



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

山苦瓜在老化引發肌少症小鼠模式中之效應

The effect of wild bitter melon in an aging-induced
sarcopenia mouse model

賴怡安

Yi-An Lai

指導教授：黃青真 博士

Advisor: Ching-Jang Huang, Ph.D.

中華民國 108 年 8 月

August, 2019



謝辭

兩年的研究生活讓我體驗了進行研究的整個過程，而每個細小的環節都需要無數個日子反覆地思考修正。這些日子或許可以說是我人生中過得最踏實充實且收穫滿滿的日子，而這要歸功於太多太多人的幫助和陪伴了！

首先必須感謝的是芝翎學姊和昱仁學長，在我閱讀文獻設計實驗時給我滿滿的建議，也陪伴我進行所有小鼠飼養期間的實驗。原先以為碩二這年實驗室剩下我一個人，需要自立自強完成所有實驗，謝謝你們還是默默地全程參與了。非常感謝你們在我什麼都不會的時候願意讓我當跟班，感謝芝翎學姊建立了肌肉切片及染色的方法，讓我省去很多時間自己摸索。感謝昱仁在實驗結果不如預期時總是第一個安慰我、鼓勵我，你的一句「不做做看也不知道啊」真的是我做下去的動力。希望你們在未來的學術路上都能站穩腳步發揮自己的力量。

第二個想感謝林甫容老師家的學生們。感謝筱茜在我跟學姊昱仁出國玩的時候幫忙照顧我的小老鼠，以及碩士論文口試時幫忙紀錄口試委員們的問題；感謝巧虹、威廷、依靜、廷芸、嘉容在我進行小鼠犧牲時的幫忙，以及在我論文口試時幫我準備給口試委員的糧食們，讓我可以專心在報告上！

感謝龔秀妮老師實驗室的所有人：佑辰、佩羽、容安、喳喳、香菜在我寒假隻身混入你們實驗室霸佔凍切機及實驗桌時跟我聊天，還揪我一起去吃飯，讓我有不是一個人的溫暖感。真的很感謝你們不嫌棄我佔用了你們已經很小的空間，還總是願意借我門禁卡。也謝謝娜娜跟那美姊在我配 H&E 染劑時，以及凍切機出問題時的幫忙。

感謝同處於 408、409 室林璧鳳老師實驗室的人們：感謝薰儀、郁婷、韻韻在我廢寢忘食寫論文時常常主動幫我買午餐，沒有你們我大概直接爆肝暈倒不會活到現在。也謝謝駿威在我碩士論文口試前一天請我喝苦瓜排骨湯，也是個會揪我去吃晚餐免於餓死命運的重要人物。

衷心謝謝我的口試委員們，百忙之中抽空幫我審查論文，並且從二月的論文計畫書口試就提出了許多建議。特別感謝溫柔的許珊菁老師，總是循循善誘地引導我看出我的數據的價值，是我投稿 Zespri 百萬論文大賞的重要推手！謝謝張美玲老師非常細心仔細地幫我檢查論文的疏漏。謝謝龔秀妮老師全面性地思考我的研究，並且幫我查了許多可以做為討論參考的文獻。謝謝林甫容老師聽了我的論文後還私下與我討論，我總是能感受到老師對實驗的熱情，是我很好的榜樣。

最後感謝最重要的黃青真老師，總是在我沒有自信的時候鼓勵我，寫不出論文時仍拍拍我說「還會笑就好了」。永遠會記得老師在實驗室會議時送我一個寫著「信心」的牌子，它被我放在實驗室的位子前面，真是看到就想哭。也謝謝老師在我碩一時願意將澳洲的合作案交給我完成，我想那奠定了我後來對實驗的喜愛及成就感。謝謝老師總是那麼積極樂觀又不畏困難，彷彿所有難題到了老師手中都能迎刃而解。期許自己有一天能成為黃老師一樣的大人，祝老師退休快樂。

最後的最後我想說，也許我永遠還是無法對於自己的論文有一百分的滿意，但是謝謝所有給過我意見、陪伴著我度過每一次懷疑自己的時候的人。希望這樣的成果還對得起因我而犧牲的所有小老鼠及大老鼠們，以及老師學姊認真寫科技部計畫而得來的錢。謝謝所有所有可能支撐著我完成這個研究的人們，謝謝你們。

賴怡安

國立臺灣大學生化科技學系碩士班

2019 年 08 月 16 日

摘要

現代高齡化社會中，伴隨著年齡增長而日益加劇的活動功能退化為重要的公衛議題。肌少症為年齡相關肌肉質量減少、肌力與活動功能衰退的現象。伴隨老化的粒線體失能認為是影響肌少症的潛在因子。細胞衰老被認為是老化相關疾病發生的主要原因。細胞衰老為正常細胞永久停止分裂的狀態，具有獨特的生理特徵，如其衰老細胞分泌表型等。近期研究指出，山苦瓜可以上調粒線體氧化能力，並且改善睪丸剔除所誘導的肌肉流失及功能退化。在 ICR 小鼠模式中，山苦瓜亦被報導能改善肌力並降低疲勞。此實驗目的為以老齡誘發肌少症小鼠模式評估山苦瓜改善肌少症之潛力，並探討山苦瓜對於粒線體功能維持及細胞衰老的影響。

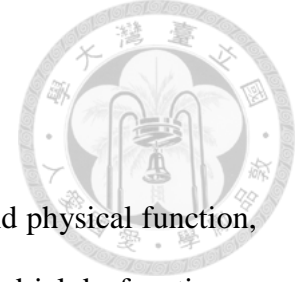
三組 16.5 月齡 C57BL/6J 小鼠分別餵食 AIN-93G 飼料 (AN 組)、50% 蔗糖改良飼料不添加 (高蔗糖飼料, AH 組) 或添加 5% 山苦瓜全果凍乾粉 (AHB 組) 26 週。另設計兩組 3.5 月齡 C57BL/6J 小鼠作為 AN 組及 AH 組之年輕控制組，分別以 YN 及 YH 表示。在餵食實驗飼料第 22 週時，山苦瓜回升老齡鼠中 Inverted screen test 表現至與年輕組相同水平 ($p>0.05$)。肌肉組織重量方面，山苦瓜補充顯著改善老齡鼠後肢小腿 腓腸肌、比目魚肌、脛骨前肌、及趾伸長肌相對重量 ($p<0.05$)。肌肉切片及染色分析方面，山苦瓜補充增加腓腸肌及脛骨前肌中，大肌纖維橫截面積肌纖維比例 ($p<0.05$)。而腓腸肌中高琥珀酸脫氫酶活性肌纖維比例亦於 AHB 組高於 AH 組 ($p<0.05$)。苦瓜補充上調腓腸肌粒線體相關基因 *Pgc1a*、*Ucp2*，以及第一型肌纖維型態指標 *Myh7* 之 mRNA 表現，並且下調第二型肌纖維型態指標 *Myh4* mRNA 表現 ($p<0.05$)。此外，將 AN、AH、YN、及 YH 組之數據以雙因子變異數分析後發現，腓腸肌、肝臟，及腎臟中衰老相關基因 mRNA 表現受到高齡上調 ($p<0.05$)。苦瓜補充下調肝臟

及附著周圍白色脂肪組織中 *p16* 基因表現 ($p < 0.05$)，但並未影響肌肉中衰老相關基因 mRNA 表現 ($p > 0.05$)。

本研究證實了苦瓜補充可以改善老齡鼠肌肉功能及粒線體氧化能力，而這可能是透過促進粒線體生合成、改善對抗氧化壓力之能力、及促進骨骼肌中肌纖維轉變來達成。總結來說，山苦瓜補充能夠作為預防肌少症的有效策略。

關鍵字：山苦瓜 (*Momordica Charantia*)、肌少症、粒線體、細胞衰老、老化

Abstract



Sarcopenia, an age-related decline in muscle mass, strength, and physical function, is of great concern in the public health of ageing societies. Mitochondrial dysfunction, a hallmark of aging, is thought to play a major role in the pathogenesis of sarcopenia. Cellular senescence, a response characterized by a stable growth arrest and other phenotypes including a proinflammatory secretome, has been implicated as a major cause of age-related diseases. While wild bitter melon has been reported to up-regulate mitochondrial oxidative capacity, improve exercise performance and reduce fatigue in castrated and ICR mice, this study aims to evaluate the effect of wild bitter melon on mitochondrial oxidative capacity in an age-induced sarcopenia mouse model.

Three groups of aging C57BL/6J male mice (16.5-month old) were fed the AIN-93G diet (the AN group) or its modified versions, which contained 50% w/w sucrose without (the AH group) or with 5% w/w wild bitter melon powder (BMP) supplementation (the AHB group) for 26 weeks. Two more groups of 3-month old mice served as the young controls for AN & AH group, denoted as YN group and YH group.

At the 22nd week of the feeding period, the latency to fall and holding impulse in the inverted screen test of the AHB group were 19% and 10% higher than the AH group respectively, and were comparable to the young groups ($p>0.05$). At necropsy, BMP supplementation restored the age-related decline in the relative gastrocnemius (GAS), soleus, tibialis anterior, and extensor digitorum longus weight ($p<0.05$). The percentage of large cross section area (CSA) fibers in GAS and TA of the AHB group was higher than the AH group for 9.71 and 18.92% respectively ($p<0.05$). The percentage of high succinate dehydrogenase (SDH) activity fibers of the AHB group increased 23% in GAS comparing to the AH group ($p<0.05$). Compared to the AH group, the AHB mice showed

up-regulated mRNA expressions of the *Pgc1 α* gene, the master regulator of mitochondrial biogenesis, *Ucp2* (ubiquitous uncoupling protein) and *Myh7* (marker of type I fiber) genes and down-regulated *Myh4* (type II fiber marker) in the GAS muscle ($p < 0.05$). On the other hand, results from two-way ANOVA of data from AN, AH, YN and YH groups showed significant up-regulations of senescence-related genes in the GAS, liver and kidney of aged mice ($p < 0.05$). The AHB group showed downregulated *p16* mRNA gene expression in liver and EWAT. Nevertheless, expression levels of the senescence related genes were comparable to the AH group in the GAS of AHB group ($p > 0.05$).

In conclusion, these results suggested that BGP could improve muscle function and mitochondrial oxidative capacity, probably through increasing mitochondrial biogenesis and through inducing fiber type conversion in skeletal muscle and might provide a potential strategy to prevent sarcopenia.

Keywords : Wild bitter gourd, sarcopenia, mitochondria, cellular senescence, aging



總目錄

謝辭	I
摘要	III
Abstract	V
總目錄	VII
圖目錄	XI
表目錄	XIII
縮寫對照表	XV
第一章 緒論	1
第一節 前言	1
第二節 文獻回顧	2
一、肌少症 (Sarcopenia).....	2
1.1 肌少症簡介	2
1.2 肌少症分類	3
1.3 肌少症病生理機轉 (Pathophysiology of sarcopenia).....	3
1.4 肌少症治療策略	4
二、粒線體	5
2.1 粒線體生合成	5
2.2 粒線體融合與分裂	6
2.3 粒線體功能相關蛋白	8
三、骨骼肌	9
3.1 肌纖維分類與肌肉可塑性	9
3.2 骨骼肌肥大與萎縮相關訊息路徑	13
3.3 肌肉幹細胞與肌肉再生能力	13
四、細胞衰老	14
4.1 細胞衰老簡介與特徵	14
4.2 細胞衰老與老化	17

4.3 對抗細胞衰老做為抗老化策略	17
五、 小鼠生命期	19
六、 山苦瓜	20
6.1 山苦瓜簡介	20
6.2 苦瓜成分與生理活性	20
6.3 苦瓜對肌肉的影響	21
第三節 研究假說及實驗架構	23
一、 研究假說	23
二、 研究架構	24
第二章 實驗設計與材料方法	25
第一節 實驗設計	25
第二節 材料與方法	26
一、 動物飼養	26
二、 山苦瓜樣品製備	27
三、 飼料配製	27
3.1 AIN-93G 飼料	27
3.2 高蔗糖飼料	27
四、 動物運動表現分析	30
4.1 前肢抓力表現分析	30
4.2 Inverted screen test	31
五、 衰弱指數評估	32
六、 動物犧牲與取樣	32
七、 血液生化指標分析	36
7.1 血糖分析	36
7.2 血脂分析	36
八、 肌肉組織冷凍切片染色分析	38
8.1 樣品前處理與包埋	38
8.2 冷凍切片	38
8.3 蘇木精-伊紅染色與肌纖維截面積定量分析	38
8.4 琥珀酸脫氫酶染色與定量分析	39

九、 mRNA 表現分析	41
9.1 組織總 RNA 抽取	41
9.2 總 RNA 反轉錄為 cDNA	41
9.3 定量即時聚合酶鏈鎖反應 (Quantitative real-time PCR).....	42
十、 統計分析	45
第三章 實驗結果	46
第一節 飼養期間小鼠存活率	46
第二節 運動表現及衰弱程度分析	47
一、 運動表現	47
二、 衰弱程度分析	47
第三節 生長情形及血清生化指標	48
一、 飼養期間體重變化、攝食量、熱量攝取、及攝食/能量利用率	48
1.1 體重變化	48
1.2 攝食量、攝食效率、能量攝取與能量效率	48
二、 犧牲時體重與組織器官重量	49
2.1 組織器官絕對重量	49
2.2 組織器官相對重量	50
三、 禁食血清生化指標	51
第四節 肌纖維橫截面積大小及粒線體活性分析	52
一、 肌纖維橫截面積大小	52
二、 肌肉組織切片琥珀酸脫氫酶活性分析	52
第五節 基因 mRNA 表現分析	53
一、 粒線體相關基因	53
二、 肌纖維型態相關基因	54
三、 肌肉生合成及肌肉萎縮相關基因	54
四、 衰老相關基因	55
第四章 討論	85
第一節 生長、組織器官重量、及血液生化指標	85
一、 死亡小鼠之觀察與高齡所致體重、攝食、及能量效率變化	85
二、 老齡鼠之身體組成及血清生化指標	86

2.1	老齡鼠較大的體重並非來自於脂肪組織	86
2.2	老齡鼠中可以觀察到前列腺、精囊腫大以及睪丸相對重量減少的情形	86
2.3	小鼠肝臟重量及血清生化指標受高齡及高蔗糖飼料共同影響	87
三、	苦瓜補充對於生長、組織器官重量、及血清生化指標之影響	89
3.1	苦瓜補充降低體重及脂肪組織重量	89
3.2	苦瓜補充趨勢性改善高齡所致前列腺及精囊腫大	90
3.3	苦瓜補充改善高齡及高蔗糖飼料共同導致的肝臟腫大並降低血清總膽固醇	91
第二節	肌少症特徵探討	92
一、	老齡鼠中確實觀察到運動表現下降及肌肉萎縮的現象	92
二、	山苦瓜改善高齡造成的運動能力表現下降及肌肉流失	93
第三節	肌纖維橫截面積大小、粒線體酵素活性及 mRNA 表現分析	94
一、	山苦瓜提升老齡小鼠粒線體 SDH 酵素活性並上調骨骼肌 <i>Pgclα</i> 及 <i>Ucp2</i> 基因表現	94
二、	山苦瓜上調第一型肌纖維指標基因 <i>Myh7</i> 表現	96
三、	山苦瓜改善老齡小鼠肌纖維大小萎縮但並未影響肌肉萎縮指標基因表現	96
四、	高齡上調肌肉、肝臟及腎臟中衰老相關基因表現	97
第四節	綜合討論	101
一、	高齡、高蔗糖飼料，以及苦瓜對於小鼠各項指標之影響	101
二、	苦瓜改善小鼠肌少症之可能機制探討	106
三、	與先前年輕小鼠餵食苦瓜模式之比較	107
四、	本研究之應用潛力	109
第五章	結論	110
第六章	參考文獻	111



圖目錄

圖 1-1 粒線體生命週期 (Ventura-Clapier et al., 2017)..... 7

圖 1-2 快肌纖維與慢肌纖維中的代謝差異 (Schiaffino et al., 2011)..... 10

圖 1-3 造成肌纖維組成轉換之生理狀況總覽 (Shigemoto et al., 2015).....11

圖 1-4 PGC-1 α 調控路徑 (Finck et al., 2007)..... 12

圖 1-5 衰老細胞的標誌 (B. G. Childs et al., 2017) 16

圖 1-6 C57BL/6J 小鼠與人類生命期之對照表 (Flurkey et al., 2007) 19

圖 2-1 小鼠進行前肢抓力表現分析時之代表照片 (TaiwanMouseClinic)..... 30

圖 2-2 小鼠進行 Inverted screen test 時之代表照片 (Bonetto et al., 2015)..... 31

圖 3-1 飼養期間各組小鼠之存活率 56

圖 3-2 受試 B6 小鼠實驗期間前肢抓力與運動表現分析 57

圖 3-3 受試 B6 小鼠餵食正式實驗飼料 22 週之衰弱指數 58

圖 3-4 受試 B6 小鼠全實驗期之生長曲線 59

圖 3-5 受試 B6 小鼠全實驗期之每週平均攝食量與能量效率變化 61

圖 3-6 受試 B6 小鼠餵食正式實驗飼料 26 週之禁食血清生化指標分析 69

圖 3-7 受試 B6 小鼠骨骼肌肌纖維橫截面積大小分析 71

圖 3-8 受試 B6 小鼠骨骼肌琥珀酸脫氫酶活性分析 73

圖 3-9 受試 B6 小鼠腓腸肌粒線體功能相關基因表現分析 74

圖 3-10 受試 B6 小鼠比目魚肌粒線體功能相關基因表現分析 75

圖 3-11 受試 B6 小鼠趾伸長肌粒線體功能相關基因表現分析 76

圖 3-12 受試 B6 小鼠腓腸肌肌纖維型態相關基因表現分析 77

圖 3-13 受試 B6 小鼠比目魚肌肌纖維型態相關基因表現分析 78

圖目錄

圖 3-14 受試 B6 公鼠趾伸長肌肌纖維型態相關基因表現分析	79
圖 3-15 受試 B6 公鼠腓腸肌肌肉生合成及肌肉萎縮相關基因表現分析	80
圖 3-16 受試 B6 公鼠腓腸肌衰老相關基因表現分析	81
圖 3-17 受試 B6 公鼠肝臟衰老相關基因表現分析	82
圖 3-18 受試 B6 公鼠副睪周圍白色脂肪組織衰老相關基因表現分析	83
圖 3-19 受試 B6 公鼠腎臟衰老相關基因表現分析	84
圖 4-1 受試 B6 公鼠禁食血糖與體脂率相關性分析	88
圖 4-2 受試 B6 公鼠腓腸肌中 <i>Ppard</i> 與 <i>p21</i> mRNA 基因表現量相關性分析 .	99
圖 4-3 受試 B6 公鼠腓腸肌中 <i>p16</i> 與 <i>p21</i> mRNA 基因表現量相關性分析	99



表目錄

表 2-1 市售 Chow diet 組成 28

表 2-2 實驗飼料配方 29

表 2-3 老齡 C57BL/6J 小鼠惡化的臨床症狀 (Whitehead et al., 2014)..... 33

表 2-4 計算衰弱指數所使用之臨床評估項目 (Whitehead et al., 2014)..... 34

表 2-5 本研究 qPCR 分析使用引子整理表 43

表 3-1 受試 B6 公鼠餵食正式實驗飼料 26 週期間之體重變化情形 60

表 3-2 受試 B6 公鼠餵食正式實驗飼料 26 週攝食量及飼料利用 62

表 3-3 受試 B6 公鼠餵食正式實驗飼料 26 週之組織/器官絕對重量 (一)..... 63

表 3-4 受試 B6 公鼠餵食正式實驗飼料 26 週之組織/器官絕對重量 (二)..... 64

表 3-5 受試 B6 公鼠餵食正式實驗飼料 26 週之組織/器官絕對重量 (三)..... 65

表 3-6 受試 B6 公鼠餵食正式實驗飼料 26 週之組織/器官相對重量 (一)..... 66

表 3-7 受試 B6 公鼠餵食正式實驗飼料 26 週之組織/器官相對重量 (二)..... 67

表 3-8 受試 B6 公鼠餵食正式實驗飼料 26 週之組織/器官相對重量 (三)..... 68

表 4-1 高齡、高蔗糖飼料，以及苦瓜補充對於受試 B6 公鼠生長情形及血清生化
指標之影響整理表 102

表 4-2 高齡、高蔗糖飼料，以及苦瓜補充對於受試 B6 公鼠各項肌肉指標之影響
整理表 103

表 4-3 高齡、高蔗糖飼料，以及苦瓜補充對於受試 B6 公鼠骨骼肌基因表現之影
響整理表 104

表 4-4 高齡、高蔗糖飼料，以及苦瓜補充對於受試 B6 公鼠衰老基因表現之影響
整理表 105

表 4-5 山苦瓜補充對於年輕小鼠及老齡小鼠肌肉中粒線體相關基因影響之比較..

.....108



縮寫對照表



Groups	Full names	
AN	Aging mice fed AIN-93G diet	
AH	Aging mice fed high sucrose (HS) diet, 50% (w/w) sucrose	
AHB	Aging mice fed 5% bitter melon powder (BMP) in HS diet	
YN	Young mice fed AIN-93G diet	
YH	Young mice fed high sucrose (HS) diet, 50% (w/w) sucrose	
Muscles	Full names	Remarks
BC	Bulbocavernosus	Androgen-responsive muscle
LA	Levator ani	Androgen-responsive muscle
Quadriceps	Quadriceps	Mix-type muscle
TRI	Triceps	Mix-type muscle
GAS	Gastrocnemius	Mix-type muscle
SOL	Soleus	Type I fiber dominant muscle
TA	Tibialis anterior	Mix-type muscle
EDL	Extensor digitorum longus	Type II fiber dominant muscle
Abbreviation	Full names	
AMPK	AMP-activated protein kinase	
ATM	ataxia telangiectasia mutated	
ATR	ataxia telangiectasia and RAD3-related protein	
B6	C57BL/6J	
BAT	interscapular brown adipose tissue	
BCL	B cell lymphoma	
BGP	bitter melon powder	
BH3	Bcl-2 homology 3	
CDK	cyclin-dependent kinase	
CLN	9-cis, 11-trans, 13-trans-conjugated linolenic acid	
COX	cytochrome c oxidase	
CRE	cAMP-responsive element	
CREB	CRE binding protein	
CRP	C-reactive protein	
CS	citrate synthase	
CSA	cross section area	
DNMT3A	p53-dependent DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A	
EWAT	epididymal white adipose tissue	
FIS1	fission 1 protein	

縮寫對照表

GH	grow hormone
GK	glycerol kinase
GOD	glucose oxidase
GPO	glycerol-3-phosphate oxidase
HMB	β -hydroxy β -methylbutyrate
HS	high sucrose
IGF-1	insulin-like growth factor-1
IL-6	interleukin-6
IWAT	inguinal subcutaneous white adipose tissue
MAFbx	Muscle Atrophy F-box or Atrogen-1
MDM2	mouse double minute 2
MFN1	mitofusin1
MFN2	mitofusin2
MMP	metalloproteinase
mtDNA	mitochondrial DNA
mTOR	mammalian target of rapamycin
MuRF1	Muscle RING Finger 1
MyHC	myosin heavy chain
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
Nnt	Nicotinamide nucleotide transhydrogenase
NRF	nuclear respiratory factors
OPA1	optic atrophy protein 1
PAI1	plasminogen activator inhibitor 1
PGC-1 α	peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α
POD	peroxidase
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptors
PPRE	PPAR-responsive element
PUMA	p53-upregulated modulator of apoptosis
RB	retinoblastoma protein
ROS	reactive oxygen species
RWAT	retroperitoneal white adipose tissue
SARM	selective androgen receptor modulators
SASP	senescence-associated secretory phenotype
SA- β -gal	Senescence-associated β -galactosidase
SDH	succinate dehydrogenase
SIRT1	sirtuin1
SV	seminal vesicle
TFAM	mitochondrial transcription factor A



縮寫對照表

TNF- α	tumor necrosis factor-alpha
UCP	uncoupling protein
VEGF	vascular endothelial growth factor





第一章 緒論

第一節 前言

近年來全球老年人口比例持續上升，老年人健康問題日益受到重視。根據內政部資料顯示，台灣 65 歲以上人口在 2018 年已達 14%，顯示台灣已進入高齡化社會。依據目前人口成長速度，在 2023 年 65 歲以上人口可能達到 20%，這將使台灣進入超高齡社會（臺灣內政部統計處, 2018）。而這也使得如何維持晚年生活品質成為重要議題。老年人晚年生活品質與活動能力密切相關，活動能力低下會降低生活自理能力，增加看護醫療等支出，並且增加疾病及死亡的風險。

肌少症係指隨著年齡增長所致肌肉質量及肌力減少與活動能力下降。肌少症常與第二型糖尿病、肥胖等代謝疾病有共病關係，影響老齡人口晚年活動能力。骨骼肌老化在細胞層面來說源自於細胞傷害的累積。老化骨骼肌中可以發現蛋白質合成及降解路徑的失調、代謝失衡、粒線體功能低下以及幹細胞衰老導致肌肉再生能力下降、以及發炎情形上升等等。

苦瓜 (*Momordica Charantia*) 已被多年研究證實具有降血糖、抗肥胖、改善代謝異常與調節免疫等多重生理活性。而近期研究中發現苦瓜對於肌肉功能的維持有正面的效果。本研究以老齡誘發肌少症小鼠為模式，評估山苦瓜改善肌少症之效用，及其可能之調節粒線體功能與抗衰老能力，以期未來可應用於改善老年肌肉萎縮及運動功能衰退。



第二節 文獻回顧

一、肌少症 (Sarcopenia)

1.1 肌少症簡介

“sarcopenia”一詞由希臘字根“sarx”(肉)與“penia”(缺乏)所組成，指的是與年齡相關的漸進式肌肉質量減少、肌力下降與功能退化 (Rosenberg, 1997)。在自然老化過程中，30 歲後肌肉質量以每十年約減少 8% 的速率流失，70 歲以後流失地更加迅速，每年約流失 1.5% 肌肉質量，而肌肉流失以下肢肌肉更為明顯 (T. N. Kim et al., 2013)。臨床上肌少症診斷包含肌肉質量評量、肌力測量以及活動能力測量三項指標，個別說明如下：

- (1) 臨床上常使用雙能量 X 光吸收儀 (Dual energy X-ray absorptiometry) 或生物電阻測量分析 (Bio-impedance analysis) 測量，並以四肢骨骼肌質量指數 (appendicular skeletal muscle mass index) 來評估身體肌肉量，算法為四肢骨骼肌質量除以身高平方 ($\text{appendicular skeletal muscle mass}/\text{squared height}$, ASM/ht^2)，以四肢骨骼肌質量指數低於年輕族群兩倍標準差作為低肌肉質量的切點。台灣國家衛生研究院研究資料顯示，台灣肌肉質量過低切點為男性 $6.76 \text{ kg}/\text{m}^2$ 、女性 $5.28 \text{ kg}/\text{m}^2$ (I.-C. Wu et al., 2014)。
- (2) 肌力部分則以握力器測量手部握力，以族群中最低 20% 值作為切點。台灣男性 $\text{BMI} < 22.1 \text{ kg}/\text{m}^2$ 者之握力切點為 25.0 kg；女性 $\text{BMI} < 22.3 \text{ kg}/\text{m}^2$ 者之握力切點為 14.6 kg (I.-C. Wu et al., 2014)。
- (3) 活動能力方面則以步行速度作為指標，歐盟肌少症工作小組 (European Working Group on Sarcopenia in Older People) 建議以行走速率低於 0.8 m/s 作為 65 歲以上長者活動能力低下切點 (Cruz-Jentoft et al., 2010)。

研究顯示，60 到 70 歲長者間的肌少症盛行率約為 5~13%，而 80 歲以上人口的肌少症盛行率則約為 11~50% (von Haehling et al., 2010)。

肌少症可能伴隨著失能、生活無法自理、疾病發生率提高、生活品質降低、跌倒風險增加，以及死亡風險的增加。更有研究指出，罹患肌少症之長者死亡率 (67.4%) 高於未罹患患者 (41.2%)，顯示肌肉功能為影響晚年生活品質及死亡率的重要因素之一 (Cooper et al., 2010; Hirani et al., 2015; Janssen et al., 2002)。此外，由於肌肉組織亦為重要的內分泌組織，肌少症亦常與心血管疾病與代謝疾病如肥胖及第二型糖尿病有共病關係 (Pedersen et al., 2012; Sayer et al., 2005)。

1.2 肌少症分類

肌少症可以分為單純因老化而造成的原發性肌少症，與多重疾病與風險因子 (含活動量下降、疾病或營養不良) 所造成的次發性肌少症。臨床診斷上又將肌少症依不同嚴重程度分為肌少症前期、肌少症與嚴重肌少症。肌少症前期指的是肌肉質量下降但尚未發生肌力減退或活動功能下降；肌少症診斷標準為肌肉質量下降合併肌力減退或活動功能下降；而三項診斷標準皆符合則稱為嚴重肌少症 (Cruz-Jentoft et al., 2010)。

1.3 肌少症病生理機轉 (Pathophysiology of sarcopenia)

肌少症發病及進程的影響因子可分為外在因子及內在因子。外在因子包含活動量、飲食及營養攝取以及生活型態及疾病狀態等。內在因子包含神經肌肉完整性下降、體內同化性荷爾蒙 (anabolic hormone) 含量及其敏感性改變 (包含生長激素 (growth hormone, GH)、類胰島素生長因子 (insulin-like growth factor-1, IGF-1)、雄激素、雌激素及胰島素減少，以及皮質類固醇與胰島素阻抗的增加)、活性氧分子生成增加、促發炎性細胞激素 (如腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor-alpha, TNF- α)、介白素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 及 C-reactive protein (CRP) 等) 分泌增加、以及以上因子共同導致的蛋白質降解速率上升以及蛋白質合成速率下降 (Kanda et al., 1989)。蛋白質生成及降解速率平衡被破壞便進一步導致肌肉流失並且影響運動功能。



1.4 肌少症治療策略

粒線體被認為是調節各項肌少症內在因子的重要因素，隨著年齡而下降的粒線體功能也被認為是造成老年運動能力下降的原因之一 (Arnold et al., 1984)。因此，近年來強化粒線體功能也成為逐漸受到重視的肌少症治療策略 (Picca et al., 2019)。然而，目前預防及治療肌少症最好的方法仍為運動，且又以阻力運動效果最佳。有多篇臨床研究支持阻力運動能增加肌肉質量、肌力與活動能力之效用 (Barrera et al., 2001; Bonnefoy et al., 2007; Sinacore et al., 2005; Suetta et al., 2008)。而粒線體功能提升被認為介導了運動帶來好處的原因。

此外，營養補充亦為肌少症治療策略之一，常被使用的營養補充品包含全蛋白質或以白氨酸 (leucine) 為主的必需胺基酸補充、以及效果較優的白氨酸下游代謝產物 β -hydroxy β -methylbutyrate (HMB) 補充。單純蛋白質補充與以 leucine 為主的必需胺基酸補充對於肌肉質量、肌力與活動能力的影響皆有限，需搭配運動才能有較好的效果 (Barrera et al., 2001; H. K. Kim et al., 2012; Tieland et al., 2012)。而 HMB 可以降低蛋白質降解並增加蛋白質生合成 (Eley et al., 2007)，於臨床研究結果中有較一致之改善肌肉質量、肌力與活動能力之效果 (N. E. Deutz et al., 2013; Flakoll et al., 2004; Stout et al., 2013)。研究顯示長者對於蛋白質生合成路徑反應降低，因此目前歐洲臨床營養與代謝協會 (European Society for Clinical Nutrition and Metabolism) 建議健康 65 歲以上長者每日蛋白質攝取量應提高為 1.0-1.2 g/kg BW 蛋白質，而對於患有慢性病或營養不良之長者，則更加提高至 1.2-1.5 g/kg (Davis et al., 1996; N. E. P. Deutz et al., 2014)。蛋白質以外的營養補充品包含維生素 D 及睪固酮 (testosterone) 等。維生素 D 有助於肌肉生長及預防骨質疏鬆。睪固酮用於性腺功能低下的老年男性則可增加體重及肌肉質量並減少脂肪量，但其長期補充可能增加前列腺癌及心血管疾病風險。近期選擇性雄激素受體調節劑 (selective androgen receptor modulators, SARM) 被發現擁有睪固酮帶來的好處卻無其害處，為肌少症治療的新興策略。



二、粒線體

粒線體為真核生物特有的雙層膜胞器，其主要功能為進行檸檬酸循環以及氧化磷酸化產生 ATP，提供細胞能量。因此，代謝旺盛的器官如肌肉、肝臟、及棕色脂肪組織中粒線體含量較為豐富。粒線體為細胞與細菌內共生演化而來，因此具有自己的一套 DNA，稱為粒線體 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)，可以自行製造出氧化磷酸化複合體中的蛋白質。除了產生能量外，粒線體也參與胺基酸與脂肪酸的代謝、尿素循環、鈣離子濃度調控、生成活性氧物質、細胞分化與凋亡等維繫生理功能之重要機制。也因此，粒線體具有多種品質控制系統共同合作維持粒線體的功能。這些粒線體品質相關系統包含：粒線體生合成、粒線體融合及分裂、粒線體自噬以及粒線體功能相關蛋白表現調控等。

2.1 粒線體生合成

粒線體生合成是指粒線體數目因細胞對能量需求增加而增加，為一複雜的轉錄調控機制。粒線體生合成的主要調節者 peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α (PGC-1 α) 為轉錄輔激活因子 (coactivator)，可調控轉錄因子之轉錄活性影響其下游基因表現。運動過後，PGC-1 α 透過增加轉錄因子 nuclear respiratory factors (NRF)-1、-2 之表現來進一步增加 mitochondrial transcription factor A (TFAM) 表現。TFAM 進入粒線體後便可 mtDNA 結合，並促進粒線體生合成以及增加粒線體氧化酵素之表現 (Scarpulla, 2008)。

2.2 粒線體融合與分裂

粒線體是高度適應性的胞器，透過不停融合與分裂進行動態重塑來適應不同養分供給狀態下的能量需求。粒線體融合及分裂對於粒線體功能的維持扮演了重要的角色。粒線體融合由外膜融合蛋白 mitofusin1 (MFN1)、mitofusin 2 (MFN2) 及內膜融合蛋白 optic atrophy protein 1 (OPA1) 負責，可以稀釋掉受損的粒線體，減輕環境或代謝造成的壓力。粒線體分裂則由 fission 1 protein (FIS1) 負責，可使受損粒線體進一步透過粒線體自噬 (mitophagy) 被清除 (Schrepfer et al., 2016)。

粒線體型態可以反映粒線體融合與分裂間的速率關係。型態較長且為網絡狀或管狀的粒線體可能來自於較旺盛的粒線體融合作用；而顆粒狀的較小的粒線體則可能來自於較旺盛的粒線體分裂作用。不同類別的細胞中粒線體型態具有高度變異，例如：纖維母細胞中的粒線體多呈絲狀；而肝細胞中粒線體則為較小的胞器。骨骼肌中的粒線體型態亦依據能量代謝的不同而有所差異，根據 Mishra et al. (2015) 研究顯示，快肌纖維中粒線體以小塊狀排列，而慢肌纖維中之粒線體則較長且互相連接。此外，在快肌轉換為慢肌的過程中也能發現粒線體增長的現象。

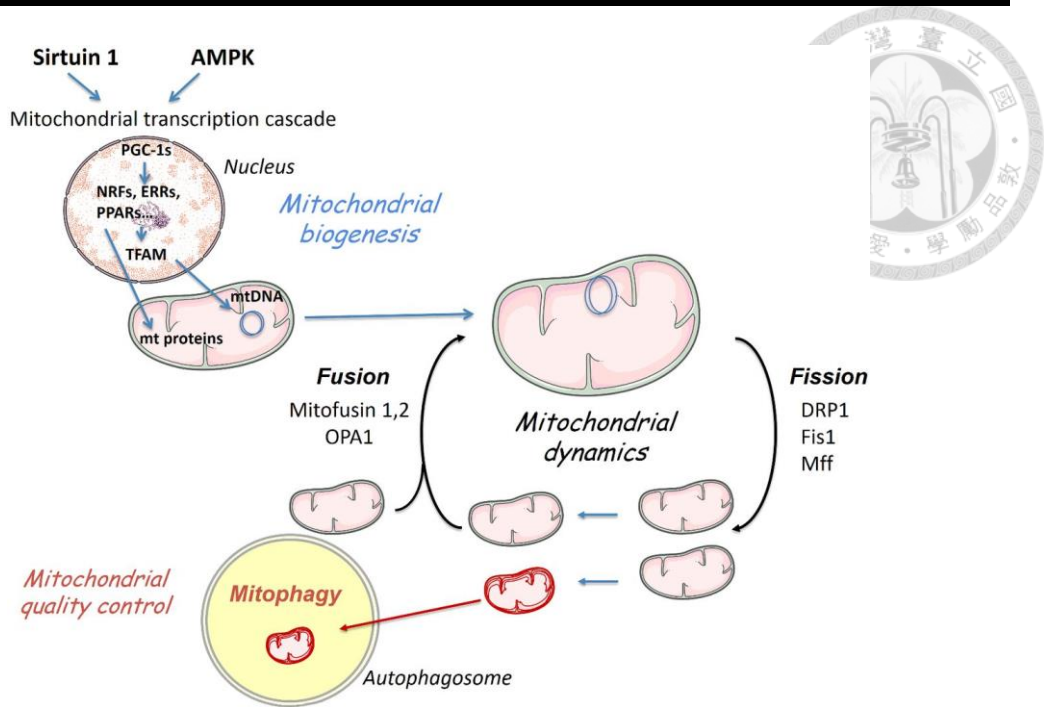


圖 1-1 粒線體生命週期 (Ventura-Clapier et al., 2017)

Figure 1-1 Mitochondria life cycle

Mitochondria life cycle involves mitochondrial biogenesis, mitochondrial dynamics, and quality control involving mitophagy. Mitochondrial biogenesis is initiated by an energetic disequilibrium that is sensed by two signaling pathways: the AMPK and the deacetylase SIRT1. Increased expression or activity of the master regulators of mitochondrial biogenesis PGC-1 α and β activates the expression of the nuclear respiratory factors 1 and 2 (NRFs) which induces the expression of the mitochondrial transcription factor TFAM which translocates to mitochondria, binds to mtDNA and activates its transcription and replication. NRFs together with other transcription factors (ERRs, PPARs) activate the expression of nuclear-encoded mitochondrial proteins (mt proteins) which are imported into mitochondria. Mitochondria then undergo fusion and fission cycles known as mitochondrial dynamics. Defective mitochondria (red) can be eliminated in the autophagy vesicles through a process called mitophagy. (Ventura-Clapier et al., 2017)

2.3 粒線體功能相關蛋白

如前述提到，粒線體主要功能為進行檸檬酸循環以及氧化磷酸化產生 ATP，提供細胞能量，參與檸檬酸循環及氧化磷酸化之酵素乃被作為粒線體功能指標。常作為粒線體功能指標的粒線體酵素包含位於粒線體基質，且為檸檬酸循環中第一個酵素的檸檬酸合成酶 (citrate synthase, CS)，以及位於粒線體內膜上同樣參與檸檬酸循環並為氧化磷酸化複合體 II 的琥珀酸脫氫酶 (succinate dehydrogenase, SDH) 以及氧化磷酸化複合體 IV——細胞色素 c 氧化酶 (cytochrome c oxidase, COX)。其中，亦有研究支持 CS 活性與粒線體含量成正比 (O'Neill et al., 2011)。

除了氧化磷酸化相關酵素外，粒線體內膜上亦存在著去耦合蛋白 (uncoupling protein, UCP)。UCP 作為氫離子通道蛋白會進行去耦合作用，讓粒線體內外膜間之氫離子通過，並使原本用以產生 ATP 的氫離子濃度梯度轉換成熱能。除了產生熱能外，UCP 亦會影響能量代謝，並具有調節活性氧分子生成的功能。UCP 有三種亞型 (isoform)，包括 UCP1、UCP2、及 UCP3。UCP1 為脂肪組織特有；UCP2 廣泛表達於各種組織細胞中；而 UCP3 則主要表現於骨骼肌。

三、骨骼肌

骨骼肌佔人體質量約 40%，支持運動、產生力氣、呼吸運動、平衡姿勢、調節體溫等重要功能。也是人體主要的蛋白質及肝糖儲存所，在代謝調節上扮演重要角色 (Shavlakadze et al., 2006)。骨骼肌與平滑肌及心肌共同屬於肌肉組織，但與平滑肌及心肌不同的是，骨骼肌是隨意肌，可受意識自主控制其收縮及舒張。

骨骼肌由具有收縮能力的肌細胞所組成。肌細胞形狀呈細長的纖維狀，因此又稱為肌纖維 (muscle fiber)。肌纖維由肌母細胞 (myoblasts) 融合而來，為多核細胞，並具有許多粒線體以供應其能量需求。

3.1 肌纖維分類與肌肉可塑性

3.1.1 肌纖維分類

肌纖維依據收縮速度則可分為第一型慢縮肌纖維 (slow switch, Type I fiber) 與第二型快縮肌纖維 (fast switch, Type II fiber)。Type I fiber 又被稱為紅肌，含有較多粒線體與肌紅蛋白且血液供應較為充足，主要以有氧代謝來產生能量，疲勞阻抗能力強，主要提供身體進行長時間的耐力運動。而 Type II fiber 又被稱為白肌，其粒線體含量較低，主要使用糖解作用進行無氧代謝產生能量，疲勞阻抗能力較 type I fiber 弱，但收縮速度快，負責肌群之瞬間爆發力 (Burke et al., 1971)。

Type II fiber 依其肌球蛋白重鍊 (myosin heavy chain, MyHC) 組成不同，並依其粒線體含量、氧化酵素如 SDH 活性、與抗疲勞程度由高至低排序又可分為 type IIa、type IIx/d、及 type IIb fiber (Larsson et al., 1991; Peter et al., 1972; Spamer et al., 1977)。

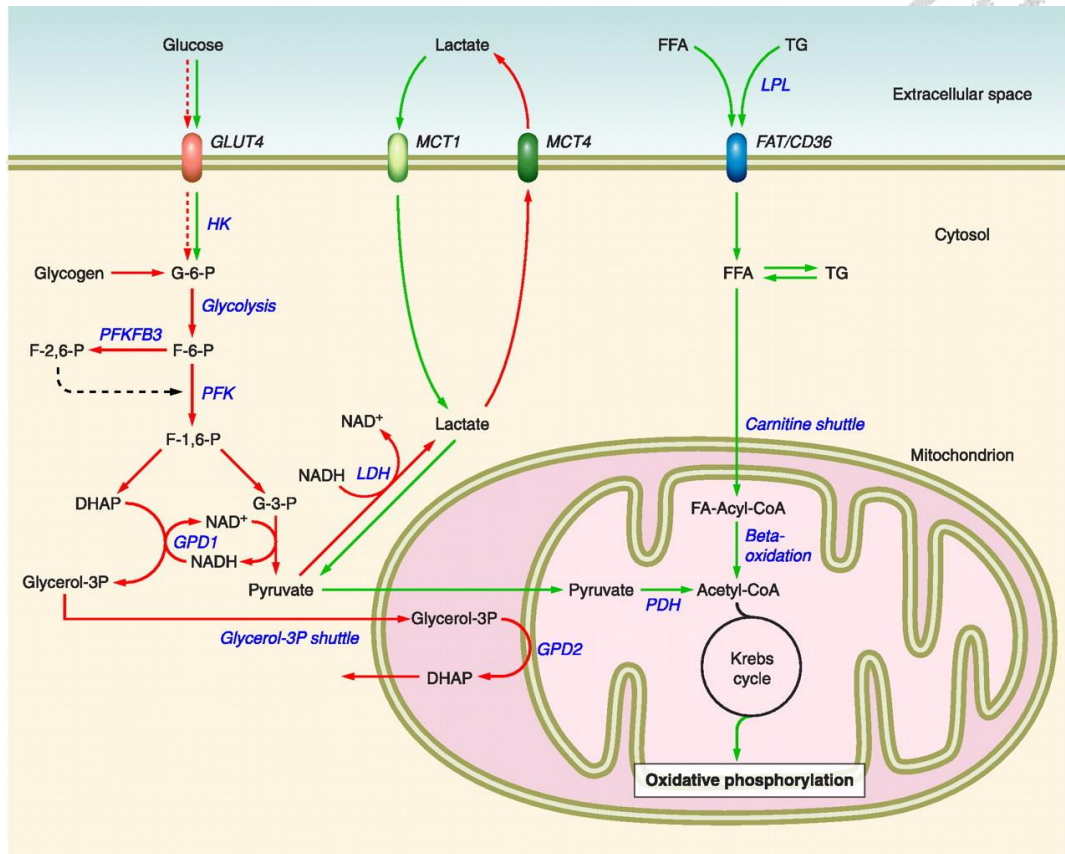


圖 1-2 快肌纖維與慢肌纖維中的代謝差異 (Schiaffino et al., 2011)

Figure 1-2 Scheme showing some differences in glucose, lactate, and fatty acid metabolism between fast and slow muscle fibers.

