

國立臺灣大學生物資源暨農學院食品科技研究所

碩士論文

Graduate Institute of Food Science and Technology

College of Bioresources and Agriculture

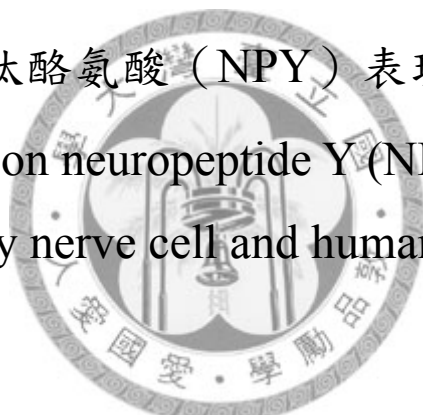
National Taiwan University

Master Thesis

香料物質對嗅覺神經細胞與人體血漿中

神經胜肽酪氨酸 (NPY) 表現之影響

Effects of spices on neuropeptide Y (NPY) expression in
olfactory nerve cell and human plasma



吳帛儒

Po-Ju Wu

指導教授：蔣丙煌 博士

Advisor: Been-Huang Chiang, Ph.D.

中華民國 98 年 7 月

July 2009

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

香料物質對嗅覺神經細胞與人體血漿中
NPY 表現之影響

Effects of spices on neuropeptide Y expression in olfactory nerve
cell and human plasma

本論文係吳帛儒君（R96641002）在國立臺灣大學食品科技研究所完成之碩士學位論文，於民國 98 年 07 月 15 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

莊石垣

（指導教授）

羅翹棧

謝子乙

張希培

許輔

系主任、所長

葉文義

謝誌

圍繞食科所的鳳凰花燦爛綻放，心中沉沉地壓力亦隨之獲得紓解。就讀食科所的日子裡感謝身旁的老師、家人、同學及朋友讓我在與人相處、學術研究與生活態度上有許多的成長。首先感謝我的指導教授 蔣丙煌 博士 在這兩年中對於學生論文研究上之諄諄教誨。在公務繁忙之餘老師您總是有耐心地聽我訴說研究上的困難並指引我許多可以解決問題的方法。每週六的 meeting 讓我們有更多的時間與老師共同分享生活點滴與美食品嚐。亦感謝免疫所繆希椿老師、園藝所許輔老師與食科所羅翊禎老師及謝淑貞老師悉心的指導學生論文。

除此之外，感謝育蔚學長在實驗上及生活上的幫忙與協助，學長還常常幫我們買午餐真的很感動；Dipali 與 Rakesh 謝謝你們總是和我分享許多有趣之事物，送舊印度風令人印象深刻；潘學長 謝謝你總是給予我實驗上的幫忙，也真的好恭喜你有個可愛的女兒囉！秀如學姊 感謝妳常聽我分享許多事情並給予我許多之建議和目標；柏憲學長 感謝你常以幽默風趣的話語逗著我們哈哈大笑紓解實驗上之壓力，亦在做實驗之餘舉辦令人印象深刻之活動；小薇學姊 感謝妳帶領我一起學實驗、拼實驗及討論實驗、分享研究上之喜怒哀樂及給予我許多生活上及找工作上之幫忙；仟琦學姊 謝謝妳總是與我們分享許多之經歷，畢業典禮那天小熊熊花真的令我好感動。超級貼心之雯婷 最最感謝的人就是妳，謝謝妳在我研究所生涯總是不厭其煩地聽我分享生活上的喜怒哀樂並給予鼓勵與支持。我會好懷念與妳共同修課、討論事宜及一起歡樂的時光；同班六年具有海大不倒千杯不醉封號之嘉慶 感謝你常聽我碎碎唸、一起懷念海大時光及在生活上貼心的照顧；郁筑 謝謝妳總是會提醒我許多的事情，在實驗上的分享讓我們都更有動力的去堅持與完成；松立 總是很感謝你在許多活動上及軟體上之幫忙。穎群 謝謝你總是幫我許多的忙，你的冷笑話總讓我可以解解夏天之炙熱 哈；佳雯 妳的直爽個性總讓我啼笑皆非、妳的好手藝總讓我很稱羨呢！苓瑋 謝謝妳總與我分享許多有趣的事情，旅行的意義及對未來生活的憧憬激勵我們都要更努力唷！亦感謝育諄學長與瑜珈課之夥伴芳琪學姊於生活上的分享及勉勵、咖啡王子志杰學長總讓我品嚐美味的咖啡。怡如學姊和遠在巴拉圭的子寧學長感謝你們對於我生活上的勉勵。

感謝是學姊亦是好朋友之依潔及小虎於研究所期間的分享及鼓勵；朋友凱如總給予精神的勉勵與支持，不同環境但是相同的生活步調讓我們依然保有革命般的情感。意今、芝瑋、怡文、郁淨、瓊文、淑芳、雅方及薇心謝謝你們常常關心我，不定期之聚餐總為我帶來許多之動力。

最後，由衷感謝我的家人給予我精神層面的支持，幽默且願意為子女付出的爸爸及媽媽總讓家裡充滿歡笑與溫馨，大姐二姐弟弟有你們的關心與陪伴真的很窩心。另外，宗穎 有你在身旁的支持總讓我有更多的信心去面對難題。謹此論文獻上所有我愛的老師、家人、同學及朋友們。

摘要

NPY為神經胜肽酪氨酸 (neuropeptide tyrosine) 之簡稱，由36個胺基酸所組成，廣泛地分布在中樞神經與周邊神經系統，是一種能促進食慾之胜肽。在2005年Shen等人發現葡萄柚精油及其組成分檸檬油烯(limonene) 能抑制動物之食慾，而薰衣草精油及其主成分沈香醛(linanool) 則增加動物之食慾，故推測香氣成分能刺激或抑制嗅覺神經分泌NPY，進而影響攝食行為。

本實驗室之前的研究發現，以檸檬油烯及沈香醛處理培養兩天之大鼠嗅覺細胞株 Rolf B1. T cells 10分鐘，可以作為抑制及刺激NPY mRNA 表現的篩選平台。本研究則以此篩選平台篩選出具有潛在刺激NPY mRNA 表現之香料物質，並進一步藉由人體試驗驗證之。實驗結果發現，篩選之十三種香料物質中，蘑菇醇(octenol)、蒎烯(pinene) 及 methyl phenylacetate 均顯著地刺激嗅覺細胞表現 NPY mRNA，故挑選蘑菇醇與蒎烯作人體實驗之驗證。

人體實驗則分別以下列香氣刺激人類嗅覺 5、10、15 min，並測其血漿內NPY含量之變化。另外，由脂肪細胞所分泌的leptin能與NPY作用相互拮抗，當leptin大量分泌時會抑制NPY促進攝食的作用。因此，本研究亦分析血漿內leptin之含量。本研究以水作為控制組，檸檬油烯作為負控制組，正控制組為沈香醛，試驗樣品為蘑菇醇及蒎烯。實驗結果發現，予以檸檬油烯之負控制組中血漿內NPY含量之變化在10 min時下降最多(-11.54%)，顯示其具有抑制食慾之潛力。正控制組中，予以受試者沈香醛5及10 min均可增加血漿內NPY之含量(22.92%, 5.71%)；蘑菇醇之組別亦在5、10及15 min之刺激下均可增加血液內NPY之含量(13.67%, 3.29%, 5.21%)；但蒎烯之組別，血漿內NPY含量之變化較不明顯。至於，血漿內leptin之變化，由於其易受多種生理因子影響，故實驗結果缺乏一致性。另外，在受試 5、10及15分鐘後，受試者之血壓及耳溫均無顯著改變。在問卷方面，從受試者對於問卷之回應結果難以看出其與血漿內NPY及leptin含量變化之關係性。

關鍵詞：神經胜肽酪氨酸，嗅覺神經細胞，食慾，芳香療法，人體血漿NPY

Abstract

Neuropeptide tyrosine (NPY), a 36-amino acid peptide, is widely present in the central and peripheral nervous system, especially abundant in the brain. NPY is the most important stimulator of food intake. On the other hand, essences such as limonene and linalool, which are respectively the major components of grapefruit oil and lavender oil, have been verified to influence (decrease/increase) appetite in rats. Therefore, we propose that appetite regulation effect of spices might be connected with the secretion of NPY.

In a previous study, we had established a NPY expression screening model by culturing olfactory nerve cells Rolf B1.T for 2 days and treating cells with limonene and linalool for 10 min. Thus, in this study, we used this model to screen thirteen spices and expected to find potential spices that could stimulate NPY mRNA expression of Rolf B1.T cells. Furthermore, a clinical trial was implemented to study the effects of these spices on the human physiological indicators, including ear temperature, blood pressure, and plasma NPY secretion. Furthermore, leptin is synthesised by adipocytes in proportion to the levels of stored triglycerides, and is a key hormone in the regulation of food intake and energy expenditure. This research also analyzed the leptin content in plasma. In addition, personal's questionnaire was used to further investigate the relationship between food intake and aroma components.

In NPY expression screening model, our result indicated that octenol, pinene, and methyl phenylacetate significantly increased NPY mRNA levels in the Rolf B1.T cells. Moreover, the results of clinical trial were as follows: 1) when the experimental period was 10 min, limonene (negative control) decreased plasma NPY level, indicating that it might inhibit appetite, 2) when the experimental periods were 5, 10 min, linalool

(positive control) increased plasma NPY level, indicating that it might stimulate appetite, 3) when the experimental periods were 5, 10 and 15 min, octenol could increase plasma NPY level, revealing that it might be a potent stimulator of food intake, 4) the plasma NPY level in the pinene group had no obviously changes at any experimental time. However, the results of plasma leptin concentrations were inconclusive. We suspected that it was influenced by other physiological factors. Blood pressure and ear temperature were not significantly changed at any experimental time.

Keywords: NPY, olfactory nerve cells, appetite, aromatherapy, human plasma NPY



目錄

口試委員審定書	I
謝誌	II
摘要	III
Abstract	IV
目錄	VI
圖目錄	IX
表目錄	XI
第一章 前言	1
第二章 文獻回顧	3
第一節、食品香料	3
一、簡介	3
二、食品香料之定義	3
三、食品香料之分類及種類	3
四、食品香料的功能性	7
第二節、人類之嗅覺系統	13
一、簡介	13
二、嗅覺器官的組成	13
三、嗅覺訊息之傳遞路徑	14
四、香料物質經由嗅覺影響生理之特性	15
五、嗅神經鞘細胞 (olfactory nerve ensheathing cells)	20
六、存在嗅覺細胞內，調控食慾之激素	20
第三章 研究動機與架構	29
第一節、研究動機	29
第二節、研究架構	30

第四章 實驗材料與方法	32
第一節、實驗材料	32
一、細胞株	32
二、實驗藥品與試劑	32
三、主要設備與儀器	34
第二節、實驗方法	35
一、細胞培養	35
二、基因表現	37
三、人體試驗	43
第五章 實驗結果與討論	52
第一部份實驗結果	52
一、試驗樣品（香料物質）對嗅覺神經細胞 Rolf B1.T 15 min 下存活率之影響	52
二、試驗樣品（香料物質）刺激嗅覺神經細胞 Rolf B1. T 10 分鐘對 NPY mRNA 表現之影響	61
（一）Total RNA extraction 品質的鑑定	61
（二）RNA 之反轉錄（Reverse transcription）	61
（三）瓊脂糖膠體電泳法（Agarose gel electrophoresis）	63
（四）即時定量聚合酶連鎖反應（Real-Time Quantitative PCR）	64
第二部份實驗結果	73
（一）受試者基本資料	73
（二）受試前，受試者血漿中 NPY 與 leptin 含量之關係性且血漿中 NPY、leptin 含量與年齡、體脂、身體質量指數（BMI）及性別之關係性	75
（三）受試 5、10 及 15 分鐘，受試者血漿中 NPY、leptin 含量之變化	83
（四）以香料物質刺激 5、10 及 15 分鐘後受試者耳溫及血壓之變化	99
（五）問卷結果與受試者血漿中 NPY 及 leptin 含量變化之相關性	101
第六章 結論	106

第七章 參考文獻	107
附件	122
附錄 期刊格式	127



圖目錄

圖 2-1、嗅覺訊息傳遞路徑	14
圖 2-2、嗅覺訊號處理的主要路徑	16
圖 2-3、自主神經系統包含 (A) 交感神經及 (B) 副交感神經	19
圖 2-4、能量平衡之生理調控	26
圖 2-5、神經胜肽 Y 在嗅覺系統的分泌表現	28
圖 5-1、以 s(-)-limonene 處理嗅覺神經細胞 Rolf B1.T 15 分鐘對其存活率之影響	55
圖 5-2、以 (+/-)-Linalool 處理嗅覺神經細胞 Rolf B1.T 15 分鐘對其存活率之影響	55
圖 5-3、以 citronellal, citronellol 與 geraniol 處理嗅覺神經細胞 Rolf B1.T 15 分鐘對其存活率之影響	56
圖 5-4、以 eucalyptol, methyl phenylacetate 與 octenol 處理嗅覺神經細胞 Rolf B1.T 15 分鐘對其存活率之影響	56
圖 5-5、以 vanillin 處理嗅覺神經細胞 Rolf B1.T 15 分鐘對其存活率之影響	57
圖 5-6、以 capsaicin 處理嗅覺神經細胞 Rolf B1.T 15 分鐘對其存活率之影響	57
圖 5-7、以 pinene 與 citral 對嗅覺神經細胞 Rolf B1.T 15 分鐘對其存活率之影響	58
圖 5-8、以 curcumin 處理嗅覺神經細胞 Rolf B1.T 15 分鐘對其存活率之影響	58
圖 5-9、以 diallyl sulfide 處理嗅覺神經細胞 Rolf B1.T 15 分鐘對其存活率之影響	59
圖 5-10、以 diallyl disulfide 處理嗅覺神經細胞 Rolf B1.T 15 分鐘對其存活率之影響	59
圖 5-11、RNA 濃度及品質	62
圖 5-12、(A) RNA 之品質及濃度 (B) 甲醛洋菜膠體電泳觀察 RNA 品質	62

圖 5-13、cDNA 之濃度及品質	62
圖 5-14、cDNA 經聚合酶連鎖反應放大產物之結果	63
圖 5-15、嗅覺神經細胞經不同樣品處理 10 min 後 NPY mRNA 基因之表現	68
圖 5-16、嗅覺神經細胞經不同樣品處理 10 min 後 NPY mRNA 基因之表現	69
圖 5-17、嗅覺神經細胞經不同樣品處理 10 min 後 NPY mRNA 基因之表現	70
圖 5-18、嗅覺神經細胞經不同樣品處理 10 min 後 NPY mRNA 基因之表現	71
圖 5-19、受試前，受試者血漿中 NPY 與血漿中 leptin 含量之相關性	78
圖 5-20、受試前，受試者年齡與血漿中 NPY 及 leptin 含量之相關性	79
圖 5-21、受試前，受試者體脂與血漿中 NPY 及 leptin 含量之相關性	80
圖 5-22、受試前，受試者 BMI 與血漿中 NPY 及 leptin 含量之相關性	81
圖 5-23、受試前，受試者性別與血漿中 NPY 及 leptin 含量之相關性	82
圖 5-24、給予各種香氣 5、10 及 15 分鐘後受試者血漿中 NPY 含量之變化	88
圖 5-25、給予各種香氣 5、10 及 15 分鐘後受試者血漿中 leptin 含量之變化	89

表目錄

表 2-1、香料物質之結構、來源及功能性.....	8
表 2-2、精油之組成與功能.....	11
表 2-3、神經胜肽 Y、胜肽 YY 與胰臟多胜肽.....	24
表 5-1、各香料物質在 15 分鐘處理時間下對於嗅覺神經細胞之安全濃度.....	60
表 5-2、不同濃度之香料物質刺激嗅覺神經細胞表現 NPY mRNA 之變異百分比	72
表 5-3、受試者基本資料.....	74
表 5-4、給予各種香氣 5、10 及 15 分鐘後受試者血漿中 NPY 含量之變化.....	88
表 5-5、給予各種香氣 5、10 及 15 分鐘後受試者血漿中 leptin 含量之變化.....	89
表 5-6、各種香料物質刺激後血漿中 NPY 平均變化量及人數分佈.....	92
表 5-7、各種香料物質刺激後血漿中 leptin 平均變化量及人數分佈.....	92
表 5-8、依性別探討受試後血漿中平均 NPY 之變化.....	92
表 5-9、依性別探討受試後血漿中平均 leptin 之變化.....	94
表 5-10、控制組受試者血漿中 NPY 及 leptin 之含量變化.....	96
表 5-11、負控制組 limoene 受試者血漿中 NPY 及 leptin 之含量變化.....	96
表 5-12、正控制組 linalool 受試者血漿中 NPY 及 leptin 之含量變化.....	97
表 5-13、試驗樣品 pinene 受試者血漿中 NPY 及 leptin 之含量變化.....	97
表 5-14、試驗樣品 octenol 受試者血漿中 NPY 及 leptin 之含量變化.....	98
表 5-15、以香料物質刺激 5、10 及 15 分鐘後之耳溫變化.....	100
表 5-16、以香料物質刺激 5、10 及 15 分鐘後之血壓變化.....	100
表 5-17、受試 5 分鐘問卷結果與受試者血漿中 NPY 及 leptin 含量變化之相關性	103
表 5-17、受試 10 分鐘問卷結果與受試者血漿中 NPY 及 leptin 含量變化之相關性	

.....	104
表 5-17、受試 15 分鐘問卷結果與受試者血漿中 NPY 及 leptin 含量變化之相關性	
.....	105



第一章 前言

香料物質是由纖維素、碳水化合物、脂肪、蛋白質、膠體、灰分、揮發性及其他不揮發性物質所組成。在烹飪食物中添加香料是一種最古老的芳香療法，它可以藉由增添食物的氣味、味道、顏色及質地來促進我們想攝食之慾望。而芳香療法也包括利用精油經呼吸道或經皮吸收之方式，來達到放鬆心情、舒緩壓力及改善呼吸道問題、減緩感冒症狀與肌肉疼痛等。而上述這些作用皆是藉由揮發性之香氣物質與口中及鼻中的接受器結合後，刺激大腦釋放一些神經化學物質來產生想要之作用（Raghavan, 2007）。

依 Bray（1990）研究可知交感神經活性與攝食具有顯著關係性，所以在 2005 年 Shen 等人亦同時探討葡萄柚精油及其主成分檸檬油烯（limonene）與薰衣草精油及其主成分沈香醛（linalool）刺激大鼠嗅覺後，其攝食行為、體重變化以及脂質代謝的情形。由研究結果可以發現經由葡萄柚精油及其主成分檸檬油烯（limonene）刺激的大鼠，其攝食行為與體重均顯著降低，且發現血漿中的甘油（glycerol）含量增加（意味著脂質代謝率之提高），並推測此可能是藉由興奮周邊或中樞 histaminergic nerve 交感活性所致（Shen et al., 2005；Tanida et al., 2005）。相反地，以薰衣草精油及其主成分沈香醛刺激大鼠之嗅覺，則顯著地使攝食增加、體重上升與脂質代謝率下降（Shen et al., 2005）。由文獻之搜尋亦可發現 capsaicinoids、Fenugreek powder 及 lemongrass 可促進食慾與改善食慾不振之情況；然而，*Zanthoxylum piperitum* 則會抑制食慾（Bessot et al., 1996；Robbins, 2000；Raghavan, 2007；Epple et al., 2001）。由這些研究均可以知道芳香物質可經由嗅覺來影響食慾等生理活性。

而嗅覺的產生依賴於嗅覺系統，在我們的嗅覺系統中 olfactory ensheathing cells 及 sustentacular cells 中有 NPY 之生成。NPY 為神經胜肽酪氨酸之簡稱，普遍存在中樞及周邊神經系統與周邊神經組織中，因其分佈廣泛，具有許多生理活性。其中，最主要為在下視丘內扮演調控攝食的角色。下視丘是中樞神經調控攝食與能量平衡的地方，簡單地說，下視丘的弓狀核內具有兩組神經元，分別是促進食慾、增加攝食的 NPY/AgRP 神經元（NPY/AgRP neuron）與抑制攝食、降低食慾的 POMC/CART 神經元（POMC/CART neuron），其中 NPY/AgRP 神經元分泌 NPY

以刺激大腦產生食慾；而 POMC/CART 神經元則分泌 POMC，其裂解物 α -MSH 刺激大腦抑制食慾及減少攝食。由文獻之研究結果也可以知道：NPY 不僅在腦中扮演著攝食調控的重要角色，在血漿中存在的 NPY 也與食慾相關（Seeley et al., 1995；Ammar et al., 2000；Benoit et al., 2005；Kobeissy et al., 2007）。

由上述的結果，可以推測藉由香氣對於嗅覺之刺激，進而促進或抑制嗅覺神經細胞分泌NPY，可能是影響動物攝食行為之原因。且本實驗室之前的研究發現，以檸檬油烯及沈香醛處理培養兩天之大鼠嗅覺神經細胞10分鐘，可以作為抑制及刺激NPY mRNA 表現的篩選平台。本研究之目的則藉由此篩選平台，篩選出具有潛力刺激嗅覺神經細胞表現NPY mRNA之香料物質，進一步藉由人體實驗驗證之。



第二章 文獻回顧

第一節、食品香料

一、簡介

食品品質隨著國人經濟水準的提高逐漸受到重視，而提升食品品質除了良好的加工技術之外，適當地使用食品香料可提高食品色、香、味上的感官表現，亦可修飾食品因加工過程引起的品質損害。而舉凡使用在食品加工之製造上，如添加在酒類、果汁、飲料、餅乾、糖果、冰淇淋和油炸食品等之香料均可稱為食品香料。

食品香料的組成複雜，富含多種物質參與香味之形成，人類對於香味的認知也受年齡、文化、種族差異性、地區發展性、食物及香料原料之取得性等因素有所不同。近年來，由於香味化學在研究上的進步，使得多種單一香味化合物組成的香料逐漸明瞭，亦將其各化合物分離、鑑定已知其對香味的貢獻(王等, 2005)。

二、食品香料之定義

根據 Hall (1968) 之定義，香味是指食物攝入口中後，呈現總和的感覺特徵，這些感覺包含味覺、嗅覺、觸覺和痛覺，這些感覺特徵進而傳至腦部加以解析後得到一個綜合的結果，即是該食物之香味。而添加食品香料的動機，即是改善和修飾這些特徵。一般修飾味覺的佐料稱為調味料 (seasonings)，例如：糖、味精及鹽巴等；而修飾嗅覺用的佐料則稱為調香料 (flavorings)，例如檸檬油、薑油等。而香辛料 (spices) 則具有調味料及調香料兩者之特性

三、食品香料之分類及種類

(一) 食品香料之分類

國際香料工業組織 (The International Organization of Flavor Industries ; IOFI) 將食品香料分為以下三類：

1. 天然香料及香味物質 (natural flavoring substances)：由天然植物或動物經加工或不加工之香料原料，以物理的方式製備而得，並可供人食用的物質，如：茴香腦 (anethole)、薑油酮 (zingerone)。
2. 天然等同香味物質 (natural identical flavoring substances)：由有機合成或從天然香料原料以化學過程分離所得之物質，此物質與天然產物之化學構造相同，經加工或不加工之香料，供人食用，如：丁香醇 (eugenol)、月桂醛 (lauraldehyde)。

3. 合成香味物質 (artificial flavoring substances)：與天然產物之化學構造不同，經加工或不加工之香料，供人食用者，如：檸檬醛 (citral)、香草醛 (vanillin) (IOFI, 1976)。然而，在美國茲將香料分成兩類：天然香料及合成香料，而天然等同香味物質在美國則屬於合成香料。在天然香料之範圍則包括：精油 (essential oil)、精油樹脂 (oleoresin)、香精 (essence)、抽出物、蛋白質水解物以及發酵、加工和酵素反應等所得之產物 (Stofberg, 1986)。

(二) 食品香料之種類

在食品香料中，天然香料是藉由抽出、濃縮、榨油、蒸餾等分離操作，萃取存在於天然物中的有香物質。從動物製造者稱動物性香料 (perfumery of animal sources)，從植物製造者稱植物性香料 (perfumery of plant sources)。而廣義的合成香料是藉由萃取、精餾、晶析、化學處理含有多成分的香氣物質的天然香料，如單離香料、pinene 等天然萜化合物；或者經由石油化學製品為原料而以有機合成反應製造的合成香料。依來源可分為單離香料 (flavoring chemical) 與調和香料 (mixed flavoring)，依形態則可為液狀、粉狀和糊狀香料。

1. 天然香料：

(1) 動物性香料 (perfumery of animal sources)：

動物性香料只有四種類，亦即麝香 (musk)、靈貓香 (civet)、龍涎香 (ambergris) 和海狸香 (castoreum)。另外還有一種動物香味浸出物 (animal flavor infusion)，主要用作高級香料的保留劑，或者是配製成酒精溶液作為香水及食品熱反應之香料，其芳香性具有獨特的魅力 (賴，1998；王等，2005)。

(2) 植物性香料 (perfumery of plant sources)：

植物性香料來自於芳香植物，多是植物體內葡萄糖苷的分解產物，並經由植物體內各種酵素作用轉化成不同結構的成分。植物性香料由於其主要成分是具有揮發性與芳香性的油狀物可統稱為精油。精油本身具有獨特香氣，是植物作為抵抗侵害、吸引授粉及其他生理作用的物質。通常不溶於水，在運用上，是以酒精或其他有機溶劑作為分散劑。精油通常以游離態或苷的形式聚集於細胞或細胞組織間隙中，其含量會隨著植物的種類、氣候條件、生長情況、土壤成分、採收時間、生長季節以及儲存運送的狀況不同而有所差異。

依據美國香料及抽出物製造者協會 (Flavor and Extract Manufacturer's

Association; FEMA) 的定義，香辛料也屬於植物性香料的範疇內，其定義為：「凡是用來做食品調味的植物，均可稱為香辛料」。換句話說，植物具有芳香的部份或經碾碎後，作為調味用的稱之為香辛料。其包括熱帶地區的各式香料以及溫帶地區的葉類香草香料。前者為木本植物皮、根、果實，必須經過乾燥後才能使用，且經得起長期的熬煮煨燉；後者通常是含有香味的草本植物 (herb)，能夠新鮮使用也能夠乾燥後再利用，但是此類香料無法長時間熬煮。

精油 (essential oils) 乃Paracelsus 於16 世紀所命名，意為蔬果香味的精髓，通常為一群複雜的化合物所組成，其性質及成分決定於植物體的種類、栽植條件、季節及收穫前的處理。精油具有多項生理功能，如抗菌性 (Shelef, 1983)、抗病毒 (Bioshop, 1995)、抗黴菌 (Mari et al., 2003)、抗毒性 (Juglal et al., 2002)、抗寄生蟲 (Pessoa et al., 2002)、殺蟲 (Karpouhtsis et al., 1998)、抗氧化 (Atsumi and Tonosaki, 2007)、抗發炎及止痛 (Silva et al., 2003)、提昇免疫反應 (Toro-Arreola et al., 2005)、皮膚保健及頭髮保健等功效。

精油所具有的生理功能，來自植物本身合成的特殊成份，有兩個來源：萜烯類化合物及含氧之複合物。

I. 萜烯類化合物 (terpenoid)

萜烯類通常具有抗菌防腐的功效，如chamazulene、farnesol 能殺菌與消毒、二萜萜檸檬油烯 (limonen) 則可以抗濾過性病毒、松油萜或稱蒎烯 (pinene) 有防腐功能。

II. 含氧之複合物 (oxygenated)

A. 酯類 (esters)

酯類對神經系統具有安撫、消炎、抗痙攣的功效，質地溫和、安全，賦予精油水果的甜香，如佛手柑、鼠尾草、薰衣草、茉莉中的乙酸伽羅木酯 (linalyl acetate)、乙酸香葉草酯 (geranyl acetate)。

B. 醛類 (aldehydes)

醛類對於中樞神經具有消炎及安撫的效果，亦能降血壓、降體溫，如檸檬醛 (citral) 存在於檸檬、檸檬草、天竺葵、香茅；香茅醛 (citronellal) 存於香茅、檸檬；橙花醛 (neral) 存於橙花；苯甲醛 (benzaldehyde) 存於安息香、肉桂醛 (cinnamic aldehyde) 存於肉桂。

C. 酮類 (ketones)

酮類能治療上呼吸道疾病、活化免疫能力、消除水腫及幫助黏膜流通，但是毒性較高，部份會造成中樞神經中毒、引發癲癇症。如樟腦酮

(camphorborneone) 存在於樟腦、肉桂；香芹酮 (carvone) 存在於藏茴香、薄荷，薄荷酮 (menthone) 存在於薄荷。

D. 酚類 (phenols)

酚類具抗菌、抗濾過性病毒及活化免疫之效果，丁香酚 (eugenols) 存在於丁香、肉桂、黑胡椒、肉豆蔻；麝香草酚 (thymols) 存在於丁香、麝香；香芹酚 (carvacrol)；甲基丁香酚 (methyleugenol) 等。

E. 醇類 (alcohols)

醇類可分為單萜醇類 (monoterpenic alcohols) 存在於薰衣草、肉豆蔻、松葉，沉香醇 (citronellol) 存在於香茅、天竺葵、玫瑰；香葉醇 (geraniol) 存在於天竺葵、玫瑰、橙花、橘葉。多萜醇類 (sequiterpenic alcohols)，如紅檜醇 (cedrol) 存在於洋香杉；橙香醇 (nerolidol) 存在於橙花，santalol 存在於檀香、farnesol 存在於玫瑰，其具有部分抗菌功效。雙萜乙醇 (di-terpenicalcohols)，只存在於少數植物精油。

F. 氧化物 (oxide)

最主要之氧化物為桉油酚 (cineol)，存在於樟腦、迷迭香、茶樹中，其他氧化物有 linalool oxide、bisabolol oxide、bisabolone oxide 等。

2. 合成香料

(1) 依來源可分為：

單離香料 (flavoring chemical)：從植物性的香料精油中只萃取單一的主成份，該成分即為單離香料；調和香料 (mixed flavoring)：將數種天然香料或合成香料組合成一基體的香味，稱基礎香味，再加上調味香料以形成完整的調和香料。

(2) 依形態則可分為

液狀香料 (liquid flavors)：所有合成香料中數量最多者，依溶液性質又可分為水溶性香料 (主要用於清涼飲料中)、油溶性香料 (主要用於烘培食品、糖果、口香糖等之製造)，乳化香料 (因具有水分散性，主要用於清涼飲料中)。

粉狀香料 (powder flavors)：適用於粉狀食品中，或是用於其他形態之食品

中因特殊目的而使用（游，1986）。以市售粉狀香料可大致分成吸著型、噴霧乾燥及膠囊化粉狀香料。

糊狀香料（paste flavors）：乃是將香料混和，分散於低沸點的脂類或氫化植物油中製得。

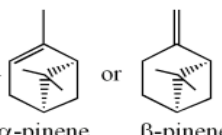
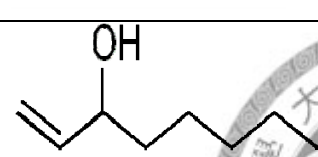
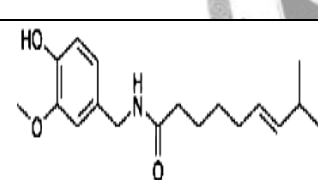
四、食品香料的功能性

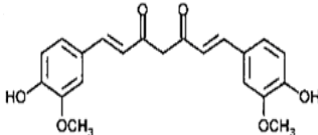
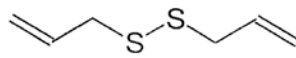
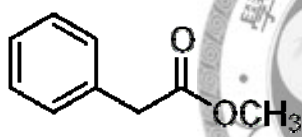
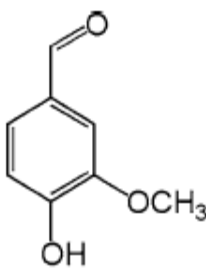
香料“Spice”此字來自於拉丁字“species”為專一性種類的意思，解釋在所有的香料中也相當地恰當，因為每種香辛料不論是其根、莖、葉、幹及果實均有其特殊芳香味、刺鼻味等其他香氣。對於全世界的人們來說亦認為香料可以刺激食慾、增添食物的風味和質地以及創造視覺上的吸引力（Taylor et al., 2000）。然而，隨著科學分析技術的逐漸成熟、人們追求天然且具有保健功效的食品需求，使得許多研究學者紛紛投入研究這些帶有種族、文化特性的香料或是草本植物對人體的實質影響。茲將許多的研究，整理如下所述：



表 2-1 香料物質之結構、來源及功能性

表 Table 2-1. Structures, sources and functions of spices

Compound	Structure	Source	Function
(-)-α-Pinene (α -蒎烯)	 α -pinene or β -pinene	Lemon oil, Lavender, hinokittiol, eugenol , citronellol, citronellal	1. 於體外證實可調控GABA的濃度 (Aoshima and Hamamoto, 1999)
Linalool (沈香醛)		lavender oil, fermentation broth of <i>A. cinnamomea</i>	1. 具有調節中樞神經傳遞系統 (Elisabetsky, 1995)
1-octen 3-ol (蘑菇醇)		edible fungi plants, especially in the Lamiaceae family, fermentation broth of <i>A. cinnamomea</i>	1. 強烈之香菇味，常添加在食品和飲料 產品中 (Maggi et al., 2009) 2. 對於眼睛有些微地刺激及經呼吸道可 能引起頭痛和噁心的症狀 (Walinder et al., 2008)
Capsaicin (辣椒素)		Chili peppers Red pepper (<i>Capsicum annuum</i>)	1. 降膽固醇、三酸甘油脂、可作為降 膽固醇試劑 (Kempaiah and Srinivasan, 2002) 2. 抑制血小板凝集 (Wang et al., 1985) 3. 保護胃功能 (Yeoh et al., 1995) 4. 預防膽固醇結石 (Srinivasan et al., 2004) 5. 抗氧化、抗發炎、抗真菌 (Chowdhury et al., 1996)

Curcumin (薑黃素)		Turmeric (<i>Curcuma longa</i>)	1. 降膽固醇 2. 降三酸甘油脂 3. 預防膽固醇結石 (Srinivasan et al., 2004) 4. 可作為降膽固醇試劑 (Kempaiah and Srinivasan, 2002) 5. 抗氧化及抗發炎 (Surh, 2003) 6. 具有抗癌之功效 (Huang et al., 1995)。
Allyl disulfide		Garlic	1. 抗血小板凝集 2. 幫助纖維蛋白質的分解 3. 抗脂血 (antilipidemic) 4. 可作為抗生素 5. 抗高血糖血症 6. 抗癌之功效 (Kleijnen et al, 1989 and Agarwal, 1996)
Methyl phenylacetate		Brandy, capsicum, coffee honey, pepper, and some wine	1. 香味類似於蜂蜜 2. 在香料工業中，貢獻蜂蜜之香味
Vanillin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde)		A plant derived nature product	1. 具有降三酸甘油脂 (Srinivasan et al., 2008) 2. 作為食品風味劑，亦可作為食品防腐及藥物運用方面 (Walton et al., 2003) 3. 具有清除自由基之活性 (Santosh and Kumar et al., 2002) 4. 抑制人類低密度脂蛋白之氧化 (Teissedre and Waterhouse, 2000) 5. 具有預防及治療發炎性大腸症 (傅，2006) 6. 具有抗菌、抗毒性之功能 (Fitzgerald et al., 2003)

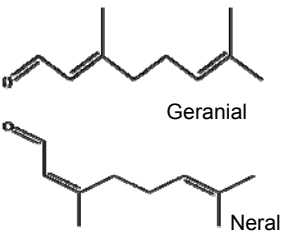
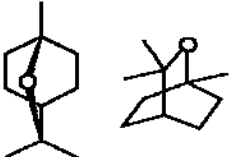
Citral (3,7-dimethyl-2,6-octadienal)	 Geranial Neral	Ginger	1. 具有抗發炎之活性 (Lin et al., 2008) 2. Citral 衍伸的胺類物質有潛力可作為抑制 bacterial NorA efflux pump (Thota et al., 2008)
Eucalyptol 桉葉醇		Eucalyptus	1. 在非常低劑量下可當作食品香料劑和藥物的原料 2. 具有抗氧化及抗菌之功效



表 2-2 精油之組成與功能

Table 2-2. Components and functions of essential oil

Essential oil	Composition	Function
Black Pepper Oil	Pinene, Phellandrene, 3-carene, cymene, terpinyl acetate, elemene, copaene, caryophyllene, cadinene, caryophyllene oxide	1. 改善吞嚥的能力 (Ebihara et al., 2006)
Lemon oil	Pinene, limonene, dihydromyrcenol, terpineol, citral isopropyl myristate	1. 藉由抑制多巴胺之活性來增加 5-HTnergic neurons 之活性，故有類似抗焦慮與抗憂鬱之效果 (Komiya et al., 2006)。
Rosemary (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	p-cymene (44.02%), linalool (20.5%), g-terpinene (16.62%), thymol (1.81%), b-pinene (3.61%), a-pinene (2.83%) and eucalyptol (2.64%).	1. 抗真菌之活性 (Özcan and Chalchat, 2008)。
Silene armeria L.	methylamine (21.48%), α -butene (17.97%), β -butene (46.40%), coumaran (0.22%), eugenol (0.21%), humulene (0.07%), farnesol (0.05%) and linalool (0.12%).	1. 可作為抑制食品腐敗菌，諸如下述： <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Escherichia coli</i> O157-Human, <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> O57:H7 and <i>Enterobacter aerogenes</i> (Bajpai et al., 2008)
Amomum tsao-ko	1,8-cineole (45.24%), p -propylbenzaldehyde (6.04%), geraniol (5.11%), geranial (4.52%), α -terpineol (3.59%) and α -phellandrene (3.07%).	1. 具有抗菌之活性，如葛蘭氏陽性菌、陰性菌和真菌 2. 對於 <i>Staphylococcus aureus</i> CCTCC AB91118 有很強之殺菌能力 (Yang et al., 2008)。
Casimiroa pringlei	piperitone, eucalyptol, and α -terpineol,	1. 對於 <i>Aspergillus flavus</i> 抑制真菌之能力強 (Cárdenas et al., 2005)。 2. 可作為止痙攣的藥 (Ponce-Monter et al., 2008)。
Lippia rugosa	Geraniol (51.5%), nerol (18.6%) and geranial (10.4%)	1. 對於 <i>Aspergillus flavus</i> Link ex. 有抑制真菌的效果 (Tatsadjieu et al., 2009)。
Cymbopogon winterianus (Poaceae)	geraniol (40.06%), citronellal (27.44%) and citronellol (10.45%)	1. 可作為止痛劑 (Almeida et al., 2001)。 2. 抗凝血劑 (Almeida et al., 2003 ; Quintans-Ju' nior et al., 2008)。 3. 抗焦慮 (Almeida et al., 2004)。
Ginger essential oil (<i>Zingiber officinale</i> Roscoe)	camphene, geranial, β -phellandrene、 ar-curcumene、geranyl acetate	1. 降低噁心嘔吐的症狀 (Fugh-Berman and Kronenberg 2003)。 2. 提升腸胃功能 (Pin et al., 2002)。 3. 有助於心血管疾病之預防 (Fuhrman et al., 2000)。 4. 具有預防癌症功能之潛力 (Bode et al., 2001)。

(三) 誘引劑 (attractant)

飼料中能增加誘引性的原料，稱之為誘引劑，是飼料中添加的微量元素之一。然而，誘引劑又可稱作食慾增進劑或是適口性添加劑，屬於非營養性的飼料添加物。在飼料中添加誘引劑的主要作用為：1.改善飼料的適口性，刺激食慾，促進動物對飼料的消化吸收與利用，加快動物的生長速度以及提高飼料換肉率和降低成本；2.掩蓋飼料中之異味，改善適口性；3.增加動物受到外界緊迫影響或罹病時的攝食量，有利其康復及接受治療；4.刺激消化液的分泌，提高營養消化吸收率；5.使飼料更具有商品性；6.利於新飼料資源之開發、降低飼料成本(賈和胡，1997；朱，2006)。各種動物之誘引劑如下：

1. 人

中醫師常用甘草、山楂、八角或是丁香等作為健脾開胃之藥材，例如八角成分茴香醚、丁香成分丁香油酚等，均具有揮發性萜類的強烈香味，常食用之滷包中即含有類似成分。

2. 魚類

多香果、小豆蔻、大蒜、香味薄荷和草木犀的萃取物與中草藥及其提取物對於魚類或蝦類之攝食行為有促進的作用。賈等(1997)亦證實在飼料中添加大蒜素可明顯提高鯉魚的活存率與增重率。

