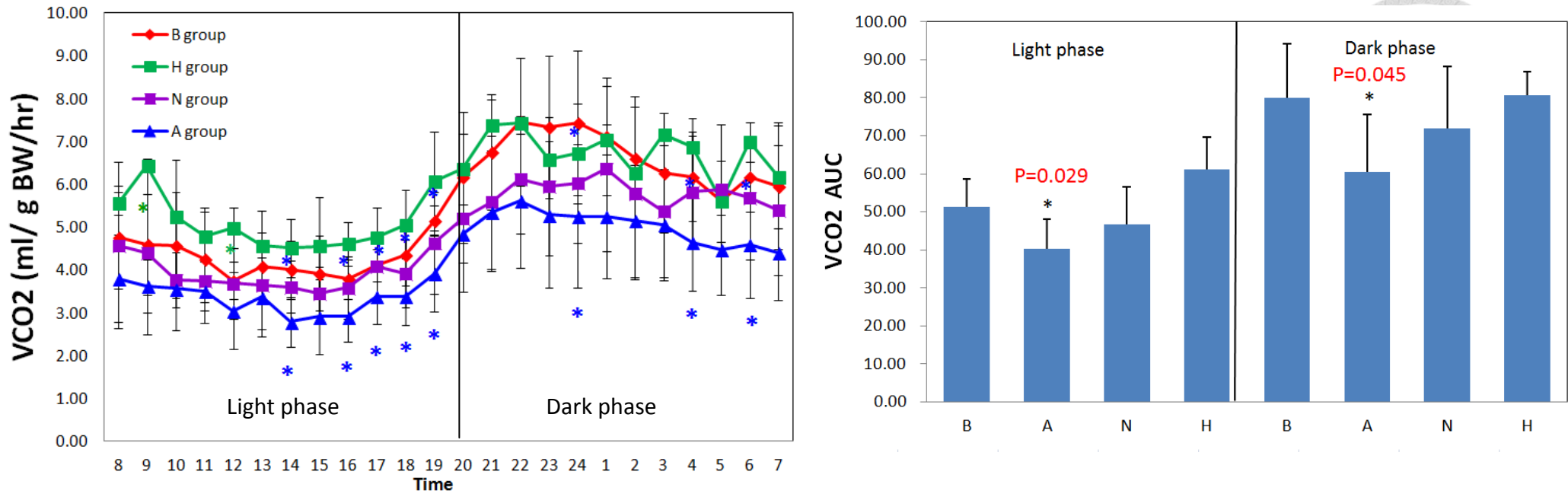


圖 4-3、C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 3-5 週之二氧化碳排出量。

Figure 4-3. The CO<sub>2</sub> production of C57BL/6J female mice fed test diets at at week 3~5.

a. AUC = area under curve, b. The diet were (1) Basal group: AIN-93 modified basal diet (50 % sucrose) (2) A group: basal diet supplemented with 1% CLA (9*c*,11*t*-CLA : 10*t*,12*c*-CLA = 1:1) (3) N group: basal diet supplemented with 1% crude CLN ( 76 % 9*c*,11*t*,13*t*-CLN, 2.1 % C16:0, 2.3 % C18:0, 4.8 % C18:1, 6.1 % C18:2, 0.8 % C20:1, 2.5 % 9*t*,11*t*,13*c*-CLN, 5.1 % 9*t*,11*t*,13*t*-CLN) (4) H group: basal diet supplemented with 1% pure CLN (99 % 9*c*,11*t*,13*t*-CLN). The values represented mean of 2 ~ 6 mice each group. Data were analyzed by Student's *t* test. \* indicated significant different from B group by Student's *t* test, \**p* < 0.05.

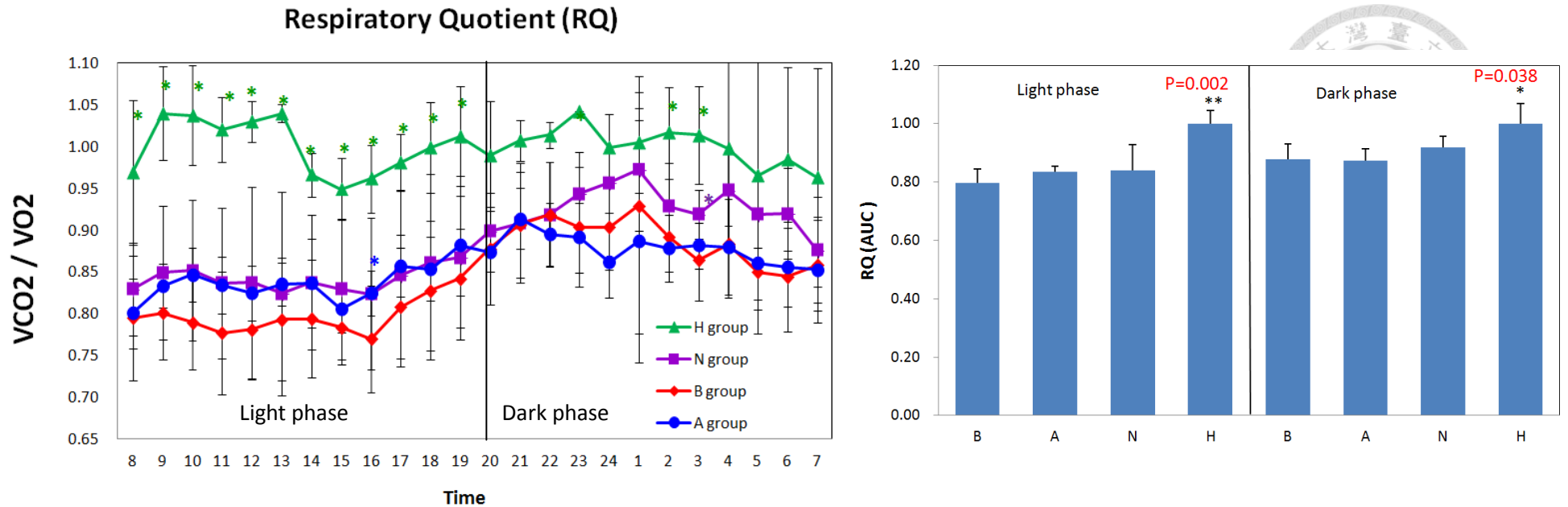


圖 4-4、C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 3-5 週之呼吸商曲線下面積。

Figure 4-4. Area under curve (AUC) of respiratory quotient (RQ) of C57BL/6J female mice fed test diets at week 3 and week 4.

a. AUC = area under curve, b. The diet were (1) Basal group: AIN-93 modified basal diet (50 % sucrose) (2) A group: basal diet supplemented with 1% CLA (9*c*,11*t*-CLA : 10*t*,12*c*-CLA = 1:1) (3) N group: basal diet supplemented with 1% crude CLN ( 76 % 9*c*,11*t*,13*t*-CLN, 2.1 % C16:0, 2.3 % C18:0, 4.8 % C18:1, 6.1 % C18:2, 0.8 % C20:1, 2.5 % 9*t*,11*t*,13*c*-CLN, 5.1 % 9*t*,11*t*,13*t*-CLN) (4) H group: basal diet supplemented with 1% pure CLN (99 % 9*c*,11*t*,13*t*-CLN). The values represented mean of 2 ~ 6 mice each group. Data were analyzed by Student's *t* test. \* indicated significant different from B group by Student's *t* test, \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01.

表 4-6、C57BL/6J 餵食雌鼠實驗飼料 4 週進食血清葡萄糖及 5 週後犧牲時禁食血清葡萄糖濃度

Table 4-6. The serum glucose concentration of C57BL/6J female mice fed test diets at week 4 (feeding serum) and week 5 (fasting serum)

Dietary groups	feeding serum glucose		fasting serum glucose	
	<i>n</i>	<i>mg/dL</i>		
B	6	205.3 ± 40.0	223.8 ± 23.2	
A	6	216.8 ± 54.2	268.0 ± 94.4	
N	6	216.5 ± 18.0	254.8 ± 20.5 *	
H	2	212.7 ± 4.7	238.9 ± 79.2	

a. The values represent mean ± SD b. The diet were (1) Basal group: AIN-93 modified basal diet (50 % sucrose) (2) A group: basal diet supplemented with 1% CLA (9*c*, 11*t*-CLA : 10*t*, 12*c*-CLA = 1:1) (3) N group: basal diet supplemented with 1% crude CLN ( 76 % 9*c*, 11*t*, 13*t*-CLN, 2.1 % C16:0, 2.3 % C18:0, 4.8 % C18:1, 6.1 % C18:2, 0.8 % C20:1, 2.5 % 9*t*, 11*t*, 13*c*-CLN, 5.1 % 9*t*, 11*t*, 13*t*-CLN) (4) H group: basal diet supplemented with 1% pure CLN (99 % 9*c*, 11*t*, 13*t*-CLN). The values represented mean of 2 ~ 6 mice each group. Data were analyzed by Student's *t* test. \* indicated significant different from B group by Student's *t* test, \**p* < 0.05.

表 4-7、餵食 C57BL/6J 雌鼠實驗飼料 4 週進食及 5 週後犧牲之血清胰島素濃度

Table 4-7. The serum insulin concentration of C57BL/6J female mice fed test diets at week 4 (feeding serum) and week 5 (fasting serum)

Dietary		serum insulin ( $\mu\text{g/ml}$ )	
groups	n	feeding	fasting
B	6	2.1 $\pm$ 0.8	0.4 $\pm$ 0.1
A	6	8.6 $\pm$ 5.0 *	1.4 $\pm$ 1.5
N	6	3.0 $\pm$ 2.4	0.7 $\pm$ 0.4 *
H	2	3.8 $\pm$ 1.8	0.4 $\pm$ 0.0

a. The values represent mean  $\pm$  SD b. The diet were (1) Basal group: AIN-93 modified basal diet (50 % sucrose) (2) A group: basal diet supplemented with 1% CLA (9*c*,11*t*-CLA : 10*t*,12*c*-CLA = 1:1) (3) N group: basal diet supplemented with 1% crude CLN ( 76 % 9*c*,11*t*,13*t*-CLN, 2.1 % C16:0, 2.3 % C18:0, 4.8 % C18:1, 6.1 % C18:2, 0.8 % C20:1, 2.5 % 9*t*,11*t*,13*c*-CLN, 5.1 % 9*t*,11*t*,13*t*-CLN) (4) H group: basal diet supplemented with 1% pure CLN (99 % 9*c*,11*t*,13*t*-CLN). The values represented mean of 2 ~ 6 mice each group. Data were analyzed by Student's *t* test. \* indicated significant different from B group by Student's *t* test, \**p* < 0.05.

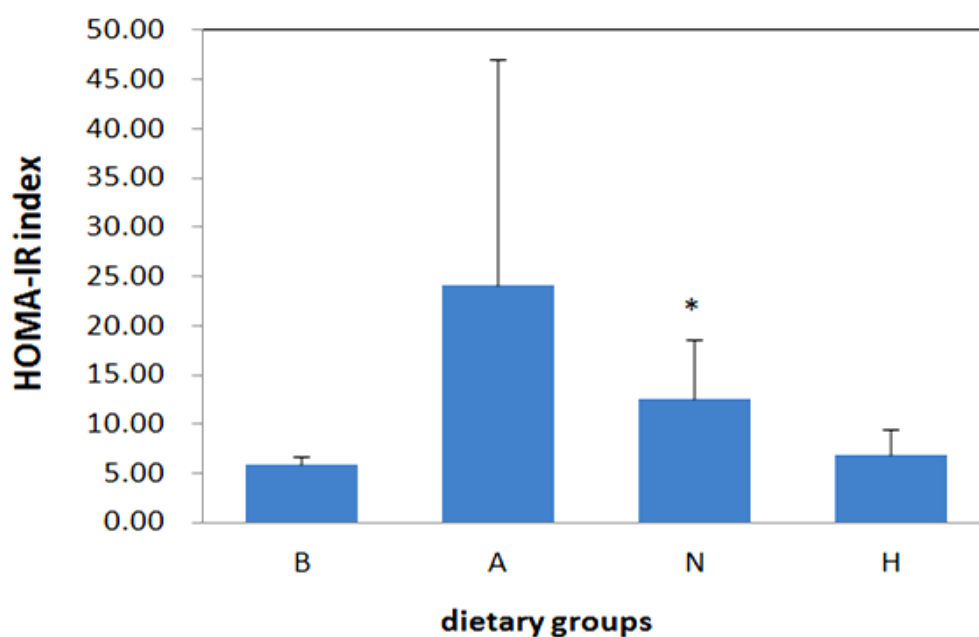


圖 4-5、C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後犧牲之胰島素抗性指標 (HOMA-IR index)。

Fig. 4-5. The HOMA-IR index of C57BL/6J female mice fed test diets for 5 weeks.

a.  $\text{HOMA-IR index} = \text{blood insulin } (\mu\text{U/mL}) \times \text{blood glucose (mmol/L)} \div 22.5$

b. The diet were (1) Basal group: AIN-93 modified basal diet (50 % sucrose) (2) A group: basal diet supplemented with 1% CLA (9*c*,11*t*-CLA : 10*t*,12*c*-CLA = 1:1) (3) N group: basal diet supplemented with 1% crude CLN ( 76 % 9*c*,11*t*,13*t*-CLN, 2.1 % C16:0, 2.3 % C18:0, 4.8 % C18:1, 6.1 % C18:2, 0.8 % C20:1, 2.5 % 9*t*,11*t*,13*c*-CLN, 5.1 % 9*t*,11*t*,13*t*-CLN) (4) H group: basal diet supplemented with 1% pure CLN (99 % 9*c*,11*t*,13*t*-CLN). The values represented mean of 2 ~ 6 mice each group. Data were analyzed by Student's *t* test. \* indicated significant different from B group by Student's *t* test, \**p* < 0.05.

表 4-8、C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後血清中三酸甘油酯及膽固醇濃度

Table 4-8. The serum triglyceride concentration and the serum cholesterol of C57BL/6J female mice fed test diets for 5 weeks

Dietary groups	<i>n</i>	Serum triglyceride	Serum cholesterol
		<i>mg/dL</i>	
B	6	63.5 ± 9.6	86.6 ± 12.9
A	6	43.2 ± 9.2 **	141.0 ± 26.7 **
N	6	88.2 ± 23.6 *	80.7 ± 21.5
H	2	53.4 ± 16.9	100.5 ± 8.2

a. The values represent mean ± SD b. The diet were (1) Basal group: AIN-93 modified basal diet (50 % sucrose) (2) A group: basal diet supplemented with 1% CLA (9*c*,11*t*-CLA : 10*t*,12*c*-CLA = 1:1) (3) N group: basal diet supplemented with 1% crude CLN ( 76 % 9*c*,11*t*,13*t*-CLN, 2.1 % C16:0, 2.3 % C18:0, 4.8 % C18:1, 6.1 % C18:2, 0.8 % C20:1, 2.5 % 9*t*,11*t*,13*c*-CLN, 5.1 % 9*t*,11*t*,13*t*-CLN) (4) H group: basal diet supplemented with 1% pure CLN (99 % 9*c*,11*t*,13*t*-CLN). The values represented mean of 2 ~ 6 mice each group. Data were analyzed by Student's *t* test. \* indicated significant different from B group by Student's *t* test, \**p* < 0.05,\*\* *p* < 0.01.