Pathways prevalent in fast or slow muscle fibers are shown as red or green arrows, respectively. DHAP, dihydroxyacetone phosphate; GLUT4, glucose transporter 4; F-6-P, fructose-6-phosphate; FAT/CD36, fatty acid translocase; FFA, free fatty acids; F-1,6-P, fructose-1,6-bisphosphate; F-2,6-P, fructose-2,6-bisphosphate; G-3-P, glyceraldehyde-3-phosphate; G-6-P, glucose-6-phosphate; GPD1, glycerolphosphate dehydrogenase 1 (cytoplasmic); GPD2, glycerolphosphate dehydrogenase 2 (mitochondrial); HK, hexokinase; LDH, lactate dehydrogenase; MCT1, monocarboxylic acid transporter 1; MCT4, monocarboxylic acid transporter 4; PDH, pyruvate dehydrogenase; PFK, phosphofructokinase; PFKFB3, phosphofructokinase/fructose bisphosphatase 3; TG, triglycerides. (Schiaffino et al., 2011)

3.1.2 肌肉可塑性

不同類型肌纖維間可透過運動訓練、運動神經活性改變、及荷爾蒙變化等刺激互相轉變，稱為肌肉可塑性 (plasticity)。例如，耐力訓練及粒線體含量上升可使原本氧化能力較低的 type IIb fiber 轉化為氧化能力較高的 type IIa fiber (Hoppeler et al., 1985; Jacobs-El et al., 1993)。

肌肉肌纖維組成亦受神經肌肉疾病、肌少症、賀爾蒙變化、或藥物濫用所影響。其中，在禁食 (fasting)、糖皮質素 (glucocorticoid)、惡質症、以及老化所致肌少症等情況中，type II fiber 萎縮情形較 type I fiber 嚴重 (Matsakas et al., 2009; Sayer et al., 2005)。此 type II fiber 較為敏感的情形可能是由於 type II fiber 中 PGC-1 α 表現量較少，Foxo3 受抑制情形較低，因此下游肌肉萎縮基因 ubiquitin ligases atrogin-1 及 MuRF1 表現較高所致 (Sandri et al., 2006)。另外，type II fiber 選擇性地去神經化與 mtDNA 及蛋白質含量減少也可能與老化過程中 type II fiber 萎縮情形較嚴重有關。研究也指出，type I fiber 中粒線體輕度去耦合可以降低活性氧物質 (reactive oxygen species (ROS)) 的產生，使其較能對抗隨著年齡增長而增加的粒線體損傷 (Amara et al., 2007)。

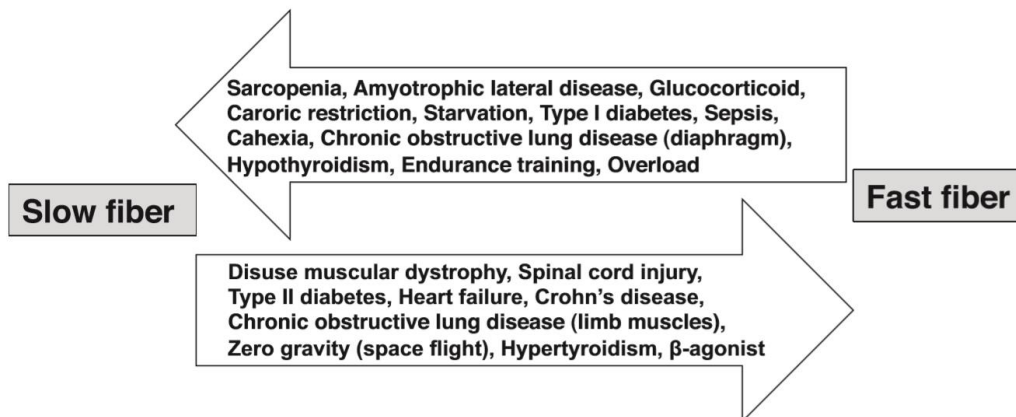


圖 1-3 造成肌纖維組成轉換之生理狀況總覽 (Shigemoto et al., 2015)

Figure 1-3 Summary of conditions to induce muscle fiber-type switching.

3.1.3 肌肉可塑性調節機制與 PGC1 α

肌纖維轉變的調控機制包含：鈣調磷酸酶 (calcineurin) 與轉錄因子 nuclear factor of activated T-cells (NFAT)、對肌肉分化扮演重要角色之轉錄因子 MEF2 相關路徑、以及參與粒線體生合成調控的 PGC-1 α 。過度表現 PGC-1 α 可在快肌中增加粒線體含量及氧化酵素表現，並使 type I 及 type IIa 比例增加，並具有較高的抗疲勞能力 (Lin et al., 2002b)。

除了與粒線體生合成相關之 NRF 外，受 PGC-1 α 調節的轉錄因子亦包含負責調控脂肪酸汲取與氧化的 ERR α 以及參與脂質及蛋白質的代謝的過氧化體增殖活化受體 (peroxisome proliferator-activated receptors, PPAR) 家族。PPAR 具有 α 、 δ/β 、及 γ 三種亞型，受長鏈脂肪酸及其衍生物所活化並影響脂質代謝 (Grygiel-Górniak, 2014)。骨骼肌中以 PPAR δ/β 含量最多，且其表現量在 type I fiber 較 type II fiber 中高 (Muio et al., 2002; Y.-X. Wang et al., 2004)。肌肉中專一性過度表現 PPAR δ/β 可使肌纖維轉為傾向氧化型，增加粒線體 DNA、增加 type I fiber 基因表現，並使抗疲勞程度增加 (LUQUET et al., 2003)。

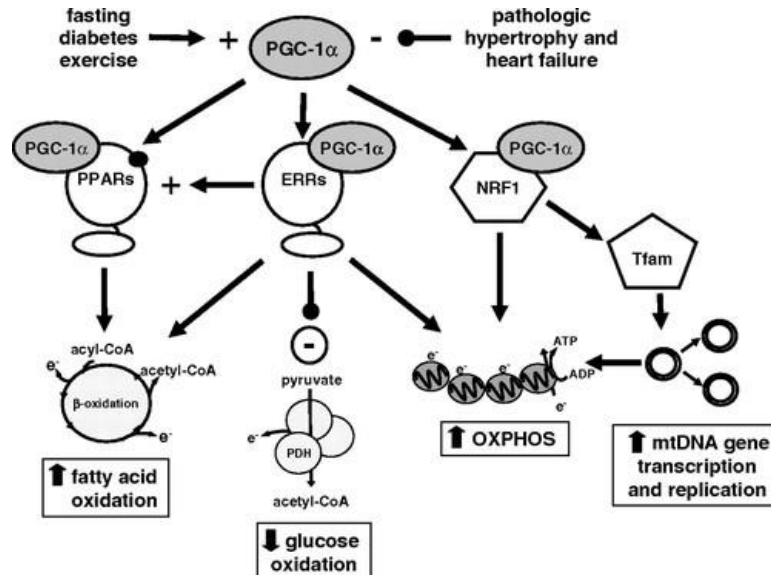


圖 1-4 PGC-1 α 調控路徑 (Finck et al., 2007)

Figure 1-4 The PGC-1 α regulatory cascade.

而 PGC-1 α 主要受 AMP-activated protein kinase (AMPK) 及 SIRT 等能量需求相關路徑所調控。AMPK 為細胞能量代謝主要調節者，可以感知細胞能量狀態 (Hardie et al., 2006)。當細胞能量下降時，AMP/ATP 比例上升，AMP 便會活化 AMPK 訊息路徑。以 AMP 類似物 AICAR 活化 AMPK 可以透過磷酸化 PGC-1 α 增加粒線體氧化酵素含量並且增進運動耐力 (Narkar et al., 2008)。AMPK 活化亦會影響 MyHC 表現，並使 type IIb fiber 轉變為 type IIa 或 type IIx/d (Röckl et al., 2007)。

此外，低能量狀態亦使 NAD^+/NADH 比值上升，刺激 sirtuin1 (SIRT1) 活性。SIRT 為去乙酰化酶，會將轉錄因子或共同活化因子去乙酰化調節其活性，如 SIRT1 會去乙酰化活化 PGC-1 α ，進一步促進粒線體生合成及粒線體活性。熱量限制為在不造成營養不良的情況下降低能量攝取至正常需求的 50% 至 80%，已知能夠延長壽命，而其分子調控機制便為 AMPK 路徑及 SIRT 路徑。

3.2 骨骼肌肥大與萎縮相關訊息路徑

PI3K/Akt 是調節肌肉質量主要的訊息路徑，為 IGF-1 及 insulin receptor 下游並且受運動調節 (Glass, 2005)。PI3K/Akt 路徑活化可透過活化 (mammalian target of rapamycin) mTOR 路徑增加 S6K1、及 4E-BP1 的磷酸化來增進蛋白質生合成，並且透過磷酸化轉錄因子 FOXO ((Brunet et al., 1999) 來抑制 Muscle Atrophy F-box or Atrogen-1 (MAFbx) 及 Muscle RING Finger 1 (MuRF1) 轉錄進而降低肌肉萎縮情形 (Bodine, Stitt, et al., 2001; Stitt et al., 2004)。老年胰島素敏感性下降導致對於蛋白質生合成路徑刺激較不敏感 (Davis et al., 1996)。增加蛋白質攝取可增加 Akt、S6K1、及 4E-BP1 的磷酸化進而增加蛋白質生合成並且透過活化 mTOR 訊息路徑來增加蛋白質轉譯。

蛋白質分解靠依賴 ATP 之泛素-蛋白酶體 (ubiquitin-proteasome) 之蛋白質水解路徑活化，在哺乳類動物中需要透過 MAFbx 及 MuRF1 才能達成 (Bodine, Latres, et al., 2001)。因此，MAFbx 及 MuRF1 可作為肌肉萎縮指標。

3.3 肌肉幹細胞與肌肉再生能力

衛星細胞 (satellite cell) 存在於基底膜和肌纖維的肌膜之間，平時處於靜止狀態 (quiescent)，當受到運動或其他刺激時才會活化分裂進行肌肉的生長及修復 (Zammit et al., 2006)。研究發現高齡者肌肉幹細胞由靜止狀態轉變為不可逆之衰老狀態 (senescence)，肌肉增生分化與修復能力下降，加上老化過程中蛋白質分解速率高於合成速率，終致肌肉質量與功能的下降 (Sousa-Victor et al., 2014)。



四、細胞衰老

4.1 細胞衰老簡介與特徵

細胞衰老是細胞週期永久停滯的狀態，會受到端粒 (telomere) 縮短、致癌基因活化、DNA 雙股斷裂、氧化壓力等的活化。細胞衰老在短期對於抑制癌症、組織修復、傷口癒合及胚胎發育是有益的 (Demaria et al., 2014; Helman et al., 2016; Kang et al., 2011; Storer et al., 2013)，此衰老細胞可被正常免疫系統清除。但在年老、化療、放射線等因子的作用下，容易造成免疫功能下降而導致衰老細胞累積，此時衰老細胞就轉為有害的。衰老細胞有以下三種特徵：永久的細胞週期停滯、衰老相關分泌表型 (senescence-associated secretory phenotype, SASP)、以及具有抵抗細胞凋亡的能力。

4.1.1 永久的細胞週期停滯

細胞週期的調控主要依靠各時期特有的週期素 (cyclin) 及與其搭配的週期蛋白依賴酶 (cyclin-dependent kinase, CDK)。CDK 與其搭配的週期素結合後呈現活化態，會促使視網膜母細胞瘤蛋白 (retinoblastoma protein, RB) 磷酸化。磷酸化的 RB 會釋放出轉錄因子 E2F，開啟下一階段的細胞週期所需要的蛋白基因轉錄 (Bai et al., 2017)。

衰老細胞中誘發及維持細胞週期停滯的主要調節者分別為 CDK2, 4, 6 抑制劑 p53 與 p21 及 CDK4, 6 抑制劑 p16^{INK4A} (Alcorta et al., 1996; Serrano et al., 1993)。DNA 雙股斷裂或裸露的端粒會誘發 DNA 損傷反應 (DNA damage response, DDR)，進而透過 ataxia telangiectasia mutated (ATM)、ataxia telangiectasia and RAD3-related protein (ATR)，或是 p19^{ARF} 抑制泛素連接酶 mouse double minute 2 (MDM2) 使 p53 磷酸化 (Eischen et al., 2014; Shiloh et al., 2013)。受磷酸化而活化的 p53 會增加下游基因 p21 的表現，導致細胞週期停滯 (Herbig et al., 2003)。而細胞週期停滯的維持是靠 p16^{INK4A} 抑制 CDK4, 6 活性，

使細胞無法進入 S phase (Ohtani et al., 2001; Wong et al., 2009)。老齡鼠之許多器官中皆可觀察到 CDK 抑制劑含量上升的現象 (Krishnamurthy et al., 2004)。

4.1.2 衰老相關分泌表型

衰老細胞雖然失去分裂的能力，但仍會分泌許多生物活性物質，包含促發炎因子 (如 IL-6、IL-8)、細胞外基質 (extracellular matrix) 重塑蛋白 (如細胞外基質分解酶 metalloproteinases (MMPs))、促纖維化因子、以及生長因子 (如血管內皮生長因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)) 等，合稱為衰老相關分泌表型 (senescence-associated secretory phenotype, SASP) (Acosta et al., 2008; B. G. Childs et al., 2017; Coppé et al., 2008; Kuilman et al., 2008)。

SASP 會影響正常細胞功能，並可能產生旁激素效應，誘導周圍細胞衰老 (Hoare et al., 2016)，這也可能產生促進癌症的環境而使原本抑制癌症的細胞衰老機制轉向促進癌症。

體內 (in vivo) 實驗發現，BubR1^{H/H} 早衰鼠脂肪組織、骨骼肌及眼睛中 plasminogen activator inhibitor 1 (PAI1) 表現量隨年齡增加而增加 (D. J. Baker et al., 2011)。而表現多重老化相關疾病之 klotho 缺陷小鼠中也發現較高的血漿 PAI1 及組織 (腎臟、血管及心臟) PAI1 表現與老化相關失能有關 (Eren et al., 2014)。

4.1.3 抵抗細胞凋亡

當衰老壓力來臨時，p53 表現量上升，致使 p53 調節的細胞凋亡調節劑 (p53-upregulated modulator of apoptosis (PUMA))、NOXA 及 B cell lymphoma (BCL) -2、及 BCL-X 高度表現，困住促細胞凋亡的含 Bcl-2 homology 3 (BH3) domain 之蛋白質而抑制細胞凋亡 (Yosef et al., 2016)。p21 亦可以直接抑制細胞凋亡及 caspase 3 活性 (Tang et al., 2006)。凋亡的細胞也會透過 p53-dependent DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A (DNMT3A) 來抑制 p21 活性 (Zhang et al., 2011)。

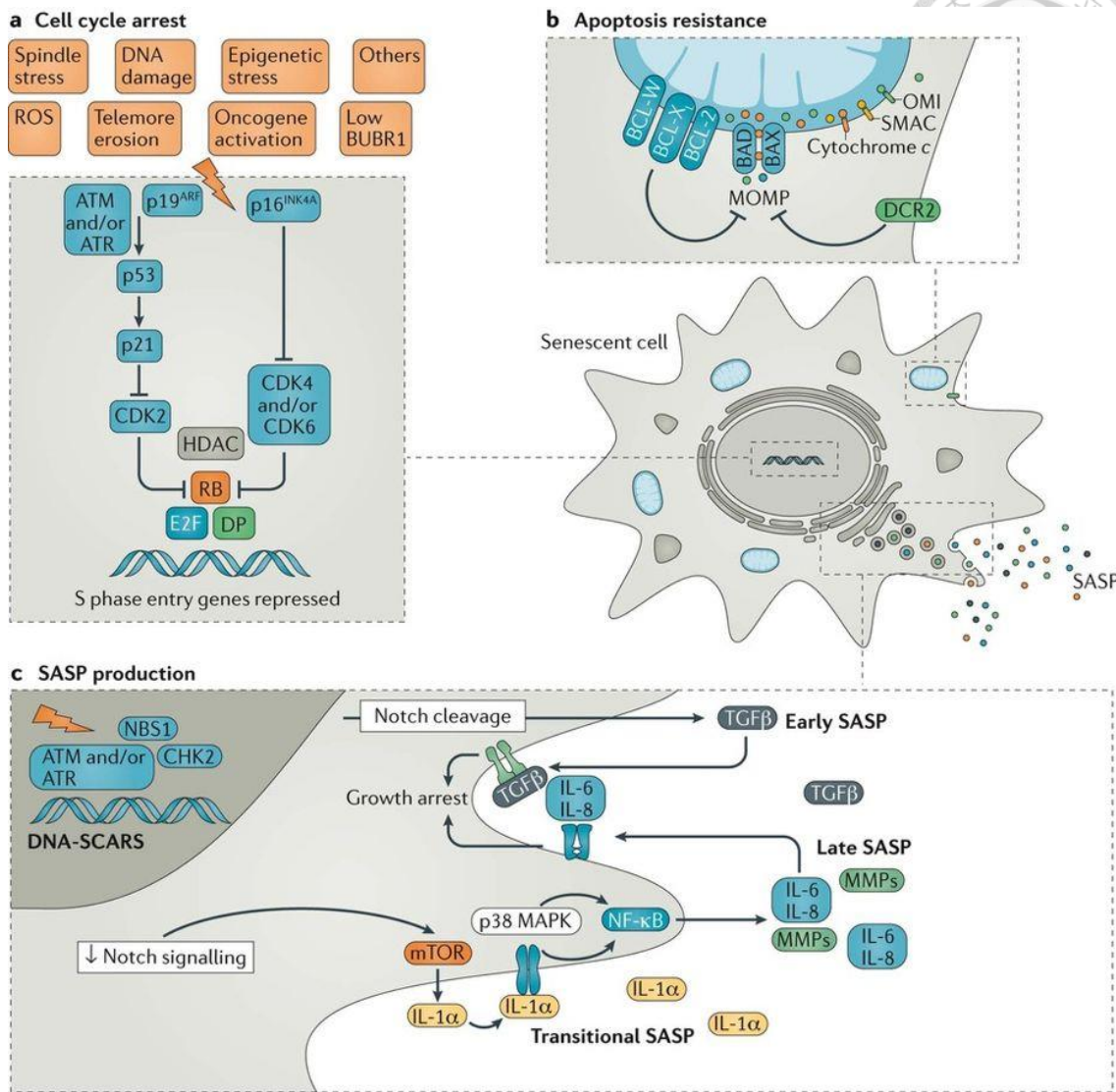


圖 1-5 衰老細胞的標誌 (B. G. Childs et al., 2017)

Figure 1-5 Hallmarks of senescent cells.

4.2 細胞衰老與老化

BubR1^{H/H} 早衰鼠具有有絲分裂檢查點缺失，常被用來研究衰老與老化間的關聯。BubR1^{H/H} 鼠在骨骼肌、脂肪組織、及眼睛會表現出老化表型，而在這些組織中皆可發現表現 p16^{INK4A} 的衰老細胞累積。抑制 p16^{INK4A} 可改善包括肌少症在內的老化現象並且延長壽命 (Darren J. Baker et al., 2008)。此團隊亦建立 INK-ATTAC (apoptosis through targeted activation of caspase) 基因轉殖模式小鼠：在 p16^{Ink4a} 之基因啟動子後加入 FKBP-Casp8-Flag-IRES-EGFP，如此可在打入 AP20187 後引起會轉錄出 p16 的細胞自噬。於 BubR1^{H/H} 小鼠中選擇性清除 p16^{Ink4a} 表現之細胞能改善肌少症、白內障、及脂肪功能異常 (lipodystrophy) 的情形 (D. J. Baker et al., 2011)。而於自然老化小鼠中選擇性清除 p16^{Ink4a} 表現之細胞能夠延長壽命、改善腎小球硬化、心肌細胞肥大、白內障、脂肪功能異常等年齡相關疾病並降低癌症發生 (Darren J Baker et al., 2016)。

4.3 對抗細胞衰老做為抗老化策略

由於細胞衰老與許多老年相關疾病有關，針對細胞衰老作用可作為對抗老年相關疾病的治療策略。針對細胞衰老的治療方法包括選擇性清除衰老細胞及影響 SASP 分泌情形等策略。選擇性清除衰老細胞策略多為針對衰老細胞中抗細胞凋亡機制，如 BCL-2 家族抑制劑 navitoclax (又被稱作 ABT-263) 能清除衰老細胞並改善動脈粥狀硬化 (Bennett G Childs et al., 2016)，但其有可能導致血小板減少症的副作用 (Rudin et al., 2012)。為了減輕藥物的副作用，仍需更多研究篩選出具有選擇性清除衰老細胞功能且半衰期短的藥物或者是採用間歇性給予的策略 (B. G. Childs et al., 2017)。另一選擇性清除衰老細胞的物質 UBX0101 可以改善骨關節炎疾病進程與疼痛 (Jeon et al., 2017)。同樣針對抗細胞凋亡作用的化療藥物 Dasatinib 及斛皮素 (quercetin，一種植物黃酮類化合物) 組合可以降低脂肪組織

中衰老細胞含量及降低 SASP 的分泌。在老齡鼠中給予 Dasatinib 及斛皮素可以提升活動功能及延長壽命 (Xu et al., 2018)。

而影響 SASP 分泌情形之策略包含降低促 SASP 分泌途徑、減少 SASP 分泌、及中和 SASP 效用等。然而降低促 SASP 分泌途徑需評估長期免疫抑制帶來的影響，而減少 SASP 分泌則無法有效降低衰老細胞帶來不良效果。

五、小鼠生命期

小鼠因其具有與人類高度相似的基因序列及生理特性，加上可獲得性與經濟效益較靈長類或其他模式佳之特點，使其廣泛應用於生物醫學相關研究。此外，小鼠生命期較短，近年來也被廣泛應用於探討老化 (aging) 與衰老 (senescence) 相關議題。

圖 1-6 為 Flurkey et al. (2007) 研究團隊觀察 300 隻 C57BL/6J (B6) 小鼠 (公鼠及母鼠各 150 隻) 而得之存活曲線。小鼠生命期可分為成年期 (mature adult)、中年期 (middle age)、與老年期 (old)。3~6 月齡之小鼠可視為處於成年期，此階段過了快速生長發育期但尚未受衰老所影響，常作為老化研究中的控制組，此時期對應到人類年齡約為 20~30 歲；10~14 月齡小鼠可視為中年期，此時期可以觀察到部分老化指標開始表現，有助於觀察年齡相關改變為漸進式變化亦或僅出現於老年期，此時期對應到人類年齡約為 38~47 歲；18~24 月齡小鼠可視為老年期，此時期可以觀察到幾乎所有的衰老相關改變；而 24 月齡以上小鼠被視為非常老，存活率急遽下降。

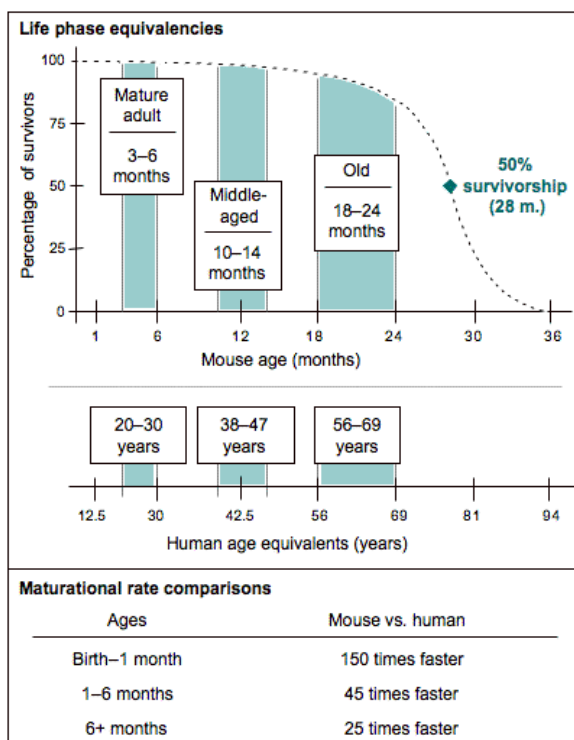


圖 1-6 C57BL/6J 小鼠與人類生命期之對照表 (Flurkey et al., 2007)

Figure 1-6 Life history stages in C57BL/6J mice in comparison to human beings



六、山苦瓜

6.1 山苦瓜簡介

山苦瓜學名為 *Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.，屬於葫蘆科 (Cucurbitaceae)、苦瓜屬 (Momordica)，為一年生蔓性攀藤植物。山苦瓜原產於熱帶及亞熱帶地區，廣泛種植於南亞、東南亞及中國等地。在臺灣一年四季均可生產山苦瓜，又以五至十月為盛產期。山苦瓜表面果實為漿果，表面有瘤狀突起，外型為紡錘狀或是橢圓形，未成熟時呈現綠色、淺綠色或白色，種子為白色；成熟後果實轉為橘黃色，種子則轉為紅色。苦瓜在熱帶地區廣泛作為一般家庭日常食用蔬菜。在傳統醫學上，苦瓜性寒，具有消暑清熱、去火、清新明目、解毒、滋陰補血、健脾補腎等功效。在亞洲、非洲、及拉丁美洲地區，苦瓜被做為改善高血糖及代謝紊亂的藥物使用，早在五千年前印度傳統醫學阿育吠陀 (Ayurveda) 中便有所記載 (Beloina et al., 2005; Grover et al., 2004a)。

6.2 苦瓜成分與生理活性

苦瓜中含九成水份，其餘成份包含纖維素及少量蛋白質。此外，苦瓜中也包含維生素、礦物質及多種植化素 (phytochemicals)，目前已知苦瓜中所含之植化素可分為五大類，包含：酚類 (phenolic compounds) 與黃酮類 (flavonoids compounds)、葫蘆烷型三萜類 (cucurbitane type triterpenoids)、葫蘆烷型三萜糖苷 (cucurbitane type triterpenoids glycoside)、齊墩果型三萜皂甙 (oleanane type triterpene saponins) 及胜肽 (peptides) (Chen et al., 2009; He et al., 2013; Kubola et al., 2008; Liu et al., 2009; Yen et al., 2014)。

苦瓜早已被報導出有抗細菌、抗發炎、抗糖尿病及抗腫瘤的能力 (Grover et al., 2004b)。本實驗室先前研究發現，山苦瓜乙酸乙酯萃物可活化 PPAR α 與 PPAR γ 、並上調脂肪酸代謝相關基因，且於山苦瓜中分離出 cis-9, trans-11, trans-13-共軛次亞麻油酸 (9-cis, 11-trans, 13-trans-conjugated linolenic acid, CLN) 作為活

性物質 (Chao et al., 2003; Chuang et al., 2006)。由山苦瓜中分離出的葫蘆烷型三萜類也被報導具有部分活化/拮抗雌激素受體(partial agonist/antagonist activity via ER) 的性質 (Hsu et al., 2011)。

小鼠體內 (in vivo) 實驗發現苦瓜可以影響多個重要體內組織及器官包含肝臟、胰臟、脂肪組織及肌肉，進而調控體內的代謝恆定，具有改善代謝異常及抗肥胖之效用。目前已知參與之調控包含：(1) 促進肝臟 PPARs 及 PGC-1 α 轉錄活性並增加 β -oxidation、減少脂肪酸合成及堆積；(2) 促進胰臟胰島素分泌及預防 β -cell 損傷；(3) 活化脂肪組織中 PPARs 及 PGC-1 α 轉錄活性，促進脂肪細胞分化、提高脂肪細胞葡萄糖汲取；(4) 促進骨骼肌 PPAR α 與 γ 表現等調控 (Alam et al., 2015)。

6.3 苦瓜對肌肉的影響

山苦瓜被認為可以增加肌肉對葡萄糖的汲取能力，進而調解血糖與促進胰島素敏感性 (Shih et al., 2009)。本實驗室過去研究也觀察到，在細胞模式中山苦瓜萃物可促進肌肉與脂肪組織葡萄糖汲取與 Akt 磷酸化 (周怡君, 2010)。山苦瓜中分離出數種三萜類化合物可以提升 L6 肌肉細胞中 AMPK 活性，使 PGC-1 α 表現量上升，進而促進粒線體生合成與調控肌纖維型態，尤其以不帶糖基三萜類活性最高 (Tan et al., 2008)。

體內實驗的部份，三萜類化合物中的 ursolic acid 被發現可以降低禁食導致肌肉萎縮小鼠之肌肉萎縮指標基因 *Atrogin-1* 及 *MuRF* 表現量 (Kunkel et al., 2011)。而在胰島素與 IGF-1 共同存在下，ursolic acid 可協同活化 IGF-1 活化 mTORC1 訊息路徑，調控蛋白質生合成 (Sakuma et al., 2012)。以高脂飲食誘發代謝異常之小鼠模式中，苦瓜補充可以上調腓腸肌 *IGF-1* 及其下游傳遞路徑 *IGF-1*、*Igf1r*、*Akt2*、*Hk2* 之基因表現，並增加腓腸肌相對重量 (黃苡慈, 2017)。Sprague-Dawley 大鼠餵食高脂 (30% fat) 飲食含 1% 或 1.25% 苦瓜 6 週後，與高脂組相比，腓腸肌中 *Ucp3* 及 *Pgc-1 α* mRNA 表現量被顯著上調

(Chan et al., 2005)。而 5% 山苦瓜補充於高蔗糖 (50% w/w) 飼料中也可促進肌肉中粒線體相關基因如 *Pgc1 α* 、*Nrf1* 及 *Tfam* mRNA 表現量 (Lu et al., 2013; 蔣汶龍, 2014)。

近年來，苦瓜被報導可以上調粒線體氧化能力並改善睪丸剔除導致的運動表現及肌肉流失 (C.-L. Wang et al., 2019)。ICR 公鼠補充山苦瓜四個禮拜後，肌力及抗疲勞能力皆顯著提升 (Hsiao et al., 2017)。



第三節 研究假說及實驗架構

一、研究假說

老化被認為源自於逐漸累積之細胞傷害，而伴隨老化的營養感應系統改變、粒線體功能下降、與衰老細胞的累積皆會導致老化情形加劇，影響老化相關疾病之進程。

已知苦瓜可藉由多種調控路徑調節體內代謝恆定。過去研究指出山苦瓜萃物可促進 C2C12 肌肉細胞之粒線體功能指標檸檬酸合成酶 (citrate synthase) 活性，並可協同 IGF-1 促進肌肉前驅細胞增生。於高脂及高蔗糖模式小鼠中皆觀察到苦瓜上調粒線體相關基因 mRNA 表現，利於維持粒線體功能。

綜合以上，本研究的假說為：**老化導致小鼠表現出肌少症之特徵，而山苦瓜可以透過調節小鼠骨骼肌粒線體活性與體內細胞衰老情形，利於減緩老化相關疾病肌少症之進程。**

本研究觀察重點如下：

- (1) 確認高齡會使小鼠表現出肌少症之特徵
- (2) 確認山苦瓜對於肌少症有改善的作用
- (3) 探討山苦瓜是否透過調節骨骼肌粒線體相關功能達改善肌少症之效果
- (4) 探討山苦瓜對體內細胞衰老情形之影響

二、研究架構

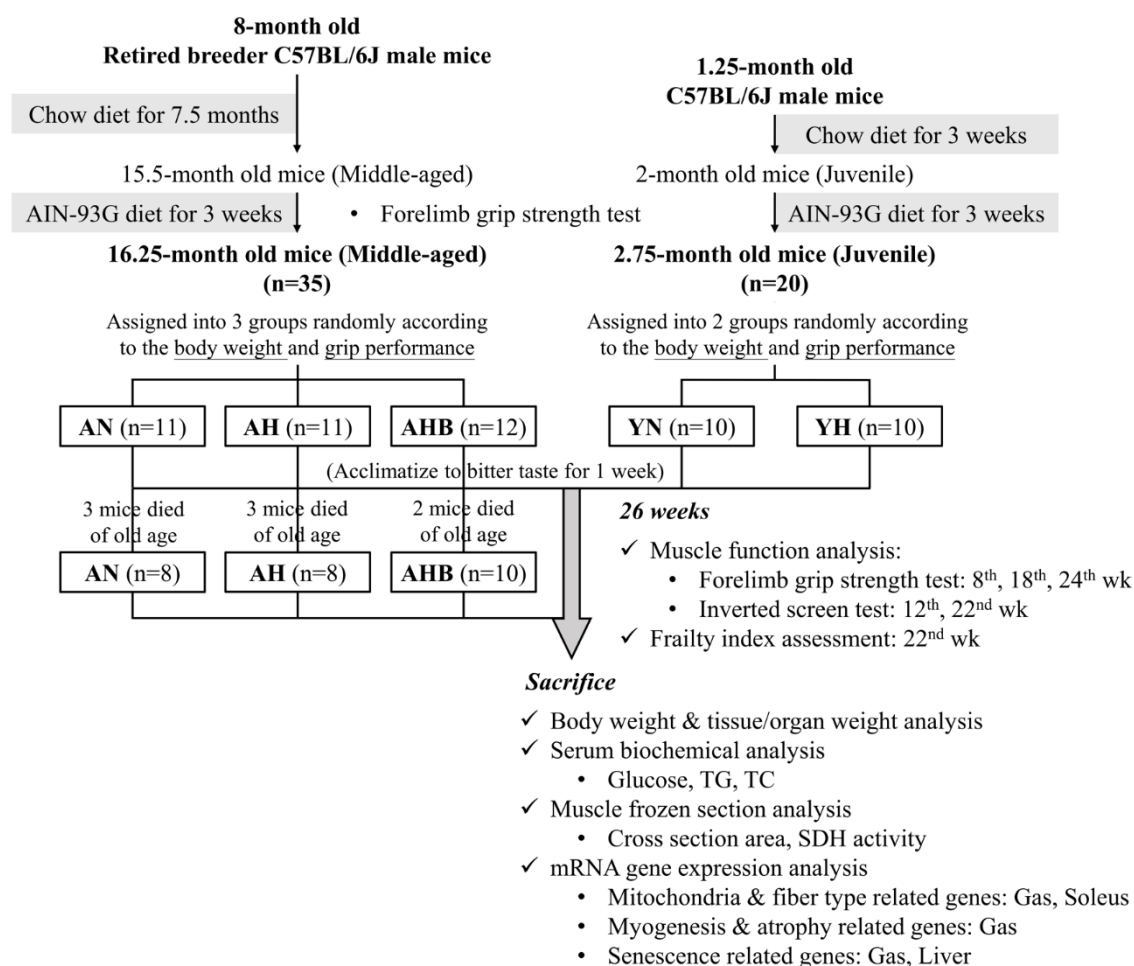
使用 8 月齡大之退役公鼠，將小鼠飼養至 16.5 月齡後觀察山苦瓜對老齡鼠肌肉功能、肌肉質量、粒線體及細胞衰老等之影響，以探討山苦瓜抗老化及應用於肌少症之潛力。實驗以老齡與高蔗糖飼料雙因子設計以釐清影響肌少症表型之因素。

1. 試驗對象：8 月齡 C57BL/6J 退役公鼠與 1.25 月齡 C57BL/6J 公鼠
2. 試驗組別：AN 組、AH 組、AHB 組、YN 組、及 YH 組
3. 實驗飼料：5% 山苦瓜全果凍乾粉添加於高蔗糖飼料，以 AIN-93G 飼料及高蔗糖飼料作為對照組
4. 實驗設計：8 月齡 C57BL/6J 公鼠餵食 Chow diet 至 15.5 月齡，更換為 AIN-93G 飼料繼續飼養至 16.25 月齡。苦瓜組經過苦味適應一周後開始給予實驗飼料，餵食 26 週後犧牲。年輕之兩組對照組於 1.25 月齡以 Chow diet 餵養至 2 月齡，更換為 AIN-93G 飼料繼續飼養至 3 月齡後開始給予實驗飼料，餵食 26 週後犧牲。



第二章 實驗設計與材料方法

第一節 實驗設計

**Test groups:**

AN: Aging mice fed AIN-93G diet

AH: Aging mice fed high sucrose (HS) diet, 50% (w/w) sucrose

AHB: Aging mice fed 5% bitter melon powder (BMP) in HS diet

YN: Young mice fed AIN-93G diet

YH: Young mice fed high sucrose (HS) diet, 50% (w/w) sucrose

動物飼養與飼養過程中的實驗均與本實驗室汪芝翎學姊及王昱仁學長共同完成。



第二節 材料與方法

一、動物飼養

八月齡退役 C57BL/6J 公種鼠 (老齡鼠) 35 隻及 5~6 週齡 C57BL/6J 公鼠 (年輕鼠) 20 隻自國家實驗動物中心購入後個別飼養於不鏽鋼絲網籠中。飼料及飲水為自由攝食，並每週監測體重。動物房溫度控制在 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ；濕度控制在 $60 \pm 10\%$ ；日照週期為 12 小時 (8:00~20:00 為光照期；20:00~8:00 為黑暗期)。

實驗鼠購入後以 Chow diet (LabDiet 5001, PMI Nutrient International Inc. Bretwood, MO) (營養組成如表 2-1 所示) 適應餵食至老齡鼠 15.5 月齡、年輕鼠 2 月齡 (年輕鼠分兩批購入，但實際年齡相同。兩月齡時兩批體重無顯著差異)，之後給予 AIN-93G 飼料進行粉狀飼料適應，此後便開始每週監測攝食量，並於其間測量其前肢抓力表現。於老齡鼠 16.25 月齡、年輕鼠 2.75 月齡時依體重及抓力表現隨機分組。

老齡鼠分為三組：持續餵食 AIN-93G 飼料之 AN 組 (n=11)；餵食將 AIN-93G 飼料中之醣類來源調整成 50% w/w 蔗糖 (高蔗糖飼料) 之 AH 組 (n=11)；及餵食以高蔗糖飼料為基礎添加 5% w/w 花蓮四號山苦瓜全果凍乾粉 (Hualien No.4 Bitter guard powder, BGP) 之 AHB 組 (n=12)。各組飼料配製方法及營養組成如本節之三、所示。年輕鼠分為兩組，分別作為 AN 及 AH 組之對照組：餵食 AIN-93G 飼料之 YN 組 (n=10) 及餵食高蔗糖飼料之 YH 組 (n=10)。AHB 組進行苦味適應 (漸進給予內含 1% (2 天)、3% (3 天) 及 5% BGP (2 天) 之高蔗糖飼料) 一週後進入正式實驗，正式實驗 26 週後進行犧牲。

二、山苦瓜樣品製備

本實驗採用由花蓮吉安鄉農業改良場提供之花蓮四號品系山苦瓜。山苦瓜全果以清水洗淨、擦乾後，切除蒂頭，並切成 0.5~1 公分間之苦瓜片，冷凍保存於 -20°C。冷凍苦瓜片於國立臺灣大學食品科技研究所進行冷凍乾燥後，以磨粉機打碎成粉末，即為花蓮四號山苦瓜全果凍乾粉，保存於 -20°C。

三、飼料配製

3.1 AIN-93G 飼料

AIN-93G 飼料普遍被用來作為純化飼料 (purified diet) 之控制組，我們特別在老齡鼠及年輕鼠中皆設計餵食 AIN-93G 之控制組小鼠，以釐清所觀察到之現象為年齡所致抑或是高蔗糖飼料所致。AIN-93G 飼料配方及配製方法參考 Reeves et al. (1993) 等人提出之方法：飼料成分、營養素組成及熱量百分比如表 2-2 所示。配製方法如下：將少量粉狀成分 (包含 AIN- 93G Mineral Mixture、AIN- 93 Vitamin Mixture、L-Cystine、Choline chloride、及 Hualien No.4 Bitter guard powder) 置於研鉢中磨至極細，逐次加入多量粉狀成分混合均勻，待所有粉狀成分混合均勻後加入大豆油繼續混勻，過篩兩次後分裝於雙層夾鏈袋中並儲存於 -20°C。在給予小鼠飼料前一天將飼料置於室溫回溫。

3.2 高蔗糖飼料

為避免山苦瓜之苦味對小鼠攝食量造成影響，本實驗採用以 AIN-93G 飼料為基礎，將醣類來源調整成 50% w/w 蔗糖之高蔗糖飼料 (High sucrose diet, HS diet)。實驗組之山苦瓜飼料 (5% BGP in HS diet) 為在高蔗糖飼料中添加 5% (w/w) 花蓮四號山苦瓜全果凍乾粉，並以苦瓜粉末組成成分 (醣類 54.6%；蛋白質 4.5%；脂質 2.7%；纖維素 38.2%) 進行調整，使營養成分組成與高蔗糖飼料相等。飼料成分、營養素組成及熱量百分比如表 2-2 所示。

表 2-1 市售 Chow diet 組成

Table 2-1 Composition of the commercial chow diet



Laboratory Rodent Diet

5001*

DESCRIPTION

Laboratory Rodent Diet is recommended for rats, mice, hamsters and gerbils. This diet is formulated using the unique and innovative concept of Constant Nutrition[®], paired with the selection of highest quality ingredients to assure minimal inherent biological variation in long-term studies. It is formulated for life-cycle nutrition; however, it is not designed for maximizing production in mouse breeding colonies. This product has been the standard of biomedical research for over 65 years.