3. 雞、牛、豬等家禽、家畜經濟動物

在小豬之飼料中添加硫酸銅和甲酸，與控制組相比能顯著性地增加攝食行為及成長 (Schöne et al., 2006)。

香料物質除了作為誘引劑之外，對於心情的調節、三酸甘油脂、脂質代謝、食慾、體重等等均有影響，但此類的影響機制大都與嗅覺相關，故留待嗅覺部份之文獻整理再詳加敘述。

第二節、人類之嗅覺系統

一、簡介

人類對生活環境的感受，是透過人的五覺，即聽覺、味覺、嗅覺、視覺、觸覺，以及個人意識等方式來體認生活環境。嗅覺是由兩種感覺系統所參與，即嗅神經系統和鼻三叉神經系統，且嗅覺的信息會影響攝食、社交行為及生殖 (Purves et al., 1997)。然而，人類如何辨識數以千計的氣味，在2004年諾貝爾生理醫學獎桂冠得主—Linda B. buck 和 Richard Alex 成功地揭開了人類嗅覺運作方式，發表一系列研究結果，發現一個大型基因家族，在這個基因家族成員中約包含了1000 個不同的基因（這數量約佔人類基因的3%），這些基因最終也能轉譯出相同數量的嗅覺受體 (olfactory receptor)。而嗅覺受體位於鼻腔上端內皮層的嗅覺細胞中，且一種嗅覺細胞僅能表達一種嗅覺受體，它們能偵測各種吸入的氣體分子。不過，每一個嗅覺受器細胞只有一種嗅受器，而每一種嗅受器只能偵測少數幾種氣味，因此嗅受器細胞對氣味具有專一性。嗅覺受體是屬於G蛋白質耦合受體(G-protein-coupled receptors)，當嗅覺受體被氣味分子活化後，會促使cAMP 的形成，進而開啟離子通道，並傳遞嗅覺訊息至大腦。大多數的氣味是由多種分子所組成，而每種分子又可活化一種或多種嗅覺受體，所以雖然人體僅有約1000 種嗅覺受體，但這些受體可以經由排列組合後，形成大量的「氣味模式」，當這些「氣味模式」傳至大腦後，大腦會將這些氣味進行更高級的分析並記憶於腦中，最終產生情感、認知等生理反應 (Buck and Axel, 1991)。

二、嗅覺器官的組成

從解剖學上來看，嗅覺黏膜是一種神經上皮細胞，位於鼻腔頂部兩側。這些神經上皮屬於一種柱狀偽複層上皮，主要包含三種細胞：(1) 負責偵測氣味分子的嗅覺感受細胞 (olfactory receptor cell)，(2) 負責分泌黏液的支持細胞 (supporting cell) 以及 (3) 基底細胞 (basal cell)：會分化成嗅覺細胞，以更新平均壽命只有4~8 週的嗅覺感受細胞，其分布在基底膜 (basement membrane) 上，且約有一億個嗅覺感受細胞分布在支持細胞之間，在支持細胞內含有磷脂色素顆粒 (phospholipid pigment) 使得此一上皮呈現黃棕色，與粉紅色的鼻黏膜形成對比。嗅覺細胞的形狀貌似釣魚浮標，中間膨大處為細胞本體，這些特化的嗅覺細胞是一種雙極的神經細胞：含有嗅覺受器的一端上具有類似纖毛(cilia)的構造以利氣味

分子與嗅覺受器細胞的結合，另一端則傳到大腦的嗅球 (olfactory bulb) (Buck and Axel, 1991)。

三、嗅覺訊息之傳遞路徑

嗅覺訊息的傳導由氣味分子結合在受器上開始（如圖 2-1 所示）：

- （一）嗅覺的受器位在被特化的神經元上，不同的受器被活化後會因為 G-protein-coupled receptors (GPCR) 的作用而使得訊息被往上傳遞。
- （二）不同神經元傳遞的訊息，會從鼻上皮黏膜出發，經由篩骨進而到達位於大腦底部的嗅球中，嗅球中有許多不同的嗅小球，每個嗅小球都是在上皮膜上個別的神經元所匯聚之處。
- （三）這些訊號經由嗅小球的整理後，經由僧帽細胞的傳遞並放大訊號進入大腦皮質區，這個區域我們稱之為大腦皮質嗅覺接受區 (Olfactory cortex；OC) 接著經由大腦的處理，產生了嗅覺。

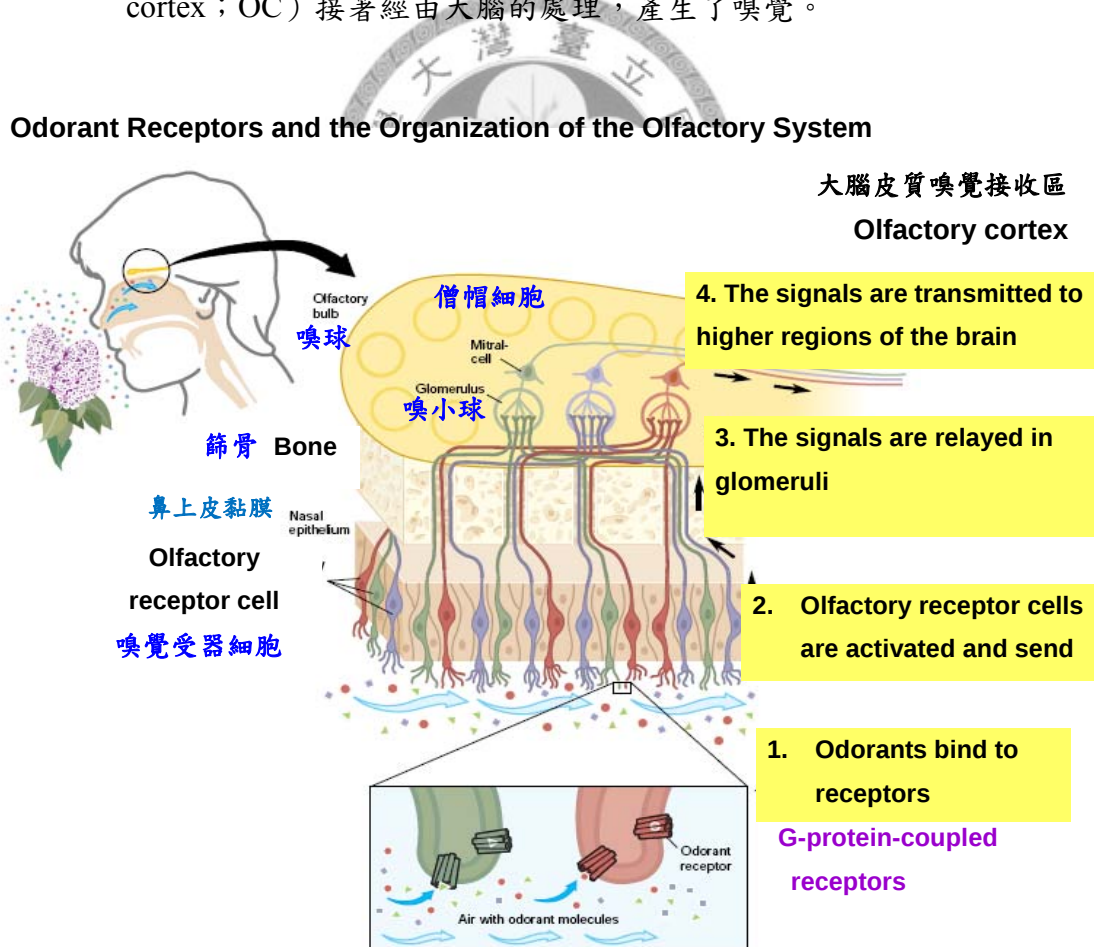


圖 2-1 嗅覺訊息傳遞路徑

Figure 2-1. Olfactory signal transduction pathway

(Buck and Axel, 1991)

四、香料物質經由嗅覺影響生理之特性

(一) 簡介

嗅覺訊息傳遞至嗅球或大腦皮質嗅覺接受區後，許多神經元仍透過此傳遞路徑傳至前腦的許多目標區域（如圖2-2），這些區域包括下視丘（hypothalamus）、丘腦（thalamus）、杏仁核（amygdala）、內鼻皮質（entorhinal cortex）以至海馬迴（hippocampus）等區域。其中下視丘是主要維持體內能量平衡的區域，可調控攝食行為；杏仁核處理發怒、負向情緒等的問題；海馬迴可以調節外來的情緒及記憶，故常被用來調整情緒；而丘腦和內鼻皮質則常與意識知覺、味道的認知相關。因此，透過嗅覺常能影響人類生理及心理的反應，而這亦是芳香療法所提倡良好的療效。

(一) 芳香療法（Aromatherapy）

起源於古埃及，藉由精油來達到舒緩精神壓力與增進身體健康。起初多用在提神或宗教冥想方面，芳香療法是近代才有的名詞，法國化學家 René-Maurice Gattefossé，1928年發表其研究成果於科學刊物上，首先運用此一名稱而開始了芳香療法。Gattefossé 指出植物精油因具有良好的滲透性，而能達到肌膚的深層組織，進而被細小的脈管所吸收，最後經由血液循環，到達被治療的器官。自古人類便發現某些芳香植物可以幫助減輕生病時的疼痛與不適，於是芳香植物可以治病的經驗就這樣長久傳承下成，延續至今。芳香療法亦可說是一種預防醫學，在歐洲歷史悠久，而近幾年，國人為擁有更健康、美好的生活品質以及回歸自然風的養生觀念下，也對芳香療法逐漸重視與喜愛，並實際應用在日常生活中，以提昇生活品質。芳香療法之應用方式有經呼吸道吸收與經皮吸收兩種。

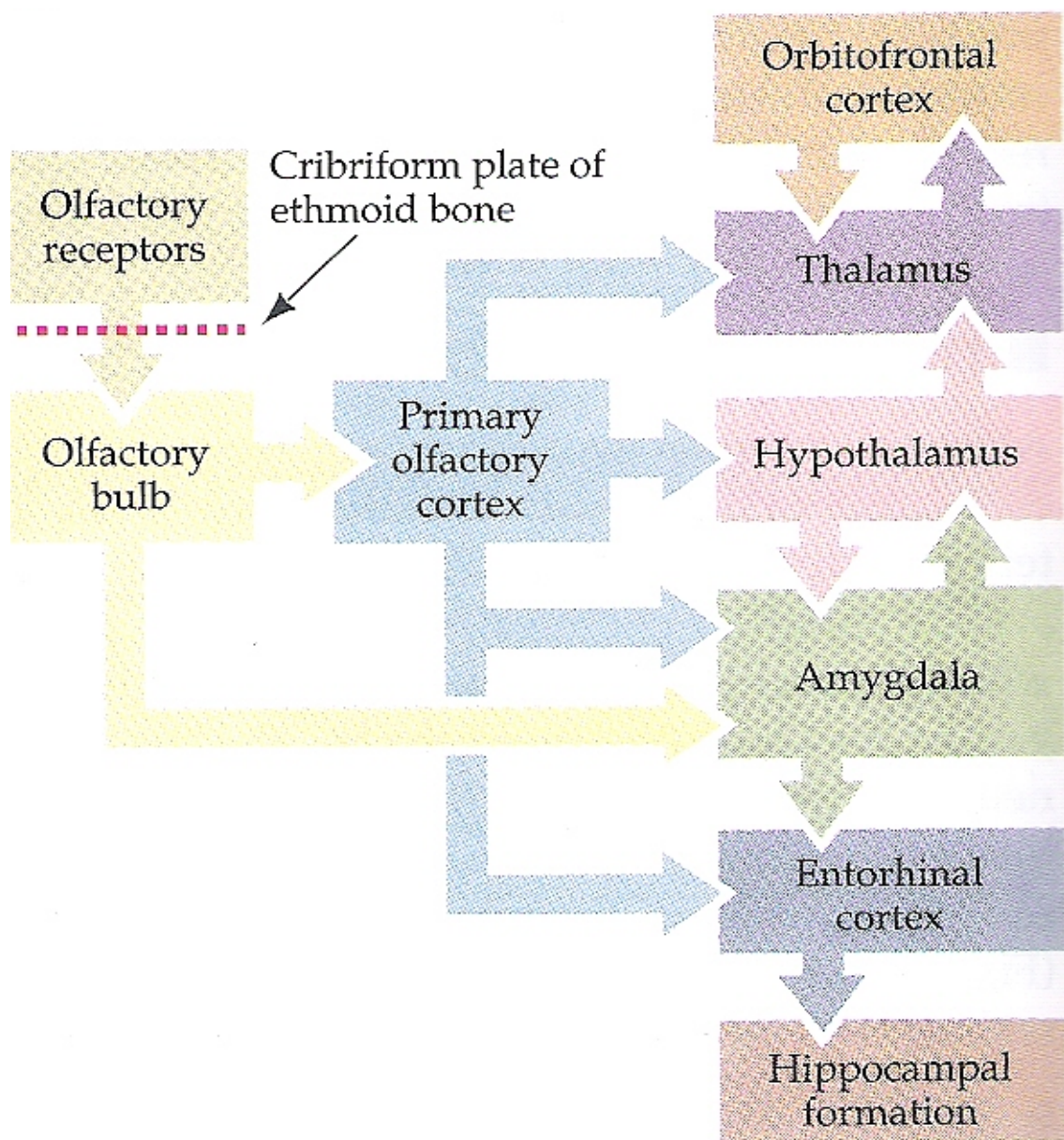


圖 2-2、嗅覺訊號處理的主要路徑

Figure 2-2. Diagram of the basic pathways for processing olfactory information

（三）香料物質對自主神經之影響

1. 自主神經系統

自主神經系統調控：平滑肌（內臟和血管）、外分泌和某些內分泌、心臟的速度和力量及某些代謝的過程（例如葡萄糖的利用）。自主神經系統不需大腦下達指令控制，即可自行調節運作，但其亦接受大腦中額葉、邊緣組織及下視丘等部位的調控。

自主神經系統包含交感神經(sympathetic)、副交感神經 (parasympathetic)及腸胃神經系統(enteric)（如圖2-3）(Godfrey, 2004)。交感及副交感神經常相互拮抗以保持平衡

（1）交感神經：功能包括使心臟竇房結速度增加、瞳孔放大及腸胃道平滑肌蠕動變慢，且交感活性在面對壓力下會增加，激發戰或逃(fight or flight)的反應。其主要特點有二：一為交感神經興奮時伴隨機體能量消耗的增加；二為在危急時交感神經興奮。

（2）副交感神經：功能包括使心臟竇房結速度減少、瞳孔縮小及腸胃道平滑肌蠕動變快、人體呈放鬆狀態，其特點是減少消耗、保存能量。在正常情況下，副交感活性在飽足和休息下佔優勢。交感神經若經常處於亢奮狀態則易引起自主神經的功能失調，嚴重者甚至會有心臟病發作及過勞死。反之，副交感神經的活性增加則有保護人體各器官的功能。

2. 相關研究

在 2005 年 Shen 等人研究發現，以不同濃度及不同刺激時間之葡萄柚精油及其主成分檸檬油烯（limonene）與薰衣草精油及其主成分沈香醛（linalool）刺激大鼠嗅覺後，對大鼠自主神經神經活性產生的影響。由這一系列的研究結果中可以發現，不論是予以葡萄柚精油和檸檬油烯刺激嗅覺的大鼠，均能興奮交感神經而抑制副交感神經的神經活性。此一研究並指出此成分可增加熱的產生（及消耗能量），可能是透過 uncoupling protein 1（UCP1）的活化來使體溫增加；反之，予以薰衣草精油和沈香醛刺激嗅覺的大鼠，則可抑制交感神經，而興奮副交感神經的神經活性（Shen et al., 2005；Shen et al., 2005；Tanida et al., 2005）。

另外，Saeki (2000)研究芳香療法對心率變異的影響，他利用十位19-20 歲健康女學生，以加入薰衣草精油或未加薰衣草精油進行溫水足部浸泡。觀察其心率

變異之表現。結果顯示，溫水足部浸泡能增加副交感神經活性，而添加薰衣草精油的組別則更能加強、延長其效果。而Saeki及Shiohara (2001)以薰衣草精油加入薰香燈的方式進行芳香療法，檢視九位健康女學生的心率變異度，結果發現，吸入薰衣草精油後，可使周邊血管擴張、血壓下降，表示薰衣草精油能減低交感神經活性，而增加副交感神經活性。

除了薰衣草精油外，Inoue 等人（2003）予以八位受試者聞茉莉花茶香味探討其對自主神經系統的影響，檢視其心率變異度，結果發現（1）不論偏愛或厭惡茉莉花茶香味的受試者，低濃度的茉莉花茶香味能使心跳速率減少，副交感神經活性增加；（2）於高濃度的茉莉花茶香味中，偏愛茉莉花茶香味的受試者其副交感神經活性增加；厭惡茉莉花茶香味的受試者則使交感神經活化。由以上研究結果，學者推測精油能影響自主神經系統，可能是精油分子能直接或間接經由嗅覺—邊緣系統進入中樞神經系統，尤其是下視丘或延腦、自主神經中樞；亦有可能因為心理、情緒的放鬆而對自主神經系統產生影響。

（四）香料物質對攝食行為、體重及脂質代謝

依 Bray(1990)研究可知交感神經活性與攝食具有強烈關係性，所以在 2005 年 Shen 等人亦同時探討葡萄柚精油及其主成分檸檬油烯（limonene）與薰衣草精油及其主成分沈香醛（linalool）刺激大鼠嗅覺後，其攝食行為、體重變化以及脂質代謝的情形。由研究結果可以發現經由葡萄柚精油及其主成分檸檬油烯（limonene）刺激的大鼠，其攝食行為與體重均顯著降低，且發現血漿中的甘油（glycerol）含量增加（意味著脂質代謝率之提高），並推測此可能是藉由興奮周邊或中樞 histaminergic nerve 交感活性所致（Shen et al., 2005；Tanida et al., 2005）。相反地，予以薰衣草精油及其主成分沈香醛刺激大鼠之嗅覺，則造成顯著地攝食行為增加、體重上升與脂質代謝率下降（Shen et al., 2005）。由這些研究可知芳香物質可經由嗅覺來影響食慾、體重、脂質代謝等生理活性。

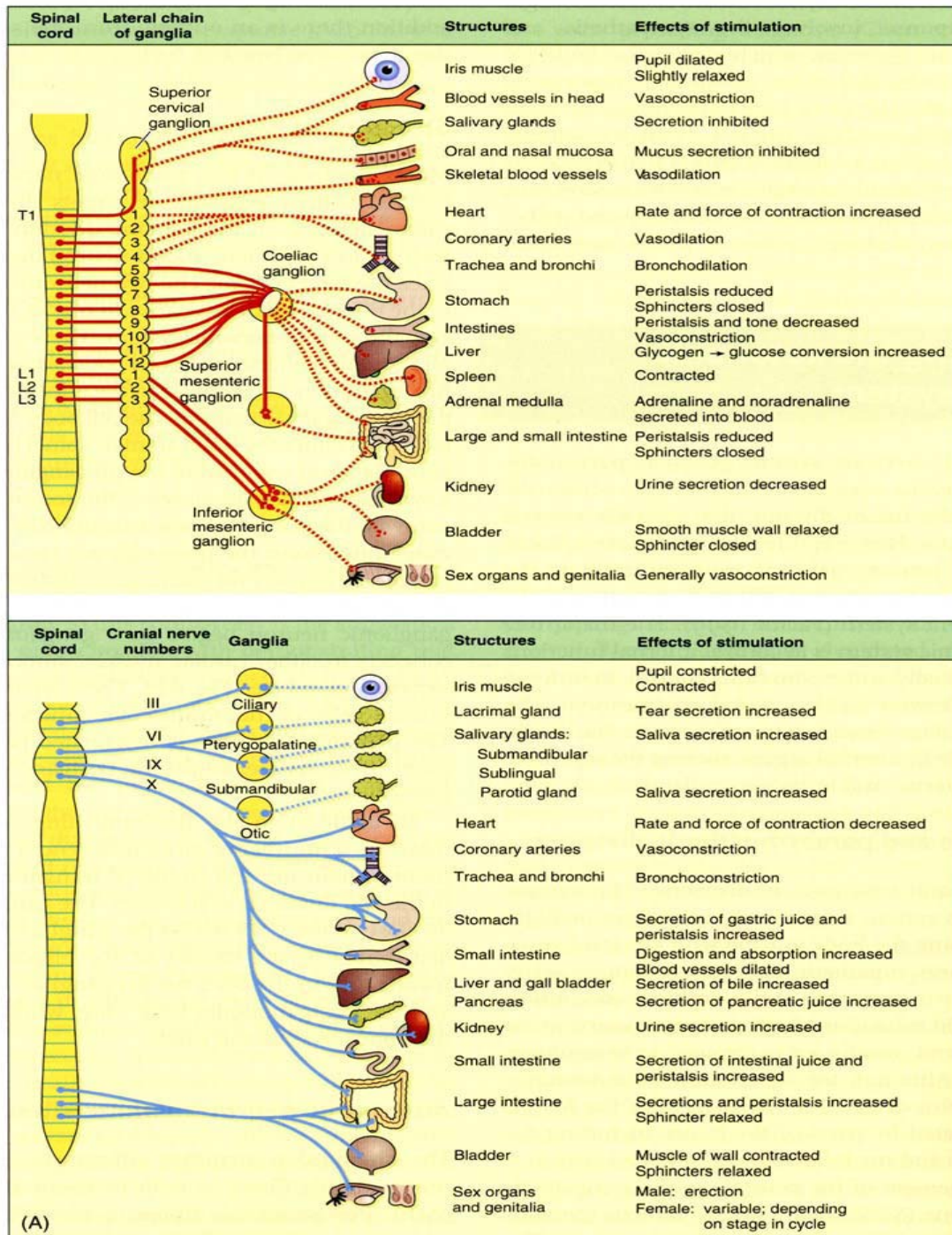


圖 2-3、自主神經系統包含 (A) 交感神經及 (B) 副交感神經

Figure 2-3. The sympathetic (A) and parasympathetic (B) divisions of the autonomic nervous system (Godfrey, 2004).

五、嗅神經鞘細胞 (olfactory nerve ensheathing cells)

(一) 形態及特性

成人嗅覺神經具有獨特之特性，嗅覺神經元透過神經上皮細胞來執行再生之能力；他的軸突進入中樞神經系統且受到內中樞神經系統之神經所支配 (Graziadei and Monti Graziadei, 1978)。嗅鞘細胞 (olfactory ensheathing cells; OECs) 可從嗅球的神經纖維層及嗅小球層、嗅黏膜固有層分離出來 (Doucette, 1991; 1993)，是一種具有中樞神經系統之星形膠質細胞 (central nervous system astrocytes; CNS astrocytes) 和外周雪旺細胞 (Peripheral nervous system Schwann cells; PNS Schwann cells) 雙重特性的成鞘細胞，在嗅覺軸突與 CNS 環境之間可形成一屏障。嗅鞘細胞生長之形態隨嗅球發育生長的階段 (Barnett et al., 1993; Goodman et al., 1993) 及體外培養環境的不同，而形成體外培養時形態上的多樣性 (Sonigra et al., 1996)。

嗅鞘細胞在免疫細胞化學的特性上，發現其具有表現膠質纖維酸性蛋白 (GFAP) (Barber and Dahl, 1987)、低親和力神經生長因子受體 (p75 NGFr) (Gong et al., 1994)、S100 蛋白質 (Pixley, 1992)、軸突生長及延伸的細胞外基質和細胞黏附因子如神經細胞黏附分子 (N-CAM family) (Doucette, 1993) 以及粘連蛋白 (laminin) 的能力。其表現之抗原型態亦會因為細胞發育階段及培養條件的不同而有所差異。

(二) 目前之研究

嗅鞘細胞因具有中樞神經系統之星形膠質細胞和外周雪旺細胞的雙重特性，除了表現多種促神經發育、生長、分化、存活的營養因子外，還能表現促神經元突起生長的細胞外基質和粘附分子，如FNL1、Tenacisin、Laminin 及NCM 等。嗅鞘細胞的多種特性使其成為在近年來修復中樞神經系統損傷的研究中，包括脊髓損傷之應用、嗅鞘細胞攜帶目標基因的移植等等，具有應用前景的移植材料 (Boyd et al., 2005; Ruitenberg et al., 2006)。

六、存在嗅覺細胞內，調控食慾之激素

(一) 神經胜肽酪氨酸 (NPY)

於第三節詳細介紹

（二）瘦激素（Leptin）

Leptin 是由希臘文leptos (=thin)而來，主要從成熟的白色脂肪細胞所產生的一種細胞激素荷爾蒙，也可在腦、骨髓、胃、消化道和肌肉組織、懷孕婦女之胎盤所分泌（Considine, 2001；Scharf et al., 2004；Holness et al., 1999）。Leptin 為一種 encode *ob* gene，由167個胺基酸所組成的蛋白質，分子量為16kDa，其接受器(OB-R)是屬於interleukin 6 receptor of class I cytokine receptor superfamily，透過Janus kinase and signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) 途徑傳導訊息。OB-R 大致分成五種：OB-Ra, OB-Rb, OB-Rc, OB-Rd 與OB-Re。五種OB-R 其N 端胺基酸序列相似，但具有不同C 端胺基酸序列（Bates et al., 2000；Münzberg et al., 2005）。瘦激素主要參與下視丘調節能量平衡的功能，其作用機轉主要是降低下視丘內神經胜肽酪氨酸的含量（neuropeptide Y；NPY），藉由抑制NPY可降低食慾、增加交感神經活性且抑制副交感神經活性（Mercer et al., 1997），維持能量與體重平衡。Leptin 主要經由三條途徑來調節能量代謝：1.刺激下視丘飽食中樞；2.興奮交感神經系統，提高組織代謝，促進能量的消耗與轉化；3.增加脂肪分解酶的合成和細胞色素C氧化酶的產生，抑制脂肪合成。

近年來有許多文獻指出，瘦激素可在嗅黏膜(olfactory mucosa)內合成與表現，其接受器與其接受器之異構體被發現存在於嗅覺之黏膜細胞、支持細胞和 subpopulation of maturing neurons。存在嗅覺內的瘦激素及其接受器可以調控嗅覺對氣味的敏感性，進而強化預攝食行為（pre-ingestive behavior）。攝入營養狀態的不同也會改變嗅覺內瘦激素的表現（Getchell et al., 2006；Baly et al., 2007）。

(三) 食慾素 (Orexins)

Orexin來自希臘文orexia為食慾之意，亦稱為hypocretins。1998年學者在大鼠腦組織提取物中發現此神經多肽能激活G-protein couple receptor，且與任何已知的多胜肽無相似之處，由於此多肽能刺激動物攝食故命名為orexin (de Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998)。食慾素不僅調控攝食行為 (feeding behavior) 亦參與睡眠與覺醒週期 (sleep-wake cycle) 之調控 (Sakurai, 2002)，更影響生殖、血壓、感覺及體溫等生理反應 (Peyron et al., 1998; Date et al., 1999; Mulet et al., 2000; Sakurai, 2002; Baldo et al., 2003)。藉由基因剔除食慾素神經元的老鼠，則可觀察到老鼠有嗜睡及厭食的行為表現 (Hara et al., 2001)。食慾素以兩種形式存在：為兩個C2末端乙醯化的單體 Orexin A 和 Orexin B (或者稱 hypocretin-1和 hypocretin-2)。Orexin A 含33 個胺基酸殘基；orexin B 含 28個胺基酸殘基，其受體也有兩種，Orexin 1 R與Orexin 2 R。人和大鼠Orexin1 R 有94%相似，與Orexin 2 R 則有95%，可知其基因具有高度的保守性。

食慾素神經元存在於生命早期，一直至成年其數目亦不斷地增加 (Yamamoto et al., 2000)，並與泌乳激素 (prolactin) 和強啡肽 (dynorphin) 共同表現。在饑餓狀態下，下視丘可分泌orexin，刺激進食中樞，而引起食慾。並且，Orexin亦存在嗅覺系統中 (cilia, olfactory nuclei 和amygdala) (Caillol et al., 2003)。

第三節、神經胜肽酪氨酸 (Neuropeptide Tyrosine ; NPY)

一、 簡介

神經胜肽酪氨酸最早在 1982 年由 Tatemoto 從牛腦中分離出來，為 36 個胺基酸所組成的神經胜肽，屬於一種神經傳導物質。其命名由來是因為此胜肽鏈的氨基端與羧基端都是酪氨酸 (tyrosine, Y) 故稱為 Neuropeptide Tyrosine、Neuropeptide Y，簡稱為 NPY。

NPY 胺基酸結構中的氨基端與其受體的親和力相關；羧基端則可維持 NPY 的生物活性。從牛腸中所分離出來的胜肽序列因為與 NPY 高度相似，故命名為 peptide YY (PYY)，兩者的結構均極類似於胰臟的多胜肽 (pancreatic polypeptides ; PPs)，遂歸屬於相同的胜肽家族，稱為 NPY 家族 (NPY family) 或者是 NPY 超級家族 (NPY super-family) (各胺基酸序列如表 2-3 所示)。

NPY 廣泛地分布在脊椎動物的周邊與中樞神經系統及消化 (Cerdá-Reverter and Larhammar, 2000)，因為分佈廣泛，對於許多生理功能及反應扮演重要的調控角色，例如：促進攝食行為、血壓、交感神經、心跳之調控以及生殖行為、性行為、焦慮、情緒、壓力之反應等等 (Rutkowski et al., 1999)。

NPY 含量則藉由一些因子所調控，例如神經成長因子 (NGF) (Sabol et al., 1990) 和表皮生長因子 (EGF) (Colmers et al., 1993) 均會促進 NPY mRNA 的表現；然而，胰島素 (Higuchi et al., 1988)、糖皮質激素 (glucocorticoid) (Misaki et al., 1992) 以及瘦體素 (Schwartz et al., 1996) 均會降低 NPY mRNA 表現。此外，下視丘鋅濃度的不足，會引起食慾減退而使下視丘內 NPY 含量增加 (Lee et al., 1998)。嗅球內銅濃度的缺乏，則會造成嗅球內之 NPY mRNA 表現與控制組相比有顯著性地增加 (Rutkowski et al., 1999)。

表 2-3、神經胜肽 Y、胜肽 YY 與胰臟多胜肽

Table 2-3. Primary amino acid and sequence of neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide.

	1	5	10	15	20	25	30	35	Diff																												
NPY																																					
human	Y	P	S	K	P	D	N	P	G	E	D	A	P	A	E	D	M	A	R	Y	Y	S	A	L	R	H	Y	I	N	L	I	T	R	Q	R	Y-NH2	
rat	Y	P	S	K	P	D	N	P	G	E	D	A	P	A	E	D	M	A	R	Y	Y	S	A	L	R	H	Y	I	N	L	I	T	R	Q	R	Y-NH2	
porcine	Y	P	S	K	P	D	N	P	G	E	D	A	P	A	E	D	L	A	R	Y	Y	S	A	L	R	H	Y	I	N	L	I	T	R	Q	R	Y-NH2	1
guinea pig	Y	P	S	K	P	D	N	P	G	E	D	A	P	A	E	D	M	A	R	Y	Y	S	A	L	R	H	Y	I	N	L	I	T	R	Q	R	Y-NH2	
dogfish	Y	P	S	K	P	D	N	P	G	E	G	A	P	A	E	D	L	A	K	Y	Y	S	A	L	R	H	Y	I	N	L	I	T	R	Q	R	Y-NH2	3
lamprea	F	P	N	K	P	D	S	P	G	E	D	A	P	A	E	D	L	A	R	Y	L	S	A	V	R	H	Y	I	N	L	I	T	R	Q	R	Y-NH2	6
PYY																																					
human	Y	P	I	K	P	E	A	P	G	E	D	A	S	P	E	E	L	N	R	Y	Y	A	S	L	R	H	Y	L	N	L	V	T	R	Q	R	Y-NH2	
rat	Y	P	A	K	P	E	A	P	G	E	D	A	S	P	E	E	L	S	R	Y	Y	A	S	L	R	H	Y	L	N	L	V	T	R	Q	R	Y-NH2	2
porcine	Y	P	A	K	P	E	A	P	G	E	D	A	S	P	E	E	L	S	R	Y	Y	A	S	L	R	H	Y	L	N	L	V	T	R	Q	R	Y-NH2	2
guinea pig	Y	P	S	K	P	E	A	P	G	S	D	A	S	P	E	E	L	A	R	Y	Y	A	S	L	R	H	Y	L	N	L	V	T	R	Q	R	Y-NH2	3
dogfish	Y	P	P	K	P	E	N	P	G	E	D	A	P	P	E	E	L	A	K	Y	Y	S	A	L	R	H	Y	I	N	L	I	T	R	Q	R	Y-NH2	9
lamprea	F	P	P	K	P	D	N	P	G	D	N	A	S	P	E	Q	M	A	R	Y	K	A	A	V	R	H	Y	I	N	L	I	Y	T	Q	R	Y-NH2	14
PP																																					
human	A	P	L	E	P	V	Y	P	G	D	D	A	T	A	E	Q	M	A	Q	Y	A	A	D	L	R	R	Y	I	N	M	L	T	R	P	R	Y-NH2	
rat	A	P	L	E	P	M	Y	P	G	D	Y	A	T	H	E	Q	R	A	Q	Y	E	T	Q	L	R	R	Y	I	N	T	L	T	R	P	R	Y-NH2	8
porcine	A	P	L	E	P	V	Y	P	G	D	D	A	T	P	E	Q	M	A	Q	Y	A	A	E	L	R	R	Y	I	N	M	L	T	R	P	R	Y-NH2	2
guinea pig	A	P	L	E	P	V	Y	P	G	D	D	A	T	P	Q	Q	M	A	Q	Y	A	A	E	M	R	R	Y	I	N	M	L	T	R	P	R	Y-NH2	4
avian	G	P	S	Q	P	T	Y	P	G	D	D	A	P	V	E	D	L	I	R	F	Y	D	N	L	Q	Q	Y	L	N	V	V	T	R	H	R	Y-NH2	20

Diff represents the number of amino acid that is not identical to sequences found in human (van Dumont and Quirion, 2006)



二、NPY 對於攝食行為之影響

(一) 下視丘調控攝食行為之概論

下視丘 (hypothalamus) 是中樞調控食慾及能量平衡的主要位置。能量平衡是藉由攝入食物的能量與消耗的能量維持一個平衡狀態；攝食行為則依賴下視丘對於食慾之飽食訊息及進食訊息兩者間相互的調節作用。Stellar (1954) 提出「雙中心假說 (dual center hypothesis)」，指出下視丘有兩個調控食慾的中樞，一個是進食中樞 (feeding center)，位於外側核 (lateral hypothalamus; LH)，主要是刺激食慾的位置；當破壞LH 則會減少攝食和飲水，並降低體重，若以電擊刺激LH 時，則會增加食物攝取，進而導致肥胖 (Carlson, 1991)。另一個為飽食中樞 (satiety center) 位於腹內側核 (ventromedial hypothalamus; VMH)，當破壞此區域則會過度攝食而導致肥胖，若以電擊刺激VMH 時，會有飽食感並減少進食。近年來的研究指出，下視丘的弓形核 (Arcuatenucleus; ARC)、視上核 (Supraoptic nucleus; SON) 與室旁核 (Paraventricular nucleus; PVN) 等，亦是調控攝食行為的重要區域 (Anand and Brobeck, 1951; Gold, 1973; Swanson and Sawchenko, 1983)。且隨著解剖學、分子醫學研究之進步，雙中心假說依據Elmqvist等學者 (1999) 研究，必須再考慮神經傳遞物質 (neurotransmitter) 的分布影響。

下視丘靠近第三腦室，弓狀核-外側核-自律神經系統 (ARC-LHA-ANS 或是 ARC-LHA-cerebral cortex) 靠近下視丘外側，稱為外側進食神經網路，是刺激食慾的主要區域。於飢餓狀態會被活化的神經傳遞物質有食慾素 (orexin) 及MCH (melanin concentrating hormone) 等。另一類則為弓狀核-旁核-自律神經系統 (ARC-PVN-ANS) 之內側飽覺神經網路 (medial hypothalamic satiety network)，是抑制食慾的主要區域，參與食慾減退的神經傳遞物質有 α -MSH (α -melanocyte stimulating hormone)、CART (cocaine and amphetamine regulated) 等。然而，NPY 及豚鼠相關蛋白 (agouti-related protein; AgRP)，從血液來的受體素 (leptin)、胰島素 (insulin) 以及糖皮質激素等，則可同時作用在這兩類神經網路 (Elmqvist et al., 1999)。

因此，可簡單歸類為：下視丘中的弓狀核內具有兩組神經元，分別是促進食慾、增加攝食的NPY/AgRP 神經元 (NPY/AgRP neuron) 與抑制攝食、降低食慾的POMC/CART 神經元 (POMC/CART neuron)，其中NPY/AgRP 神經元分泌NPY

以刺激大腦產生食慾；而POMC/CART 神經元則分泌POMC，其裂解物 α -MSH刺激大腦抑制食慾及減少攝食（如圖2-4所示）。

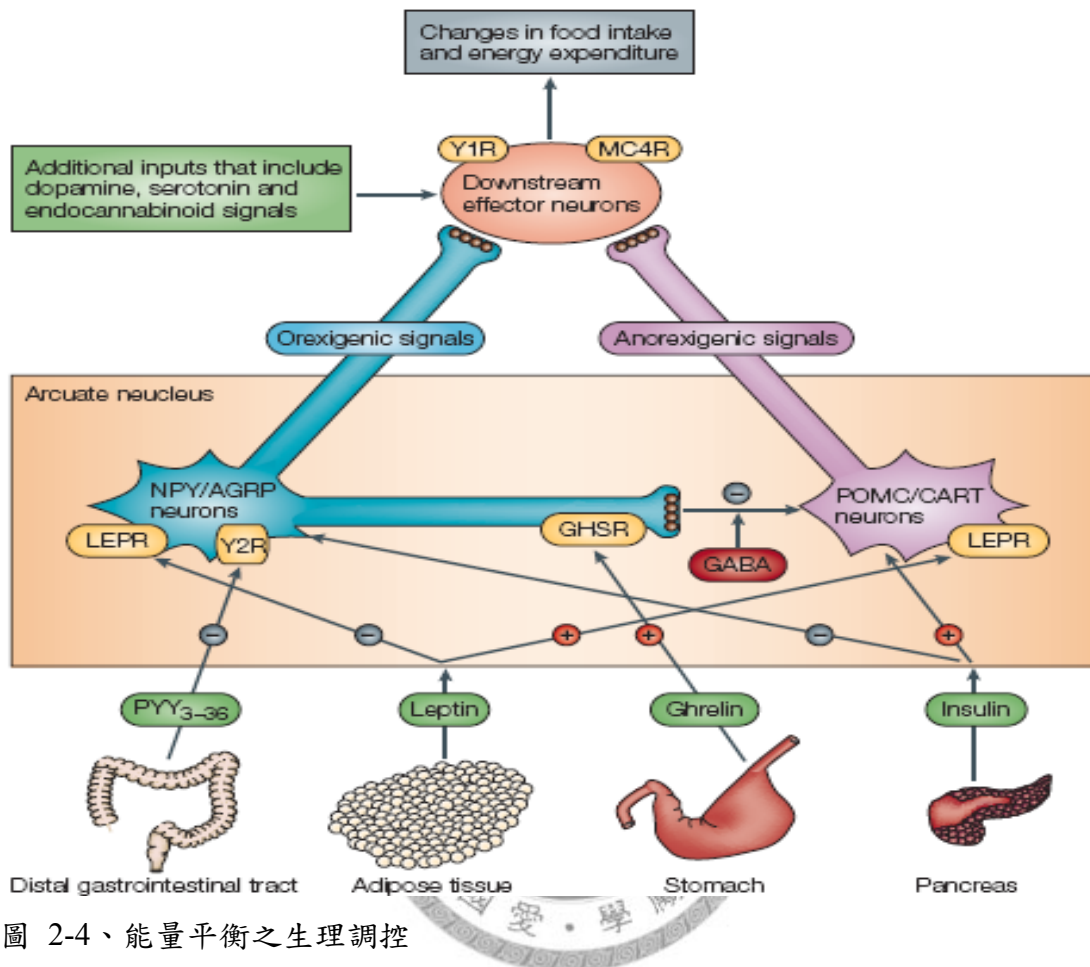


圖 2-4、能量平衡之生理調控

Figure 2-4. Physiological regulation of energy balance (Barsh and Schwartz, 2002)