表 4-9、C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後肝臟三酸甘油酯及膽固醇含量

Table 4-9. The concentration of hepatic triglyceride and cholesterol of C57BL/6J female mice fed test diets for 5 weeks

Dietary groups	Triglyceride				cholesterol	
	<i>n</i>	mg / g Liver	mg / Total Liver	mg / g Liver	mg / Total Liver	
B	6	32.1 ± 5.4	28.1 ± 5.3	5.9 ± 0.8	5.1 ± 1.2	
A	6	52.8 ± 20.8 *	73.1 ± 32.4 **	8.1 ± 0.9 **	10.9 ± 2.5 **	
N	6	27.8 ± 4.9	24.5 ± 4.7	6.7 ± 1.7	6.0 ± 2.1	
H	2	18.4 ± 7.4 *	16.3 ± 7.8 *	7.1 ± 0.7	6.0 ± 0.1	

a. The values represent mean ± SD b. The diet were (1) Basal group: AIN-93 modified basal diet (50 % sucrose) (2) A group: basal diet supplemented with 1% CLA (9*c*,11*t*-CLA : 10*t*,12*c*-CLA = 1:1) (3) N group: basal diet supplemented with 1% crude CLN ( 76 % 9*c*,11*t*,13*t*-CLN, 2.1 % C16:0, 2.3 % C18:0, 4.8 % C18:1, 6.1 % C18:2, 0.8 % C20:1, 2.5 % 9*t*,11*t*,13*c*-CLN, 5.1 % 9*t*,11*t*,13*t*-CLN) (4) H group: basal diet supplemented with 1% pure CLN (99 % 9*c*,11*t*,13*t*-CLN). The values represented mean of 2 ~ 6 mice each group. Data were analyzed by Student's *t* test. \* indicated significant different from B group by Student's *t* test, \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01



表 4-10、C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後之 RWAT 三酸甘油酯及膽固醇含量

Table 4-10. The concentration of RWAT triglyceride and cholesterol of C57BL/6J female mice fed test diets for 5 weeks

Dietary groups	RWAT triglyceride			RWAT cholesterol	
	<i>n</i>	mg / g RWAT	mg / Total RWAT	mg / g RWAT	mg / Total RWAT
B	6	124.7 ± 19.4	4.8 ± 0.8	6.4 ± 1.0	0.1 ± 0.0
A	6	97.2 ± 18.4 *	3.4 ± 1.4	5.7 ± 1.2	0.2 ± 0.1
N	6	132.2 ± 72.6	9.3 ± 4.6*	6.7 ± 3.2	0.9 ± 0.9 *
H	2	116.8 ± 39.5	4.7 ± 1.3	7.2 ± 3.8	0.7 ± 0.5 *

a. The values represent mean ± SD

b. The diet were (1) Basal group: AIN-93 modified basal diet (50 % sucrose) (2) A group: basal diet supplemented with 1% CLA (9*c*,11*t*-CLA : 10*t*,12*c*-CLA = 1:1) (3) N group: basal diet supplemented with 1% crude CLN ( 76 % 9*c*,11*t*,13*t*-CLN, 2.1 % C16:0, 2.3 % C18:0, 4.8 % C18:1, 6.1 % C18:2, 0.8 % C20:1, 2.5 % 9*t*,11*t*,13*c*-CLN, 5.1 % 9*t*,11*t*,13*t*-CLN) (4) H group: basal diet supplemented with 1% pure CLN (99 % 9*c*,11*t*,13*t*-CLN). The values represented mean of 2 ~ 6 mice each group. Data were analyzed by Student's *t* test. \* indicated significant different from B group by Student's *t* test, \**p* < 0.05.

表 4-11、C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後肌肉三酸甘油酯及膽固醇含量

Table 4-11. The concentration of muscle triglyceride and cholesterol of C57BL/6J female mice fed test diets for 5 weeks

Dietary groups	Muscle triglyceride		Muscle cholesterol
	<i>n</i>	mg / g Muscle	mg / g Muscle
B	6	5.2 ± 1.4	1.1 ± 0.3
A	6	4.2 ± 0.8	1.1 ± 0.3
N	6	5.7 ± 1.8	1.3 ± 0.3
H	2	5.9 ± 0.7	1.2 ± 0.4

a. The values represent mean ± SD

b. The diet were (1) Basal group: AIN-93 modified basal diet (50 % sucrose) (2) A group: basal diet supplemented with 1% CLA (9*c*,11*t*-CLA : 10*t*,12*c*-CLA = 1:1) (3) N group: basal diet supplemented with 1% crude CLN ( 76 % 9*c*,11*t*,13*t*-CLN, 2.1 % C16:0, 2.3 % C18:0, 4.8 % C18:1, 6.1 % C18:2, 0.8 % C20:1, 2.5 % 9*t*,11*t*,13*c*-CLN, 5.1 % 9*t*,11*t*,13*t*-CLN) (4) H group: basal diet supplemented with 1% pure CLN (99 % 9*c*,11*t*,13*t*-CLN). The values represented mean of 2 ~ 6 mice each group. Data were analyzed by Student's *t* test. \* indicated significant different from B group by Student's *t* test.

表 4-12、C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後肝臟脂肪酸組成

Table 4-12. Fatty acid compositions in liver of C57BL/6J female mice after fed test diets for 5 weeks

groups	Liver			
	B	A	N	H
	WT % Total FA			
<i>Saturated fatty acid</i>				
C14:0	0.41 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.31 ± 0.07 <sup>b*</sup>	0.46 ± 0.08 <sup>ab</sup>	0.62 ± 0.52 <sup>a</sup>
C16:0	22.55 ± 1.82 <sup>b</sup>	26.81 ± 1.31 <sup>a**</sup>	23.56 ± 2.72 <sup>ab</sup>	21.45 ± 2.46 <sup>b</sup>
C18:0	4.49 ± 0.56 <sup>b</sup>	4.53 ± 1.36 <sup>b</sup>	4.90 ± 1.21 <sup>b</sup>	7.49 ± 1.11 <sup>a*</sup>
C20:0	ND	ND	ND	ND
C24:0	ND	ND	ND	ND
<i>Monounsaturated fatty acid</i>				
C14:1	ND	ND	ND	ND
C16:1n-9	0.33 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.67 ± 0.27 <sup>a*</sup>	0.40 ± 0.11 <sup>ab</sup>	0.29 ± 0.02 <sup>b</sup>
C16:1n-7	3.01 ± 0.27 <sup>b</sup>	2.45 ± 0.58 <sup>b</sup>	4.71 ± 1.16 <sup>a**</sup>	2.53 ± 0.38 <sup>b</sup>
C18:1n-9c	29.79 ± 1.01 <sup>b</sup>	39.84 ± 6.22 <sup>a*</sup>	29.95 ± 5.08 <sup>b</sup>	27.04 ± 2.93 <sup>b</sup>
C18:1n-7	3.45 ± 0.41 <sup>a</sup>	3.57 ± 0.34 <sup>a</sup>	3.29 ± 0.98 <sup>a</sup>	3.29 ± 0.18 <sup>a</sup>
C20:1n-9	0.05 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.10 ± 0.03 <sup>ab</sup>	0.12 ± 0.03 <sup>a*</sup>	0.31 ± 0.33 <sup>ab</sup>
<i>Polyunsaturated fatty acid</i>				
C18:2n-6	27.38 ± 2.11 <sup>a</sup>	14.07 ± 4.05 <sup>c**</sup>	19.32 ± 3.30 <sup>b**</sup>	23.73 ± 0.17 <sup>ab</sup>
18:2 c9t11 CLA	ND	0.47 ± 0.07 <sup>c**</sup>	0.89 ± 0.12 <sup>a**</sup>	0.67 ± 0.22 <sup>b**</sup>
18:2 t10c12 CLA	ND	0.08 ± 0.03 <sup>**</sup>	ND	ND
C18:3n-6	0.76 ± 0.23 <sup>a</sup>	0.14 ± 0.01 <sup>c**</sup>	0.71 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.45 ± 0.10 <sup>b</sup>
C18:3n-3	ND	ND	ND	ND
C18:3 9c,11t,13t-CLN	ND	ND	0.69 ± 0.13 <sup>a**</sup>	0.51 ± 0.39 <sup>a</sup>
C18:4n-3	ND	ND	ND	ND
C20:2n-6	0.07 ± 0.14 <sup>a</sup>	0.09 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.03 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.01 ± 0.01 <sup>a</sup>
C20:3n-6	0.28 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.38 ± 0.14 <sup>bc</sup>	0.56 ± 0.12 <sup>b**</sup>	0.77 ± 0.11 <sup>a*</sup>
C20:4n-6 (AA)	4.04 ± 0.65 <sup>b</sup>	3.64 ± 1.86 <sup>b</sup>	5.76 ± 1.39 <sup>ab</sup>	6.52 ± 1.76 <sup>a**</sup>
C20:5n-3 (EPA)	0.49 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.19 ± 0.05 <sup>bc**</sup>	0.16 ± 0.02 <sup>c**</sup>	0.26 ± 0.03 <sup>b**</sup>
C22:6n-3 (DHA)	2.90 ± 0.63 <sup>a</sup>	2.67 ± 1.55 <sup>a</sup>	4.49 ± 1.65 <sup>a</sup>	4.06 ± 0.94 <sup>a</sup>

第四章 實驗結果

groups	Liver			
	B	A	N	H
	WT % Total FA			
SFA	27.45 ± 2.26 <sup>a</sup>	31.64 ± 1.89 <sup>a*</sup>	28.93 ± 3.79 <sup>a</sup>	28.56 ± 2.67 <sup>a</sup>
MUFA	36.64 ± 1.02 <sup>b</sup>	46.63 ± 6.54 <sup>a*</sup>	38.47 ± 6.55 <sup>ab</sup>	33.92 ± 1.74 <sup>b</sup>
PUFA	35.92 ± 1.31 <sup>a</sup>	21.72 ± 6.62 <sup>b**</sup>	32.60 ± 3.69 <sup>a</sup>	37.52 ± 0.94 <sup>a</sup>
n-3	3.38 ± 0.71 <sup>a</sup>	2.86 ± 1.56 <sup>a</sup>	4.65 ± 1.64 <sup>a</sup>	4.66 ± 0.42 <sup>a</sup>
n-6	32.53 ± 1.70 <sup>a</sup>	18.31 ± 5.28 <sup>c**</sup>	26.36 ± 3.15 <sup>b**</sup>	31.71 ± 1.09 <sup>ab</sup>
MUFA/SFA	1.34 ± 0.14 <sup>a</sup>	1.48 ± 0.23 <sup>a</sup>	1.38 ± 0.45 <sup>a</sup>	1.20 ± 0.17 <sup>a</sup>
n-3/n-6	0.10 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.15 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.18 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.15 ± 0.01 <sup>a</sup>
<b><i>delta-6-desaturation index</i></b> (C18:3 n-6/ C18:2 n-6)	0.03 ± 0.01 <sup>ab</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>c**</sup>	0.04 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.02 ± 0.00 <sup>bc</sup>
<b><i>delta-5-desaturation index</i></b> (C20:4 n-6/ C20:3 n-6)	14.61 ± 1.90 <sup>a</sup>	9.36 ± 2.49 <sup>b*</sup>	10.34 ± 0.83 <sup>b**</sup>	9.49 ± 2.31 <sup>b*</sup>
<b><i>delta-9-desaturase (SCD)</i></b>				
C16:1n-7/C16:0	0.13 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.09 ± 0.02 <sup>b*</sup>	0.21 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.12 ± 0.00 <sup>ab</sup>
C18:1n-9/C18:0	6.74 ± 1.13	9.76 ± 4.08	6.65 ± 2.95	4.06 ± 0.40

a. The values represent mean ± SD b. The diet were (1) Basal group: AIN-93 modified basal diet (50 % sucrose) (2) A group: basal diet supplemented with 1% CLA (9*c*, 11*t*-CLA : 10*t*, 12*c*-CLA = 1:1) (3) N group: basal diet supplemented with 1% crude CLN ( 76 % 9*c*, 11*t*, 13*t*-CLN, 2.1 % C16:0, 2.3 % C18:0, 4.8 % C18:1, 6.1 % C18:2, 0.8 % C20:1, 2.5 % 9*t*, 11*t*, 13*c*-CLN, 5.1 % 9*t*, 11*t*, 13*t*-CLN) (4) H group: basal diet supplemented with 1% pure CLN (99 % 9*c*, 11*t*, 13*t*-CLN). The values represented mean of 2 ~ 6 mice each group. Data were analyzed by Student's *t* test. \* indicated significant different from B group by Student's *t* test, \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01 c. Data were analyzed by one- way ANOVA, Duncan's Multiple Range Test and Student's *t* test. Values not sharing a common superscript letter were significantly different from one another , *p* < 0.05. d. ND = Not detected

表 4-13、C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後腎周圍脂肪組織 (RWAT) 脂肪酸組成  
Table 4-13. Fatty acid compositions in RWAT of C57BL/6J female mice after fed test diets for 5 weeks

groups	RWAT			
	B	A	N	H
	WT % Total FA			
<i>Saturated fatty acid</i>				
C14:0	1.25 ± 0.07	1.37 ± 0.21	1.31 ± 0.14	1.29 ± 0.02
C16:0	20.52 ± 0.77	26.64 ± 2.22**	21.46 ± 0.80	19.32 ± 0.65
C18:0	4.01 ± 0.73	2.70 ± 0.20**	3.08 ± 0.23**	2.78 ± 0.48
C20:0	ND	ND	ND	ND
C24:0	ND	ND	ND	ND
<i>Monounsaturated fatty acid</i>				
C14:1	ND	ND	ND	ND
C16:1n-9	0.26 ± 0.15	0.40 ± 0.17	0.12 ± 0.01*	0.10 ± 0.02
C16:1n-7	5.13 ± 0.89	4.09 ± 0.42*	7.44 ± 1.01**	6.72 ± 1.37
C18:1n-9	39.53 ± 1.42	34.70 ± 3.49	33.24 ± 2.35**	39.65 ± 5.94
C18:1n-7	2.12 ± 1.69	3.61 ± 0.30	2.73 ± 0.55	3.59 ± 0.58
C20:1n-9	0.10 ± 0.03	0.05 ± 0.02**	0.11 ± 0.02	0.09 ± 0.02
<i>Polyunsaturated fatty acid</i>				
C18:2n-6c	26.57 ± 2.01	24.45 ± 2.17	27.54 ± 1.26	25.10 ± 4.78
18:2 c9t11 CLA	ND	1.06 ± 0.13**	2.08 ± 0.18**	0.76 ± 0.10**
18:2 t10c12 CLA	ND	0.64 ± 0.08**	ND	ND
C18:3n-6	0.01 ± 0.02	ND	ND	ND
C18:3n-3	ND	ND	ND	ND
C18:3 9c,11t,13t-CLN	ND	ND	0.35 ± 0.18**	0.02 ± 0.02*
C18:4n-3	ND	ND	ND	ND
C20:2n-6	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.00
C20:3n-6	0.14 ± 0.02	0.08 ± 0.04**	0.14 ± 0.03	0.15 ± 0.02
C20:4n-6	0.25 ± 0.05	0.18 ± 0.07	0.24 ± 0.03	0.27 ± 0.02
C20:5n-3	0.03 ± 0.01	0.29 ± 0.66	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01
C22:6n-3	0.05 ± 0.04	0.02 ± 0.02	0.10 ± 0.03*	0.10 ± 0.02
SFA	25.68 ± 0.85	31.07 ± 2.69**	25.84 ± 1.14	23.39 ± 0.19*
MUFA	47.78 ± 0.76	42.72 ± 3.60*	43.64 ± 1.90**	50.15 ± 5.11
PUFA	26.55 ± 1.54	26.53 ± 3.20	30.51 ± 1.43**	26.46 ± 4.93
n-3	0.07 ± 0.03	0.36 ± 0.73	0.13 ± 0.03	0.13 ± 0.02
n-6	26.48 ± 1.55	24.48 ± 2.38	27.95 ± 1.26	25.55 ± 4.79
MUFA/SFA	1.86 ± 0.04	1.39 ± 0.24**	1.69 ± 0.13*	2.15 ± 0.24*
n-3/n-6	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.03	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00

a. The values represent mean ± SD b. The diet were (1) Basal group: AIN-93 modified basal diet (50 % sucrose) (2) A group: basal diet supplemented with 1% CLA (9c,11t-CLA : 10t,12c-CLA = 1:1) (3) N group: basal diet supplemented with 1% crude CLN ( 76 % 9c,11t,13t-CLN, 2.1 % C16:0, 2.3 % C18:0, 4.8 % C18:1, 6.1 % C18:2, 0.8 % C20:1, 2.5 % 9t,11t,13c-CLN, 5.1 % 9t,11t,13t-CLN) (4) H group: basal diet supplemented with 1% pure CLN (99 % 9c,11t,13t-CLN). The values represented mean of 2 ~ 6 mice each group. Data were analyzed by Student's *t* test. \* indicated significant different from B group by Student's *t* test, \**p* < 0.05,\*\**p* < 0.01 c. ND = Not detected