Features and Benefits

- Constant Nutrition[®] formula helps minimize nutritional variables
- High quality animal protein added to create a superior balance of amino acids for optimum performance
- Formulated for multiple species for single product inventory
- The rodent diet standard for biomedical research

Product Forms Available

- Oval pellet, 10 mm x 16 mm x 25 mm length (3/8"x5/8"x1")
- Meal (ground pellets)

Other Versions Available

- 5010 Laboratory Autoclavable Rodent Diet
- 5L0D PicoLab Laboratory Rodent Diet (Minimum order required)

GUARANTEED ANALYSIS

Crude protein not less than	23.0%
Crude fat not less than	4.5%
Crude fiber not more than	6.0%
Ash not more than	8.0%

INGREDIENTS

Ground corn, dehulled soybean meal, dried beet pulp, fish meal, ground oats, brewers dried yeast, cane molasses, dehydrated alfalfa meal, dried whey, wheat germ, porcine animal fat preserved with BHA, porcine meat meal, wheat middlings, salt, calcium carbonate, DL-methionine, choline chloride, cholecalciferol, vitamin A acetate, folic acid, menadione dimethylpyrimidinol bisulfite (source of vitamin K), pyridoxine hydrochloride, biotin, thiamin mononitrate, nicotinic acid, calcium pantothenate, dl-alpha tocopheryl acetate, vitamin B₁₂ supplement, riboflavin, ferrous sulfate, manganous oxide, zinc oxide, ferrous carbonate, copper sulfate, zinc sulfate, calcium iodate, cobalt carbonate, sodium selenite.

FEEDING DIRECTIONS

Feed ad libitum to rodents. Plenty of fresh, clean water should be available to the animals at all times.

Rats- All rats will eat varying amounts of feed depending on their genetic origin. Larger strains will eat up to 30 grams per day. Smaller strains will eat up to 15 grams per day. Feeders in rat cages should be designed to hold two to three days supply of feed at one time.

Mice-Adult mice will eat up to 5 grams of pelleted ration daily. Some of the larger strains may eat as much as 8 grams per day per animal. Feed should be available on a free choice basis in wire feeders above the floor of the cage.

Hamsters-Adults will eat up to 14 grams per day.

CHEMICAL COMPOSITION¹

Nutrients ²			
Protein, %	23.9	Sulfur, %	0.36
Arginine, %	1.41	Sodium, %	0.40
Cystine, %	0.31	Chlorine, %	0.67
Glycine, %	1.21	Fluorine, ppm	16
Histidine, %	0.57	Iron, ppm	270
Isoleucine, %	1.14	Zinc, ppm	79
Leucine, %	1.83	Manganese, ppm	70
Lysine, %	1.41	Copper, ppm	13
Methionine, %	0.67	Cobalt, ppm	0.90
Phenylalanine, %	1.04	Iodine, ppm	1.0
Tyrosine, %	0.71	Chromium, ppm	1.2
Threonine, %	0.91	Selenium, ppm	0.30
Tryptophan, %	0.29		
Valine, %	1.17	Vitamins	
Serine, %	1.19	Carotene, ppm	2.3
Aspartic Acid, %	2.81	Vitamin K (as menadione), ppm	1.3
Glutamic Acid, %	4.37	Thiamin Hydrochloride, ppm	16
Alanine, %	1.43	Riboflavin, ppm	4.5
Proline, %	1.49	Niacin, ppm	120
Taurine, %	0.02	Pantothenic Acid, ppm	24
Fat (ether extract), %	5.0	Choline Chloride, ppm	2250
Fat (acid hydrolysis), %	5.7	Folic Acid, ppm	7.1
Cholesterol, ppm	200	Pyridoxine, ppm	6.0
Linoleic Acid, %	1.22	Biotin, ppm	0.30
Linolenic Acid, %	0.10	B ₁₂ , mcg/kg	50
Arachidonic Acid, %	<0.01	Vitamin A, IU/gm	15
Omega-3 Fatty Acids, %	0.19	Vitamin D ₃ (added), IU/gm	4.5
Total Saturated Fatty Acids, %	1.56	Vitamin E, IU/kg	42
Total Monounsaturated Fatty Acids, %	1.60	Ascorbic Acid, mg/gm	—
Fiber (Crude), %	5.1		
Neutral Detergent Fiber ³ , %	15.6	Calories provided by:	
Acid Detergent Fiber ⁴ , %	6.7	Protein, %	28.507
Nitrogen-Free Extract (by difference), %	48.7	Fat (ether extract), %	13.496
Starch, %	31.9	Carbohydrates, %	57.996
Glucose, %	0.22	*Product Code	
Fructose, %	0.30	1. Formulation based on calculated values from the latest ingredient analysis information. Since nutrient composition of natural ingredients varies and some nutrient loss will occur due to manufacturing processes, analysis will differ accordingly.	
Sucrose, %	3.70	2. Nutrients expressed as percent of ration except where otherwise indicated. Moisture content is assumed to be 10.0% for the purpose of calculations.	
Lactose, %	2.01	3. NDF = approximately cellulose, hemicellulose and lignin.	
Total Digestible Nutrients, %	76.0	4. ADF = approximately cellulose and lignin.	
Gross Energy, kcal/gm	4.07	5. Physiological Fuel Value (kcal/gm) = Sum of decimal fractions of protein, fat and carbohydrate (use Nitrogen Free Extract) x 4,9,4 kcal/gm respectively.	
Physiological Fuel Value⁵, kcal/gm	3.36		
Metabolizable Energy, kcal/gm	3.02		
Minerals			
Ash, %	7.0		
Calcium, %	0.95		
Phosphorus, %	0.66		
Phosphorus (non-phytate), %	0.39		
Potassium, %	1.18		
Magnesium, %	0.21		

04/05/12

LabDiet
www.labdiet.com

表 2-2 實驗飼料配方

Table 2-2 Composition of Test Diets

Ingredient of Diet ¹ (%)	AIN-93G	HS	5% BGP in HS
Corn starch	52.95	12.95	10.22
Sucrose	10	50	50
Casein	20	20	19.775
Soybean oil	7	7	6.865
Cellulose	5	5	3.09
AIN- 93G Mineral Mixture ²	3.5	3.5	3.5
AIN- 93 Vitamin Mixture ²	1	1	1
L-Cystine	0.3	0.3	0.3
Choline chloride	0.25	0.25	0.25
Hualien No.4 Bitter guard powder ³	-	-	5
kcal/g	3.96	3.96	3.96
CHO calorie/ total calories (%)	63.59	63.59	63.59
Protein calorie/ total calories (%)	20.51	20.51	20.51
Fat calorie/ total calories (%)	15.91	15.91	15.91

1. Ingredients (Sources): Corn starch (台榮, Taiwan); Sucrose (台糖, Taiwan); Casein (MP, New Zealand); Soybean oil (台糖, Taiwan); Cellulose (JRS, Germany); AIN-93G Mineral Mixture, (MP, New Zealand); AIN-93 Vitamin Mixture (MP, New Zealand); L-Cystine (Wako, Japan); Choline chloride (Sigma, USA)
2. The composition of AIN-93G Mineral Mixture and AIN-93 Vitamin Mixture are as described in J, Nur, 123:1939-1951 (1993) (Nielsen et al., 1993)
3. 5% BGP in HS diet is modified according to the proximate composition of the bitter gourd powder (54.6% carbohydrate, 4.5% protein, 2.7% fat, and 38.2% dietary fiber).



四、動物運動表現分析

此項目為運動表現測試，為避免小鼠因焦慮不適而影響量測結果，進行測試前均先將小鼠由飼養區移至實驗區適應實驗環境 30 分鐘，並由相同操作者固定於光照期中間時段（約下午兩點時）進行。

4.1 前肢抓力表現分析

以抓力分析儀 (grip strength meter, Muromachi, Japan) 測量小鼠前肢抓力，實驗方法參考 Bonetto et al. (2015) 建立之模式。抓力分析儀由透明壓克力板架、抓網與抓力測量儀組成。抓力測量方法為讓老鼠抓住抓網後，將小鼠以水平於地面方向向後拉，直至小鼠放開抓網，抓力測量儀會記錄小鼠之最大抓力值 (如圖 2-1 A 所示)。每一次的抓力分析實驗共進行 10~12 次抓力量測，每次量測間隔 5 秒鐘，每 5~6 次量測間休息 30 秒，將 10~12 次最大抓力值量測結果平均即為小鼠之前肢抓力表現。抓力測量期間觀察小鼠狀況，若小鼠出現縮手、舔手或拱背的情形 (如圖 2-1 B) 則暫停實驗，待小鼠狀況恢復時再接續實驗。

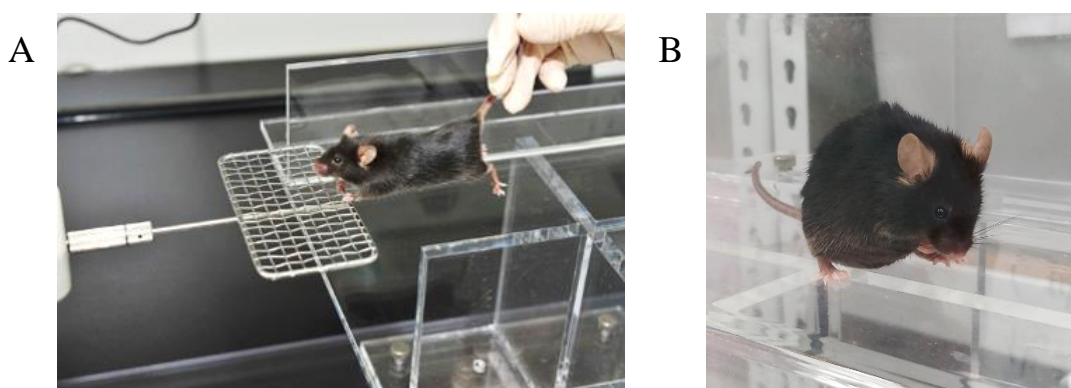


圖 2-1 小鼠進行前肢抓力表現分析時之代表照片 (TaiwanMouseClinic)

Figure 2-1 Representing photo while performing a forelimb grip test on mice

(A) Forelimb grip strength test of mouse grasping wire screen as it is being pulled by the tail horizontally relative to the force meter. The mouse is pulled steadily until it loses grip. The peak force is measured by the force meter. (B) Representing photo of mouse showing uncomfortable signs.

4.2 Inverted screen test

Inverted screen test 又稱四肢懸吊試驗 (four limb-hanging test)，使小鼠以對抗自身重量的方法倒吊於不鏽鋼格網上，以評估小鼠的肌肉力量 (Bonetto et al., 2015)。將 1 × 1 公分不鏽鋼格網架於離地 35 公分以上，以避免小鼠跳離格網，並將地上鋪滿擦手紙及墊料以防小鼠掉落時摔傷。實驗過程中將老鼠置於格網中間，確認其四肢皆抓於網格後緩慢翻轉格網 180°，使小鼠倒吊於格網上。記錄小鼠倒吊於格網上之時間以及懸吊於格網上時的後腳移動次數。每隻小鼠進行兩次試驗，兩次試驗間隔至少 30 分鐘。由於小鼠倒吊時間受其體重影響，因此我們將倒吊於格網上之時間對體重進行校正，結果以 holding impulse (gm × sec) 呈現。而於格網上的後腳次數則與倒吊於格網上之時間進行校正，計算單位時間內之後腳移動次數 (number of rear leg moves/latency to fall (sec))。

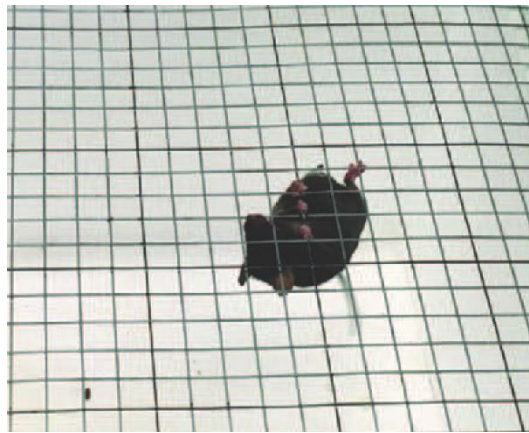


圖 2-2 小鼠進行 Inverted screen test 時之代表照片 (Bonetto et al., 2015)

Figure 2-2 Representing photo while performing an inverted screen test on mice

Four limb-hanging test of mouse grasping wire screen as it is inverted.



五、衰弱指數評估

參考 Whitehead et al. (2014) 建立之非侵入性且簡易的方法對於小鼠健康狀況進行評估。該法之評估項目共計 31 項，內容涵蓋體表、肌肉骨骼系統、前庭與聽覺系統、眼部和鼻部系統、消化系統、泌尿生殖系統、呼吸系統、不適、體重、以及體溫，詳細項目及評估方法如表 2-3、表 2-4 所示。評估方法為依據不正常或衰退的程度給予各項目 0、0.5、或 1 的給分 (1 分為最嚴重衰退)，並計算各項目加總分數佔全部評估項目的比例即為衰弱指數。

六、動物犧牲與取樣

小鼠於正式實驗第 26 週 (老年鼠 23 月齡；年輕鼠 9.5 月齡時) 犧牲。犧牲前 12 小時禁食以消除前一餐飲食帶來的影響。以二氧化碳窒息法進行犧牲。確定動物無疼痛反射後，秤取小鼠體重，並迅速以 1 ml 針筒進行心臟採血。將血液樣本置於冰上，之後以 4°C 12000 g 離心 20 分鐘，取上清液，重複離心取上清液步驟一次即得血清樣本，將血清樣本保存於 -80°C 待後續分析。

動物採血後以大剪剪開腹腔，取其肝臟、腎臟、白色脂肪組織 (副睪周圍脂肪組織、腎臟周圍脂肪組織、以及鼠蹊部皮下脂肪組織)、肩胛骨棕色脂肪組織、後肢大腿股四頭肌 (quadriceps)、後肢小腿肌包含腓腸肌 (gastrocnemius, GAS)、比目魚肌 (soleus)、脛骨前肌 (tibialis anterior, TA)、及趾伸長肌 (extensor digitorum longus, EDL)、前肢肱三頭肌 (Triceps)、提肛肌 (levator ani)、以及球狀海綿體肌 (bulbocavernosus) 秤重。腓腸肌、脛骨前肌、及肱三頭肌秤重後取單側浸泡於 30% sucrose/PBS 中，待後續進行冷凍切片。剩餘組織秤重後放入液態氮使其急速冷凍並保存於 -80°C。

其餘組織包含心臟、脾臟、肺臟、腎上腺、睪丸、副睪、前列腺、以及精囊僅取出秤重。

表 2-3 老齡 C57BL/6J 小鼠惡化的臨床症狀 (Whitehead et al., 2014)

Table 2-3 Clinical signs of deterioration in aging C57BL/6J mice

System and Parameter	Potential Deficits
Integument	
Alopecia	Hair loss due to age-related balding and/or barbering (fur trimming)
Loss of fur colour	Change in fur colour from black to grey or brown
Dermatitis	Inflammation, overgrooming, barbering or scratching causing skin erosion. Can result in open sores anywhere on the body
Loss of whiskers	Loss of vibrissae (whiskers) due to aging and/or whisker trimming
Coat condition	Ruffled fur and/or matted fur. Ungroomed appearance. Coat does not look smooth, sleek, and shiny
Physical/musculoskeletal	
Tumors	Development of tumors or masses anywhere on the body
Distended abdomen	Enlarged abdomen. May be due to tumor growth, organ enlargement, or intraperitoneal fluid accumulation
Kyphosis	Exaggerated outward curvature of the lower cervical/thoracic vertebral column. Hunched back or posture
Tail stiffening	Tail appears stiff, even when animal is moving in the cage. Tail does not wrap freely when stroked
Gait disorders	Lack of coordination in movement including hopping, wobbling, or uncoordinated gait. Wide stance. Circling or weakness
Tremor	Involuntary shaking at rest or during movement
Forelimb grip strength	A decline in forelimb grip strength
Body condition score	Visual signs of muscle wasting or obesity based on the amount of flesh covering bony protuberances
Vestibulocochlear/auditory	
Vestibular disturbance	Disruption in the ability to perceive motion and gravity. Reflected in problems with balance, orientation, and acceleration
Hearing loss	Failure to respond to sudden sound (eg, clicker) indicative of hearing loss or impairment
Ocular/nasal	
Cataracts	Clouding of the lens of the eye. An opaque spot in the center of the eye
Corneal opacity	Development of white spots on the cornea. Cloudy cornea
Eye discharge/swelling	Eyes are swollen or bulging (exophthalmia). They may exhibit abnormal secretions and/or crusting
Microphthalmia	Eyes are small and/or sunken. May involve one or both eyes
Vision loss	Vision loss, indicated by failure to reach toward the ground when lowered by the tail
Menace reflex	Rapid eye blink and closure of the palpebral fissure in response to a nontactile visual threat to the eye. Measures the integrity of the entire visual pathway including cortical components
Nasal discharge	Signs of abnormal discharge from the nares
Digestive/urogenital	
Malocclusions	Incisor teeth are uneven or overgrown. Top teeth grow back into the roof of the mouth or bottom teeth are long and easily seen
Rectal prolapse	Protrusion of the rectum just below the tail
Vaginal/uterine/penile prolapse	Vagina or uterus protrudes through the vagina and vulva. Penis cannot reenter the penile sheath.
Diarrhea	Feces on the walls of the home cage. Bedding adheres to feces in cage. Feces, blood, or bedding around the rectum
Respiratory	
Breathing rate/depth	Difficulty breathing (dyspnea), pulmonary congestion (rales), and/or rapid breathing (tachypnea)
Discomfort	
Mouse Grimace Scale	Measure of pain/discomfort based on facial expression. Assessment of five facial features: orbital tightening, nose bulge, cheek bulge, ear position (drawn back), or whisker change (either backward or forward)
Piloerection	Involuntary bristling of the fur due to sympathetic nervous system activation
Other	
Temperature	Increase or decrease in body temperature
Weight	Increase or decrease in body weight

表 2-4 計算衰弱指數所使用之臨床評估項目 (Whitehead et al., 2014)

Table 2-4 Clinical assessment of deficits to create a frailty index

<i>System/ Parameter</i>	<i>Clinical assessment of deficit</i>	<i>Scoring</i>
Integument		
Alopecia	Gently restrain the animal and inspect it for signs of fur loss.	0 = normal fur density 0.5 = < 25% fur loss 1 = >25% fur loss
Loss of fur colour	Note any change in fur colour from black to grey or brown.	0 = normal colour 0.5 = focal grey/brown changes 1 = grey/brown fur throughout body
Dermatitis	Document skin lesions.	0 = absent 0.5 = focal lesions (e.g. neck, flanks, under chin) 1 = widespread or multifocal lesions
Loss of whiskers	Inspect the animal for signs of a reduction in the number of whiskers.	0 = no loss 0.5 = reduced number of whiskers 1 = absence of whiskers
Coat condition	Inspect the animal for signs of poor grooming.	0 = smooth, sleek, shiny coat 0.5 = coat is slightly ruffled 1 = unkempt and un-groomed, matted appearance
Physical/ Musculoskeletal		
Tumours	Observe the mice to look for symmetry. Hold the base of the tail and manually examine mice for visible or palpable tumours.	0 = absent 0.5 = <1.0 cm 1 = >1.0 cm or multiple smaller tumours
Distended abdomen	Hold the mouse vertically by the base of their tail and tip backwards over your hand. Excess fluid visible as a bulge below the rib cage.	0 = absent 0.5 = slight bulge 1 = abdomen clearly distended
Kyphosis	Inspect the mouse for curvature of the spine or hunched posture. Run your fingers down both sides of the spine to detect abnormalities.	0 = absent 0.5 = mild curvature 1 = clear evidence of hunched posture
Tail stiffening	Grasp the base of the tail with one hand, and stroke the tail with a finger of the other hand. The tail should wrap freely around the finger when mouse is relaxed.	0 = no stiffening 0.5 = tail responsive but does not curl 1 = tail completely unresponsive
Gait disorders	Observe the freely moving animal to detect abnormalities such as hopping, wobbling, circling, wide stance and weakness.	0 = no abnormality 0.5 = abnormal gait but animal can still walk 1 = marked abnormality, impairs ability to move
Tremor	Observe the freely moving animal to detect tremor, both at rest and when the animal is trying to climb up an incline.	0 = no tremor 0.5 = slight tremor 1 = marked tremor; animal cannot climb
Forelimb grip Strength	Hold the mouse. Allow it to grip the bars on the cage lid. Lift animal by the base of the tail to assess grip strength.	0 = sustained grip 0.5 = reduction in grip strength 1 = no grip strength, no resistance
Body condition score	Place mouse on flat surface, hold tail base and manually assess the flesh/fat that covers the sacroiliac region (back and pubic bones).	0 = bones palpable, not prominent 0.5 = bones prominent or barely felt 1 = bones very prominent or not felt due to obesity
Vestibulocochlear/ Auditory		
Vestibular disturbance	Hold the base of the tail and lower mouse towards a flat surface. Inspect for head tilt, spinning, circling, head tuck or trunk curling.	0 = absent 0.5 = mild head tilt and/or slight spin when lowered 1 = severe disequilibrium
Hearing loss	Test startle reflex. Hold a clicker ~10 cm from mouse, sound it 3 times and record responses.	0 = always reacts (3/3 times) 0.5 = reacts 1/3 or 2/3 times 1 = unresponsive (0/3 times)
Cataracts	Visual inspection of the mouse to detect opacity in the centre of the eye.	0 = no cataract 0.5 = small opaque spot 1 = clear evidence of opaque lens
Eye discharge/swelling	Visual inspection of the mouse to detect ocular discharge and swelling of the eyes.	0 = normal 0.5 = slight swelling and/or secretions 1 = obvious bulging and/or secretions
Microphthalmia	Inspect eyes.	0 = normal size 0.5 = one or both eyes slightly small or sunken 1 = one or both eyes very small or sunken

第二章 實驗設計與材料方法

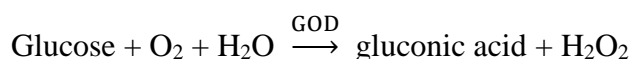
Corneal opacity	Visual inspection of the mouse to superficial white spots and/or clouding of the cornea.	0 = normal 0.5 = minimal changes in cornea 1 = marked clouding and/or spotting of cornea
Vision loss	Lower mouse towards a flat surface. Evaluate the height at which the mouse reaches towards the surface.	0 = reaches >8 cm above surface 0.5 = reaches 2-8 cm above surface 1 = reaches <2 cm above surface
Menace reflex	Move an object towards the mouse's face 3 times. Record whether the mouse blinks in response	0 = always responds 0.5 = no response to 1 or 2 approaches 1 = no response to 3 approaches
Nasal discharge	Visual inspection of the mouse to detect nasal discharge.	0 = no discharge 0.5 = small amount of discharge 1 = obvious discharge, both nares
Digestive/ Urogenital		
Malocclusions	Grasp the mouse by the neck scruff, invert and expose teeth. Look for uneven, overgrown teeth.	0 = mandibular longer than maxillary incisors 0.5 = teeth slightly uneven 1 = teeth very uneven and overgrown
Rectal prolapse	Grasp the mouse by the base of the tail to detect signs of rectal prolapse.	0 = no prolapse 0.5 = small amount of rectum visible below tail 1 = rectum clearly visible below tail.
Vaginal/uterine/ penile prolapse	Grasp the mouse by the base of the tail to detect signs of vaginal/uterine or penile prolapse.	0 = no prolapsed 0.5 = small amount of prolapsed tissue visible 1 = prolapsed tissue clearly visible
Diarrhoea	Grasp the mouse and invert it to check for signs of diarrhoea. Also look for fecal smearing in home cage.	0 = none 0.5 = some feces or bedding near rectum 1 = feces plus blood and bedding near rectum, home cage smearing
Respiratory		
Breathing rate/depth	Observe the animal. Note the rate and depth of breathing as well as any gasping behaviour.	0 = normal 0.5 = modest change in breathing rate and/or depth 1 = marked changes in rate/depth, gasping
Discomfort		
Mouse Grimace Scale	Note facial signs of discomfort: 1) orbital tightening, 2) nose bulge, 3) cheek bulge, 4) ear position (drawn back) or 5) whisker change (either backward or forward).	0 = no signs present 0.5 = 1 or 2 signs present 1 = 3 or more signs present
Piloerection	Observe the animal and look for signs of piloerection, in particular on the back of the neck.	0 = no piloerection 0.5 = involves fur at base of neck only 1 = widespread piloerection
Other		
Temperature	Measure surface body temperature with an infrared thermometer directed at the abdomen (average of 3 measures). Compare with reference values from sex-matched adult animals.	0 = differs by <1 SD from reference value 0.25 = differs by 1 SD 0.5 = differs by 2 SD 0.75 = differs by 3 SD 1 = differs by >3 SD
Weight	Weigh the mouse. Compare with reference values from sex-matched adult animals.	0 = differs by <1 SD from reference value 0.25 = differs by 1 SD 0.5 = differs by 2 SD 0.75 = differs by 3 SD 1 = differs by >3 SD



七、血液生化指標分析

7.1 血糖分析

使用市售試劑套組 (Randox GL2623, UK) 進行血糖測定，測定原理如下：藉由葡萄糖氧化酵素 (glucose oxidase, GOD) 氧化葡萄糖並產生過氧化氫 (H_2O_2)，再藉由過氧化氫酶 (peroxidase, POD) 催化 H_2O_2 產生紫紅色 quinoneimine。

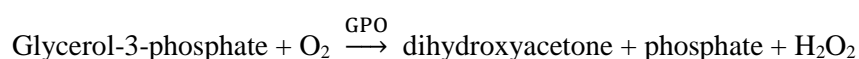
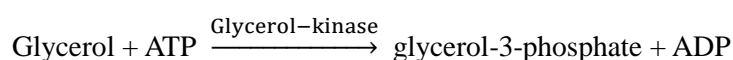
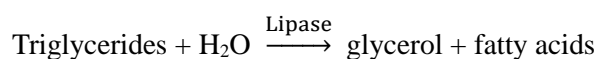


實驗方法：將血清樣本以一次水稀釋八倍，並將試劑套組提供之葡萄糖標準液 (100 mg/dL) 以一次水序列稀釋成 50、25、12.5、6.25 mg/dL 之葡萄糖液。取 10 μl 稀釋後之血清樣品、葡萄糖液、及作為空白組之一次水加入 96 孔盤中 (二重複試驗)，再加入 100 μl 反應試劑，反應 10 分鐘後測量 490 nm 吸光值。將標準品之吸光值做成標準曲線，帶入樣品吸光值即可推算樣品中葡萄糖濃度。

7.2 血脂分析

7.2.1 血清三酸甘油酯分析

使用市售試劑套組 (Randox TR213, UK) 進行血清三酸甘油酯測定，測定原理如下：反應試劑中 lipase 將三酸甘油酯分解成甘油及脂肪酸，再藉由 glycerol kinase (GK) 將甘油磷酸化成 glycerol-3-phosphate，而後經 glycerol-3-phosphate oxidase (GPO) 氧化生成過氧化氫 (H_2O_2)，再藉由過氧化氫酶 (peroxidase, POD) 催化 H_2O_2 產生紫紅色 quinoneimine。

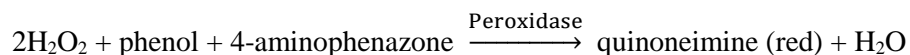
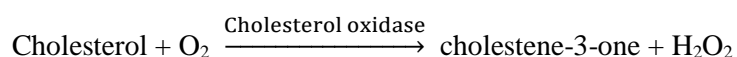
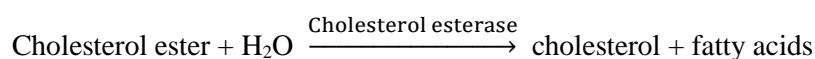




實驗方法：將血清樣本以一次水稀釋四倍，並將試劑套組提供之三酸甘油酯標準液 (200 mg/dL) 以一次水序列稀釋成 100、50、25、12.5 mg/dL 之三酸甘油酯液。此外，將試劑套組中之 buffer 1 與 enzyme reagent 2 混合均勻，配製成反應試劑。取 10 μl 稀釋後之血清樣品、標準液、及作為空白組之一次水加入 96 孔盤中 (二重複試驗)，再加入 100 μl 反應試劑，反應 10 分鐘後測量 490 nm 吸光值，並以標準曲線推算樣品中三酸甘油酯濃度。

7.2.2 血清總膽固醇分析

採用市售試劑套組 (Randox CH7945, UK) 進行血清總膽固醇測定，測定原理如下：血清中膽固醇主要以酯化膽固醇 (cholesterol esters) 及游離膽固醇 (free cholesterol) 兩種形式存在。藉由反應試劑中 cholesterol esterase 將酯化膽固醇水解成游離膽固醇，再經由膽固醇氧化酶 (cholesterol oxidase, CO) 氧化形成過氧化氫 (H_2O_2)，而後透過過氧化氫酶 (Peroxidase) 催化形成紫紅色 quinonimine。



實驗方法：將血清樣本以一次水稀釋四倍，並將試劑套組提供之膽固醇標準液 (200 mg/dL) 以一次水序列稀釋成 100、50、25、12.5 mg/dL 之膽固醇液。取 10 μl 稀釋後之血清樣品、標準液、及作為空白組之一次水加入 96 孔盤中 (二重複試驗)，再加入 100 μl 反應試劑，反應 10 分鐘後測量 490 nm 吸光值，並以標準曲線推算樣品中總膽固醇濃度。

八、肌肉組織冷凍切片染色分析

本實驗於國立臺灣大學醫學院解剖學暨細胞生物學研究所龔秀妮老師實驗室進行。



8.1 樣品前處理與包埋

將浸泡於 30% sucrose/PBS 中之單側腓腸肌、脛骨前肌、及肱三頭肌放置於 4°C 冷房中搖晃三天，每天更換一次 30% sucrose/PBS 以確保組織內水分被置換。三天後將組織以 Tissue-Tek[®] O.C.T. Compound (Sakura[®] Finetek, Cat. No. 25608-930, USA) 於乾冰預冷之 2-methylbutane (Sigma, M32631, USA) 中進行冷凍包埋，包埋完成之組織樣品保存於 -80°C。為確保日後冷凍切片時肌肉方向為橫切，肌肉組織先以肌束水平於地面的方向進行包埋。其次，再以轉 90° 使肌束垂直於地面的方向進行第二次包埋。包埋時以針頭去除 OCT 內之氣泡以利日後切片。

8.2 冷凍切片

冷凍切片機 (Leica Microsystems, CM3050S, Germany) 操作溫度設定為 -23 至 -25°C，切片厚度設定為 8 μl。將切片樣本黏貼於 poly-L-lysine coated 之載玻片 (Sigma, P0425-72EA, USA)，於顯微鏡下確認切片方向為橫切 (垂直於肌束方向) 後保存於 -20°C，並於 1 個月內進行琥珀酸脫氫酶染色以確保酵素活性。

8.3 蘇木精-伊紅染色與肌纖維截面積定量分析

蘇木精 (hematoxylin) 染液為鹼性，會使細胞核內的染色質與細胞質內的核醣體染上藍紫色；伊紅 (eosin) 為酸性染料，會使細胞質及胞外基質染上紅色。蘇木精-伊紅 (Hematoxylin and Eosin, H&E) 染色被廣泛用來進行組織型態的觀察，我們使用的染色方法如下：



1. 室溫浸泡 4% PFA 固定隔夜，浸泡 PBS 約 5 分鐘
2. Hematoxylin solution 染 90 秒並浸泡二次水 5 分鐘
3. 快速過三下酸酒精並浸泡二次水 5 分鐘
4. Eosin solution 染 30 秒並以二次水洗去多餘染劑
5. 以 70%、80%、95%、100% 酒精脫水 (每濃度依序快速過三下)
6. 100% 酒精脫水 3 分鐘兩次
7. 浸泡 Xylene 3 分鐘兩次
8. 以油性封片膠 (Leica) 封片並將切片常溫保存

切片以光學顯微鏡 (Leica DM1000LED) 進行拍照，每片組織切片在 200X 視野下取至少 3 個視野進行拍照。以 ImageJ 軟體手動沿著肌纖維外圍隨機圈選 250 個肌纖維，並分析在 0~6000 μm 之間的肌纖維橫截面積大小分布。求取五組小鼠之肌纖維橫截面積平均值，計算各組大於此平均值之肌纖維面積比例及平均肌纖維截面積進行定量。

8.4 琥珀酸脫氫酶染色與定量分析

每隻小鼠取一至兩片切片進行琥珀酸脫氫酶 (succinate dehydrogenase, SDH) 染色分析。切片於室溫浸泡 PBS 10 分鐘去除 O.C.T. Compound 並風乾 5 分鐘，之後避光浸泡新鮮配置之 SDH working solution (配方如下) 反應 15 分鐘。反應完成後移除 SDH working solution 並以去離子水終止反應，待避光風乾後以油性封片膠 (Leica) 封片並將切片保存於 -20°C 。

切片於封片後 1 個月內以光學顯微鏡 (Leica DM1000LED) 拍照，每片組織切片在 200X 視野下取約 5~15 個視野進行拍照，並以 ImageJ (NIH, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) 之 Histogram analysis 分析視野下所有肌纖維之 SDH 活性強度分佈情形。

進行 Histogram analysis 分析時，先將切片轉為灰階後依明暗強度分為 0~255 個由黑到白的色階，並顯示各色階在切片中所佔的像素 (pixel) 值。為降

低背景值對各色階所佔比例的影響，我們將 250~255 色階視為背景值。去除像素背景值後，將單隻小鼠之所有照片像素加總並計算各色階的分佈比例。各色階的分佈比例即反映了組織中不同 SDH 酵素活性肌纖維之比例。

另定義 SDH 強度分佈前 50% 為高 SDH 強度，並計算各組高 SDH 強度的比例來進行定量比較。

■ SDH working solution 配方所需材料：

- (1) 1-methosyngenzine methosulphate (mPMS, Sigma M8640)
- (2) Nitroblue tetrazolium (NBT, Sigma N6876)
- (3) Disodium succinate stock (0.24M)

將 3.24 g disodium succinate (Sigma W327700) 加入二次水定容至 50 mL。配置完成之 Disodium succinate stock 可於 -20°C 保存約一年。

- (4) Azide/EDTA/PO4 buffer stock

Component	Amount	Final Concentration
Sodium azide	12.2 mg	7.5 mM
Disodium EDTA	465.3 mg	5.5 mM
NaH ₂ PO ₄	389.8 mg	13 mM
Na ₂ HPO ₄	4.65 g	0.13 M

將以上配方以約 50 mL 二次水溶解後調整 pH 值至 7.6 後，再以二次水定容至 100 mL。配置完成之 buffer stock 可於 -20°C 保存約一年。

■ SDH working solution 配方

Component	Amount	Final Concentration
mPMS	8.4 mg	1 mM
NBT	30.7 mg	1.5 mM
0.24M disodium succinate stock	5 ml	-
Azide/EDTA/PO4 Buffer stock	10 ml	-
ddH ₂ O	10 ml	-
Total volume	25 ml	



九、mRNA 表現分析

9.1 組織總 RNA 抽取

使用 Direct-zol™ RNA MiniPrep 套組 (Zymo research, USA) 進行組織總 RNA 抽取。未註明之離心條件皆為 4°C 12000 × g 離心 1 分鐘。

取約 0.05 g 組織放入已滅菌的均質管中，加入 750 µl TRIzol® Reagent (Invitrogen 15596018, USA)，以組織均質機均質 6~10 次 (20 秒/次)。離心後取上清液至新的滅菌離心管中，加入等體積絕對酒精與上清液震盪混合。將混合液移至套組所附之 spin column 內，離心後倒除蒐集管中廢液，將 spin column 移至新的蒐集管上。加入 400 µl Direct-zol™ RNA PreWash，離心倒除蒐集管中廢液並重複此步驟一次。而後加入 700 µl RNA Wash Buffer，離心倒廢液後，再離心 4°C 12000 × g 2 分鐘以確保 RNA Wash Buffer 完全清除。將 spin column 放入滅菌過的微量離心管中，加入 50 µl DNase/RNase Free Water，離心將 RNA 流洗至微量離心管中，即可得純化後的總 RNA 溶液。

純化後的總 RNA 溶液以超微量分光光度計 (Thermo scientific, NanoDrop-2000, USA) 測量 A_{230} 、 A_{260} 、以及 A_{280} 吸光值。以 $A_{260} \times 40 \times$ 稀釋倍數計算 RNA 濃度 (ng/µl) 並以 A_{260}/A_{280} 及 A_{260}/A_{230} 來評估 RNA 品質，兩比值皆大於 1.8 則為品質佳的純化 RNA。

純化 RNA 樣品立即進行反轉錄或保存於 -80°C。

9.2 總 RNA 反轉錄為 cDNA

使用反轉錄試劑套組 High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Cat. No. 4368813, USA) 將 RNA 反轉錄為 cDNA，過程如下：將純化後的 RNA 樣品以 DNase/RNase Free Water 稀釋成 0.2 µg/µl，取 10 µl 稀釋後的 RNA 樣品溶液加入 10 µl 2× RT Master Mix (內含 2 µl 10× RT Buffer、0.8 µl 25× dNTP Mix (100 mM)、2 µl 10× RT Random Primers、1 µl MultiScribe™

Reverse Transcriptase、4.2 μl DNase/RNase Free Water) 中進行反轉錄反應，上機條件為 25°C 10 分鐘，37°C 120 分鐘，85°C 5 分鐘，最後維持在 4°C。反轉錄完成的 cDNA 樣品理論濃度為 100 ng/ μl ，將其保存於 -80°C，以待日後分析使用。

9.3 定量即時聚合酶鏈鎖反應 (Quantitative real-time PCR)

將 cDNA 樣品以滅菌過的二次水稀釋成 1 ng/ μl 。取 10 μl 稀釋後之 cDNA (1 ng/ μl) 加入 12.5 μl 2 \times Taqman[®] Universal Master Mix II (Applied Biosystems, Cat. No. 4440038, USA)、1.25 μl 20 \times Probe/Primer Mixture、及 1.25 μl 滅菌二次水，總體積為 25 μl 。將樣品加入 Multiplate[®] PCR Plate (Bio-Rad, Cat. No. MLL9601, UK)，短暫離心去除氣泡後便可上機進行 mRNA 定量分析。使用 CFX Connect[™] Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, 1855200, USA) 進行即時定量，上機條件為 50°C 2 分鐘，95°C 10 分鐘，95°C 15 秒鐘，60°C 1 分鐘，其中 95°C 15 秒鐘及 60°C 1 分鐘重複 40 個循環。