（二）下視丘 NPY 調控攝食之角色

神經胜肽Y (Neuropeptide Y, NPY) 廣泛地存在中樞與周邊神經系統，最主要的功能在於刺激食慾、增加攝食 (Clark et al., 1984)。在動物實驗中可以發現，經注射NPY 後，會增加動物尋找食物及攝食的慾望 (Seeley et al., 1995; Ammar et al., 2000; Benoit et al., 2005)。另外，NPY 能使已感到飽足的動物繼續進食，進而延緩飽食感、增加攝食量 (meal size) 而造成肥胖，亦能改變食物種類的選擇行為 (Stricker-Krongrad et al., 1994; Lynch et al., 1994)。NPY促進攝食的行為先是藉由弓狀核之神經細胞來合成NPY，進而將其傳遞到下視丘，下視丘再傳遞至室旁核與其它神經核，例如：外側區、背側核 (Dorsomedialnucleus) 以及下視丘其它區域 (Billington et al., 1994; Inui, 2000; Kalra et al., 1999)；而位於弓狀核的NPY 的表現則會受瘦體素所調控，可降低下視丘弓狀核中NPY 作用 (Inui, 1999; Kalra et al., 1997)。缺乏瘦激素 (leptin deficiency) 的ob/ob小鼠、或缺乏瘦激素接受器之db/db 小鼠，其下視丘弓狀核NPY mRNA的表現量會增加，且釋放至室旁核的NPY 量也會伴隨著增加 (Dryden et al., 1995a; Erickson et al., 1996)。然而，當能量缺乏或能量代謝增加時，NPY神經元會受到活化，NPY 的合成和分泌也會增加 (Baskin et al., 1999; Chance et al., 1994)。

神經胜肽Y與受體的結合必須透過細胞膜上的G-蛋白連結的接受器來產生作用，目前已有六種NPY 接受器被發現，包括：Y1、Y2、Y3、Y4、Y5、Y6，除了Y3 之外其餘皆已被選殖 (Cloned) 出來 (Balasubramania, 1997, 2002)。在中樞神經系統給予神經胜肽Y1 或Y5 受器之拮抗劑後，則會抑制自發性及神經胜肽Y 所誘導的攝食行為 (Dube et al., 1995; Ishihara et al., 1998; Kanatani et al., 1996; Polidori et al., 2000)。在剔除神經胜肽Y1 接受器的大鼠中，攝食量、體重、活動力都會明顯降低，且棕色脂肪中去耦合蛋白 (Uncoupling protein; UCP-1) 的含量則會顯著增加 (Polidori et al., 2000)；在神經胜肽Y5 接受器剔除的大鼠中亦有攝食量及體重降低之情形 (Inui, 2000; Michel et al., 1998)，所以，Y1、Y5 接受器在NPY 所誘導的增加攝食調控作用中扮演其重要角色。

在能量平衡方面，若在腦室或室旁核注射神經胜肽Y 後，將會減少棕色脂肪組織 (Brown adipose tissue; BAT) 的產熱作用 (Thermogenesis)、降低能量消耗 (Energy expenditure) 及增加食物之攝取，進而減少能量消耗、促進脂肪儲存，

最後導致肥胖（Billington et al., 1991；Egawa et al., 1991；Zarjevski et al., 1993）。

NPY 的受體亦存在於許多免疫系統的主要細胞上，例如巨噬細胞、淋巴細胞與嗜中性白血球，NPY 對於免疫細胞的作用主要包括抑制巨噬細胞細胞激素的分泌（如 IL-6），抑制天然殺手細胞活性與抑制暴露於某種抗原下，專一性種類的抗體產生（Bedoui et al., 2003）。

在嗅覺內由嗅鞘細胞所表現的 NPY 則擔任抗感染的功能，其保護嗅上皮細胞和鼻腔神經通道免於細菌的感染。除此之外，由嗅鞘細胞所表現的 NPY 也被認為是嗅覺神經元的生長因子（Hansel et al., 2001; Ubink and Hokfelt, 2000）。

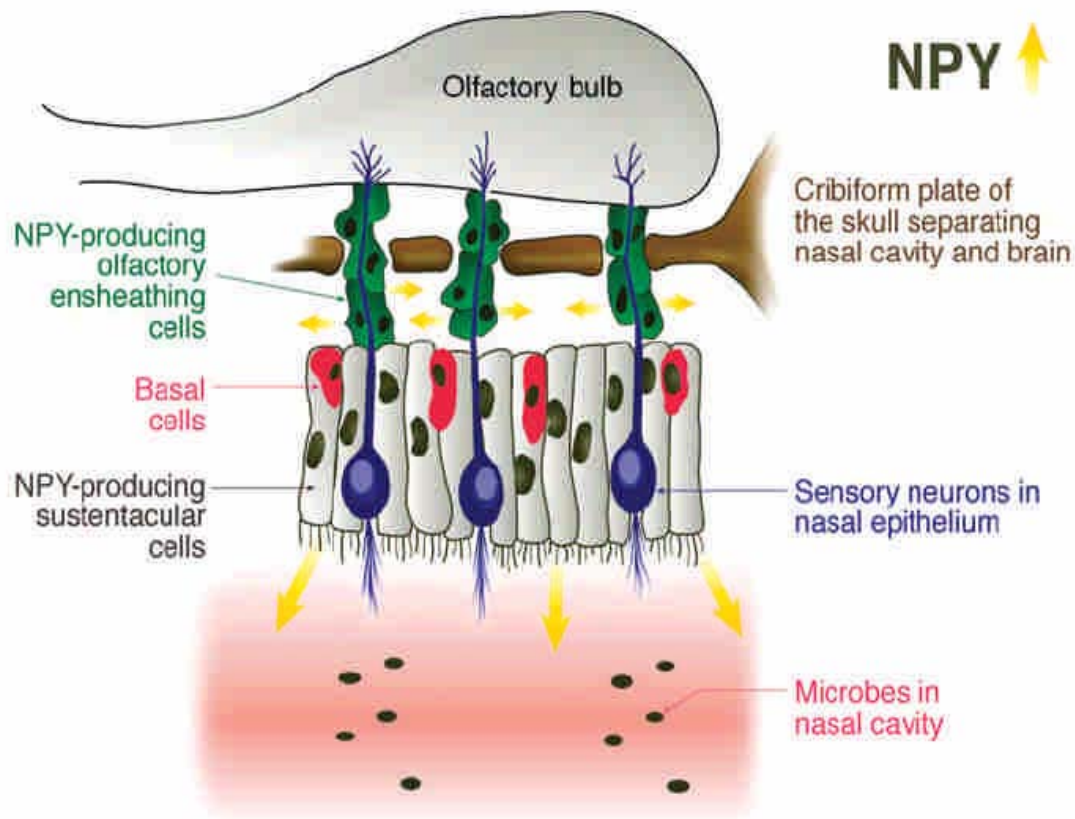


圖 2-5、神經胜肽 Y 在嗅覺系統的分泌表現

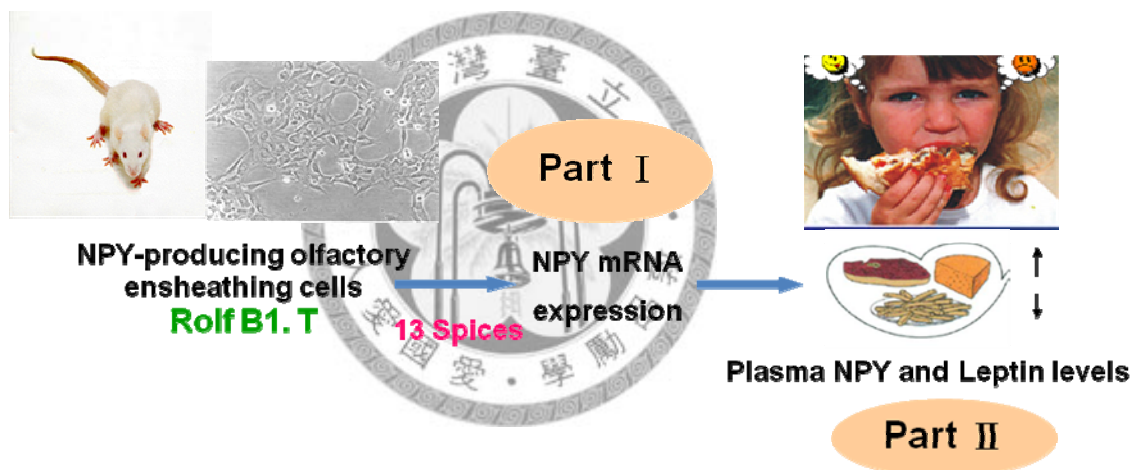
Figure 2-5. NPY-producing cells in the olfactory system. (Brogden et al., 2005)

第三章 研究動機與架構

第一節、研究動機

NPY為神經胜肽酪氨酸(neuropeptide tyrosine) 之簡稱，由36個胺基酸所組成，廣泛地分布在中樞神經與周邊神經組織，是一種促進食慾之胜肽，對於促進食慾之影響最為重要。在2005年Shen等人發現葡萄柚精油及其組成分檸檬油烯(limonene) 能抑制動物食慾，而薰衣草精油及其主成分沈香醛(linanool) 則促進動物食慾，故推測香氣成分能刺激或抑制嗅覺神經分泌NPY，進而影響攝食行為。本實驗室之前的研究發現，以檸檬油烯及沈香醛處理培養兩天之大鼠嗅覺細胞10分鐘，可以作為抑制及刺激NPY mRNA 表現的篩選平台。

故本研究目的可分為兩部份：

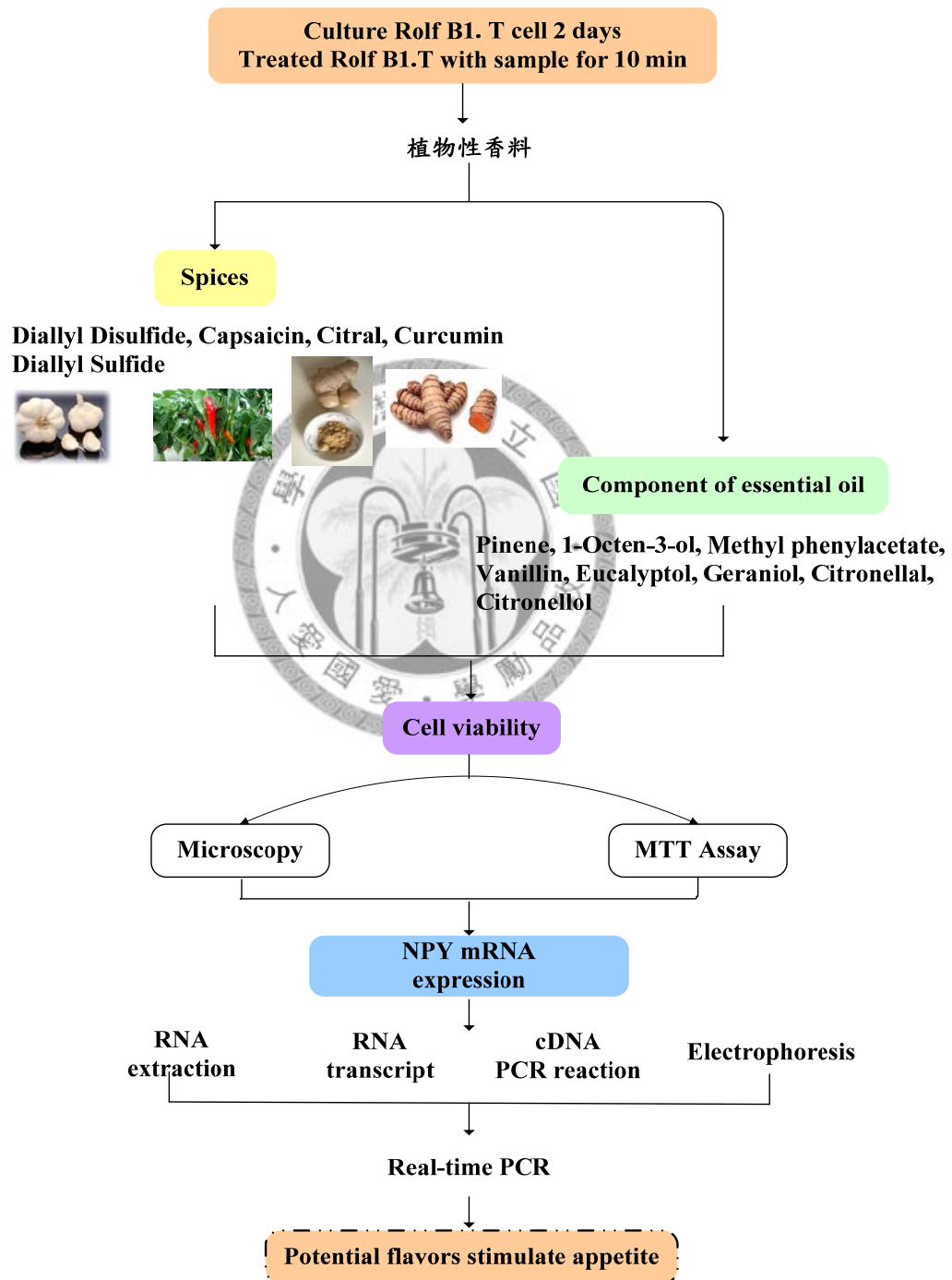


第一部份：藉由篩選平台：以 5×10^5 cells/mL 大鼠嗅覺神經細胞培養兩天，處理香料物質 10 min 之模式。篩選出具有潛力刺激大鼠嗅覺神經細胞表現 NPY mRNA 之香料物質

第二部份：藉由人體試驗驗證第一部份之結果

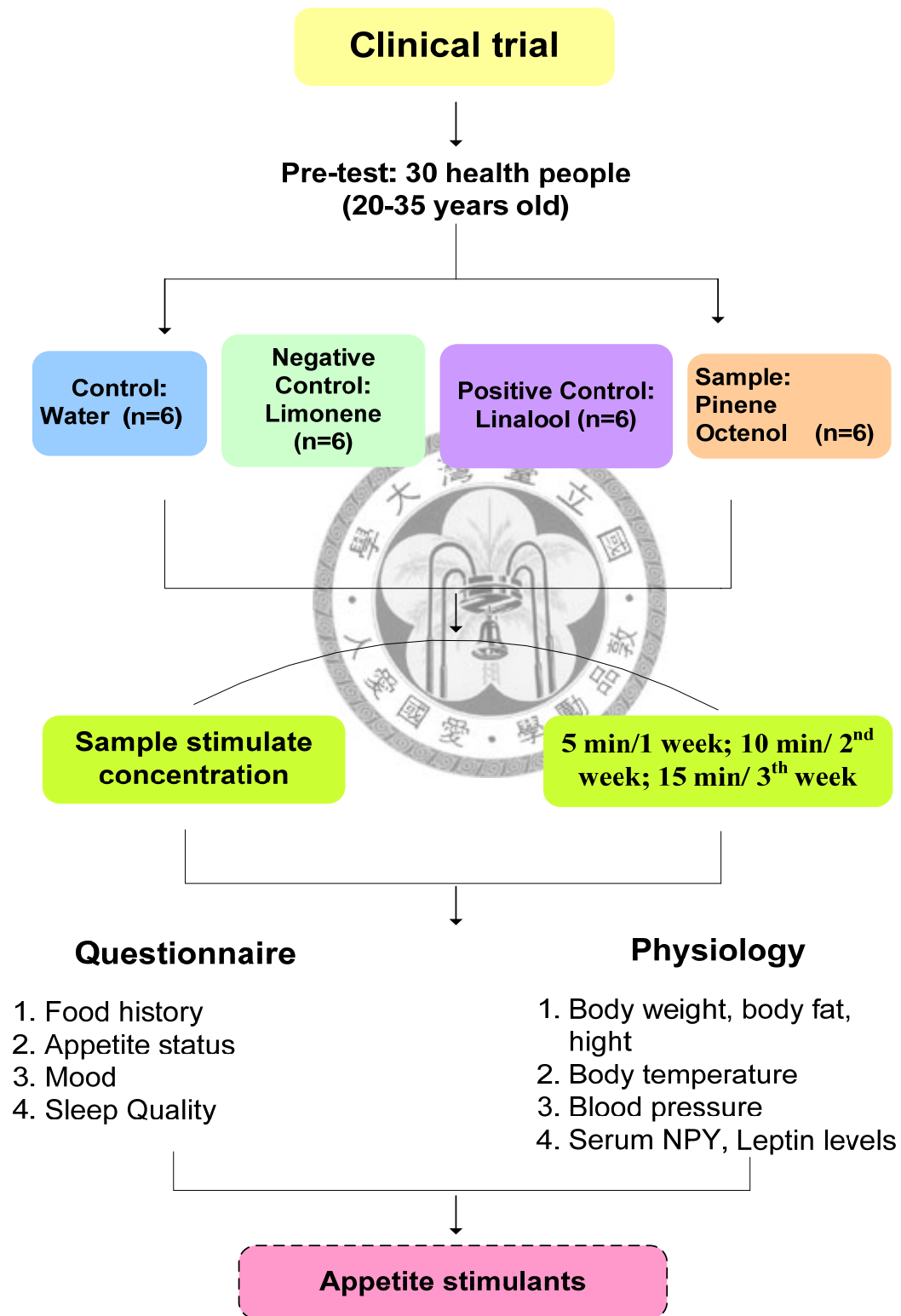
第二節、研究架構

第一部份：藉由篩選平台：以 5×10^5 cells/mL 大鼠嗅覺神經細胞培養兩天，處理香料物質 10 min 之模式。篩選出具有潛力刺激大鼠嗅覺神經細胞表現 NPY mRNA 之香料物質



第二部份：藉由人體實驗驗證由

第一部份篩出具有刺激食慾潛力的香氣物質



第四章 實驗材料與方法

第一節、實驗材料

一、細胞株

成年大鼠嗅覺髓鞘細胞株 Rolf B1.T (Adult rat olfactory nerve ensheathing cells)，委託財團法人食品工業發展研究所自 European Collection of Cell Culture Health Protection Agency (ECACC) 輸入。此細胞株能表現膠質纖維酸性蛋白 S100、低親和力神經營養因子受體 p75 神經生長因子、粘連蛋白 laminin、tenascin 及 NCAM。

二、實驗藥品與試劑

1. 購自 Sigma, St. Louis, Mo, USA：

Capsaicin

Citral

Curcumin

Diallyl disulfide

Geraniol

Methyl phenylacetate

3-(4,5-dimethyl Thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)

1-octen-3-ol

Sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4)

Sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3)

Trypan blue

Vanillin

2. 購自 Merck, chemical Co., USA

Citronellal

Diallyl sulfide

(+/-)-Linalool

s-(-)-limonene

Sodium chloride (NaCl)

3. 購自 Merck, Hohenbrunn, Germany

Dimethyl sulfoxide (DMSO)



4. 購自 Hyclone, Logan, Utah, USA

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

Fetal bovine serum (FBS)

5. 購自 fluca

Eucalyptol

6. 購自 alfa aesar

Citronellol

7. RNase inhibitor

						實驗使用之
簡稱	品名	純度	數量	廠商	中文名	溶劑濃度： DMSO
L1	s-(-)-Limonene	99%	1 ml	Fluca	萜烯/檸檬油烯	5000 ppm
L2	(+/-)-Linalool	97%	100 ml	Merck	沈香醛/芳樟醇	5000 ppm
C1	Citronellal	96%	100 ml	Merck	香茅醛	5000 ppm
C2	Citronellol		5 ml	alfa aesar	香茅醇	5000 ppm
Citral	Citral	95%	5 ml	Sigma-Aldrich	檸檬醛	10000 ppm
Cur	Curcumin	90%	10 g	Sigma-Aldrich	薑黃素	10000 ppm
Cap	Capsaicin		50 mg	Sigma-Aldrich	辣椒素	10000 ppm
DAS	Diallyl sulfide	97%	50 ml	Merck		10000 ppm
DADS	Diallyl disulfide	80%	25 g	Sigma-Aldrich		10000 ppm
E	Eucalyptol	99%	1 ml	Fluca	桉葉醇	5000 ppm
G	Geraniol	98%	25 g	Sigma-Aldrich	香葉草醇	5000 ppm
M	Methyl phenylacetate	99%	5 g	Sigma-Aldrich		5000 ppm
O	1-octen-3-ol	98%	10 g	Sigma-Aldrich	1-壬烯-3-醇 (蘑菇醇)	5000 ppm
P	(-)- α -Pinene	99%	1 ml	Fluca	蒎烯	10000 ppm
V	Vanillin		100 g	Sigma-Aldrich	香草醛	5000 ppm

三、主要設備與儀器

1. 0.22, 0.45 μm 無菌針筒過濾器 購自 Pall corporation
2. 1 ml、2 ml、5 ml、10 ml serological pipettes 購自 TPP, Switzerland
3. 15 ml、50 ml 無菌離心管 購自 Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany
4. 500 ml、1000 ml 血清瓶 購自 Schott, Germany
5. 3 mL, 5 mL, 10 mL 針筒
6. Cell culture 培養瓶 (25cm^2 、 75cm^2) 購自 Cellstar, USA
7. pH meter (Jenco 6071) 購自 台北，台灣
8. Pipet (100 μl 、1ml、5ml、10ml) 購自 Rainin, USA
9. Pipet-aid 購自 Drummond Scientific Co., USA
10. Tip (0.2ml、1ml、5ml、10ml) 購自 Gilson, USA
11. 天平 Balance (HR-200) 購自 A&D, USA
12. 血球計數板 (Hemocytometer) 購自 Neubauer Ma
13. 自動免疫酵素分析儀 (Precision microplate reader) 購自 Emax, Molecular Devices, USA
14. 烘箱 (Eyela WFO-600SD Windy oven) 購自 Tokyo, Japan
15. 高壓滅菌釜 (Dong-ming TM323 Autoclave) 購自 台北，台灣
16. 無菌操作台 (Laminar flow) 購自 炬安，台北，台灣
17. 液態氮冷凍鋼筒 購自 Taylor-Wharton, 34HC
18. 恆溫水浴槽 Tungtec RT-25R Reciprocating low temp. shaker bath 購自 台北，台灣
19. 直立顯微鏡 (Microscope Eclipse TE300) 購自 Nikon, Japan
20. 倒立顯微鏡 Inverted microscope (Eclipse TE300) 購自 Nikon, Japan
21. 培養箱 CO₂ incubator (Model TC 2323) 購自 SHEL LAB, Japan
22. 離心機 Centrifuge KUBOTA 2100 購自 KUBOTA, Japan
23. 去離子水由 Milli-Q 純水系統 (Bedford, MA, USA)
24. 超微量分光光度計 Nanodrop-100 (ND-100)
25. 電泳儀器 (Mupid-2plus gel electrophoresis system) 購自 Cosmo Bio Co., Ltd., Tokto, Japan

26. 影像分析系統 (UV-box)

27. PCR 熱循環器 (PCR thermocycler) 購自柏昂儀器

第二節、實驗方法

一、細胞培養

(一) Rolf B1. T 細胞之冷凍、解凍及培養

1. Rolf B1. T 細胞之解凍

進行實驗前兩週，採用快速解凍的方式將凍存的Rolf B1. T 細胞自液態氮中取出後，迅速置於37°C 恆溫槽中，待融化至剩下一小塊冰時，立即於無菌操作台中吸出細胞液並緩慢加入含培養液（89% DMEM + 10% FBS + 1% L-glutamine）離心管中，再以培養液調整細胞濃度，置入T75之培養瓶中，於37°C，5% CO₂，且具充分溼度的培養箱中培養24小時後使細胞貼附後，再更換培養瓶中的培養液。

2. Rolf B1. T 細胞之培養

細胞培養於含89% DMEM、10% FBS及1% L-glutamine 的培養液中，放置於37°C，5% CO₂，且具充分溼度的培養箱中培養。

3. Rolf B1. T 細胞之繼代培養

待細胞生長面積至八、九分滿時，即可進行繼代培養（subculture），進行繼代培養時，先將細胞自培養箱中取出，吸出原先之培養液，以 3mL PBS 緩衝液清洗細胞並取出，之後加入3mL 0.25% Trypsin-EDTA放回培養箱作用3分鐘，使細胞不貼附於培養瓶底部，並以含FBS的培養液中和Trypsin-EDTA 酵素反應，將細胞收集於15 mL無菌離心管中，於室溫以1000 rpm, 5 min 離心，去除上清液並加入培養液混合均勻，再利用無菌吸管將細胞懸浮液均一化，取少部分利用血球計數板計算細胞數，再用培養液(89% DMEM + 10% FBS + 1% L-glutamine)將細胞濃度調至 1×10^5 cells/mL，吸入T75之培養瓶中，並於培養瓶上標記繼代日期及細胞數目，再放入培養箱中。確認Rolf B1. T 細胞呈現指數生長狀態且存活率達98% 以上時，才進行後續實驗。

4. Rolf B1. T 細胞之凍管保存

細胞經大量培養後，調整細胞濃度為 5×10^6 cells/ml 後，加入每1mL含90% FBS及10% dimethyl sulfoxide (DMSO)液體，混合均勻後置入無菌冷凍小管，並標明細胞名稱及數目、冷凍日期。之後利用慢速降溫方式，放入Cryo Freezing Container: 加入100% isopropyl alcohol (isopropanol)，並放置於-80°C 冰箱漸進降溫，隔夜，再將冷凍小管移至液態氮中，則可長期保存。

(二) 細胞計數

取適當稀釋之0.1ml細胞懸浮液，加入0.1ml 0.4% Trypan blue染色，在顯微鏡下計數細胞，計數血球計數器中，染成藍色的死細胞和未染色的活細胞。

計算公式如下：

$$\text{細胞數/ml} = \left[(\text{血球計數器8大格總活細胞數}) / 8 \right] \times 2 \times 10^4 \times \text{稀釋倍數}$$

用DMEM培養液調整細胞數至所需濃度，以備實驗使用。

(三) 香氣物質對於 Rolf B1. T細胞存活率試驗 (MTT assay)

MTT [3-(4, 5)-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] 還原法是1983年Mosmann 學者發展出以呈色反應來測定活細胞數的方法，原理為利用活細胞中粒腺體內琥珀酸脫氫酶 (succinate dehydrogenase) 會將淡黃色水溶性MTT之tetrazolium還原成紫色結晶的formazan沈澱，再加入溶劑溶解結晶後，可測定570 nm下的吸光值，當存活細胞越多，吸光值也就越高。而死細胞粒腺體不含脫氫酶，所以MTT顏色並不會產生變化，仍為淡黃色 (Mosmann, 1983)。

於細胞繼代時將細胞收集並計數，將細胞濃度調整為 5×10^5 cells/mL，且每一well種入100 μ L的細胞於培養盤中培養。試驗組與空白試驗組分別為：添加100 μ L 不同濃度之香氣成分與DMEM 及當溶劑的DMSO。經過15 分鐘培養後，移除不同濃度之香氣成分與DMEM，再加入100 μ L MTT (2mg/mL)，於37°C，含5% CO₂ 的培養箱中培養3小時後，添加100 μ L lysis buffer (DMSO)，待15分鐘後，於570nm 測吸光值，測定細胞毒性或細胞增殖能力。以DMEM培養液組別當作基準，計算添加不同濃度之香氣成分之細胞毒性或細胞增殖能力百分比。並使用單因子共變數分析 (ANOVA)，試驗結果以SAS套裝統計分析軟體進行分析，以 Duncan's 判斷其差異顯著性。

(四) 以香料物質刺激 Rolf B1. T 大鼠嗅覺神經細胞

取 5×10^5 cells/mL細胞液加入6 well 培養瓶中，置於37°C，含5% CO₂ 的培養箱中培養兩天，兩天後加入不同之香料物質處理，以香料物質的溶劑做為正相關組別及DMEM培養液做為空白組別。加入樣品後，置於37°C，含5% CO₂ 的培養箱中培養10 分鐘後，收集細胞並抽取RNA。

二、基因表現

(一) 抽取 Rolf B1. T total RNA (Total RNA extraction)

5×10^5 cells/mL 經香氣成分刺激後之細胞，使用Geneaid RNA Mini kit 抽細胞RNA。將細胞切下來後以100 μ L PBS 打散細胞，加入400 μ L RB Buffer 和4 μ L β -mercaptoethanol 混勻後靜置5 分鐘，再加入500 μ L，70% Ethanol 充分混勻，從中先取502 μ L混和液體移至 RB Column中，於 4°C 以13,000離心1分鐘後，去除過濾液。再將剩下的502 μ L混和液體移至 RB Column中，於 4°C 以13,000離心1分鐘後，去除過濾液。加入 400 μ L W1 Buffer，於 4°C 以13,000離心1分鐘後，去除過濾液。加入600 μ L Wash Buffer，於 4°C 以13,000離心1分鐘後，去除過濾液，重複兩次。換 column 並於 4°C 以13,000離心3分鐘後，加入RNase-free water (DEPC) 靜置3分鐘，於 4°C 以13,000離心1分鐘，收取離心下來的液體即為此細胞的total RNA。

(二) RNA 濃度及品質之測定

1. 超微量分光光度計 Nanodrop-100 (ND-100)

取上述的RNA 2 μ L，利用超微量分光光度計 Nanodrop-100 (ND-100) 測定RNA 濃度及品質。ND-100超微量分光光度計是應用液體表面張力的特性，只需1-2 μ L樣品，在偵測台上，經上下臂的接觸拉出固定的光徑（1 mm 及0.2 mm），達到快速、微量、高濃度、免石英管、免毛細管等耗材偵測吸收值的優點。開啟nanodrop 執行程式，點選Nucleic Acid，校正完畢後，利用分光光譜儀測定在波長260 nm 處的吸光值藉以估計RNA 的濃度。（O.D.260=1時，相當於原液中RNA 的濃度為40 μ g/ μ L）。並紀錄260/230、260/280 吸光值之比值以鑑別RNA 之品質，260/230值應介於2.0-2.2，260/280 值應介於1.8-2.0為佳。

2. 甲醛洋菜膠體電泳 (formaldehyde-agarose gel electrophoresis)

甲醛是一種常用的RNA變性劑。在進行甲醛洋菜膠體電泳分析時，必須先配置含有甲醛的洋菜膠，RNA必須先以甲醛及formamide 進行變性處理，以確保其二度結構充分被打開。由於甲醛可能是一種致癌物質，配製膠體及進行電泳分析時都應在抽氣櫥裡小心操作；進行電泳時所使用的緩衝液為MOPS。此外，含有甲醛的洋菜膠體較滑溜，容易破裂，在移動膠體時應特別留意。由於 rRNA佔細胞RNA總量之80~85%，以ethidium bromide染色後，呈現於膠體上的兩個主要RNA色帶應該分別是large與small rRNAs(真核生物為 28S與18S，原核生物為 23S與16S)；散佈於small rRNA附近，呈淡淡smear的就是mRNAs，這是因為 mRNAs存在量不多，而且長度不一的緣故。

方法步驟如下 (Sambrook et al., 1989)

1. 配置1.2% 甲醛洋菜膠體

- (1) 秤取0.48 g agarose 置100 mL血清瓶中，加入25 mL dH₂O/DEPC
- (2) 以微波爐加熱溶解後，微微晃動血清瓶使混和均勻，再移至60°C 恆溫水槽靜置5 min
- (3) 將裝著agarose溶液的血清瓶移至抽氣櫥，加入8 mL 之5倍 formaldehyde gel running buffer 及7.2 mL之甲醛，輕輕搖晃血清瓶以便混和均勻
- (4) 儘速於抽氣櫥內把混和液倒入膠體鑄模，並插入齒梳（膠體凝固約 30 min）

2. RNA樣品準備（總體積為20 µL）

- (1) dH₂O/DEPC: 4.5-X (µL)
RNA (6 µg) : X (µL)
5倍formaldehyde gel running buffer : 2 (µL)
Formaldehyde : 3.5 (µL)
Formamide : 10 (µL)
- (2) 混和均勻並離心數秒後，放置於65°C 恆溫水槽作用15 min

(3) 將作用完之微量離心管移至冰浴中

(4) 離心數秒後，再將離心管放回於冰浴中，並於各離心管分別加入
2 μL formaldehyde gel loading buffer與 1 μL ethidium bromide

3. 電泳

(1) 進行電泳時，把已凝固之洋菜膠體放進電泳槽，並加入適當1倍
formaldehyde gel running buffer

(2) 以50 V電壓預跑 5 min

(3) 注入欲分析之 RNA樣品，以50 V電壓進行電泳，待追蹤染劑移動
至膠體三分之二處時，關閉電源，將膠體移至UV transilluminator
box，觀察RNA色帶之存在情形

(三) RNA 之反轉錄 (Reverse transcription)

1. 利用BIO-RAD iScript™ cDNA Synthesis Kit

2. RNA濃度調整至100 ng/ μL

3. 每管反應所需試劑及劑量如下表：

Component	Volume per reaction
5× iScript Reaction Mix	4 μL
iScript Reverse Transcriptase	1 μL
Nuclease-free water	(15- X) μL
RNA template (100 ng/ μL Total RNA)	X μL
Total Volume	20 μL

3. 利用熱循環器設定反應溫度及時間

Temperature	time
25°C	5 mins
42°C	30 mins
85°C	5 mins

(四) 聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

利用EconoTaq®PLUS GREEN 2X Master Mix

1. 先將 cDNA 濃度調整至 200 ng/μL
2. 每管反應所需試劑及劑量如下表

Component	Volume per reaction
EconoTaq®PLUS	12.5 μL
GREEN 2X Master Mix	
NPY-Forward Primer (100 pmol/μL)	2.5 μL
NPY-Reverse Primer (100 pmol/μL)	2.5 μL
DNA template (200 ng/μL cDNA)	1 μL
Water, Nuclease-free	6.5 μL
Total Volume	25 μL

3. PCR Cycling Condition

Cycling step	Temperature	Time	# of Cycles
Initial Denaturation	95°C	5 mins	1
Denaturation	95°C	20 secs	
Annealing	53°C	20 secs	50
Extension	72°C	30 secs	
Final Extention	72°C	10 mins	1
Hold	4°C	59 mins	1

4. NPY primer

Forward: 5'-CCC AGA GCA GAG CAC C-3' 16mer at 24 site

Reverse: 5'-CCC CTC AGC CAG AAT G-3' 16mer at 155 site

Product 132 bp (cDNA) vs 924 bp (genomic DNA)

5. *Beta*-actin (gene bank number: NM031144, product: 309 bp)

Forward: 5'-ATGGGTCAGAAGGACTCCTACG-3'

Reverse: 5'-AGTGGTACGACCAGAGGCATAC-3'

(五) 瓊脂糖膠體電泳法 (Agarose gel electrophoresis)

以1X TAE 溶液製備2% agarose gel。加熱至完全溶解後，冷卻至50℃左右，倒入膠臺，裝上齒梳。待其凝固後，移去齒梳，置入含1X TAE 之電泳槽。以電壓100V預跑10分鐘。將10 µl PCR產物混合0.2 倍體積之6X loading dye (0.25 % bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FE, 15 % Ficoll)，混合均勻後注入膠槽中，以電壓100V、進行電泳約30 分鐘。在電泳完成後，將膠體放入含有Ethidium Bromide (EtBr) 溶液中染色10分鐘，並浸於清水退染20分鐘後，再置入紫外燈箱 (UV box) 中照相分析。

(六) 即時定量聚合酶連鎖反應 (Real-Time Quantitative PCR)

Real-Time Quantitative PCR 是指PCR 擴增的每一個循環後分別檢測其PCR 產量，借助電腦資料處理，可以描繪出PCR 擴增的過程中 PCR 產物變化的曲線，進而根據 PCR 變化曲線來計算出目標基因之分子數。

簡單地來說，同步定量 PCR 是指在 PCR 反應系統中加入螢光基團，利用螢光信號的累積，即時監測整個 PCR 過程，最後通過標準曲線對未知模板進行定量分析的方法。一方面提高了靈敏度，另一方面還可以做到PCR 每循環一次就收集一個資料，建立即時擴增曲線，準確地確定 Ct 值，並根據 Ct 值確定起始 DNA 拷貝數，做到了DNA 定量。其目標基因可以是DNA 或 RNA。本研究所用的 SYBR Green I 是一種結合在雙股 DNA 的 minor groove 中的螢光染料。只有在當它與 DNA 雙股結合時，才會發出螢光；若從 DNA 雙股上釋放出來時，螢光信號急劇減弱。因此，在一個系統內，其訊號強度代表了雙股 DNA 分子的數量。

SYBR Green 螢光染料法定量 PCR 的基本過程是：

1. 開始反應，當 SYBR Green 染料與 DNA 雙股結合時發出螢光。
2. DNA 變性時，SYBR Green 染料釋放出來，螢光急劇減少。
3. primer annealing 在繼續聚合延伸形成PCR 產物。
4. 聚合完成後，SYBR Green 與雙股 DNA 結合，同步定量 PCR 系統則可偵測到螢光的量增大。

此研究中模板擴增及定量是利用 iQ5 Real-Time PCR Detection System

(BIO-RAD, USA) 來進行。

1. 取前述製備適量之cDNA，加入以下試劑，總體積20 μ L後，於上述儀器中進行real-time PCR 反應。

Component	Volume per reaction
iQ SYBR Green Supermix	10 μ L
NPY-Forward Primer (100 pmol/ μ L)	0.25 μ L
NPY-Reverse Primer (100 pmol/ μ L)	0.25 μ L
Sterile water	8.5 μ L
DNA template (200 ng/ μ L cDNA)	1 μ L
Total Volume	20 μ L

2. NPY primer (gene bank number: M15880, product: 132 bp)
Forward: 5'-CCC AGA GCA GAG CAC C-3' 16mer at 24 site
Reverse: 5'-CCC CTC AGC CAG AAT G-3' 16mer at 155 site
Product 132 bp (cDNA) vs 924 bp (genomic DNA)
3. *Beta*-actin (gene bank number: NM031144, product: 309 bp)
Forward: 5'-ATGGGTCAGAAGGACTCCTACG-3'
Reverse: 5'-AGTGGTACGACCAGAGGCATAC-3'

4. 反應條件

Cycling step	Temperature	Time	# of Cycles
Cycle 1	95°C	3 mins	1
Cycle 2	95°C	10 secs	50
	53.3°C	30 secs	
Cycle 3	95°C	10 secs	1
Cycle 4	65°C	60 secs	1
Cycle 5	65°C	10 secs	Melting curve

細胞之 NPY mRNA 表現量是以 *Beta*-actin 當作內標 (internal control)，再將實驗所得之數據除以 *Beta*-actin的數值，以其估計基因之表現情形。

（七）統計分析方法：

上述實驗結果，使用單因子共變數分析 (ANOVA)，試驗結果以SAS套裝統計分析軟體進行分析，以Duncan's 判斷其差異顯著性。

三、人體試驗

（通過台大醫院臨床試驗委員會如附件一）

（一）試驗方法與程序

研究對象為一般健康人，取樣於台灣大學之學生為研究樣本

實驗使用方法為噴霧吸入的方式進行芳香療法，使用超音波噴霧器，利用電子震盪原理，運用壓電水晶體震盪器，產生高頻率震波（超音波）將液態精油打散，超音波震盪頻率為1.65MHz，植物精油經由超音波震盪擴散產生3 μm 的氣味霧狀粒子，刺激嗅覺神經，以研究個體經香味刺激後相關之生理反應。

在臨床試驗之研究架構為：

1. 探討已有大量之動物實驗研究指出—經由嗅覺刺激會影響攝食及體重變化之香氣—limonene（降低食慾、減少攝食；作為負控制組）和 linalool（促進食慾、增加攝食；作為正控制組），對於人體相關生理指標的影響，包括體溫、血壓、神經胜肽酪氨酸（NPY）和瘦激素（Leptin）等之影響。
2. 探討利用模式篩選出具有刺激食慾潛力的香氣成分：pinene、octenol、對於人體相關生理指標的影響，包括體溫、血壓、神經胜肽酪氨酸（NPY）和瘦激素（Leptin）等之影響。
3. 進行人員問卷調查，以充分了解食慾與香氣物質之間的關係。

（二）實驗環境

1. 密閉、無窗戶之房間
2. 桌上放置筆記型電腦，放輕鬆的小短片
3. 一張座椅
4. 環境溫度控制在攝氏25度
5. 環境照明保持明亮
6. 環境空調：裝置空氣清靜設備，主要為降低因氣味留滯空氣中而影響氣味散播頻率的感受程度

7. 氣味散播距離：由受測者自行調整位置
8. 每位受試者所使用之測試器材相同

(三) 受試者及試驗組別

1. 受試者選擇標準

- (1) 20-35 歲年齡層，體重達五十公斤，意識清楚、無精神或認知障礙。
- (2) 聽、嗅覺無嚴重障礙（能以正常音量溝通者）。
- (3) 無吸菸習慣者。
- (4) 試驗婦女在參加試驗期間不得懷孕。
- (5) 同意參與本研究需簽署同意書（附件二）。

2. 試驗組別及各試驗樣品濃度

試驗組別可分為五組，分別為：

- a. 控制組：水
- b. 負控制組：Limonene (80 ppm)
- c. 正控制者：Linalool (320 ppm)
- d. 試驗組：Pinene (75 ppm)
- e. 試驗組：Octenol (2 ppm)

(四) 實驗香氣物質與器材

1. 本研究所使用的香氣物質及濃度為：

Limonene、linalool、 α -pinene、及octenol

2. 實驗器材

- (1) 身高量尺
- (2) 體重、體脂計：Tanita 脂肪儀體重機，BF-700
- (3) 血壓計：OMRON血壓計歐姆龍/手臂型血壓計HEM-7020
- (4) 耳溫槍：Fora（福爾）TD-1116耳額溫槍
- (5) 超音波噴霧器：SL-1D65 AC110V超音波精油噴霧器，廣華電子
- (6) 空氣清淨機
- (7) 一張座椅
- (8) 一台筆記型電腦

(五) 試驗設計與流程：

實驗主要分為實驗前的準備工作、實驗中及實驗後的後續分析三個階段：

1. 實驗前準備工作：

- (1) 與受試者說明研究目的、過程，並取得同意書
- (2) 試驗會先以水2組及待測樣品1組篩選健康受試者30位，受試者必須正確地從中拿取待測樣品，才符合受試者選擇的標準，以避免受試者對待測樣品沒有反應。
- (3) 拿取待測樣品持續噴灑於空氣中，試驗受試者會不會感覺不適，以避免受試者對其香味感到過敏。



受試者注意事項：

- (1) 為了避免影響嗅覺，試驗當天前24小時不可嚼食口香糖，避免藥物服用與刺激飲品，如咖啡、茶、含酒精飲料
- (2) 並避免太餓或太飽。試驗前兩小時不攝食，不飲用飲料及試驗當天不過度運動
- (3) 於受測前安靜休息 10 分鐘，紀錄受試者的基本資料（如附件三）：量身高、體重、體溫、體脂、血壓；研究開始前抽血7 ml作前測，以作為原始數據，評估各指標改變情形

2. 實驗中

- (1) 受試者處於充滿精油香氣的房間中5, 10, 15分鐘/每次，每一星期進行一次，於早上 11 點，共三星期。
- (2) 實驗中，受試者靜靜地坐在椅子上欣賞播放的小短片。

3. 實驗後

- (1) 立即紀錄受試者的基本資料：體溫、血壓
- (2) 立即抽血7 ml進行後續分析（血液處理如下4.）
- (3) 利用問卷紀錄受試者的試驗後狀況。包括身體、心情及食慾的狀況評估（如附件四）

4. 血液分析

抽血7 ml，收集於含EDTA之管子，分別分析血漿中Leptin與NPY之含量：

(1) 血漿Leptin含量之測定

購買 Human Leptin Immunoassay SLP00 (Quantikine[®], R&D 世盟)之商業套組，分析流程如下：

A. 樣品收集和保存

1. Plasma-利用抗凝血之 EDTA 管子收集
2. $1000 \times g$ 離心 15 分鐘，立即分析，或貯存在 -20°C 以下，並避免反覆冷凍解凍

B. 配製實驗樣品

1. 將 plasma sample 稀釋 50 倍
2. 50 倍稀釋：20 μL sample + 980 μL Calibrator Diluent RD5P

C. 試劑配置（試劑使用前需回溫）

1. Wash Buffer:

用去離子水稀釋 20 mL 之 Wash Buffer 配置成 500 mL 之 Wash buffer

2. Substrate Solution:

避光，color reagent A 和 B 需同體積之混和，在 15 min 內使用完。每 well 需要 200 μ L.