表 4-14、C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後血清組織脂肪酸組成  
Table 4-14. Fatty acid compositions in serum of C57BL/6J female mice after fed test diets for 5 weeks

groups	Serum			
	B	A	N	H
	WT % Total FA			
<i>Saturated fatty acid</i>				
C14:0	0.13 ± 0.04	0.07 ± 0.01*	0.16 ± 0.04	0.12 ± 0.02
C16:0	35.22 ± 3.12	29.72 ± 2.55*	25.49 ± 3.53**	26.44 ± 3.44*
C18:0	17.88 ± 1.89	15.10 ± 3.24	13.57 ± 2.24**	16.12 ± 1.99
C20:0	ND	ND	ND	ND
C24:0	ND	ND	ND	ND
<i>Monounsaturated fatty acid</i>				
C14:1	ND	ND	ND	ND
C16:1n-9	0.23 ± 0.08	0.22 ± 0.06	0.19 ± 0.10	0.19 ± 0.02
C16:1n-7	1.38 ± 0.28	0.71 ± 0.13**	2.19 ± 0.85	1.19 ± 0.30
C18:1n-9c	14.21 ± 1.66	11.67 ± 2.07	14.73 ± 4.24	10.25 ± 0.49*
C18:1n-7	2.08 ± 0.30	1.88 ± 0.41	2.36 ± 0.60	1.70 ± 0.16
C20:1n-9	0.12 ± 0.11	0.09 ± 0.01	0.11 ± 0.12	0.25 ± 0.24
<i>Polyunsaturated fatty acid</i>				
C18:2n-6c	15.55 ± 2.44	14.31 ± 1.74	20.13 ± 2.32*	18.62 ± 2.62
18:2 c9t11 CLA	ND	0.41 ± 0.16**	0.69 ± 0.10**	0.36 ± 0.05**
18:2 t10c12 CLA	ND	0.12 ± 0.04**	ND	ND
C18:3n-6	ND	ND	ND	ND
C18:3n-3	ND	ND	ND	ND
C18:3 9c,11t,13t-CLN	ND	ND	0.20 ± 0.02**	0.19 ± 0.01**
C18:4n-3	ND	ND	ND	ND
C20:2n-6	ND	ND	ND	ND
C20:3n-6	0.36 ± 0.09	1.29 ± 0.31**	0.94 ± 0.34**	0.89 ± 0.38*
C20:4n-6	10.56 ± 1.88	17.79 ± 2.88**	14.66 ± 3.85	18.27 ± 1.44**
C20:5n-3	0.22 ± 0.15	0.44 ± 0.15*	0.33 ± 0.10	0.32 ± 0.02
C22:6n-3	2.07 ± 0.70	6.29 ± 2.63**	4.35 ± 2.47	5.08 ± 2.22*
SFA	53.23 ± 4.14	44.89 ± 5.13*	39.14 ± 5.58**	42.69 ± 5.45*
MUFA	18.03 ± 2.23	14.57 ± 2.33*	19.58 ± 5.64	13.58 ± 1.21*
PUFA	28.76 ± 4.58	40.63 ± 6.49**	41.28 ± 8.43*	43.73 ± 6.66*
n-3	2.29 ± 0.75	6.73 ± 2.73**	4.67 ± 2.46	5.39 ± 2.19*
n-6	26.47 ± 4.35	33.39 ± 3.99*	35.73 ± 6.01*	37.78 ± 4.44*
MUFA/SFA	0.34 ± 0.05	0.33 ± 0.05	0.51 ± 0.18	0.32 ± 0.01
n-3/n-6	0.09 ± 0.03	0.20 ± 0.06**	0.12 ± 0.05	0.14 ± 0.04

a. The values represent mean ± SD b. The diet were (1) Basal group: AIN-93 modified basal diet (50 % sucrose) (2) A group: basal diet supplemented with 1% CLA (c9t11 CLA : t10c12 CLA = 1:1) (3) N group: basal diet supplemented with 1% crude CLN ( 76 % 9c,11t,13t-CLN, 2.1 % C16:0, 2.3 % C18:0, 4.8 % C18:1, 6.1 % C18:2, 0.8 % C20:1, 2.5 % t9t11c13 CLN, 5.1 % t9t11t13 CLN) (4) H group: basal diet supplemented with 1% pure CLN (99 % 9c, 11t, 13t-CLN). The values represented mean of 2 ~ 6 mice each group. Data were analyzed by Student's *t* test. \* indicated significant different from B group by Student's *t* test, \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01. c. ND = Not detected

表 4-15、C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後肌肉細胞脂肪酸組成  
 Table 4-15. Fatty acid compositions in muscle of C57BL/6J female mice after fed test diets for 5 weeks

groups	Muscle			
	B	A	N	H
	WT % Total FA			
<i>Saturated fatty acid</i>				
C14:0	0.51 ± 0.29	1.23 ± 0.59*	1.23 ± 0.39**	0.89 ± 0.28
C16:0	23.05 ± 1.73	30.41 ± 4.46**	25.13 ± 1.93	22.0 ± 3.88
C18:0	8.13 ± 2.61	7.52 ± 0.60	5.55 ± 0.85	5.42 ± 2.17
C20:0	ND	ND	ND	ND
C24:0	ND	ND	ND	ND
<i>Monounsaturated fatty acid</i>				
C14:1	ND	ND	ND	ND
C16:1n-9	0.31 ± 0.19	0.42 ± 0.23	0.23 ± 0.14	0.26 ± 0.18
C16:1n-7	4.35 ± 1.13	6.70 ± 1.58*	10.61 ± 2.98**	8.34 ± 1.68**
C18:1n-9c	29.31 ± 4.73	18.21 ± 3.43**	26.22 ± 3.67	30.35 ± 3.98
C18:1n-7	4.35 ± 0.48	3.82 ± 0.30*	3.62 ± 0.20*	3.86 ± 0.52
C20:1n-9	0.17 ± 0.03	0.14 ± 0.07	0.12 ± 0.02**	0.11 ± 0.01*
<i>Polyunsaturated fatty acid</i>				
C18:2n-6c	17.48 ± 2.46	15.88 ± 1.12	14.22 ± 2.04*	17.72 ± 4.30
18:2 c9t11 CLA	ND	0.54 ± 0.27**	1.13 ± 0.10**	0.58 ± 0.07**
18:2 t10c12 CLA	ND	0.30 ± 0.16**	ND	ND
C18:3n-6	ND	ND	ND	ND
C18:3n-3	ND	ND	ND	ND
C18:3 9c,11t,13t-CLN	ND	ND	0.06 ± 0.01**	0.02 ± 0.01**
C18:4n-3	ND	ND	ND	ND
C20:2n-6	ND	ND	ND	ND
C20:3n-6	0.56 ± 0.15	0.48 ± 0.26	0.40 ± 0.16	0.38 ± 0.07
C20:4n-6	4.43 ± 2.42	6.12 ± 1.28	4.04 ± 1.30	3.32 ± 0.94
C20:5n-3	0.19 ± 0.15	0.24 ± 0.15	0.13 ± 0.05	0.11 ± 0.04
C22:6n-3	7.30 ± 1.30	9.97 ± 3.23	7.31 ± 2.86	0.64 ± 1.96
SFA	31.69 ± 3.77	39.16 ± 5.12*	31.92 ± 1.59	28.31 ± 6.33
MUFA	38.48 ± 5.23	29.29 ± 3.94**	40.79 ± 4.94	42.92 ± 4.98
PUFA	29.96 ± 2.56	33.53 ± 4.14	27.29 ± 5.89	28.76 ± 1.36
n-3	7.49 ± 1.43	10.22 ± 3.36	7.45 ± 2.87	6.75 ± 2.00
n-6	22.47 ± 1.68	22.48 ± 1.12	18.66 ± 3.24*	21.42 ± 3.29
MUFA/SFA	1.24 ± 0.03	0.75 ± 0.11**	1.28 ± 0.14	1.57 ± 0.53
n-3/n-6	0.33 ± 0.06	0.45 ± 0.14	0.39 ± 0.10	0.33 ± 0.14

a. The values represent mean ± SD b. The diet were (1) Basal group: AIN-93 modified basal diet (50 % sucrose) (2) A group: basal diet supplemented with 1% CLA (9c,11t-CLA : 10t,12c-CLA = 1:1) (3) N group: basal diet supplemented with 1% crude CLN ( 76 % 9c,11t,13t-CLN, 2.1 % C16:0, 2.3 % C18:0, 4.8 % C18:1, 6.1 % C18:2, 0.8 % C20:1, 2.5 % 9t,11t,13c-CLN, 5.1 % 9t,11t,13t-CLN) (4) H group: basal diet supplemented with 1% pure CLN (99 % 9c,11t,13t-CLN). The values represented mean of 2 ~ 6 mice each group. Data were analyzed by Student's *t* test. \* indicated significant different from B group by Student's *t* test, \**p* < 0.05,\*\**p* < 0.01 c. ND = Not detected



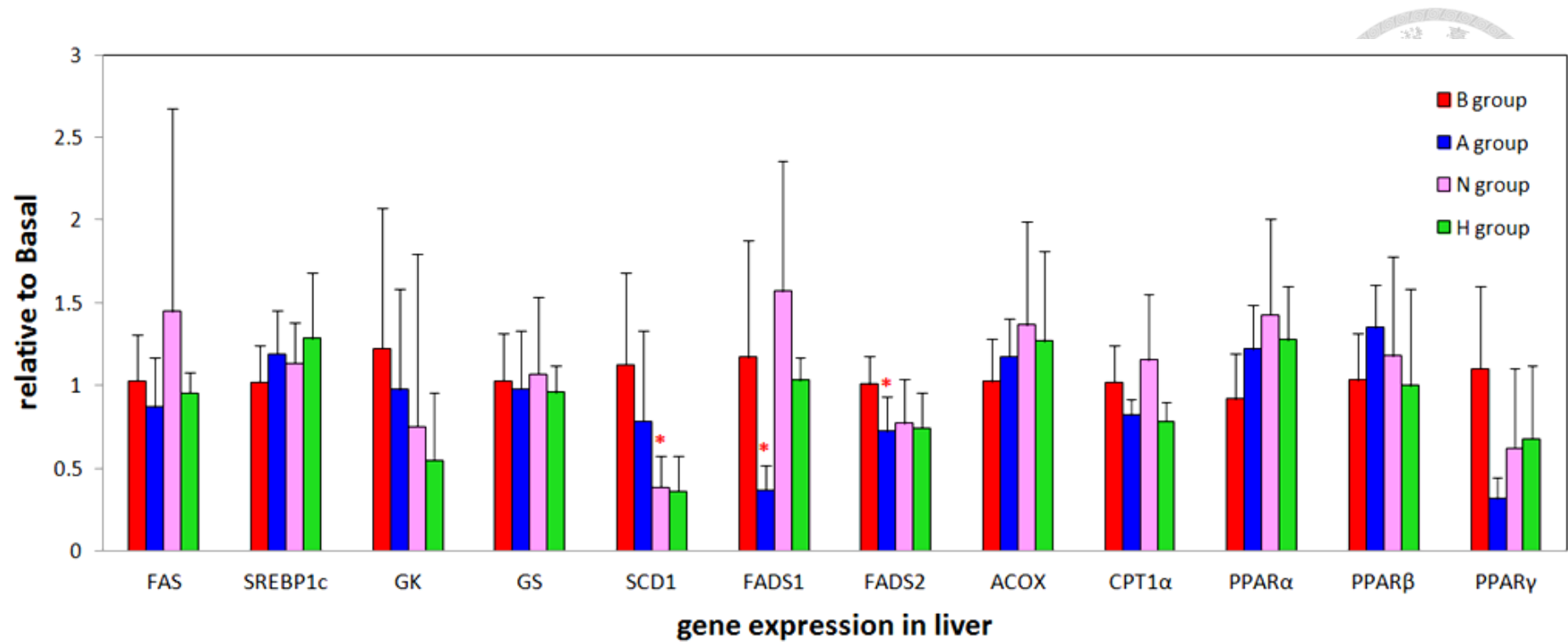


圖 4-6、C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後肝臟基因表現。

Fig. 4-6. The gene expression of liver after feeding C57BL/6J female mice with test diets for 5 weeks.

a. The values represent mean  $\pm$  SD b. The diet were (1) Basal group: AIN-93 modified basal diet (50 % sucrose) (2) A group: basal diet supplemented with 1% CLA (c9t11 CLA : t10c12 CLA = 1:1) (3) N group: basal diet supplemented with 1% crude CLN ( 76 % 9c,11t,13t-CLN, 2.1 % C16:0, 2.3 % C18:0, 4.8 % C18:1, 6.1 % C18:2, 0.8 % C20:1, 2.5 % t9t11c13 CLN, 5.1 % t9t11t13 CLN) (4) H group: basal diet supplemented with 1% pure CLN (99 % 9c, 11t, 13t-CLN). The values represented mean of 2 ~ 6 mice each group. Data were analyzed by Student's *t* test. \* indicated significant different from B group by Student's *t* test, \**p* < 0.05.