本研究所有 Probe/Primer AssayMix ID (Applied Biosystems, USA) 如表 2-5 所示。肌肉組織、副睪周圍白色脂肪組織，以及腎臟以 *Gapdh* 作為內部控制 (internal control)。肝臟組織以 *Actb* 作為內部控制 (internal control)。

數據計算方法為：

$$\Delta\text{CT} = \text{Ct value of target gene} - \text{Ct value of internal control}$$

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT of each sample} - \text{average } \Delta\text{CT of control group}$$

$$\text{Fold of change} = 2^{(-\Delta\Delta\text{CT})}$$

表 2-5 本研究 qPCR 分析使用引子整理表

Table 2-5 Taqman® Primers ID used in the qPCR in this study

Gene symbol	Gene name	TaqMan Assay ID
Mitochondrial biogenesis, morphology, and function		
<i>Pgc1a</i>	peroxisome proliferator activated receptor, gamma, coactivator 1 α	Mm01208835_m1
<i>Nrf1</i>	nuclear respiratory factor 1	Mm01135606_m1
<i>Tfam</i>	transcription factor A, mitochondrial	Mm00447485_m1
<i>Fis1</i>	fission 1 (mitochondrial outer membrane) homolog (yeast)	Mm00481580_m1
<i>Mfn1</i>	mitofusin 1	Mm00612599_m1
<i>Mfn2</i>	mitofusin 2	Mm00500120_m1
<i>Opa1</i>	optic atrophy 1	Mm01349707_g1
<i>Ucp2</i>	uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)	Mm00627599_m1
<i>Ucp3</i>	uncoupling protein 3 (mitochondrial, proton carrier)	Mm00494077_m1
<i>Cox7a1</i>	cytochrome c oxidase subunit VIIa 1	Mm00438296_m1
<i>Cox8b</i>	cytochrome c oxidase subunit VIIIb	Mm00432648_m1
Fiber type		
<i>Tnni</i>	troponin I, skeletal, slow1	Mm00502426_m1
<i>Myh7</i>	myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta, MyHC-I	Mm00600555_m1
<i>Myh2</i>	myosin, heavy polypeptide 2, skeletal muscle, MyHC-IIa	Mm01332564_m1
<i>Myh1</i>	myosin, heavy polypeptide 1, skeletal muscle, MyHC-Iix/d	Mm01332489_m1
<i>Myh4</i>	myosin, heavy polypeptide 4, skeletal muscle, MyHC-IIb	Mm01332541_m1
<i>Pparδ</i>	peroxisome proliferator activated receptors δ	Mm00803184_m1

Myogenesis and atrophy		
<i>Igf1</i>	insulin like growth factor 1	Mm00439560_m1
<i>Igf1r</i>	insulin like growth factor 1 receptor	Mm00802831_m1
<i>Fbxo32</i>	MAFbx/Atrogin-1	Mm00499523_m1
<i>Trim63</i>	MurF1	Mm01185221_m1
<i>Sirt1</i>	sirtuin 1	Mm00490758_m1
Senescence		
<i>Cdkn2a</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	Mm00494449_m1
<i>Cdkn1a</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	Mm00432448_m1
<i>Serpine1</i>	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1	Mm00435860_m1
<i>Mmp12</i>	matrix metalloproteinase 12	Mm00500554_m1
<i>Cxcl2</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	Mm00436450_m1
<i>Ccl2</i>	chemokine (C-C motif) ligand 2; monocyte chemoattractant protein 1	Mm00441242_m1
<i>Il6</i>	Interleukin 6	Mm00446190_m1
Internal control		
<i>GAPDH</i>	glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase	Mm99999915_g1
<i>Actb</i>	actin, beta	Mm00607939_s1

十、統計分析

數據以平均值 \pm 標準差 (mean \pm SD) 表示。以 IBM SPSS Statistics Version 22 軟體進行統計分析， $p < 0.05$ 視為具有顯著差異。所有數據皆先進行常態檢定，若數據不符合常態分布，則將數據進行倒數、平方、開根號、取對數等轉換後進行分析。若各種轉換皆無法使數據符合常態分佈，則以無母數檢定進行分析。符合常態分佈之數據以單因子變異數分析 (one-way ANOVA analysis) 搭配 Duncan's multiple range test 事後檢定比較各組差異、以 Student's t-test 檢定比較 AH 組與 AHB 兩組間差異；YN、YH、AN 及 AH 組之數據以雙因子變異數分析 (two-way ANOVA analysis) 評估年齡及飲食之影響。各組間存活率比較以 Log-rank (Mantel-Cox) test 進行分析。



第三章 實驗結果

第一節 飼養期間小鼠存活率

從存活曲線圖 (圖 3-1) 可以看出老齡鼠於 18.5 月齡開始出現死亡情形。

AN 組及 AH 組於實驗期間皆有 3 隻小鼠自然老化死亡，存活率為 73%；AHB 組於實驗期間有 2 隻小鼠自然老化死亡，存活率約為 83%；年輕鼠 (YN、YH) 於實驗期間皆存活。整體而言，本實驗老齡鼠於 23.5 月齡時存活率為 76%。後續實驗中我們僅保留存活小鼠之實驗數據進行分析探討。



第二節 運動表現及衰弱程度分析

一、運動表現

於正式實驗前兩週 (-2 週) 與實驗第 8, 18, 24 週分析小鼠前肢抓力表現，各時間點之各組小鼠前肢抓力表現皆未達顯著差異 ($p > 0.05$) (圖 3-2 A)。Inverted screen test (四肢懸吊試驗) 於實驗第 12 及 22 週時進行，高齡顯著降低小鼠於網上懸吊時間、Holding impulse、及單位時間內後腳移動次數 ($p < 0.05$) (圖 3-2 B-D)。5% BGP 山苦瓜補充未顯著影響第 12 週時之網上懸吊時間及 Holding impulse ($p > 0.05$)，但使單位時間內後腳移動次數上升至與年輕組小鼠無顯著差異 ($p > 0.05$)。而第 22 週時 5% BGP 苦瓜補充小鼠之網上懸吊時間與 Holding impulse 上升至與年輕組小鼠無顯著差異 ($p > 0.05$)。第 22 週之單位時間內後腳移動次數則於各組之間無顯著差異 ($p > 0.05$)。

二、衰弱程度分析

於第 22 週以衰弱指數評估小鼠整體生理狀況。結果顯示：高齡顯著提升小鼠衰弱指數 ($p < 0.05$)，表示老齡確實降低小鼠整體生理狀況；高蔗糖飼料則趨勢性增加小鼠衰弱指數 ($p = 0.071$)。AHB 組小鼠之衰弱指數與 AH 組無顯著差異 ($p > 0.05$) (圖 3-3)。



第三節 生長情形及血清生化指標

一、飼養期間體重變化、攝食量、熱量攝取、及攝食/能量利用率

1.1 體重變化

飼養期間小鼠體重變化如圖 3-4。實驗起始時，老年鼠及年輕鼠依小鼠前肢-2 週之抓力表現與體重隨機分為老年三組與年輕兩組。分組時老年三組體重約為 38.8 g，年輕兩組體重皆為 24.7 g，老年三組與年輕兩組間體重皆無統計差異 ($p > 0.05$)。分組後，AHB 組進行苦味適應一週，於老齡鼠 16.5 月齡與年輕鼠 3.0 月齡時開始餵食實驗飼料 (實驗第 0 週)。

以 two-way ANOVA 分析除 AHB 外四組小鼠發現，整個正式實驗期間，年齡因子皆顯著影響小鼠體重 ($p < 0.05$)，老齡鼠體重顯著高於年輕鼠。而除 AHB 組外老齡兩組 (AN/AH) 間與年輕兩組 (YN/YH) 間體重皆無統計差異 ($p > 0.05$)。實驗第 23 週後，YH 組體重與 AH 組無顯著差異 ($p > 0.05$)。

AHB 組體重於苦味適應一週後至正式實驗第 5 週顯著低於老年其餘兩組 ($p < 0.05$)。實驗第 6~16 週時，AHB 組體重回復至與 AH 組無統計差異 ($p > 0.05$)；而第 17 週至實驗結束 (第 26 週) 時，AHB 組體重顯著低於 AH 組 ($p < 0.05$) 而與年輕兩組 (YN、YH 組) 無顯著差異 ($p > 0.05$)。

1.2 攝食量、攝食效率、能量攝取與能量效率

餵食苦瓜組 (AHB 組) 小鼠於苦味適應期間至正式實驗第 2 週之攝食量與能量效率皆顯著低於 AH 組 ($p < 0.05$) (圖 3-5)。而 AHB 組小鼠能量效率於第 3 週回復至與 AH 組小鼠無顯著差異 ($p > 0.05$) 後，於第 4~8 週顯著高於 AH 組小鼠 ($p < 0.05$)。而 AHB 組小鼠攝食量於第 8~13 週又顯著低於 AH 組 ($p < 0.05$)。

觀察整個實驗期間小鼠平均攝食量、攝食效率、能量攝取與能量效率 (表 3-2)，年齡因子對於各項目則有顯著影響，老齡小鼠在攝食量與能量攝取方面顯著高於年輕小鼠，而在攝食效率與能量效率方面則顯著低於年輕小鼠 ($p < 0.05$)；飼料因子對於各項目之影響皆未達顯著 ($p > 0.05$)。AHB 組小鼠與 AH 組小鼠在各項目上皆無顯著差異 ($p > 0.05$)。

二、犧牲時體重與組織器官重量

2.1 組織器官絕對重量

餵食實驗飼料 26 週後，小鼠禁食 12 小時後進行犧牲，秤取犧牲時體重並取出各組織與器官進行秤重。年齡對小鼠犧牲體重有顯著影響 ($p < 0.05$)，老齡鼠之犧牲體重顯著高於年輕鼠，而 AHB 組小鼠之犧牲體重顯著低於其餘老齡兩組 ($p < 0.05$)，並與年輕組小鼠無顯著差異 ($p > 0.05$) (表 3-3)。組織器官絕對重量方面，年齡因子對於心臟、肝臟、脾臟、肺臟、腎臟、及腎上腺皆有顯著影響 ($p < 0.05$)，老齡小鼠之組織器官重量大於年輕小鼠。肝臟絕對重量也受飼料因子顯著影響，高蔗糖飼料顯著增加肝臟絕對重量。老齡小鼠於高蔗糖飼料中補充 5% BGP 能降低受年齡及飼料因子影響而增加的肝臟絕對重量與受年齡因子影響增加的腎臟絕對重量。

生殖組織器官中，老齡小鼠有顯著較大之前列腺及精囊絕對重量 ($p < 0.05$)，而苦瓜補充能顯著降低精囊絕對重量 ($p < 0.05$)，並降低前列腺重量至與年輕小鼠相同水平 (表 3-4)。脂肪組織絕對重量方面，高齡及高蔗糖飼料皆無顯著影響，但 AHB 組有顯著低於其餘四組之 RWAT、IWAT、及 BAT 絕對重量 ($p < 0.05$)。

肌肉組織方面，受雄激素影響之 BC 及 LA 之絕對重量在各組間無顯著差異 ($p > 0.05$) (表 3-5)。老齡小鼠有顯著較低之股四頭肌與腓腸肌絕對重量 ($p < 0.05$)，而餵食 HS 飼料的組別有趨勢性較餵食 AIN-93G 飼料的組別低之腓腸肌與脛骨前肌絕對重量 ($p = 0.051$; $p = 0.058$)。AHB 組之股四頭肌絕對重量顯著低於 AH 組 ($p < 0.05$)。

2.2 組織器官相對重量

以犧牲時體重將各組織器官重量換算為相對重量，結果如表 3-6~表 3-8 所示。

高齡及高蔗糖飼料皆顯著增加肝臟相對重量，且兩因子間有交互作用 ($p < 0.05$)，高齡狀況下餵食高蔗糖飼料會有較年輕時劇烈的肝臟相對重量增加。苦瓜補充可降低肝臟相對重量至與年輕兩組無顯著差異 ($p > 0.05$) (表 3-6)。AHB 組之脾臟與肺臟相對重量顯著高於其餘四組 ($p < 0.05$)。

生殖組織器官方面，老齡小鼠之睪丸相對重量顯著低於年輕小鼠 ($p < 0.05$)，而前列腺及精囊相對重量顯著高於年輕小鼠 ($p < 0.05$) (表 3-7)。苦瓜補充可提升睪丸相對重量 ($p < 0.05$)，並趨勢性降低前列腺相對重量 ($p = 0.08$) 至與年輕兩組無顯著差異 ($p > 0.05$)。脂肪組織方面，AHB 組之 BAT 相對重量顯著低於其餘四組 ($p < 0.05$)，其餘四組間則無顯著差異 ($p > 0.05$)。

肌肉組織方面，高齡小鼠有顯著低於年輕小鼠之 BC、股四頭肌、肱三頭肌、腓腸肌、比目魚肌、與脛骨前肌相對重量 ($p < 0.05$)。而餵食高蔗糖飼料組有顯著低於餵食 AIN-93G 飼料組之 BC、腓腸肌、及脛骨前肌相對重量 ($p < 0.05$) (表 3-8)。苦瓜補充可提升 BC 相對重量至與年輕小鼠無顯著差異 ($p > 0.05$)，亦可顯著提升腓腸肌、比目魚肌、脛骨前肌、與趾伸長肌之相對重量 ($p < 0.05$)。

三、禁食血清生化指標

餵食實驗飼料 26 週後，小鼠禁食 12 小時，以二氧化碳犧牲並進行心臟採血，取其血清樣本進行血清生化指標（血糖及血脂）分析。結果顯示，高齡顯著降低小鼠之禁食血糖及禁食血清三酸甘油酯濃度 ($p < 0.05$)；高蔗糖飼料則顯著降低禁食血清三酸甘油酯濃度，並提升禁食血清總膽固醇濃度 ($p < 0.05$) (圖 3-6)。苦瓜補充顯著降低禁食血清總膽固醇濃度，且其禁食血清總膽固醇濃度顯著低於其餘四組 ($p < 0.05$)。





第四節 肌纖維橫截面積大小及粒線體活性分析

一、肌纖維橫截面積大小

將肌肉組織冷凍切片進行蘇木精-伊紅染色以觀察肌纖維橫截面積大小分佈，結果如圖 3-7 所示。

高齡顯著降低前肢肱三頭肌、後肢腓腸肌，以及脛骨前肌橫截面積大之肌纖維比例以及平均肌纖維橫截面積 ($p < 0.05$)。高蔗糖飼料對於脛骨前肌之橫截面積大之肌纖維比例以及平均肌纖維橫截面積在不同年齡小鼠間有不同的影響：年輕鼠餵食高糖可增加其脛骨前肌肌纖維橫截面肌大小，老齡鼠餵食高糖卻有較小的肌纖維橫截面積。苦瓜處理組小鼠 (AHB 組) 之橫截面積大之肌纖維比例較 AH 組高 ($p < 0.05$)。

二、肌肉組織切片琥珀酸脫氫酶活性分析

將肌肉組織冷凍切片並進行琥珀酸脫氫酶酵素活性分析，以評估肌肉中粒線體酵素氧化能力，結果如圖 3-8 所示。

高齡顯著降低前肢肱三頭肌及後肢腓腸肌之高琥珀酸脫氫酶活性肌纖維比例 ($p < 0.05$)；高蔗糖飼料則僅顯著降低腓腸肌之高琥珀酸脫氫酶活性肌纖維比例 ($p < 0.05$)。苦瓜補充可回升受高齡及高蔗糖飼料影響而降低的腓腸肌高琥珀酸脫氫酶活性肌纖維比例 ($p < 0.05$)。



第五節 基因 mRNA 表現分析

一、粒線體相關基因

餵食小鼠實驗飼料 26 週後進行犧牲，取其肌肉組織包含屬於混合肌之腓腸肌、屬於紅肌之比目魚肌，以及屬於白肌之趾伸長肌進行粒線體相關基因表現分析，分析的基因如下：

- (1) 粒線體生合成：*Pgcl1*、*Nrf1*、*Tfam*
- (2) 粒線體分裂及融合：*Fis1*、*Mfn1*、*Mfn2*、*Opal*
- (3) 去耦合作用：*Ucp2*、*Ucp3*
- (4) 氧化磷酸化相關酵素：*Cox7a1*、*Cox8b*

粒線體生合成相關基因方面，腓腸肌之 *Pgcl1* mRNA 基因表現受年齡因子及飼料因子的交互作用影響 ($p < 0.05$)，高齡顯著上調 AIN-93G 餵食組之 *Pgcl1* mRNA 基因表現；餵食高蔗糖飼料組則未看到年齡之影響。高齡顯著下調趾伸長肌 *Tfam* mRNA 基因表現 ($p < 0.05$)。山苦瓜補充顯著上調腓腸肌 *Pgcl1* mRNA 基因表現以及比目魚肌中 *Nrf1* 基因表現 ($p < 0.05$)。(圖 3-9、圖 3-10、圖 3-11)

粒線體分裂及融合方面，高蔗糖飼料顯著上調腓腸肌粒線體分裂基因 *Fis1* mRNA 基因表現 ($p < 0.05$)。比目魚肌中則觀察到粒線體外膜融合基因 *Mfn1* mRNA 基因表現受年齡因子及飼料因子的交互作用影響 ($p < 0.05$)，高蔗糖飼料顯著上調年輕鼠之 *Mfn1* mRNA 基因表現；於老齡鼠中卻有相反的情形。而趾伸長肌中，粒線體融合基因 *Mfn1*、*Mfn2*，以及 *Opal* 皆受高齡影響而下調。山苦瓜補充顯著下調腓腸肌粒線體分裂基因 *Fis1*、粒線體外膜融合基因 *Mfn2*、及腓腸肌與比目魚肌中粒線體內膜融合基因 *Opal* mRNA 基因表現 ($p < 0.05$)。

去耦合作用方面，高蔗糖飼料下調腓腸肌中 *Ucp2* mRNA 基因表現，比目魚肌之 *Ucp2* mRNA 基因表現則有受高齡而上調的現象 ($p < 0.05$)。山苦瓜補充顯著上調腓腸肌及趾伸長肌中 *Ucp2* 及 *Ucp3* mRNA 基因表現。

氧化磷酸化相關酵素方面，腓腸肌中 *Cox8b* mRNA 基因表現受年齡因子及飼料因子的交互作用影響 ($p < 0.05$)，高齡顯著下調餵食高蔗糖飼料組之 *Cox8b* mRNA 基因表現。比目魚肌中 *Cox7a1* 及 *Cox8b* mRNA 基因表現皆受高齡而下調 ($p < 0.05$)。山苦瓜補充顯著下調腓腸肌 *Cox7a1* mRNA 基因表現 ($p < 0.05$)。

二、肌纖維型態相關基因

分析 Type I fiber (*Tnni1*、*Myh7*)、Type IIa fiber (*Myh2*)、Type IId/x fiber (*Myh1*)、Type IIb fiber (*Myh4*) 等各肌纖維型態指標，以及被認為可能參與肌纖維轉換調控的 *Ppard* 於腓腸肌 (混合肌)、比目魚肌 (紅肌)，以及趾伸長肌 (白肌) 之 mRNA 基因表現。結果發現，腓腸肌之 Type IIa fiber 指標 *Myh2* mRNA 基因表現受年齡影響 ($p < 0.05$)，於老齡鼠中表現量較低。*Ppard* mRNA 基因表現則受高齡及高蔗糖因子影響 ($p < 0.05$)，兩者皆顯著上調腓腸肌之 *Ppard* mRNA 基因表現 (圖 3-12)。比目魚肌 (紅肌) 之各肌纖維型態指標 mRNA 基因表現在各組之間皆無顯著差異 ($p > 0.05$) (圖 3-13)。趾伸長肌 (白肌) 中，高齡顯著上調 Type IId/x fiber 指標 *Myh1* mRNA 基因表現，並顯著下調 Type IIb fiber 指標 *Myh4* mRNA 基因表現 ($p < 0.05$) (圖 3-14)。苦瓜補充顯著上調 Type I fiber 指標 *Myh7*，並顯著下調 Type I fiber 指標 *Myh4* 於腓腸肌之 mRNA 基因表現 ($p < 0.05$) (圖 3-12)。而於趾伸長肌中，苦瓜補充顯著上調 Type IIa fiber 指標 *Myh2* 及 Type IId/x fiber 指標 *Myh1* mRNA 基因表現 ($p < 0.05$) (圖 3-14)。

三、肌肉生合成及肌肉萎縮相關基因

分析肌肉生合成相關基因 *Igf1*、*Igf1r*、肌肉萎縮指標 *Fbxo32*、*Trim63* mRNA 基因表現。結果發現，肌肉萎縮指標 *Trim63* mRNA 基因表現受年齡顯著上調 ($p < 0.05$)。苦瓜補充則未對肌肉生合成與肌肉萎縮相關基因表現有顯著影響 ($p > 0.05$) (圖 3-15)。

四、衰老相關基因

分析腓腸肌、肝臟、副睪周圍白色脂肪組織，以及腎臟中細胞週期停滯相關基因 *p16* 及 *p21*、以及衰老相關分泌表型，包含 *Pail*、*Mmp12*、*Cxcl2*、*Ccl2*、及 *Il6* 之 mRNA 基因表現。結果發現腓腸肌中 *p16*、*p21*、*Mmp12*、*Cxcl2*、*Ccl2* 之 mRNA 基因表現受年齡增加而上調 (圖 3-16)。其中 *p21*、*Cxcl2*、*Ccl2* 之 mRNA 基因表現又受飼料因子交互影響 ($p < 0.05$)，高齡狀態下餵食高蔗糖飼料顯著上調 *p21* mRNA 基因表現，並顯著下調 *Cxcl2*、*Ccl2* 之 mRNA 基因表現。肝臟之各衰老相關基因表現皆受年齡顯著上調 (圖 3-17)。副睪周圍白色脂肪組織之 *p16* 及 *Il6* mRNA 基因表現受高齡上調 (圖 3-18)。腎臟之 *p16*、*p21*、*Cxcl2*、*Ccl2*，及 *Il6* mRNA 基因表現皆受高齡上調 (圖 3-19)。苦瓜補充顯著上調腓腸肌中 *p21* 及 *Pail* mRNA 基因表現，並顯著下調肝臟中 *p16* mRNA 基因表現、副睪周圍白色脂肪組織中 *p16* 及 *Pail* mRNA 基因表現、以及腎臟 *Mmp12*、*Ccl2*、及 *Il6* 之 mRNA 基因表現 (圖 3-16~圖 3-19)。

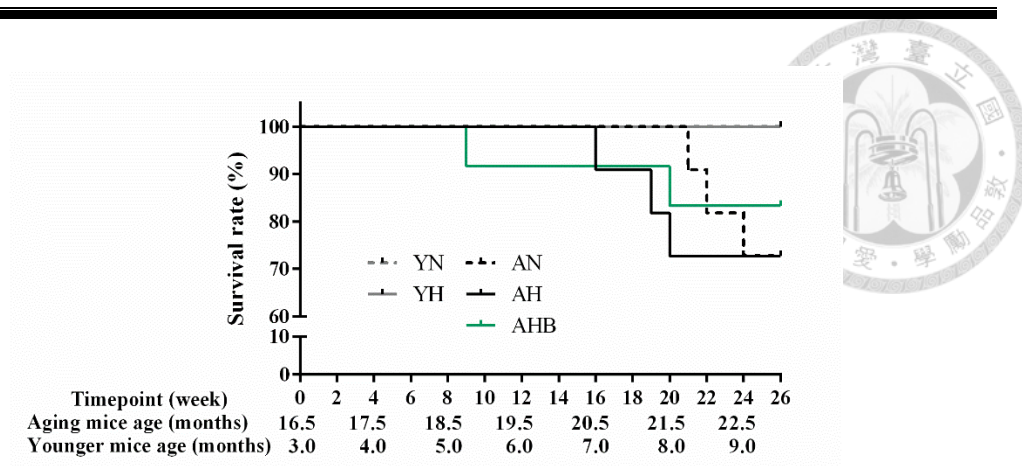


圖 3-1 飼養期間各組小鼠之存活率

Figure 3-1 The survival rate of the tested mice during the feeding experimental period.

The survival rates between tested groups were not significantly different using Log-rank (Mantel-Cox) test ($p > 0.05$).

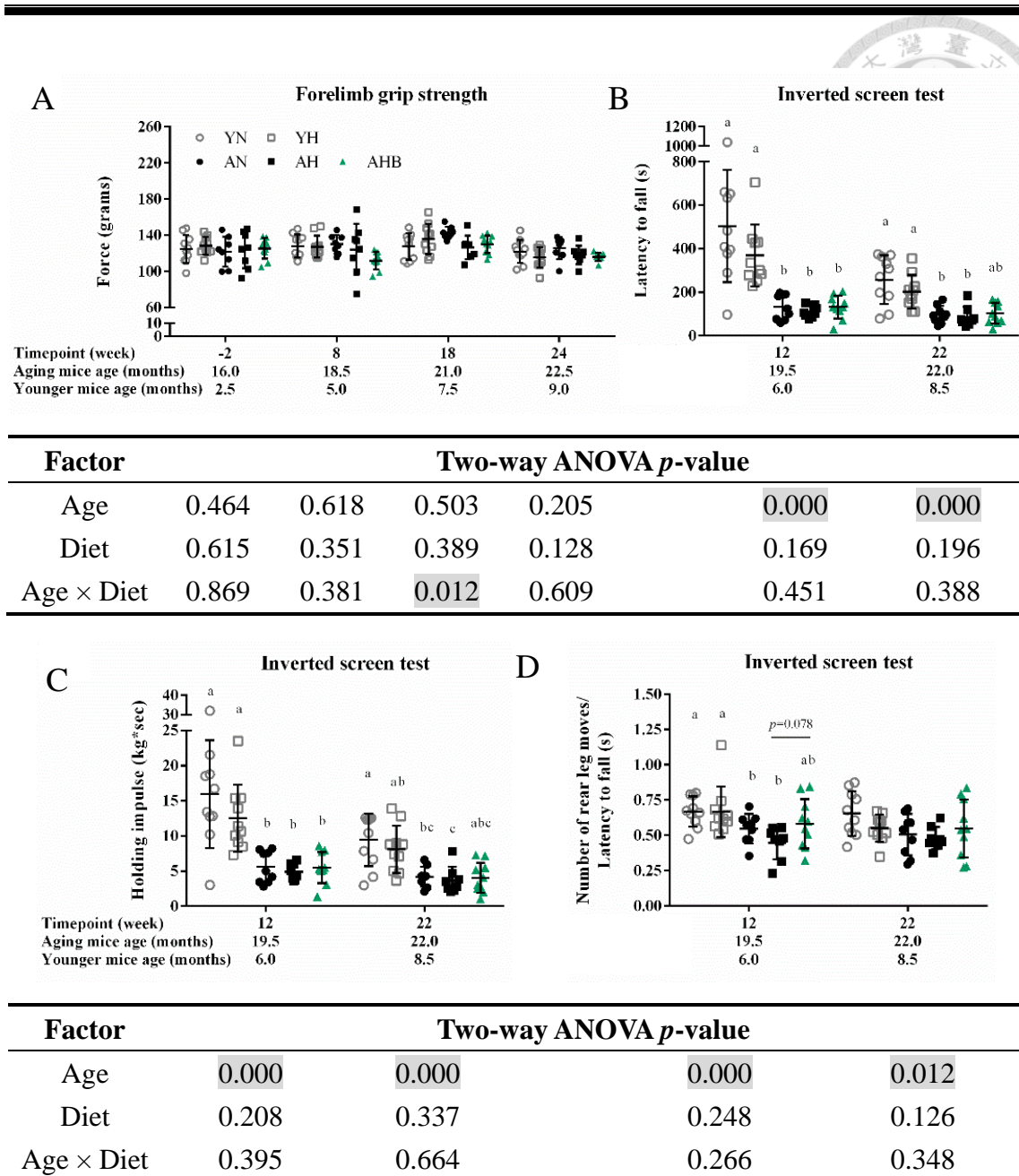


圖 3-2 受試 B6 公鼠實驗期間前肢抓力與運動表現分析

Figure 3-2 The physical performance of the tested B6 male mice during the feeding experimental period.

(A) Forelimb grip strength performance at -2, 8, 18, 24 week; (B~D) Inverted screen test at 12 and 22 week; (B) Latency to fall, (C) Holding impulse, which was calculated as latency to fall (sec) × body weight (g); (D) Number of rear legs moves/latency to fall (#/sec). The values represent mean ± SD (n = 8 for AN and AH; n = 10 for AHB, YN, and YH). Data were analyzed by one-way ANOVA with Duncan multiple comparison test (or by nonparametric statistics for those not following normal distribution). Values not sharing the same superscripted letter are significantly different at $p < 0.05$.

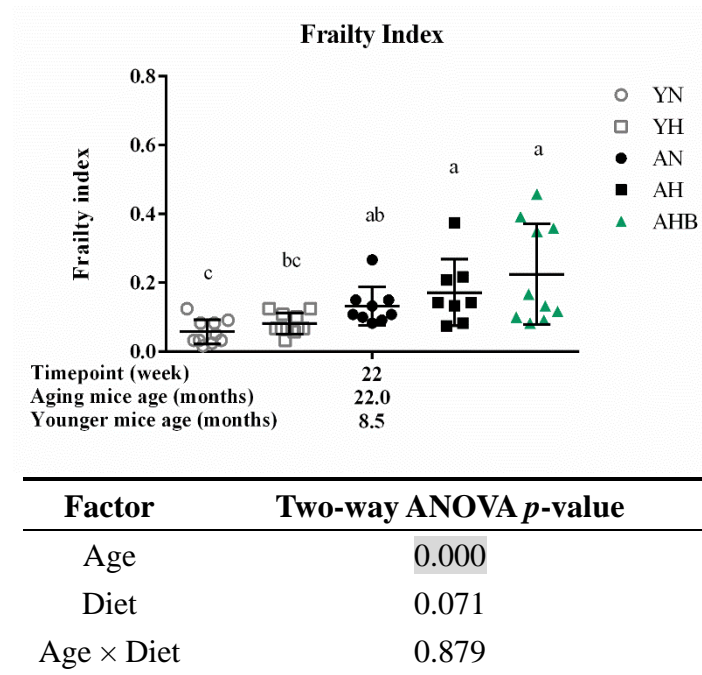


圖 3-3 受試 B6 公鼠餵食正式實驗飼料 22 週之衰弱指數

Figure 3-3 The frailty index of the tested B6 male mice fed test diets for 22 weeks.

Data were analyzed by one-way ANOVA with Duncan multiple comparison test and by two-way ANOVA. Values not sharing the same superscripted letter are significantly different at $p < 0.05$.

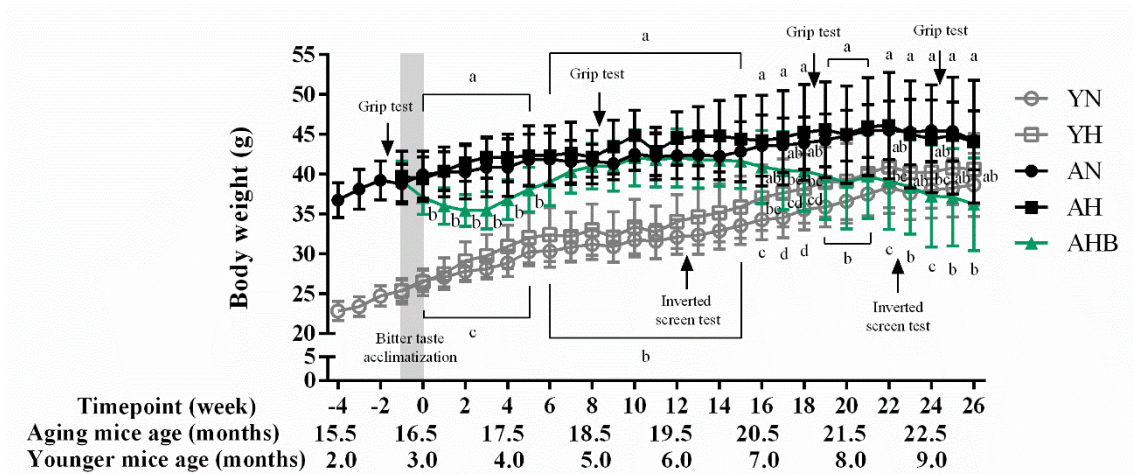


圖 3-4 受試 B6 公鼠全實驗期之生長曲線

Figure 3-4 The growth curve of the tested B6 male mice during the experimental period.

Aging mice at 15.5 months (n=8 for AN and AH; n=10 for AHB) and Younger control mice at 2.0 months (10 mice/group) were fed, ad libitum, the AIN-93G diet for 3 weeks. After that, the mice were grouped according to the body weight and grip strength performance tested at the 3rd AIN-93G fed week. After the 1-week progressive bitter taste acclimatization period (1% 2 days, 3% 2 days, and 5% 3 days), the mice were fed the AIN-93G, HS or 5% BGP in HS diet according to their assigned group for 26 weeks. Animals were weighted weekly. The values represent means \pm SD. Data were analyzed by one-way ANOVA with Duncan multiple comparison test (or by nonparametric statistics for those not following normal distribution). Values not sharing the same superscripted letter are significantly different at $p < 0.05$.

表 3-1 受試 B6 公鼠餵食正式實驗飼料 26 週期間之體重變化情形

Table 3-1 The body weight changes of the tested B6 male mice fed test diets for 26 weeks.

Dietary group	n	Initial body weight	Final body weight	Body weight gain
		(g)	(g)	(g)
YN	10	26.60 ± 1.36 ^c	38.66 ± 3.94 ^b	12.06 ± 3.67 ^{ab}
YH	10	26.44 ± 1.70 ^c	40.62 ± 4.49 ^{ab}	14.19 ± 3.26 ^a
AN	8	39.93 ± 2.94 ^a	44.22 ± 3.70 ^a	4.29 ± 4.60 ^c
AH	8	39.41 ± 2.77 ^a	44.06 ± 7.71 ^a	4.65 ± 8.12 ^{bc}
AHB	10	37.09 ± 2.15 ^b	36.22 ± 5.83 ^b	-0.87 ± 6.46 ^c

Dietary Factor	Two-way ANOVA <i>p</i> -value		
Age	0.000	0.013	0.000
Diet	0.649	0.602	0.471
Age × Diet	0.813	0.539	0.607

The values represent mean ± SD. Data were analyzed by one-way ANOVA with Duncan multiple comparison test and by two-way ANOVA (or by nonparametric statistics for those not following normal distribution). Values not sharing the same superscripted letter are significantly different at $p < 0.05$.

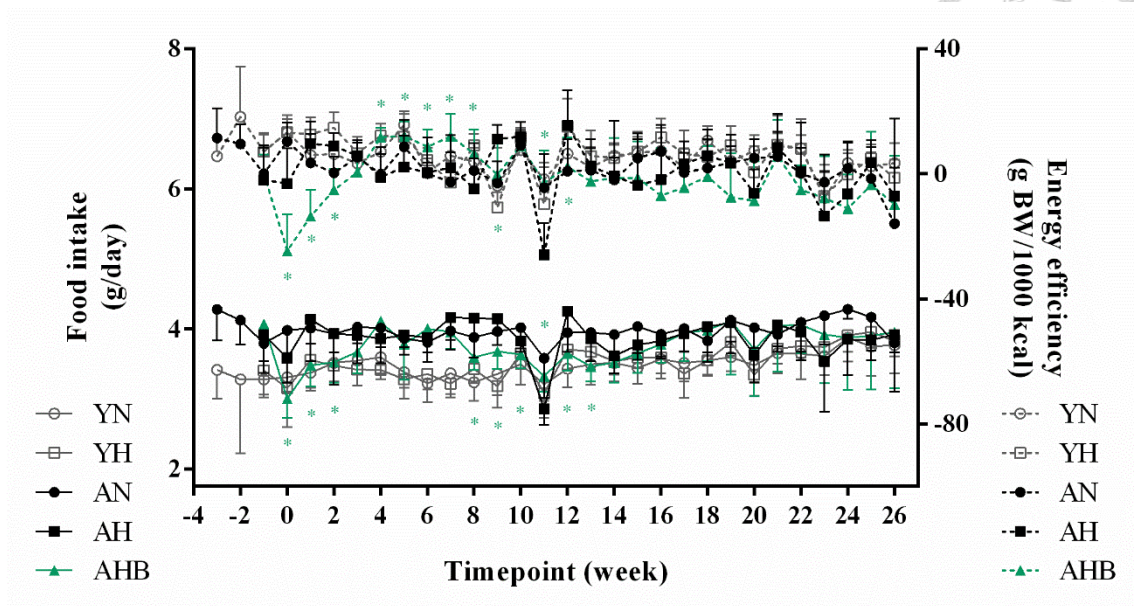


圖 3-5 受試 B6 公鼠全實驗期之每週平均攝食量與能量效率變化

Figure 3-5 The mean food intake and energy efficiency of the tested B6 male mice during the experimental period.

The values represent means \pm SD. Data were analyzed by one-way ANOVA with Duncan multiple comparison test (or by nonparametric statistics for those not following normal distribution). Values not sharing the same superscripted letter are significantly different at $p < 0.05$. * denotes significant difference between AHB group and AH group at $p < 0.05$.

表 3-2 受試 B6 公鼠餵食正式實驗飼料 26 週攝食量及飼料利用

Table 3-2 The food intake and feed efficiency of the tested B6 male mice fed test diets for 26 weeks.

Dietary group	n	Food intake (g / day)	Feed efficiency ² (g BW/100 g diet)	Energy intake (kcal/day)	Energy efficiency ³ (g BW/1000 kcal)
YN	10	3.51 ± 0.21 ^b	1.89 ± 0.54 ^{ab}	13.89 ± 0.83 ^b	4.78 ± 1.36 ^{ab}
YH	10	3.54 ± 0.12 ^b	2.21 ± 0.48 ^a	14.02 ± 0.49 ^b	5.58 ± 1.21 ^a
AN	8	3.97 ± 0.18 ^a	0.60 ± 0.65 ^c	15.72 ± 0.73 ^a	1.51 ± 1.64 ^c
AH	8	3.88 ± 0.20 ^a	0.67 ± 1.15 ^{bc}	15.35 ± 0.78 ^a	1.69 ± 2.90 ^{bc}
AHB	10	3.78 ± 0.28 ^{ab}	-0.10 ± 0.95 ^c	14.96 ± 1.11 ^{ab}	-0.24 ± 2.39 ^c

Dietary Factor	Two-way ANOVA <i>p</i> -value			
Age	0.000	0.000	0.000	0.000
Diet	0.620	0.432	0.620	0.432
Age × Diet	0.309	0.620	0.309	0.620

1. The values represent mean ± SD. Data were analyzed by one-way ANOVA with Duncan multiple comparison test and by two-way ANOVA (or by nonparametric statistics for those not following normal distribution). Values not sharing the same superscripted letter are significantly different at $p < 0.05$.
2. Feed efficiency was calculated as body weight gain/total food intake × 100.
3. Energy efficiency was calculated as body weight gain/total calorie intake × 1000.



表 3-3 受試 B6 公鼠餵食正式實驗飼料 26 週之組織/器官絕對重量 (一)

Table 3-3 The absolute tissue/organ weights of the tested B6 male mice fed test diets for 26 weeks.

Dietary group	n	Body weight	Heart	Liver	Spleen (g)	Lung	Kidney	Adrenal gland
YN	10	36.97 ± 3.97 ^{ab}	0.17 ± 0.01 ^b	1.31 ± 0.23 ^c	0.09 ± 0.01 ^b	0.19 ± 0.01 ^b	0.48 ± 0.04 ^b	0.004 ± 0.001
YH	10	38.92 ± 5.03 ^{ab}	0.17 ± 0.01 ^b	1.63 ± 0.33 ^b	0.10 ± 0.01 ^b	0.19 ± 0.02 ^b	0.48 ± 0.04 ^b	0.005 ± 0.001
AN	8	42.21 ± 3.77 ^a	0.19 ± 0.01 ^a	1.57 ± 0.21 ^b	0.12 ± 0.03 ^{ab}	0.21 ± 0.01 ^a	0.51 ± 0.03 ^{ab}	0.009 ± 0.010
AH	8	42.35 ± 7.54 ^a	0.20 ± 0.02 ^a	2.16 ± 0.58 ^a	0.15 ± 0.06 ^a	0.22 ± 0.02 ^a	0.54 ± 0.07 ^a	0.006 ± 0.001
AHB	10	33.44 ± 6.45 ^b	0.20 ± 0.02 ^a	1.59 ± 0.25 ^b	0.21 ± 0.14 ^a	0.21 ± 0.01 ^a	0.49 ± 0.03 ^b	0.006 ± 0.003
Dietary Factor		Two-way ANOVA <i>p</i> -value						
Age		0.018	0.000	0.002	0.001	0.000	0.003	0.048
Diet		0.553	0.765	0.001	0.063	0.420	0.427	0.407
Age × Diet		0.609	0.485	0.891	0.879	0.878	0.412	0.384

- The values represent mean ± SD. Data were analyzed by one-way ANOVA with Duncan multiple comparison test and by two-way ANOVA (or by nonparametric statistics for those not following normal distribution). Values not sharing the same superscripted letter are significantly different at $p < 0.05$.



表 3-4 受試 B6 公鼠餵食正式實驗飼料 26 週之組織/器官絕對重量 (二)

Table 3-4 The absolute tissue/organ weights of the tested B6 male mice fed test diets for 26 weeks.