3. Calibrator Diluent RD5P (1X):

用去離子水稀釋 20 mL 之 Calibrator Diluent RD5P 配製成 100 mL 之 Wash buffer

4. Leptin standard:

用 1 mL 之去離子水回溶 Leptin standard，此為 10000 pg/mL stock solution。
在使用來稀釋之前，溫和地 vortex 15 min 以上。

5. Use polypropylene tubes:

a. 吸取 900 μ L Calibrator Diluent RD5P (1X) 至 1000pg/mL tube。

b. 吸取 500 μ L Calibrator Diluent RD5P (1X) 至每一個 tube

c. 使用 stock solution 作連續稀釋

d. 在 transfer 之前，徹底混勻

e. 1000 pg/mL 為標準曲線之最高濃度；Calibrator Diluent RD5P 作為零點之標準曲線濃度（0 pg/mL）

D. 實驗流程

1. 準備好所有的試劑，working standards 和 sample

2. 加入 100 μ L Assay Diluent RD1-19 在每一 well 內

3. 加入 100 μ L 之 Standard 或 Sample 至每一 well，在室溫下培養 2 hr

4. a. 吸出每 well 的液體

b. 進行 wash 之動作（總共四次）：

前三次：用 400 μ L 之 Wash Buffer 充滿整個 well 去 wash，每一次完全移除液體之步驟都相當重要，才能表現出好的數據

最後一次 wash：藉由吸出或輕輕倒出之方式，移除任何可能存在之 Wash Buffer

* 將 plate 直接地倒放在乾淨之餐巾紙上，dry

5. 加入 200 μ L 之 Leptin Conjugate 至每一 well 內，室溫培養 1 hr
6. 重複性地吸出/wash 如同步驟五
7. 加入 200 μ L 之 Substrate Solution 至每一 well 內，避光，室溫培養 30 min
8. 加入 50 μ L 之 Stop Solution 至每一 well 內

顏色會從藍色變成黃色，若顏色呈現綠色或不規律的變化，輕輕搖晃 plate 確定已全部混勻

9. 在 30 min 內，偵測 450nm 下之吸光值

(2) 血漿 NPY 含量之測定 (Amplified enzyme immunoassay of NPY)

購買 NPY (Human, Rat, Mouse) EIA kit (0-100ng/ml) (PHOENIX PHARMACEUTICALS, INC.)

A、樣品收集和保存

(一) Blood Withdrawal

1. 收集血液至含有 EDTA 之 Lavender Vacutainer tubes (7 ml)，一收集完就立刻搖晃數次，防止血液之凝結
2. 將血液從 Lavender Vacutainer tubes 移至含有抑制蛋白酶 aprotinin (0.6TIU/ ml of blood)，溫和地搖晃數次，抑制蛋白酶之活性
3. 將血液在 4°C，1600 $\times$ g，離心 15 min，收集 plasma 之部份
4. Plasma 貯放在 -70°C，可存放一個月

(二) Extraction of Peptides from Plasma:

1. 使 Plasma 酸化:
加入等體積之 buffer A，4°C，離心 6000~17000 $\times$ g，20 min
2. Equilibrate SEP-COLUMN containing 200 mg of C18:
3 ml Buffer A, 3 次
1 ml Buffer B, 1 次
3. 取酸化之 plasma 溶液，加入先前平衡好之 C-18 SEP-Column
4. 用 buffer A (3 ml, 2 次) 緩慢 wash the column，丟棄 wash
5. 用 buffer B (3 ml, 1 次) 緩慢加入，elute peptide，收集至 polystyrene tube
6. 將收集之 peptide，凍乾並保存在 -20°C

B、配置實驗樣品

將凍乾的粉末加入 250 μL 1 $\times$ assay buffer

C、試劑準備：

需將試劑回溫（室溫：20-23 $^{\circ}\text{C}$ ），試劑一旦覆水就要趕緊使用完

D、實驗流程

（一）試劑準備

1. 在試驗前先完整地閱讀過試驗流程，讓所有試劑在使用前回溫（25-45min）
2. 用 950 mL 蒸餾水稀釋 20 $\times$ assay buffer concentrate，成為一倍之 assay buffer。若 20 $\times$ assay buffer concentrate 存有結晶，可放置溫水浴 30min 直至結晶消失，使用前徹底的混和
3. 用 1 mL，1 $\times$ assay buffer 回溶 standard peptide（離心稀釋）並 vortex，此 stock solution 的濃度為 1000 ng/ml，讓溶液在室溫下（20-23 $^{\circ}\text{C}$ ）放置至少 10min 使溶液完全溶解，在使用前立即地離心、vortex
4. 用 5ml，1 $\times$ assay buffer 回溶 primary antibody，靜置 5 min 直至完全溶解需徹底地混和
5. 用 5ml，1 $\times$ assay buffer 回溶 biotinylated peptide，靜置 5 min 直至完全溶解，需徹底地混和
6. 用 200 μL ，1 $\times$ assay buffer 回溶並離心 positive control 靜置 5 min 直至完全溶解，需徹底地混和

（二）試驗開始: Blank, Total binding, Standard

7. A-1 和 A-2 作為 Blank
8. 在 B-1 和 B-2 加入 50 μL ，1 $\times$ assay buffer 作為 Total Binding
9. 加入 50 μL 已配置好之 peptide standards，序列稀釋加入之順序為低濃度至高濃度（#5->#1）至 well 之順序為：C-1,C-2=>G-1,G-2
*peptide standards assay 需二重複
10. 加入 50 μL 回溶之 positive control 至 well H-1, H-2

（三）試驗開始: Sample

11. 加入 50 μL 製備好之 sample 至設計好之 well 內，assay 為 2 重複
12. 加入 25 μL 已回溶之 primary antibody 至每一 well 內，除了 Blank 部份

13. 加入 25 μL 已回溶之 biotinylated peptide 至每一 well 內，除了 Blank 部份
14. 用 acetate plate sealer(APS)封膜，在室溫下（20-23 $^{\circ}\text{C}$ ）Orbital shaking at 250-300 rpm，2 hr
15. 離心 Streptavidin-horseradish peroxidase (SA-HRP)，從中取 12 μL 和 12ml, 1 $\times$ assay buffer 配成 SA-HRP solution，徹底地 vortex
16. 移除 APS，並移除內容物
17. 用 350 μL , 1 $\times$ assay buffer, wash 每一 well 後移除，倒蓋至餐巾紙上至乾，重複四次
18. 在每一 well 加入 100 μL SA-HRP
19. 用 APS 封膜，在室溫下（20-23 $^{\circ}\text{C}$ ）Orbital shaking at 300-400 rpm，1 hr
20. 移除 APS
21. 用 350 μL , 1 $\times$ assay buffer, wash 每一 well 後移除，重複四次，倒蓋至餐巾紙上，乾，
22. 在每一 well 內加入 100 μL 之 TMB substrate solution，封膜 APS 並避光，在室溫下（20-23 $^{\circ}\text{C}$ ）Orbital shaking at 300-400 rpm，1 hr.
24. 移除 APS，加入 100 μL 之 2N HCl 至每一 well 內，終止反應，顏色會從藍色變成黃色，若顏色變化不正常，在 20min 內輕晃 plate 已確保完全均勻
25. 測 450 nm 下之吸光值

（六）資料之蒐集處理評估及統計分析方法：

問卷及受試者年齡、BMI、體脂及性別與血漿 NPY、leptin 變化量之相關性藉由 Pearson's correlation coefficient 分析。

（七）臨床上不良反應及處理方法：

目前關於吸入性 limonene、linalool、pinene、及 octenol 之香氣的風險評估均不具有致癌性，依據本實驗試驗之濃度和時間，亦在安全考量之範圍內，。

相關報告指出：若長期（兩個月以上）處於高濃度 limonene 環境（1000ppm）之人們易出現輕微皮膚過敏，對於人類之呼吸道之無作用安全劑

量為80 ppm；動物實驗中，則易造成中度急性毒性、皮膚刺激性及造成支氣管緊縮和腎臟方面之疾病（De Witt and Beberta, 2004; Karlberg et al., 1991; Larsen et al., 2000; Hard et al., 1994）。Linalool 在人體試驗中，濃度達20% 對皮膚有輕微或無刺激性，濃度為320 ppm 時對眼睛和呼吸道均無刺激性。Pinene，在動物實驗指出：長期處於高濃度（兩個月以上， 450 mg/m^3 , 75 ppm）之pinene 易刺激呼吸道、感覺暈眩、皮膚發炎等症狀；人體實驗上：對於長期處於pinene 之環境工作者，易刺激眼睛，黏膜及皮膚，更有可能造成皮膚炎。然而，對於短時間（20分鐘）處於此香氣環境下之人們，肺功能並無顯著影響（Rosenberg et al., 2002; Eriksson et al., 1997; Falk et al., 1997）。Octenol，在人體實驗指出：一小時，處於濃度 10 mg/m^3 (1.74 ppm) 易對皮膚造成刺激性，更有頭暈的症狀（Walinder et al., 2008）。

然而，本實驗試驗之濃度和時間，均在安全考量範圍內。但是，如果受試者在試驗中有任何不適之症狀時，如皮膚過敏，暈眩，亦備妥氧氣筒及氧氣、撤水緊急設備以緊急處理，並終止試驗。



第五章 實驗結果與討論

第一部份實驗結果

一、試驗樣品（香料物質）對嗅覺神經細胞Rolf B1.T 15 min下存活率之影響

由文獻的搜尋可知，目前尚未建立不同香料物質對於嗅覺神經細胞的安全劑量。因此，在實驗香料物質處理嗅覺神經細胞之前，必須先建立不同香料物質對於嗅覺神經細胞的安全濃度，再進一步地在此安全濃度之範圍下，進行後續之實驗。細胞存活率之試驗濃度主要是參考Prashar 等學者研究薰衣草精油對於人類皮膚細胞的細胞毒性試驗（Prashar, et al., 2004）。在此部份的實驗結果：

（一）檸檬油烯（s(-)-Limonene）

普遍存在柑橘類精油中的主要香氣成分檸檬油烯（s(-)-Limonene）在濃度880 ppm 以下對嗅覺神經細胞無傷害，但在試驗濃度1700~7000 ppm 時則會顯著地造成細胞傷害及死亡（圖5-1）。然而，在Zhang and Lim (2008) 之研究顯示 d-limonene在濃度為 4 mM下處理 Caco-2（human colon carcinoma）、LLC-PK1（porcine kidney epithelial cells）及L-MDR1（LLC-PK1 cells transfected with human *MDR 1* gene）三種細胞，4小時下，不會造成細胞傷害。

（二）沈香醛（(+/-)-Linalool）

沈香醛（(+/-)-Linalool）為薰衣草精油的主要成分，亦在濃度880 ppm 以下對嗅覺神經細胞無傷害，但在試驗濃度1700~7000 ppm 時則會顯著地造成細胞傷害及死亡（圖5-2）。對於人類皮膚細胞株：HMEC-1，HNDF及153BR，linalool 對其之安全劑量為 440 ppm（Prashar, et al., 2004），由此可知嗅覺神經細胞較人類皮膚細胞對於 linalool 可承受較高的濃度。

（三）香茅醛（citronellal）、香茅醇（citronellol）與香葉草醇（geranio）

香茅醛、香茅醇與香葉草醇常存在香茅屬精油中。研究結果顯示香茅醛和香茅醇在濃度880 ppm 以下對嗅覺神經細胞無傷害，但在濃度1700~7000 ppm 時則會顯著地造成細胞傷害及死亡（圖5-3）。香葉草醇則在濃度440 ppm 以下對嗅覺神經細胞無傷害，高於此濃度則會造成細胞傷害及死亡（圖5-3）。

(四) 桉葉醇 (eucalyptol)

桉葉醇 (eucalyptol) 普遍存在桉葉油中，對於嗅覺神經細胞的安全濃度為3500 ppm 以下，在試驗濃度 7000 ppm 時則會造成細胞傷害及死亡 (圖5-3)。

(五) methyl phenylacetate

具有蜂蜜香味之methyl phenylacetate 常存在白蘭地、咖啡、胡椒及酒中，對於嗅覺神經細胞的安全濃度為880 ppm 以下，高於此濃度則會造成細胞傷害及死亡 (圖5-4)。

(六) 蘑菇醇 (1-octen-3-ol)

蘑菇醇 (1-octen-3-ol) 又常簡寫為octenol，主要存在於菇類中，提供菇類強烈之新鮮香菇味，對於嗅覺神經細胞之安全濃度為3500 ppm 以下，在試驗濃度7000 ppm 時則會造成細胞傷害及死亡 (圖5-4)。

(七) 香草醛 (vanillin)

具有奶鮮味之香草醛 (vanillin) 其濃度在2500 ppm 以下對嗅覺細胞無傷害，試驗濃度為5000 ppm 則造成細胞傷害及死亡 (圖5-5)。

(八) 辣椒素 (capsaicin)

常存在胡椒及辣椒中的辣椒素 (capsaicin) 試驗結果與香草醛相同，在濃度2500 ppm 以下對嗅覺細胞無傷害，試驗濃度為 5000 ppm 則造成細胞傷害及死亡 (圖5-6)。

(九) 蒎烯 ((-)-a-Pinene)

蒎烯 ((-)-a-Pinene) 是許多香料物質降解產物，亦為各種terpineol合成香料之出發原料，如檸檬油烯、沈香醛，對於嗅覺神經細胞的安全濃度為3500 ppm 以下，高於此濃度則會造成細胞傷害及死亡 (圖5-7)。

(十) 檸檬醛 (citral)

檸檬醛 (citral) 為薑精油中主要香氣成分，由試驗結果可以發現，相對於其他香氣物質而言，檸檬醛對於嗅覺神經細胞的安全濃度較低，在440 ppm 以下，高於此濃度則會造成細胞傷害及死亡 (圖5-7)。Zhang and Lim (2008) 以檸檬醛處理 Caco-2、LLC-PK1及L-MDR 細胞 4小時，發現濃度為1 mM 下不會造成細胞傷害，高於1.5 mM 則會造成細胞傷害。

(十一) 薑黃素 (curcumin)

存在於薑黃中的薑黃素 (curcumin) 在濃度為 500 ppm 以下對於嗅覺神經細胞無傷害，高於此濃度則會造成細胞傷害及死亡 (圖5-8)。此外，對於 Caco-2、LLC-PK1及L-MDR 細胞，薑黃素濃度為60 μ M、培養4小時下為安全劑量；當濃度為120 μ M，三種細胞株存活率低 (Zhang and Lim, 2008)。

(十二) Diallyl sulfide 與Diallyl disulfide

Diallyl sulfide 與Diallyl disulfide均為大蒜中的香氣物質，對於嗅覺神經細胞的安全濃度分別為3500 ppm 及350 ppm，由此亦可發現在相同的試驗濃度下Diallyl disulfide相較於Diallyl sulfide、其他香料物質，對於嗅覺細胞的傷害較大 (圖5-9、圖5-10)。

由上述結果可以知道，不同香料物質對於嗅覺神經細胞有其安全濃度，茲將上述香料物質對於嗅覺神經細胞的安全濃度整理為表5-1。

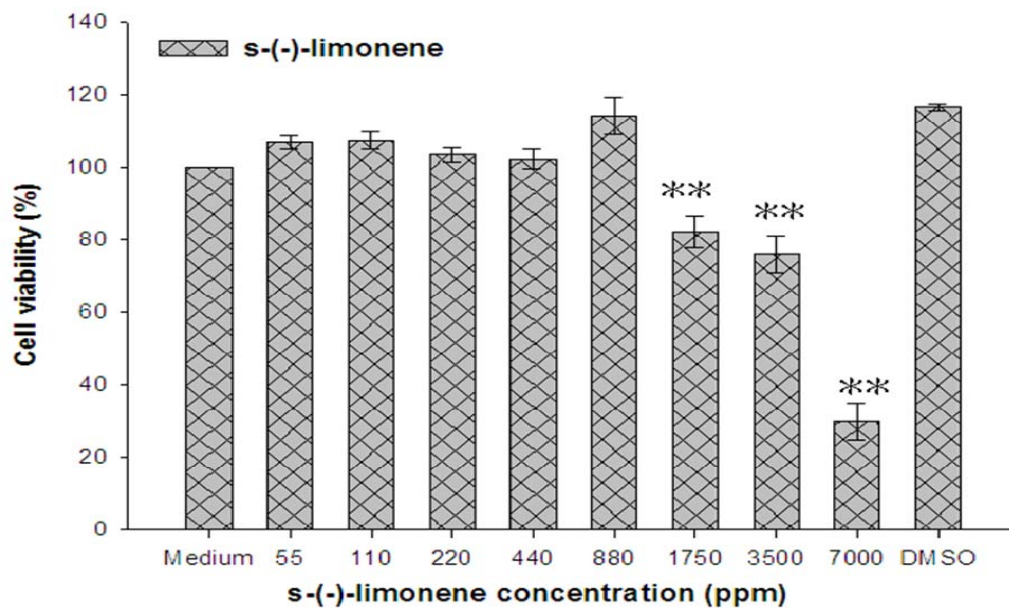


圖5-1、以 s-(-)-limonene 處理嗅覺神經細胞 Rolf B1.T 15分鐘對其存活率之影響
(n=3, mean $\pm$ SD, $P < 0.01$)。

Figure 5-1. Effect of s-(-)-limonene on viability of Rolf B1.T cells after 15 min treatment (n=3, mean $\pm$ SD, $P < 0.01$).

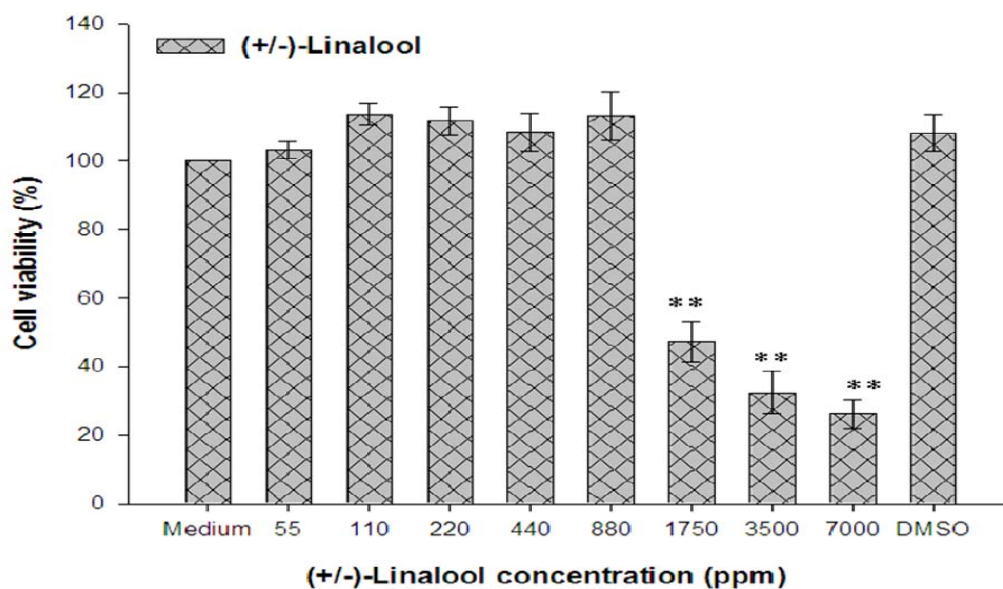


圖5-2、以(+/-)-Linalool處理嗅覺神經細胞 Rolf B1.T 15分鐘對其存活率之影響
(n=3, mean $\pm$ SD, $P < 0.01$)。

Figure 5-2. Effect of (+/-)-Linalool on viability of Rolf B1.T cells after 15 min treatment (n=3, mean $\pm$ SD, $P < 0.01$).

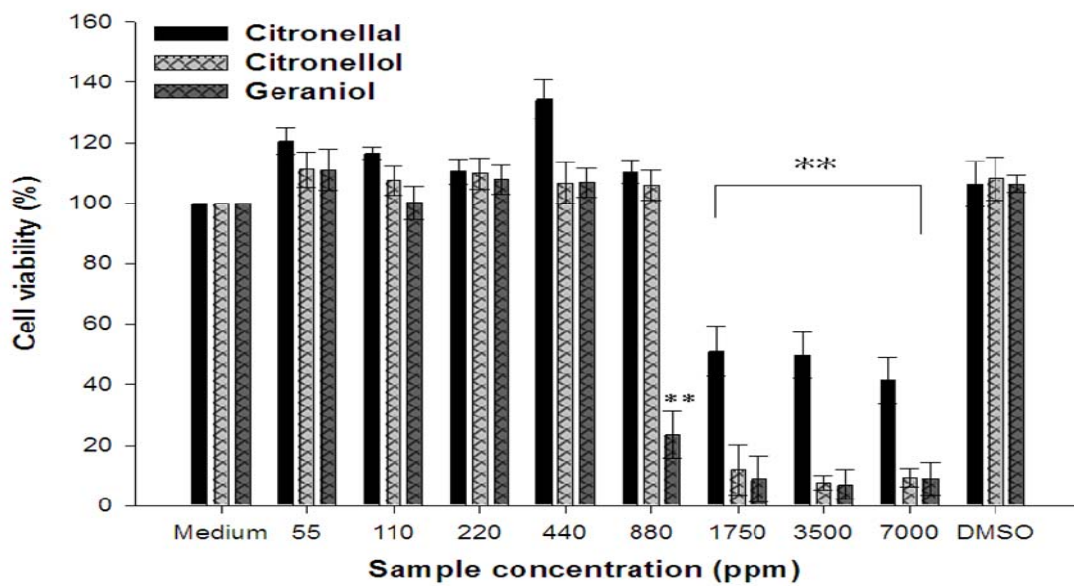


圖5-3、以 citronellal，citronellol 與 geraniol 處理嗅覺神經細胞 Rolf B1.T 15 分鐘對其存活率之影響 (n=3, mean $\pm$ SD, $P < 0.01$)。

Figure 5-3. Effects of citronellal, citronellol and geraniol on viability of Rolf B1.T cells after 15 min treatment (n=3, mean $\pm$ SD, $P < 0.01$).

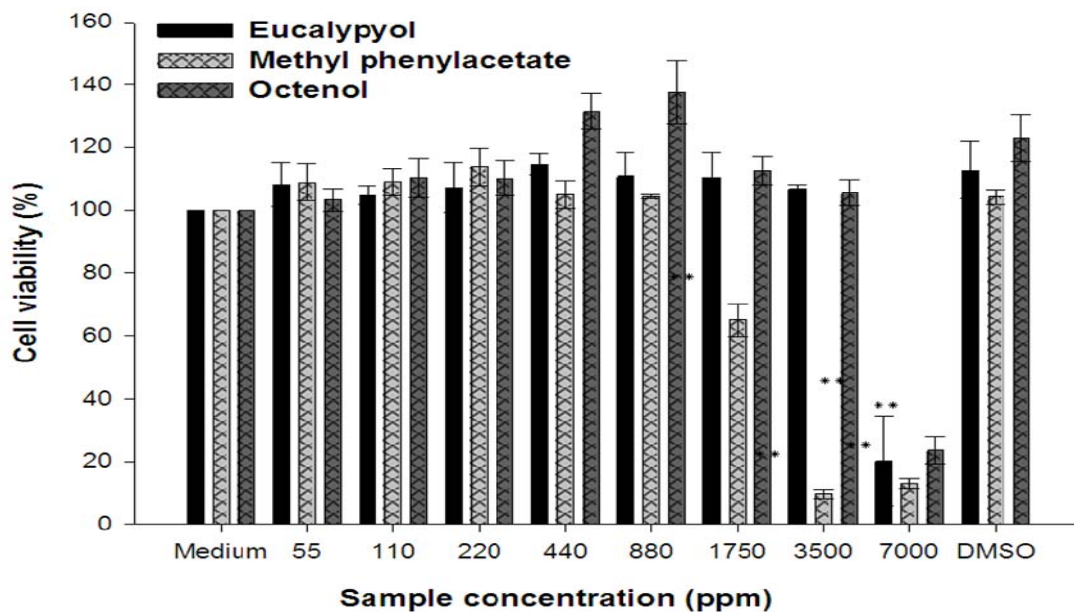


圖5-4、以 eucalypol，methyl phenylacetate 與 octenol 處理嗅覺神經細胞 Rolf B1.T 15 分鐘對其存活率之影響 (n=3, mean $\pm$ SD, $P < 0.01$)。

Figure 5-4. Effects of eucalypol, methyl phenylacetate and octenol on viability of Rolf B1.T cells after 15 min treatment (n=3, mean $\pm$ SD, $P < 0.01$).

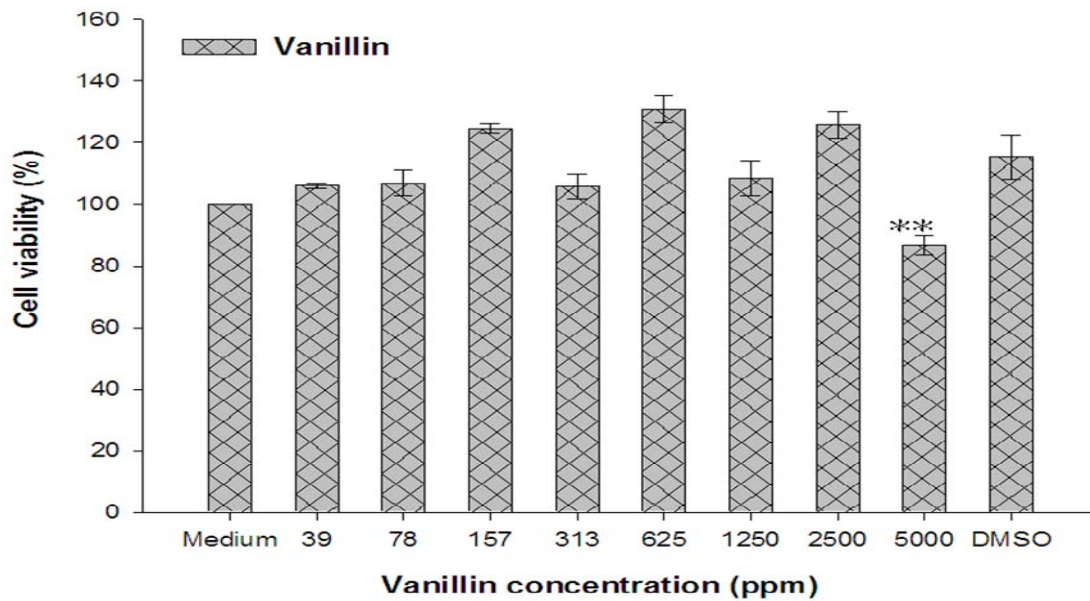


圖5-5、以 vanillin 處理嗅覺神經細胞 Rolf B1.T 15 分鐘對其存活率之影響 (n=3, mean $\pm$ SD, $P < 0.01$)。

Figure 5-5. Effect of vanillin on viability of Rolf B1.T cells after 15 min treatment (n=3, mean $\pm$ SD, $P < 0.01$).

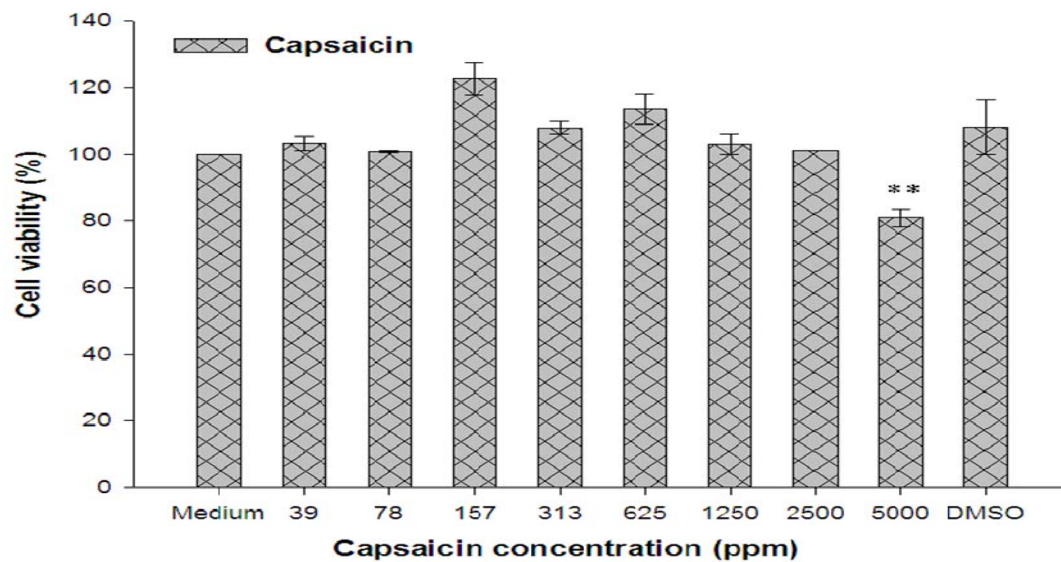


圖5-6、以 capsaicin 處理嗅覺神經細胞 Rolf B1.T 15分鐘對其存活率之影響 (n=3, mean $\pm$ SD, $P < 0.01$)。

Figure 5-6. Effect of capsaicin on viability of Rolf B1.T cells after 15 min treatment (n=3, mean $\pm$ SD, $P < 0.01$).

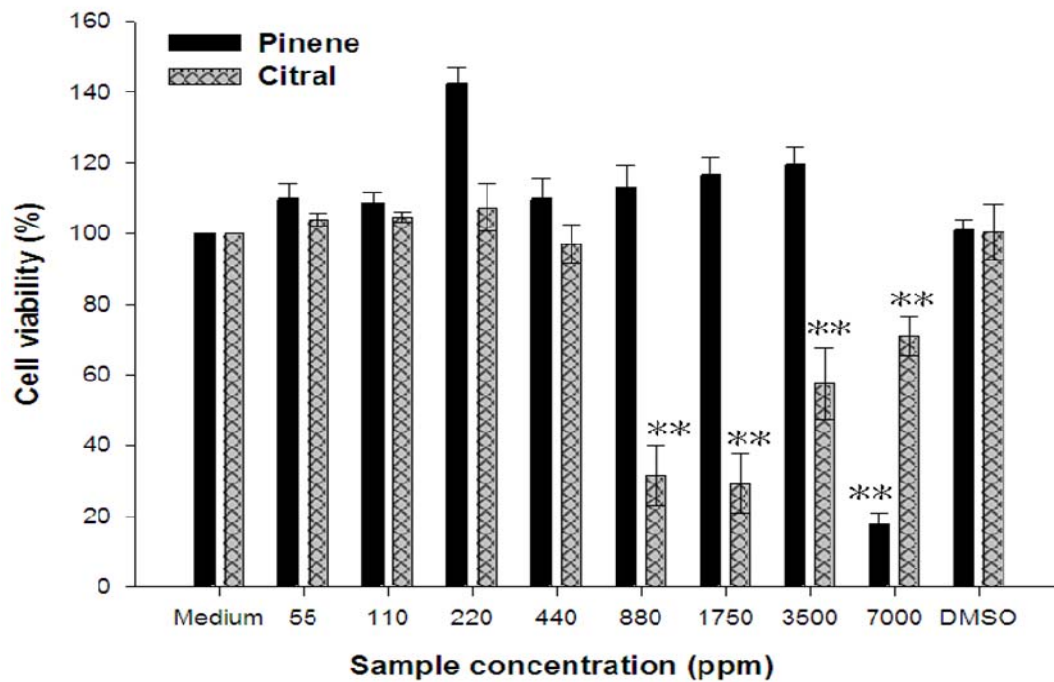


圖5-7、以pinene 與 citral 處理嗅覺神經細胞Rolf B1.T 15 分鐘對其存活率之影響 (n=3, mean $\pm$ SD, $P < 0.01$)。

Figure 5-7. Effects of pinene and citral on viability of Rolf B1.T cells after 15 min treatment (n=3, mean $\pm$ SD, $P < 0.01$).

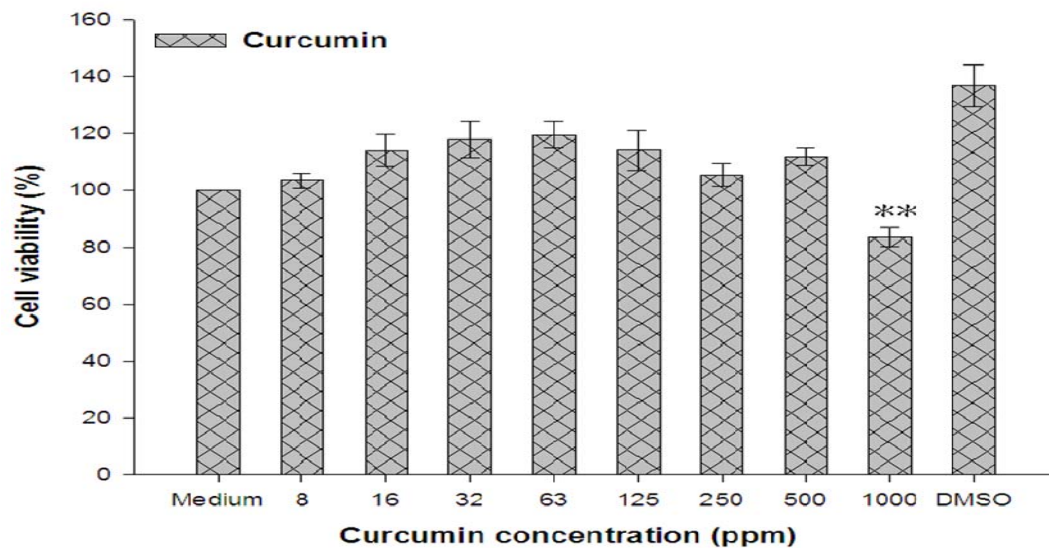


圖5-8、以curcumin 處理嗅覺神經細胞 Rolf B1.T 15分鐘對其存活率之影響 (n=3, mean $\pm$ SD, $P < 0.01$)。

Figure 5-8. Effect of curcumin on viability of Rolf B1.T cells after 15 min treatment (n=3, mean $\pm$ SD, $P < 0.01$).

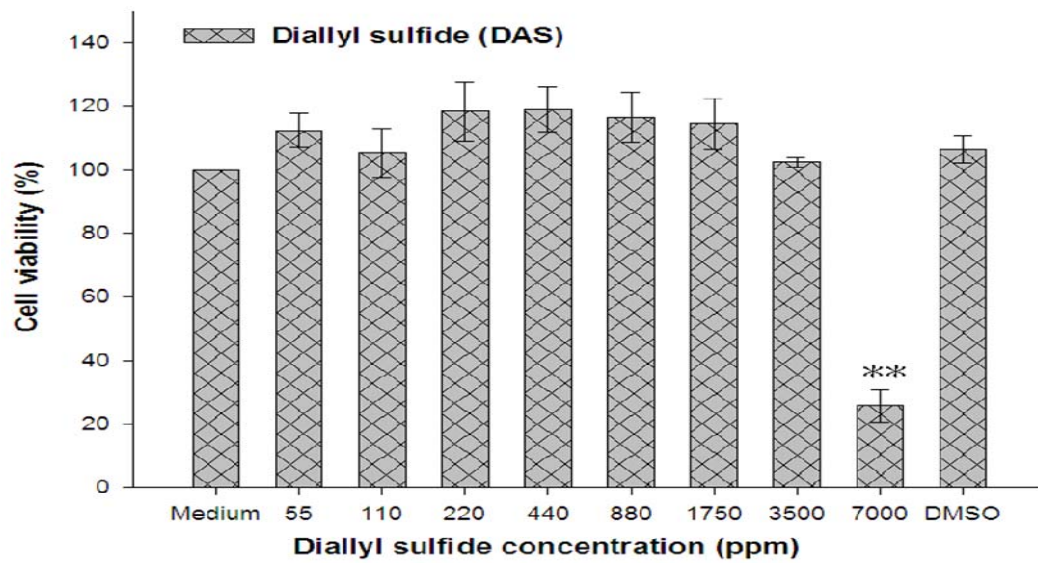


圖5-9、以diallyl sulfide處理嗅覺神經細胞Rolf B1.T 15 分鐘對其存活率之影響
(n=3, mean $\pm$ SD, $P < 0.01$)。

Figure 5-9. Effect of diallyl sulfide on viability of Rolf B1.T cells after 15 min treatment (n=3, mean $\pm$ SD, $P < 0.01$).