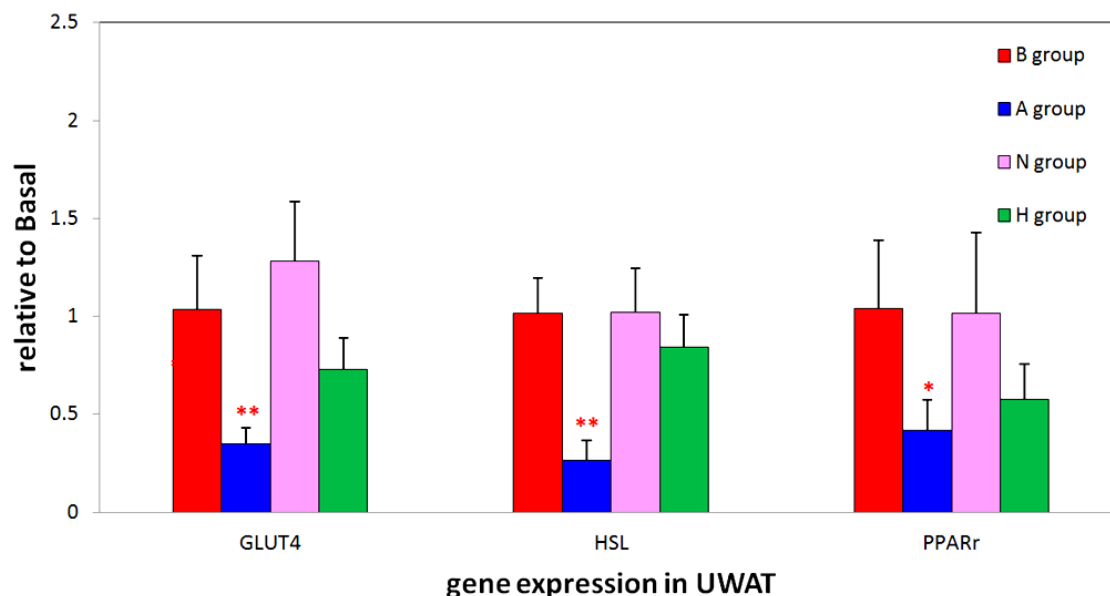


圖 4-7、C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後子宮周圍脂肪組織基因表現。

Fig. 4-7. The gene expression of UWAT after feeding C57BL/6J female mice with test diets for 5 weeks.

a. The values represent mean  $\pm$  SD b. The diet were (1) Basal group: AIN-93 modified basal diet (50 % sucrose) (2) A group: basal diet supplemented with 1% CLA (c9t11 CLA : t10c12 CLA = 1:1) (3) N group: basal diet supplemented with 1% crude CLN ( 76 % 9c,11t,13t-CLN, 2.1 % C16:0, 2.3 % C18:0, 4.8 % C18:1, 6.1 % C18:2, 0.8 % C20:1, 2.5 % t9t11c13 CLN, 5.1 % t9t11t13 CLN) (4) H group: basal diet supplemented with 1% pure CLN (99 % 9c, 11t, 13t-CLN). The values represented mean of 2 ~ 6 mice each group. Data were analyzed by Student's *t* test. \* indicated significant different from B group by Student's *t* test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

表 4-16、C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後與 B 組具顯著差異之肝臟代謝物預測

Table 4-16. A list of predicted metabolites in the liver of C57BL/6J female mice fed test diets

No	MW	Predicted compound name	Chemical formula	KEGG	HMDB	A vs B	N vs B	H vs B
1	131.173	D-Leucine	C6H13NO2	C00123	HMDB13773	-	down	down
2	137.043	Anthranilic acid	C7H7NO2	x	x	-	up	-
3	146.145	L-Glutamine	C5H10N2O3	C00064	HMDB00641	up	up	-
4	165.189	L-Phenylalanine	C9H11NO2	C00079	HMDB00159	down	-	down
5	181.189	Tyrosine	C9H11NO3	C00082	HMDB00158	down	down	down
6	204.225	L-Tryptophan	C11H12N2O2	C00078	HMDB00929	down	-	down
7	220.225	5-Hydroxytryptophan	C11H12N2O3	C01017	HMDB00472	down	down	down
8	242.229	Thymidine	C10H14N2O5	C00214	HMDB00273	down	-	-
9	243.217	Cytidine	C9H13N3O5	C00475	HMDB00089	down	down	down
10	244.311	Biotin	C10H16N2O3S	C00120	HMDB00030	down	down	down
11	267.241	Adenosine	C10H13N5O4	C00212	HMDB00050	-	up	-
12	267.241	Vidarabine	C10H13N5O4	C07195	HMDB14340	-	up	-
13	272.075	7,8-Benzoflavone	C19H12O2			down	down	down
14	272.253	Naringenin	C15H12O5	C00509	HMDB02670	down	down	down
15	282.156	Artemisinin	C15H22O5	x	x	down	down	-
16	313.093	Cellotetraose	C24H42O21	C02013	x	-	up	-
17	323.197	Cytidine monophosphate	C9H14N3O8P	C00055	HMDB00095	down	down	down
18	331.124	Bucharaine	C19H25NO4	C10649	x	down	-	down

#### 第四章 實驗結果

No	MW	Predicted compound name	Chemical formula	KEGG	HMDB	A vs B	N vs B	H vs B
19	347.221	Adenosine 3'-monophosphate	C10H14N5O7P	C01367	HMDB03540	up	up	-
20	347.221	Adenosine 5'-monophosphate	C10H14N5O7P	C00020	HMDB00045	up	up	-
21	363.221	Guanosine monophosphate	C10H14N5O8P	C00144	HMDB01397	up	up	up
22	402.212	Dehydrocholic acid	C24H34O5	x	x	-	down	-
23	470.309	Enoxolone	C30H46O4	C02283	x	-	down	up
24	515.703	Taurocholate	C26H45NO7S	C05122	HMDB00036	up	up	down
25	605.341	GDP-D-mannose	C16H25N5O16P2	C00096	HMDB01163	-	up	-
26	605.341	GDP-glucose	C16H25N5O16P2	C00035	HMDB01201	-	up	-
27	664.433	Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)	C21H27N7O14P2	C00003	HMDB00902	up	up	up
28	854.068	Adenosine Diphosphate	C10H15N5O10P2	x	x	-	up	-

a. The predicted metabolites were compared to the spectrometry data of human metabolome database (HMDB).

b. The regulation of the metabolites was listed according to the metab-Q and metab-ID software

c. Data were analyzed by Student's *t* test. \* indicated significant different from B group by Student's *t* test, up /down:  $p < 0.05$ , - :  $p > 0.05$

表 4-17、C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後與 B 組具顯著差異之腎周圍脂肪組織代謝物預測  
 Table 4-17. A list of predicted metabolites in RWAT of C57BL/6J female mice fed test diets

No	MW	Predicted compound name	Chemical formula	KEGG	HMDB	A vs B	N vs B	H vs B
1	204.225	L-Tryptophan	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C00078	HMDB00929	down	down	-
2	413.6358	Solasodine	C <sub>27</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>2</sub>	C10822	HMDB35282	-	down	down
3	470.309	Enoxolone	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub>	C02283	x	down	-	-
4	489.1201	Cytidine 5'-diphosphocholine	C <sub>14</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> O <sub>11</sub> P <sub>2</sub>	C00055	HMDB00095	-	down	-
5	515.703	Taurocholate	C <sub>26</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>7</sub> S	C05122	HMDB00036	down	up	down

a. The predicted metabolites were compared to the spectrometry data of human metabolome database (HMDB).

b. The regulation of the metabolites was listed according to the metab-Q and metab-ID software

c. Data were analyzed by Student's *t* test. \* indicated significant different from B group by Student's *t* test, up /down:  $p < 0.05$ , - :  $p > 0.05$

第四章 實驗結果

表 4-18、C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後與 B 組具顯著差異之血清代謝物預測

Table 4-18. A list of predicted metabolites in Serum of C57BL/6J female mice fed test diets

No	MW	Predicted compound name	KEGG	HMDB	Chemical formula	A vs B	N vs B	H vs B
1	120.080	Threonine	C00188	HMDB00167	C4H9NO3	up	-	-
2	150.057	Methionine	C00073	HMDB00696	C5H11NO2S	up	up	-
3	166.086	L-Phenylalanine	C00079	HMDB00159	C9H11NO2	up	-	up
4	182.063	L-Methionine sulfone	x	x	C5H11NO4S	up	up	
5	182.063	L-Tyrosine	C00082	HMDB00158	C9H11NO3	up	up	up
6	205.097	L-Tryptophan	C00078	HMDB00929	C11H12N2O2	up	-	-
7	206.078	N-(3-Hydroxypropyl)phthalimide	x	x	C11H11NO3	up	up	-
8	244.091	Cytidine	C00475	HMDB00089	C9H13N3O5	-	up	-
9	247.106	Achillin	x	x	C15H18O3	down	-	-
10	247.106	Santonin	x	x	C15H18O3	down	-	-
11	268.103	Adenosine	C00212	HMDB00050	C10H13N5O4	down	-	-
12	268.103	Vidarabine	C07195	HMDB14340	C10H13N5O4	down	-	-
13	283.173	Artemisinin	x	x	C15H22O5	down	down	-
14	322.136	Ser Asp Thr	x	x	C11H19N3O8	up	-	-
15	351.211	8-iso-15-keto-PGE2	x	HMDB02341	C20H30O5	-	up	-
16	355.254	15-keto-PGF1alpha	x	HMDB60045	C20H34O5	-	up	-
17	391.273	Digoxigenin	x	x	C23H34O5	-	up	-
18	403.253	Dehydrocholic acid	x	x	C24H34O5	-	up	-
19	455.277	Verapamil	C07188	HMDB01850	C27H38N2O4	up	up	-

#### 第四章 實驗結果

No	MW	Predicted compound name	KEGG	HMDB	Chemical formula	A vs B	N vs B	H vs B
20	471.321	Enoxolone	C02283	x	C30H46O4	-	up	-
21	516.287	Taurocholate	C05122	HMDB00036	C26H45NO7S	up	up	-
22	613.156	L-Glutathione (oxidized form)	C00127	HMDB03337	C20H32N6O12S2	-	up	-

a. The predicted metabolites were compared to the spectrometry data of human metabolome database (HMDB).

b. The regulation of the metabolites was listed according to the metab-Q and metab-ID software

c. Data were analyzed by Student's *t* test. \* indicated significant different from B group by Student's *t* test, up /down:  $p < 0.05$ , - :  $p > 0.05$

表 4-19、C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後與 B 組具顯著差異之尿液代謝物預測

Table 4-19. A list of predicted metabolites in urine of C57BL/6J female mice fed test diets

No	MW	Predicted compound name	KEGG	HMDB	Chemical formula	A vs B	N vs B	H vs B
1	165.0555	p-Coumaric acid	C06738	HMDB30677	C9H8O3	up	up	down
2	169.0861	Pyridoxamine	C00534	HMDB01431	C8H12N2O2	-	up	-
3	179.0559	Esculetin	x	x	C9H6O4	-	down	down
4	181.0505	Theobromine	C07480	HMDB02825	C7H8N4O2	up	up	down
5	193.049	Scopoletin	C01752	HMDB34344	C10H8O4	down	-	-
6	215.1387	1-Hydroxytacrine	x	x	C13H14N2O	-	down	-
7	215.1387	4-Hydroxytacrine	x	x	C13H14N2O	-	down	-
8	215.1389	Harmaline	C06536	HMDB30310	C13H14N2O	-	-	up
9	245.0953	5,6-Dihydrothymidine	x	x	C10H16N2O5	down	down	-
10	245.0953	Biotin	C00120	HMDB00030	C10H16N2O3S	down	down	-
11	247.128	Glu Val	x	x	C10H18N2O5	-	down	down
12	263.1393	Austricine	x	x	C15H18O4	-	down	-
13	288.1804	Ritodrine	C07239	HMDB15005	C17H21NO3	-	-	down
14	303.229	Abietic acid	x	x	C20H30O2	down	down	down
15	403.2329	Dehydrocholic acid	x	x	C24H34O5	down	-	-
16	469.1061	Cromolyn	x	x	C23H16O11	down	down	-

a. The predicted metabolites were compared to the spectrometry data of human metabolome database (HMDB).

b. The regulation of the metabolites was listed according to the metab-Q and metab-ID software

c. Data were analyzed by Student's *t* test. \* indicated significant different from B group by Student's *t* test, up /down:  $p < 0.05$ , - :  $p > 0.05$



表 4-20、C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後與 B 組相較可能改變之肝臟代謝途徑預測

Table 4-20. A list of predicted metabolites in liver after feeding C57BL/6J female mice with test diets for 5 weeks.

NO	Metabolic pathways (Liver)	A vs B	N vs B	H vs B
1	Aminoacyl-tRNA biosynthesis in mitochondrion	down	down	down
2	Aminoacyl-tRNA biosynthesis in cytoplasm	down	down	down
3	Aminoacyl-tRNA biosynthesis in cytoplasm/ Rodent version	down	down	down
4	ATP metabolism	up	up	-
5	NAD metabolism	up	up	up
6	Vitamin B7 (biotin) metabolism	down	down	down
7	CTP/UTP metabolism	down	down	down
8	Tyrosine metabolism p.1 (dopamine)	down	-	-
9	Phenylalanine metabolism	down	-	-
10	Regulation of lipid metabolism_Regulation of acetyl-CoA carboxylase 1 activity in lipogenic tissue	up	up	-
11	Regulation of lipid metabolism_Regulation of acetyl-CoA carboxylase 1 activity in keratinocytes	up	up	-
12	Development_Role of nicotinamide in G-CSF-induced granulopoiesis	up	-	up
13	Taurine and hypotaurine metabolism	up	-	down
14	Development_Signaling of Beta-adrenergic receptors via Beta-arrestins	up	-	-
15	Neurophysiological process_Role of CDK5 in presynaptic signaling	down	-	-
16	Regulation of lipid metabolism_RXR-dependent regulation of lipid metabolism via PPAR, RAR and VDR	down	-	down

#### 第四章 實驗結果

NO	Metabolic pathways (Liver)	A vs B	N vs B	H vs B
17	ATP/ITP metabolism	-	up	-
18	G-protein signaling_G-Protein alpha-s signaling cascades	-	up	-
19	Neurophysiological process_GABAergic neurotransmission	-	up	-
20	Oxidative phosphorylation	-	up	-

a. The analysis of the metabolic pathway was listed according to the Metacore software. (<https://portal.genego.com/>)

b. Data were analyzed by Student's *t* test. \* indicated significant different from B group by Student's *t* test, up /down:  $p < 0.05$ , - :  $p > 0.05$

表 4-21、C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後與 B 組相較可能改變之腎週圍脂肪組織代謝途徑預測

Table 4-21. A list of predicted metabolites in RWAT after feeding C57BL/6J female mice with test diets for 5 weeks.

NO	Metabolic pathways (RWAT)	A vs B group	N vs B group	H vs B group
1	Taurine and hypotaurine metabolism	down	up	down
2	Serotonin - melatonin biosynthesis and metabolism	down	down	-
3	Aminoacyl-tRNA biosynthesis in mitochondrion	down	down	-
4	Bile Acid Biosynthesis	down	up	down
5	Aminoacyl-tRNA biosynthesis in cytoplasm	down	down	-
6	Tryptophan metabolism	down	down	-
7	Bile Acid Biosynthesis / Rodent version	down	up	down
8	Acetylcholine biosynthesis and metabolism	-	down	-

a. The analysis of the metabolic pathway was listed according to the Metacore software. (<https://portal.genego.com/>)

b. Data were analyzed by Student's *t* test. \* indicated significant different from B group by Student's *t* test, up/down:  $p < 0.05$ , - :  $p > 0.05$

表 4-22、C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後與 B 組相較可能改變之血清代謝途徑預測

Table 4-22. A list of predicted metabolites in serum after feeding C57BL/6J female mice with test diets for 5 weeks.