Dietary group	n	Testis	Epididymis	Prostate	Seminal vesicle	EWAT	RWAT	IWAT	BAT
YN	10	0.19 ± 0.02 ^{ab}	0.11 ± 0.02	0.03 ± 0.01 ^b	0.53 ± 0.06 ^c	1.73 ± 0.50	0.85 ± 0.33 ^a	1.08 ± 0.38 ^a	0.24 ± 0.10 ^a
YH	10	0.20 ± 0.01 ^{ab}	0.12 ± 0.01	0.03 ± 0.01 ^b	0.53 ± 0.12 ^c	1.85 ± 0.55	0.96 ± 0.39 ^a	1.35 ± 0.56 ^a	0.28 ± 0.13 ^a
AN	8	0.21 ± 0.05 ^a	0.13 ± 0.02	0.05 ± 0.03 ^a	3.67 ± 0.62 ^a	1.96 ± 0.63	0.89 ± 0.37 ^a	1.30 ± 0.46 ^a	0.24 ± 0.06 ^a
AH	8	0.17 ± 0.02 ^{ab}	0.12 ± 0.02	0.04 ± 0.02 ^{ab}	3.60 ± 1.09 ^a	1.82 ± 0.88	0.88 ± 0.46 ^a	1.12 ± 0.62 ^a	0.30 ± 0.17 ^a
AHB	10	0.17 ± 0.03 ^b	0.11 ± 0.03	0.03 ± 0.01 ^b	2.54 ± 1.15 ^b	0.99 ± 0.85	0.45 ± 0.40 ^b	0.61 ± 0.48 ^b	0.13 ± 0.06 ^b
Dietary Factor		Two-way ANOVA <i>p</i> -value							
Age		0.751	0.118	0.007	0.000	0.659	0.862	0.958	0.655
Diet		0.171	0.790	0.364	0.932	0.981	0.712	0.777	0.217
Age × Diet		0.034	0.016	0.143	0.938	0.555	0.625	0.202	0.805

1. The values represent mean ± SD. Data were analyzed by one-way ANOVA with Duncan multiple comparison test and by two-way ANOVA (or by nonparametric statistics for those not following normal distribution). Values not sharing the same superscripted letter are significantly different at $p < 0.05$.
2. EWAT: epididymal white adipose tissue; RWAT: retroperitoneal white adipose tissue; IWAT: inguinal subcutaneous white adipose tissue; BAT: interscapular brown adipose tissue.



表 3-5 受試 B6 公鼠餵食正式實驗飼料 26 週之組織/器官絕對重量 (三)

Table 3-5 The absolute tissue/organ weights of the tested B6 male mice fed test diets for 26 weeks.

Dietary group	n	BC	LA	Quadriceps	Triceps	Gastrocnemius	Soleus	TA	EDL
YN	10	0.10 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.43 ± 0.04 ^a	0.26 ± 0.02	0.34 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.00	0.12 ± 0.01	0.03 ± 0.00
YH	10	0.10 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.43 ± 0.04 ^a	0.25 ± 0.02	0.33 ± 0.01 ^{ab}	0.02 ± 0.00	0.12 ± 0.01	0.03 ± 0.00
AN	8	0.10 ± 0.00	0.07 ± 0.01	0.38 ± 0.05 ^{ab}	0.26 ± 0.02	0.33 ± 0.02 ^{ab}	0.02 ± 0.00	0.12 ± 0.01	0.03 ± 0.00
AH	8	0.09 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.39 ± 0.06 ^a	0.25 ± 0.04	0.30 ± 0.04 ^b	0.02 ± 0.00	0.11 ± 0.01	0.03 ± 0.00
AHB	10	0.08 ± 0.03	0.06 ± 0.02	0.31 ± 0.07 ^b	0.21 ± 0.05	0.28 ± 0.05 ^b	0.02 ± 0.00	0.10 ± 0.02	0.02 ± 0.00
Dietary Factor		Two-way ANOVA <i>p</i> -value							
Age		0.879	0.832	0.018	0.657	0.009	0.070	0.129	0.180
Diet		0.100	0.774	0.978	0.448	0.051	0.400	0.058	0.885
Age × Diet		0.441	0.900	0.661	0.842	0.298	0.265	0.255	0.180

1. The values represent mean ± SD. Data were analyzed by one-way ANOVA with Duncan multiple comparison test and by two-way ANOVA (or by nonparametric statistics for those not following normal distribution). Values not sharing the same superscripted letter are significantly different at $p < 0.05$.
2. BC: bulbocavernosus muscle; LA: levator ani muscle; TA: tibialis anterior; EDL: extensor digitorum longus.



表 3-6 受試 B6 公鼠餵食正式實驗飼料 26 週之組織/器官相對重量 (一)

Table 3-6 The relative tissue/organ weights of the tested B6 male mice fed test diets for 26 weeks.

Dietary group	n	Heart	Liver	Spleen	Lung	Kidney	Adrenal gland
		(% of body weight)					
YN	10	0.47 ± 0.04	3.52 ± 0.31 ^b	0.24 ± 0.03 ^b	0.52 ± 0.06 ^b	1.31 ± 0.15	0.01 ± 0.00
YH	10	0.44 ± 0.05	4.15 ± 0.39 ^b	0.25 ± 0.02 ^b	0.50 ± 0.07 ^b	1.25 ± 0.16	0.01 ± 0.00
AN	8	0.46 ± 0.06	3.70 ± 0.29 ^b	0.27 ± 0.07 ^b	0.51 ± 0.04 ^b	1.23 ± 0.18	0.01 ± 0.00
AH	8	0.49 ± 0.14	5.06 ± 0.77 ^a	0.39 ± 0.25 ^b	0.53 ± 0.12 ^b	1.32 ± 0.32	0.02 ± 0.01
AHB	10	0.61 ± 0.17	4.95 ± 1.44 ^{ab}	0.70 ± 0.56 ^a	0.65 ± 0.12 ^a	1.53 ± 0.34	0.02 ± 0.01
Dietary Factor		Two-way ANOVA <i>p</i> -value					
Age		0.499	0.001	0.051	0.694	0.971	0.072
Diet		0.980	0.001	0.180	0.987	0.846	0.456
Age × Diet		0.317	0.026	0.412	0.524	0.290	0.459

1. Mice were fed test diets for 26 weeks. The relative skeletal muscle weight is expressed as the percentage of the body weight.
2. The values represent mean ± SD. Data were analyzed by one-way ANOVA with Duncan multiple comparison test and by two-way ANOVA (or by nonparametric statistics for those not following normal distribution). Values not sharing the same superscripted letter are significantly different at $p < 0.05$.

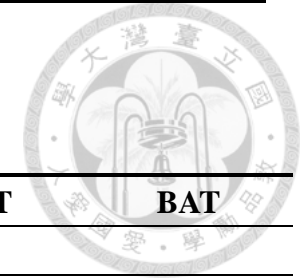


表 3-7 受試 B6 公鼠餵食正式實驗飼料 26 週之組織/器官相對重量 (二)

Table 3-7 The relative tissue/organ weights of the tested B6 male mice fed test diets for 26 weeks.

Dietary group	n	Testis	Epididymis	Prostate	SV	EWAT	RWAT	IWAT	BAT
		(% of body weight)							
YN	10	0.52 ± 0.09 ^a	0.30 ± 0.08	0.07 ± 0.02 ^b	1.44 ± 0.18 ^b	4.62 ± 0.96	2.25 ± 0.63	2.88 ± 0.72 ^a	0.62 ± 0.20 ^a
YH	10	0.52 ± 0.07 ^a	0.32 ± 0.06	0.08 ± 0.03 ^b	1.35 ± 0.25 ^b	4.66 ± 1.03	2.39 ± 0.82	3.36 ± 1.12 ^a	0.68 ± 0.26 ^a
AN	8	0.49 ± 0.11 ^a	0.32 ± 0.04	0.13 ± 0.07 ^a	8.75 ± 1.62 ^a	4.60 ± 1.29	2.07 ± 0.74	3.01 ± 0.84 ^a	0.57 ± 0.13 ^a
AH	8	0.41 ± 0.05 ^b	0.28 ± 0.08	0.09 ± 0.05 ^{ab}	8.55 ± 2.29 ^a	4.09 ± 1.60	1.95 ± 0.87	2.51 ± 1.19 ^{ab}	0.69 ± 0.32 ^a
AHB	10	0.51 ± 0.08 ^a	0.33 ± 0.05	0.07 ± 0.02 ^b	7.44 ± 3.07 ^a	2.62 ± 2.00	1.15 ± 0.94	1.63 ± 1.08 ^b	0.37 ± 0.10 ^b
Dietary Factor		Two-way ANOVA <i>p</i> -value							
Age		0.015	0.785	0.018	0.000	0.473	0.245	0.287	0.879
Diet		0.146	0.815	0.460	0.747	0.582	0.780	0.146	0.497
Age × Diet		0.110	0.206	0.312	0.901	0.505	0.567	0.976	0.803

1. Mice were fed test diets for 26 weeks. The relative skeletal muscle weight is expressed as the percentage of the body weight.
2. The values represent mean ± SD. Data were analyzed by one-way ANOVA with Duncan multiple comparison test and by two-way ANOVA (or by nonparametric statistics for those not following normal distribution). Values not sharing the same superscripted letter are significantly different at $p < 0.05$.
3. SV: seminal vesicle; EWAT: epididymal white adipose tissue; RWAT: retroperitoneal white adipose tissue; IWAT: inguinal subcutaneous white adipose tissue; BAT: interscapular brown adipose tissue.



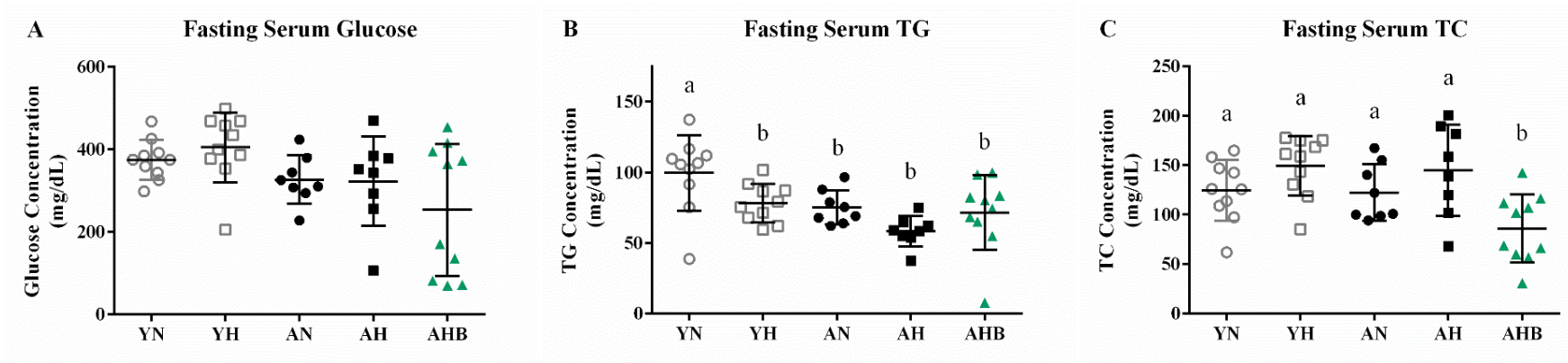
表 3-8 受試 B6 公鼠餵食正式實驗飼料 26 週之組織/器官相對重量 (三)

Table 3-8 The relative tissue/organ weights of the tested B6 male mice fed test diets for 26 weeks.

Dietary group	n	BC	LA	Quadriceps	Triceps	Gastrocnemius	Soleus	TA	EDL
		(% of body weight)							
YN	10	0.27 ± 0.03 ^a	0.19 ± 0.04	1.19 ± 0.19 ^a	0.72 ± 0.10 ^a	0.93 ± 0.10 ^a	0.07 ± 0.02 ^a	0.33 ± 0.04 ^a	0.07 ± 0.01
YH	10	0.25 ± 0.04 ^{ab}	0.19 ± 0.04	1.10 ± 0.12 ^a	0.66 ± 0.08 ^{ab}	0.87 ± 0.14 ^{ab}	0.06 ± 0.01 ^b	0.31 ± 0.04 ^{ab}	0.07 ± 0.01
AN	8	0.25 ± 0.02 ^{ab}	0.17 ± 0.02	0.91 ± 0.09 ^b	0.61 ± 0.05 ^b	0.78 ± 0.06 ^b	0.06 ± 0.01 ^{bc}	0.29 ± 0.02 ^b	0.07 ± 0.01
AH	8	0.22 ± 0.03 ^b	0.17 ± 0.03	0.93 ± 0.07 ^b	0.61 ± 0.07 ^b	0.73 ± 0.07 ^b	0.05 ± 0.01 ^c	0.27 ± 0.03 ^b	0.06 ± 0.01
AHB	10	0.24 ± 0.04 ^{ab}	0.19 ± 0.05	0.94 ± 0.11 ^b	0.64 ± 0.06 ^b	0.83 ± 0.06 ^{ab*}	0.07 ± 0.01 ^{a*}	0.32 ± 0.03 ^{ab*}	0.07 ± 0.01 [*]

Dietary Factor	Two-way ANOVA <i>p</i> -value							
Age	0.008	0.108	0.000	0.003	0.000	0.001	0.000	0.217
Diet	0.033	0.927	0.465	0.230	0.008	0.312	0.007	0.609
Age × Diet	0.872	0.826	0.235	0.354	0.358	0.717	0.456	0.708

1. Mice were fed test diets for 26 weeks. The relative skeletal muscle weight is expressed as the percentage of the body weight
2. The values represent mean ± SD. Data were analyzed by one-way ANOVA with Duncan multiple comparison test and by two-way ANOVA (or by nonparametric statistics for those not following normal distribution). Values not sharing the same superscripted letter are significantly different at $p < 0.05$.
3. * denotes significant difference between AHB group and AH group at $p < 0.05$.
4. BC: bulbocavernosus muscle; LA: levator ani muscle; TA: tibialis anterior; EDL: extensor digitorum longus



Factor	Two-way ANOVA <i>p</i> -value		
	Glucose	TG	TC
Age	0.017	0.001	0.767
Diet	0.613	0.003	0.048
Age × Diet	0.515	0.723	0.919

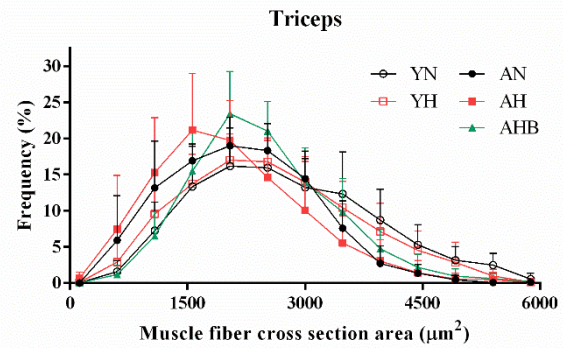
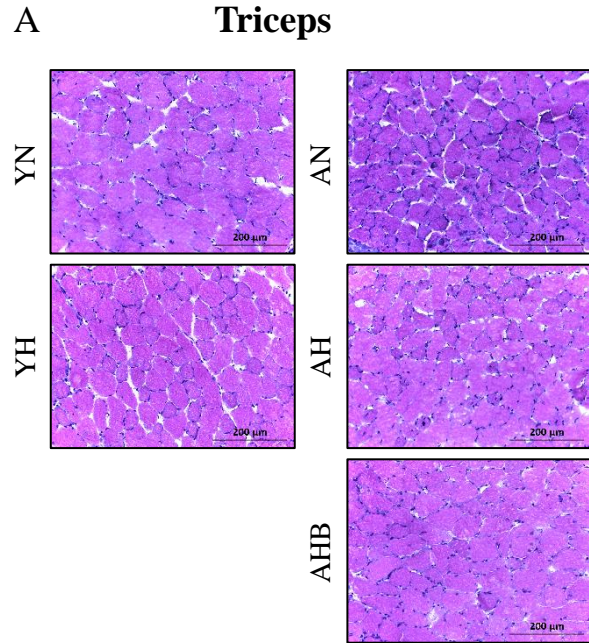
圖 3-6 受試 B6 公鼠餵食正式實驗飼料 26 週之禁食血清生化指標分析

Figure 3-6 The fasting serum biochemical analysis of the tested B6 male mice fed test diets for 26 weeks.

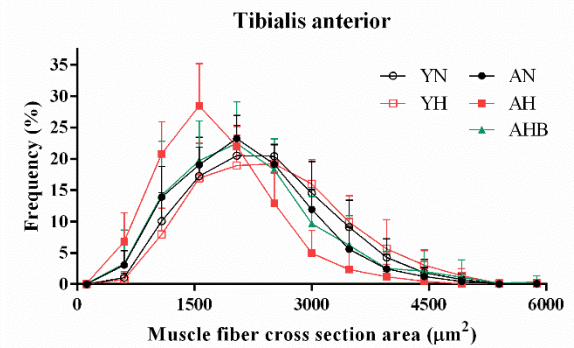
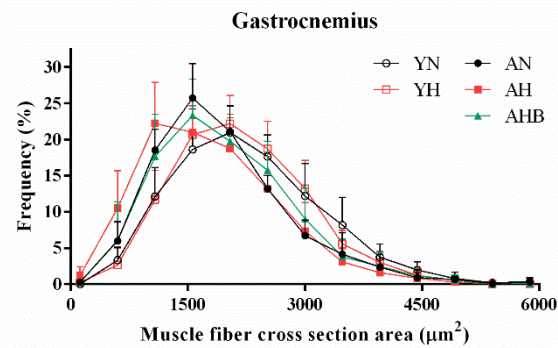
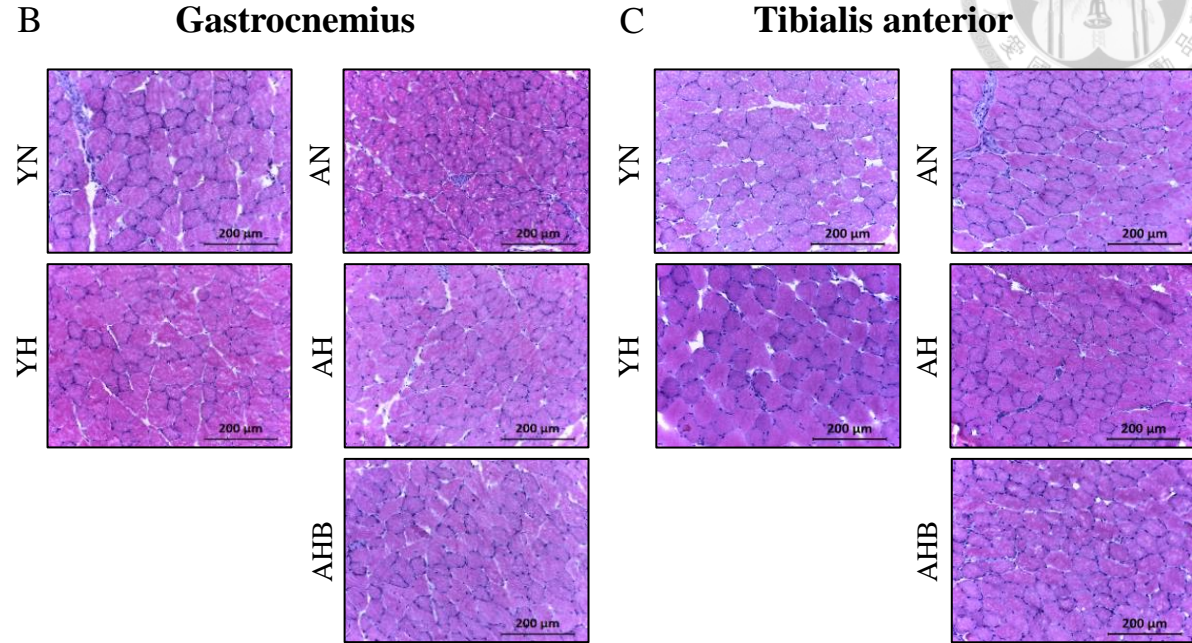
(A) Fasting serum glucose; (B) Fasting serum triglyceride; (C) Fasting serum total cholesterol. The values represent mean ± SD (n = 8 for AN and AH; n = 10 for AHB, YN, and YH). Data were analyzed by one-way ANOVA with Duncan multiple comparison test and by two-way ANOVA (or by nonparametric statistics for those not following normal distribution). Values not sharing the same superscripted letter are significantly different at $p < 0.05$.



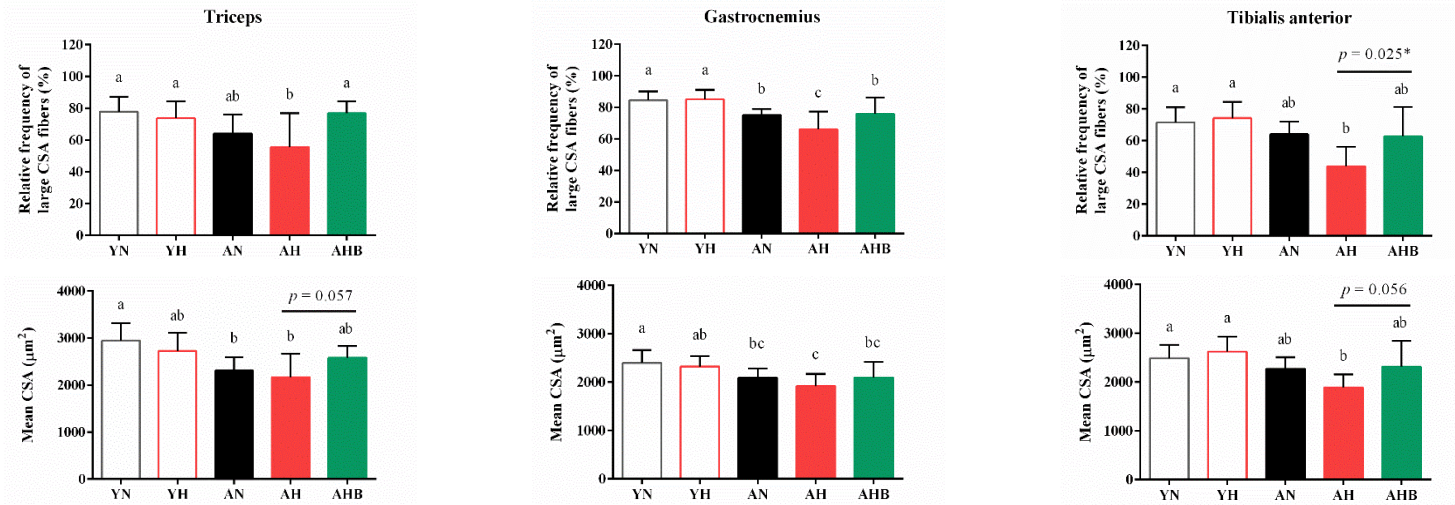
Forelimb



Hindlimb



第三章 實驗結果



Factor	Two-way ANOVA <i>p</i> -value					
	Large CSA fibers		Mean CSA		Large CSA fibers	
Age	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Diet	0.213	0.201	0.125	0.176	0.016	0.189
Age × Diet	0.654	0.757	0.066	0.952	0.002	0.009

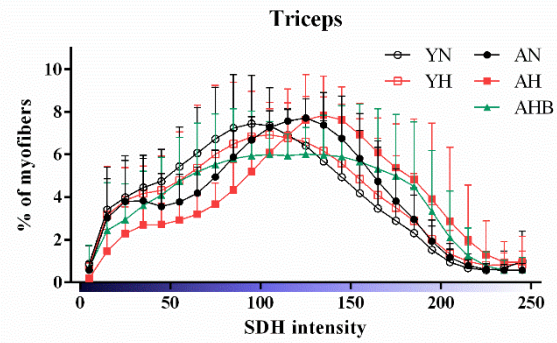
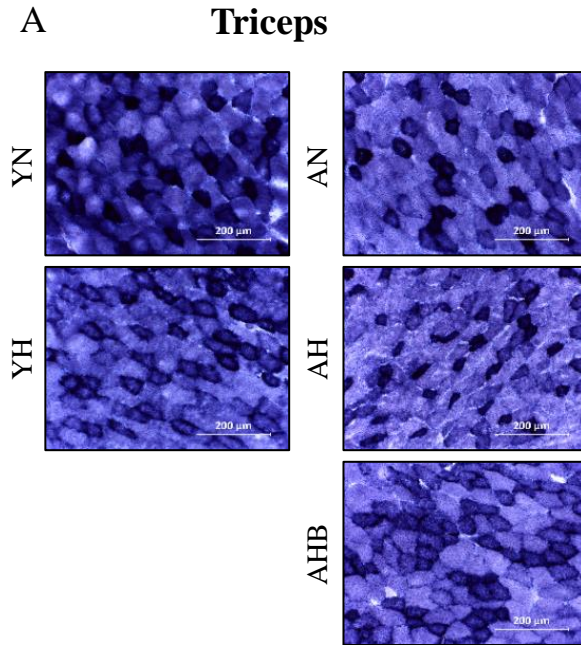
圖 3-7 受試 B6 公鼠骨骼肌肌纖維橫截面積大小分析

Figure 3-7 The cross-section area of myofibers in various limb muscles of the tested B6 male mice

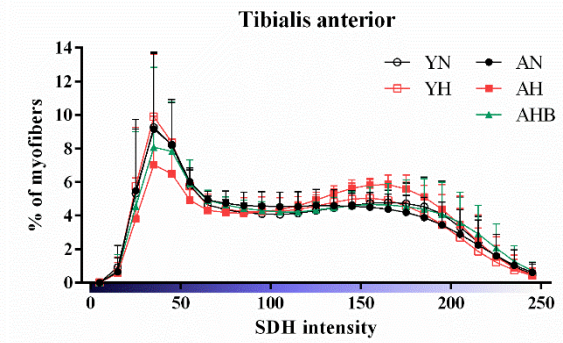
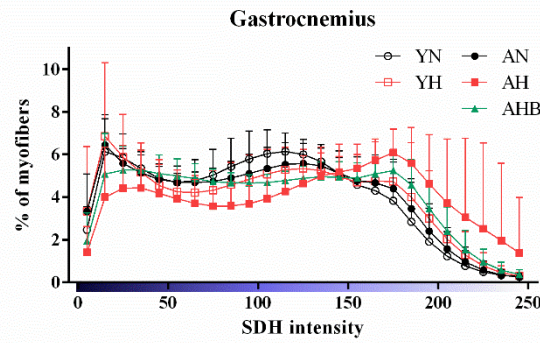
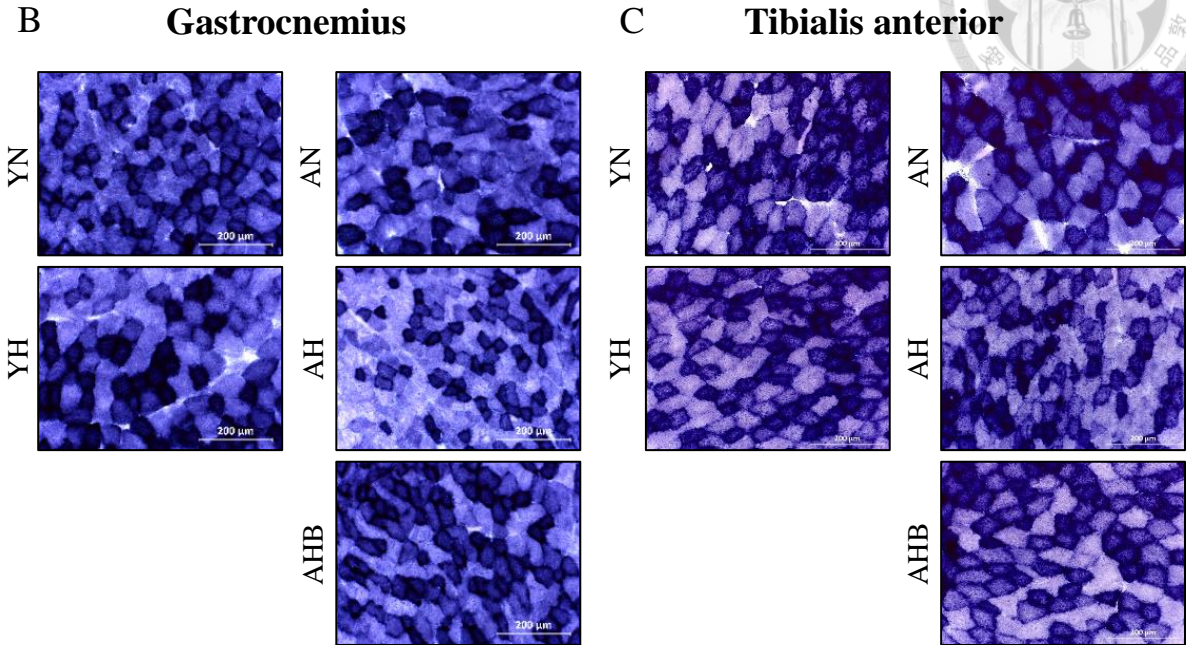
Sections from dry ice-cooled isopentane frozen triceps (A), gastrocnemius (B), and tibialis anterior (C) muscle were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS and stained with hematoxylin and eosin. Scale bar: 200 μm. Myofibers were manually circled, analyzed, and plotted as cross section area (CSA) distribution diagrams with Image J. Large CSA fibers (top 50%) and average CSA were quantified. The values represent mean ± SD. Data were analyzed by one-way ANOVA with Duncan multiple comparison test and by two-way ANOVA (or by nonparametric statistics for those not following normal distribution). Values not sharing the same superscripted letter are significantly different at $p < 0.05$. In some cases, a two-sample Student's *t* test was further performed for the comparison with the AH group. * denotes significant difference between AHB group and AH group at $p < 0.05$.



Forelimb



Hindlimb



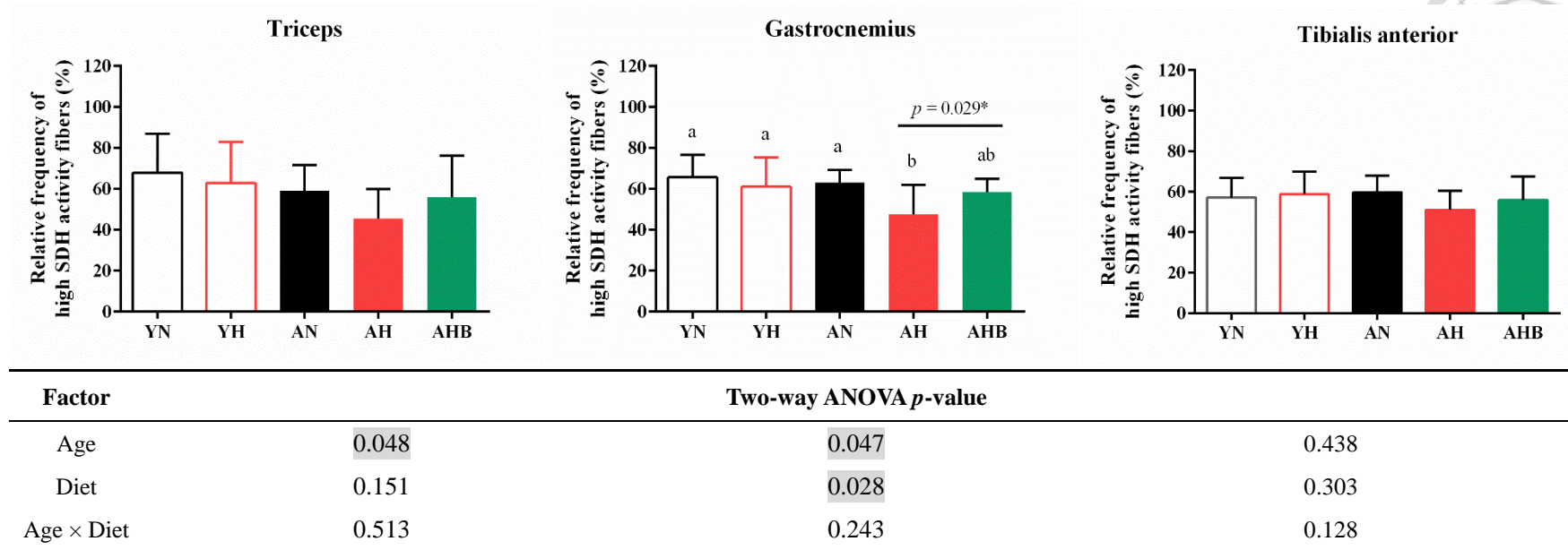


圖 3-8 受試 B6 公鼠骨骼肌琥珀酸脫氫酶活性分析

Figure 3-8 Histochemical staining of succinate dehydrogenase activity in various limb muscles of the tested B6 male mice.

SDH activity was observed from stained frozen sections of triceps (A), gastrocnemius (B), and tibialis anterior (C) muscle. Scale bar: 200 μ m. The staining intensity was analyzed with Image J and plotted as intensity distribution diagrams. High SDH activity fibers (top 50% intensity) were quantified. The values represent mean \pm SD. Data were analyzed by one-way ANOVA with Duncan multiple comparison test and by two-way ANOVA (or by nonparametric statistics for those not following normal distribution). Values not sharing the same superscripted letter are significantly different at $p < 0.05$. In some cases, a two-sample Student's *t* test was further performed for the comparison with the AH group. * denotes significant difference between AHB group and AH group at $p < 0.05$.

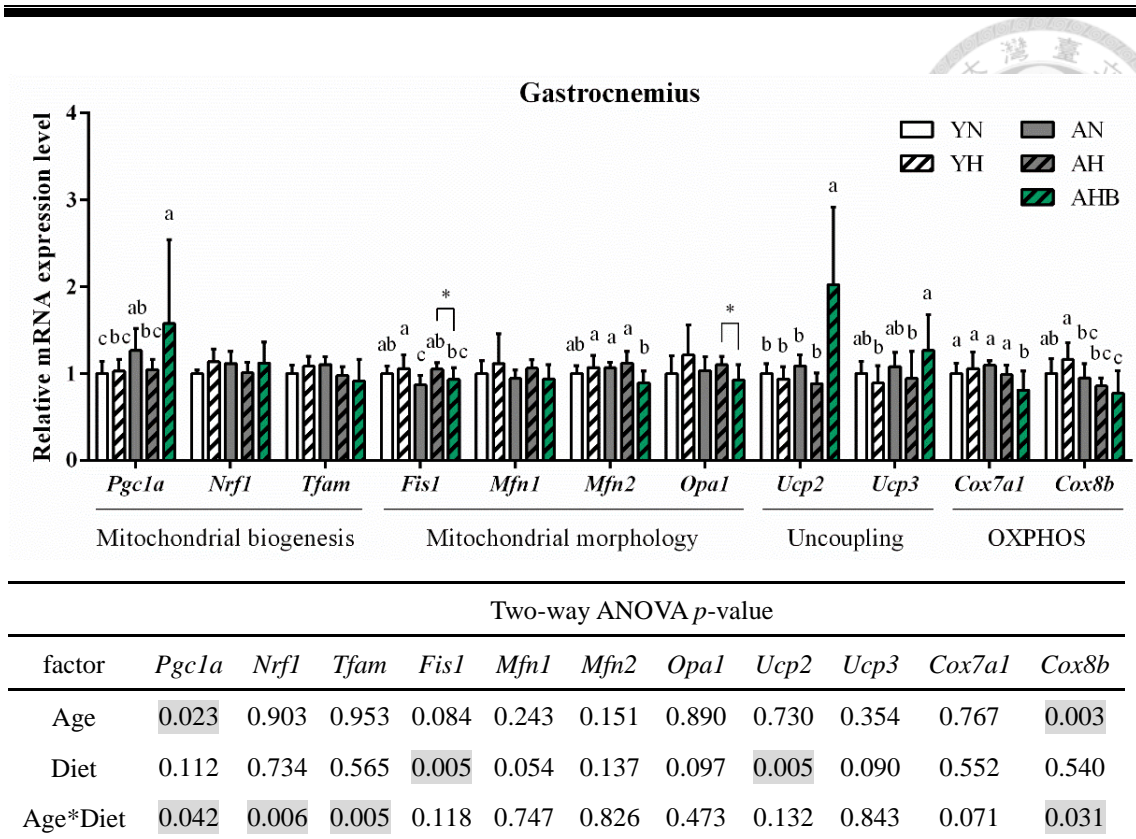


圖 3-9 受試 B6 公鼠腓腸肌粒線體功能相關基因表現分析

Figure 3-9 The mRNA expression levels of genes related to mitochondrial functions in gastrocnemius muscle of the tested B6 male mice.

The mRNA expression levels of genes related to mitochondrial biogenesis (*Pgc1a*, *Nrf1*, *Tfam*), morphology (*Fis1*, *Mfn1*, *Mfn2*, *Opa1*), uncoupling (*Ucp2*, *Ucp3*), and oxidative phosphorylation (OXPHOS) (*Cox7a1*, *Cox8b*) in gastrocnemius muscle were analyzed by quantitative real-time PCR. Data were normalized with *Gapdh* mRNA expression level and presented as expression levels relative to the YN group. The values represent mean \pm SD. Data were analyzed by one-way ANOVA with Duncan multiple comparison test and by two-way ANOVA (or by nonparametric statistics for those not following normal distribution). Values not sharing the same superscripted letter are significantly different at $p < 0.05$. In some cases, a two-sample Student's t test was further performed for the comparison with the AH group. * denotes significant difference between AHB group and AH group at $p < 0.05$.

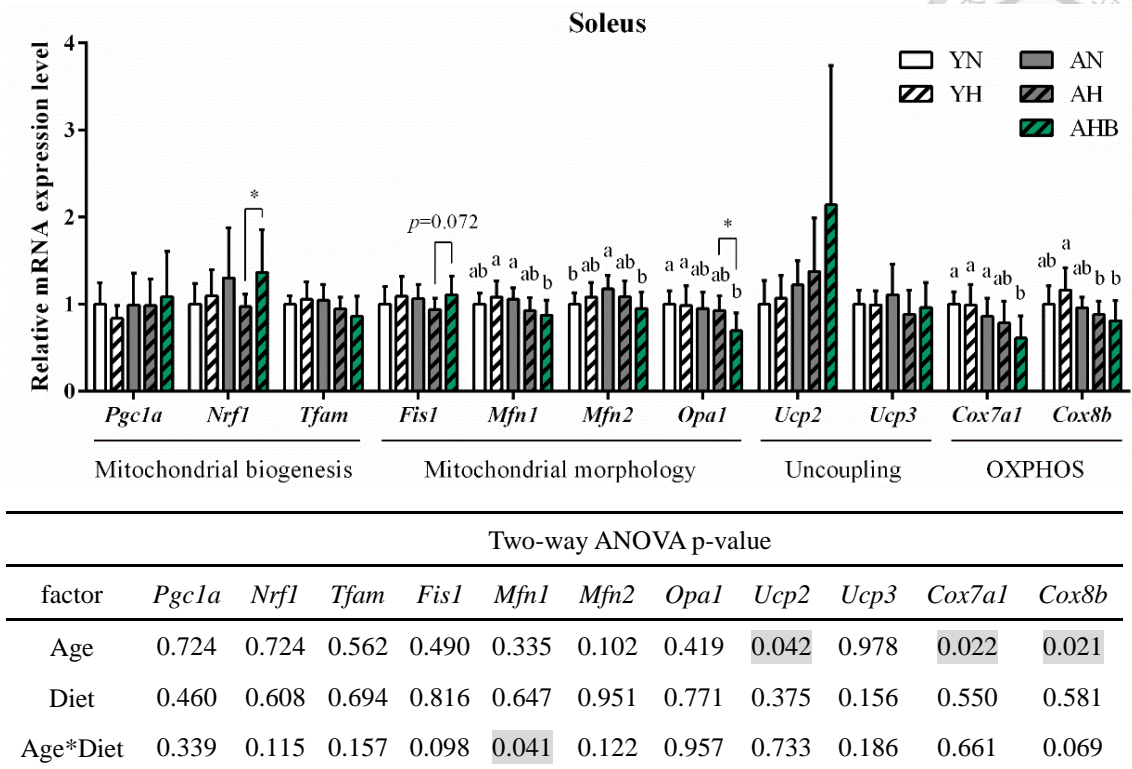


圖 3-10 受試 B6 公鼠比目魚肌粒線體功能相關基因表現分析

Figure 3-10 The mRNA expression levels of genes related to mitochondrial functions in soleus muscle of the tested B6 male mice.

The mRNA expression levels of genes related to mitochondrial biogenesis (*Pgc1a*, *Nrf1*, *Tfam*), morphology (*Fis1*, *Mfn1*, *Mfn2*, *Opa1*), uncoupling (*Ucp2*, *Ucp3*), and oxidative phosphorylation (OXPHOS) (*Cox7a1*, *Cox8b*) in soleus muscle were analyzed by quantitative real-time PCR. Data were normalized with *Gapdh* mRNA expression level and presented as expression levels relative to the YN group. The values represent mean \pm SD. Data were analyzed by one-way ANOVA with Duncan multiple comparison test and by two-way ANOVA (or by nonparametric statistics for those not following normal distribution). Values not sharing the same superscripted letter are significantly different at $p < 0.05$. In some cases, a two-sample Student's t test was further performed for the comparison with the AH group. * denotes significant difference between AHB group and AH group at $p < 0.05$.