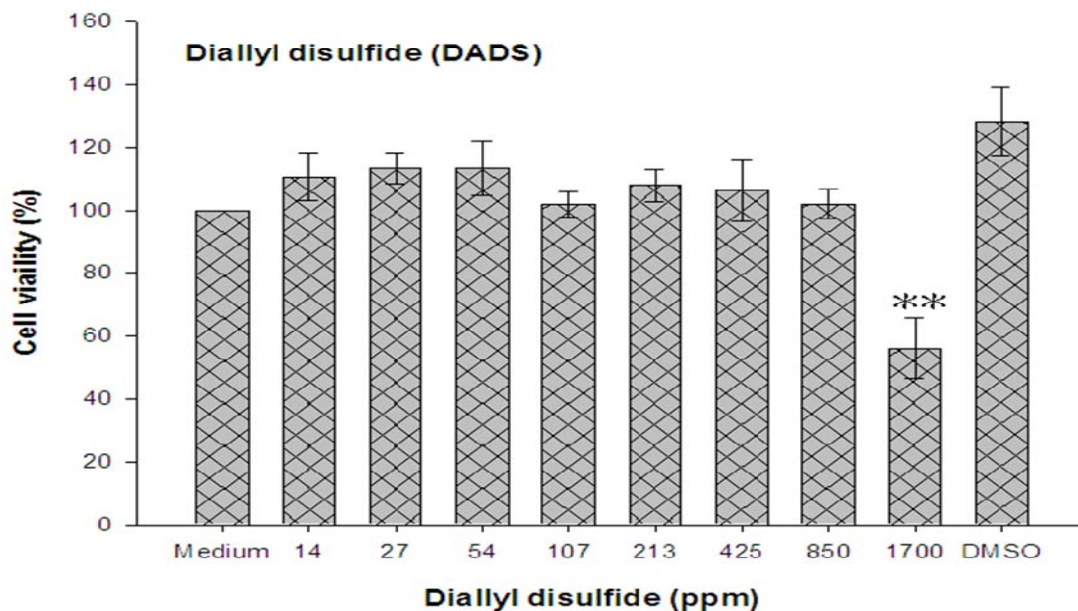


圖5-10、以diallyl disulfide 處理嗅覺神經細胞Rolf B1.T 15 min對其存活率之影響
(n=3, mean $\pm$ SD, $P < 0.01$)。

Figure 5-10. Effect of diallyl disulfide on viability of Rolf B1.T cells after 15 min treatment (n=3, mean $\pm$ SD, $P < 0.01$).

表 5-1、各香料物質在15分鐘處理時間下對於嗅覺神經細胞之安全濃度

Table 5-1. Limits of concentration used on Rolf B1.T cell for 15 min treatment.

Short name	spices	Limits of concentratuins used (v/v) for 100% Cell Viability
L1	s-(-)-Limonene	800 ppm
L2	(+/-)-Linalool	800 ppm
C1	Citronellal	800 ppm
C2	Citronellol	800 ppm
Citral	Citral	400 ppm
Cur	Curcumin	500 ppm
Cap	Capsaicin	2500 ppm
DAS	Diallyl sulfide	3500 ppm
DADS	Diallyl disulfide	800 ppm
E	Eucalyptol	3500 ppm
G	Geraniol	400 ppm
M	Methyl phenylacetate	800 ppm
O	1-octen-3-ol	3500 ppm
P	(-)- α -Pinene	3500 ppm
V	Vanillin	2500 ppm

二、試驗樣品（香料物質）刺激嗅覺神經細胞 Rolf B1. T 10 分鐘對 NPY mRNA 表現之影響

（一）Total RNA extraction 品質的鑑定

1. 超微量分光光度計（nanodrop）測定 RNA 濃度及品質

利用 Geneaid RNA Mini kit 抽取培養兩天經香料物質處理 10 min 的細胞之 total RNA（原細胞濃度為 5×10^5 cells/mL），藉由超微量分光光度計測定 RNA 濃度及品質。結果發現，在此細胞數下抽取之 RNA 平均濃度約為 200 ng/ μ L，其 260/280 比值約為 2-2.2 之間；260/230 比值約為 2 左右，顯示其 RNA 品質優良，未受有機溶劑、醣類及蛋白質之污染（僅以圖 5-11 結果為代表）。

2. 甲醛洋菜膠體電泳

利用 6 well 培養瓶培養細胞並且加入香料物質處理之，其 total RNA 之濃度偏低無法進行甲醛洋菜膠體電泳之觀察，故將細胞培養放大至 10 cm dish，再用同樣方法處理細胞、抽取細胞 total RNA（RNA 濃度約為 3000 ng/ μ L）並藉由甲醛洋菜膠體電泳驗證 RNA 之品質。由電泳圖可以發現（如圖 5-12）：呈現於膠體上的兩條色帶分別應是 large subunit (LSU) 28S 與 small subunit (SSU) 18S，藉此更可以確定抽取 RNA 之品質良好。

爾後，顧及實驗進行的方便及快速，後續篩選香料物質刺激嗅覺神經細胞表現 NPY mRNA 之實驗，仍以 6 well 培養瓶培養細胞之方式進行。

（二）RNA 之反轉錄（Reverse transcription）

利用 BIO-RAD iScript™ cDNA Synthesis Kit 將抽取之 RNA 反轉錄為 cDNA，並藉由超微量分光光度計測定 cDNA 之濃度及品質。結果發現 cDNA 之濃度約為 1000~1400 ng/ μ L，且 260/280 比值為 1.8 左右，可知其品質良好（僅以圖 5-13 結果為代表）。

ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw
195.58	4.889	2.327	2.10	2.21	40.00	230	2.210	0.008
201.13	5.028	2.410	2.09	2.17	40.00	230	2.313	0.003
238.02	5.951	2.837	2.10	2.21	40.00	230	2.688	0.012
219.80	5.495	2.653	2.07	2.22	40.00	230	2.472	0.016
194.65	4.866	2.331	2.09	2.14	40.00	230	2.272	0.006
209.19	5.230	2.657	1.97	1.95	40.00	230	2.680	0.108
243.73	6.093	2.928	2.08	2.19	40.00	230	2.776	0.013
192.94	4.824	2.282	2.11	2.22	40.00	230	2.169	0.024
168.35	4.209	2.001	2.10	2.18	40.00	230	1.934	0.019
220.65	5.516	2.659	2.07	2.22	40.00	230	2.486	0.005
231.03	5.776	2.755	2.10	2.22	40.00	230	2.604	0.022
199.81	4.995	2.393	2.09	2.22	40.00	230	2.247	0.015

圖 5-11、RNA 濃度及品質

Figure 5-11. Concentration and quality of RNA

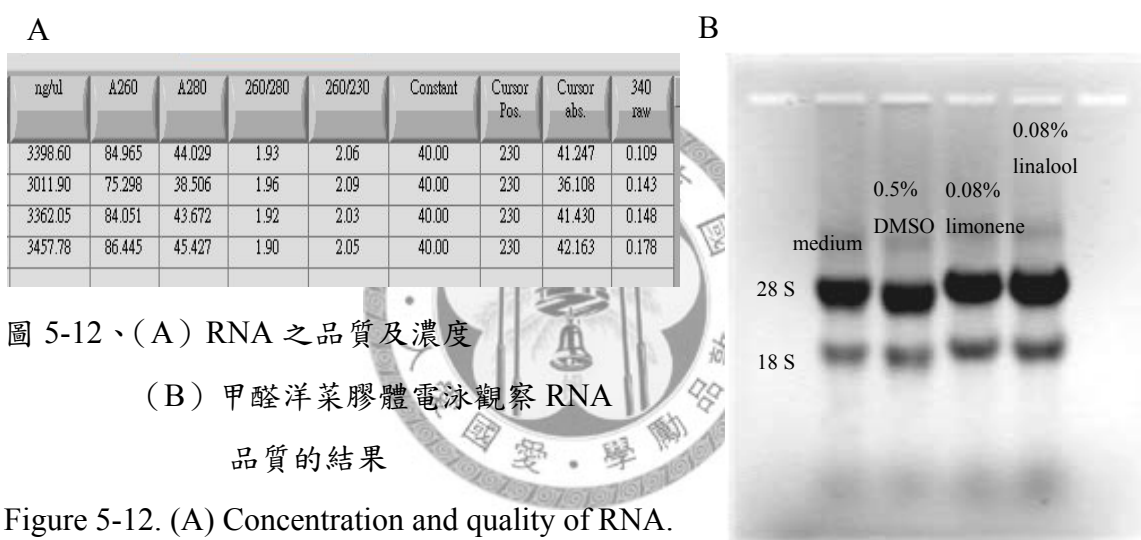


圖 5-12、(A) RNA 之品質及濃度

(B) 甲醛洋菜膠體電泳觀察 RNA
品質的結果

Figure 5-12. (A) Concentration and quality of RNA.

(B) Quality of RNA.

ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw
1264.59	25.292	13.476	1.88	2.18	50.00	230	11.589	0.103
1124.30	22.486	11.944	1.88	2.18	50.00	230	10.307	0.135
1101.66	22.033	11.840	1.86	2.26	50.00	230	9.762	12.385
1145.62	22.912	12.334	1.86	2.23	50.00	230	10.262	7.175
1003.17	20.063	10.674	1.88	2.20	50.00	230	9.136	0.092
1088.61	21.772	11.631	1.87	2.15	50.00	230	10.105	0.059
1055.81	21.116	11.352	1.86	2.16	50.00	230	9.767	0.040
1284.63	25.693	13.768	1.87	2.19	50.00	230	11.732	0.041
1135.06	22.701	12.095	1.88	2.14	50.00	230	10.611	0.084
1200.24	24.005	12.809	1.87	2.17	50.00	230	11.064	0.254
1173.99	23.480	12.575	1.87	2.17	50.00	230	10.830	0.058
1377.60	27.552	14.814	1.86	2.16	50.00	230	12.744	0.061

圖 5-13、cDNA 之濃度及品質

Figure 5-13. Concentration and quality of cDNA.

(三) 瓊脂糖膠體電泳法 (Agarose gel electrophoresis)

將反轉錄之 cDNA 利用特定引子:1. 目標產物 NPY:16 mer NPY primer 以及 2. 作為 internal control 之 gene: β -actin, 經由聚合酶連鎖反應 (PCR) 放大其產物, 並且藉由瓊脂糖膠體電泳法作為定性之依據, 結果如圖 5-14 所示。由電泳圖可以知道本研究所挑選之引子及 PCR 設定的溫度、時間及 cycle 數可以適當地將目標產物 (NPY: 132 bp; β -actin: 309 bp) 放大。

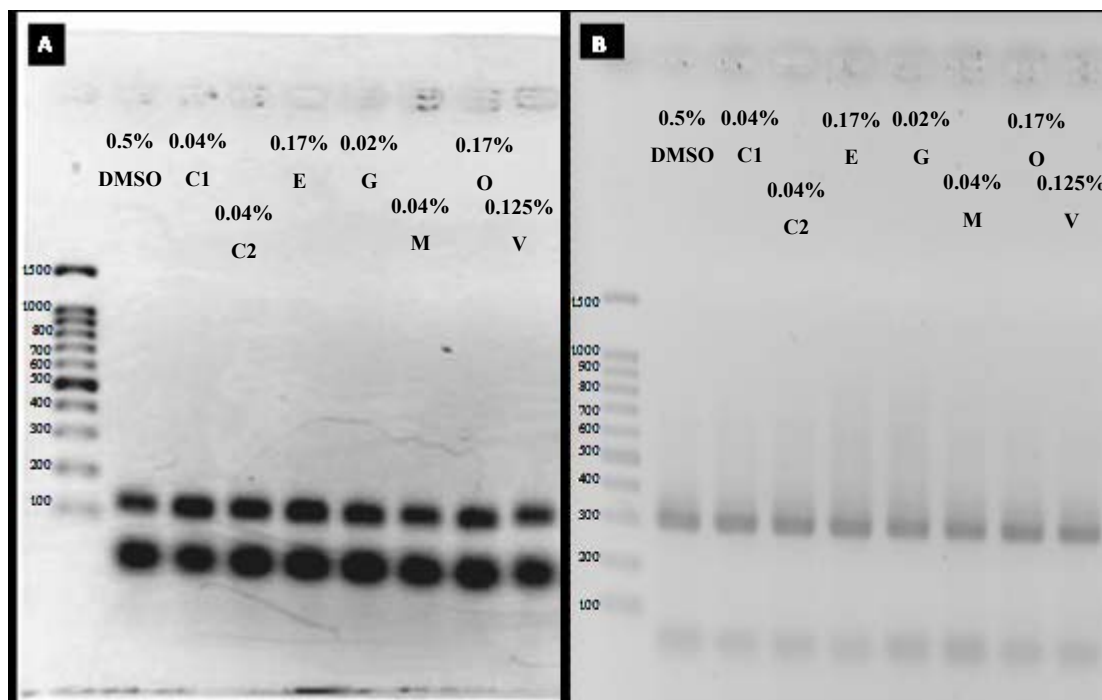


圖 5-14、cDNA 經聚合酶連鎖反應放大產物之結果

(A) NPY: 132 bp (B) β -actin: 309 bp

Figure 5-14. Results of polymerase chain reaction. (A) NPY (B) β -actin

C1: citronellal, C2: citronellol, E: eucalyptol, G: geraniol,
M: methyl phenylacetate, O: octenol, V: vanillin

(四) 即時定量聚合酶連鎖反應 (Real-Time Quantitative PCR)

反轉錄之 cDNA 經 PCR 放大且藉由電泳定性後，利用即時定量聚合酶連鎖反應來進行定量之步驟。實驗結果如下：

1. 以 5000 ppm DMSO 為溶劑的香料

以 5000 ppm DMSO 為溶劑的香料，處理培養兩天之嗅覺神經細胞 10 min，NPY mRNA 表現之結果如圖 5-15。實驗數據之計算方式，是以溶劑 5000 ppm DMSO 處理嗅覺神經細胞表現 NPY mRNA 之數值當作比較值 ($=1$)。結果顯示使用 400 ppm citronellal 處理之嗅覺神經細胞，NPY mRNA 表現量為 0.484 ± 0.117 ；經 400 ppm citronellol、1700 ppm eucalyptol、200 ppm geraniol 處理之嗅覺神經細胞表現 NPY mRNA 則分別為 0.020 ± 0.005 、 0.661 ± 0.038 與 0.230 ± 0.091 。其中，以 400 ppm methyl phenylacetate 及 1700 ppm octenol 處理之嗅覺神經細胞表現 NPY mRNA 之量均大於 1，分別為 2.259 ± 0.754 和 6.528 ± 0.968 ，且均達 $P < 0.01$ 之顯著差異，顯示此兩種香料物質均具有刺激 NPY mRNA 表現的潛力。但以 1250 ppm vanillin 處理之嗅覺神經細胞其 NPY mRNA 之表現量僅 0.101 ± 0.060 。

2. 以 10000 ppm DMSO 為溶劑的香料

以 10000 ppm DMSO 為溶劑的香料，處理培養兩天之嗅覺神經細胞 10 min，NPY mRNA 表現之影響如圖 5-16。實驗數據之計算方式，是以溶劑 10000 ppm DMSO 處理嗅覺神經細胞表現 NPY mRNA 之數值當作比較值 ($=1$)。結果顯示經 1250 ppm capsaicin 和 400 ppm diallyl disulfide 處理後之嗅覺神經細胞其表現 NPY mRNA 之含量差不多，分別是 0.504 ± 0.187 與 0.543 ± 0.054 。但經 250 ppm curcumin 與 1700 ppm diallyl sulfide 處理之細胞，其 NPY mRNA 之表現量僅分別為 0.062 ± 0.043 和 0.034 ± 0.039 。其中，200 ppm citral 與 1700 ppm pinene 處理之嗅覺神經細胞表現 NPY mRNA 之量均大於 1，分別為 1.797 ± 0.097 和 5.051 ± 4.181 。然而，僅經 1700 ppm pinene 處理之細胞表現 NPY mRNA 之量，達 $P < 0.01$ 之顯著差異，顯示 1700 ppm pinene 香料物質具有刺激 NPY mRNA 表現的潛力。

綜合上述的實驗結果可以發現，帶有香菇味之 octenol、蜂蜜味之 methy phenylacetate 及 pinene（許多香料物質之降解產物，亦是芬多精中之香氣物質）均具有刺激嗅覺神經細胞表現較高表現量之 NPY mRNA，刺激 NPY mRNA 表現量高至低為：1700 ppm octenol > 1700 ppm pinene > 400 ppm methy phenylacetate。

不同香氣有其不同之閾值，對人而言，因個體生活經驗、認知上之差異，對於香氣的感受性濃度也不一致（Yeretzian et al., 2004）。故推測，嗅覺神經細胞亦會因為處理香料物質的濃度不同，造成嗅覺細胞表現 NPY mRNA 之能力也不相同。張（2007）探討浸泡大蒜萃取物（garlic extract）對於點帶石斑魚攝食調控因子 NPY 基因表現之影響，結果發現大蒜萃取物在濃度為 6.25×10^{-1} ppm 就具有增加 NPY 基因表現量之效果，在 6.25×10^{-3} ppm 時 NPY 基因表現最高，然而，在 6.25×10^{-5} ppm 時則不具有刺激的效果。可見浸泡不同濃度之大蒜萃取物會影響 NPY 基因之表現。

但是，在本實驗上 1700 ppm diallyl sulfide 與 400 ppm diallyl disulfide 均無顯著刺激嗅覺神經細胞表現 NPY mRNA，故參考上述實驗使用之濃度並考量細胞實驗操作上之困難度，將上述（四）1、2 之實驗香料濃度稀釋 100 倍後，處理嗅覺神經細胞並定量 NPY mRNA 之表現能力。實驗結果如下：

3. 以 50 ppm DMSO 為溶劑的香料

以 50 ppm DMSO 為溶劑的香料，處理培養兩天之嗅覺神經細胞 10 min，NPY mRNA 表現之影響如圖 5-17。實驗數據之計算方式是以溶劑 50 ppm DMSO 處理嗅覺神經細胞表現 NPY mRNA 之數值當作比較值（= 1）。結果顯示使用 4 ppm citronellal 處理之嗅覺神經細胞，NPY mRNA 表現量為 0.359 ± 0.009 ；經 4 ppm citronellol、17 ppm eucalyptol、2 ppm geraniol 處理之嗅覺神經細胞表現 NPY mRNA 則分別為 1.324 ± 1.037 、 0.601 ± 0.082 與 0.409 ± 0.044 。4 ppm methyl phenylacetate 及 17 ppm octenol 處理之嗅覺神經細胞表現 NPY mRNA 之量分別為 0.467 ± 0.271 和 0.572 ± 0.152 。而以 12.5 ppm vanillin 處理之嗅覺神經細胞其 NPY

mRNA 之表現量則為 0.741 ± 0.194 。

將此數據與 (四) 1 的數據相比 (未稀釋 100 倍前之香料物質濃度) 其 NPY mRNA 表現變異的百分比如表 5-2。(其計算之方式為: $\left[\frac{1}{100} \text{ sample} \right] \text{ NPY gene 之表現量} - \left[\text{sample} \right] \text{ NPY gene 之表現量} \bigg/ \left[\text{sample} \right] \text{ NPY gene 之表現量} * 100$)。由實驗結果可以發現處理 17 ppm octenol 與 4 ppm methyl phenylacetate, 其嗅覺細胞表現 NPY mRNA 量與 1700 ppm octenol、400 ppm methyl phenylacetate 相比下降, 分別為 -91.23% 及 -79.31%。然而, 處理 4 ppm citronellol、2 ppm geraniol 與 12.5 ppm vanillin 與未稀釋百倍前之香料物質相比, 則增加嗅覺神經細胞表現 NPY mRNA 之能力 (分別增加為 6544.61%、77.75% 與 635.46%)。此外, 在 4 ppm citronellal 與 17 ppm eucalyptol 刺激嗅覺神經細胞表現 NPY mRNA 之能力與 400 ppm citronellal 及 1700 ppm eucalyptol 相比亦下降 -25.77% 與 9.13%。由此可知, 香料濃度之不同會影響嗅覺神經細胞 NPY mRNA 之表現, 並且, 濃度經稀釋之香料物質對於嗅覺神經細胞無顯著刺激 NPY mRNA 之表現。

4. 以 100 ppm DMSO 為溶劑的香料

以 100 ppm DMSO 為溶劑的香料, 處理培養兩天之嗅覺神經細胞 10 min, NPY mRNA 表現之影響如圖 5-18。實驗數據之計算方式為: 以溶劑 100 ppm DMSO 處理嗅覺神經細胞表現 NPY mRNA 之數值當作比較值 ($=1$)。結果顯示經 12.5 ppm capsaicin 和 2.5 ppm curcumin 處理後之嗅覺神經細胞其表現 NPY mRNA 之含量差不多, 分別是 0.252 ± 0.041 與 0.392 ± 0.075 。但經 2 ppm citral 與 17 ppm diallyl sulfide 處理之細胞, 其 NPY mRNA 之表現量分別為 0.589 ± 0.124 和 0.414 ± 0.056 。其中, 4 ppm diallyl disulfide 與 17 ppm pinene 處理之嗅覺神經細胞表現 NPY mRNA 之量均大於 1, 分別為 1.337 ± 0.253 和 1.563 ± 1.060 。然而, 此實驗中以 100 ppm DMSO 為溶劑的香料, 均無顯著地刺激 NPY mRNA 之表現。

將此數據與 (四) 2 的數據相比 (未稀釋 100 倍前之香料物質濃度) 其 NPY 基因表現變異的百分比如表 5-2。(其計算之方式為: $\left[\frac{1}{100} \right]$

sample〕 NPY gene 之表現量 — [sample〕 NPY gene 之表現量】 / [sample〕 NPY gene 之表現量 *100)。由表可知在 2.5 ppm curcumin、17 ppm DAS 與 4 ppm DADS，NPY mRNA 表現量雖無顯著表現，但與濃度未稀釋前之香料相比，其刺激 NPY mRNA 表現之能力分別提高 534.30%、1118.09% 與 146.04%；然而，12.5 ppm capsaicin 和 2 ppm citral 對於刺激 NPY mRNA 表現之能力則是分別下降：49.90%、67.20%。其中，以 1700 ppm pinene 能刺激 NPY 基因表現量高的香料，濃度經百倍稀釋後 NPY mRNA 表現雖然仍大於 1，但 NPY mRNA 之表現卻下降 69.05%。

由上述的實驗結果可以發現：不同濃度的香料物質對於刺激嗅覺神經細胞表現 NPY mRNA 之能力不盡相同；並且在篩選模式之建立上，亦發現不同濃度及不同刺激時間的 limonene 和 linalool 對於刺激嗅覺神經細胞表現 NPY mRNA 也有相同之趨勢。張(2007)探討四種誘引劑(Betaine、Garlic extract、DMPT 與 TMAO)及中草藥丁香、八角對於點帶石斑魚 NPY 基因表現之影響結果顯示，上述誘引劑在不同濃度、不同刺激時間，均會影響 NPY 基因之表現量。

但是，經 800 ppm limonene 和 800 ppm linalool 處理嗅覺神經細胞 10 min，不論細胞培養的天數為何均可建立一個抑制與刺激 NPY mRNA 表現的模式。故在本研究中，雖然亦發現相同的香料物質會因為濃度不同而影響 NPY mRNA 表現量之高低。但是，本研究之目的是希望以此模式篩選具有刺激嗅覺神經細胞表現較高 NPY mRNA 表現量之香料物質，故暫不論香料之濃度影響，仍從實驗結果可知 octenol、pinene 及 methy phenylacetate（表現 NPY mRNA 之高至低為：octenol > pinene > methy phenylacetate）為具有潛力刺激嗅覺神經細胞表現較高 NPY mRNA 表現量之香料物質。

因此，在第二部份人體實驗，則選擇 octenol 與 pinene 這兩種具有潛力刺激嗅覺神經細胞表現較高 NPY mRNA 表現量之香料物質，作為人體實驗驗證之樣品。

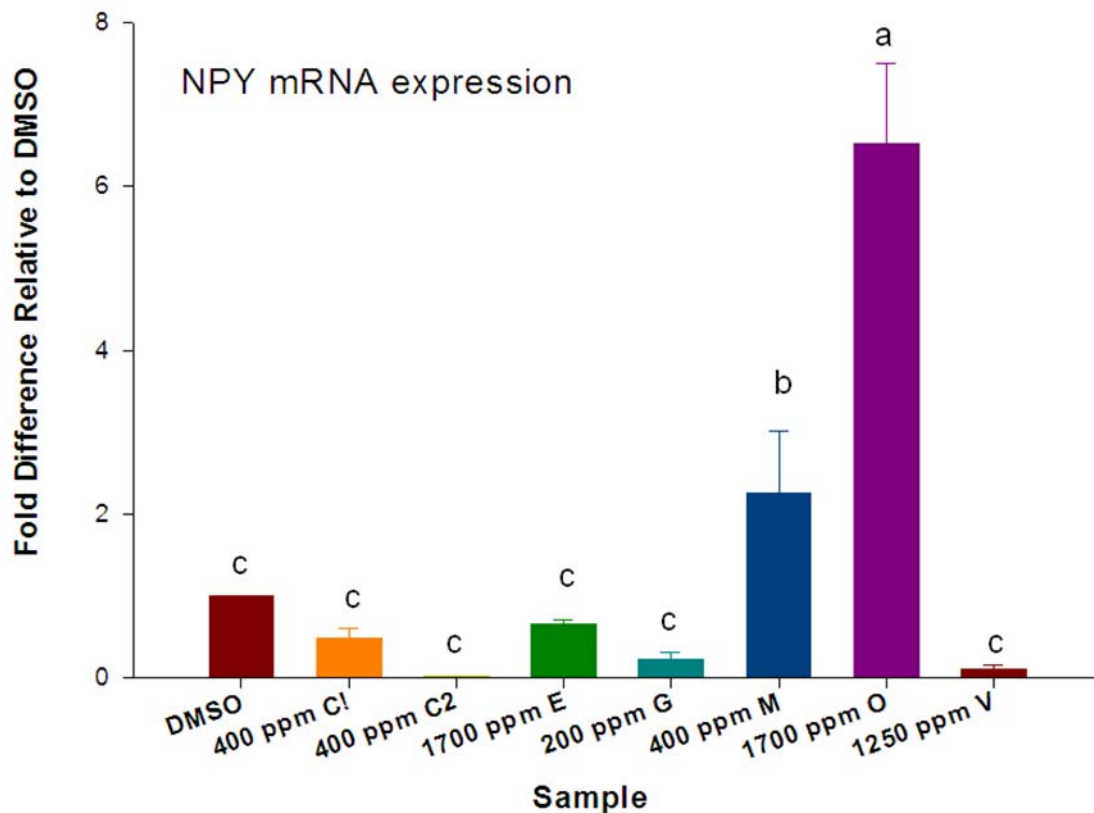


圖 5-15、嗅覺神經細胞經不同樣品處理 10 min 後 NPY mRNA 基因之表現
以 real-time PCR 進行定量之步驟，數據以縱座標為以 5000 ppm DMSO 處理之結果作為比較值，並以 ANOVA 作事前檢定及 Duncan 作事後變異性分析 (n=3, mean $\pm$ SD, $P < 0.01$)

Figure 5-15. Gene expression of NPY mRNA in Rolf B1.T cells treated with different samples for 10 mins. (n=3, mean $\pm$ SD, $P < 0.01$)

*The comparative changes in gene expression of NPY mRNA were determined by real-time PCR analysis. Values were normalized using β -actin mRNA levels as a reference.

*a, b, c: Base with different letters are significantly different from the control group (5000 ppm DMSO). $P < 0.01$

*C1: Citronellal, C2: Citronellol, E: Eucalyptol, G: Geraniol, M: methyl phenylacetate, O: Octenol, V: vanillin

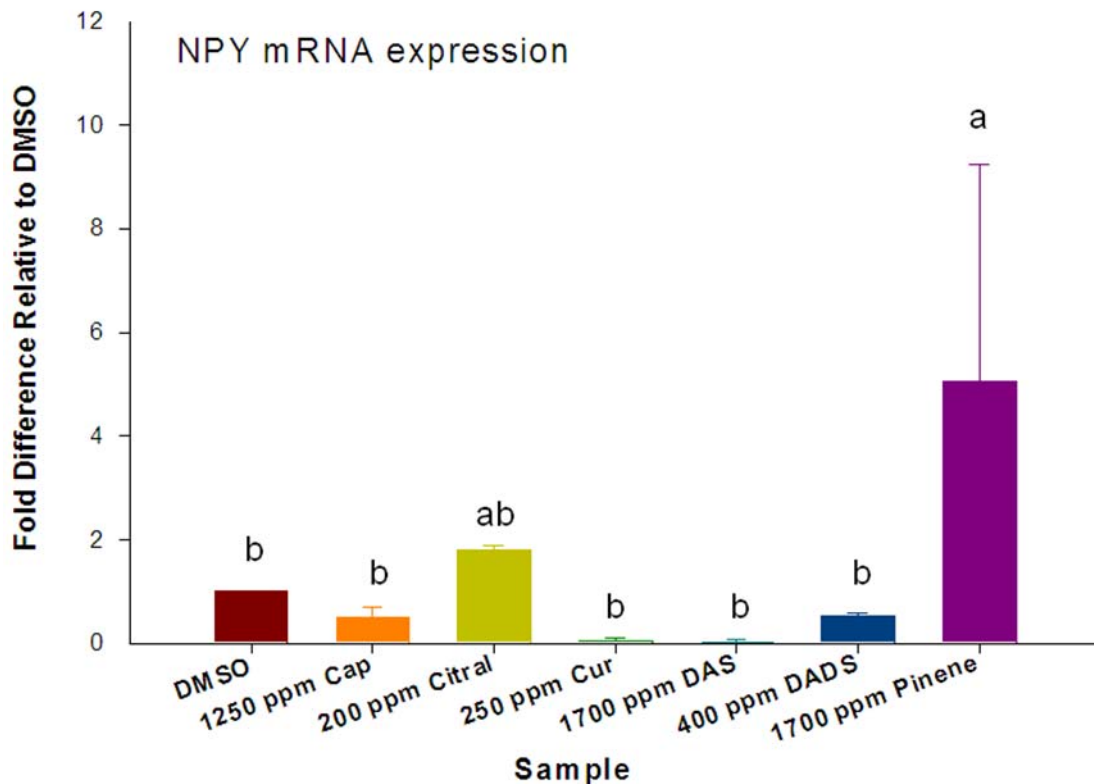


圖 5-16、嗅覺神經細胞經不同樣品處理 10 min 後 NPY mRNA 基因之表現
以 real-time PCR 進行定量之步驟，數據以縱座標為以 10000 ppm DMSO
處理之結果作為比較值，並以 ANOVA 作事前檢定及 Duncan 作事後變異
性分析 (n=3, mean $\pm$ SD, $P < 0.01$)。

Figure 5-16. Gene expression of NPY mRNA in Rolf B1.T cells treated with different samples for 10 mins (n=3, mean $\pm$ SD, $P < 0.01$).

*The comparative changes in gene expression of NPY mRNA were determined by real-time PCR analysis. Values were normalized using β -actin mRNA levels as a reference.

*a, b: Base with different letters are significantly different from the control group (10000 ppm DMSO). $P < 0.01$

*Cap: capsaicin, Cur: Curcumin, DAS: Diallyl sulfide, DADS: Diallyl disulfide

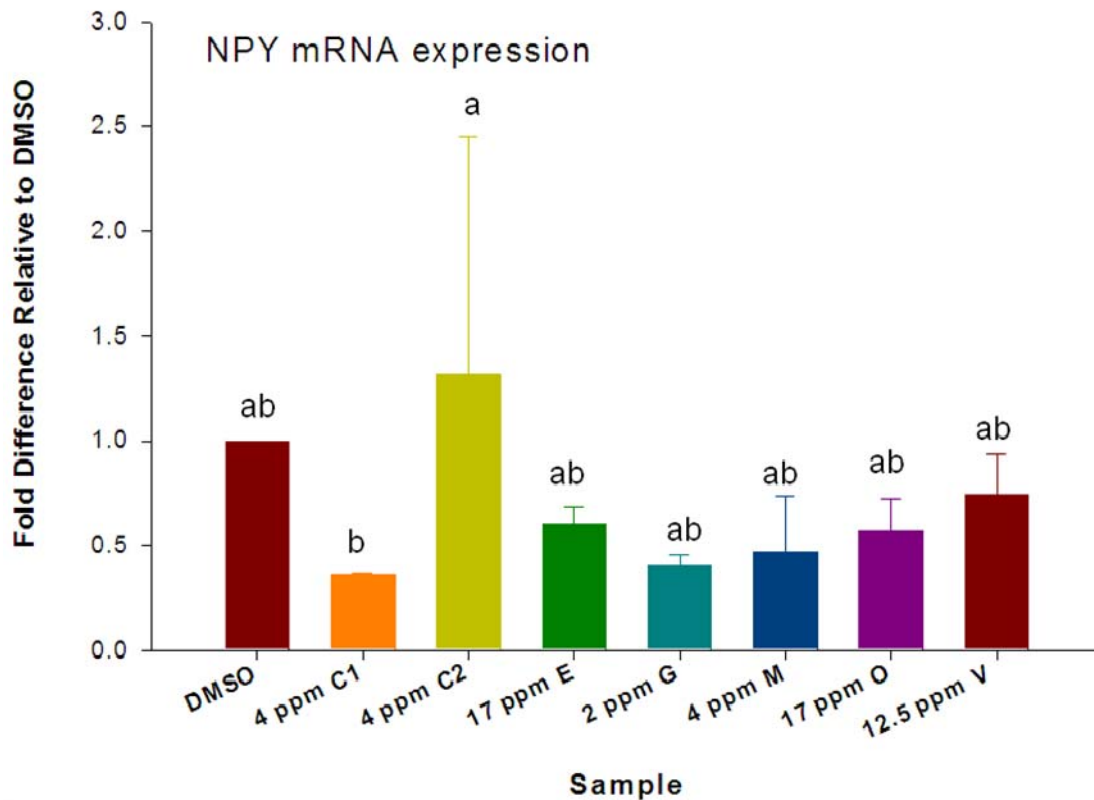


圖 5-17、嗅覺神經細胞經不同樣品處理 10 min 後 NPY mRNA 基因之表現
以 real-time PCR 進行定量之步驟，數據以縱座標為以 50 ppm DMSO 處理之結果作為比較值，並以 ANOVA 作事前檢定及 Duncan 作事後變異性分析 (n=3, mean $\pm$ SD, $P < 0.01$)。

Figure 5-17. Gene expression of NPY mRNA in Rolf B1.T cells treated with different samples for 10 mins. (n=3, mean $\pm$ SD, $P < 0.01$)

*The comparative changes in gene expression of NPY mRNA were determined by real-time PCR analysis. Values were normalized using β -actin mRNA levels as a reference.

*a, b: Base with different letters are significantly different from the control group (50 ppm DMSO). $P < 0.01$

*C1: Citronellal, C2: Citronellol, E: Eucalyptol, G: Geraniol, M: methyl phenylacetate, O: Octenol, V: vanillin

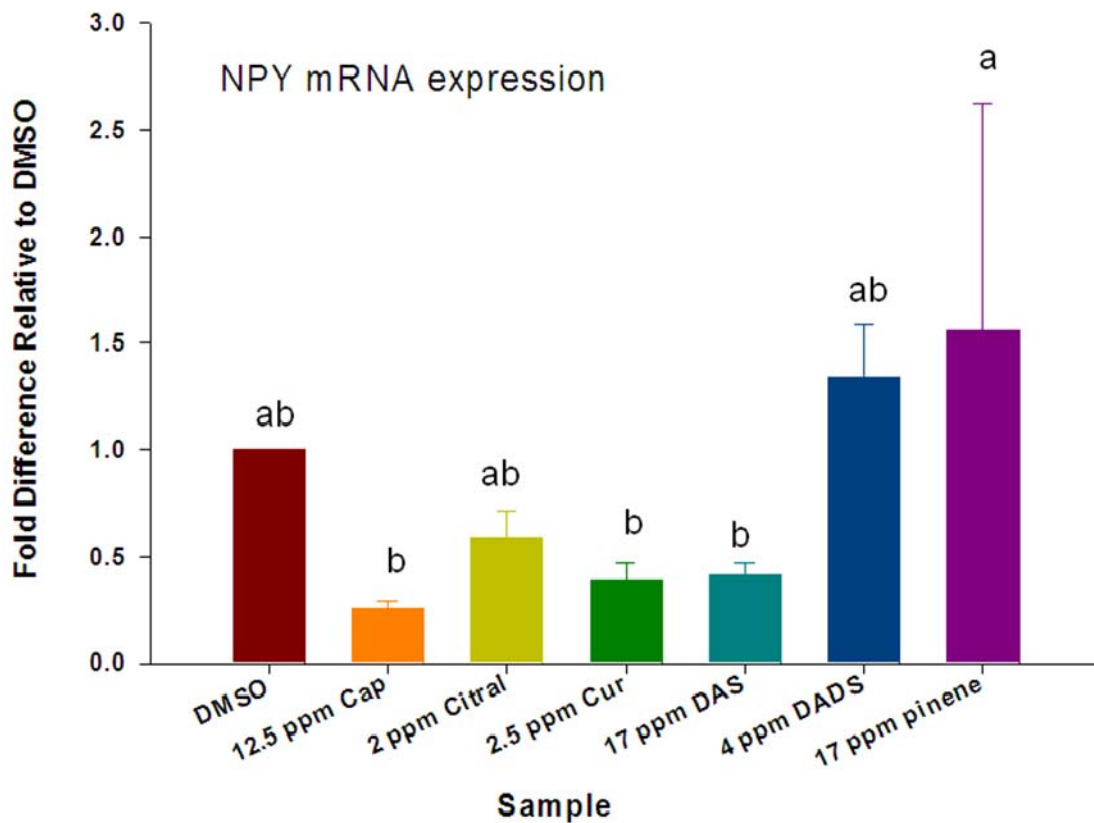


圖 5-18、嗅覺神經細胞經不同樣品處理 10 min 後 NPY mRNA 基因之表現
以 real-time PCR 進行定量之步驟，數據以縱座標為以 0.01% DMSO 處理之結果作為比較值，並以 ANOVA 作事前檢定及 Duncan 作事後變異性分析 (n=3, mean $\pm$ SD, $P < 0.01$)。

Figure 5-18. Gene expression of NPY mRNA in Rolf B1.T cells treated with different samples for 10 mins (n=3, mean $\pm$ SD, $P < 0.01$).

*The comparative changes in gene expression of NPY mRNA were determined by real-time PCR analysis. Values were normalized using β -actin mRNA levels as a reference.

*a, b: Base with different letters are significantly different from the control group (100 ppm DMSO). $P < 0.01$

*Cap: capsaicin, Cur: Curcumin, DAS: Diallyl sulfide, DADS: Diallyl disulfide

表 5-2、不同濃度的香料物質刺激嗅覺神經細胞表現 NPY mRNA 之變異百分比

Table 5-2. Variation of gene expression of NPY mRNA in Rolf B1.T cells treated with different samples with different concentrations for 10 mins.