NO	Metabolic pathways (Serum)	A vs B group	N vs B group	H vs B group
1	Aminoacyl-tRNA biosynthesis in mitochondrion	up	up	up
2	Aminoacyl-tRNA biosynthesis in cytoplasm	up	up	up
3	Tyrosine metabolism p.1 (dopamine)	up	up	up
4	Phenylalanine metabolism	up	up	up
5	Tryptophan metabolism	up	-	up
6	Methionine metabolism	-	up	-
7	Oxidative stress_Role of ASK1 under oxidative stress	-	up	-
8	(L)-Alanine, (L)-cysteine, and (L)-methionine metabolism	-	up	-
9	Glutathione metabolism	-	up	-
10	Catecholamine metabolism	-	up	-
11	Serotonin - melatonin biosynthesis and metabolism	-	-	up

a. The analysis of the metabolic pathway was listed according to the Metacore software. (<https://portal.genego.com/>)

b. Data were analyzed by Student's *t* test. \* indicated significant different from B group by Student's *t* test, up /down:  $p < 0.05$ , - :  $p > 0.05$

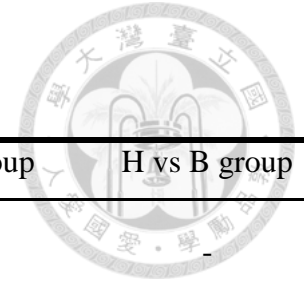
表 4-23、C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週後與 B 組相較可能改變之尿液代謝途徑預測

Table 4-23. A list of predicted metabolites in urine after feeding C57BL/6J female mice with test diets for 5 weeks.

NO	Metabolic pathways (urine)	A vs B group	N vs B group	H vs B group
1	Vitamin B7 (biotin) metabolism	down	-	-
2	Ubiquinone metabolism	up	down	down
3	Peroxisomal branched chain fatty acid oxidation	down	-	-

a. The analysis of the metabolic pathway was listed according to the Metacore software. (<https://portal.genego.com/>)

b. Data were analyzed by Student's *t* test. \* indicated significant different from B group by Student's *t* test, up /down:  $p < 0.05$ , - :  $p > 0.05$



## 第五章 討論



## 一、共軛脂肪酸影響組織脂質含量

(一) 10*t*,12*c*-CLA 造成肝臟脂質堆積

許多研究指出啮齒動物攝食含有 CLAs 之飼料，會造成體重減輕、降低 20 ~ 60 % 體脂肪、瘦肉增加 (Roche, Noone and Gibney 2001, Belury and Kempa-Steczko 1997)。例如: C57BL/6J female mice 餵食 1 % CLA mixture diet (34% 9*c*,11*t*-CLA、9*t*,11*c*-CLA ; 36% 10*t*,12*c*-CLA ; 3% 9*c*,11*c*-CLA、10*c*,12*c*-CLA ; 2% 9*t*,11*t*-CLA、10*t*,12*t*-CLA) 後，體重無顯著改變，但體脂肪減少、TG 堆積造成肝腫大 (Tsuboyama-Kasaoka et al. 2000)。

CLA mixture (9*c*,11*t*-CLA 及 10*t*,12*c*-CLA 混合物) 能造成小鼠體重減輕、體脂肪降低，主因是受 10*t*,12*c*-CLA 影響。文獻指出 10*t*,12*c*-CLA 會促使 C57BL/6J mice 白色脂肪組織 HSL mRNA 表現量增加 (LaRosa et al. 2006)，造成脂肪細胞 TG 分解。TG 分解產生之 FFA 釋放至血液，FFA 再被具有代謝活性的組織 uptake (例如: 肝臟、肌肉) (Park et al. 1997)。10*t*,12*c*-CLA 會導致肝臟 TG、CHOL、FFA 含量增加與堆積、造成肝腫大，而 9*c*,11*t*-CLA 對肝臟脂質含量無顯著影響 (Kelley et al. 2004)。

文獻指出 10*t*,12*c*-CLA 能使促使小鼠脂肪細胞 apoptosis，或降低脂肪組織 TG 儲存量，造成脂肪組織重量減輕。白色脂肪組織 UCP2 表現過多會降低 ATP 合成效率，細胞會因 ATP 缺乏而使細胞膜被破壞，造成細胞 apoptosis 或 necrosis (Tsuboyama-Kasaoka et al. 2000)。

本實驗餵食 1 % CLA mixture (9*c*,11*t*-CLA: 10*t*,12*c*-CLA = 1:1) 實驗飼料之 A 組小鼠體重與 B 組無顯著差異 (表 4-1)，肝臟重量百分比 (%) 較 B 組小鼠增加 1.5 倍 ( $p < 0.05$ ) (表 4-3)、RWAT 相對重量與 B 組小鼠無顯著差異 (表 4-5)、RWAT 三酸甘油酯含量 (mg TG / g RWAT(g)) 較 B 組減少 22 % ( $p < 0.05$ ) (表 4-10)、血清 TG 濃度顯著低於 B 組 ( $p < 0.01$ ) (表 4-8)、肝臟 TG (mg / g Liver) 含量比 B 組增加 1.6 倍 ( $p < 0.05$ ) (表 4-9)。推測 A 組小鼠受 10*t*,12*c*-CLA 影響，促進脂肪組織 lipolysis 及 TG 分解成 FFA 並釋放至血液中，血中 FFA 再被肝臟 uptake，最後重新合成 TG 並堆積儲存肝臟中。推論餵食 CLA 的 A 組小鼠，造成脂肪組織中的 TG 轉移至肝臟儲存，故雖可降低體脂肪，但卻造成脂肪肝。

## (二) 9c,11t,13t-CLN 未造成肝臟脂質堆積

本實驗 N 組小鼠餵食實驗飼料 5 週後體重 (表 4-1)、RWAT 重量百分比 (表 4-5)、禁食血清 TG 含量(mg/dL) (表 4-8) 顯著高於 B 組小鼠 ( $p < 0.05$ )，肝臟 TG (mg/total liver) 含量與 B 組無顯著差異(表 4-9)。

H 組小鼠餵食實驗飼料 5 週後體重與 B 組無顯著差異 (表 4-1)，RWAT 重量百分比顯著高於 B 組小鼠 ( $p < 0.05$ ) (表 4-5)，H 組小鼠 RWAT 之 TG 含量 (mg / g RWAT) (表 4-10)、血清 TG 含量 (mg/dL) (表 4-8) 與 B 組小鼠無顯著差異，肝臟總 TG 含量 (mg / g Liver) 則顯著低於 B 組 ( $p < 0.05$ ) (表 4-9)。餵食 CLN 之 N、H 組小鼠肝臟無脂質堆積的情形推測是 9c,11t,13t-CLN 在肝臟轉變成 9c,11t-CLA，而無形成 10t,12c-CLA 所導致 (表 4-12)。

Noguchi (2001) 等人研究指出，4 週齡 Wistar 大鼠餵食 2 % bitter gourd oil diet (BGO) (BGO 含 65% CLN) 實驗飼料 4 週後，體重顯著低於 control ( $p < 0.05$ )，肝臟脂肪酸分析結果無測得 9c,11t,13t-CLN，但有測得 9c,11t-CLA，推測大鼠體重降低可能受 9c,11t-CLA 影響 (Noguchi et al. 2001)。

本實驗未觀察到 N、H 組小鼠具體重 (表 4-1) 及體脂降低情形 (表 4-5)，原因除本實驗動物選用、實驗條件 (飼料配方、餵養時間等) 與文獻不同外，苦瓜籽油 (BGO) 中除了 9c,11t,13t-CLN，可能尚含其他可降體脂成分。

## 二、CLA 與胰島素抗性

文獻指出餵食 CLA mixture (9c,11t-CLA 與 10t,12c-CLA 混合物) 或 10t,12c-CLA 之小鼠，血液胰島素濃度顯著高於 control ( $p < 0.001$ ) 並造成脂肪肝，但血糖濃度與 control 無顯著差異；然而餵食 9c,11t-CLA 飼料之小鼠血液胰島素濃度及血糖濃度與 control 無顯著差異 (Clement et al. 2002)。而本實驗 A 組小鼠禁食血糖 (表 4-6) 及血清胰島素濃度 (表 4-7) 與 B 組無顯著差異。

本實驗 N 組小鼠禁食血糖 (表 4-6) 及血清胰島素濃度 (表 4-7)、HOMA-IR index (圖 4-5) 顯著高於 B 組，推測 N 組小鼠可能具胰島素抗性情形；而 H 組小鼠禁食血糖 (表 4-6) 及血清胰島素濃度 (表 4-7) 與 B 組無顯著差異。造成 N 組與 H 組小鼠血糖及胰島素濃度差異，可能與實驗飼料之 9c,11t,13t-CLN 純度有關。



### 三、高純度 9c,11t,13t-CLN 增高呼吸商 (RQ)

呼吸商 (respiratory quotient, RQ) 為二氧化碳排出量 ( $V_{CO_2}$ ) 與氧氣消耗量 ( $V_{O_2}$ ) 的比值，用來評估能量利用主要來源，當  $RQ = 1$  表示動物體以醣類作為主要能量來源；當  $RQ = 0.7$  表示以脂質為主要能量來源。

本實驗 B、A、N 組小鼠光照期呼吸商較低 ( $RQ = 0.84 \sim 0.88$ )，黑暗期呼吸商較高 ( $RQ = 0.87 \sim 0.92$ ) (圖 4-4)，推測光照期 RQ 降低原因為光照期屬小鼠睡眠期，小鼠未攝食並以脂肪細胞儲存之脂質作為主要能量利用來源 (Azain et al. 2000, West et al. 1998)。

文獻指出 C57BL/6J 品系小鼠 *Nnt* (Nicotinamide nucleotide transhydrogenase) 基因 exon 缺陷，無法合成 Nut 蛋白，造成胰臟  $\beta$ -cell 代謝受阻、減少胰島素分泌，進而降低肌肉及脂肪組織 glucose uptake，使 C57BL/6J 小鼠細胞醣類利用效率降低 (Freeman et al. 2006)。

本實驗 H 組小鼠光照期、黑暗期 RQ 值趨近 1，推測餵食 1% pure CLN 飼料之小鼠，醣類代謝效率低的情形受改善 (圖 4-4)。

### 四、共軛脂肪酸影響組織脂肪酸組成

#### (一) 9c,11t,13t-CLN 轉變成 9c,11t-CLA

文獻指出在許多組織，delta-13-saturase 能將 9c,11t,13t-CLN 快速轉變為 9c,11t-CLA。delta-13-saturase 活性依組織而異，delta-13-saturase 於肝臟活性高，但於血液、腎臟及小腸則活性低 (Tsuzuki et al. 2004)。

本實驗 N、H 組小鼠，肝臟 (表 4-12)、RWAT (表 4-13)、血清 (表 4-14)、肌肉 (表 4-15) 含有 0.67 ~ 2.08 % 9c,11t-CLA、0.02 ~ 0.69 % 9c,11t,13t-CLN，9c,11t-CLA 於 RWAT 存量最多，9c,11t,13t-CLN 存量於肝臟最多。

N、H 組小鼠組織 (肝臟、RWAT、血清、肌肉) 經脂肪酸組成分析測得含有 9c,11t-CLA，顯示 9c,11t,13t-CLN 在小鼠體內會經由 delta-13 desaturase 轉變成 9c,11t-CLA (表 4-12 ~ 4-15)。A、N、H 組小鼠 9c,11t-CLA 於 RWAT 存量比在肝臟高 1.1~2.4 倍，N、H 組小鼠 9c,11t,13t-CLN 於肝臟存量比在 RWAT 存量高。推測 N、H 組小鼠 9c,11t,13t-CLN 在肝臟經酵素轉變之 9c,11t-CLA、以及 A 組小鼠攝食所得 9c,11t-CLA 皆多儲存於脂肪組織。



## (二) 共軛脂肪酸影響脂肪酸代謝

Kelley (2006) 等人研究指出 0.5 % 9*c*,11*t*-CLA 及 0.5 % 10*t*,12*c*-CLA 可改變 C57BL/6N mice 肝臟及脂肪組織脂肪酸組成。例如：餵食 0.5 % 9*c*,11*t*-CLA 飼料之小鼠，肝臟 C18:1 n-9 及 MUFA 含量降低，C18:2 n-6 及 n-6 PUFA 增加 ( $p < 0.05$ )；餵食 0.5 % 10*t*,12*c*-CLA 之小鼠，肝臟 C18:1 n-9 及 MUFA 增加，C18:2 n-6、C20:4 n-6 (AA)、C22:6 n-3 (DHA)、n-6 PUFA 及 n-3 PUFA 降低 (Kelley et al. 2006)。餵食 0.5 % 9*c*,11*t*-CLA 飼料之小鼠，脂肪組織 C14:0 及 C18:2n-6 含量增加，C18:0 及 C18:1 n-9 含量降低；餵食 0.5 % 10*t*,12*c*-CLA 之小鼠，脂肪組織 C16:0 及 C16:1n-9 含量增加，C18:0 及 C16:1n-7 含量降低。雖 9*c*,11*t*-CLA 及 10*t*,12*c*-CLA 改變脂肪組織脂肪酸組成，但 MUFA:SFA ratio 與 control 則無顯著差異 (Kelley et al. 2006, Kelley et al. 2004)。

Sebedio (2001) 等人研究指出，10*t*,12*c*-CLA 會造成脂肪組織 SFA (C14:0、C16:0、C18:0) 及 C16:1n-9 含量增加；9*c*,11*t*-CLA 會降低脂肪組織 C18:0 含量；而 CLA mixture 會造成脂肪組織 C14:0 及 C16:1n-9 含量增加 (Sebedio et al. 2001)。

文獻指出 CLA 促使大鼠肝臟 n-3 Fatty acids (例如：C22:5 n-3、C22:6 n-3 (DHA)) 含量增加 (Li and Watkins 1998)，而本實驗觀察發現，A、N、H 組小鼠肝臟 C22:6 n-3 (DHA) 含量與 B 組無顯著差異(表 4-12)。

Noguchi (2001) 等人研究指出，餵食 0.5 % 及 2 % bitter gourd oil diet (BGO) 實驗飼料 4 週之大鼠，肝臟脂肪酸分析無測得 9*c*,11*t*,13*t*-CLN，但測得 0.4 ~ 2 % c9t11 CLA。0.5 % BGO 組大鼠肝臟 C22:6 n-3 (DHA) 含量顯著高於 control，C18:2 n-6 (LA) 顯著低於 control ( $p < 0.05$ )；2 % BGO 組大鼠肝臟 C22:6 n-3 (DHA) 含量顯著高於 control，C18:2 n-6 (LA)、C18:1 n-7 含量顯著低於 control ( $p < 0.05$ ) (Noguchi et al. 2001)。苦瓜籽油中含有 65 % 9*c*,11*t*,13*t*-CLN，因此上述結果可視為 9*c*,11*t*,13*t*-CLN 造成組織脂肪酸組成改變。

本實驗 A 組與 B 組小鼠相比，肝臟 C18:1 n-9 增加、C18:2 n-6 減少 (減少約 50 %) (表 4-12)，與 Kelley 等人指出 t10c12 CLA 影響肝臟脂肪酸組成改變的結果一致 (Kelley et al. 2006)，推測餵食 CLA mixture (9*c*,11*t*-CLA 與 10*t*,12*c*-CLA 混合物) 之小鼠，10*t*,12*c*-CLA 對肝臟脂肪酸組成影響較大。