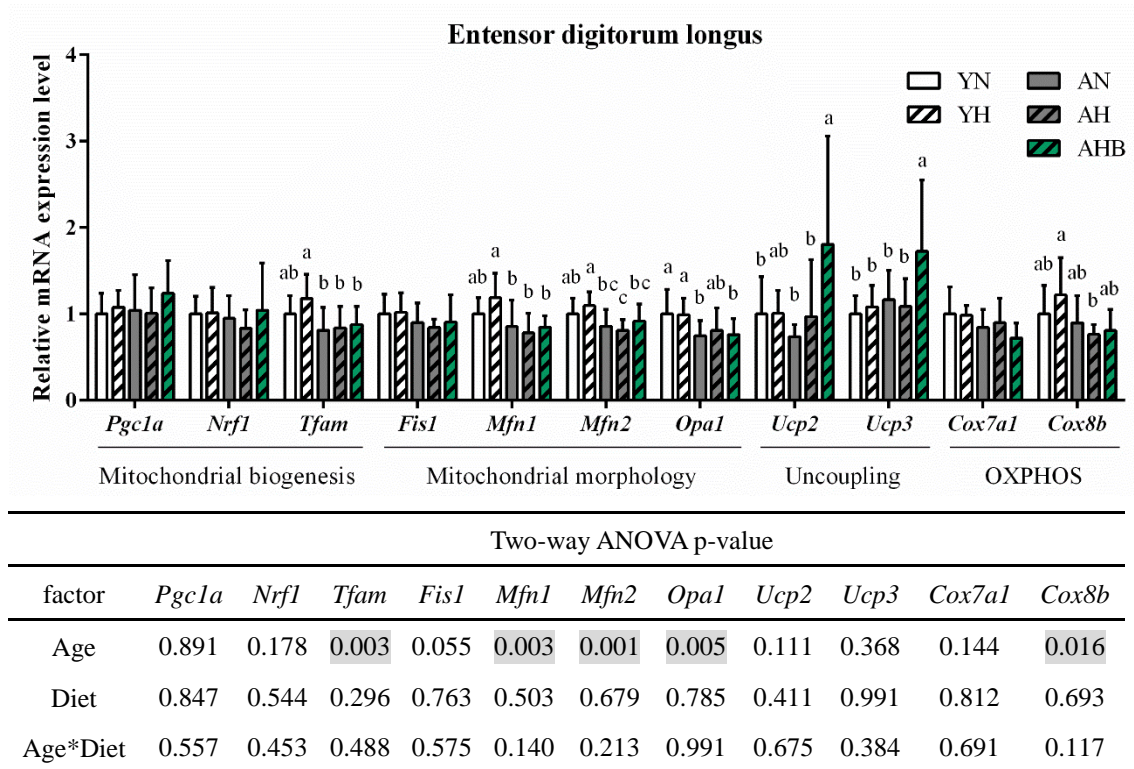


圖 3-11 受試 B6 公鼠趾伸長肌粒線體功能相關基因表現分析

Figure 3-11 The mRNA expression levels of genes related to mitochondrial functions in extensor digitorum longus muscle of the tested B6 male mice.

The mRNA expression levels of genes related to mitochondrial biogenesis (*Pgc1a*, *Nrf1*, *Tfam*), morphology (*Fis1*, *Mfn1*, *Mfn2*, *Opa1*), uncoupling (*Ucp2*, *Ucp3*), and oxidative phosphorylation (OXPHOS) (*Cox7a1*, *Cox8b*) in extensor digitorum longus muscle were analyzed by quantitative real-time PCR. Data were normalized with *Gapdh* mRNA expression level and presented as expression levels relative to the YN group. The values represent mean \pm SD. Data were analyzed by one-way ANOVA with Duncan multiple comparison test and by two-way ANOVA (or by nonparametric statistics for those not following normal distribution). Values not sharing the same superscripted letter are significantly different at $p < 0.05$.

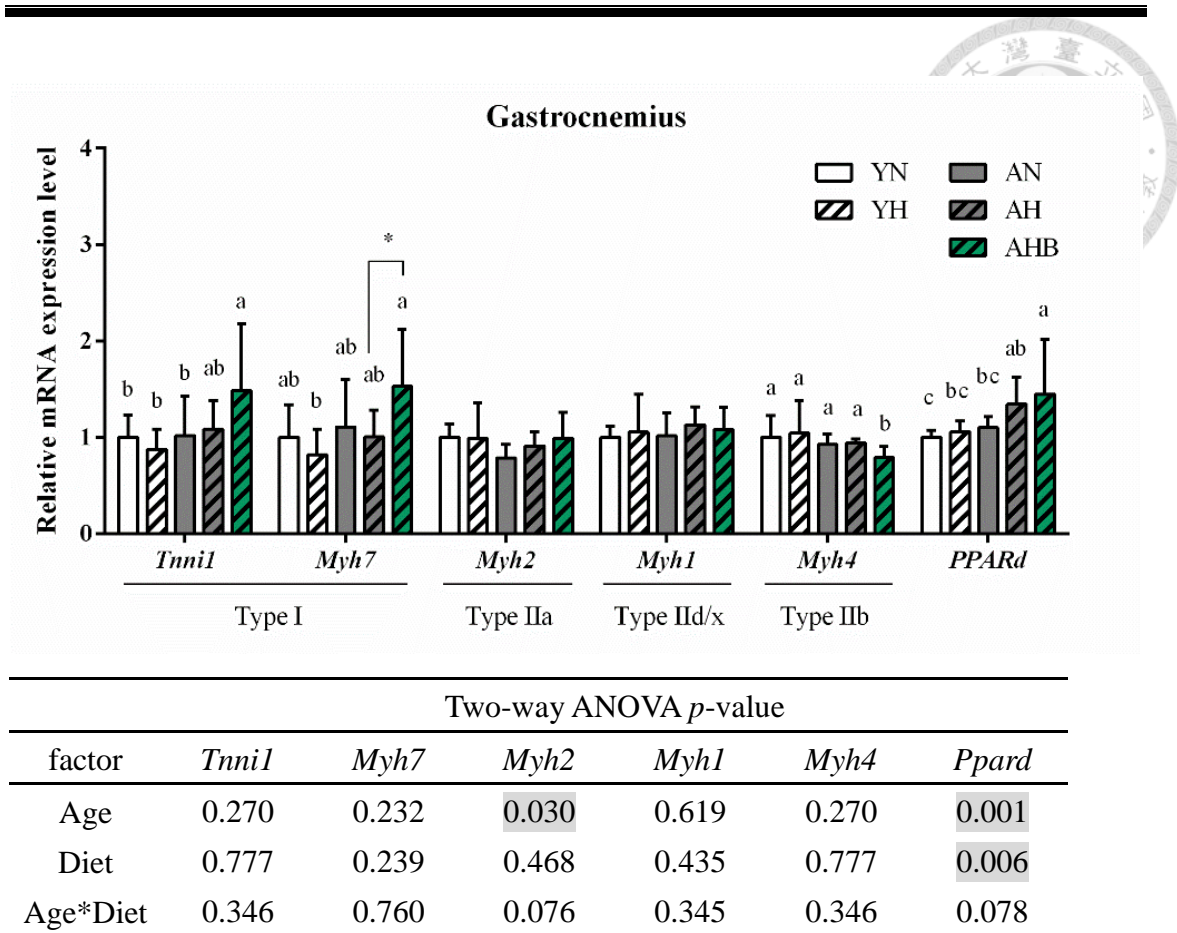


圖 3-12 受試 B6 公鼠腓腸肌肌纖維型態相關基因表現分析

Figure 3-12 The mRNA expression levels of genes related to fiber type in gastrocnemius muscle of the tested B6 male mice.

The mRNA expression levels of markers of type I fiber (*Tnni1*, *Myh7*), type IIa fiber (*Myh2*), type IIc fiber (*Myh1*), type IIb fiber (*Myh4*), and possible fiber type transition regulator (*Ppard*) in gastrocnemius muscle were analyzed by quantitative real-time PCR. Data were normalized with *Gapdh* mRNA expression level and presented as expression levels relative to the YN group. The values represent mean \pm SD. Data were analyzed by one-way ANOVA with Duncan multiple comparison test and by two-way ANOVA (or by nonparametric statistics for those not following normal distribution). Values not sharing the same superscripted letter are significantly different at $p < 0.05$. In some cases, a two-sample Student's t test was further performed for the comparison with the AH group. * denotes significant difference between AHB group and AH group at $p < 0.05$.

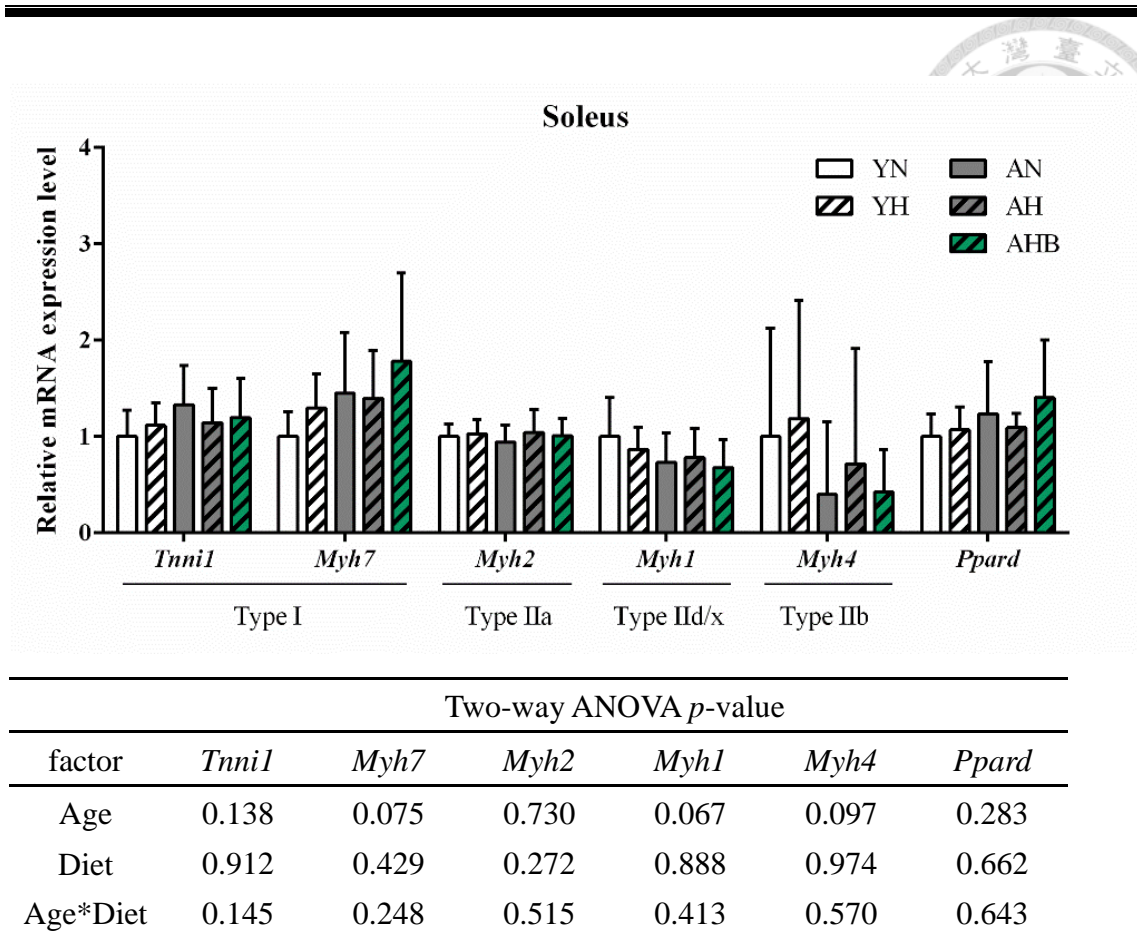
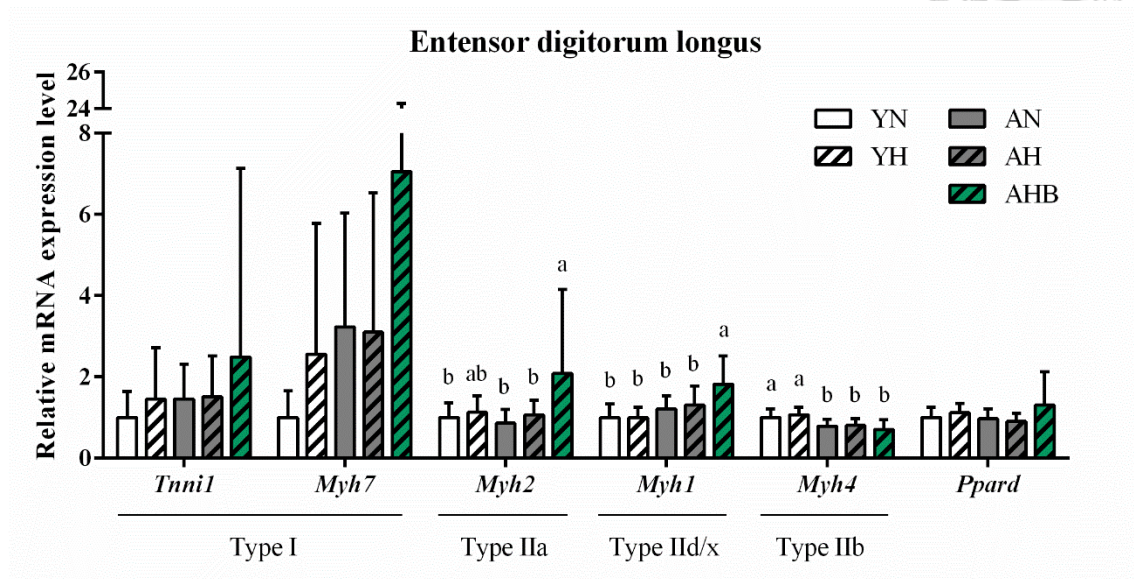


圖 3-13 受試 B6 公鼠比目魚肌纖維型態相關基因表現分析

Figure 3-13 The mRNA expression levels of genes related to fiber type in soleus muscle of the tested B6 male mice.

The mRNA expression levels of markers of type I fiber (*Tnni1*, *Myh7*), type IIa fiber (*Myh2*), type IIb fiber (*Myh4*), and possible fiber type transition regulator (*Ppard*) in soleus muscle were analyzed by quantitative real-time PCR. Data were normalized with *Gapdh* mRNA expression level and presented as expression levels relative to the YN group. The values represent mean \pm SD. Data were analyzed by one-way ANOVA with Duncan multiple comparison test and by two-way ANOVA (or by nonparametric statistics for those not following normal distribution). Values not sharing the same superscripted letter are significantly different at $p < 0.05$.



Two-way ANOVA <i>p</i> -value						
factor	<i>Tnni1</i>	<i>Myh7</i>	<i>Myh2</i>	<i>Myh1</i>	<i>Myh4</i>	<i>Ppard</i>
Age	0.345	0.242	0.410	0.027	0.001	0.127
Diet	0.526	0.615	0.180	0.710	0.474	0.703
Age*Diet	0.628	0.616	0.742	0.821	0.638	0.228

圖 3-14 受試 B6 公鼠趾伸長肌肌纖維型態相關基因表現分析

Figure 3-14 The mRNA expression levels of genes related to fiber type in entensor digitorum longus muscle of the tested B6 male mice.

The mRNA expression levels of markers of type I fiber (*Tnni1*, *Myh7*), type Iia fiber (*Myh2*), type IId/x fiber (*Myh1*), type Iib fiber (*Myh4*), and possible fiber type transition regulator (*Ppard*) in entensor digitorum longus muscle were analyzed by quantitative real-time PCR. Data were normalized with *Gapdh* mRNA expression level and presented as expression levels relative to the YN group. The values represent mean \pm SD. Data were analyzed by one-way ANOVA with Duncan multiple comparison test and by two-way ANOVA (or by nonparametric statistics for those not following normal distribution). Values not sharing the same superscripted letter are significantly different at $p < 0.05$.

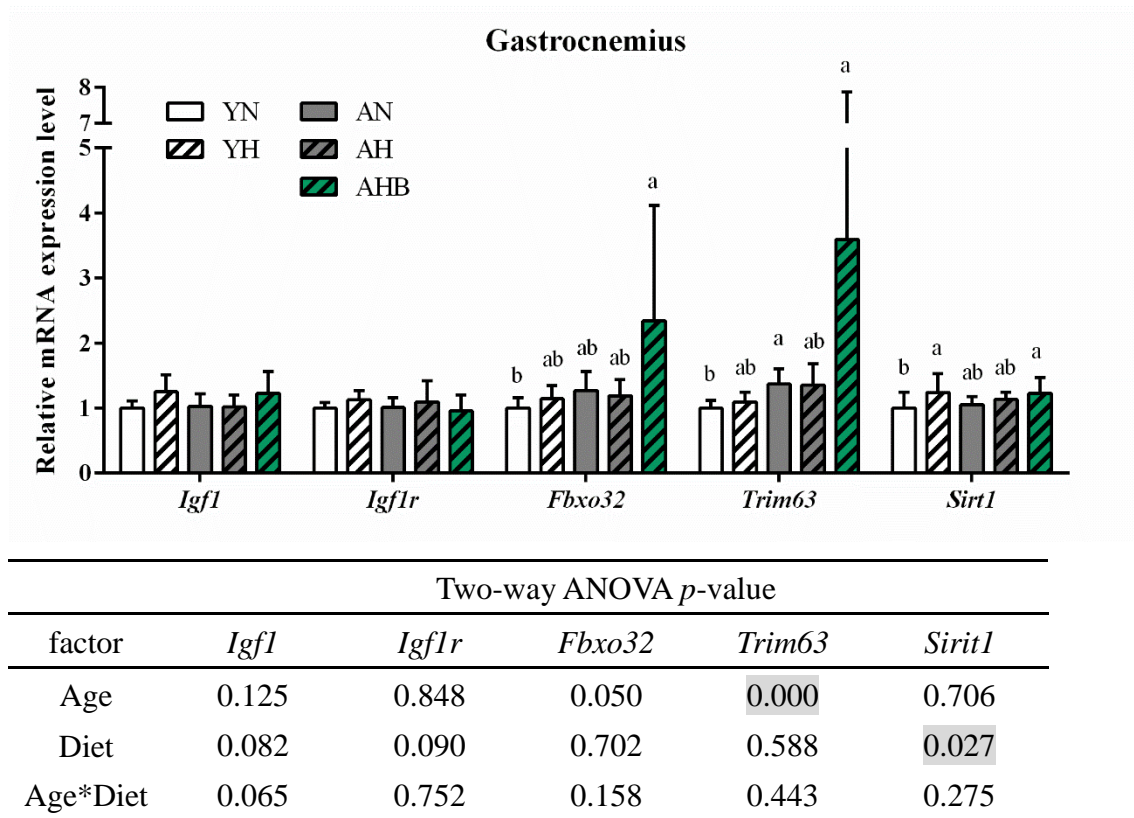


圖 3-15 受試 B6 公鼠腓腸肌肌肉合成及肌肉萎縮相關基因表現分析

Figure 3-15 The mRNA expression levels of genes related to myogenesis and atrophy in gastrocnemius muscle of the tested B6 male mice.

The mRNA expression levels of genes related to myogenesis (*Igf1*, *Igf1r*) and atrophy (*Fbxo32*, *Trim63*) in gastrocnemius muscle were analyzed by quantitative real-time PCR. Data were normalized with *Gapdh* mRNA expression level and presented as expression levels relative to the YN group. The values represent mean \pm SD. Data were analyzed by one-way ANOVA with Duncan multiple comparison test and by two-way ANOVA (or by nonparametric statistics for those not following normal distribution). Values not sharing the same superscripted letter are significantly different at $p < 0.05$.

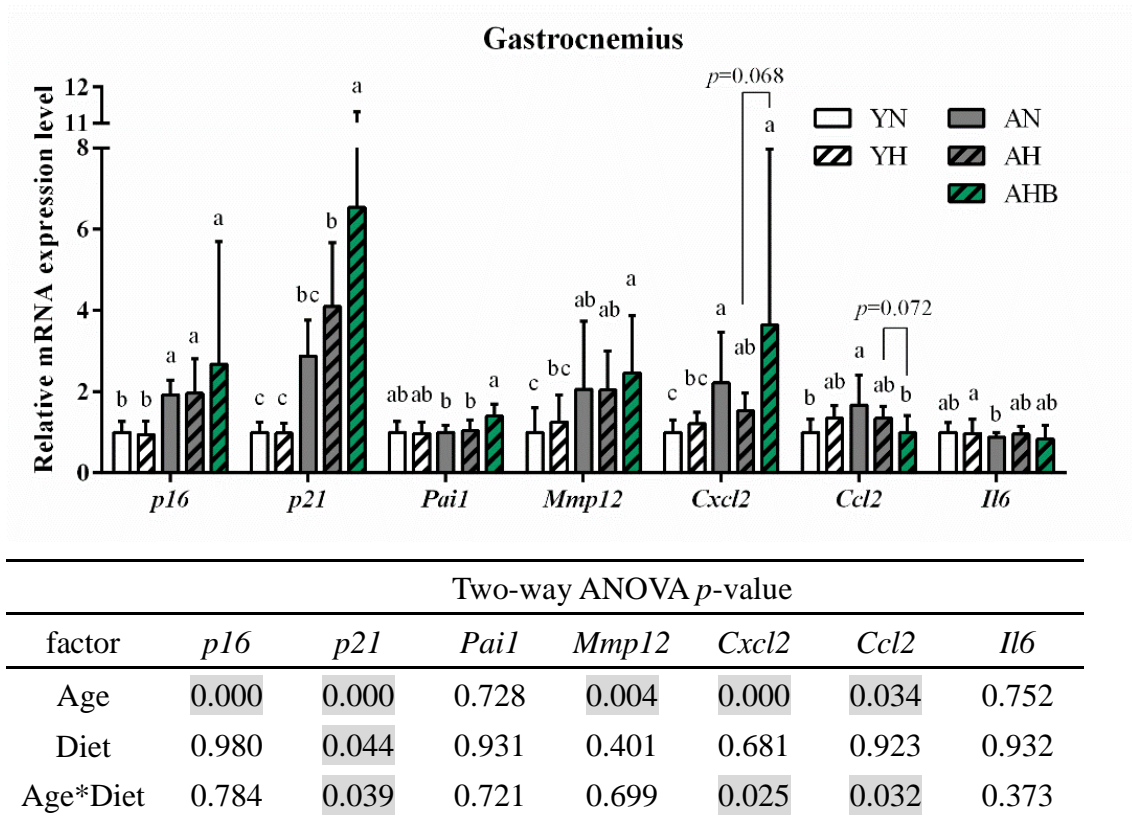


圖 3-16 受試 B6 公鼠腓腸肌衰老相關基因表現分析

Figure 3-16 The mRNA expression levels of genes related to senescence in gastrocnemius muscle of the tested B6 male mice.

The mRNA expression levels of genes related to senescence, including cell cycle arrest mediators (*p16*, *p21*) and senescence associated secretory phenotype (*Pai1*, *Mmp12*, *Cxcl2*, *Ccl2*, *Il6*), in gastrocnemius muscle were analyzed by quantitative real-time PCR. Data were normalized with *Gapdh* mRNA expression level and presented as expression levels relative to the YN group. The values represent mean \pm SD. Data were analyzed by one-way ANOVA with Duncan multiple comparison test and by two-way ANOVA (or by nonparametric statistics for those not following normal distribution). Values not sharing the same superscripted letter are significantly different at $p < 0.05$. In some cases, a two-sample Student's t test was further performed for the comparison with the AH group. * denotes significant difference between AHB group and AH group at $p < 0.05$.

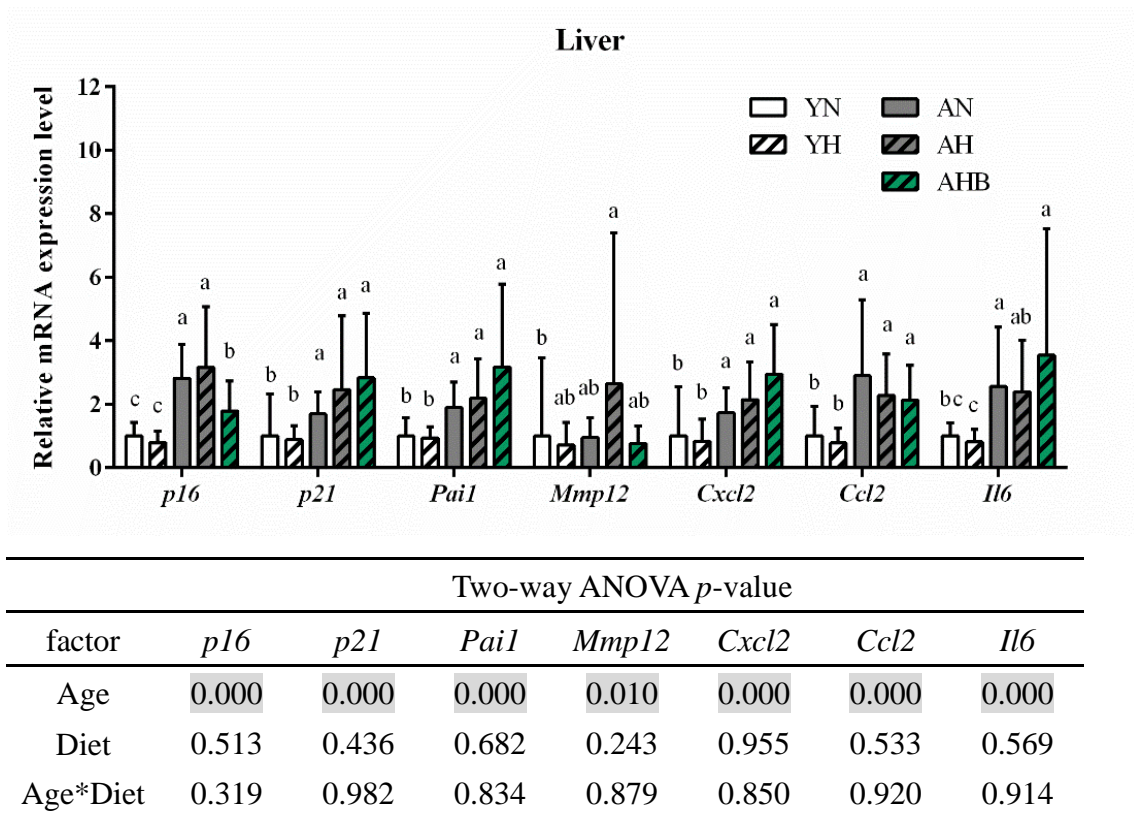


圖 3-17 受試 B6 公鼠肝臟衰老相關基因表現分析

Figure 3-17 The mRNA expression levels of genes related to senescence in liver of the tested B6 male mice.

The mRNA expression levels of genes related to senescence, including cell cycle arrest mediators (*p16*, *p21*) and senescence associated secretory phenotype (*Pai1*, *Mmp12*, *Cxcl2*, *Ccl2*, *Il6*), in gastrocnemius muscle were analyzed by quantitative real-time PCR. Data were normalized with *Actb* mRNA expression level and presented as expression levels relative to the YN group. The values represent mean \pm SD. Data were analyzed by one-way ANOVA with Duncan multiple comparison test and by two-way ANOVA (or by nonparametric statistics for those not following normal distribution). Values not sharing the same superscripted letter are significantly different at $p < 0.05$.

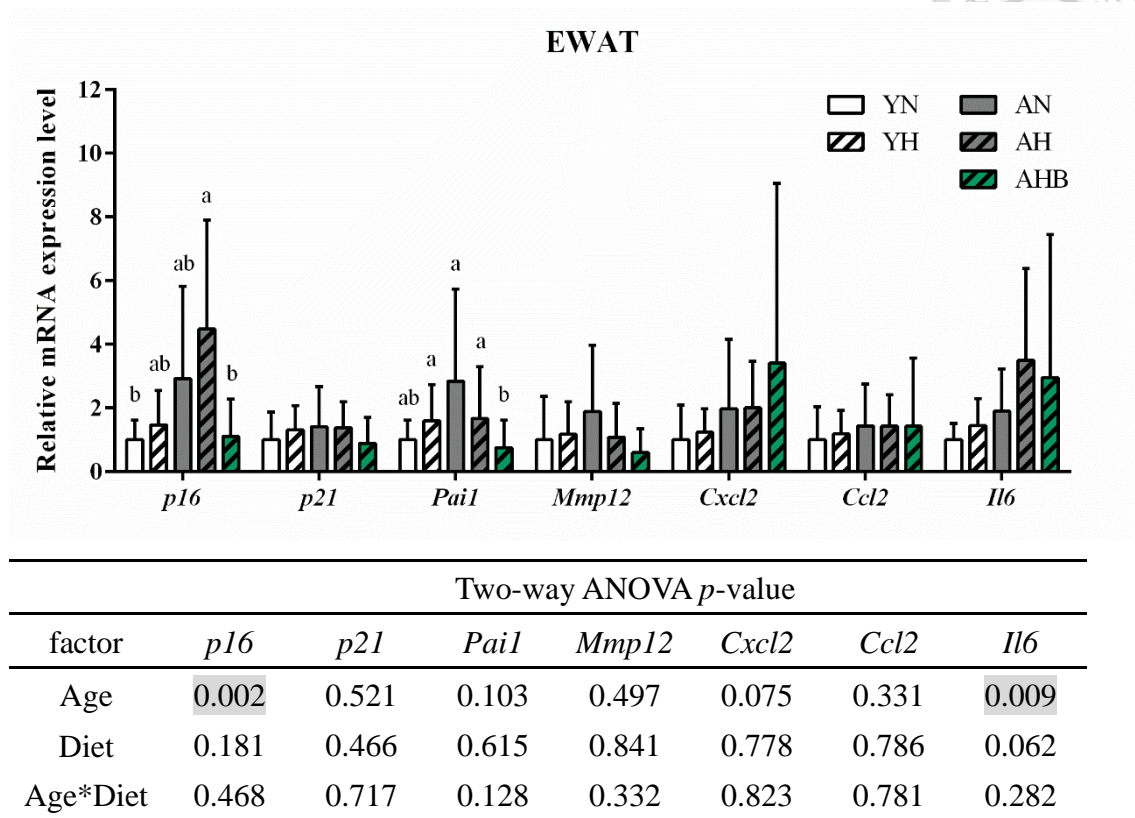


圖 3-18 受試 B6 公鼠副睪周圍白色脂肪組織衰老相關基因表現分析

Figure 3-18 The mRNA expression levels of genes related to senescence in EWAT of the tested B6 male mice.

The mRNA expression levels of genes related to senescence, including cell cycle arrest mediators (*p16*, *p21*) and senescence associated secretory phenotype (*Pai1*, *Mmp12*, *Cxcl2*, *Ccl2*, *Il6*), in epididymal white adipose tissue (EWAT) were analyzed by quantitative real-time PCR. Data were normalized with *Gapdh* mRNA expression level and presented as expression levels relative to the YN group. The values represent mean \pm SD. Data were analyzed by one-way ANOVA with Duncan multiple comparison test and by two-way ANOVA (or by nonparametric statistics for those not following normal distribution). Values not sharing the same superscripted letter are significantly different at $p < 0.05$.

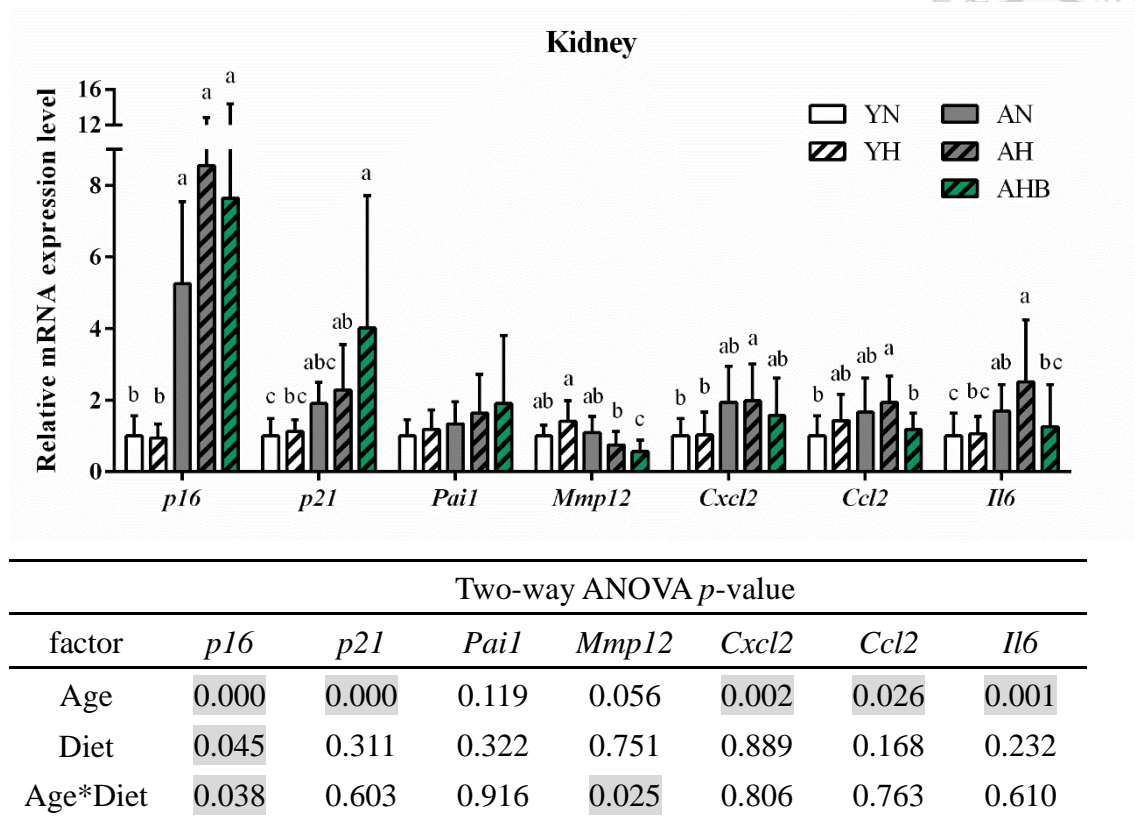


圖 3-19 受試 B6 公鼠腎臟衰老相關基因表現分析

Figure 3-19 The mRNA expression levels of genes related to senescence in kidney of the tested B6 male mice.

The mRNA expression levels of genes related to senescence, including cell cycle arrest mediators (*p16*, *p21*) and senescence associated secretory phenotype (*Pai1*, *Mmp12*, *Cxcl2*, *Ccl2*, *Il6*), in kidney were analyzed by quantitative real-time PCR. Data were normalized with *Gapdh* mRNA expression level and presented as expression levels relative to the YN group. The values represent mean \pm SD. Data were analyzed by one-way ANOVA with Duncan multiple comparison test and by two-way ANOVA (or by nonparametric statistics for those not following normal distribution). Values not sharing the same superscripted letter are significantly different at $p < 0.05$.



第四章 討論

第一節 生長、組織器官重量、及血液生化指標

一、死亡小鼠之觀察與高齡所致體重、攝食、及能量效率變化

在整個 26 週的實驗期間中，老齡鼠於 18.5 月齡開始出現死亡情形，共有 8 隻死亡，包含 AN 組及 AH 組各 3 隻，以及 AHB 組 2 隻 (圖 3-1)。實驗結束時，也就是老齡鼠 23.5 月齡時，存活率為 76%，與 Flurkey et al. (2007) 等人之研究相符。本實驗僅保留存活小鼠之實驗數據進行分析探討。

而觀察自然小鼠死亡前六週之體重、攝食、及能量效率後發現，小鼠於死亡前 1 週體重、攝食量、及能量效率皆明顯下降 (data not shown)。老年攝食量下降可能是生有重病而食慾不振，或是因活動力下降而無法自由攝食、飲水，造成血糖過低又更加虛弱的惡性循環所導致。

而研究指出，老化會伴隨著胰島素敏感度下降，且在肝臟及肌肉中皆可發現肝糖分解路徑的上調 (Houtkooper et al., 2011)。這表示著，老化狀態下對營養素的訊息不敏感，吃進去的食物無法有效轉換成能量供給細胞利用，而偏好利用身體內原先儲存的物質作為能量來源。此外，腸胃道消化吸收能力在老齡鼠中也會逐漸下降，這些都可能為導致能量效率下降的原因。而攝食量及能量效率的下降綜合起來便造就了老齡鼠中逐漸下降的體重。

觀察整個實驗期的小鼠體重、攝食、及能量效率變化 (圖 3-4、圖 3-5)。老齡鼠體重在實驗初期仍微幅上升，但體重增加幅度逐漸下降。老齡鼠體重在實驗第 22 周 (22 月齡) 時到達顛峰，之後體重開始下降。而存活老齡鼠之攝食量及能量效率在實驗期間未有明顯變化。年輕小鼠體重在實驗期間持續上升，其攝食量亦隨逐漸增加的體重而有所提升。但觀察其能量效率可發現隨著年齡增長有逐

漸下降的情形。總體來說，老年鼠具有體重高、吃的多，但能量效率低落的特徵 (表 3-1、表 3-2)。



二、老齡鼠之身體組成及血清生化指標

2.1 老齡鼠較大的體重並非來自於脂肪組織

既然老齡的影響在體重方面如此顯著且持久，我們便好奇年輕鼠及老齡鼠中身體組成差異究竟為何。觀察小鼠犧牲時之組織器官絕對及相對重量我們驚奇地發現，我們所測量的各塊脂肪組織無論是絕對重量，抑或是除以體重做校正之相對重量，在老齡鼠及年輕鼠中皆未有顯著差異 (表 3-4、表 3-7)。在先前 Mitchell et al. (2016) 等人的研究中發現，小鼠之身體組成隨著年齡不同而有所不同。B6 小鼠在 12 月齡之前脂肪組織比例增加，而 12~24 月齡間脂肪組織比例下降。本實驗之老齡鼠犧牲時為 23 月齡，應已進入脂肪流失的時期。而年輕鼠犧牲時為 9.5 月齡，推測仍處於脂肪組織比例增加的時期。

2.2 老齡鼠中可以觀察到前列腺、精囊腫大以及睪丸相對重量減少的情形

再回來觀察小鼠犧牲時之組織器官絕對及相對重量，我們發現精囊重量為老齡鼠與年輕鼠間差異最大之項目 (表 3-4、表 3-7)。老齡鼠之精囊絕對重量約為年輕鼠精囊絕對重量的 6.9 倍，而相對重量也有 6.1 倍之多。其實，早在 1974 年 Finch et al. (1974) 等人的研究中便觀察到，24 月齡以上 C57BL/6J 小鼠雙側精囊有因精液 (seminal fluid) 增多而異常腫大的現象。精囊可作為能量來源，刺激精子活動，並且具有提供免疫抑制因子等功能，對於生殖能力的維持扮演著重要角色 (Peitz, 1988)。近期的人體研究發現，在體染色體顯性多囊性腎病 (autosomal dominant polycystic kidney disease) 病人中也有精囊腫大的現象，其伴隨的精囊功能退化與精子死亡可能與不孕有關 (Zawaideh et al., 2017)。此外，我們觀察到年輕鼠之精囊為白色，而老齡鼠之精囊則可能為褐色或奶茶色。文獻指出，精囊顏色異常可能為感染或梗塞所導致 (Pettan-Brewer et al., 2011)。

精囊腫大可能原因為睪丸功能衰退而導致的二次增長的現象，此情形被認為與人類前列腺肥大相似 (Li et al., 2017)。與之相符的是，我們發現老齡鼠具有較小的睪丸相對重量 (表 3-7)，這可能暗示著有睪丸功能衰退的情形。此外，我們在老齡鼠中也觀察到前列腺絕對重量與相對重量大於年輕鼠之情形 (表 3-4、表 3-7)。前列腺增大為人類臨床研究中常見的現象，80 歲以上老齡人中有前列腺增大的人約占 90%。由於前列腺之解剖位置靠近尿道及膀胱，前列腺增大會導致老年男性排尿困難，並可能進一步導致膀胱與腎臟病變，造成腎功能損傷 (Medina et al., 1999)。

對於老年鼠與年輕鼠間體重差異有所貢獻的器官還包括肝臟、心臟、脾臟、肺臟、及腎臟等絕對重量較大的器官 (表 3-3)。然而除了肝臟之外，這些器官的相對重量在老齡鼠及年輕鼠間未看到顯著差異 (表 3-6)，顯示這些器官的重量變化幅度與體重相同。

2.3 小鼠肝臟重量及血清生化指標受高齡及高蔗糖飼料共同影響

肝臟為掌控醣類、蛋白質與脂質代謝之主要器官，可將攝食所得葡萄糖合成為肝醣進行儲存。而當吸收葡萄糖超過肝醣合成之負載力時，便會啟動脂肪酸合成機制 (de novo fatty acid synthesis)。肝臟是此實驗中唯一觀察到受高蔗糖飼料影響，且與高齡交互作用影響的器官 (表 3-3、表 3-6)。老齡與高蔗糖飼料皆顯著增加肝臟之絕對重量與相對重量，而高蔗糖飼料對於老齡小鼠之肝臟相對重量有較大的影響。我們推測，本實驗中較大的肝臟重量可能來自於肝臟脂質堆積。研究指出，老化可能透過降低 GH/IGF-1 訊息路徑、增加胰島素阻抗、促使血糖及血脂異常、增加脂肪酸合成等因素，促使肝臟中脂質堆積，為造成非酒精性脂肪肝的潛在因子 (Gong et al., 2017)。而高蔗糖飼料被認為易導致肝脂累積、增加極低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) 分泌並降低脂肪酸氧化路徑 (Cahova et al., 2012)。然而增加的肝臟重量是否確實來自於脂質堆積仍有待日後實驗證明。

我們觀察到，禁食血清三酸甘油酯濃度在老年鼠較年輕鼠低 (圖 3-6 B)，這可能可以作為肝臟脂質堆積的一個線索。Houtkooper et al. (2011) 研究團隊在老齡鼠中亦觀察到血清游離脂肪酸濃度增加，而血清三酸甘油酯濃度降低的情形。