Sample concentration		*Variation of NPY mRNA (%)
[sample]	[1/100 sample]	
400 ppm C1	4 ppm C1	-25.77
400 ppm C2	4 ppm C2	6544.61
1700 ppm E	17 ppm E	-9.13
200 ppm G	2 ppm G	77.75
400 ppm M	4 ppm M	-79.31
1700 ppm O	17 ppm O	-91.23
1250 ppm V	12.5 ppm V	635.46
1250 Cap	12.5 ppm Cap	-49.90
200 ppm Citral	2 ppm Citral	-67.20
250 ppm Cur	2.5 ppm Cur	534.30
1700 ppm DAS	17 ppm DAS	1118.09
400 ppm DADS	4 ppm DADS	146.04
1700 ppm Pinene	17 ppm pinene	-69.05

*計算之方式為：Variation of NPY mRNA expression (%)=

$$\frac{【 [1/100 \text{ sample }] \text{ NPY gene 之表現量} - [\text{sample}] \text{ NPY gene 之表現量} 】 \times 100}{[\text{sample}] \text{ NPY gene 之表現量}}$$

* C1: Citronellal, C2: Citronellol, E: Eucalyptol, G: Geraniol, M: methyl phenylacetate, O: Octenol, V: vanillin, Cap: capsaicin, Cur: Curcumin, DAS: Diallyl sulfide, DADS: Diallyl disulfide

第二部份實驗結果

三、人體試驗

(一) 受試者基本資料

表 5-3 為受試者基本資料（僅附性別、年齡、體脂、BMI 及教育程度之部分），本試驗維持三星期，每星期試驗一次，相同受試者在三星期中均予以相同之氣味，其刺激時間分別為：第一個星期刺激五分鐘、第二個星期刺激十分鐘及第三個星期刺激十五分鐘。所有受試者中，僅 linalool 組別，一人退出 15 分鐘之試驗，其餘均完成三星期之試驗。

表 5-3，n 代表每組之受試人數，控制組 water、正控制組 linalool 及由第一部份篩選出之樣品：pinene、octenol，受試人數均為六人；其中，負控制組 limonene 之受試人數為七人。

各組間性別及年齡之分佈，也儘量讓性別比例相同，其組間性別及平均年齡之分佈如下，控制組 water：三位男性、三位女性，平均年齡為 24.2 歲、負控制組 limonene：四位男性、三位女性，平均年齡為 26.4 歲、正控制組 linalool：三位男性、三位女性，平均年齡為 24.7 歲；及由第一部份篩選出之樣品 pinene、octenol 性別分佈同是四位男性、兩位女性，平均年齡個別為 25.2 歲與 27.2 歲。

各組間之平均身高及體重以 BMI 表示；則各組平均 BMI 與體脂如下，控制組 water：20.89、23.48%；負控制組 limonene：23.35、24.63%；正控制組 linalool：22.59、24.67%；及由第一部份篩選出之樣品 pinene：22.10、21.3%；octenol：26.59、25.3%。其中可以發現，octenol 組 BMI、體脂及年齡均較其他組高。

各組之教育程度平均為研究所。

表 5-3 受試者基本資料

Table 5-3. Baseline characteristics of experimental subjects

		n	Sex	¹ BMI	Body fat (%)	Age (year)	Education
Control	Water	6	3M 3F	20.89	23.48	24.2	Graduated
Negative	Limonene (80 ppm)	7	4M 3F	23.35	24.63	26.4	Graduated
Positive	Linalool (320 ppm)	6	3M 3F	22.59	24.67	24.7	Graduated
Sample	Pinene (75 ppm)	6	4M 2F	22.10	21.3	25.2	Graduated
	Octenol (2 ppm)	6	4M 2F	26.59	25.3	27.2	Graduated

1: BMI: body weight (kg) /height² (m²)

(二) 受試前，受試者血漿中 NPY 與 leptin 含量之關係性且血漿中 NPY、leptin 含量與年齡、體脂、身體質量指數 (BMI) 及性別之關係性

文獻研究發現年齡、BMI 會與血漿中 NPY 之含量有相關性 (Baranowska et al., 1997; Lin et al., 2007)；而血漿中 leptin 則會與性別、BMI 有相關性 (Nam et al., 2009; Priego et al., 2009)。故觀察本研究之受試者於受試前血漿中 NPY 與 leptin 含量之關係性且血漿中 NPY、leptin 含量與年齡、體脂、身體質量指數 (BMI) 之關係。

1. 受試前，受試者血漿中 NPY 與 leptin 含量之關係性

文獻指出 leptin 可以藉由與下視丘弓狀核 NPY/AGRP 神經元上之 leptin receptor 結合來抑制 NPY 之表現，進而達到抑制食慾、減少攝食並增加交感神經活性且抑制副交感神經活性 (Mercer et al., 1997)，可知兩者間存在相互拮抗之作用。因而觀察受試前受試者血漿中 NPY 與 leptin 含量之關係性，其結果並無此現象。推測 leptin 除了扮演與 NPY 含量相互拮抗之角色，易因其他生理因子影響 (Chen et al., 2005; 2006; Getchell et al., 2006; Baly et al., 2007)。故在本試驗中並無看出相互拮抗之趨勢 ($P=0.4796$)。

2. 受試前，受試者年齡與血漿中 NPY、leptin 之關係

由圖 5-20 可以發現，受試前，受試者年齡與血漿中 NPY 之 r^2 (決定係數) 為 0.0234；與 leptin 之決定係數亦為 0.0234。由此可知，在本研究之受試者年齡與血漿中 NPY、leptin 含量關係性低。Lin 等人之研究 (2007) 發現受試者年齡 (0-400 month) 與血漿中的 NPY 含量有其正相關性。然而，在本研究中無此現象，推測其可能原因為：受試者之年齡分佈相近 (22~32 歲) 較不易看出此趨勢。 (NPY, $P=0.4115$; leptin, $P=0.9441$)。

3. 受試前，受試者體脂百分率與血漿中 NPY、leptin 之關係

將受試者之體脂個別與受試者之血漿 NPY、leptin 含量作直線迴歸分

析，由圖 5-21 可以發現：受試者體脂百分率與血漿中 NPY 之決定係數為 0.0047，其相關性非常低；相反地，受試者體脂百分率與血漿中 leptin 之決定係數有高達 0.633 之相關性（達 $p=0.0001$ 極顯著地相關性），可發現受試者體脂百分率越高，血漿中 leptin 含量也越高之趨勢。推測其原因為 leptin 為脂肪組織分泌的一種荷爾蒙，當脂肪含量越多的時候，其分泌量也隨之增加；且 leptin 在血漿中的含量也與脂肪細胞的多寡、脂肪含量相關（Bell et al., 2005；Chilliard et al., 2001），故在本研究之受試者中亦發現有相同之現象。（NPY, $P=0.7142$ ；leptin, $P=0.0001$ ）

4. 受試前，受試者 BMI 與血漿中 NPY、leptin 之關係

受試前，受試者 BMI 與血漿中 NPY、leptin 之決定係數分別為 0.0065 與 0.3101（圖 5-22）。受試者 BMI 與血漿中 NPY 之決定係數僅只有 0.0065，其相關性低。Baranowska 等學者（1997）研究結果發現 BMI 與血漿中 NPY 含量具有相關性。然而，此研究目的主要是針對肥胖之女人其 BMI 對於血漿中 NPY 的關係性，研究之 BMI 範圍區分為：25-30、31-40、 >40 及 31-40 且帶有糖尿病之患者，對照於本試驗的受試者其 BMI 值大都落在 22-25 區間，故推測在本研究之受試者中較難看到有相同之趨勢（ $P=0.6670$ ）。

受試者 BMI 與血漿中 leptin 之決定係數達 0.3101，由圖可以看出受試者 BMI 值越高，血漿中 leptin 含量亦有越高之趨勢。其在 Baranowska 等學者（1997）研究中亦有相同之趨勢，推測其原因為：leptin 為脂肪組織分泌的一種荷爾蒙，當脂肪含量越多的時候，其分泌量也隨之增加；且 leptin 在血漿中的含量與脂肪細胞的多寡、脂肪含量相關（Bell et al., 2005；Chilliard et al., 2001），而通常脂肪含量高其體重也就越重，BMI 值也高。故在本研究之受試者中亦發現有相同之現象（ $P=0.0011$ ）。

5. 受試前，受試者性別與血漿中 NPY、leptin 之關係

在性別方面，受試者性別與血漿中 NPY 較無關係性；但與 leptin 之含量較有相關，顯示女性在血漿中 leptin 的濃度較高於男性（圖 5-23）（但

未達顯著差異），推測為女性體內之脂肪含量本身高於男性應為主要原因（NPY, $P=0.0819$ ；leptin, $P=0.7585$ ）。



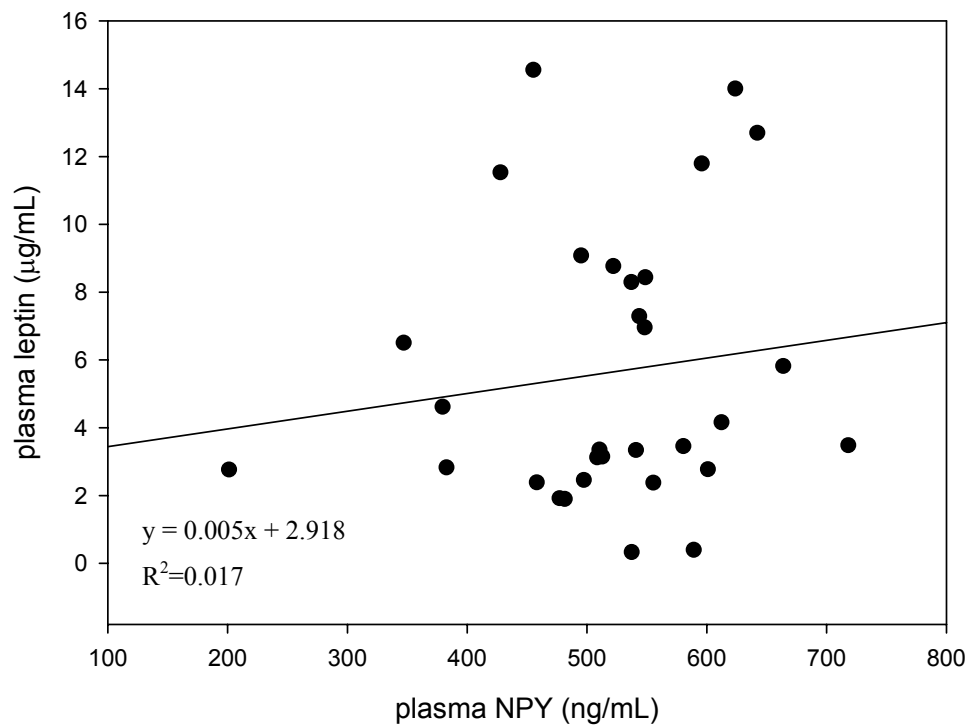


圖 5-19、受試前，受試者血漿中 NPY 與血漿中 leptin 含量之相關性

Figure 5-19. Relationship between plasma NPY and plasma leptin of all subjects (n=31).

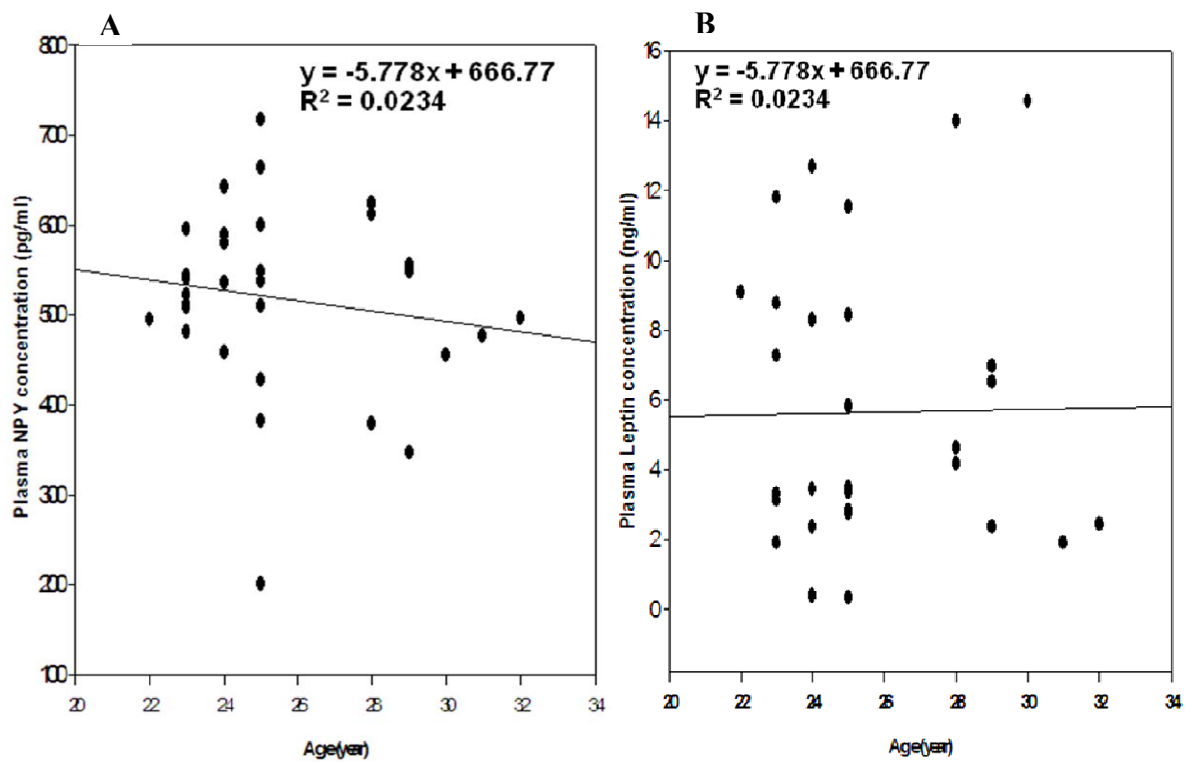


圖 5-20、受試前，受試者 (A) 年齡與血漿中 NPY 及 (B) 年齡與血漿中 leptin 含量之相關性

Figure 5-20. Relationship between (A) age and plasma NPY, and (B) age and plasma leptin of all subjects (n=31).

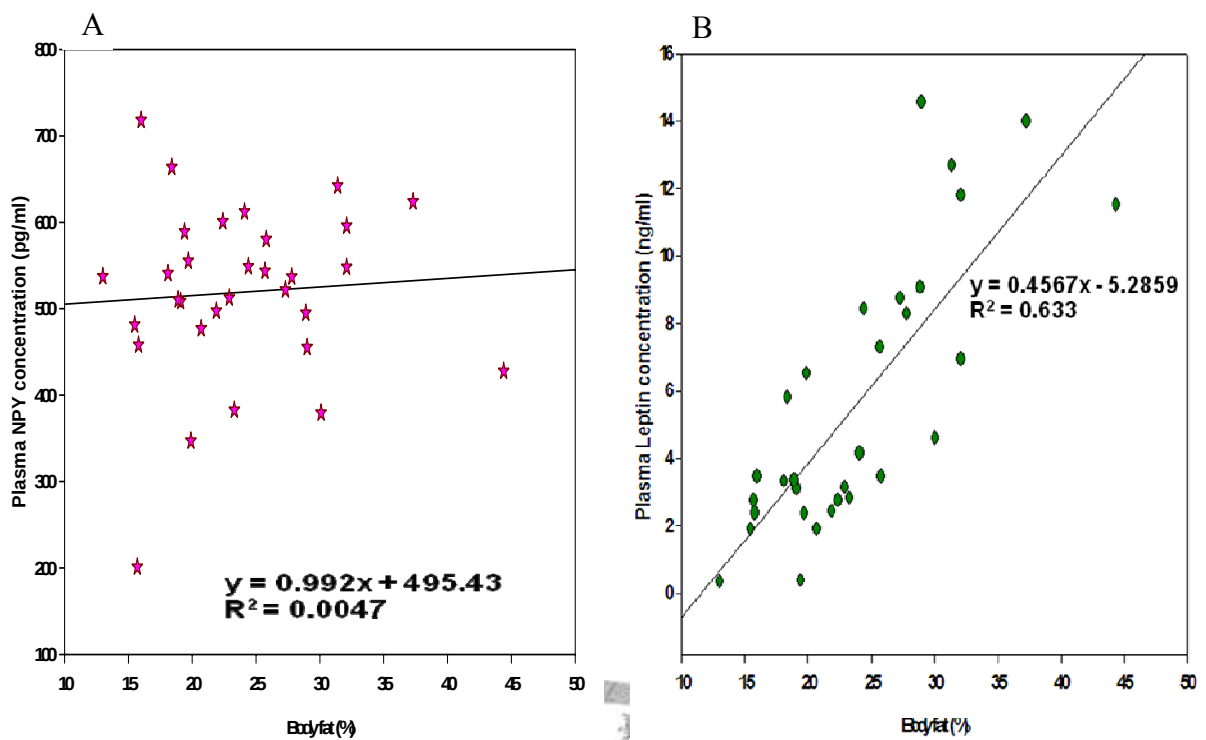


圖 5-21、受試前，受試者 (A) 體脂與血漿中 NPY 及 (B) 體脂與血漿中 leptin 含量之相關性

Figure 5-21. Relationship between (A) body fat and plasma NPY, and (B) body fat and plasma leptin of all subjects (n=31).

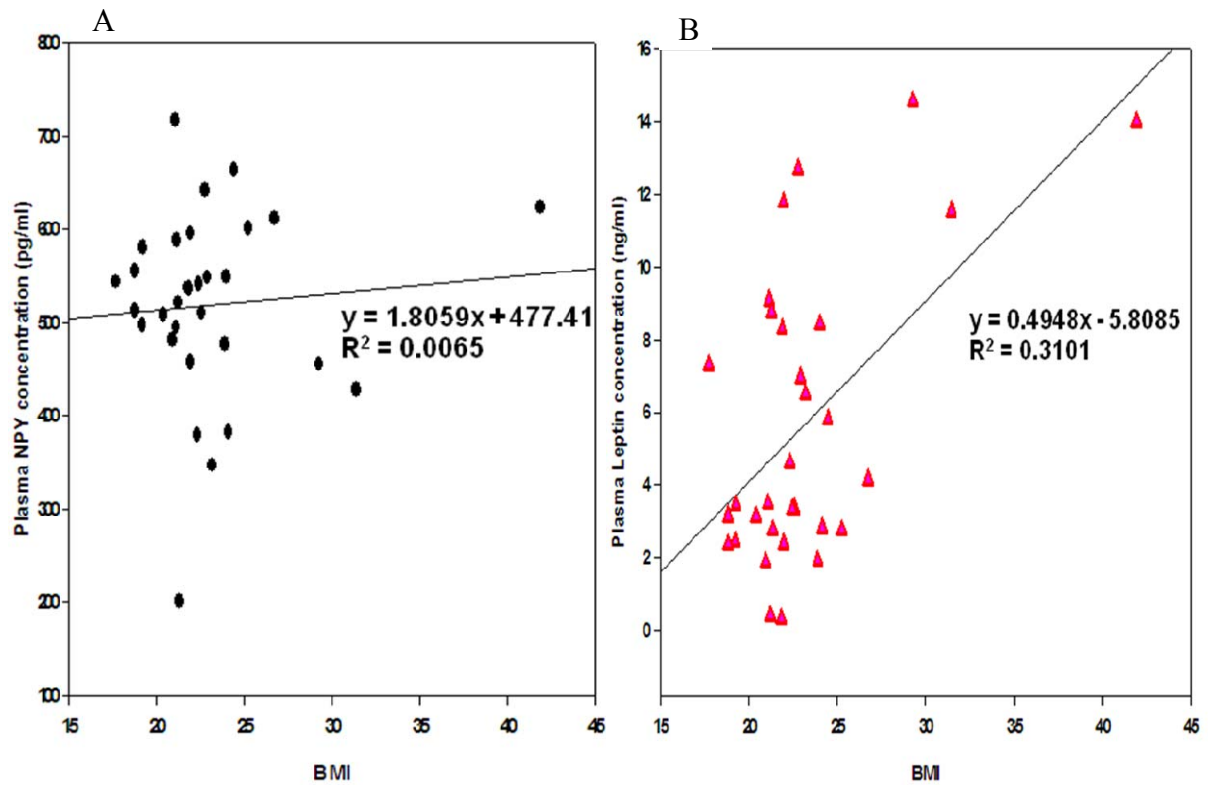


圖 5-22、受試前，受試者 (A) BMI 與血漿中 NPY 及 (B) BMI 與血漿中 leptin 含量之相關性

Figure 5-22. Relationship between (A) BMI and plasma NPY, and (B) BMI and plasma leptin of all subjects (n=31).

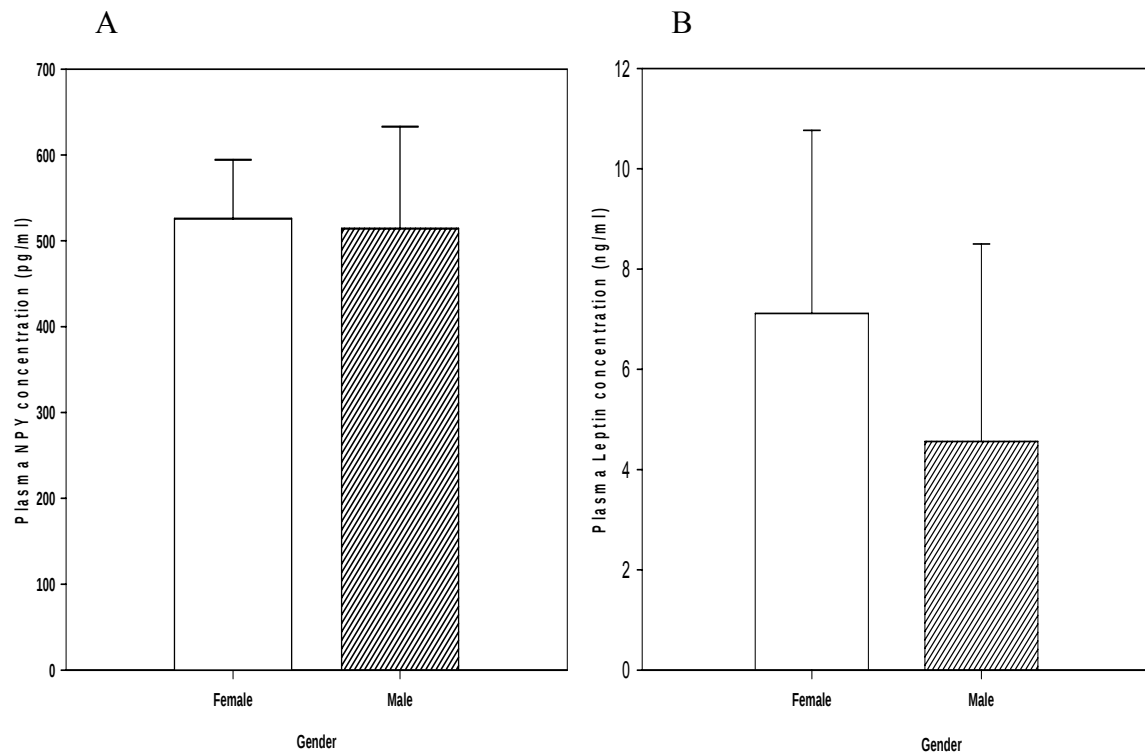


圖 5-23、受試前，受試者 (A) 性別與血漿中 NPY 及 (B) 性別與血漿中 leptin 含量之相關性

Figure 5-23. Relationship between (A) gender and plasma NPY, and (B) gender and plasma leptin (n=31).

(三) 受試 5、10 及 15 分鐘，受試者血漿中 NPY、leptin 含量之變化

以水作為控制組，控制組之受試結果計算方式為：三次實驗變化量百分比之平均值作為比較之基準值。其他各試驗組則分別以受試後相對於受試前的變化量百分比表示，即 $\text{NPY 與 leptin}_{5, 10, 15 \text{ min}} \% = (\text{後測值} - \text{前測值}) \div \text{前測值} \times 100$ 。然而，此部份的實驗結果，因為受試者個體變異性大，故分別試著以下列不同方式去探討受試後血漿中 NPY 及 leptin 之變化。

1. 以各組整體探討受試後血漿中平均 NPY 及 leptin 之變化量
2. 以各組分別探討受試後血漿中 NPY 及 leptin 平均下降及上升之變化量及人數分佈
3. 以各組依性別探討受試後血漿中平均 NPY 及 leptin 之變化
4. 各受試者於受試後血漿中平均 NPY 及 leptin 之變化

並將上述各點分述如下：

1. 以各組整體探討：受試 5、10 及 15 分鐘，血漿中平均 NPY、leptin 之變化量

(1) 血漿中 NPY 於受試 5、10 及 15 分鐘平均變化量

I. 結果

由實驗結果（如圖 5-24、表 5-4）可以發現，以水作為試驗 5、10 及 15 分鐘之控制組，其 NPY 平均之變化率為 -1.49%。而在動物實驗上已證實具有抑制食慾之香氣 limonene（Shen et al., 2005）作為試驗負控制組，其在 5、10 與 15 分鐘 NPY 之平均變化率分別為：-0.06%、-11.54% 與 -4.13%，其中予以受試者刺激 10 分鐘時 NPY 下降之百分率最高；相反地，以動物實驗上已證實具有刺激食慾之香氣 linalool（Shen et al., 2005）作為試驗之正控制組，受試者 NPY 之平均變化率在 5 分鐘及 15 分鐘均為上升，其中又以 5 分鐘時上升最多，其值分別為 22.93% 與 5.71%，而在 10 分鐘時受試者之 NPY 平均變化率則下降，其值為 -2.49%。另外，以大鼠嗅覺神經細胞表現 NPY mRNA 之篩選平台，篩選出具有顯著地刺激大鼠嗅覺神經細胞表現 NPY mRNA 之香氣物質 pinene 及 octenol，其予以受試者聞 5、10 與 15 分鐘 NPY 之平均變化率

在 pinene 組別中分別為 2.20%、0.08% 及 -8.13%；在 octenol 組別中不論是在 5 分鐘、10 分鐘及 15 分鐘，NPY 平均變化率均為增加，其值分別為：13.67%、3.30% 和 5.21%。

II. 討論

NPY 廣泛地存在中樞、周邊神經系統及組織中，由研究結果可以知道，NPY 不僅在腦中扮演著攝食調控的重要角色，在血漿中存在的 NPY 也與食慾相關（Seeley et al., 1995；Ammar et al., 2000；Benoit et al., 2005；Kobeissy et al., 2007）。除此之外，將老鼠暴露於香煙、MDMA（3,4-methylenedioxymethamphetamine）及 METH（methamphetamine）的環境中，會降低老鼠腦中 NPY 含量及血漿中 NPY 存在之量，進而影響食慾（Kobeissy et al., 2007；Chen et al., 2006）。可知氣味物質藉由嗅覺的刺激會改變 NPY 之含量。在本實驗中，負控制組 limonene，在動物實驗上已證實為抑制食慾之香氣（Shen et al., 2005），予以受試者刺激 10 分鐘時，血漿中 NPY 下降之百分率最高，充分顯示其具有抑制 NPY 表現進而抑制食慾之潛力。此結果也與 Shen 等學者（2005）之動物實驗結果以及在實驗室之前所建立之篩選平台（可抑制嗅覺神經細胞表現 NPY mRNA）之結果相互呼應。

相反地，在動物實驗上已證實具有刺激食慾之香氣 linalool（Shen et al., 2005）作為試驗之正控制組，在刺激 5 分鐘時，受試者血漿中 NPY 上升最多。充分顯示其具有刺激 NPY 表現進而促進食慾之潛力。此結果也與 Shen 等學者（2005）之動物實驗結果以及在實驗室之前所建立之篩選平台（可刺激嗅覺神經細胞表現 NPY mRNA）之結果相互呼應。另外，以大鼠嗅覺神經細胞表現 NPY mRNA 之篩選平台，篩選出具有顯著地刺激大鼠嗅覺神經細胞表現 NPY mRNA 之香氣物質 octenol 在 5 分鐘、10 分鐘及 15 分鐘，NPY 平均變化率均增加。充分顯示其具有刺激 NPY 表現進而促進食慾之潛力。然而，在 pinene 組中則較無此現象。

對照於 limonene、linalool 和 pinene 組，推測具有香菇味之 octenol 可能是因為較貼近於食品之香氣，在人體實驗 5 分鐘、10 分鐘及 15 分鐘均使受試者血漿中 NPY 之含量有增加之趨勢。其促進食慾對於人體

可能之機轉應相較於精油類之香氣較為直接。

Mathey 等學者 (2001) 及 Essed 等學者 (2007) 分別探討於飲食中添加香料物質對於護理之家年老的人，其攝食與營養狀態之影響 (試驗進行 16 個星期)。結果發現添加 chicken flavor、beef bouillon flavor、turkey flavor 和 lemon butter (fish) flavor 於飲食中，能促進年老的人攝食並且增加體重 (Mathey et al., 2001)。然而，在 Essed 等學者之研究中，添加九種香料物質 (chicken soup、stewed chicken、fried chicken、roast chicken、stewed pork、roast pork、stewed beef、roast beef 及 roast lamb)、九種香料物質加上 MSG 以及 MSG 於飲食中，則未發現攝食增加與體重上升之情況，推測此結果可能由於受試者在嗅覺與味覺上無法真正聞到、嚐到香料物質味道的緣故。故推測，在本實驗之受試者亦因為對於香氣的感受度不同，而影響個體表現 NPY 之差異。

(2) 血漿中 leptin 於受試 5、10 及 15 分鐘平均變化量

I. 結果

由實驗結果 (如圖 5-25、表 5-5) 可以發現，以水作為試驗 5、10 及 15 分鐘之控制組，其 leptin 平均之變化率為 -6.63%。試驗之負控制組 limonene，其在 5、10 與 15 分鐘 leptin 之平均變化率分別為：-6.15%、4.91% 與 -10.02%，其中予以受試者刺激 15 分鐘時下降 leptin 之百分率最高；相反地，作為試驗之正控制組 linalool，受試者 leptin 之平均變化率在 5 分鐘、10 分鐘均為下降，其中又以 10 分鐘時下降最多，其值分別為 -7.88% 與 -8.16%，而在 15 分鐘時，受試者之 leptin 平均變化率則上升，其值為 5.37%。另外，篩選出具有顯著地刺激大鼠嗅覺神經細胞表現 NPY mRNA 之香氣物質 pinene 及 octenol，其予以受試者聞 5、10 與 15 分鐘 leptin 之平均變化率在 pinene 組別中分別為 -8.47%、14.32% 及 -2.91%；在 octenol 組別中不論是在 5 分鐘、10 分鐘及 15 分鐘，leptin 平均變化率均為下降，其值分別為：-8.95%、-7.66% 和 -18.71%。

II. 討論

由上述結果，可以發現受試者血漿中 leptin 之含量，於不同受試組別與不同刺激時間，幾乎均呈現下降之趨勢。Leptin 主要是由脂肪細胞所分泌之荷爾蒙，參與下視丘調節能量平衡的功能，作用機轉主要是抑制 NPY 於下視丘之表現，進而使食慾下降、減少攝食並增加交感神經活性且抑制副交感神經活性 (Mercer et al., 1997)，來維持能量與體重平衡。在本實驗中，具有刺激食慾潛力之 octenol 組符合此現象，於受試 5 分鐘、10 分鐘及 15 分鐘 leptin 含量均呈現下降之趨勢，與 NPY 含量之變化恰為相反。此結果正可以說明 octenol 具刺激食慾之潛力可能為：促進 NPY 之表現及抑制 leptin 表現所致。

然而，將老鼠暴露於香煙的環境中，可以發現其攝食量減少、體重下降，測量腦中的 NPY 濃度與血漿中的 leptin 濃度均呈現下降的趨勢。一直以來認為 leptin 與 NPY 濃度應呈現相反之關係，其功能應為相互拮抗作用。在此，作者推測應該是體重下降，使脂肪細胞減少進而影響 leptin 之濃度 (Chen et al., 2005 ; 2006)。可見 leptin 濃度不單單地表示一種生理現象。此外，Getchell 等學者 (2006) 及 Baly 等學者 (2007) 發現 leptin 可在嗅黏膜 (olfactory mucosa) 內合成與表現，其接受器與其接受器之異構體被發現存在於嗅覺之黏膜細胞、支持細胞和 subpopulation of maturing neurons。另有研究發現老鼠於禁食下會降低血漿中 leptin 之含量，但在嗅覺黏膜中卻發現 leptin mRNA 表現量增加。而後亦證實存在嗅覺內的 leptin 及其接受器可以調控嗅覺對氣味的靈敏性，進而強化預攝食行為 (pre-ingestive behavior)。並且，攝入營養狀態的不同也會改變嗅覺內瘦激素的表現 (Getchell et al., 2006 ; Baly et al., 2007)。由以上可知 leptin 受許多生理行為影響，難以從結果發現一致性之關係。

然而，存在於血漿中的 leptin 以單體 (free form, 16.7 kDa) 及蛋白質結合形式存在 (protein-bound, >70 kDa)，其現象可能使測量結果產生誤差 (Zeng et al., 1997)。除此之外，NPY 及 leptin 在血漿中的半衰期分別約為 12 分鐘 (Grouzmann et al., 2001)、24 分鐘 (Klein et al., 1996)，可見芳香療法促進的是當下之反應，無法持續很久。

由以上之整理方式，雖然可以看出一個整體上之趨勢，但易掩蓋了個體間實際變化之情況，故以下以各組分別陳述受試後血漿中 NPY、leptin 平均下降及上升之變化量及人數分佈



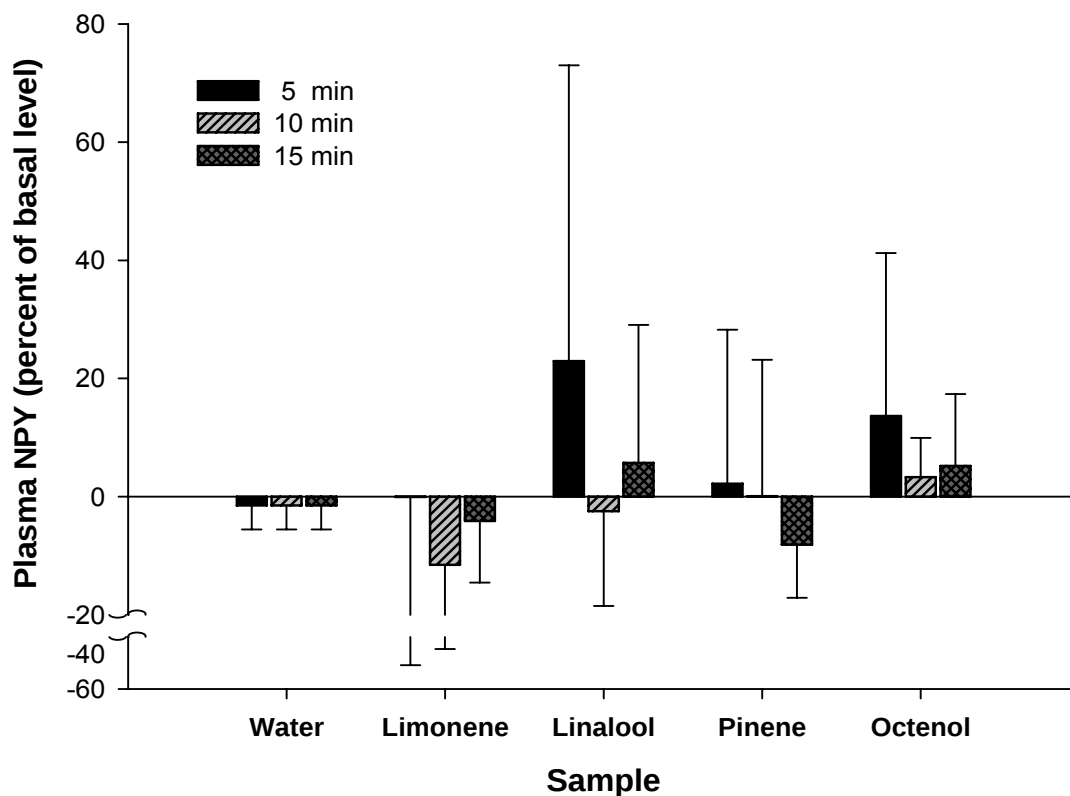


圖 5-24、給予各種香氣 5、10 及 15 分鐘後，受試者血漿中 NPY 含量之變化
以 ANOVA 作事前檢定及 Duncan 作事後變異性分析
(n=6, mean $\pm$ SD, $P < 0.05$)

Figure 5-24. Changes of plasma NPY concentration after stimulating with various spices for 5, 10, 15 min (n=6, mean $\pm$ SD, $P < 0.05$).

表 5-4 給予各種香氣 5、10 及 15 分鐘後，受試者血漿中 NPY 含量之變化

Table 5-4. Changes of plasma NPY concentration after stimulating with various spices for 5, 10, 15 min.

Plasma NPY (%)					
Sample/Time (min)	Water	Limonene	Linalool	Pinene	Octenol
5	-1.49	-0.06	22.93	2.20	13.67
10	-1.49	-11.54	-2.49	0.08	3.30
15	-1.49	-4.13	5.71	-8.13	5.21

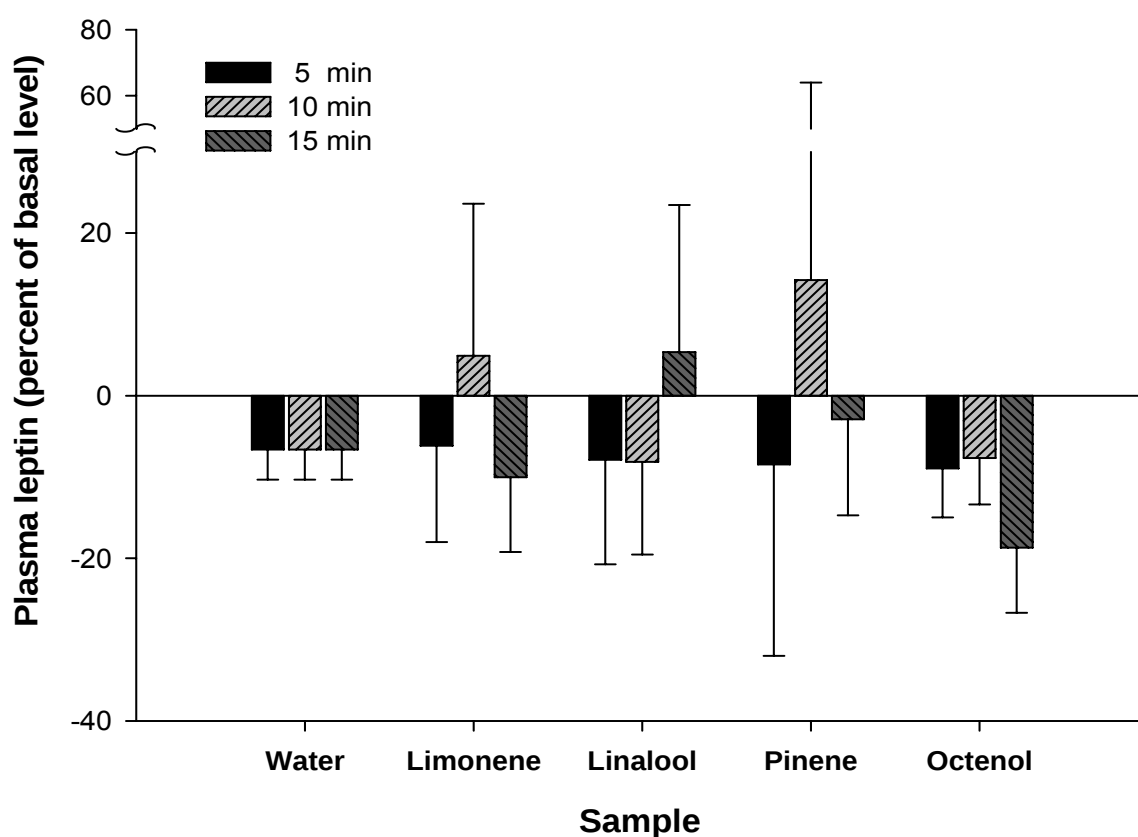


圖 5-25、給予各種香氣 5、10 及 15 分鐘後，受試者血漿中 leptin 含量之變化以 ANOVA 作事前檢定及 Duncan 作事後變異性分析 (n=6, mean $\pm$ SD, $P < 0.05$)

Figure 5-25. Changes of plasma leptin concentration after stimulating with various spices for 5, 10, 15 min (n=6, mean $\pm$ SD, $P < 0.05$).

表 5-5、給予各種香氣 5、10 及 15 分鐘後，受試者血漿中 leptin 含量之變化

Table 5-5. Changes of plasma leptin concentration after stimulating with various spices for 5, 10, 15 min.