由於 9*c*,11*t*-CLA 及 10*t*,12*c*-CLA 其本身代謝以及對脂肪酸代謝影響具差異性，因此本實驗 A 組小鼠組織脂肪酸組成，可能為兩種 CLA mixture (c9t11 CLA、t10c12 CLA) 共同作用、影響所導致。

### (三) 10*t*,12*c*-CLA 活化 PPAR $\alpha$

文獻指出 10*t*,12*c*-CLA 及 CLA mixture (9*c*,11*t*-CLA 與 10*t*,12*c*-CLA 混合物) 會促進 PUFA 氧化、代謝，而 c9t11 CLA 則無此效應 (West et al. 1998)。PUFA 可活化肝臟 PPAR $\alpha$ 、抑制 SREBP-1c 基因表現，進而促進肝臟脂肪酸  $\beta$ -oxidation、抑制肝臟脂肪酸生合成 (fatty acid synthesis) (Jump et al. 2005)，因此推測 CLA mixture 活化 PPAR $\alpha$  主要受 10*t*,12*c*-CLA isomer 影響。

研究指出 10*t*,12*c*-CLA 可有效降低小鼠體脂，但若餵食 PPAR $\alpha$ -/- mice (PPAR $\alpha$ -/-小鼠無法合成 PPAR $\alpha$ ) 含 10*t*,12*c*-CLA 實驗飼料，除小鼠體脂無降低，尚有肝腫大及肝臟脂質堆積情形 (Peters et al. 2001)。

### (四) 共軛脂肪酸之代謝

#### 1. 9*c*,11*t*-CLA 與 10*t*,12*c*-CLA 代謝

最早文獻指出 9*c*,11*t*-CLA 及 10*t*,12*c*-CLA 會代謝成為長鏈代謝物 (long-chain metabolites) (Sebedio et al. 1997a)。

CLA isomers 被動物體吸收後，位於肝臟之 CLAs 不經  $\beta$ -oxidation 直接氧化、代謝 (Belury 2002)，而是藉 elongation、desaturation 將其轉變為 C20:3、C20:4 conjugated isomers，因此 CLA 被認為可調節脂質代謝、影響組織脂肪酸組成 (Sebedio et al. 1997b)。其中文獻指出，10*t*,12*c*-CLA 在肝臟中主要會代謝成 C18:3 ( $\Delta$  6,10,12) 及 C16:2 ( $\Delta$  8,10)，9*c*,11*t*-CLA 主要代謝成 C20:3 (Sebedio et al. 2001)。

本實驗 N、H 組小鼠肝臟 C20:3n-6 顯著增加，可能為 9*c*,11*t*,13*t*-CLN 轉變成 9*c*,11*t*-CLA 之代謝結果。

## 2. 共軛脂肪酸藉競爭抑制脂肪酸合成

文獻指出 CLA 代謝過程會與脂肪酸產生競爭，例如: Banni 等人指出 linoleic acid (C18:2n-6, LA) 及 CLA 皆為  $\Delta$ -6 desaturation 之 substrate，推測在  $\Delta$ -6 desaturation 反應過程中，LA 與 CLA 是競爭關係 (Banni et al. 1999)。

已知 LA (C18:2n-6) 依序經 D6D ( $\Delta$ -6 desaturase)、elongation、D5D ( $\Delta$ -5 desaturase) 作用，可將 LA 轉變為 C20:4n-6 (AA)。D6D 為 LA (C18:2n-6) 轉變成 AA (C20:4n-6) 的 rate-limiting step，因此推測 CLA 能調控 AA 含量 (Belury and Kempa-Steczko 1997)。另有文獻指出，CLA isomers 除可調控 C18:2 n-6 (LA) 與 C18:3 n-3 (LN) 之  $\Delta$ -6 desaturation，也能調控 stearic acid (C18:0) 之  $\Delta$ -9 desaturation (Bretilon et al. 1999)。

本實驗 A 組小鼠肝臟 AA 含量與 B 組無顯著差異 (表 4-12)，H 組小鼠肝臟 AA 百分比含量顯著高於 B 組。小鼠肝臟 9*c*,11*t*-CLA 含量為 A 組 < N 組 < H 組小鼠，但 H 組小鼠肝臟 AA 無顯著降低，顯示 9*c*,11*t*,13*t*-CLN 所轉變的 9*t*,11 CLA 不是僅透過與 LA 競爭而達到調控 AA 含量，共軛脂肪酸可能會透過其它方式對脂肪酸含量進行調控。

## 3. 共軛脂肪酸調控 desaturase 活性及表現量

將肝臟細胞株 HepG2 以 10*t*,12*c*-CLA 刺激，細胞中  $\Delta$ -9、 $\Delta$ -6、 $\Delta$ -5 desaturation 會顯著被抑制，並且 MUFA/SFA ratio 顯著降低；HepG2 以 9*t*,11 CLA 刺激， $\Delta$ -9 desaturation 會些微被抑制， $\Delta$ -6、 $\Delta$ -5 desaturation 無被抑制，MUFA/SFA ratio 則些微降低 (Eder, Slomma and Becker 2002)。

肝臟脂質代謝異常為造成代謝症候群的主因，因此肝臟中負責調控 lipogenic gene transcription 的 SREBP-1c 具重要性。當 SREBP-1c 轉錄活性增加，會促進脂質合成以及抑制脂質分解 (Biddinger et al. 2005)。此外，SREBPs 活化會使肝臟 SCD1 (delta-9 desaturase, D9D) 基因表現量增加，造成 MUFA 含量增加 (Shimomura et al. 1998)。SCD1 為合成 MUFA 的 rate-determining enzyme，為長鏈飽和脂肪酸去飽和之第一步酵素，能將 C16:0 轉變為 C16:1，或將 C18:0 轉變為 C18:1 (Biddinger et al. 2005)。

文獻提及，肝臟和脂肪組織 SCD1 活性及表現量增加會促進肥胖產生，已知 PUFA 會抑制 SCD1 基因表現、抑制肥胖 (Jones et al. 1996, Pan, Hulbert and Storlien

1994)。Park 等人研究指出 10*t*,12*c*-CLA 可有效抑制 SCD1 基因表現，但 9*c*,11*t*-CLA 則無法 (Park et al. 2000)。

#### 五、共軛脂肪酸對肝臟及脂肪組織基因之調控

文獻指出 PPAR $\alpha$  活化可抑制 FAS 基因表現 (lipogenic gene)，而 CLA 可抑制 SCD1 基因表現 (Peters et al. 2001)。

本實驗餵食 CLA 及 CLN 飼料之 A、N、H 組小鼠會影響 SCD1 (delta-9-desaturase, D9D) 及 FADS2 (delta-6-desaturase, D6D) 基因表現量 (圖 4-6)，顯示 CLA 及 CLN 會影響小鼠脂質代謝。其中 N 組小鼠 SCD1 表現量顯著低於 B 組，A 組小鼠 FADS1 (delta-5-desaturase, D5D) 及 FADS2 基因表現量皆顯著低於 B 組。

本實驗 A 組小鼠 FADS1 (D5D)、FADS2 (D6D) 基因表現顯著低於 B 組，與 A 組小鼠肝臟脂肪酸分析結果顯示 D5D index (C20:4n-6/C20:3n-6) 及 D6D index (C18:3n-6/C18:2n-6) 顯著低於 B 組小鼠之結果相符。N 組小鼠肝臟脂肪酸組成之 D9D index (C16:1n-7/C16:0) 與 B 組無顯著差異 (表 4-12)(表 5-1)，此結果與 N 組小鼠 SCD1 基因表現量顯著低於 B 組之結果不符合，推測可能受 gene translation 及 enzyme activity 影響導致 (表 4-12)(表 5-1)。

文獻指出，餵食 0.4 % 10*t*,12*c*-CLA 飼料的 C57BL/6J female mice 肝臟基因表現量與 control 相比，PPAR $\gamma$  ( $p < 0.001$ )、FAT/CD36 ( $p < 0.05$ )、ALBP ( $p < 0.05$ )、SREBP1a ( $p < 0.05$ ) 及 FAS ( $p < 0.001$ ) 基因表現增加，PEPCK ( $p < 0.025$ ) 基因表現下降，PPAR $\alpha$ 、PPAR $\beta$ 、SREBP1c 基因表現無顯著差異。餵食 0.4 % 9*c*,11*t*-CLA 飼料 4 週的 C57BL/6J female mice 肝臟 PPAR $\alpha$ 、PPAR $\beta$ 、PPAR $\gamma$ 、FAT/CD36、ALBP、PEPCK、SREBP1a、SREBP1c 及 FAS 基因表現量皆無顯著差異。肝臟中過度產生的 FAT/CD36、ALBP，增加肝臟細胞 FA uptake；FAS、SREBP1a 過度表現會增加肝臟 lipogenic activity、促使肝臟脂質堆積 (Clement et al. 2002)。

當血中胰島素濃度增加，會促進葡萄糖被肌肉細胞及白色脂肪組織 uptake。glucose 進入細胞則須受 GLUT4 調控，肌肉細胞、白色脂肪組織膜上 GLUT4 蛋白濃度為調控葡萄糖進入脂肪及肌肉細胞之 rate-limiting step。文獻指出 leptin 及 insulin 與肌肉細胞及白色脂肪組織葡萄糖 uptake 有關。除 leptin 會促使 glucose uptake 外，當血液 insulin 濃度增加，GLUT4 表現量及活性會增加，促進葡萄糖被細胞利用 (Tsuboyama-Kasaoka et al. 2000)。

N 組小鼠禁食血糖濃度 (表 4-6)、血清胰島素濃度 (表 4-7) 及 HOMA-IR index 顯著高於 B 組, 但 UWAT 分析之 GLUT4 基因表現量與 B 組無顯著差異, 顯示 N 組小鼠胰島素敏感度降低, 但尚未影響 glucose 被脂肪細胞 uptake。

本實驗 A、N、H 組小鼠肝臟中 FAS、SREBP-1c 與脂質合成相關的基因, 其表現量皆與 B 組無顯著差異(圖 4-6)。

GK 為葡萄糖代謝的重要酵素, 主要存於肝臟中, GK 除了參與肝糖合成 (glycogenesis) 的第一步反應 (rate-limiting step), 也促進葡萄糖酵解 (glycolysis) (Fernandes et al. 2007)。文獻指出 10*t*,12*c*-CLA 對小鼠 GK 無影響, 無法促進血液葡萄糖被肝臟利用(Jourdan et al. 2009)。本研究顯示, A、N、H 組小鼠肝臟 GK 基因表現量與 B 組皆無顯著差異。

脂肪肝的形成與肝臟 PPAR $\gamma$  及 FAS 基因過度表現有關。本實驗 A 組小鼠肝臟 PPAR $\gamma$  及 FAS 基因表現量與 B 組無顯著差異, 但肝臟卻有脂質堆積情形, 推測 A 組小鼠肝臟脂質堆積可能受到其他因子調控。

本實驗 A 組小鼠以 CLA mixture (9*c*,11*t*-CLA 與 10*t*,12*c*-CLA 混合物) 之實驗飼料飼養, 造成體脂肪降低、肝臟脂肪堆積, 推測其結果可能為單一受到 10*t*,12*c*-CLA 或同時受兩種 CLA isomers 影響 (Kamphuis et al. 2003)。N、H 組小鼠可能也因飼食的 9*c*,11*t*,13*t*-CLN 純度、劑量不同而造成小鼠生化值、組織脂肪酸組成、肝臟與 UWAT 脂肪組織基因表現之差異, 除此原因外, 亦可能為 9*c*,11*t*,13*t*-CLN 轉變而成之 9*c*,11*t*-CLA 所造成。

PUFA 可藉由抑制 SREBP1、活化 PPAR $\alpha$ , 抑制肝臟脂質堆積及改善胰島素抗性 (Sekiya et al. 2003)。本實驗 A 組小鼠肝臟腫大、脂質堆積, 推測為攝入之 CLA mixture (9*c*,11*t*-CLA 與 10*t*,12*c*-CLA 混合物) 改變肝臟脂肪酸組成。

本研究 H 組小鼠肝臟 TG 含量顯著低於 B 組 (表 4-9), N 組血清 TG 含量顯著高於 B 組 (表 4-8)。A 組小鼠肝臟 TG 含量顯著高於 B 組 (表 4-9), 血清 TG 含量顯著少於 B 組 (表 4-8), 腎周圍脂肪組織 TG 顯著少於 B 組 (表 4-10)。N、H 組小鼠肝臟脂肪酸分析結果顯示 9*c*,11*t*,13*t*-CLN 部分經 delta-13-saturase 轉變成 9*c*,11*t*-CLA。觀察發現 N、H 組小鼠 TG 儲存的情形與飼食 CLA mixture (9*t*11 CLA : 10*c*12 CLA = 1:1) 的小鼠結果相異, 推測 N、H 組小鼠 TG 代謝受 9*c*,11*t*,13*t*-CLN 影響較 9*c*,11*t*-CLA 大。

## 六、代謝體學結果分析

本實驗將餵食含有共軛脂肪酸飼料之小鼠組織 (肝臟、血清、RWAT、肌肉組織) 以代謝體學分析、預測並比較組間代謝物差異。本實驗代謝體學分析結果顯示，A、N、H 組小鼠肝臟 phenylalanine、tyrosine、tryptophan、5-hydroxytryptophan、biotin、taurocholate 等代謝物濃度與 B 組有顯著差異。RWAT 及血清之 Trp、taurocholate 亦然。尿液之 pyridoxamine 及 biotin 可能受影響。

Kalhan 等人將罹患脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 之肥胖病人血液，經代謝體學分析，發現血液中 glycocholate、taurocholate 及 glycochenodeoxycholate 含量顯著高於控制組 (Kalhan et al. 2011)。

本實驗以代謝體學預測受改變之代謝物結果顯示，A 組、N 組小鼠血清中 taurocholate 含量顯著高於 B 組。A 組小鼠有肝臟脂質堆積的情形，可能與血清 taurocholate 增加有關。

Tsutsui 等人研究指出，將糖尿病鼠 (diabetic mice, ddY-H) 及其控制組 (normal mice, ddY-L) 進行代謝體學分析，比較兩組間代謝產物差異，結果顯示糖尿病鼠肝臟、腎臟中 3-Hydroxycinnamate 及 Phenylalanine (Phe) 代謝物增加，表示 Phe 代謝 (phenylalanine metabolic pathway) 增加 (Tsutsui et al. 2011)。

本實驗 A、H 組小鼠肝臟 Phe 顯著低於 B 組小鼠，其中 A 組小鼠肝臟有 TG 堆積情形，但肝臟 Phe 代謝顯著低於 B 組。

Phe 經標準品確認本實驗小鼠肝臟及血清 Phe 代謝受共軛脂肪酸影響。而其他預測受共軛脂肪酸影響之代謝物有待進一步確認分析。

表 5-1、C57BL/6J 雌鼠餵食實驗飼料 5 週之脂質代謝影響

Table 5-1. Effects of lipid metabolism of C57BL/6J female mice fed test diets for 5 weeks