我們觀察到老齡鼠之禁食血糖較年輕鼠低 (圖 3-6 A)，這與 C57BL/6J 小鼠具 Nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) 基因缺陷，易產生自發性高血糖 (Freeman et al., 2006) 的認知不符。因此，我們觀察各組血糖趨勢，並與本實驗其餘結果進行相關性分析後發現：禁食血糖與體脂率顯著高度正相關 ($r=0.805$; $p=0.000$) (體脂率為計算 EWAT、RWAT、IWAT、BAT 之總重量佔體重比例而得)。根據世界衛生組織 (WHO)，肥胖被定義為不正常或過量的脂肪堆積，是代謝症候群的風險因子之一。這暗示著雖然老齡鼠與年輕鼠之體脂率差異未達顯著，但其仍會造成代謝上的改變，脂肪比例高者仍可能具有較差的胰島素敏感度。

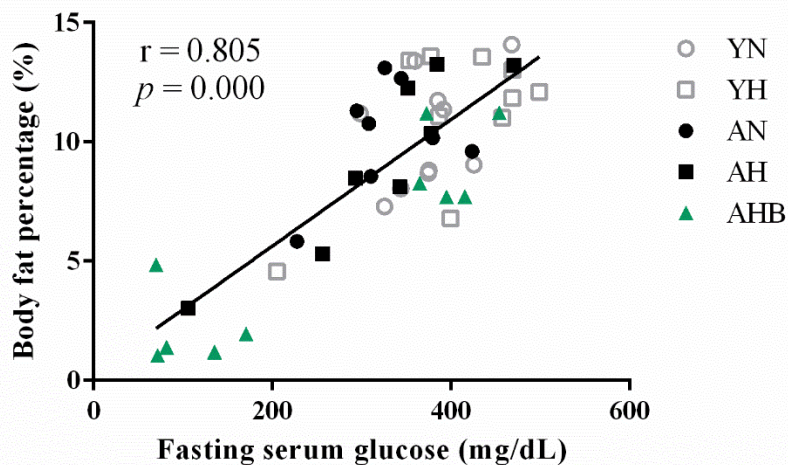


圖 4-1 受試 B6 公鼠禁食血糖與體脂率相關性分析

Figure 4-1 Correlation between fasting serum glucose and body fat percentage of tested B6 male mice

Body fat percentage was calculated as (sum of absolute weight of EWAT, RWAT, IWAT, and BAT)/body weight

先前研究發現，蔗糖較澱粉更容易造成高胰島素血症，給予高蔗糖飲食較易出現代謝異常 (Harte et al., 1999)。3 月齡 C57BL/6J 小鼠餵食 modified AIN76 diet (65% starch) 或 modified AIN76 diet (50% sucrose; 15% starch) 13 周後發現高蔗糖組小鼠有較高之體重、血糖、血脂、血清胰島素、HOMO-IR index 及肝脂 (鍾誠珠, 2009)。在血清膽固醇方面，我們觀察到高蔗糖飼料顯著提升禁食總膽固醇 (圖 3-6 C)，與先前研究相符。

三、苦瓜補充對於生長、組織器官重量、及血清生化指標之影響

3.1 苦瓜補充降低體重及脂肪組織重量

逐週觀察小鼠飼養期間之體重變化、攝食量、及能量效率發現，AHB 組小鼠於苦味適應期至實驗第 2 周之攝食量及能量效率皆有降低的情形，而這也導致體重的下降，直至實驗第 5 周才回升 (圖 3-4、圖 3-5)。此攝食量降低的情形可能是由於對於苦味之不適應。而到實驗第 8~13 週間亦可觀察到攝食量下降，然各週間並未表現出一致的能量效率差異，而此較低之攝食量也並未影響小鼠之體重。推測此時期小鼠可能因山苦瓜促進 glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 分泌而產生食慾抑制的情形。本實驗室先前發現小分子山苦瓜水萃物、富含苦味物質之區分物、及山苦瓜水解萃物可促進 STC-1 細胞株分泌 GLP-1 (白依平, 2012; 黃婷妮, 2010)，且此促進作用可被苦味受器抑制劑 probenecid 所抑制。管餵高脂飼料誘導肥胖小鼠小分子山苦瓜水萃物後可在三十分鐘內顯著降低血糖並提升血液中胰島素及 GLP-1 濃度。GLP-1 能調控腦部食慾中樞，增加飽足感並且降低食慾 (Drucker, 2007)。實驗室先前研究使用約三月齡 C57BL/6J 小鼠餵食 5% BGP in HS diet 觀察到，苦瓜補充組小鼠於實驗第 9 周開始攝食量低於餵食 HS 組別 (穆偉傑, 2014)，此攝食量下降之時間點與本實驗相符。

老齡鼠中補充 5% 山苦瓜 (AHB) 組之犧牲體重與 AH 組相比顯著較低。計算各組織對體重差異之貢獻，發現脂肪組織 (含 EWAT、RWAT、IWAT、BAT) 總和之重量差異貢獻最大，貢獻體重差異之 22%。本實驗室先前研究便指出，苦瓜活化脂肪組織中脂質代謝調節者 PPAR 家族，以及 PGC1 α 轉錄活性，增加脂肪酸氧化作用、抑制脂肪細胞分化並降低脂質堆積。也因此，苦瓜補充在多種模式下皆能夠改善小鼠肥胖情形。本實驗再次驗證了這件事情。

而貢獻體重差異第二多者為精囊，貢獻體重差異之 12%。

3.2 苦瓜補充趨勢性改善高齡所致前列腺及精囊腫大

肌少症治療方法中，新興藥物雄激素受體調節劑 (selective androgen receptor modulator, SARM) 日益受到重視。睪固酮補充可透過調節雄激素受體 (androgen receptor, AR) 改善肌肉萎縮但其具有導致前列腺癌的風險。而 SARM 則透過在不同組織間選擇性調節 AR，對於肌肉萎縮有保護作用，但卻不會促進前列腺的增生。本實驗觀察到，苦瓜可改善老齡所致精囊腫大，並降低前列腺重量至與年輕鼠相同水平 (表 3-4)。此外，苦瓜補充可以提升睪丸相對重量。綜合以上，我們或許可以推測苦瓜具有改善生殖能力的特質，並且對於前列腺癌具有保護作用。然而，先前文獻指出，持續 35 天給予大鼠 25 mg/100 g body weight 苦瓜籽乙醇萃物會抑制精子生成，降低精子數目，並導致不孕 (Naseem et al., 1998; Tumkiratiwong et al., 2014)。但也有文獻指出，山苦瓜萃取物可以抑制前列腺癌細胞 PC3 及 LNCaP 增生，並減緩前列腺癌基因轉殖鼠之前列腺癌進程 (Ru et al., 2011)。飲食補充之效果可能受劑量、補充年齡、補充時間等之影響，山苦瓜籽萃取物抑制精子生成之實驗使用的是未進入老年期之大鼠，而本實驗未對生殖能力有所評估。因此，山苦瓜補充對於老齡鼠生殖能力的影響仍有待進一步的釐清。

3.3 苦瓜補充改善高齡及高蔗糖飼料共同導致的肝臟腫大並降低血清總膽固醇

前面提到，本實驗中觀察到肝臟重量受高齡及高蔗糖飼料影響而有腫大的現象。老齡鼠中補充 5% 山苦瓜可顯著降低肝臟絕對重量，並降低肝臟相對重量至與年輕鼠無顯著差異 (表 3-3、表 3-6)。此改善肝臟腫大的現象可能與山苦瓜改善脂質代謝能力有關。實驗室先前研究指出，餵食山苦瓜可以透過活化 PPAR α 促進肝臟脂質分解相關基因表現及其他途徑減少脂質合成，降低肝臟中三酸甘油酯堆積及肝臟腫大 (董又慈, 2016)。前述實驗亦發現，苦瓜萃取物可能透過活化肝臟 LXR α 促進 Cyp7a1 表現而改善肝臟膽固醇堆積及高膽固醇血症。本實驗中肝臟脂質堆積情形有待日後實驗證實，然而我們確實觀察到苦瓜補充具有降低血清總膽固醇之效果 (圖 3-6 C)。

此外，本實驗中觀察到老齡鼠補充 5% 山苦瓜提升脾臟相對重量近兩倍之多 (表 3-6)。脾臟為與免疫及造血相關的器官。研究指出，老齡鼠中脾臟腫大的現象是由於脾外造血現象，而這可能與腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 有關 (Loukov et al., 2016)。先前研究指出，6 週齡小鼠餵食補充山苦瓜粉末飼料可以減低 LPS 誘導之敗血症反應，並且降低脾臟中包含 TNF 在內之促發炎細胞激素濃度 (Ciou et al., 2014)。我們推測，可能由於年輕及老齡老鼠體內環境不同，山苦瓜對於體內免疫反應調節具有不同的效果。然而由於本實驗並未進行體內細胞激素濃度的分析，山苦瓜是否影響老齡鼠中免疫反應仍需更多實驗來證實。



第二節 肌少症特徵探討

肌少症定義為與年齡相關的漸進式肌肉質量減少、肌力下降與功能退化 (Rosenberg, 1997)。本研究之目的為探討苦瓜是否具有改善肌少症之潛力。因此，我們在飼養期間對小鼠進行運動表現分析，包含前肢抓力及 Inverted screen test，以評估其功能退化情形。小鼠犧牲後亦進行各塊肌肉絕對及相對重量之量測。

一、老齡鼠中確實觀察到運動表現下降及肌肉萎縮的現象

抓力儀主要用於測量小鼠前肢之最大抓力，於實驗結果中我們未能觀察到各組小鼠間抓力差異 (圖 3-2 A)。老化被認為與 type II fiber 萎縮有關，type II fiber 主要負責的是高強度需要爆發力的運動。然而在需要爆發力之抓力測試上我們卻沒有看到老化帶來的差異。推測可能是因為個體差異過大，不易在樣品數少的實驗中觀察組間的差別。

另一項運動表現分析 Inverted screen test 主要是讓小鼠懸吊，以對抗其自身體重的方式評估其四肢肌力與肌耐力。Inverted screen test 中，我們很明顯可以觀察到老年鼠之網上懸吊時間及以體重校正之 Holding impulse 較年輕鼠差 (圖 3-2 B、C)。而小鼠於懸吊期間在網上的移動可能增加其體力負荷，進而降低小鼠懸吊時間。因此，我們也觀察小鼠於網上時間內之平均後腳移動次數。我們發現實驗第 12 週時，老齡鼠於網上時間內之平均後腳移動次數較年輕鼠來的低，這表示其較短之懸吊時間並非由於移動次數較高所導致，而是真正地耐力較差 (圖 3-2 D)。

將小鼠進行犧牲並觀察其肌肉重量。我們在股四頭肌及腓腸肌於老年鼠中觀察到萎縮的現象，不論是絕對重量或相對重量皆顯著低於年輕鼠 (表 3-5、表 3-8)。而肱三頭肌、比目魚肌與脛骨前肌之絕對重量雖老齡鼠與年輕鼠並無不同，然其相對重量在老齡鼠中顯著較低。這顯示老齡確實會導致肌肉流失。此肌肉流失可能源自於蛋白質生合成及降解路徑的失衡。研究顯示，老齡人對於蛋白質生

合成訊號較不敏感，飲食補充蛋白質後老年人體內的蛋白質生合成速率低於年輕人 (Welle et al., 1993)。而蛋白質分解速率則無論是在休息時或是運動後長者身上皆高於年輕人 (Raue et al., 2007)。

此外，我們觀察到對雄激素敏感之 BC 相對重量在老齡鼠中低於年輕鼠。先前研究中發現，睪固酮濃度隨著年齡增加而會有下降的情形，因此我們推測老齡鼠中較低的 BC 相對重量顯示其具有較低的睪固酮濃度，而這可能需要日後實驗進一步證實。

二、山苦瓜改善高齡造成的運動能力表現下降及肌肉流失

我們並未觀察到苦瓜補充對於前肢抓力有改善的作用 (圖 3-2 A)。而組織重量方面也發現，我們唯一量測的前肢肌肉肱三頭肌 (Triceps) 在 AHB 與 AH 組間並無顯著差異 (表 3-5、表 3-8)。

然而，苦瓜補充可以回升小鼠於實驗第 22 週時之懸吊時間及 Holding impulse，且其單位時間內後腳移動次數與 AH 組並無不同，顯示苦瓜補充有回復老化所致肌耐力降低的潛力。骨骼肌中不同型態肌纖維具有不同的代謝偏好路徑，type I fiber 偏好利用粒線體氧化磷酸化產生能量，主要參與需要肌耐力的活動。而 type II fiber 偏好利用糖解作用產生能量，主要參與需要爆發力的活動。我們推測苦瓜中肌耐力改善之情形可能來自於肌肉中粒線體活性的增加，抑或是促使肌纖維轉變，這部份討論將於後面說明。雖然我們並未觀察到 AHB 組小鼠之骨骼肌絕對重量受苦瓜補充而回升之現象，然於腓腸肌、比目魚肌、脛骨前肌及趾伸長肌之相對重量方面仍可以看到苦瓜對維持骨骼肌在身體之中之比例有所益處。

第三節 肌纖維橫截面積大小、粒線體酵素活性及 mRNA 表現分析

一、山苦瓜提升老齡小鼠粒線體 SDH 酵素活性並上調骨骼肌 *Pgcl1* 及 *Ucp2* 基因表現

粒線體為細胞的能量工廠，主要功能為進行檸檬酸循環以及氧化磷酸化產生 ATP，提供細胞能量。近年來許多證據支持粒線體功能在老化過程中扮演重要的角色。臨床研究顯示，骨骼肌粒線體氧化能力隨著年齡增長而下降，並且與行走速度有關，影響長者移動能力 (Zane et al., 2017)。本研究將肌肉組織冷凍切片進行琥珀酸脫氫酶 (succinate dehydrogenase, SDH) 酵素活性分析，結果觀察到老齡鼠之高 SDH 肌纖維比例較年輕鼠低 (圖 3-7)，顯示了其粒線體功能的衰退。mRNA 基因表現結果，我們也觀察到粒線體氧化磷酸化酵素 *Cox8b* 表現，在腓腸肌及比目魚肌中皆有受高齡下調的情形 (圖 3-9、圖 3-10)。比目魚肌中 *Cox7a1* 亦有受高齡下調的情形，這可能暗示老齡鼠氧化代謝能力較年輕鼠差。*COX7a1* 及 *COX8b* 為組成粒線體氧化磷酸化複合體 IV 的酵素蛋白質，由細胞核基因所轉錄出來 (nuclear encoded)。Rönn et al. (2008) 團隊指出，*Cox7a1* mRNA 表現量隨年齡逐漸下調的情形是由於 *Cox7a1* 啟動子在老化過程中甲基化程度上升所導致。

苦瓜補充雖可使腓腸肌中高 SDH 活性肌纖維比例回升至與年輕小鼠相同水平，其腓腸肌 *Cox7a1* mRNA 基因表現卻有下調的情形 (圖 3-9)。這暗示著可能有其他機制參與了粒線體氧化能力的調節。我們發現，腓腸肌中 *Pgcl1* 表現量受苦瓜補充而上調。*Pgcl1* 為粒線體生合成的主要調節者，透過提升 *Nrfl* 轉錄活性上調 *Tfam* 基因表現，促進粒線體生合成。然而我們並未觀察到苦瓜補充有上調粒線體生合成下游基因 *Tfam* 表現。因此，粒線體生合成作用是否介導了苦瓜補充在老齡鼠模式下對於肌肉功能的保護仍有待進一步的釐清。推測仍有其他

調節者參與了粒線體生合成之調控，抑或是 *Pgcl1*、*Nrf1*、及 *Tfam* 在粒線體生合成過程中表現的時間點不一定相同，而這需要更多實驗來進一步證實。

粒線體功能受其中各種蛋白質偕同調控。本研究結果，苦瓜補充能夠上調腓腸肌 *Ucp2* 及 *Ucp3* mRNA 表現 (圖 3-9)。UCPs 為位於粒線體內膜上之氫離子通道蛋白，能進行去耦合作用降低粒線體內外膜間氫離子濃度梯度。粒線體氧化磷酸化過程中會伴隨著 ROS 的生成，而此 ROS 生成量受粒線體內外膜間氫離子濃度所影響 (Brand et al., 2004; St-Pierre et al., 2002)。研究指出，粒線體輕度去耦合可以降低 ROS 的產生，使其較能對抗隨著年齡增長而增加的粒線體損傷 (Amara et al., 2007)。因此我們推測，腓腸肌 *Ucp2* mRNA 表現量上調有助於其粒線體 ROS 清除，並且對粒線體功能具有保護作用。亦有研究指出，*Ucp2* 表現量受脂肪酸刺激並經由 PPAR- γ 與 PGC-1 α 路徑上調 (Thompson et al., 2004; Z. Wu et al., 1999)，我們在苦瓜補充小鼠腓腸肌中觀察到同時上調的 *Pgcl1* 及 *Ucp2*，支持此一論點。

此外，研究指出代謝旺盛的小鼠具有較長的壽命，而這被認為可能來自於較旺盛的去耦合作用 (Brand, 2000; Speakman et al., 2004)。甚至有人提出高基礎代謝率 - 高存活率假說，認為 UCP 表現與存活率有關 (Azzu et al., 2017)。而 Rose et al. (2011) 等人的研究支持此一論點。老化會伴隨著基礎代謝率的下降 (Macias-Núñez et al., 2008)，或許苦瓜補充能透過上調 UCP 表現，提高基礎代謝率，並且延長壽命。本實驗由於樣本數過少無法看出苦瓜補充對於壽命的影響，或許提高樣本數及飼養時間可能可以看出一些效果。

二、山苦瓜上調第一型肌纖維指標基因 *Myh7* 表現

PGC1a 除了參與粒線體生合成路徑外，亦可調節 PPAR δ 基因表現，進而促進脂肪酸氧化作用。PGC1a 及 PPAR δ 皆被認為參與了肌纖維轉變的調控。type II fiber 中過度表現 *Pgc1a* 可使其表現出 type I fiber 的特徵，增加疲勞抵抗能力 (Lin et al., 2002a)。而骨骼肌中過度表現 *Ppard* 亦能使肌纖維轉為傾向氧化型，並上調脂肪酸氧化路徑。符合預期的是，我們發現，苦瓜補充可以上調腓腸肌中 *Ppard* 及 type I fiber 指標基因 *Myh7* mRNA 表現，並且下調 type II fiber 指標基因 *Myh4* mRNA 表現 (圖 3-12)。此結果暗示著苦瓜補充能使腓腸肌肌纖維型態轉變為偏向 type I fiber，而這可能為苦瓜補充小鼠之 Inverted screen test 表現得以維持的原因。

出乎意料的是，我們並未在老齡鼠中觀察到粒線體生合成基因下調的情形 (圖 3-9、圖 3-10)，這與多數文獻並不相符。然而，亦有文獻中觀察到老齡鼠中骨骼肌 CS 活性上升以及 BAT 中粒線體生合成上升的現象，他們認為這或許是用來維持粒線體功能的補償機制 (Houtkooper et al., 2011)。

三、山苦瓜改善老齡小鼠肌纖維大小萎縮但並未影響肌肉萎縮指標基因表現

MAFBx (*Fbxo32*) 及 MuRF1 (*Trim63*) 為肌肉中特有的 E3 ubiquitin ligase，其基因表現受轉錄因子 FoxO 的調控，常作為評估肌肉萎縮程度的指標。我們確實觀察到老齡鼠腓腸肌中 *Trim63* 表現量受上調的情形 (圖 3-15)，並且在肌纖維 CSA 分析中觀察到老齡鼠之平均肌纖維 CSA 顯著低於年輕鼠 (圖 3-7)。然而，我們觀察到苦瓜補充可提高腓腸肌大 CSA 肌纖維比例，而其肌肉萎縮指標基因卻未受影響。事實上，肌肉的維持受到肌肉生長及萎縮訊息的調控，而肌肉生長調控路徑 PI3K/Akt 路徑涉及 mTOR 及其下游 S6K1、及 4E-BP1 的磷酸化。本實驗室先前研究中發現，山苦瓜萃取物能夠偕同 IGF-1 增加 C2C12 肌肉前驅細胞中磷酸化 Akt 蛋白質表現 (黃苡慈, 2017)。然而本實驗中我們僅分析肌肉生

長調控中最上游的 *Igf1* 及 *Igflr* mRNA 基因表現，而未進行此路徑下游蛋白質磷酸化程度的評估。因此，苦瓜是否透過上調肌肉生長路徑達到改善肌肉萎縮的效果值得進一步的確認。

此外，*Fbxo32* 及 *Trim32* 此二基因之所以被認為是肌肉萎縮指標基因，乃是由於其在肌肉萎縮模式中被發現。然而或許，此二基因之上調並不一定伴隨著肌肉萎縮，如同我們實驗中所看到的。

老化被認為主要導致 type II fiber 的萎縮。我們觀察到苦瓜補充對於腓腸肌之影響較比目魚肌劇烈。腓腸肌為混合型肌肉，由 type I fiber 及 type II fiber 共同組成，但其中 type II fiber 比例較高；而比目魚肌主要由 type I fiber 組成，被認為可作為 type I fiber 的代表肌肉。Murgia et al. (2017) 研究團隊以蛋白質體學方法分析 type I fiber 及 type II fiber 中各種蛋白質在年長者及年輕人中的含量差異。結果發現，年長者之 type I fiber 蛋白質合成及降解相關蛋白含量較年輕人多，但在 type II fiber 蛋白質合成及降解相關蛋白含量則在年長者及年輕人中未有明顯差異。較好的蛋白質周轉率 (turnover rate) 可能為 type I fiber 不易隨著年齡增長而萎縮的原因 (van Wessel et al., 2010)。苦瓜補充或許能透過促進肌纖維轉為偏向 type I fiber，進而提升其蛋白質周轉率，維持骨骼肌中肌纖維 CSA 大小。

四、高齡上調肌肉、肝臟及腎臟中衰老相關基因表現

細胞衰老被認為是老化相關疾病發生的原因。永久性的週期停滯、衰老相關分泌表型的分泌 (SASP)、以及抵抗細胞凋亡的能力為衰老細胞的三個特徵。我們測量肌肉中衰老相關基因 mRNA 表現以探討苦瓜維持肌肉功能的效果是否來自於改善細胞衰老情形。本實驗中確實發現高齡會上調腓腸肌、肝臟，以及腎臟中細胞週期停滯誘導者 *p16* 與 *p21* mRNA 基因表現。且分析數個 SASP 基因表現量亦發現，腓腸肌及肝臟中 *Mmp12*、*Cxcl2*、以及 *Ccl2* mRNA 基因表現皆受高齡而上調 (圖 3-16、圖 3-17)。於肝臟中亦觀察到 *Pai1* 與 *Il6* 受高齡上調

的情形。但我們觀察苦瓜補充的效果發現，苦瓜上調腓腸肌中 *p21* 及 *Pail* mRNA 基因表現 (圖 3-16)。過去文獻中指出，*p21* 在細胞衰老初期表現，細胞衰老後 *p21* 表現量便會下降 (Sharpless et al., 2015)。苦瓜補充小鼠中腓腸肌 *p21* 的上調是否表示其具有較嚴重的細胞衰老情形？抑或是相較於其餘老齡兩組，苦瓜補充小鼠之衰老狀態處於衰老初期，才會有 *p21* mRNA 表現量受到上調的情形？我們目前為止觀察到的現象仍無法回答這個問題。然而有研究指出，在 BubR1 早衰鼠中，*p53* 藉由 *p21* 抑制前驅細胞中 *p16^{INK4a}* 所導致的細胞衰老作用，延緩骨骼肌及脂肪組織的功能退化 (Darren J. Baker et al., 2013)。

我們觀察到苦瓜補充小鼠之 *p21* mRNA 表現量之標準差極大。且我們發現五組間 *p21* 表現量與 *Ppard* 表現量分布趨勢相似。進行相關性分析後我們發現腓腸肌中 *p21* mRNA 基因表現量與 *Ppard* mRNA 基因表現量具有高度相關性 (圖 4-2)。此外，我們亦觀察到，除 AHB 外其餘四組小鼠之腓腸肌 *p16* 與 *p21* mRNA 基因表現量間具有顯著相關性 (圖 4-3 A)，然而在苦瓜補充小鼠之腓腸肌此二基因表現量上卻未觀察到此現象 (圖 4-3 B)。

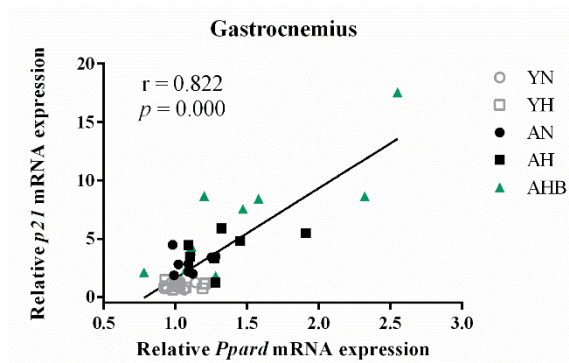


圖 4-2 受試 B6 公鼠腓腸肌中 *Ppard* 與 *p21* mRNA 基因表現量相關性分析
 Figure 4-2 Correlation between relative *Ppard* and *p21* mRNA expression level in gastrocnemius of tested B6 male mice

Data were normalized with *Gapdh* mRNA expression level and presented as expression levels relative to the YN group.

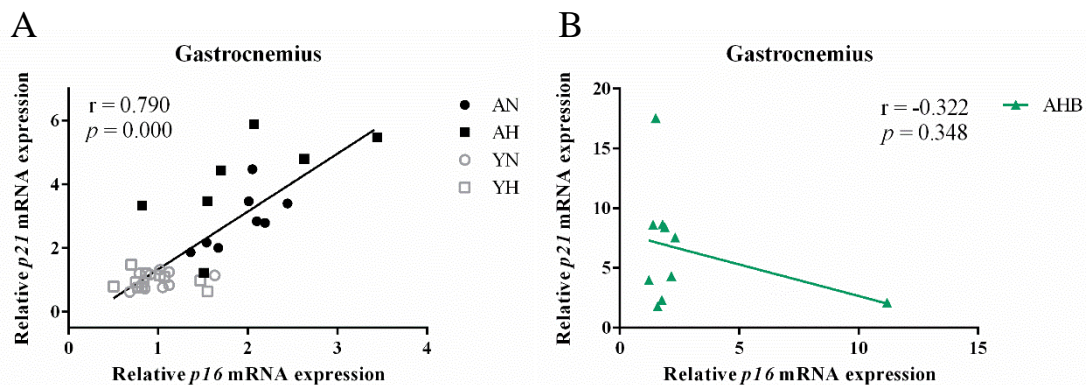


圖 4-3 受試 B6 公鼠腓腸肌中 *p16* 與 *p21* mRNA 基因表現量相關性分析
 Figure 4-3 Correlation between relative *p16* and *p21* mRNA expression level in gastrocnemius of tested B6 male mice

Correlation between relative *p16* and *p21* mRNA expression level in gastrocnemius of tested B6 male mice without (A) and only (B) AHB group. Data were normalized with *Gapdh* mRNA expression level and presented as expression levels relative to the YN group.

先前研究指出，beraprost 上調 *Ppard* 並誘導 inducible nitric oxide synthase (iNOS)，抑制主動脈平滑肌細胞增生。而 *Ppard* 在 beraprost 誘導的抗增生血管平滑肌細胞中會透過促進 cAMP-responsive element (CRE) binding protein (CREB) 進核，並進一步促進 *p21/p27* 基因表現 (Sue et al., 2009)。此外，他們在 *p21/p27* 啟動子區域 CRE 中發現具有功能的 PPAR-responsive elements (PPREs)，PPARd 在 CREB-binding protein 結合過程中會與 CREB 互相影響。這或許說明了苦瓜補充小鼠腓腸肌中 *Ppard* 與 *p21* 基因表現量具有相關性的原因。然而這也透漏著一個訊息：目前為止被認為與衰老有關的指標基因其實都各自與不同生理功能有關，而不同衰老基因受不同路徑所調控。就算我們在苦瓜補充小鼠中觀察到上調的 *p21*，其受上調的主要路徑也可能與老齡鼠中誘導 *p21* 表現量上升的主要路徑不同。

目前研究結果最一致，並且最為眾人所接受的衰老指標其實為 *p16* mRNA 表現量上調及 Senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) 活性上升。衰老細胞有 β -galactosidase 累積的情形，而其含量之多使其可以在非最強生理活性酸鹼值環境 (pH6) 中被測到活性。我們在小鼠犧牲後其實有取部分 EWAT 進行 SA- β -gal 活性測試。然而因組間差異過大，且我們未建立良好的定量方法，故未能呈現此結果。

值得注意的是，苦瓜補充顯著下調肝臟及副睪周圍白色脂肪 *p16* mRNA 基因表現 (圖 3-17、圖 3-18)。雖然前述討論中提到衰老指標的代表性仍有所爭議，然而此結果亦非無令人讚嘆之處。研究指出，去除表現 *p16* 之衰老細胞可以降低脂肪肝情形；而誘導肝細胞衰老則會導致肝脂堆積 (Ogrodnik et al., 2017)。而脂肪組織中的細胞衰老被認為與脂肪生成不良、發炎，及胰島素阻抗有關，會造成脂肪功能異常，更可能進一步導致系統性的發炎及第二型糖尿病。綜合以上，苦瓜補充對於肝臟及副睪周圍白色脂肪之衰老現象可能有減緩之效果，但仍需更多實驗證實。

第四節 綜合討論

本實驗使用不同年齡及飼料的雙因子設計，探討高齡及高蔗糖飼料對 B6 小鼠老化之影響。並且給予老齡鼠 5% (w/w) 補充山苦瓜之高蔗糖飼料以探討苦瓜補充對肌少症病徵及其可能作用機制之影響。

一、高齡、高蔗糖飼料，以及苦瓜對於小鼠各項指標之影響

高齡對於小鼠生長情形影響相當顯著，老齡鼠有較高的體重以及食物攝取量，然其體重增加量及能量效率皆顯著低於年輕鼠。觀察其響對組織器官重量發現，老齡鼠具有肝臟、前列腺及精囊腫大的現象，且其相對睪丸重量較年輕鼠低。肝臟為身體代謝主要器官，而前列腺、精囊，以及睪丸主要影響生殖能力。由此，我們可以推斷年紀對於代謝能力及生殖能力的影響甚大。而出乎意料的是，老齡鼠並未具有較重的脂肪重量，這可能是由於小鼠 12 月齡後脂肪開始流失所導致 (Mitchell et al., 2016)。抑或是在我們的模式中，相對年輕組之小鼠即將進入中老年期 (middle-aged)，也已不再「年輕」。將所有受試鼠之體脂率和進行血糖進行相關性分析發現，兩項指標具有高度正相關。這也暗示著老齡鼠較低的禁食血糖可能與體內脂肪組織比例有關。此外，老齡鼠亦具有較低的禁食血清三酸甘油酯。

而高蔗糖飼料對小鼠生長情形之影響則未如高齡顯著，僅於較重的肝臟相對重量中看到其影響，而高蔗糖飼料也降低了血清三酸甘油酯及總膽固醇。我們推測這可能與肝臟脂質代謝有關，而此推測需要更多實驗證實。

苦瓜補充回復了高齡及高蔗糖飼料導致的肝臟腫大，也改善了高齡導致的睪丸萎縮現象，並可降低血清總膽固醇 (表 4-1)。

表 4-1 高齡、高蔗糖飼料，以及苦瓜補充對於受試 B6 公鼠生長情形及血清生化指標之影響整理表

Table 4-1 The effect of aging, high sucrose diet, and BGP supplementation on the growing and serum biochemical analysis of the tested B6 male mice

	Aging	HS	BGP
Growing			
Final BW	↑	-	↓
BW gain	↓	-	-
Food intake	↑	-	-
Energy efficiency	↓	-	-
Relative tissue/organ weights			
Heart	-	-	-
Liver	↑	↑	↓
Spleen	(↑)	-	↑
Lung	-	-	-
Kidney	-	-	-
Adrenal gland	(↑)	-	-
Testis	↓	-	↑
Epididymis	-	-	-
Prostate	↑	-	-
Seminal vesicle	↑	-	-
EWAT	-	-	-
RWAT	-	-	-
IWAT	-	-	-
BAT	-	-	↓
Fasting serum biochemical analysis			
Serum glucose	↓	-	-
Serum TG	↓	↓	-
Serum TC	-	↑	↓

The effect of aging and high sucrose diet were determined by two-way ANOVA. One-way ANOVA and two-sample Student's t-test were used to determine the effect of BGP. ↑/↓ means significant increase/decrease at $p < 0.05$. (↑)/(↓) means increase/decrease at $0.01 > p > 0.05$. - means no significant difference between groups at $p < 0.05$.

表 4-2 高齡、高蔗糖飼料，以及苦瓜補充對於受試 B6 公鼠各項肌肉指標之影響整理表

Table 4-2 The effect of aging, high sucrose diet, and BGP supplementation on the various muscle parameters of the tested B6 male mice

	Aging	HS	BGP	
Relative tissue/organ weights				
BC	↓	↓	-	
LA	-	-	-	
Quadriceps	↓	-	-	
Triceps	↓	-	-	
Gastrocnemius	↓	↓	↑	
Soleus	↓	-	↑	
Tibialis anterior	↓	↓	↑	
EDL	-	-	↑	
Histochemical analysis				
Triceps	% of large CSA fibers	↓	-	↑
	Mean CSA	↓	-	(↑)
	% of high SDH activity fibers	↓	-	-
GAS	% of large CSA fibers	↓	-	↑
	Mean CSA	↓	-	-
	% of high SDH activity fibers	↓	↓	↑
TA	% of large CSA fibers	↓	↓	↑
	Mean CSA	↓	-	(↑)
	% of high SDH activity fibers	-	-	-

The effect of aging and high sucrose diet were determined by two-way ANOVA. One-way ANOVA and two-sample Student's t-test were used to determine the effect of BGP. ↑/↓ means significant increase/decrease at $p < 0.05$. (↑)/(↓) means increase/decrease at $0.01 > p > 0.05$. - means no significant difference between groups at $p < 0.05$.

表 4-3 高齡、高蔗糖飼料，以及苦瓜補充對於受試 B6 公鼠骨骼肌基因表現之影響整理表

Table 4-3 The effect of aging, high sucrose diet, and BGP supplementation on the mRNA gene expression in various skeletal muscle of the tested B6 male mice

	Gastrocnemius			Soleus			EDL		
	(Mix type)			(Type I-oxidative)			(Type II-glycolytic)		
	Aging	HS	BGP	Aging	HS	BGP	Aging	HS	BGP
Mitochondria related gene									
<i>Pgc1a</i>	↑	-	↑	-	-	-	-	-	-
<i>Nrf1</i>	-	-	-	-	-	↑	-	-	-
<i>Tfam</i>	-	-	-	-	-	-	↓	-	-
<i>Fis1</i>	(↓)	↑	↓	-	-	(↑)	(↓)	-	-
<i>Mfn1</i>	-	-	-	-	-	-	↓	-	-
<i>Mfn2</i>	-	↓	↓	-	-	-	↓	-	-
<i>Opal</i>	-	-	↓	-	-	↓	↓	-	-
<i>Ucp2</i>	-	-	↑	↑	-	-	-	-	↑
<i>Ucp3</i>	-	-	↑	-	-	-	-	-	↑
<i>Cox7a1</i>	-	-	↓	↓	-	-	-	-	-
<i>Cox8b</i>	↓	-	-	↓	-	-	↓	-	-
Fiber type related gene									
<i>Tnni1</i>	-	-	-	(↑)	-	-	-	-	-
<i>Myh7</i>	-	-	↑	-	-	-	-	-	-
<i>Myh2</i>	↓	-	-	-	-	-	-	-	↑
<i>Myh1</i>	-	-	-	(↓)	-	-	↑	-	↑
<i>Myh4</i>	-	-	↓	(↓)	-	-	↓	-	-
<i>Ppard</i>	↑	↑	↑	-	-	-	-	-	-

The effect of aging and high sucrose diet were determined by two-way ANOVA. One-way ANOVA and two-sample Student's t-test were used to determine the effect of BGP. ↑/↓ means significant increase/decrease at $p < 0.05$. (↑)/(↓) means increase/decrease at $0.01 > p > 0.05$. - means no significant difference between groups at $p < 0.05$.

表 4-4 高齡、高蔗糖飼料，以及苦瓜補充對於受試 B6 公鼠衰老基因表現之影響整理表

Table 4-4 The effect of aging, high sucrose diet, and BGP supplementation on the mRNA gene expression of senescence related genes of the tested B6 male mice

	GAS			Liver			EWAT			Kidney		
	Aging	HS	BGP	Aging	HS	BGP	Aging	HS	BGP	Aging	HS	BGP
Senescence related gene												
<i>p16</i>	↑	-	-	↑	-	↓	↑	-	↓	↑	↑	-
<i>p21</i>	↑	↑	↑	↑	-	-	-	-	-	↑	-	-
<i>Pai1</i>	-	-	↑	↑	-	-	-	-	↓	-	-	-
<i>Mmp12</i>	↑	-	-	↑	-	-	-	-	-	(↓)	-	↓
<i>Cxcl2</i>	↑	-	(↑)	↑	-	-	-	-	-	↑	-	-
<i>Ccl2</i>	↑	-	(↓)	↑	-	-	-	-	-	↑	-	↓
<i>Il6</i>	-	-	-	↑	-	-	↑	(↑)	-	↑	-	↓

The effect of aging and high sucrose diet were determined by two-way ANOVA. One-way ANOVA and two-sample Student's t-test were used to determine the effect of BGP. ↑/↓ means significant increase/decrease at $p < 0.05$. (↑)/(↓) means increase/decrease at $0.01 > p > 0.05$. - means no significant difference between groups at $p < 0.05$.