Plasma Leptin (%)					
Sample/Time (min)	Water	Limonene	Linalool	Pinene	Octenol
5	-6.63	-6.15	-7.88	-8.47	-8.95
10	-6.63	4.91	-8.16	14.23	-7.66
15	-6.63	-10.02	5.37	-2.91	-18.71

2. 以各組分別探討受試後血漿中 NPY、leptin 平均下降及上升之變化量及人數分佈

藉由探討受試後血漿中 NPY、leptin 平均下降及上升之變化量及人數分佈來瞭解各組間實際變化之情況。其計算之方式：除控制組外，各試驗組分別統計其下降之平均百分率、人數及上升之平均百分率、人數。

(1) 受試後血漿中 NPY 平均下降及上升之變化量及人數分佈

以水作為控制組下，NPY 平均變化率為 -1.49%，人數為六人（如表 5-6）。觀察其他各組 NPY 上升及下降人數之分佈，可以發現 limonene 組，刺激 5 分鐘時，NPY 下降之幅度有 -29.85%、人數為四人；NPY 上升之幅度有 39.66%、人數為三人。10 分鐘時仍以 NPY 下降所占之人數較多為，平均下降 -22.05%、人數為五人；上升 14.65%、人數為兩人。在 15 分鐘時，NPY 下降 -11.63%、上升 5.88%；人數分佈為四人及三人。因此，在 limonene 組別不論是在 5 分鐘或 10 分鐘以及在 15 分鐘時 NPY 下降所占的人數均較 NPY 上升所占的人數多。反之，linalool 組，在 5、10 及 15 分鐘時，雖然 NPY 之下降及上升人數比例差不多，但 NPY 上升之百分率均較 NPY 下降之百分率高出許多，其中又以 5 分鐘時 NPY 上升之百分率達 51.70%。然而，pinene 組中，各時間點人數比例較高之分佈分別為：5 分鐘時以 NPY 上升為多（平均 18.49%）、10 分鐘時，NPY 上升及下降人數比例相同且百分率亦相當（-14.97%、14.48%）、15 分鐘時，則以下降人數占多數（-11.37%、五人）。在 octenol 組別中，不論刺激時間為何（5 分鐘、10 分鐘及 15 分鐘），NPY 平均上升百分比及人數分佈均較 NPY 下降百分比與人數為多，依序為：23.65%、四人；4.84%、四人和 9.77%、四人。其中又以刺激 5 分鐘時，NPY 上升最多。

(2) 受試後血漿中 leptin 平均下降及上升之變化量及人數分佈

以水作為控制組下，leptin 平均變化率為 -6.63%，人數為六人（如表 5-7）。觀察其他各組 leptin 上升及下降百分率、人數之分佈，實驗結果表現，不論是在 limonene、linalool 組別，還是在 octenol 組別中，受試後血漿中 leptin 經刺激 5 分鐘、10 分鐘及 15 分鐘後，均呈現下降所占得人數比例較多，又以 octenol 及 linalool 在 5 分鐘與 10 分鐘時下降所占人數為

多（分別為-10.96%、9.36% 五人；-12.48%、-12.10% 五人），並且，octenol 組在刺激 15 分鐘血漿中 leptin 均呈現下降之趨勢（-18.71% 六人）。其次為 limonene 在 5 分鐘時為 -11.0%、五人，10 分鐘： -9.73%、四人；15 分鐘： -12.45% 六人。然而，pinene 組，在受試後血漿中 leptin 之變化經刺激 5 分鐘、10 分鐘及 15 分鐘，其上升和下降所占得人數比例相當。

以此方式之計算方式，較可以呈現各組間受試者血漿中 NPY、leptin 真正變化之情況，以避免整體計算時相互消長而掩蓋實際變化之情況發生。



表 5-6. 各種香料物質刺激後血漿中 NPY 平均變化量及受試人數分佈

Table 5-6. Changes of plasma NPY and number of subjects being affected after stimulating with various spices.

Plasma NPY (%)						
Time/Sample	5 min		10 min		15min	
Water	-1.49		-1.49		-1.49	
n=	6		6		6	
Limonene	-29.85	39.66	-22.02	14.65	-11.63	5.88
n=	4	3	5	2	4	3
Linalool	-5.84	51.70	-18.88	5.71	-6.16	23.53
n=	3	3	3	4	3	2
Pinene	-30.38	18.49	-14.97	14.68	-11.37	8.10
n=	2	4	3	3	5	1
Octenol	-6.30	23.65	-3.33	4.84	-8.02	9.77
n=	2	4	2	4	2	4

表 5-7. 各種香料物質刺激後血漿中 leptin 平均變化量及受試人數分佈

Table 5-7. Changes of plasma leptin and number of subjects being affected after stimulating with various spices.

Plasma leptin (%)						
Time/Sample	5min		10min		15 min	
Water	-6.63		-6.63		-6.63	
n=	6		6		6	
Limonene	-11.00	5.96	-9.73	24.44	-12.45	4.49
n=	5	2	4	3	6	1
Linalool	-12.48	15.12	-12.10	11.61	-7.20	24.21
n=	5	1	5	1	3	2
Pinene	-23.14	6.20	-14.97	43.43	-12.23	6.40
n=	3	3	3	3	3	3
Octenol	-10.96	1.09	-9.36	0.82	-18.71	0
n=	5	1	5	1	6	0

3. 以各組依性別探討受試後血漿中平均 NPY、leptin 之變化

文獻結果指出大鼠在長時間高脂肪飲食下，依性別的不同，誘發不同調控食慾的因子來調控身體能量的不平衡（Schneider, 2006；Priego et al., 2009）。相關之研究結果亦顯示母鼠不論是在高脂肪或是高糖飲食下，體重增加之數值均高於公鼠（Eckel and Moore, 2004；Priego et al., 2008）；並且，母鼠於禁食下對於美食比公鼠易誘發強烈 orexigenic 之攝食行為（Gayle et al., 2006）。而在流行病學的研究結果指出女性比男性更易產生肥胖之疾病（Ogden et al., 2003）。可見，不同性別對於攝食調控因子之表現亦不同。故本研究亦將受試者分性別去探討經 5、10 及 15 分鐘受試者血漿中平均 NPY 及 leptin 之變化，結果闡述如下：

（1）將各組依性別探討受試後血漿中平均 NPY 之變化

結果如表 5-8，以水作為控制組下，NPY 平均變化率為 -1.49%。負控制組 limonene 實驗結果：男性比女性在受試 5 分鐘時，血漿中 NPY 之濃度先下降，分別為-8.19% 及 10.78%。然而，在 10、15 分鐘時，男性及女性血漿中 NPY 之含量均呈現下降之趨勢。在正控制組 linalool，男性在受試 5、10 及 15 分鐘時 NPY 含量呈現先上升後下降之趨勢，依序為 49.95%、0.06% 與-1.80%；相反地，女性 5、10 分鐘時先呈現下降而在 15 分鐘時血漿中 NPY 含量增加，依序為：-4.10%、-5.03% 及 16.98%。在試驗組 pinene 性別之區分對於血漿中 NPY 含量之變化較無一致性；另外，在試驗組 octenol，男性及女性在受試 5、10 及 15 分鐘血漿中 NPY 含量幾乎均呈現上升之趨勢，僅在女性 10 分鐘時有下降之現象。其中，在受試 5 分鐘時，男性、女性血漿中 NPY 之含量均上升最高。

（2）將各組依性別探討受試後血漿中平均 leptin 之變化

結果如表 5-9，以水作為控制組下，leptin 平均變化率為 -6.63%。負控制組 limonene 實驗結果顯示，男性及女性在受試 5 及 15 分鐘時血漿中 leptin 之濃度均呈現下降之趨勢；然而在 10 分鐘時，男性及女性血漿中 leptin 之含量則呈現上升之趨勢，且與 NPY 在 10 分鐘之結果呈現相反之現象。正控制組 linalool 則造成男性及女性在受試 5 分鐘時 leptin 含量均呈現下降之趨勢，但在 10、15 分鐘時較無特殊變化。而試驗組 pinene 性

別之區分對於血漿中 leptin 含量之變化亦無一致性；然而，在試驗組 octenol，男性及女性不論是在受試 5、10 及 15 分鐘血漿中 leptin 含量均呈現下降之趨勢，此部份結果與 NPY 之結果恰為相反。可知，在本實驗的研究結果，試驗中男性與女性對於 NPY 及 leptin 的表現趨勢並無一致性。

表 5-8. 依性別探討受試後血漿中平均 NPY 之變化

Table 5-8. Sex-associated differences in the plasma NPY.

NPY	5min		10min		15 min	
	Men	Female	Men	Female	Men	Female
water	-1.49		-1.49		-1.49	
Limonene	-8.19	10.78	-14.47	-7.63	-1.24	-7.98
Linalool	49.95	-4.10	0.06	-5.03	-1.80	16.98
Pinene	8.53	-10.44	-10.03	20.29	-5.60	-13.18
Octenol	2.42	36.15	0.56	-1.30	0.92	5.35

表 5-9. 依性別探討受試後血漿中平均 leptin 之變化

Table 5-9. Sex-associated differences in the plasma leptin.

Leptin	5min		10min		15 min	
	Men	Female	Men	Female	Men	Female
water	-6.63		-6.63		-6.63	
Limonene	-6.91	-5.15	5.91	3.59	-9.66	-10.52
Linalool	-8.72	-7.03	0.55	-16.85	1.24	11.56
Pinene	-15.64	5.88	24.26	-5.84	-2.99	-2.76
Octenol	-8.79	-9.29	-5.91	-11.17	-21.01	-14.12

4. 各受試者於受試後血漿中平均 NPY 及 leptin 之變化

人體實驗，個體差異性極大，茲將每一位受試者於 5、10 及 15 分鐘之試驗結果，詳整理如表 5-10~5-14 所示。此部份的研究結果，並不一一論述，只大略性地探討影響個體差異性之因子：

(1) 由問卷的觀察：

無法歸納問卷評估之因子與個體間受試後血漿中平均 NPY 及 leptin 之變化關係。

(2) 影響血漿 NPY 含量之因子：

- A. 處在壓力之環境會增加血漿中 NPY 之濃度 (Carrasco and Van de Kar, 2003; Morgan et al., 2000)
- B. 沮喪、憂鬱則會使血漿中 NPY 之濃度下降 (Czermak et al., 2008)
- C. BMI 值越高血漿中 NPY 濃度越高 (Baranowska et al., 1997)
- D. 越年長 (0~400 month) 血漿中 NPY 濃度越高 (Lin et al., 2007)
- E. 飢餓、飽足程度；暴露之環境；運動刺激交感神經活性使血漿中 NPY 濃度增加 (Morris et al., 1986)

(3) 影響血漿 leptin 含量之因子：

- A. 營養代謝階段 (nutritional status) (Getchell et al., 2006; Baly et al., 2007)、性別
- B. BMI 值越高血漿中 leptin 濃度越高 (Baranowska et al., 1997)
- C. leptin 在血漿中的含量與脂肪細胞的多寡、脂肪含量相關 (Bell et al., 2005; Chilliard et al., 2001)。人類脂肪組織產生 leptin 之速度為 $3.2 \pm 0.5 \text{ ng} \times 100 \text{ g}^{-1} \text{ fat min}^{-1}$ ，相似於大鼠 $3.6 \pm 1.2 \text{ ng} \times 100 \text{ g}^{-1} \text{ fat min}^{-1}$ ，故每人體內存在脂肪含量的多寡會影響 leptin 分泌之量 (Zeng et al., 1997)

(4) 個人對於香氣的感受性、認知不同 (Yeretzian et al., 2004)

(5) 個人生長之生活環境、記憶、學習過程等等相關

由上述可以知道，影響個體受試後血漿中 NPY、leptin 含量變化之因子相當地多，難以以一個解釋來概括。

表 5-10、 控制組，受試者血漿中 NPY 及 leptin 之含量變化

Table 5-10 . Changes of plasma NPY and plasma leptin in control group

<i>Water</i>	<i>Plasma NPY (%)</i>			<i>Plasma leptin (%)</i>		
No. of subjects	5 min	10min	15min	5 min	10min	15min
19	-4.86	-6.92	0.34	0.14	0.75	6.96
11	139.84	-10.97	-20.14	13.71	-12.86	-7.62
13	-23.96	-10.17	7.67	-28.79	12.47	-0.16
16	2.87	-14.14	4.28	-5.39	2.43	1.28
24	-37.82	15.48	16.96	-16.25	-6.89	-8.31
14	2.62	-31.82	46.55	-27.41	-24.51	-17.64

*控制組為水

表 5-11、 負控制組 limoene，受試者血漿中 NPY 及 leptin 之含量變化

Table 5-11 . Changes of plasma NPY and plasma leptin in limonene group

<i>Limonene</i>	<i>Plasma NPY (%)</i>			<i>Plasma leptin (%)</i>		
<i>No. of subjects</i>	5 min	10min	15min	5 min	10min	15min
31	-15.25	-35.92	-3.10	-6.39	17.76	-22.96
9	2.42	-0.40	2.386	-7.98	27.62	-15.06
17	-51.72	27.74	-13.95	-2.73	-10.64	-5.11
1	31.78	-49.32	9.69	-10.52	-11.12	4.49
6	-13.57	-9.14	5.56	11.62	27.92	-12.26
12	-38.86	1.57	-14.89	-27.37	-5.24	-15.81
22	84.77	-15.32	-14.59	0.31	-11.90	-3.47

表 5-12 正控制組 linalool，受試者血漿中 NPY 及 leptin 之含量變化

Table 5-12 . Changes of plasma NPY and plasma leptin in linalool group

<i>Linalool</i>	<i>Plasma NPY (%)</i>			<i>Plasma leptin (%)</i>		
No. of subjects	5 min	10min	15min	5 min	10min	15min
27	32.22	5.20	-2.62	-8.67	-4.70	-3.66
23	-2.62	-5.93	-3.27	-14.62	-5.27	-9.60
15	120.26	0.92	0.50	-2.88	11.61	16.98
8	-12.96	1.24	-	-21.18	-14.39	-
2	-1.96	15.49	-12.60	-15.04	-16.98	-8.33
14	2.62	-31.82	46.55	15.12	-19.18	31.45

-: 表示編號 8 號之受試者於試驗十五分鐘的實驗，退出試驗

表 5-13、試驗樣品 pinene，受試者血漿中 NPY 及 leptin 之含量變化

Table 5-13. Changes of plasma NPY and plasma leptin in pinene group

<i>Pinene</i>	<i>Plasma NPY (%)</i>			<i>Plasma leptin (%)</i>		
No. of subjects	5 min	10min	15min	5 min	10min	15min
21	17.17	-16.48	-11.42	6.85	14.37	0
26	25.43	-27.50	8.10	-5.38	5.61	8.18
25	23.80	4.78	-14.57	-10.05	-33.24	-3.61
7	-32.28	-0.93	-4.52	-53.98	110.32	-16.54
10	7.58	40.18	-9.68	1.37	-7.25	11.02
18	-28.47	0.41	-16.67	10.38	-4.43	-16.54

表 5-14、試驗樣品 octenol，受試者血漿中 NPY 及 leptin 之含量變化

Table 5-14 . Changes of plasma NPY and plasma leptin in octenol group

<i>Octenol</i>	<i>Plasma NPY (%)</i>			<i>Plasma leptin (%)</i>		
No. of subjects	5 min	10min	15min	5 min	10min	15min
29	17.36	14.66	6.97	1.09	-9.08	-19.16
5	4.92	-16.84	-11.63	-12.82	0.82	-29.51
32	-3.90	2.04	4.69	-12.29	-11.01	-16.52
3	-8.69	2.39	3.66	-11.13	-4.37	-18.84
20	5.44	-2.87	23.76	-4.30	-10.98	-23.75
4	66.87	0.26	-13.06	-14.28	-11.36	-4.49



(四) 以香料物質刺激 5、10 及 15 分鐘後受試者耳溫及血壓之變化

1. 受試者耳溫於受試前後之變化

觀察各組受試者於受試前、後（5、10 及 15 分鐘）耳溫之變化，並無發現顯著的變化（表 5-15）。

原因可能是受試時間短，難以看出此變化。根據文獻研究指出，予以小鼠 linalool 60 分鐘後，其體溫會有顯著降低之情況（Linck et al., 2008）。且予以小鼠葡萄柚精油及薰衣草精油後，結果分別使棕色脂肪組織之溫度升高及下降，作者推測其原因為予以香氣刺激後會改變小鼠之自律神經活性進而影響體溫（Shen et al., 2005；Shen et al., 2005）。相同研究團隊亦發現予以大鼠葡萄柚精油及薰衣草精油刺激 120 分鐘，在白天刺激時，葡萄柚精油會增加大鼠體溫及棕色脂肪組織之溫度；相反地，予以薰衣草精油則會降低大鼠體溫及棕色脂肪組織之溫度。然而，在夜晚進行相同實驗下則無此現象。

2. 受試者血壓於受試前後之變化

觀察各組受試者於受試前、後（5、10 及 15 分鐘）血壓之變化，並無發現有顯著之變化（如表 5-16）。

Tanida 等學者（2005）發現以葡萄柚精油（1/100 suspension）及其主成份 limonene（1/100 suspension）刺激大鼠嗅覺 10 分鐘，會使得大鼠之血壓上升。推測其原因為：藉由 H₁ receptor 在腦中 histaminergic 神經系統之作用所致。相反地，Saeki 及 Shiohara（2001）將薰衣草精油加入薰香燈的方式進行芳香療法，檢視九位健康女學生，研究結果指出：吸入薰衣草精油後，可使周邊血管擴張、血壓下降。但在本人體實驗中，並無發現此趨勢，其可能為刺激之濃度不夠影響所致。

表 5-15、以香料物質刺激受試者 5、10 及 15 分鐘後之耳溫變化

Table 5-15. Ear temperature of all subjects after stimulating with various spices for 5, 10 and 15 min.

耳溫 (°C)	<i>baseline</i>	<i>5 min</i>	<i>baseline</i>	<i>10 min</i>	<i>baseline</i>	<i>15 min</i>
water	35.7	35.7	35.8	35.7	35.6	35.9
Limonene	35.6	35.5	35.7	35.8	35.7	35.8
Linalool	35.8	35.8	35.9	36.0	36.0	36.0
Pinene	35.8	35.9	36.0	36.0	35.9	35.9
Octenol	35.8	35.9	35.9	36.0	36.0	36.0

表 5-16、以香料物質刺激受試者 5、10 及 15 分鐘後之血壓變化

Table 5-16. Blood pressure of all subjects after stimulating with various spices for 5, 10 and 15 min.

血壓 (mmgh) (收縮壓，舒張壓)	<i>Baseline</i>		<i>5 min</i>		<i>baseline</i>		<i>10 min</i>		<i>baseline</i>		<i>15 min</i>	
water	116.5	72.5	110.3	83.3	106.2	68.7	105.8	66.3	108.2	71.5	105.3	67.5
Limonene	111.0	70.4	104.9	69.4	111.4	66.4	111.6	70.6	105.3	66.1	105.4	70.0
Linalool	114.7	72.7	109.5	75.5	107.0	71.0	115.3	75.0	114.4	76.4	110.4	72.2
Pinene	117.3	73.3	116.2	81.3	113.8	68.7	108.7	71.3	110.8	75.0	107.0	69.5
Octenol	123.7	80.3	123.2	77.7	120.5	79.5	113.7	79.5	122.2	84.8	119.0	76.7

(五) 問卷結果與受試者血漿中 NPY 及 leptin 含量變化之相關性

本研究問卷之設計方式乃參考 Council on Nutrition appetite questionnaire (CNAQ)、the simplified nutritional appetite questionnaire (SNAQ) 及 the appetite, hunger and sensory perception questionnaire (AHSP)、TFEQ (three-factor eating questionnaire) (Wilson et al., 2005; Mathey et al., 2001; Karlsson et al., 2000)，並依據文獻的研究結果，加入香氣可能會影響生理功能之因子作為問卷之項目。本研究之問卷分成兩部份，分別是受試後當下之感受評估及受試後一星期中之食慾、心情及睡眠情況評估。結果計算之方式：是將受試後血漿中 NPY 及 leptin 之變化量和問卷作相關係數分析，以期發現箇中潛在之相關性。表之數據僅以決定係數表示 (r^2 : coefficient of determination)。

1. 受試 5min 問卷與受試者血漿中 NPY、leptin 含量變化之相關性

由表 5-22 詳列問卷每一個項目與受試者血漿中 NPY 及 leptin 含量變化之相關性。可以發現 limonene 組，做事的效率變好與受試者血漿中 NPY 有顯著地正相關性 ($p < 0.05$)。linalool 組，受試者血漿 leptin 含量之變化與問卷試驗讓身體覺得不適、做事的效率變好及一週都覺得精神奕奕，均具有顯著正相關性其中又以後者具有極顯著地正相關性 (分別為 $p < 0.05$, $p < 0.05$ 及 $p < 0.01$)。然而，在 pinene 組中，試驗後，心情有放鬆的感覺及試驗讓身體覺得不適分別與受試者血漿 NPY 和 leptin 含量變化具顯著負相關性 ($p < 0.05$)。octenol 組中，感覺想吃的慾望減少及一週都覺得精神奕奕，與受試者血漿 NPY 含量變化具顯著負相關性 ($p < 0.05$)。

受試 5min 之問卷與不同香氣之間有不同之相關性存在，亦存在相反地趨勢：試驗讓身體覺得不適在 linalool 組受試者血漿 leptin 含量之變化呈現顯著正相關；但在 pinene 組則為負相關性。octenol 組中，感覺想吃的慾望減少與受試者血漿 NPY 含量變化具顯著負相關性，結果符合本實驗之預期。但是，感覺想吃的慾望增加與受試者血漿 NPY 含量變化卻無顯著正相關性。在此部份之結果，難以加以歸納，亦可能為問卷設計不夠周詳、不夠具有代表性之緣故。

2. 受試 10 min 問卷與受試者血漿中 NPY 及 leptin 含量變化之相關性

參閱表 5-23，詳列問卷每一個項目與受試者血漿中 NPY 及 leptin 含量變化之相關性。在 limoene 組中，感覺想吃的慾望增加及感覺想吃的慾望減少分別與受試者血漿 NPY 含量變化具顯著負相關性及正相關性 ($p < 0.05$)，此部份之結果與文獻之結果相反，推測此問卷設計之方式不夠具有統計效果，也發現個人的感受性評估與血漿內 NPY 及 leptin 實際之變化不相符。在 pinene 組受試 10 min，試驗中心情有放鬆的感覺、試驗後心情愉悅及試驗後、心情有放鬆的感覺則與受試者血漿 NPY 含量變化具顯著負相關性 ($p < 0.05$)。然而，在 octenol 組中，受試者血漿 leptin 含量變化與有想攝食的感覺，及試驗後有嗜睡的感覺、排便變順暢，均存在極顯著地正相關性 ($p < 0.01$)。在 linalool 組，受試者血漿 NPY 及 leptin 含量變化與問卷結果無相關性。受試 10 min 部份之問卷，結果仍難以加以歸納。

3. 受試 15min 問卷與受試者血漿中 NPY、leptin 含量變化之相關性

由表 5-24 詳列問卷每一個項目與受試者血漿中 NPY、leptin 含量變化之相關性。在 limonene 組中，受試者血漿 NPY 含量變化與讓心跳有加速的感覺及試驗後精神變好具顯著正相關性 ($p < 0.05$, $p < 0.01$)，此部份符合實驗之預期。受試者血漿 leptin 含量變化則與試驗中心情有放鬆的感覺呈顯著負相關性 ($p < 0.05$)。Pinene 組中，問卷：試驗中有嗜睡的感覺與受試者血漿 NPY 含量變化呈顯著負相關性 ($p < 0.05$)；試驗後，不想攝食的感覺及睡眠品質變好，則與受試者血漿 NPY 含量變化呈顯著正相關性 ($p < 0.05$)。

由上述之結果，難以歸納一個結果來綜述，其可能由於問卷設計不夠適當或者是受試者人數少之緣故。

表 5-17、受試 5 分鐘問卷結果與受試者血漿中 NPY 及 leptin 含量變化之相關性

Table 5-17. Correlation of the different parameters in questionnaire and plasma NPY, leptin levels after treating with various spices for 5 min.

5min	Limonene		Linalool		Pinene		Octeno	
試驗後之評估	NPY	Leptin	NPY	Leptin	NPY	Leptin	NPY	Leptin
1.喜歡試驗之味道	0.022	0.3949	0.0032	0.0003	0.1417	0.2228	0.0157	0.0655
2.試驗讓身體覺得不適	0.0164	0.0017	0.0395	0.7664*	0.093	0.6469*	0.0075	0.0957
3.試驗讓心跳有加速的感覺	0.0006	0.005	0.2369	0.1405	0.0496	0.1205	0.0049	0.0814
4.試驗中，心情有放鬆的感覺	0.0048	0.0012	0.1446	0.3494	0.2429	0.0849	0.0019	0.15
5.試驗中，有嗜睡的感覺	0.0055	0.1122	0.0844	0.0837	0.0019	0.3123	0.1376	0.0678
6.試驗後，有想攝食的感覺	0.2149	0.0027	0.00007	0.1582	0.494	0.00003	0.215	0.1062
7.試驗後，不想攝食的感覺	0.0049	0.0534	0.1233	0.2563	0.3605	0.0868	0.0408	0.0007
8.試驗後，心情愉悅	0.0935	0.1769	0.0889	0.0091	0.3992	0.0004	0.0209	0.018
9.試驗後，心情有放鬆的感覺	0.1072	0.1905	0.0329	0.0941	0.7177*	0.2382	0.0027	0.017
10.試驗後，有嗜睡的感覺	0.0427	0.000008	0.2883	0.3515	0.3471	0.1338	0.0008	0.1478
11.試驗後，精神變好	0.0036	0.4723	0.0156	0.3324	0.3333	0.1539	0.2936	0.0062
一星期後之評估	NPY	Leptin	NPY	Leptin	NPY	Leptin	NPY	Leptin
1.感覺想吃的慾望增加	0.0107	0.129	0.0593	0.0744	0.0004	0.0039	0.0309	0.4303
2.感覺想吃的慾望減少	0.0448	0.3719	0.0593	0.0744	0.1903	0.1411	0.7297*	0.0654
3. 排便變順暢	0.0006	0.0046	0.1222	0.227	0.191	0.0041	0.3149	0.1251
4. 做事的效率變好	0.6608*	0.2259	0.0476	0.7894*	0.4639	0.3484	0.0244	0.0079
5.一週都覺得精神奕奕	0.0547	0.0373	0.0058	0.8776**	0.4914	0.4263	0.8063*	0.00006
6. 睡眠品質變好	0.1111	0.1366	0.1933	0.0045	0.61	0.0429	0.3577	0.0667

Values are Pearson's coefficient of determination

(r: correlation coefficient, r^2 : coefficient of determination)

* Significant correlation at $P < 0.05$

** Significant correlation at $P < 0.01$

- 代表相關性不存在

表 5-18、受試 10 分鐘問卷結果與受試者血漿中 NPY 及 leptin 含量變化之相關性

Table 5-18. Correlation of the different parameters in questionnaire and plasma NPY, leptin levels after treating with various spices for 10 min.

10 min	Limonene		Linalool		Pinene		Octeno	
*試驗後之評估	NPY	Leptin	NPY	Leptin	NPY	Leptin	NPY	Leptin
1.喜歡試驗之味道	-	-	0.0332	0.3127	0.0039	0.1433	0.0153	0.1309
2.試驗讓身體覺得不適	0.0839	0.0933	0.032	0.0174	0.0008	0.4837	0.2049	0.0452
3.試驗讓心跳有加速的感覺	0.282	0.23	0.0081	0.5122	0.0303	0.343	0.1336	0.1163
4.試驗中，心情有放鬆的感覺	0.3553	0.5036	0.0671	0.1376	0.672*	0.0652	0.1216	0.0024
5.試驗中，有嗜睡的感覺	0.5694	0.0922	0.3501	0.1123	0.066	0.0835	0.0792	0.0063
6.試驗後，有想攝食的感覺	0.2015	0.4219	0.14	0.374	0.5554	0.1137	0.1551	0.758**
7.試驗後，不想攝食的感覺	0.2637	0.0007	0.0541	0.1865	0.0183	0.085	0.0199	0.0023
8.試驗後，心情愉悅	0.0003	0.0128	0.0671	0.1376	0.724*	0.0447	0.001	0.0957
9.試驗後，心情有放鬆的感覺	0.0207	0.0044	0.0671	0.1376	0.712*	0.0288	0.0559	0.016
10.試驗後，有嗜睡的感覺	0.1651	0.0677	0.3373	0.056	0.2826	0.1686	0.2729	0.730**
11.試驗後，精神變好	0.4846	0.112	0.1775	0.001	0.5885	0.1977	0.0068	0.084
*一星期後之評估	NPY	Leptin	NPY	Leptin	NPY	Leptin	NPY	Leptin
1.感覺想吃的慾望增加	0.719*	0.1805	0.0131	0.5582	0.3381	0.1436	0.0037	0.0632
2.感覺想吃的慾望減少	0.692*	0.0475	0.0432	0.0129	0.2979	0.0239	0.0717	0.124
3. 排便變順暢	0.3865	0.2075	0.013	0.0719	0.1234	2.00E-06	0.1655	0.732**
4. 做事的效率變好	0.1628	0.0112	0.013	0.0719	-	-	0.0005	0.0722
5.一週都覺得精神奕奕	0.0316	0.4223	0.1355	0.2207	0.1295	0.0935	0.2741	0.0055
6. 睡眠品質變好	0.5327	0.0299	0.0802	0.0065	0.2499	0.1703	0.4327	0.057

Values are Pearson's coefficient of determination

(r: correlation coefficient, r^2 : coefficient of determination)

* Significant correlation at $P < 0.05$

** Significant correlation at $P < 0.01$

- 代表相關性不存在

表 5-19、受試 15 分鐘問卷結果與受試者血漿中 NPY 及 leptin 含量變化之相關性

Table 5-19. Correlation of the different parameters in questionnaire and plasma NPY, leptin levels after treating with various spices for 15 min.

15 min	Limonene		Linalool		Pinene		Octeno	
*試驗後之評估	NPY	Leptin	NPY	Leptin	NPY	Leptin	NPY	Leptin
1.喜歡試驗之味道	0.3182	0.1725	-	-	0.1188	0.1886	0.0009	0.0775
2.試驗讓身體覺得不適	0.0742	0.0125	0.2847	0.5233	0.029	0.3883	0.0824	0.2056
3.試驗讓心跳有加速的感覺	0.5793*	0.1179	0.0002	0.029	0.3106	0.2109	0.0002	0.0359
4.試驗中，心情有放鬆的感覺	0.1316	0.6096*	-	-	0.1233	0.0008	0.4704	0.0399
5.試驗中，有嗜睡的感覺	0.0251	0.0367	0.0504	0.0481	0.7036*	0.0623	0.4105	0.008
6.試驗後，有想攝食的感覺	0.3264	0.1504	0.0028	0.0291	0.1648	0.3815	0.0213	0.1543
7.試驗後，不想攝食的感覺	0.2453	0.4422	0.233	0.0081	0.7818*	0.2117	0.0163	0.0519
8.試驗後，心情愉悅	-	-	0.1922	0.1791	0.1233	0.0008	0.077	0.1982
9.試驗後，心情有放鬆的感覺	-	-	0.1922	0.1791	0.1251	0.1199	-	-
10.試驗後，有嗜睡的感覺	0.2233	0.0063	0.3516	0.0333	0.2959	0.0099	0.1337	0.2584
11.試驗後，精神變好	0.809**	0.0602	0.2251	7.00E-05	0.2959	0.0099	0.274	0.3909
*一星期後之評估	NPY	Leptin	NPY	Leptin	NPY	Leptin	NPY	Leptin
1.感覺想吃的慾望增加	0.327	0.007	0.114	0.366	0.019	0.054	0.094	0.289
2.感覺想吃的慾望減少	0.099	0.237	0.114	0.366	0.032	0.014	0.002	6.0E-05
3. 排便變順暢	0.003	0.017	-	-	0.451	-	0.01	0.017
4. 做事的效率變好	0.282	0.072	-	-	0.302	0.403	0.245	0.022
5.一週都覺得精神奕奕	0.06	0.112	0.569	0.644	0.635	0.099	0.359	0.002
6. 睡眠品質變好	0.038	0.408	0.194	0.097	0.73*	0.006	0.449	0.016

Values are Pearson's coefficient of determination

(r: correlation coefficient, r^2 : coefficient of determination)

* Significant correlation at $P < 0.05$

** Significant correlation at $P < 0.01$

- 代表相關性不存在

第六章 結論

以培養兩天大鼠嗅覺神經細胞經香料物質處理10分鐘，作為抑制或刺激NPY mRNA 表現的篩選平台。實驗結果發現，篩選之十三種香料物質中（香茅醛、香茅醇、香葉草醇、桉葉醇、methyl phenylacetate、麝香醇、香草醛、辣椒素、蒎烯、檸檬醛、薑黃素、Diallyl sulfide 與Diallyl disulfide），以麝香醇 (octenol)、蒎烯 (pinene) 及 methyl phenylacetate 能顯著地刺激嗅覺神經細胞表現 NPY mRNA。故在人體實驗之設計方面，則挑選麝香醇與蒎烯兩者刺激嗅覺細胞表現 NPY mRNA 較高表現量作為人體實驗之驗證。

人體實驗為分別予以下列香氣刺激受試者之嗅覺 5、10及15分鐘，並利用 ELISA immunoassay 之方法，測定受試者血漿內NPY與leptin含量之變化。以水作為控制組，檸檬油烯作為負控制組，正控制組為沈香醛，試驗樣品為麝香醇及蒎烯。此部份之實驗結果發現，予以檸檬油烯之負控制組中血漿內NPY含量之變化在10 min時下降最多(-11.54%)，顯示其具有抑制食慾之潛力。正控制組中，予以沈香醛之組別在5、10 分鐘均可增加血漿內NPY之含量(22.92%, 5.71%)；麝香醇之組別在5、10、15 分鐘之刺激下均可增加血漿內NPY之含量(13.67%, 3.29%, 5.21%)，則顯示 linalool和octenol 具有刺激食慾之潛力；但在蒎烯之組別中，血漿內NPY含量之變化較不明顯。可能由於血漿內leptin之變化易受多種生理因子影響，故其實驗結果缺乏一致性。此外，受試 5、10及15分鐘，受試者在血壓及耳溫之測量方面均無顯著改變。在問卷方面，受試者對於問卷因子之評估結果難以看出與血漿內NPY及leptin含量變化之關係性。

綜合而言，以大鼠嗅覺神經細胞之篩選平台，篩選的香料物質（pinene及octenol）經由人體實驗之驗證後，顯示octenol具有刺激食慾之潛力；此外，在動物實驗上已證實具有抑制及刺激食慾潛力之limonene、linalool，不管在本實驗嗅覺神經細胞表現NPY mRNA 的結果亦或是在人體實驗之結果，均分別顯示limonene及linalool分別具有抑制及刺激食慾之潛力。因此，在未來更可以利用此篩選平台，瞭解更多香料物質對於食慾的影響。

第七章 參考文獻

- 朱維。飼料香味技術全接觸。**2006**。中國畜牧獸醫網。
- 何毓倫。薰衣草、茉莉、洋甘菊、檀香或佛手柑精油吸入性芳香療法對心率變異度的影響。**2007**。南華大學碩士論文。
- 張文傑。誘引劑對於點帶石斑 (*Epinephelus coioides*) 腦內攝食調控基因表現、攝食與成長之影響。**2007**。海洋大學碩士論文。
- 傅書琴。香草醛預防及治療發炎性大腸症之研究。**2006**。中國醫藥大學基礎醫學碩士論文。
- 賈衛斌，胡波。碘化改性大蒜素的應用研究。**1997**。中國飼料。15-16頁。
- Almeida, R. N.; Navarro, D. S.; Barbosa-Filho, J. M. Plants with central analgesic activity. *Phytomedicine*. **2001**, 8, 310-322.
- Almeida, R. N.; Motta, S. C.; Leite, J. R. Óleos essenciais com propriedades anticonvulsivantes. Bol. Latinoam. *Caribe Plantas Med. Aromat.* **2003**, 2, 3-6.
- Almeida, R. N.; Motta, S. C.; Faturi, C. B. Catallani, B.; Leite, J. R. Anxiolytic-like effects of rose oil inhalation on the elevated plus-maze test in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2004**, 77, 361-364.
- Aoshima, H.; Hamamoto, K. Potentiation of GABA_A receptors expressed in *Xenopus* oocytes by perume and phytoncid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1999**, 63, 743-748.
- Anand, B. K.; Brobeck, J. R. Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale Journal of Biology & Medicine*. **1951**, 24, 123-140.
- Ammar, A. A.; Sederholm, F.; Saito, T. R.; Scheurink, A. J.W.; Johnson, A. E.; Sodersten, P. NPY-leptin: opposing effects on appetitive and consummatory ingestive behavior and sexual behavior. *Am. J. Physiol.* **2000**, 278, 1627-1633.
- Balasubramaniam, A. Clinical potentials of neuropeptide Y family of hormones. *The American Journal of Surgery*. **2002**, 183, 430-434.
- Balasubramaniam, A. Neuropeptide Y family of hormones: Receptor subtypes and antagonists. *Peptides*. **1997**, 18, 445-457.
- Baldo, B. A.; Daniel, R. A.; Berridge, C.W., Kelley, A. E. Overlapping distribution of orexin/hypocretin- and dopamine-beta-hydroxylase immunoreactive fibers in rat brain regions mediating arousal, motivation, and stress. *J. Comp. Neurol.* **2003**, 464, 220-237

- Baly, C.; Aioun J.; Badonnel, K.; Lacroix, M. C.; Durieux, D.; Schlegel, C.; Salesse, R.; Caillol, M. Leptin and its receptors are present in the rat olfactory mucosa and modulated by the nutritional status. *Brain research* **2007**, *1129*, 130-143.
- Bajpai, V. K.; Dung, N. T.; Kwon, O. J.; Sun, C. K. Analysis and the potential applications of essential oil and leaf extracts of *Silene armeria L.* to control food spoilage and food-borne pathogens. *Eur Food Res Technol.* **2008**, *227*, 1613-1620.
- Baranowska, B.; Wasilewska-Dziubinska, E.; Radzikowska, M.; Ptonowski, A.; Roguski, K. Neuropeptide Y, galanin and leptin release in obese women and in women with anorexia nervosa. *Metabolism.* **1997**, *46*, 1384-1389.
- Barber, P. C.; Dahl, D. Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-like immunoreactivity in normal and transected rat olfactory nerve. *Exp. Brain Res.* **1987**, *65*, 681-685.
- Barnett, S. C.; Hutchins, A. M.; Noble, M. Purification of olfactory nerve ensheathing cells from the olfactory bulb. *Dev. Biol.* **1993**, *155*, 337-350.
- Barsh, G. S.; Schwartz, M. W. Genetic approaches to studying energy balance: Perception and integration. *Nature reviews.* **2002**, *3*, 589-600.
- Baskin, D.G.; Breininger, J. F.; Schwartz, M. W. Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. *Diabetes.* **1999**, *48*, 828-833.
- Bates, S. H.; Dundon, T. A.; Seifert M. LRB-STAT3 signaling is required for the neuroendocrine regulation of energy expenditure by leptin. *Diabetes* **2004**, *53*, 3067-73.
- Bedoui, S.; Kawamura, N.; Straub, R. H.; Pabst, R.; Yamamura, T.; von Hörsten, S. Relevance of neuropeptide Y for the neuroimmune crosstalk. *J. Neuroimmunol.* **2003**, *134*, 1-11.
- Bell, C. G.; Walley, A. J.; Froguel, P. The genetics of human obesity. *Genetic.* **2005**, *6*, 221-232.
- Benoit, S. C.; Clegg, D. J.; Wood, S. C.; Seeley, R. J. The role of previous exposure in the appetitive and consummatory effects of orexigenic neuropeptide. *Peptides.* **2005**, *26*, 751-757.
- Billington, C. J.; Briggs, J. E.; Grace, M.; Levine, A. S. Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. *American Journal of Physiology.* **1991**, *260*, 321-327.