分析	結果	A vs B	N vs B	H vs B
犧牲時體重	Body weight	NS	↑	NS
組織/器官重量	腎臟重量百分比 (%)	↑	NS	NS
氧氣消耗量 (ml/g BW/hr)	光照期	↓	NS	NS
	黑暗期	NS	NS	NS
二氧化碳排出量 (ml/g BW/hr)	光照期	↓	NS	NS
	黑暗期	↓	NS	NS
呼吸商 (RQ)	光照期	NS	NS	↑
	黑暗期	NS	NS	↑
禁食血清 (fasting serum)	serum glucose (mg/dL)	NS	↑	NS
	serum insulin ( $\mu$ g/ml)	(↑)	(↑)	NS
	TG (mg/dL)	↓	↑	NS
	CHOL (mg/dL)	↑	NS	NS
非禁食血清 (feeding serum)	serum glucose (mg/dL)	NS	NS	NS
	serum insulin ( $\mu$ g/ml)	↑	NS	NS
胰島素抗性指標	HOMA-IR	NS	↑	NS
脂肪組織基因表現	GLUT4	↓	NS	NS
肝臟組織	肝臟重量百分比 (%)	↑	NS	NS
	TG (mg/g tissue)	↑	NS	↓
	TG (mg/g Total tissue)	↑	NS	↓
	CHOL (mg/g tissue)	↑	NS	NS
	CHOL (mg/g Total tissue)	↑	NS	NS
肝臟基因表現	Acyl-CoA oxidase-1 (ACOX)	NS	NS	NS
	Carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT1 $\alpha$ )	(↑)	NS	NS
	Peroxisome proliferator activated receptor- $\alpha$ (PPAR $\alpha$ )	(↑)	NS	NS
	Sterol regulatory element binding transcription factor 1c (SREBP1c)	NS	NS	NS
	Fatty acid synthase (FAS)	NS	NS	NS
脂肪組織	RWAT 重量百分比 (%)	NS	↑	↑
	UWAT 重量百分比 (%)	NS	↑	NS
	RWAT (TG) (mg/g tissue)	↓	NS	NS
	RWAT (TG) (mg/g Total tissue)	(↓)	↑	NS
	RWAT- CHOL (mg/g tissue)	NS	NS	NS
	RWAT- CHOL (mg/g Total tissue)	NS	(↑)	↑
脂肪組織基因表現	hormone sensitive lipase (HSL)	↓	NS	NS
delta-6-desaturase (D6D) (肝臟)	D6D index (C18:3n-6/C18:2n-6)	↓	NS	NS
	FADS2 基因表現	↓	NS	NS
delta-5-desaturase (D5D) (肝臟)	D5D index (C20:4n-6/C20:3n-6)	↓	↓	↓
	FADS1 基因表現	↓	NS	NS
delta-9-desaturase (D9D) (肝臟)	D9D index C16:1n-7/C16:0	↓	NS	NS
	D9D index C18:1n-9/C18:0	NS	NS	NS
	SCD1 基因表現	NS	↓	NS

TG:三酸甘油酯 CHOL:膽固醇 RWAT:腎周圍脂肪組織 UWAT:子宮周圍脂肪組織 ↑/↓: 顯著增加/減少各生化值 ( $p < 0.05$ ) (↑)/(↓): 增加/減少各生化值 趨勢 ( $p < 0.05$ ) NS: 與 vesicle 或 basal 無顯著差異 ( $p > 0.05$ )

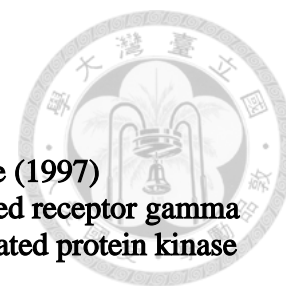
## 第六章 結論

A、N、H 組小鼠肝臟 PPAR $\alpha$  基因表現量與 B 組皆無顯著差異。A 組小鼠肝臟 D5D、D6D 基因表現量，與肝臟脂肪酸百分比組成 (wt %) D5D index (C20:4 n-6/C20:3n-6)、D6D index (C18:3n-6/C18:2n-6) 皆顯著低於 B 組小鼠。N 組小鼠肝臟 SCD1 (delta-9-desaturase, D9D) 基因表現量顯著低於 B 組，但 N 組小鼠肝臟脂肪酸 D9D index (C16:1n-7/C16:0) 與 B 組無顯著差異。

CLA 混合物 (9*c*,11*t*-CLA 與 10*t*,12*c*-CLA) 對脂肪組織重量無顯著差異，但造成脂肪肝；CLN 增加脂肪組織重量，但無肝臟脂質堆積。高純度 CLN 能降低肝脂並提高 RQ，低純度則否。兩組 CLN 餵食結果之差異，究與劑量或低純度 CLN 樣品含有其他活性成分有關，尚待進一步研究。



## 第七章 參考文獻



- Adams, M., M. J. Reginato, D. Shao, M. A. Lazar & V. K. Chatterjee (1997) Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. *J Biol Chem*, 272, 5128-32.
- Azain, M. J., D. B. Hausman, M. B. Sisk, W. P. Flatt & D. E. Jewell (2000) Dietary conjugated linoleic acid reduces rat adipose tissue cell size rather than cell number. *The Journal of nutrition*, 130, 1548-1554.
- Bajare, S., J. Anthony, A. Nair, R. Marita, A. Damre, D. Patel, C. Rao, H. Sivaramakrishnan & N. Deka (2012) Synthesis of N-(5-chloro-6-(quinolin-3-yloxy) pyridin-3-yl) benzenesulfonamide derivatives as non-TZD peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) agonist. *European journal of medicinal chemistry*.
- Balkan, J., O. Kanbagli, G. Mehmetcik, U. Mutlu-Turkoglu, G. Aykac-Toker & M. Uysal (2002) Increased lipid peroxidation in serum and low-density lipoproteins associated with aging in humans. *Int J Vitam Nutr Res*, 72, 315-20.
- Banni, S., E. Angioni, V. Casu, M. P. Melis, G. Carta, F. P. Corongiu, H. Thompson & C. Ip (1999) Decrease in linoleic acid metabolites as a potential mechanism in cancer risk reduction by conjugated linoleic acid. *Carcinogenesis*, 20, 1019-1024.
- Bassaganya-Riera, J., A. J. Guri & R. Hontecillas (2011) Treatment of Obesity-Related Complications with Novel Classes of Naturally Occurring PPAR Agonists. *J Obes*, 2011, 897894.
- Belury, M. A. (2002) Dietary Conjugated Linoleic Acid in Health: Physiological Effects and Mechanisms of Action 1. *Annual Review of Nutrition*, 22, 505-531.
- Belury, M. A. & A. Kempa-Steczko (1997) Conjugated linoleic acid modulates hepatic lipid composition in mice. *Lipids*, 32, 199-204.
- Biddinger, S. B., K. Almind, M. Miyazaki, E. Kokkotou, J. M. Ntambi & C. R. Kahn (2005) Effects of diet and genetic background on sterol regulatory element-binding protein-1c, stearoyl-CoA desaturase 1, and the development of the metabolic syndrome. *Diabetes*, 54, 1314-1323.
- Blankson, H., J. A. Stakkestad, H. Fagertun, E. Thom, J. Wadstein & O. Gudmundsen (2000) Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in overweight and obese humans. *The Journal of nutrition*, 130, 2943-2948.
- Braissant, O. & W. Wahli (1998) Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha, -beta, and -gamma during rat embryonic development. *Endocrinology*, 139, 2748-54.
- Bretillon, L., J. M. Chardigny, S. Gregoire, O. Berdeaux & J. L. Sebedio (1999) Effects of conjugated linoleic acid isomers on the hepatic microsomal desaturation activities in vitro. *Lipids*, 34, 965-9.
- Brown, J. M., M. S. Boysen, S. Chung, O. Fabiyi, R. F. Morrison, S. Mandrup & M. K. McIntosh (2004) Conjugated linoleic acid induces human adipocyte delipidation: autocrine/paracrine regulation of MEK/ERK signaling by adipocytokines. *J Biol Chem*, 279, 26735-47.
- Brown, J. M., M. S. Boysen, S. S. Jensen, R. F. Morrison, J. Storkson, R. Lea-Currie, M. Pariza, S. Mandrup & M. K. McIntosh (2003) Isomer-specific regulation of metabolism and PPARgamma signaling by CLA in human preadipocytes. *J Lipid*

- Res*, 44, 1287-300.
- Cao, Z.-P., F. Wang, X.-S. Xiang, R. Cao, W.-B. Zhang & S.-B. Gao (2007) Intracerebroventricular administration of conjugated linoleic acid (CLA) inhibits food intake by decreasing gene expression of NPY and AgRP. *Neuroscience letters*, 418, 217-221.
- Chang, C., W. Shau, Y. Jiang, H. Li, T. Chang, W. H-H Sheu, C. Kwok, L. Ho & L. Chuang (2010) Type 2 diabetes prevalence and incidence among adults in Taiwan during 1999–2004: a national health insurance data set study. *Diabetic Medicine*, 27, 636-643.
- Charles, R. (1967) [The diagnosis and classification of diabetes mellitus]. *Infirm Haiti*, 1, 14-5.
- Chin, S., W. Liu, J. Storkson, Y. Ha & M. Pariza (1992) Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *Journal of food composition and analysis*, 5, 185-197.
- Choi, Y., Y. C. Kim, Y. B. Han, Y. Park, M. W. Pariza & J. M. Ntambi (2000) The trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid downregulates stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr*, 130, 1920-4.
- Chuang, C.-Y., C. Hsu, C.-Y. Chao, Y.-S. Wein, Y.-H. Kuo & C.-j. Huang (2006) Fractionation and identification of 9c, 11t, 13t-conjugated linolenic acid as an activator of PPAR $\alpha$  in bitter melon (*Momordica charantia* L.). *Journal of biomedical science*, 13, 763-772.
- Chung, S., J. M. Brown, J. N. Provo, R. Hopkins & M. K. McIntosh (2005) Conjugated linoleic acid promotes human adipocyte insulin resistance through NF $\kappa$ B-dependent cytokine production. *J Biol Chem*, 280, 38445-56.
- Clement, L., H. Poirier, I. Niot, V. Bocher, M. Guerre-Millo, S. Krief, B. Staels & P. Besnard (2002) Dietary trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse. *J Lipid Res*, 43, 1400-9.
- Cullingford, T. E., K. Bhakoo, S. Peuchen, C. T. Dolphin, R. Patel & J. B. Clark (1998) Distribution of mRNAs encoding the peroxisome proliferator-activated receptor alpha, beta, and gamma and the retinoid X receptor alpha, beta, and gamma in rat central nervous system. *J Neurochem*, 70, 1366-75.
- Dhar, P. & D. Bhattacharyya (1998) Nutritional characteristics of oil containing conjugated octadecatrienoic fatty acid. *Annals of nutrition and metabolism*, 42, 290-296.
- Dhar, P., K. Chattopadhyay, D. Bhattacharyya, A. Roychoudhury, A. Biswas & S. Ghosh (2006) Antioxidative effect of conjugated linolenic acid in diabetic and non-diabetic blood: an in vitro study. *J Oleo Sci*, 56, 19-24.
- Dhar, P., S. Ghosh & D. Bhattacharyya (1999) Dietary effects of conjugated octadecatrienoic fatty acid (9 cis, 11 trans, 13 trans) levels on blood lipids and nonenzymatic in vitro lipid peroxidation in rats. *Lipids*, 34, 109-114.
- Eder, K., N. Slomma & K. Becker (2002) Trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid suppresses the desaturation of linoleic and alpha-linolenic acids in HepG2 cells. *J Nutr*, 132, 1115-21.
- Elibal, B., H. F. Suzen, H. A. Aksoy, G. Ustun & M. Tuter (2011) Production of structured lipids containing conjugated linolenic acid: optimisation by response surface methodology. *International Journal of Food Science & Technology*, 46, 1422-1427.
- Fernandes, N. P., C. V. Lagishetty, V. S. Panda & S. R. Naik (2007) An experimental evaluation of the antidiabetic and antilipidemic properties of a standardized

- Momordica charantia fruit extract. *BMC complementary and alternative medicine*, 7, 29.
- Floyd, Z. E. & J. M. Stephens (2002) Interferon-gamma-mediated activation and ubiquitin-proteasome-dependent degradation of PPARgamma in adipocytes. *J Biol Chem*, 277, 4062-8.
- Freeman, H. C., A. Hugill, N. T. Dear, F. M. Ashcroft & R. D. Cox (2006) deletion of nicotinamide nucleotide transhydrogenase A new quantitative trait locus accounting for glucose intolerance in C57BL/6J mice. *Diabetes*, 55, 2153-2156.
- Fukumoto, K., Y. Sumida, N. Yoshida, K. Sakai, K. Kanemasa, Y. Itoh, S. Mitsufuji, K. Kataoka & T. Okanoue (2008) [A case of adult-onset type II citrullinemia having a liver histology of nonalcoholic steatohepatitis (NASH)]. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi*, 105, 244-51.
- Gonzalez, F. J., J. M. Peters & R. C. Cattley (1998) Mechanism of action of the nongenotoxic peroxisome proliferators: role of the peroxisome proliferator-activator receptor alpha. *J Natl Cancer Inst*, 90, 1702-9.
- Ha, Y., N. Grimm & M. Pariza (1987) Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis*, 8, 1881-1887.
- Hill, M. R., M. D. Young, C. M. McCurdy & J. M. Gimble (1997) Decreased expression of murine PPARgamma in adipose tissue during endotoxemia. *Endocrinology*, 138, 3073-6.
- Hontecillas, R., M. Diguardo, E. Duran, M. Orpi & J. Bassaganya-Riera (2008) Catalpic acid decreases abdominal fat deposition, improves glucose homeostasis and upregulates PPAR alpha expression in adipose tissue. *Clin Nutr*, 27, 764-72.
- House, R. L., J. P. Cassady, E. J. Eisen, T. E. Eling, J. B. Collins, S. F. Grissom & J. Odle (2005) Functional genomic characterization of delipidation elicited by trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid (t10c12-CLA) in a polygenic obese line of mice. *Physiological genomics*, 21, 351-361.
- Hsu, C., T.-H. Tsai, Y.-Y. Li, W.-H. Wu, C.-J. Huang & P.-J. Tsai (2012a) Wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.) extract and its bioactive components suppress *Propionibacterium acnes*-induced inflammation. *Food chemistry*, 135, 976-984.
- (2012b) Wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.) extract and its bioactive components suppress *Propionibacterium acnes*-induced inflammation. *Food chemistry*.
- Hughes, P. E., W. J. Hunter & S. Tove (1982) Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. Purification and properties of cis-9, trans-11-octadecadienoate reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 257, 3643-3649.
- Igarashi, M. & T. Miyazawa (2000) Newly recognized cytotoxic effect of conjugated trienoic fatty acids on cultured human tumor cells. *Cancer letters*, 148, 173-179.
- Jiang, J., A. Wolk & B. Vessby (1999) Relation between the intake of milk fat and the occurrence of conjugated linoleic acid in human adipose tissue. *The American journal of clinical nutrition*, 70, 21-27.
- Jones, B. H., M. A. Maher, W. J. Banz, M. B. Zemel, J. Whelan, P. J. Smith & N. Moustaid (1996) Adipose tissue stearoyl-CoA desaturase mRNA is increased by obesity and decreased by polyunsaturated fatty acids. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 271, E44-E49.
- Jourdan, T., L. Djaouti, L. Demizieux, J. Gresti, B. Vergès & P. Degrace (2009) Liver carbohydrate and lipid metabolism of insulin-deficient mice is altered by trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid. *The Journal of nutrition*, 139,