二、苦瓜改善小鼠肌少症之可能機制探討

我們首先確認了高齡會使小鼠運動能力下降並且減少其肌肉質量，使小鼠表現出肌少症之特徵。而山苦瓜補充改善老齡鼠耐力型運動 Inverted screen test 之表現，並且顯著提升後肢小腿 GAS、Soleus、TA、及 EDL 相對重量。運動能力的維持及肌肉萎縮情形之改善顯示山苦瓜補充對於肌少症有改善的作用。

我們推測山苦瓜對於肌肉功能的保護可能源自於其具有改善粒線體功能的能力，SDH 酵素活性分析結果支持此推論。*Pgc1a* 作為粒線體生合成的主要調解者，並可能與 *Ucp2* 及肌纖維型態指標等基因上調有關。苦瓜中上調的 *Pgc1a* 可能透過上調 *Ucp2* 基因表現，清除多餘的 ROS，進而改善小鼠對抗粒線體功能缺失的能力。而 *Pgc1a* 亦可能與肌纖維型態的轉變有關。偏向於 Type I fiber 的轉變可能同時增進肌肉生長及萎縮速率並且提升蛋白質周轉率，達到維持肌纖維大小的結果。

我們並未觀察到苦瓜補充下調腓腸肌中細胞衰老相關基因 mRNA 表現。然而我們發現苦瓜補充小鼠腓腸肌上調的 *p21* 與 *Ppard* mRNA 表現有關。*p21* 參與了細胞衰老，造成了細胞週期的停滯。而 *PPAR δ* 則參與了脂肪酸氧化、肌纖維型態轉變、傷口癒合等作用。此兩因子的調控對於細胞有何生理意義有待日後實驗釐清。此外，我們在苦瓜補充小鼠肝臟及副睪周圍白色脂肪中發現 *p16* mRNA 基因表現受到下調。下調的 *p16* 是否與山苦瓜在先前文獻中被看到的，改善脂肪肝及代謝異常的能力有關為日後可進行探討的方向。

三、與先前年輕小鼠餵食苦瓜模式之比較

本研究由於著重於探討山苦瓜補充對於老齡小鼠之效果，並未設計年輕小鼠給予山苦瓜補充之組別。而事實上，在本實驗室學長蔣汶龍 (2014) 等人先前研究中便有以年輕小鼠 (2.5 月齡) 為模式給予 5% BGP 補充添加於高蔗糖飼料中，餵食實驗飼料 25 週後觀察山苦瓜對於粒線體增殖之影響。山苦瓜補充於年輕小鼠及老齡小鼠肌肉中對於粒線體相關基因影響之比較如表 4-5。


本研究及先前研究同樣將山苦瓜配製於高蔗糖飼料中，並且使用 C57BL/6J 小鼠為研究模式。而兩研究之差異在於開始進行苦瓜介入的時間點，先前研究苦瓜補充時間點為小鼠 2.75 月齡時 (即將進入 mature adult 時期)；而本研究苦瓜補充時間點為小鼠 16.5 月齡時 (介於 middle-aged 至 old 之間)。此兩模式之肌肉中皆可觀察到粒線體生合成相關基因 (*Pgc1a*、*Nrf1*) 以及 *Ucp2* mRNA 基因表現受苦瓜補充而上調的情形。然而由比較表 4-5 亦可觀察到，年輕期時進行苦瓜補充與老年期開始補充相比，粒線體生合成相關基因上調情形較為全面。年輕鼠中主要由 type II fiber 組成之 DVL *Pgc1a*、*Nrf1*、及 *Tfam* mRNA 基因表現皆受苦瓜補充而上調；而老年鼠中同樣為 type II fiber 組成之 EDL 粒線體生合成相關基因卻未因苦瓜補充而有所影響，推測這可能是由於老年體內對代謝路徑敏感度下降所致。

表 4-5 山苦瓜補充對於年輕小鼠及老齡小鼠肌肉中粒線體相關基因影響之比較
 Table 4-5 The comparison of effect of BGP supplementation in the mRNA expression of mitochondria related genes in muscles of young and aging mice

Group		5% BGP in HS vs. HS			
Model	Young C57BL/6J male mice (蔣汶龍, 2014)		Aging C57BL/6J male mice (This study)		
Time of treatment	2.75-9month old (25 wk)		16.5-23month old (26wk)		
Muscle	SVL (Type I)	DVL (Type II)	GAS (Mix type)	Soleus (Type I)	EDL (Type II)
Mitochondria related gene					
<i>Pgc1a</i>	-	↑	↑	-	-
<i>Nrf1</i>	↑	↑	-	↑	-
<i>Tfam</i>	↑	↑	-	-	-
<i>Fis1</i>	↑	↑	↓	-	-
<i>Mfn1</i>	↑	↑	-	-	-
<i>Mfn2</i>	↑	↑	↓	-	-
<i>Opa1</i>	-	↑	↓	↓	-
<i>Ucp2</i>	↑	↑	↑	-	↑
<i>Ucp3</i>	-	-	↑	-	↑
<i>Cox7a1</i>	-	-	↓	-	-
<i>Cox8b</i>	↑	-	-	-	-

Data were analyzed by one-way ANOVA and by two-sample Student's t-test. ↑/↓ means significant increase/decrease between groups according to the analysis of one-way ANOVA or Student's t-test at $p < 0.05$. – means no significant difference between groups at $p < 0.05$. SVL: superficial vastus lateralis; DVL: deep vastus lateralis

四、本研究之應用潛力



本研究為初探山苦瓜補充於老齡小鼠模式中之效應，最終目的依舊期望能夠拓展山苦瓜於保健食品上的應用。因此，我們依據 Reagan-Shaw et al. (2008) 等人所提出的動物劑量與人體劑量轉換公式，換算此 5% w/w BGP 補充應用於人體上攝取量。以小鼠平均攝食量 4g 作為估算，本實驗之 5% w/w BGP 補充相當於小鼠每天攝取 0.2g BGP。苦瓜組小鼠平均體重估計為 40g，此苦瓜攝取量相當於每公斤體重小鼠每日攝取 5g BGP。考慮不同動物等效劑量換算係數，換算 60 公斤人每日攝取 50g BGP。苦瓜中水分約占 90% 重量，每日 50g BGP 攝取相當於每天攝取 500g 新鮮山苦瓜。500g 新鮮山苦瓜幾乎等於整日的蔬菜來源皆為苦瓜，這在實際應用上或許不好達成，替代方法可能可以為直接攝取苦瓜粉末或者降低攝取劑量但持續而長期的補充。事實上，在 Tsai et al. (2012) 等人以 BGP 膠囊進行補充之人體試驗中，成人每日給予 4.8g BGP 膠囊補充三個月後即可觀察到顯著改善代謝症候群之效果。而本研究使用較高劑量山苦瓜補充之原因為，本研究為初探型研究，期望能夠先確認山苦瓜於老齡引發肌少症小鼠模式中具有改善肌肉功能之效果。未來研究方向能夠進一步以不同劑量山苦瓜補充實驗來找尋有效且可行性較高之補充模式。

山苦瓜補充應用於人體之介入時間點根據 Flurkey et al. (2007) 等人建立之 C57BL/6J 小鼠與人類生命期對照表進行推算：本實驗中受試 C57BL/6J 小鼠餵食實驗飼料期間為：老年鼠 16.5~23 月齡，相當如人類 52~65 歲；年輕鼠 3~9.5 月齡，相當於人類 20~37 歲。因此，我們推斷由中年期開始進行苦瓜補充，於將近退休的年紀便可享受運動功能維持的效果，開啟人生的另一段美好旅程。

第五章 結論



高齡使小鼠表現出肌少症的特徵，苦瓜補充能夠維持運動表現並改善肌肉萎縮，對於肌少症有保護作用。苦瓜補充上調 *Pgc1a*、*Ucp2*、*Myh7* 表現，並下調 *Myh4* 表現。這顯示苦瓜可能透過提升粒線體生合成作用、增進清除自由基能力、與促使肌纖維 type II 至 type I 的轉變，改善粒線體氧化能力，並進一步減緩肌少症進程。高齡上調肌肉、肝臟，及腎臟中衰老相關基因 mRNA 表現。苦瓜補充下調肝臟及副睪周圍脂肪中 *p16* 基因表現，但並未改善肌肉中衰老相關基因 mRNA 表現。由此，苦瓜應是透過抗老化以外的路徑達到改善肌少症的效果。

本研究證實了苦瓜補充可以改善老齡鼠肌肉功能及粒線體氧化能力，而這可能是透過促進粒線體生合成、改善對抗氧化壓力之能力、及促進骨骼肌中肌纖維轉變來達成。總結來說，山苦瓜補充具有預防肌少症之潛力。

第六章 參考文獻



- Acosta, J.C., O'Loughlen, A., Banito, A., Guijarro, M.V., Augert, A., Raguz, S., & Gil, J. (2008). Chemokine Signaling via the CXCR2 Receptor Reinforces Senescence. *Cell*, 133(6), 1006-1018
- Alam, M.A., Uddin, R., Subhan, N., Rahman, M.M., Jain, P., & Reza, H.M. (2015). Beneficial role of bitter melon supplementation in obesity and related complications in metabolic syndrome. *J Lipids*, 2015, 496169
- Alcorta, D.A., Xiong, Y., Phelps, D., Hannon, G., Beach, D., & Barrett, J.C. (1996). Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(24), 13742-13747
- Amara, C.E., Shankland, E.G., Jubrias, S.A., Marcinek, D.J., Kushmerick, M.J., & Conley, K.E. (2007). Mild mitochondrial uncoupling impacts cellular aging in human muscles in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(3), 1057-1062
- Arnold, D., Matthews, P., & Radda, G. (1984). Metabolic recovery after exercise and the assessment of mitochondrial function in vivo in human skeletal muscle by means of ³¹P NMR. *Magnetic resonance in medicine*, 1(3), 307-315
- Azzu, V., & Valencak, T.G. (2017). Energy Metabolism and Ageing in the Mouse: A Mini-Review. *Gerontology*, 63(4), 327-336
- Bai, J., Li, Y., & Zhang, G. (2017). Cell cycle regulation and anticancer drug discovery. *Cancer biology & medicine*, 14(4), 348
- Baker, D.J., Childs, B.G., Durik, M., Wijers, M.E., Sieben, C.J., Zhong, J., & Pezeshki, A. (2016). Naturally occurring p16 Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*, 530(7589), 184
- Baker, D.J., Perez-Terzic, C., Jin, F., Pitel, K.S., Niederländer, N.J., Jeganathan, K., & van Deursen, J.M. (2008). Opposing roles for p16Ink4a and p19Arf in senescence and ageing caused by BubR1 insufficiency. *Nature Cell Biology*, 10, 825
- Baker, Darren J., Weaver, Robbyn L., & van Deursen, Jan M. (2013). p21 Both Attenuates and Drives Senescence and Aging in BubR1 Progeroid Mice. *Cell Reports*, 3(4), 1164-1174
- Baker, D.J., Wijshake, T., Tchkonja, T., LeBrasseur, N.K., Childs, B.G., van de Sluis, B., & van Deursen, J.M. (2011). Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*, 479(7372), 232-236

- Barrera, G., Avendaño, M., Petermann, M., de la Maza, P., Hirsch, S., Gattas, V., & Bunout, D. (2001). The Impact of Nutritional Supplementation and Resistance Training on the Health Functioning of Free-Living Chilean Elders: Results of 18 Months of Follow-up. *The Journal of nutrition*, 131(9), 2441S-2446S
- Beloina, N., Gbeassorb, M., Akpaganab, K., Hudsonc, J., Soussab, K.d., Koumaglob, K., & Arnason, J.T. (2005). Ethnomedicinal uses of *Momordicacharantia* (Cucurbitaceae) in Togo and relation to its phytochemistry and biological activity. *J Ethnopharmacol*, 96(1-2), 49–55
- Bodine, S.C., Latres, E., Baumhueter, S., Lai, V.K.-M., Nunez, L., Clarke, B.A., & Glass, D.J. (2001). Identification of Ubiquitin Ligases Required for Skeletal Muscle Atrophy. *Science*, 294(5547), 1704-1708
- Bodine, S.C., Stitt, T.N., Gonzalez, M., Kline, W.O., Stover, G.L., Bauerlein, R., & Yancopoulos, G.D. (2001). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nature Cell Biology*, 3, 1014
- Bonetto, A., Andersson, D.C., & Waning, D.L. (2015). Assessment of muscle mass and strength in mice. *BoneKEy reports*, 4, 732-732
- Bonnefoy, M., Cornu, C., Normand, S., Boutitie, F., Bugnard, F., Rahmani, A., & Laville, M. (2007). The effects of exercise and protein–energy supplements on body composition and muscle function in frail elderly individuals: a long-term controlled randomised study. *British Journal of Nutrition*, 89(5), 731-738
- Brand, M.D. (2000). Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Experimental Gerontology*, 35(6), 811-820
- Brand, M.D., Affourtit, C., Esteves, T.C., Green, K., Lambert, A.J., Miwa, S., & Parker, N. (2004). Mitochondrial superoxide: Production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(6), 755-767
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., & Greenberg, M.E. (1999). Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor. *Cell*, 96(6), 857-868
- Burke, R.E., Levine, D.N., Zajac, F.E., Tsairis, P., & Engel, W.K. (1971). Mammalian Motor Units: Physiological-Histochemical Correlation in Three Types in Cat Gastrocnemius. *Science*, 174(4010), 709-712
- Cahova, M., Dankova, H., Palenickova, E., Papackova, Z., & Kazdova, L. (2012). The Opposite Effects of High-Sucrose and High-Fat Diet on Fatty Acid Oxidation and Very Low Density Lipoprotein Secretion in Rat Model of Metabolic Syndrome. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2012, 10

- Chan, L.L., Chen, Q., Go, A.G., Lam, E.K., & Li, E.T. (2005). Reduced adiposity in bitter melon (*Momordica charantia*)-fed rats is associated with increased lipid oxidative enzyme activities and uncoupling protein expression. *J Nutr*, *135*(11), 2517-2523
- Chao, C.-Y., & Huang, C.-j. (2003). Bitter gourd (*Momordica charantia*) extract activates peroxisome proliferator-activated receptors and upregulates the expression of the acyl CoA oxidase gene in H4IIEC3 hepatoma cells. *Journal of biomedical science*, *10*(6), 782-791
- Chen, J.C., Liu, W.Q., Lu, L., Qiu, M.H., Zheng, Y.T., Yang, L.M., & Li, Z.R. (2009). Kuguacins F-S, cucurbitane triterpenoids from *Momordica charantia*. *Phytochemistry*, *70*(1), 133-140
- Childs, B.G., Baker, D.J., Wijshake, T., Conover, C.A., Campisi, J., & van Deursen, J.M. (2016). Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. *Science*, *354*(6311), 472-477
- Childs, B.G., Gluscevic, M., Baker, D.J., Laberge, R.M., Marquess, D., Dananberg, J., & van Deursen, J.M. (2017). Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nat Rev Drug Discov*, *16*(10), 718-735
- Chuang, C.-Y., Hsu, C., Chao, C.-Y., Wein, Y.-S., Kuo, Y.-H., & Huang, C.-j. (2006). Fractionation and identification of 9c, 11t, 13t-conjugated linolenic acid as an activator of PPAR α in bitter gourd (*Momordica charantia* L.). *Journal of biomedical science*, *13*(6), 763-772
- Ciou, S.-Y., Hsu, C.-C., Kuo, Y.-H., & Chao, C.-Y. (2014). Effect of wild bitter gourd treatment on inflammatory responses in BALB/c mice with sepsis. *BioMedicine*, *4*(3)
- Cooper, R., Kuh, D., Hardy, R., & Mortality Review Group. (2010). Objectively measured physical capability levels and mortality: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, *341*, c4467
- Coppé, J.-P., Patil, C.K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D.P., Goldstein, J., & Campisi, J. (2008). Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLOS Biology*, *6*(12), e301
- Cruz-Jentoft, A.J., Baeyens, J.P., Bauer, J.M., Boirie, Y., Cederholm, T., Landi, F., & Zamboni, M. (2010). Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age and Ageing*, *39*(4), 412-423
- Davis, T.A., Burrin, D.G., Fiorotto, M.L., & Nguyen, H.V. (1996). Protein synthesis in skeletal muscle and jejunum is more responsive to feeding in 7-than in 26-day-

- old pigs. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 270(5), E802-E809
- Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S.A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J.R., & Dollé, M.E. (2014). An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Developmental cell*, 31(6), 722-733
- Deutz, N.E., Pereira, S.L., Hays, N.P., Oliver, J.S., Edens, N.K., Evans, C.M., & Wolfe, R.R. (2013). Effect of β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) on lean body mass during 10 days of bed rest in older adults. *Clinical nutrition*, 32(5), 704-712
- Deutz, N.E.P., Bauer, J.M., Barazzoni, R., Biolo, G., Boirie, Y., Bosy-Westphal, A., & Calder, P.C. (2014). Protein intake and exercise for optimal muscle function with aging: recommendations from the ESPEN Expert Group. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 33(6), 929-936
- Drucker, D.J. (2007). The role of gut hormones in glucose homeostasis. *The Journal of clinical investigation*, 117(1), 24-32
- Eischen, C.M., & Lozano, G. (2014). The Mdm Network and Its Regulation of p53 Activities: A Rheostat of Cancer Risk. *Human mutation*, 35(6), 728-737
- Eley, H.L., Russell, S.T., Baxter, J.H., Mukerji, P., & Tisdale, M.J. (2007). Signaling pathways initiated by β -hydroxy- β -methylbutyrate to attenuate the depression of protein synthesis in skeletal muscle in response to cachectic stimuli. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 293(4), E923-E931
- Eren, M., Boe, A.E., Murphy, S.B., Place, A.T., Nagpal, V., Morales-Nebreda, L., & Vaughan, D.E. (2014). PAI-1-regulated extracellular proteolysis governs senescence and survival in Klotho mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(19), 7090-7095
- Finch, C.E., & Girgis, F.G. (1974). Enlarged Seminal Vesicles of Senescent C57BL/6J Mice. *Journal of Gerontology*, 29(2), 134-138
- Finck, B.N., & Kelly, D.P. (2007). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ ; Coactivator-1 (PGC-1) Regulatory Cascade in Cardiac Physiology and Disease. *Circulation*, 115(19), 2540-2548
- Flakoll, P., Sharp, R., Baier, S., Levenhagen, D., Carr, C., & Nissen, S. (2004). Effect of β -hydroxy- β -methylbutyrate, arginine, and lysine supplementation on strength, functionality, body composition, and protein metabolism in elderly women. *Nutrition*, 20(5), 445-451
- Flurkey, K., M. Curren, J., & Harrison, D.E. (2007). Chapter 20 - Mouse Models in Aging Research. In J. G. Fox, M. T. Davisson, F. W. Quimby, S. W. Barthold, C. E. Newcomer, & A. L. Smith (Eds.), *The Mouse in Biomedical Research (Second Edition)* (pp. 637-672). Burlington: Academic Press.

- Freeman, H., Shimomura, K., Cox, R.D., & Ashcroft, F.M. (2006). Nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a link between insulin secretion, glucose metabolism and oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 34(5), 806-810
- Glass, D.J. (2005). Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(10), 1974-1984
- Gong, Z., Tas, E., Yakar, S., & Muzumdar, R. (2017). Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease in aging. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 455, 115-130
- Grover, J.K., & Yadav, S.P. (2004a). Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. *J Ethnopharmacol*, 93(1), 123-132
- Grover, J.K., & Yadav, S.P. (2004b). Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 93(1), 123-132
- Grygiel-Górniak, B. (2014). Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review. *Nutrition journal*, 13, 17-17
- Hardie, D.G., & Sakamoto, K. (2006). AMPK: A Key Sensor of Fuel and Energy Status in Skeletal Muscle. *Physiology*, 21(1), 48-60
- Harte, R.A., Kirk, E.A., Rosenfeld, M.E., & LeBoeuf, R.C. (1999). Initiation of Hyperinsulinemia and Hyperleptinemia is Diet Dependent in C57BL/6 Mice. *Horm Metab Res*, 31(10), 570-575
- He, W.J., Chan, L.Y., Clark, R.J., Tang, J., Zeng, G.Z., Franco, O.L., & Tan, N.H. (2013). Novel inhibitor cystine knot peptides from *Momordica charantia*. *PLoS One*, 8(10), e75334
- Helman, A., Klochendler, A., Azazmeh, N., Gabai, Y., Horwitz, E., Anzi, S., & Nevo, Y. (2016). p16 Ink4a-induced senescence of pancreatic beta cells enhances insulin secretion. *Nature medicine*, 22(4), 412
- Herbig, U., Wei, W., Dutriaux, A., Jobling, W.A., & Sedivy, J.M. (2003). Real-time imaging of transcriptional activation in live cells reveals rapid up-regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene CDKN1A in replicative cellular senescence. *Aging Cell*, 2(6), 295-304
- Hirani, V., Blyth, F., Naganathan, V., Le Couteur, D.G., Seibel, M.J., Waite, L.M., & Cumming, R.G. (2015). Sarcopenia is associated with incident disability, institutionalization, and mortality in community-dwelling older men: the Concord Health and Ageing in Men Project. *Journal of the American Medical Directors Association*, 16(7), 607-613

- Hoare, M., Ito, Y., Kang, T.-W., Weekes, M.P., Matheson, N.J., Patten, D.A., & Narita, M. (2016). NOTCH1 mediates a switch between two distinct secretomes during senescence. *Nature Cell Biology*, *18*, 979
- Hoppeler, H., Howald, H., Conley, K., Lindstedt, S.L., Claassen, H., Vock, P., & Weibel, E.R. (1985). Endurance training in humans: aerobic capacity and structure of skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, *59*(2), 320-327
- Houtkooper, R.H., Argmann, C., Houten, S.M., Cantó, C., Jenning, E.H., Andreux, P.A., & Auwerx, J. (2011). The metabolic footprint of aging in mice. *Scientific reports*, *1*, 134-134
- Hsiao, C.-Y., Chen, Y.-M., Hsu, Y.-J., Huang, C.-C., Sung, H.-C., & Chen, S.-S. (2017). Supplementation with Hualian No. 4 wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* ser.) extract increases anti-fatigue activities and enhances exercise performance in mice. *Journal of Veterinary Medical Science*, *79*(6), 1110-1119
- Hsu, C., Hsieh, C.-L., Kuo, Y.-H., & Huang, C.-j. (2011). Isolation and Identification of Cucurbitane-Type Triterpenoids with Partial Agonist/Antagonist Potential for Estrogen Receptors from *Momordica charantia*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(9), 4553-4561
- Jacobs-El, J., Ashley, W., & Russell, B. (1993). Iix and slow myosin expression follow mitochondrial increases in transforming muscle fibers. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *265*(1), C79-C84
- Janssen, I., Heymsfield, S.B., & Ross, R. (2002). Low Relative Skeletal Muscle Mass (Sarcopenia) in Older Persons Is Associated with Functional Impairment and Physical Disability. *Journal of the American Geriatrics Society*, *50*(5), 889-896
- Jeon, O.H., Kim, C., Laberge, R.-M., Demaria, M., Rathod, S., Vasserot, A.P., & David, N. (2017). Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nature medicine*, *23*(6), 775
- Kanda, K., & Hashizume, K. (1989). Changes in properties of the medial gastrocnemius motor units in aging rats. *Journal of Neurophysiology*, *61*(4), 737-746
- Kang, T.-W., Yevsa, T., Woller, N., Hoenicke, L., Wuestefeld, T., Dauch, D., & Potapova, A. (2011). Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature*, *479*(7374), 547
- Kim, H.K., Suzuki, T., Saito, K., Yoshida, H., Kobayashi, H., Kato, H., & Katayama, M. (2012). Effects of Exercise and Amino Acid Supplementation on Body Composition and Physical Function in Community-Dwelling Elderly Japanese Sarcopenic Women: A Randomized Controlled Trial. *Journal of the American Geriatrics Society*, *60*(1), 16-23

- Kim, T.N., & Choi, K.M. (2013). Sarcopenia: Definition, Epidemiology, and Pathophysiology. *J Bone Metab*, 20(1), 1-10
- Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M.R., Kovalev, G.I., Al-Regaiey, K., Su, L., & Sharpless, N.E. (2004). Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest*, 114(9), 1299-1307
- Kubola, J., & Siriamornpun, S. (2008). Phenolic contents and antioxidant activities of bitter melon (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro. *Food Chem*, 110(4), 881-890
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L.C.W., Douma, S., van Doorn, R., Desmet, C.J., & Peeper, D.S. (2008). Oncogene-Induced Senescence Relayed by an Interleukin-Dependent Inflammatory Network. *Cell*, 133(6), 1019-1031
- Kunkel, S.D., Suneja, M., Ebert, S.M., Bongers, K.S., Fox, D.K., Malmberg, S.E., & Adams, C.M. (2011). mRNA expression signatures of human skeletal muscle atrophy identify a natural compound that increases muscle mass. *Cell Metabolism*, 13(6), 627-638
- Larsson, L., Edstrom, L., Lindgren, B., Gorza, L., & Schiaffino, S. (1991). MHC composition and enzyme-histochemical and physiological properties of a novel fast-twitch motor unit type. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 261(1), C93-C101
- Li, D., Meng, L., Xu, T., Su, Y., Liu, X., Zhang, Z., & Wang, X. (2017). RIPK1-RIPK3-MLKL-dependent necrosis promotes the aging of mouse male reproductive system. *Elife*, 6, e27692
- Lin, J., Wu, H., Tarr, P.T., Zhang, C.-Y., Wu, Z., Boss, O., & Spiegelman, B.M. (2002a). Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*, 418(6899), 797-801
- Lin, J., Wu, H., Tarr, P.T., Zhang, C.-Y., Wu, Z., Boss, O., & Spiegelman, B.M. (2002b). Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*, 418, 797
- Liu, J.Q., Chen, J.C., Wang, C.F., & Qiu, M.H. (2009). New cucurbitane triterpenoids and steroidal glycoside from *Momordica charantia*. *Molecules*, 14(12), 4804-4813
- Loukov, D., Naidoo, A., Puchta, A., Marin, J.L.A., & Bowdish, D.M. (2016). Tumor necrosis factor drives increased splenic monopoiesis in old mice. *Journal of leukocyte biology*, 100(1), 121-129
- Lu, K.-N., Hsu, C., Chang, M.-L., & Huang, C.-j. (2013). Wild bitter melon increased metabolic rate and up-regulated genes related to mitochondria biogenesis and UCP-1 in mice. *Journal of Functional Foods*, 5(2), 668-678

- LUQUET, S., LOPEZ-SORIANO, J., HOLST, D., FREDENRICH, A., MELKI, J., RASSOULZADEGAN, M., & GRIMALDI, P.A. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor δ controls muscle development and oxidative capability. *The FASEB Journal*, 17(15), 2299-2301
- Macías-Núñez, J.-F., Ribera Casado, J.-M., del Rey, M.d.l.F., Quiroga, G.B., Tresguerres, J.A.F., Ariznavarreta, C., & López-Novoa, J.M. (2008). Biology of the Aging Process and Its Clinical Consequences. In J. F. MachasNúñez, J. S. Cameron, & D. G. Oreopoulos (Eds.), *The Aging Kidney in Health and Disease* (pp. 55-91). Boston, MA: Springer US.
- Matsakas, A., & Patel, K. (2009). Skeletal muscle fibre plasticity in response to selected environmental and physiological stimuli. *Histology and histopathology*, 24(5), 611-629
- Medina, J.J., Parra, R.O., & Moore, R.G. (1999). BENIGN PROSTATIC HYPERPLASIA (THE AGING PROSTATE). *Medical Clinics of North America*, 83(5), 1213-1229
- Mishra, P., Varuzhanyan, G., Pham, Anh H., & Chan, David C. (2015). Mitochondrial Dynamics Is a Distinguishing Feature of Skeletal Muscle Fiber Types and Regulates Organellar Compartmentalization. *Cell Metabolism*, 22(6), 1033-1044
- Mitchell, S.J., Madrigal-Matute, J., Scheibye-Knudsen, M., Fang, E., Aon, M., González-Reyes, J.A., & de Cabo, R. (2016). Effects of Sex, Strain, and Energy Intake on Hallmarks of Aging in Mice. *Cell Metabolism*, 23(6), 1093-1112
- Muoio, D.M., MacLean, P.S., Lang, D.B., Li, S., Houmard, J.A., Way, J.M., & Kraus, W.E. (2002). Fatty acid homeostasis and induction of lipid regulatory genes in skeletal muscles of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α knock-out mice evidence for compensatory regulation by PPAR δ . *Journal of Biological Chemistry*, 277(29), 26089-26097
- Murgia, M., Toniolo, L., Nagaraj, N., Ciciliot, S., Vindigni, V., Schiaffino, S., & Mann, M. (2017). Single Muscle Fiber Proteomics Reveals Fiber-Type-Specific Features of Human Muscle Aging. *Cell Reports*, 19(11), 2396-2409
- Narkar, V.A., Downes, M., Yu, R.T., Emblar, E., Wang, Y.-X., Banayo, E., & Evans, R.M. (2008). AMPK and PPAR δ Agonists Are Exercise Mimetics. *Cell*, 134(3), 405-415
- Naseem, M.Z., Patil, S.R., Patil, S.R., Ravindra, & Patil, S.B. (1998). Antispermatic and androgenic activities of Momordica charantia (Karela) in albino rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 61(1), 9-16
- Nielsen, F.H., Reeves, P.G., & Fahey, G.C., Jr. (1993). AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc

- Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *The Journal of nutrition*, 123(11), 1939-1951
- O'Neill, H.M., Maarbjerg, S.J., Crane, J.D., Jeppesen, J., Jørgensen, S.B., Schertzer, J.D., & Steinberg, G.R. (2011). AMP-activated protein kinase (AMPK) beta1beta2 muscle null mice reveal an essential role for AMPK in maintaining mitochondrial content and glucose uptake during exercise. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(38), 16092-16097
- Ogrodnik, M., Miwa, S., Tchkonina, T., Tiniakos, D., Wilson, C.L., Lahat, A., & Jurk, D. (2017). Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. *Nature Communications*, 8(1), 15691
- Ohtani, N., Zebedee, Z., Huot, T.J.G., Stinson, J.A., Sugimoto, M., Ohashi, Y., & Hara, E. (2001). Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature*, 409, 1067
- Pedersen, B.K., & Febbraio, M.A. (2012). Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nature Reviews Endocrinology*, 8, 457
- Peitz, B. (1988). Effects of seminal vesicle fluid components on sperm motility in the house mouse. *Reproduction*, 83(1), 169-176
- Peter, J.B., Barnard, R.J., Edgerton, V.R., Gillespie, C.A., & Stempel, K.E. (1972). Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry*, 11(14), 2627-2633
- Pettan-Brewer, C., & Treuting, P.M. (2011). Practical pathology of aging mice. *Pathobiology of aging & age related diseases*, 1, 10.3402/pba.v3401i3400.7202
- Picca, A., Calvani, R., Leeuwenburgh, C., Coelho-Junior, H.J., Bernabei, R., Landi, F., & Marzetti, E. (2019). Targeting mitochondrial quality control for treating sarcopenia: lessons from physical exercise. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 23(2), 153-160
- Röckl, K.S.C., Hirshman, M.F., Brandauer, J., Fujii, N., Witters, L.A., & Goodyear, L.J. (2007). Skeletal Muscle Adaptation to Exercise Training. *AMP-Activated Protein Kinase Mediates Muscle Fiber Type Shift*, 56(8), 2062-2069
- Rönn, T., Poulsen, P., Hansson, O., Holmkvist, J., Almgren, P., Nilsson, P., & Ling, C. (2008). Age influences DNA methylation and gene expression of COX7A1 in human skeletal muscle. *Diabetologia*, 51(7), 1159
- Raue, U., Slivka, D., Jemiolo, B., Hollon, C., & Trappe, S. (2007). Proteolytic Gene Expression Differs At Rest and After Resistance Exercise Between Young and Old Women. *The Journals of Gerontology: Series A*, 62(12), 1407-1412
- Reagan-Shaw, S., Nihal, M., & Ahmad, N. (2008). Dose translation from animal to human studies revisited. *The FASEB Journal*, 22(3), 659-661

- Reeves, P.G., Nielsen, F.H., & Fahey, G.C., Jr. (1993). AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *The Journal of nutrition*, 123(11), 1939-1951
- Rose, G., Crocco, P., De Rango, F., Montesanto, A., & Passarino, G. (2011). Further support to the uncoupling-to-survive theory: the genetic variation of human UCP genes is associated with longevity. *PloS one*, 6(12), e29650-e29650
- Rosenberg, I.H. (1997). Sarcopenia: origins and clinical relevance. *The Journal of nutrition*, 127(5), 990S-991S
- Ru, P., Steele, R., Nerurkar, P.V., Phillips, N., & Ray, R.B. (2011). Bitter melon extract impairs prostate cancer cell-cycle progression and delays prostatic intraepithelial neoplasia in TRAMP model. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*, 4(12), 2122-2130
- Rudin, C.M., Hann, C.L., Garon, E.B., De Oliveira, M.R., Bonomi, P.D., Camidge, D.R., & Ramalingam, S.S. (2012). Phase II study of single-agent navitoclax (ABT-263) and biomarker correlates in patients with relapsed small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 18(11), 3163-3169
- Sakuma, K., & Yamaguchi, A. (2012). Novel intriguing strategies attenuating to sarcopenia. *Journal of aging research*, 2012
- Sandri, M., Lin, J., Handschin, C., Yang, W., Arany, Z.P., Lecker, S.H., & Spiegelman, B.M. (2006). PGC-1 α protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(44), 16260-16265
- Sayer, A.A., Dennison, E.M., Syddall, H.E., Gilbody, H.J., Phillips, D.I.W., & Cooper, C. (2005). Type 2 Diabetes, Muscle Strength, and Impaired Physical Function. *The tip of the iceberg?*, 28(10), 2541-2542
- Scarpulla, R.C. (2008). Transcriptional Paradigms in Mammalian Mitochondrial Biogenesis and Function. *Physiological Reviews*, 88(2), 611-638
- Schiaffino, S., & Reggiani, C. (2011). Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles. *Physiological Reviews*, 91(4), 1447-1531
- Schrepfer, E., & Scorrano, L. (2016). Mitofusins, from Mitochondria to Metabolism. *Molecular Cell*, 61(5), 683-694
- Serrano, M., Hannon, G.J., & Beach, D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, 366(6456), 704-707
- Sharpless, N.E., & Sherr, C.J. (2015). Forging a signature of in vivo senescence. *Nat Rev Cancer*, 15(7), 397-408

- Shavlakadze, T., & Grounds, M. (2006). Of bears, frogs, meat, mice and men: complexity of factors affecting skeletal muscle mass and fat. *BioEssays*, 28(10), 994-1009
- Shigemoto, K., Motohashi, N., & Mori, S. (2015). *Metabolic plasticity in sarcopenia* (Vol. 4).
- Shih, C.-C., Lin, C.-H., Lin, W.-L., & Wu, J.-B. (2009). Momordica charantia extract on insulin resistance and the skeletal muscle GLUT4 protein in fructose-fed rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 123(1), 82-90
- Shiloh, Y., & Ziv, Y. (2013). The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14(4), 197
- Sinacore, D.R., Binder, E.F., Holloszy, J.O., Steger-May, K., Schechtman, K.B., Yarasheski, K.E., & Brown, M. (2005). Effects of Progressive Resistance Training on Body Composition in Frail Older Adults: Results of a Randomized, Controlled Trial. *The Journals of Gerontology: Series A*, 60(11), 1425-1431
- Sousa-Victor, P., Gutarra, S., García-Prat, L., Rodriguez-Ubreva, J., Ortet, L., Ruiz-Bonilla, V., & Muñoz-Cánoves, P. (2014). Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence. *Nature*, 506, 316
- Spamer, C., & Pette, D. (1977). Activity patterns of phosphofructokinase, glyceraldehydephosphate dehydrogenase, lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase in microdissected fast and slow fibres from rabbit psoas and soleus muscle. *Histochemistry*, 52(3), 201-206
- Speakman, J.R., Talbot, D.A., Selman, C., Snart, S., McLaren, J.S., Redman, P., & Brand, M.D. (2004). Uncoupled and surviving: individual mice with high metabolism have greater mitochondrial uncoupling and live longer. *Aging Cell*, 3(3), 87-95
- St-Pierre, J., Buckingham, J.A., Roebuck, S.J., & Brand, M.D. (2002). Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Biological Chemistry*, 277(47), 44784-44790
- Stitt, T.N., Drujan, D., Clarke, B.A., Panaro, F., Timofeyva, Y., Kline, W.O., & Glass, D.J. (2004). The IGF-1/PI3K/Akt Pathway Prevents Expression of Muscle Atrophy-Induced Ubiquitin Ligases by Inhibiting FOXO Transcription Factors. *Molecular Cell*, 14(3), 395-403
- Storer, M., Mas, A., Robert-Moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, M.C., Di Giacomo, V., & Sharpe, J. (2013). Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell*, 155(5), 1119-1130
- Stout, J.R., Smith-Ryan, A.E., Fukuda, D.H., Kendall, K.L., Moon, J.R., Hoffman, J.R., & Mustad, V.A. (2013). Effect of calcium β -hydroxy- β -methylbutyrate (CaHMB) with and without resistance training in men and women 65+ yrs: A

- randomized, double-blind pilot trial. *Experimental Gerontology*, 48(11), 1303-1310
- Sue, Y.-M., Chung, C.-P., Lin, H., Chou, Y., Jen, C.-Y., Li, H.-F., & Juan, S.-H. (2009). PPAR δ -mediated p21/p27 induction via increased CREB-binding protein nuclear translocation in beraprost-induced antiproliferation of murine aortic smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 297(2), C321-C329
- Suetta, C., Andersen, J.L., Dalgas, U., Berget, J., Koskinen, S., Aagaard, P., & Kjaer, M. (2008). Resistance training induces qualitative changes in muscle morphology, muscle architecture, and muscle function in elderly postoperative patients. *Journal of Applied Physiology*, 105(1), 180-186
- TaiwanMouseClinic. Grip Strength. Retrieved from <http://tmc.sinica.edu.tw/grip.html>
- Tan, M.J., Ye, J.M., Turner, N., Hohnen-Behrens, C., Ke, C.Q., Tang, C.P., & Ye, Y. (2008). Antidiabetic activities of triterpenoids isolated from bitter melon associated with activation of the AMPK pathway. *Chem Biol*, 15(3), 263-273
- Tang, J.J., Shen, C., & Lu, Y.J. (2006). Requirement for pre-existing of p21 to prevent doxorubicin-induced apoptosis through inhibition of caspase-3 activation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 291(1), 139-144
- Thompson, M.P., & Kim, D. (2004). Links between fatty acids and expression of UCP2 and UCP3 mRNAs. *FEBS Letters*, 568(1), 4-9
- Tieland, M., Dirks, M.L., van der Zwaluw, N., Verdijk, L.B., Van De Rest, O., de Groot, L.C., & Van Loon, L.J. (2012). Protein supplementation increases muscle mass gain during prolonged resistance-type exercise training in frail elderly people: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of the American Medical Directors Association*, 13(8), 713-719
- Tsai, C.-H., Chen, E.C.-F., Tsay, H.-S., & Huang, C.-j. (2012). Wild bitter gourd improves metabolic syndrome: a preliminary dietary supplementation trial. *Nutrition journal*, 11, 4-4
- Tumkiratiwong, P., Ploypattarapinyo, R., Pongchairerk, U., & Thong-Asa, W. (2014). Reproductive toxicity of *Momordica charantia* ethanol seed extracts in male rats. *Iranian journal of reproductive medicine*, 12(10), 695-704
- van Wessel, T., de Haan, A., van der Laarse, W.J., & Jaspers, R.T. (2010). The muscle fiber type-fiber size paradox: hypertrophy or oxidative metabolism? *European journal of applied physiology*, 110(4), 665-694
- Ventura-Clapier, R., Moulin, M., Piquereau, J., Lemaire, C., Mericskay, M., Veksler, V., & Garnier, A. (2017). Mitochondria: a central target for sex differences in pathologies. *Clinical Science*, 131(9), 803-822

- von Haehling, S., Morley, J.E., & Anker, S.D. (2010). An overview of sarcopenia: facts and numbers on prevalence and clinical impact. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, 1(2), 129-133
- Wang, C.-L., Kung, H.-N., Wu, C.-H., & Huang, C.-j. (2019). Dietary wild bitter gourd displays selective androgen receptor modulator like activity and improves the muscle decline of orchidectomized mice. *Food & Function*
- Wang, Y.-X., Zhang, C.-L., Yu, R.T., Cho, H.K., Nelson, M.C., Bayuga-Ocampo, C.R., & Evans, R.M. (2004). Regulation of Muscle Fiber Type and Running Endurance by PPAR δ . *PLOS Biology*, 2(10), e294
- Welle, S., Thornton, C., Jozefowicz, R., & Statt, M. (1993). Myofibrillar protein synthesis in young and old men. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 264(5), E693-E698
- Whitehead, J.C., Hildebrand, B.A., Sun, M., Rockwood, M.R., Rose, R.A., Rockwood, K., & Howlett, S.E. (2014). A clinical frailty index in aging mice: comparisons with frailty index data in humans. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 69(6), 621-632
- WHO. Obesity. Retrieved from <https://www.who.int/topics/obesity/en/>
- Wong, E.S.M., Le Guezennec, X., Demidov, O.N., Marshall, N.T., Wang, S.T., Krishnamurthy, J., & Bulavin, D.V. (2009). p38MAPK Controls Expression of Multiple Cell Cycle Inhibitors and Islet Proliferation with Advancing Age. *Developmental cell*, 17(1), 142-149
- Wu, I.-C., Lin, C.-C., Hsiung, C.A., Wang, C.-Y., Wu, C.-H., Chan, D.-C.D., & Hsu, C.-C. (2014). Epidemiology of sarcopenia among community-dwelling older adults in Taiwan: A pooled analysis for a broader adoption of sarcopenia assessments. *Geriatrics & Gerontology International*, 14(S1), 52-60
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., & Spiegelman, B.M. (1999). Mechanisms Controlling Mitochondrial Biogenesis and Respiration through the Thermogenic Coactivator PGC-1. *Cell*, 98(1), 115-124
- Xu, M., Pirtskhalava, T., Farr, J.N., Weigand, B.M., Palmer, A.K., Weivoda, M.M., & Kirkland, J.L. (2018). Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med*
- Yen, P.H., Dung, D.T., Nhiem, N.X., Anh Hle, T., Hang, D.T., Yen, D.T., & Van Kiem, P. (2014). Cucurbitane-type triterpene glycosides from the fruits of *Momordica charantia*. *Nat Prod Commun*, 9(3), 383-386
- Yosef, R., Pilpel, N., Tokarsky-Amiel, R., Biran, A., Ovadya, Y., Cohen, S., & Condiotti, R. (2016). Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nature Communications*, 7, 11190

- Zammit, P.S., Partridge, T.A., & Yablonka-Reuveni, Z. (2006). The Skeletal Muscle Satellite Cell: The Stem Cell That Came in From the Cold. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 54(11), 1177-1191
- Zane, A.C., Reiter, D.A., Shardell, M., Cameron, D., Simonsick, E.M., Fishbein, K.W., & Ferrucci, L. (2017). Muscle strength mediates the relationship between mitochondrial energetics and walking performance. *Aging Cell*, 16(3), 461-468
- Zawaideh, J.P., Russo, R., & Derchi, L.E. (2017). Enlarged seminal vesicles as an initial presentation of polycystic kidney disease. *Kidney International*, 91(5), 1258
- Zhang, Y., Gao, Y., Zhang, G., Huang, S., Dong, Z., Kong, C., & Liang, Q. (2011). DNMT3a plays a role in switches between doxorubicin-induced senescence and apoptosis of colorectal cancer cells. *International journal of cancer*, 128(3), 551-561
- 白依平. (2012). 山苦瓜萃取物暨其區分物及一些苦味分子對腸道內分泌細胞株 STC-1 分泌 GLP-1 之影響, (碩士論文), 國立臺灣大學生命科學院生化科技學系.
- 周怡君. (2010). 以脂肪與肌肉細胞模式評估山苦瓜水萃取物暨其區分物對細胞汲取葡萄糖之影響與其機制探討, (博士論文), 國立臺灣大學生命科學院生化科技學系.
- 黃苡慈. (2017). 山苦瓜萃取物協助 IGF-1 透過 PI3K/Akt 路徑促進小鼠骨骼肌前驅細胞生長, (碩士論文), 國立臺灣大學生命科學院生化科技學系.
- 黃婷妮. (2010). 山苦瓜萃取物暨其區分物之腸泌素效應, (碩士論文), 國立臺灣大學生命科學院生化科技學系.
- 董又慈. (2016). 山苦瓜改善高脂飲食誘發小鼠代謝異常、脂肪肝與肝相關基因 mRNA 表現, (碩士論文), 國立臺灣大學生命科學院生化科技學系.
- 臺灣內政部統計處. (2018). 107 年底人口結構分析. Retrieved from
- 蔣汶龍. (2014). 探討山苦瓜對飲食誘導肥胖模式小鼠骨骼肌粒線體增殖之影響, (碩士論文), 國立臺灣大學生命科學院生化科技學系.
- 穆偉健. (2014). 山苦瓜上調 C57BL/6J 小鼠肝 Fgf21 mRNA 並誘發副睪脂褐化, (碩士論文), 國立臺灣大學生命科學院生化科技學系.
- 鍾誠珠. (2009). 代謝症候群動物模式之評估探討, (碩士論文), 國立臺灣大學生命科學院生化科技學系.