- 1901-1907.
- Jump, D. B., D. Botolin, Y. Wang, J. Xu, B. Christian & O. Demeure (2005) Fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *The Journal of nutrition*, 135, 2503-2506.
- Kaddurah-Daouk, R., B. S. Kristal & R. M. Weinshilboum (2008) Metabolomics: a global biochemical approach to drug response and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 48, 653-683.
- Kalhan, S. C., L. Guo, J. Edmison, S. Dasarathy, A. J. McCullough, R. W. Hanson & M. Milburn (2011) Plasma metabolomic profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism*, 60, 404-413.
- Kamphuis, M., M. Lejeune, W. Saris & M. Westerterp-Plantenga (2003) The effect of conjugated linoleic acid supplementation after weight loss on body weight regain, body composition, and resting metabolic rate in overweight subjects. *International journal of obesity*, 27, 840-847.
- Kang, K., M. Miyazaki, J. M. Ntambi & M. W. Pariza (2004) Evidence that the anti-obesity effect of conjugated linoleic acid is independent of effects on stearoyl-CoA desaturase1 expression and enzyme activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315, 532-537.
- Kelley, D., G. Bartolini, J. Warren, V. Simon, B. Mackey & K. Erickson (2004) Contrasting effects of t10, c12-and c9, t11-conjugated linoleic acid isomers on the fatty acid profiles of mouse liver lipids. *Lipids*, 39, 135-141.
- Kelley, D. S., G. L. Bartolini, J. W. Newman, M. Vemuri & B. E. Mackey (2006) Fatty acid composition of liver, adipose tissue, spleen, and heart of mice fed diets containing t10, c12-, and c9, t11-conjugated linoleic acid. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 74, 331-8.
- Kennedy, A., K. Martinez, S. Schmidt, S. Mandrup, K. LaPoint & M. McIntosh (2010) Antiobesity mechanisms of action of conjugated linoleic acid. *J Nutr Biochem*, 21, 171-9.
- Khanal, R. & K. Olson (2004) Factors affecting conjugated linoleic acid (CLA) content in milk, meat, and egg: a review. *Pakistan J. Nutr*, 3, 82-98.
- Kliwer, S. A., B. M. Forman, B. Blumberg, E. S. Ong, U. Borgmeyer, D. J. Mangelsdorf, K. Umehono & R. M. Evans (1994) Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 7355-9.
- Koba, K., A. Akahoshi, M. Yamasaki, K. Tanaka, K. Yamada, T. Iwata, T. Kamegai, K. Tsutsumi & M. Sugano (2002a) Dietary conjugated linolenic acid in relation to CLA differently modifies body fat mass and serum and liver lipid levels in rats. *Lipids*, 37, 343-350.
- Koba, K., A. Akahoshi, M. Yamasaki, K. Tanaka, K. Yamada, T. Iwata, T. Kamegai, K. Tsutsumi & M. Sugano (2002b) Dietary conjugated linolenic acid in relation to CLA differently modifies body fat mass and serum and liver lipid levels in rats. *Lipids*, 37, 343-50.
- LaRosa, P. C., J. Miner, Y. Xia, Y. Zhou, S. Kachman & M. E. Fromm (2006) Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid causes inflammation and delipidation of white adipose tissue in mice: a microarray and histological analysis. *Physiol Genomics*, 27, 282-94.
- LaRosa, P. C., J. J. Riethoven, H. Chen, Y. Xia, Y. Zhou, M. Chen, J. Miner & M. E. Fromm (2007) Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid activates the integrated stress response pathway in adipocytes. *Physiol Genomics*, 31, 544-53.

- Lewis, J. R. & S. R. Mohanty (2010) Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update. *Digestive diseases and sciences*, 55, 560-578.
- Li, Y. & B. A. Watkins (1998) Conjugated linoleic acids alter bone fatty acid composition and reduce ex vivo prostaglandin E2 biosynthesis in rats fed n-6 or n-3 fatty acids. *Lipids*, 33, 417-425.
- Lu, K.-N., C. Hsu, M.-L. Chang & C.-j. Huang (2013) Wild bitter gourd increased metabolic rate and up-regulated genes related to mitochondria biogenesis and UCP-1 in mice. *Journal of Functional Foods*.
- Miller, J. R., P. Siripurkpong, J. Hawes, A. Majdalawieh, H. S. Ro & R. S. McLeod (2008) The trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid decreases adiponectin assembly by PPARgamma-dependent and PPARgamma-independent mechanisms. *J Lipid Res*, 49, 550-62.
- Mougiou, V., A. Matsakas, A. Petridou, S. Ring, A. Sagredos, A. Melissopoulou, N. Tsigilis & M. Nikolaidis (2001) Effect of supplementation with conjugated linoleic acid on human serum lipids and body fat. *The Journal of nutritional biochemistry*, 12, 585-594.
- Moya-Camarena, S. Y., J. P. V. Heuvel, S. G. Blanchard, L. A. Leesnitzer & M. A. Belury (1999) Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPAR $\alpha$ . *Journal of Lipid Research*, 40, 1426-1433.
- Murch, S. J., H. V. Rupasinghe, D. Goodenowe & P. K. Saxena (2004) A metabolomic analysis of medicinal diversity in Huang-qin (*Scutellaria baicalensis* Georgi) genotypes: discovery of novel compounds. *Plant cell reports*, 23, 419-425.
- Nestel, P., A. Fujii & T. Allen (2006) The cis-9, trans-11 isomer of conjugated linoleic acid (CLA) lowers plasma triglyceride and raises HDL cholesterol concentrations but does not suppress aortic atherosclerosis in diabetic apoE-deficient mice. *Atherosclerosis*, 189, 282-287.
- Noguchi, R., Y. Yasui, R. Suzuki, M. Hosokawa, K. Fukunaga & K. Miyashita (2001) Dietary effects of bitter gourd oil on blood and liver lipids of rats. *Arch Biochem Biophys*, 396, 207-12.
- Nordlie, R. C., J. D. Foster & A. J. Lange (1999) Regulation of glucose production by the liver. *Annual review of nutrition*, 19, 379-406.
- Pal, M. & M. Ghosh (2012) Studies on comparative efficacy of alpha-linolenic acid and alpha-eleostearic acid on prevention of organic mercury-induced oxidative stress in kidney and liver of rat. *Food Chem Toxicol*, 50, 1066-72.
- Pan, D. A., A. Hulbert & L. Storlien (1994) Dietary fats, membrane phospholipids and obesity. *The Journal of nutrition*, 124, 1555.
- Park, Y., K. J. Albright, W. Liu, J. M. Storkson, M. E. Cook & M. W. Pariza (1997) Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids*, 32, 853-858.
- Park, Y., J. M. Storkson, J. M. Ntambi, M. E. Cook, C. J. Sih & M. W. Pariza (2000) Inhibition of hepatic stearoyl-CoA desaturase activity by trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid and its derivatives. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1486, 285-292.
- Peters, J. M., Y. Park, F. J. Gonzalez & M. W. Pariza (2001) Influence of conjugated linoleic acid on body composition and target gene expression in peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ -null mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1533, 233-242.
- Purushotham, A., A. A. Wendel, L. F. Liu & M. A. Belury (2007) Maintenance of adiponectin attenuates insulin resistance induced by dietary conjugated linoleic

- acid in mice. *J Lipid Res*, 48, 444-52.
- Rahman, S. M., Y.-M. Wang, H. Yotsumoto, J.-Y. Cha, S.-Y. Han, S. Inoue & T. Yanagita (2001) Effects of conjugated linoleic acid on serum leptin concentration, body-fat accumulation, and  $\beta$ -oxidation of fatty acid in OLETF rats. *Nutrition*, 17, 385-390.
- Reaven, G. M. (1988) Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 37, 1595-1607.
- Reddy, J. K. & T. Hashimoto (2001) Peroxisomal  $\beta$ -oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ : an adaptive metabolic system. *Annual review of nutrition*, 21, 193-230.
- Reddy, J. K. & M. S. Rao (2006) Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 290, G852-G858.
- Riserus, U., L. Berglund & B. Vessby (2001) Conjugated linoleic acid (CLA) reduced abdominal adipose tissue in obese middle-aged men with signs of the metabolic syndrome: a randomised controlled trial. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 25, 1129-35.
- Ritzenthaler, K. L., M. K. McGuire, R. Falen, T. D. Shultz, N. Dasgupta & M. A. McGuire (2001) Estimation of conjugated linoleic acid intake by written dietary assessment methodologies underestimates actual intake evaluated by food duplicate methodology. *The Journal of nutrition*, 131, 1548-1554.
- Roche, H. M., E. Noone & A. N. Gibney (2001) Conjugated linoleic acid: a novel therapeutic nutrient? *Nutr Res Rev*, 14, 173-88.
- Rochfort, S. (2005) Metabolomics reviewed: a new “omics” platform technology for systems biology and implications for natural products research. *Journal of natural products*, 68, 1813-1820.
- Saha, S. S., A. Chakraborty, S. Ghosh & M. Ghosh (2012) Comparative study of hypocholesterolemic and hypolipidemic effects of conjugated linolenic acid isomers against induced biochemical perturbations and aberration in erythrocyte membrane fluidity. *Eur J Nutr*, 51, 483-95.
- Sebedio, J.-L., E. Angioni, J. Chardigny, S. Gregoire, P. Juaneda & O. Berdeaux (2001) The effect of conjugated linoleic acid isomers on fatty acid profiles of liver and adipose tissues and their conversion to isomers of 16: 2 and 18: 3 conjugated fatty acids in rats. *Lipids*, 36, 575-582.
- Sebedio, J., P. Juaneda, G. Dobson, I. Ramilison, J. Martin, J. Chardigny & W. Christie (1997a) Metabolites of conjugated isomers of linoleic acid (CLA) in the rat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1345, 5-10.
- Sebedio, J. L., P. Juaneda, G. Dobson, I. Ramilison, J. C. Martin, J. M. Chardigny & W. Christie (1997b) Metabolites of conjugated isomers of linoleic acid (CLA) in the rat. *Biochim Biophys Acta*, 1345, 5-10.
- Sekiya, M., N. Yahagi, T. Matsuzaka, Y. Najima, M. Nakakuki, R. Nagai, S. Ishibashi, J. i. Osuga, N. Yamada & H. Shimano (2003) Polyunsaturated fatty acids ameliorate hepatic steatosis in obese mice by SREBP-1 suppression. *Hepatology*, 38, 1529-1539.
- Shimomura, I., H. Shimano, B. S. Korn, Y. Bashmakov & J. D. Horton (1998) Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 35299-35306.
- Suzuki, R., R. Noguchi, T. Ota, M. Abe, K. Miyashita & T. Kawada (2001) Cytotoxic

- effect of conjugated trienoic fatty acids on mouse tumor and human monocytic leukemia cells. *Lipids*, 36, 477-482.
- Takahashi, Y., M. Kushiro, K. Shinohara & T. Ide (2002) Dietary conjugated linoleic acid reduces body fat mass and affects gene expression of proteins regulating energy metabolism in mice. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 133, 395-404.
- Tan, M. J., J. M. Ye, N. Turner, C. Hohnen-Behrens, C. Q. Ke, C. P. Tang, T. Chen, H. C. Weiss, E. R. Gesing, A. Rowland, D. E. James & Y. Ye (2008) Antidiabetic activities of triterpenoids isolated from bitter melon associated with activation of the AMPK pathway. *Chem Biol*, 15, 263-73.
- Terpstra, A. (2001) Differences between humans and mice in efficacy of the body fat lowering effect of conjugated linoleic acid: role of metabolic rate. *The Journal of nutrition*, 131, 2067-2068.
- Thom, E., J. Wadstein & O. Gudmundsen (2001) Conjugated linoleic acid reduces body fat in healthy exercising humans. *J Int Med Res*, 29, 392-6.
- Tontonoz, P., E. Hu, R. A. Graves, A. I. Budavari & B. M. Spiegelman (1994) mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev*, 8, 1224-34.
- Trygg, J., J. Gullberg, A. I. Johansson, P. Jonsson, H. Antti, S. L. Marklund & T. Moritz (2005) Extraction and GC/MS analysis of the human blood plasma metabolome. *Analytical Chemistry*, 77, 8086-8094.
- Tsuboyama-Kasaoka, N., M. Takahashi, K. Tanemura, H. J. Kim, T. Tange, H. Okuyama, M. Kasai, S. Ikemoto & O. Ezaki (2000) Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes*, 49, 1534-42.
- Tsutsui, H., T. Maeda, J. Z. Min, S. Inagaki, T. Higashi, Y. Kagawa & T. Toyo'oka (2011) Biomarker discovery in biological specimens (plasma, hair, liver and kidney) of diabetic mice based upon metabolite profiling using ultra-performance liquid chromatography with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*, 412, 861-872.
- Tsuzuki, T., Y. Tokuyama, M. Igarashi, K. Nakagawa, Y. Ohsaki, M. Komai & T. Miyazawa (2004)  $\alpha$ -Eleostearic acid (9Z11E13E-18: 3) is quickly converted to conjugated linoleic acid (9Z11E-18: 2) in rats. *The Journal of nutrition*, 134, 2634-2639.
- Ueki, K., T. Kondo & C. R. Kahn (2004) Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Mol Cell Biol*, 24, 5434-46.
- Wallace, R. J., N. McKain, K. J. Shingfield & E. Devillard (2007) Isomers of conjugated linoleic acids are synthesized via different mechanisms in ruminal digesta and bacteria. *J Lipid Res*, 48, 2247-54.
- Wang, Y. W. & P. J. Jones (2004) Conjugated linoleic acid and obesity control: efficacy and mechanisms. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 28, 941-55.
- West, D. B., J. P. Delany, P. M. Camet, F. Blohm, A. A. Truett & J. Scimeca (1998) Effects of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 275, R667-R672.
- Wild, S., G. Roglic, A. Green, R. Sicree & H. King (2004) Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*,

- 27, 1047-53.
- Xing, H., J. P. Northrop, J. R. Grove, K. E. Kilpatrick, J. L. Su & G. M. Ringold (1997) TNF alpha-mediated inhibition and reversal of adipocyte differentiation is accompanied by suppressed expression of PPARgamma without effects on Pref-1 expression. *Endocrinology*, 138, 2776-83.
- Yang, L., K. Y. Leung, Y. Cao, Y. Huang, W. Ratnayake & Z.-Y. Chen (2005)  $\alpha$ -Linolenic acid but not conjugated linolenic acid is hypocholesterolaemic in hamsters. *British Journal of Nutrition*, 93, 433-438.
- Yuan, G. F., M. L. Wahlqvist, J. Q. Yuan, Q. M. Wang & D. Li (2009) Effect of punicic acid naturally occurring in food on lipid peroxidation in healthy young humans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 2331-2335.
- Yurawecz, M. P., A. A. Molina, M. Mossoba & Y. Ku (1993) Estimation of conjugated octadecatrienes in edible fats and oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 70, 1093-1099.
- Zambell, K. L., N. L. Keim, M. D. Van Loan, B. Gale, P. Benito, D. S. Kelley & G. J. Nelson (2000) Conjugated linoleic acid supplementation in humans: effects on body composition and energy expenditure. *Lipids*, 35, 777-782.
- Zhu, Y., L. Kan, C. Qi, Y. S. Kanwar, A. V. Yeldandi, M. S. Rao & J. K. Reddy (2000) Isolation and characterization of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) interacting protein (PRIP) as a coactivator for PPAR. *J Biol Chem*, 275, 13510-6.