- Billington, C. J.; Briggs, J. E.; Harker, S.; Grace, M.; Levine, A. S. Neuropeptide Y in hypothalamic paraventricular nucleus: A center coordinating energy metabolism. *American Journal of Physiology*. **1994**, *266*, 1765-1770.
- Bode, A. M.; Ma, W. Y.; Surh, Y. J.; Dong, Z. Inhibition of epidermal growth factor-induced cell transformation and activator protein 1 activation by ginger. *Cancer Res*. **2001**, *61*, 850-853.
- Boyd, J. G.; Doucette, R.; Kawaja, M. D. Defining the role of olfactory ensheathing cells in facilitating axon remyelination following damage to the spinal cord. *The FASEB Journal* **2005**, *19*, 694-703.
- Buck, L.; Axel, R. A novel multigene family may encode odorant receptors, a molecular basis for odor recognition. *Cell* **1991**, *65*, 175-187.
- Brogden, K. A.; Guthmiller, J. M.; Salzet, M.; Zasloff, M. The nervous system and innate immunity: the neuropeptide connection. *Nature Immunology*. **2005**, *6*, 558-564.
- Bray, G. A.; Oomura, Y.; Tarui, S.; Inoue, T.; Shimazu E. The MONALISA hypothesis: most obesities known are low in sympathetic activity. *Progress in Obesity Research*. **1990**, *53*, 61-66.
- Caillol, M.; Aioun, J.; Baly, C.; Persuy, M. A.; Salesse, R. Localization of orexins and their receptors in the rat olfactory perception by a neuropeptide synthesized centrally or locally. *Brain Res*. **2003**, *960*, 48-61.
- Carlson, N. R. *Physiology of behavior*, 4th ed. U.S.A.: Allyn and Bacon. **1991**, 401-433.
- Carrasco, G. A.; Van de Kar, L. D. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, *463*, 235-272.
- Cerdá-Reverter, J. M.; Larhammar, D. Neuropeptide Y family of peptides: structure, anatomical expression, function, and molecular evolution. *Biochem. Cell Biol.* **2000**, *78*, 371-392.
- Chance, W. T.; Balasubramaniam, A.; Dayal, R. Hypothalamic concentration and release of neuropeptide Y into the microdialysates is reduced in anorectic tumor-bearing rats. *Life Sciences*. **1994**, *54*, 1869-1874.
- Chen, H.; Vlahos, R.; Bozinovski, S.; Jones, J. .; Anderson, G. P.; Morris, M. J. Effect of short-term cigarette smoke exposure on body weight, appetite and brain

- neuropeptide Y in mice. *Neuropsychopharmacology*. **2005**, *30*, 713-719.
- Chen, H.; Hansen, M. J.; Jones, J. E.; Vlahos, R.; Bozinovski, S.; Anderson, G. P.; Morris, M. J. Cigarette smoke exposure reprograms the hypothalamic neuropeptide Y axis to promote weight loss. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2006**, *173*, 1248-1254.
- Chowdhury, B.; Mukhopadhyay, S.; Bhattacharayay, D.; De, A. K. Capsaicin, a unique anti-oxidant, anti-inflammatory, analgesic compound with antifungal activity against dermato- phytes. *Med. Sci. Res.* **1996**, *24*, 669-670.
- Clark, J. T.; Kalra, P. S.; Crowley, W. R. Kalra, S. P. Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats . *Endocrinology*. **1984**, *115*, 427-429.
- Colmers, W. F.; Wahlested, C. The biology of neuropeptide Y and related peptides, humana press. Totawa, *NJ*. **1993**, 564 pp.
- Considine, R. V. Regulation of leptin production. *Rev Endocr Metab Disord* **2001**, *2*, 357-363.
- Czermak, C.; Hauger, R.; Drevets, W. C.; Luckenbaugh, D. A.; Geraci, M.; Charney, D. S.; Neumeister, A. Plasma NPY concentrations during trptophan and sham depletion in medication-free patients with remitted depression. *J. Affective Disorders*. **2008**, *110*, 277-281.
- Date, Y.; Ueta, Y.; Yamashita, H.; Yamaguchi, H.; Matsukura, S.; Kangawa, K.; Sakurai, T.; Yanagisawa, M.; Nakazato, M. Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc. Natl. Acad.Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 748-753.
- deLecea, L.; Kilduff, T. S.; Peyron, C.; Gao, X.; Foye, P. E.; Danielson, P. E.; Fukuhara, C.; Battenberg, E. L.; Gautvik, V. T.; Bartlett, F. S.; Frankel, W. M.; Sutcliffe, J. G. The hypocretins: hypotjalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 322-327.
- Dryden, S.; Pickavance, L.; Frankish, H. M.; Williams, G. Increased neuropeptide Y secretion in the hypothalamic paraventricular nucleus obese (*fa/fa*) Zucker rats. *Brain Research*. **1995a**, *690*, 185-8.
- Doucette, R. PNS-CNS transition zone of the first cranial nerve. *J. Comp. Neurol.* **1991**, *312*, 451-466.
- Doucette, R. Glial cells in the nerve fiber layer of the main olfactory bulb of embryonic

- and adult mammals. *Microsc. Res. Technique* **1993**, 24, 113-130.
- Dube, M. G.; Kalra, P. S.; Crowley, W. R.; Kalra, S. P. Evidence of physiological role for neuropeptide Y in ventromedial hypothalamic lesion-induced hyperphagia. *Brain Research*. **1995**, 690, 275-278.
- Ebihara, T. M. D. ; Ebihara, S. M. D.; Maruyama, M. M. D; Kobayashi, M. B. S.; Itou, A. B. S.; Arai, H. M. D.; Sasaki, H. M. D. A randomized trial of olfactory stimulation using black pepper oil in older people with swallowing dysfunction. *J Am Geriatr Soc*. **2006**, 54, 1401-1406.
- Egawa, M.; Yoshimatsu, H.; Bray, G. Neuropeptide Y suppresses sympathetic activity to interscapular brown adipose tissue in rats. *American Journal of Physiology*. **1991**, 260, 328-334.
- Elmqvist, J. K.; Elias, C. F.; Saper, C. B. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron*. **1999**, 22, 221-232.
- Erickson, J. C.; Hollopeter, C.; Palmiter, R. D. Attenuation of the obesity syndrome of *ob/ob* mice by the loss of neuropeptide Y. *Science*. **1996**, 274, 1704-1707.
- Eriksson, K. A.; Levin, J. O.; Sandstrom, T.; Lindstrom-Espeling, K. Linden, G.; Stjernberg, N. L. Terpene exposure and respiratory effects among workers in Swedish joinery shops. *Scand. J. Work Env. Hea*. **1997**, 23: 114-120.
- Essed, N. H.; van Staveren, W. A.; Kok, F. J.; de Graaf, C. No effect of 16 weeks flavor enhancement on dietary intake and nutritional status of nursing home elderly. *Appetite*. **2007**, 48, 29-36.
- Falk, A. A.; Hagberg, M. T.; Lof, A. E.; Wigaeus-Hjelm, E. M.; Wang, Z. P. Uptake, distribution, and elimination of alpha-pinene in man after exposure by inhalation. *Scand. J. Work Env. Hea*. **1990**, 16, 372-378.
- Fitzgerald, D. J.; Stratford, M.; Narbad, A. Analysis of the inhibition of food spoilage yeasts by vanillin. *Int. J. food Microbiol*. **2003**, 86, 113-122.
- Fugh-Berman, A.; Kronenberg, F. Complementary and alternative medicine (CAM) in reproductive-age women: a review of randomized controlled trials. *Reprod Toxicol*. **2003**, 17, 137-152.
- Fuhrman B, Rosenblat, M.; Hayek, T.; Coleman, R.; Aviram, M. Ginger extract consumption reduces plasma cholesterol inhibits LDL oxidation and attenuates development of atherosclerosis in atherosclerotic, apolipoprotein E-deficient mice.

- J Nutr.* **2000**, *130*, 1124-1131.
- Getchell, T. V.; Kwong, K.; Saunderson, C. P.; Stromberg, A. J.; Getchell, M. L. Leptin regulates olfactory-mediated behavior in ob/ob mice. *Physiol. Behav.* **2006**, *87*, 848-856.
- Glod, R. M. Hypothalamic obesity: The myth of the ventromedial nucleus. *Science.* **1973**, *182*, 488-490.
- Godfrey, H. Biological perspectives for healthcare. *Churchill Livingstone*, New York **2004**, pp. 78.
- Goodman, M. N.; Silver, J.; Jacobberger, J. W. Establishment and neurite outgrowth properties of neonatal and adult rat olfactory bulb glial cell lines. *Bruin Res.* **1993**, *619*, 199-213.
- Gong, Q.; Bailey, M. S.; Pixley, S. K.; Ennis, M.; Liu, W.; Shipley, M. T. Localisation and regulation of low affinity nerve growth factor receptor expression in the rat olfactory system during development and regeneration. *J. Comp. Neurol.* **1994**, *344*, 33-348.
- Graziadei, P.; Monti Graziadei, G.A. The olfactory system: A model for the study of neurogenesis and axon regeneration in mammals. *Neuronal Plasticity*. C.W. Cotman, ed. Raven Press, New York. **1978**, pp.131-153.
- Grouzmann, E.; Fathi, M.; Gillet, M.; de Torrente, A.; Cavadas, C.; Brunner, H.; Buclin, T. Disappearance rate of catecholamines, total metanephrines, and neuropeptide Y from the plasma of patients after resection of pheochromocytoma. *Clin Chem.* **2001**, *47*, 1075-1082.
- Hansel, D. E.; Eipper, B. A.; Ronnett, G. V. Neuropeptide Y functions as a neuroproliferative factor. *Nature.* **2001**, *410*, 940-944.
- Hara, J.; Beuckmann, C. T.; Nambu, T.; Willie, J. T.; Chemelli, R. M.; Sinton, C. M.; Sugiyama, F.; Yagami, K.; Goto, K.; Yanagisawa, M.; Sakurai, T. Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron* **2001**, *30*, 345-354.
- Higuchi, H.; Yang, H.T. ; Sabol, S.L. Rat neuropeptide Y precursor gene expression. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 6288-6295.
- Holness, M. J.; Munns, M. J.; Sugden, M. C. Current concepts concerning the role of leptin in reproductive function. *Mol. Cell Endocrinol* **1999**, *157*, 11-20.

- Huang, M. T.; Ma W.; Lu Y. P.; Chang, R. L.; Fischer, C.; Manchand, P. S. Effect of curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin and tetrahydrocurcumin on TPA-induced tumor promotion. *Carcinogenesis*. **1995**, *16*, 2493–2497.
- Inoue, N.; Kuroda, K.; Sugimoto, A.; Kakuda, T.; Fushiki, T. Autonomic nervous responses according to preference for the odor of jasmine tea. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **2003**, *67*, 1206-1214.
- Inui, A. Neuropeptide Y feeding receptors-Are multiple subtypes involved? *Trends in Pharmacological Sciences*. **1999**, *20*, 43-46.
- Inui, A. Transgenic approach to the study of body weight regulation. *Pharmacological Reviews*. **2000**, *52*, 35-55.
- Ishihara, A.; Tanaka, T.; Kanatani, A.; Fukami, T.; Ihara, M.; Fukuroda, T. A potent neuropeptide Y antagonist, 1229U91: suppressed spontaneous food intake in Zucker fatty rats. *American Journal of Physiology*. **1998**, *274*, 1500-1504.
- Jin, K. S.; Jun, M.; Park, M. J.; Ok, S.; Jeong, J. H.; Kang, H. S.; Jo, W. K.; Lim, H. J.; Jeong, W. S. Promises and Risks of Unsaturated Volatile Organic Compounds: Limonene, Pinene, and Isoprene. *Food Sci. Biotechnol.* **2008**, *17*, 447 – 456.
- Julgal, S.; Govinden, R.; Odhav, B.; Spice oils for the control of co-occurring mycotoxin-producing fungi. *J of Food Protect.* **2002**, *65*, 683-687.
- Kalra, P. S.; Bube, M. G.; Xu, B.; Kalra, S. P. Increased receptor sensitivity to neuropeptide Y in the hypothalamus may underlie transient hyperphagia and body weight gain. *Regulatory Peptides*. **1997**, *72*, 121-130.
- Kalra, S. P.; Bube, M. G.; Pu, S.; Xu, B.; Horvath, T. H.; Kalra, P. S. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocrine Review*. **1999**, *20*, 68-100.
- Kanatani, A.; Ishihara, A.; Asahi, S.; Tanaka, T.; Ozaki, S.; Ihara, M. A potent neuropeptide Y Y1 receptor antagonist, 1229U91: blockade of neuropeptide Y-induced and physiological food intake. *Endocrinology*. **1996**, *137*, 3177-3182.
- Karlberg, A. T.; Boman, A.; Melin, B. Animal experiments on the allergenicity of d-limonene-the citrus solvent. *Ann. Occup. Hyg.* **1991**, *35*, 419-426.
- Karlsson, J.; Persson, L. O.; Sjostrom, L.; Sullivan, M. psychometric properties and factor structure of the three-factor eating questionnaire (TFEQ) in obese men and women. Results from the Swedish obese subjects (SOS) study. *International J*

- Obesity*. **2000**, *24*, 1715-1725.
- Karpouhtsis, I.; Pardali, E.; Feggou, E.; Kokkini, S.; Scouras, Z. G.; Mavragani-Tsipidou, P. Insecticidal and genotoxic activeities of oregano essential oils. *J Agric Food Chem*. **1998**, *46*, 1111-1115.
- Kempaiah, R. K.; Srinivasan, K. Integrity of erythrocytes of hypercholesterolemic rats during spices treatment. *Mol Cell Biochem*. **2002**, *236*, 155–161.
- Kleijnen, J.; Knipschild, P.; Terriet, G. Garlic, onions and cardiovascular risk factors. A review of the evidence from human experiments with emphasis on commercially available preparations. *Br. J. clin. Pharmacol*. **1989**, *28*, 535-544.
- Kobeissy, F. H.; Jeung, J. A.; Warren, M. W.; Geier, J. E.; Gold, M. S. Changes in leptin, ghrelin, growth hormone and neuropeptide-Y after an acute model of MDMA and methamphetamine exposure in rats. *Addiction Biology*. **2007**, *13*, 15-25.
- Komiya, M.; Takeuchi, T.; Harada, E. Lemon oil apor causes an anti-stress effect via modulating the 5-HT and DA activities in mice. *Behavioural Brain Research* **2006**, *172*, 240-249.
- Larsen, S. T.; Hougaard, K. S.; Hammer, M.; Alarie, Y.; Wolkoff, P. Clausen, P. A.; Wilkins, C. K.; Nielsen, G. D. Effects of R-(+)- and S-(-)-limonene on the respiratory tract in mice. *Hum. Exp. Toxicol*. **2000**, *19*, 457-466.
- Lee, R. G.; Rains, T. M.; Tovar-Palacio, C.; Beverly, J.L.; Shay, N. F. Zinc deficiency increases hypothalamic neuropeptide Y and neuropeptide Y mRNA levels and does not block neuropeptide Y-induced feeding in rats, *J. Nutr*. **1998**, *128*, 1218-1223.
- Lin, L. C.; Lin, H. S.; Yang, R. C. Neuropeptide Y gene polymorphism and plasma neuropeptide Y level in febrile seizure patients in Taiwan. *Kaohsiung J. Med. Sci*. **2007**, *23*, 560-566.
- Lynch, W. C.; Hart, P.; Babcock, A. M.; Neuropeptide Y attenuates satiety-evidence from a detailed analysis of patterns of ingestion. *Brain Res*. **1994**, *636*, 28-34.
- Maggi, F.; Bilek T.; Lucarini, D.; Papa, F.; Sagratini, G.; Vittori, S. Melittis melissophyllum L. subsp. melissophyllum (Lamiaceae) from central Italy: A new source of a mushroom-like flavour. *Food Chem*. **2009**, *113*, 216-221.
- Mathey, M. F.; Siebelink, E.; de Graaf, C.; van Staveren W. A. Flavor enhancement of

- food improves dietary intake and nutritional status of elderly nursing home residents. *J. Gerontology: Medical sciences*. **2001**, 56A, M200-M205.
- Mari, M.; Bertolini, P.; Pratella, G. C. Non-conventional methods for the control of post-harvest pear disease. *J of Appli Microbio*. **2003**, 94, 761-766.
- Megerdichian, C. L.; Rees, V. W.; Wayne, G. F.; Connolly, G. N. Inetrnal tobacco industry research on olfactory and trigeminal nerve response to nicotine and other smoke components. *Nicotine & Tobacco Research*. **2007**, 11, 1119-1129.
- Mercer, J. G.; Moar, K. M.; Rayner, D. V.; Trayhurn, P.; Hoggard, N. Regulation of leptin receptor and NPY gene expression in hypothalamus of leptin-treated obese (ob/ob) and cold-exposed lean mice. *FEBS Lett*. **1997**, 402, 185-188.
- Michel, M.; Beck-Sickinger, A.; Cox, H.; Doods, H. N.; Herzog, H.; Larhammar, D.; Quiroon, R.; Schwartz, T.; Westfall, T. International of pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors. *Pharmacological Reviews*. **1998**, 50, 143-149.
- Misaki, N.; Higuchi, H.; Yamagata, K.; Miki, N. Identification of glucocorticoid responsive elements_GREs.at far upstream of rat NPY gene. *Neurochem. Int*. **1992**, 21, 185-189.
- Misra, M.; Miller, K. K.; Kuo, K.; Griffin, K.; Stewart, V.; Hunter, E.; Herzog, D. B.; Klibanski, A. Secretory dynamics of leptin in adolescent girls with anorexia nervosa and healthy adolescents. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **2005**, 289, E373-E381.
- Morgan III, C. A.; Wang, S.; Southwick, S. M.; Rasmusson, A.; Hazlett, G.; Hauger, R. L.; Charney, D. S. Plasma neuropeptide-Y concentration in human exposed to military survival training. *Biol. Psychiatry*. **2000**, 47, 902-909.
- Morris, M. J.; Russel, A. E.; Kapoor, V.; Cain, M. D.; Elliott, J. M.; West, M. J.; Wing, L. M. H.; Chalmers, J. P. Increases in plasma neuropeptide Y concentrations during sympathetic activation in man. *J Auton Nerv Syst*. **1986**, 17, 143-149.
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. **1983**, 65, 55-63.
- Mullett, M. A.; Billington, C. J.; Levine, A. S.; Kotz, C. M. Hypocretin 1 in the lateral hypothalamus activates key feeding-regulatory brain sites. *Neuroreport*. **2000**, 11, 103-108.

- Münzberg, H.; Björnholm, M.; Bates, S. H.; Myers, Jr M. G. Leptin receptor action and mechanisms of leptin resistance. *Cell Mol Life Sci.* **2005**, *62*, 642–52.
- Nam, S. U.; Kratzsch, J.; Kim, K. W.; Kim, K. R.; Lim, S. K.; Marcus, C. Cerebrospinal fluid and plasma concentrations of leptin, NPY, and α -MSH in obese woman and their relationship to negative energy balance. *J. Clin. Endocrinol. Metabolism.* **2001**, *86*, 4849-4853.
- Nijjima, A.; Nagai, K. Effect of Olfactory stimulation with flavor of grapefruit oil and lemon oil on the activity of sympathetic branch in the white adipose tissue of the epididymis. *Exp. Biol. Med.* **2003**, *228*, 1190-1192.
- Özcan, M. M.; Chalchat, J. C. Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey. *International J. of Food Sciences and Nutrition* **2008**, *59*, 691-698.
- Passi, S. Cosmetic formulations comprising lipids, antioxidants, anti-inflammatory, and anti-free-radical agents PCT. *Int Appl.* **2002**, *16*, WO0226207.
- Pessoa, L. M.; Morais, S. M.; Bevilacqua, C. M. L.; Luciano, J. H. S. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. *Veter Parasito.* **2002**, *109*, 59-63.
- Peyron, C.; Tighe, D. K.; Van den Pol, A. N.; deLecea, L.; Heller, H. C.; Sutcliffe, J. G.; Kilduff, T. S. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J. Neurosci.* **1998**, *18*, 9996-10015.
- Pin, M.; Yoshio, K.; Atsushi, I. Hiroshi S, Susumu K, Takashi, N. The herbal medicine Dai-kenchu-to and one of its active components [6] -shogaol increase intestinal blood flow in rats. *Life Sci.* **2002**, *70*, 2061-2070.
- Pixley, S. K. The olfactory nerve contains two populations of glia, identified both in vivo and in vitro. *Glia* **1992**, *5*, 269-284.
- Polidori, C.; Ciccocioppo, R.; Regoli, D.; Maggi, M. Neuropeptide Y receptors mediating feeding in the rat: characterization with antagonists. *Peptides.* **2000**, *21*, 29-35.
- Ponce-Monter, H.; Campos, M. G.; Pérez, S.; Pérez, C.; Zavala, M.; Macías, A.; Oropeza, M.; Cárdenas, N. Chemical composition and antispasmodic effect of *Casimiroa pringlei* essential oil on rat uterus. *Fitoterapia* **2008**, *79*, 446-450.
- Purves, D. Neuroscience. Sunderland, Mass. 4th. 1997.

- Prashar, A.; Locke, I. C.; Evans, C. S. Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. *Cell prolif.* **2004**, *37*, 221-229.
- Priego, T.; Sanchez, J.; Pico, C.; Palou, A. Sex-associated differences in the leptin and ghrelin systems related with the induction of hyperphagia under high-fat diet exposure in rats. *Hormones and Behavior.* **2009**, *55*, 33-40.
- Quintans-Júnior, L. J.; Souza, T. T.; Leite, B. S.; Lessa, N. M. N.; Bonjardim, L. R.; Santosa, M. R. V.; Alves, P. B.; Blank, A. F.; Antoniolli, A. R. Phytochemical screening and anticonvulsant activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) leaf essential oil in rodents. *Phytomedicine* **2008**, *15*, 619-624.
- Raghavan, S. Handbook of Spices, Seasonings, and Flavorings Second edition. *Taylor & Francis.* **2007**.
- Rosenberg, C.; Liukkonen, T.; Kallas-Tarpila, T.; Ruonakangas, A.; Ranta, R.; Nurminen, M.; Welling, I.; Jappinen, P. Monoterpene and wood dust exposures: Work-related symptoms among Finnish sawmill workers. *Am. J. Ind. Med.* **2002**, *41*, 38-53.
- Ruitenbergh, M. J.; Vukovic, J.; Sarich, J.; Busfield, S. J.; Plant, G. W. Olfactory ensheathing cells: characteristic, genetic engineering, and therapeutic potential. *J. Neurotrauma* **2006**, *23*, 468-478.
- Rutkowski, N. J.; Fitch, C. A.; Carden, Y. E.; Dodge, J.; Trombley, P. Q.; Levenson, C. W. Regulation of neuropeptide Y mRNA and peptide concentrations by copper in rat olfactory bulb. *Molecular Brain Research* . **1999**, *65*, 80-86.
- Sayers, B. M. (1973). Analysis of heart rate variability. *Ergonomics*, *16*(1), 17-32.
- de Lecea, L.; Kilduff, T. S. ; Peyron, C. The hypocretins : hypothalamus specific peptides with neuroexcitatory activity. *J. Proc Natl Aca Sci.* **1998**, *95*(1), 322 - 327.
- Saeki, Y. The effect of foot-bath with or without the essential oil of lavender on the autonomic nervous system: a randomized trial. *Complementary Therapies in Medicine* **2000**, *8*, 2-7.
- Saeki, Y.; Shiohara, M. Physiological effects of inhaling fragrances. *International Journal of aromatherapy* **2001**, *11*, 118-125.
- Sakurai T.; Amemiya, A.; Ishii, M.; Matsuzaki, I.; Chemelli, R. M.; Tanaka, H.;

- Williams, S. C.; Richardson, J. A.; Kozlowski, G. P.; Wilson, S.; Arch, J. R.S.; Buckingham, R. E.; Haynes, A. C.; Carr, S. A.; Annan, R. S.; McNulty, D. E.; Liu, W. S.; Terrett, J. A.; Elshourbagy, N. A.; Bergsma, D. J. ; Yanagisawa, M. Orexins and orexin receptors : a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*. **1998** , 92, 573-585.
- Sakurai, T. Roles of orexins in regulation of feeding and wakefulness. *Neuroreport* **2002**, 13, 987-955.
- Sabol, S. L.; Higuchi, H. Transcriptional regulation of the neuropeptide Y gene by nerve growth factor: antagonism by glucocorticoids and potentiation by adenosine 3',5'-monophosphate and phorbol ester. *Mol. Endocrinol.* **1990**, 4, 384-392.
- Santosh Kumar, S.; Priyadarsini, K. I.; Sainis, K. B. Free radical scavenging activity of vanillin and *o*-vanillin using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical. *Redox Rep.* **2002**, 7, 35-40.
- Schwartz, M. W.; Seeley, R. J.; Campfield, L.A.; Burn, P.; Baskin, D. G. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J. Clin. Invest.* **1996**, 98, 1101-1106.
- Schwartz, M. W.; Woods, S. C.; Jr, D. P.; Seeley, R. J.; Baskin, D. G. Central nervous system control of food intake. *Nature*. **2000**, 404, 661-671.
- Scharf, M. T.; Ahima, R.S.; Gut peptides and other regulators in obesity. *Semin Liver Dis* **2004**, 24, 335-47.
- Schöne, F. ; Vetter, A.; Hartung, H.; Biertumpfel, A.; Richter, G.; Muller, S.; Breitschuh, G. Effects of essential oils from fennel (*Foeniculi aetheroleum*) and caraway (*Carvi aetheroleum*) in pigs. *J. Animal Physiology and Animal Nutrition* **2006**, 90, 500-510.
- Seeley, R. J.; Payne, C. J.; Woods, S. C. Neuropeptide Y fails to increase intraoral intake in rats. *Am. J. Physiol.* **1995**, 37, 423-427.
- Shelef, L. A. Antimicrobial effect of spices. *J of Food Safety*. **1983**, 6, 29-44.
- Shen, J.; Niiijima, A.; Tanida, M.; Horii, Y.; Maeda, K.; Nagai, K. Olfactory stimulation with scent of lavender oil affects autonomic nerves, lipolysis and appetite in rats. *Neurosci. Lett.* **2005**, 383, 188-193.
- Shen, J.; Niiijima, A.; Tanida, M.; Horii, Y.; Maeda, K.; Nagai, K. Olfactory stimulation with scent of grapefruit oil affects autonomic nerves, lipolysis and appetite in rats.

- Neurosci. Lett.* **2005**, *380*, 289-294.
- Silva, J.; Abebe, W.; Sousa, S. M.; Duarte, V. G.; Machado, M. I. L.; Matos, F. J. A. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalyptus. *J. Ethnopharmacol.* **2003**, *89*, 277-283.
- Sonigra, S. J.; Kandiah, S. S.; Wigley, C. B. Spontaneous immortalisation of ensheathing cells from adult rat olfactory nerve. *Glia* **1996**, *16*, 247-256.
- Srinivasan, K.; Sambaiah, K.; Chandrasekhara, N. Spices as beneficial hypolipidemic food adjuncts: a Review. *Food Reviews International.* **2004**, *20*, 187 – 220.
- Srinivasan, K.; Platel, K.; Rao, M. V. L. Hypotriglyceridemic effect of dietary vanillin in experimental rats. *Eur Food Res Technol.* **2008**, *228*, 103-108.
- Stellar, E. The physiology of motivation. *Psychol. Rev.* **1954**, *101*, 301-311.
- Stricker-Krongrad, A.; Barbanel, G.; Beck, B. Modulation of hypothalamic hypocretin/orexin mRNA expression by glucocorticoids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *296*, 129-133.
- Surh, Y. J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer.* **2003**, *3*, 768-780.
- Swanson, L.W.; Sawchenko, P.E. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu. Rev. Neurosci.* **1983**, *6*, 269-324.
- Tanida, M.; Niiijima, A.; Shen, J.; Nakamura, T.; Nagai, K. Olfactory stimulation with scent of essential oil of grapefruit affects autonomic neurotransmission and blood pressure. *Brain Research* **2005**, *1058*, 44-55.
- Tanida, M.; Shen, J.; Nakamura, T.; Niiijima, A.; Nagai, K. Day-night difference in thermoregulatory responses to olfactory stimulation. *Neuroscience Letters.* **2008**, *439*, 192-197.
- Tatsadjieu, N. L.; Jazet, Dongmo, P. M.; Ngassoum, M. B.; Etoa, F. X.; Mbofung, C. M. F. Investigations on the essential oil of *Lippia rugosa* from Cameroon for its potential use as antifungal agent against *Aspergillus flavus* Link ex. Fries. *Food Control* **2009**, *20*, 161-166.
- Tatemoto, K. Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1982**, *79*, 5485-5489.
- Teissedre, P. L.; Waterhouse, A. L. Inhibition of oxidation of human low-density lipoproteins by phenolic substances in different essential oils varieties. *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry*. **2000**, 48, 3801-3805.
- Ubink, R.; Hokfelt, T. Expression of neuropeptide Y in olfactory ensheathing cells during prenatal development. *J. Comp. Neurol.* **2000**, 423, 13–25.
- Umezu, T.; Ito, H.; Nagano, K.; Yamakoshi, M.; Oouchi, H.; Sakaniwa, M.; Morita, M.; Anticonflict effect of rose oil and identification of its active constituents. *Life Sci.* **2002**, 72, 91-102.
- van Dumont, Y.; Quirion, R. An overview of neuropeptide Y : pharmacology to molecular biology and receptor localization. NPY Family of Peptides in Neurobiology, Cardiovascular and Metabolic Disorders. *Genes to Therapeutics*. **2006**, 7-33.
- Walindera, R.; Ernstgardb, L.; Norbacka, Dan.; Wieslandera, G.; Johansonb, G. Acute effects of 1-octen-3-ol, a microbial volatile organic compound (MVOC)—An experimental study. *Toxicology Letters*. **2008**, 181, 141-147.
- Walton, N. J.; Mayer, M. J.; Narbad, A. Vanillin. *Phytochemistry* **2003**, 63, 505-515.
- Wang, J. P.; Hsu, M. F.; Hsu, T. P.; Teng, C.M. Antihemostatic and antithrombotic effects of capsaicin in comparison with aspirin and indomethacin. *Thromb. Res.* **1985**, 37, 669–679.
- Wilson, M. M. G.; Thomas, R. D.; Rubenstein, L. Z.; Chibnall, J. T.; Anderson, S.; Baxi, A.; Diebold, M. R.; Moriey, J. E. Appetite assessment: simple appetite questionnaire predicts weight loss in community-dwelling adults and nursing home residents. *Am J Clin Nutr.* **2005**, 82, 1074-1081.
- Yamamoto, Y.; Ueta, Y.; Serino, R.; Nomura, M.; Shibuya, I.; Yamashita, H. Effects of food restriction on the hypothalamic prepo-orexin gene expression in genetically obese mice. *Brain Res. Bull.* **2000**, 51, 515-521.
- Yang, Y.; Yan, R. W.; Cai, X. Q.; Zheng, Z. L.; Zou, G. L. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Amomum tsao-ko*. *J Sci Food Agric* **2008**, 88, 2111–2116.
- Yeoh, K. G.; Kang, J. Y.; Yap, I.; Guan, R.; Tan, C. C.; Wee, A.; Teng, C. H. Chili protects against aspirin-induced gastroduodenal mucosal injury in humans. *Dig. Dis. Sci.* **1995**, 40, 580–583.
- Zarjevski, N.; Cusin, I.; Vettor, R.; Rohner-Jeanrenaud, F.; Jeanrenaud, B. Chronic

intracerebroventricular neuropeptide Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity. *Endocrinology*. **1993**, *133*, 1753-1758.

Zeng, J.; Patterson, B. W.; Klein, S.; Martin, D. R.; Dagogo-Jack, S.; Kohrt, W. M.; Miller, S. B.; Landt, M. Whole body leptin kinetics and renal metabolism in vivo. *Am. Physiological society*. **1997**, *273*, 1102-1106.

Zhang, W. Z.; Lim, L. Y. Effects of spice constituents on p-glycoprotein-mediated transport and CYP3A4-mediated metabolism in vitro. *Drug metabolism and Disposition*. **2008**, *36*, 1283-1290.



附件一、

發文方式：紙本遞送

檔 號：

保存年限：

國立臺灣大學醫學院附設醫院 函

地址：100臺北市中山南路7號
承辦人：賴怡均
電話：02-2312-3456 分機 66593
傳真：02-2395-1950
電子信箱：ntuhrec2008@yahoo.com.tw

受文者：精神醫學部胡海國醫師

發文日期：中華民國98年4月27日

發文字號：校附醫倫字第0983701356號

類別：普通件

密等及解密條件或保密期限：普通

附件：如文



主旨：有關 台端所主持之「揮發性成分刺激嗅覺神經系統產生調節食慾因子而影響攝食行為之研究/The volatile compounds stimulate the olfactory nervous system to express the appetite factors and influences food intake behavior」（本院案號：200904033R）純學術臨床試驗案，符合快速審查條件及研究倫理規範，通過本院研究倫理委員會審查，同意核備，並提第150研究倫理委員會報備追認，請 查照。



附件二、受試者同意書（僅附第一頁）

國立台灣大學醫學院附設醫院

臨床試驗受試者說明及同意書

您被邀請參與此臨床試驗研究。這份表格提供您本研究之相關資訊，研究主持人或研究護士將會為您說明研究內容並回答您的任何疑問。

研究計畫名稱：

中文：揮發性成分刺激嗅覺神經系統產生調節食慾因子而影響攝食行為之研究

英文：The volatile compounds stimulate the olfactory nervous system to express the appetite factors and influences food intake behavior.

執行單位：台大醫院精神醫學部

委託單位/藥廠：無

主要主持人：胡海國

職稱：主治醫師

電話：(02) 2312-3456 分機 66785

協同主持人：蔣丙煌

職稱：教授

電話：(02) 3366-4120

※二十四小時緊急聯絡人：胡海國醫師

電話：(02) 2312-3456 分機 66785

受試者姓名：

性別：

出生日期：

病歷號碼：

通訊地址：

聯絡電話：

法定代理人或有同意權人之姓名：

與受試者關係：

性別：

出生日期：

身份證字號：

通訊地址：

聯絡電話：

附件三、基本資料

(1) 姓名：_____ 年齡：_____

(2) 性別：1. 男 ☐ 2. 女 ☐

(3) 出生日期：_____年_____月_____日

(4) 教育程度：

01. ☐ 研究所(含醫師) 02. ☐ 大學或獨立學院畢 03. ☐ 大學肄業(含二專、三專)

04. ☐ 高中職畢 05. ☐ 高中職肄業 06. ☐ 國中畢

07. ☐ 國中肄 08. ☐ 國小畢 09. ☐ 國小肄或以下

(5) 職業：

01. ☐ 學生 02. ☐ 軍 03. ☐ 公 04. ☐ 教 05. ☐ 農 06. ☐ 林 07. ☐ 牧 08. ☐ 漁 09. ☐ 工

10. ☐ 商 11. ☐ 自由業 12. ☐ 服務 13. ☐ 家管 14. ☐ 退休 15. ☐ 無

16. ☐ 其它_____

(6) 宗教信仰：

01. ☐ 天主教 02. ☐ 基督教 03. ☐ 猶太教 04. ☐ 佛教 05. ☐ 回教 06. ☐ 道教

07. ☐ 一貫道 08. ☐ 未信教 09. ☐ 其它_____

(7) 睡眠情況：

01. ☐ 良好 02. ☐ 失眠1~2次/一星期 03. ☐ 失眠3~5次/一星期

04. ☐ 失眠6~7次/一星期

(8) 是否有運動習慣(每次30 min以上)：

01. ☐ 無 02. ☐ 1~2次/一星期 03. ☐ 3~5次/一星期 04. ☐ 6~7次/一星期

(9) 是否患有疾病：

01. ☐ 無 02. ☐ 若有列出 _____ (依嚴重性列出)

(10) 自覺個人健康狀況：

01. ☐ 很好 02. ☐ 好 03. ☐ 普通 04. ☐ 差 05. ☐ 很差

感謝您的填寫！！

附件四、問卷

問卷(一)

姓名：

(強度為 1 至 5，1 為最弱，3 為中間，5 為最強)

※請依下列問題，按照個人感覺強度，在框內打 V：

	1	2	3	4	5
(1) 喜歡試驗之味道	☐	☐	☐	☐	☐
(2) 試驗讓身體覺得不適	☐	☐	☐	☐	☐
(3) 試驗讓心跳有加速的感覺	☐	☐	☐	☐	☐
(4) 試驗中，心情有放鬆的感覺	☐	☐	☐	☐	☐
(5) 試驗中，有嗜睡的感覺	☐	☐	☐	☐	☐
(6) 試驗後，有想攝食的感覺	☐	☐	☐	☐	☐
(7) 試驗後，不想攝食的感覺	☐	☐	☐	☐	☐
(8) 試驗後，心情愉悅	☐	☐	☐	☐	☐
(9) 試驗後，心情有放鬆的感覺	☐	☐	☐	☐	☐
(10) 試驗後，有嗜睡的感覺	☐	☐	☐	☐	☐
(11) 試驗後，精神變好	☐	☐	☐	☐	☐

謝謝您的合作！！

(請查閱答案或資料有無漏填的地方，再次謝謝您的配合)

問卷(二)

姓名：

(強度為 1 至 5，1 為最弱，3 為中間，5 為最強)

※請依下列問題，按照個人感覺強度，在框內打 V：

※評估上次試驗後之一星期中

	1	2	3	4	5
(1) 感覺想吃得慾望增加	☐	☐	☐	☐	☐
(2) 感覺想吃得慾望減少	☐	☐	☐	☐	☐
(3) 排便變順暢	☐	☐	☐	☐	☐
(4) 做事的效率變好	☐	☐	☐	☐	☐
(5) 一週都覺得精神奕奕	☐	☐	☐	☐	☐
(6) 睡眠品質變好	☐	☐	☐	☐	☐

謝謝您的合作！！

(請查閱答案或資料有無漏填的地方，再次謝謝您的配合)



附錄 期刊格式

Appendix

Effects of spices on neuropeptide Y expression in olfactory nerve cell and human plasma

Po-Ju Wu, Shiau-Wei Chen, Been-Huang Chiang

Institute of Food Science and Technology, National Taiwan University, Taipei 10617, Taiwan, ROC

ABSTRACT

Neuropeptide tyrosine (NPY), a 36-amino acid peptide, is the most important stimulator of food intake. On the other hand, essences such as limonene and linalool, which are respectively the major components of grapefruit oil and lavender oil, have been verified to influence (decrease / increase) appetite in rats. Therefore, we proposed that appetite regulation effect of essences might be dependent on the secretion of NPY. In a previous study, we had established a NPY expression screening model. Thus, in this study, we used this model to screen thirteen spices and expected to find potential spices that could stimulate NPY mRNA expression of Rolf B1.T cells. Furthermore, a clinical trial was implemented to study the effects of these spices on the human physiological indicators. In NPY expressing screening model, our results indicated that octenol, pinene, and methyl phenylacetate caused the significant increase of NPY mRNA level in the Rolf B1.T cells. The results of clinical trial showed that limonene might inhibit appetite, both linalool and octenol might be a potent stimulator of food intake, and pinene had no obvious affect on plasma NPY. Blood pressure and ear temperature were not significantly changed during experiments.

Keywords: neuropeptide Y, olfactory nerve ensheathing cells, appetite, aromatherapy, human plasma NPY

1. INTRODUCTION

Spices are composed of fiber, carbohydrates, fat, protein, gum, ash, volatile (essential oils) and other non-volatile components. Cooking foods with spices is the oldest form of aromatherapy since their aroma can stimulate gastric secretions that create appetites. For people throughout the world, spices add aroma, taste, color and texture to food and create visual appeal in meals. Aromatherapy, using essential oils, can relax or stimulate the body, create certain moods, relieve cold symptoms and respiratory problems and ease muscle pains through releasing neurochemicals in the brain (Raghavan, 2007).

Since food intake and sympathetic activity are closely related (Bray, 1990), Shen et al (2005) examined the effects of the scents of grapefruit oil, lavender oil, limonene and linalool on food intake and body weight. These researches suggest that smell of grapefruit oil, particularly its primary component, limonene, affects autonomic nerves, enhances lipolysis through a histaminergic response, and reduces appetite and body weight. Otherwise, scents of lavender oil and its active component, linalool, have the opposite above effects. Furthermore, literatures indicated that capsaicinoids, fenugreek powder, and lemongrass can improve and stimulate appetite (Bessot et al., 1996; Robbins, 2000; Raghavan, 2007). Inversely, *Zanthoxylum piperitum* inhibits appetite (Epple et al., 2001). Above these studies might indicate that spices could influence appetite through smelling.

In the olfactory system, neuropeptide Y (NPY), a 36-amino acid peptide, is synthesized by sustentacular cells and olfactory ensheathing cells. NPY is widely present in the central and peripheral nervous system and plays the most important role in appetite stimulator in the hypothalamus that regulates energy intake and expenditure. The arcuate (ARC) of the hypothalamus contains two sets of neurons, one produces agouti-related protein (AGRP) and neuropeptide Y (NPY) and the other produces pro-opiomelanocortin (POMC) and cocaine- and amphetamine-related transcript (CART). The first type are orexigenic, promoting food intake and reducing energy expenditure, and the second type produce the opposite anorexigenic effect. Furthermore, leptin is synthesized by adipocytes in proportion to the level of stored triglycerides, and inhibits NPY synthesis leading to the reduction of food consumption (Seeley et al., 1995 ; Ammar et al., 2000 ; Benoit et al., 2005 ; Kobeissy et al., 2007).

Most of the papers report the effect of spices on appetite, food intake, and body weight. To our best knowledge the effect of spices on NPY mRNA level in olfactory nerve cells has not been reported until now. Therefore, we proposed that appetite regulation effect of spices might be dependent on the secretion of NPY.

In a previous study, we had established a NPY expression screening model by culturing olfactory nerve cell line-Rolf B1.T for 2 days and treating cell line with limonene and linalool for 10 min. Thus, in this study, we used this model to screen thirteen spices and expected to find potential spices that could stimulate NPY mRNA expression of Rolf B1.T cells. Furthermore, a clinical trial was implemented to study the effects of these spices on the human physiological indicators, including ear temperature, blood pressure, body weight, body fat, plasma leptin and plasma NPY secretion. In addition, personals' questionnaire was used to investigate the relationship between food intake and aroma components for human.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Different spices affect NPY mRNA expression of Rolf B1.T cells

2.1.1 Chemicals.

Capsaicin, citral, curcumin, diallyl disulfide, geraniol, methyl phenylacetate, 1-octen-3-ol, and vanillin were purchased from Sigma. Citronellal and diallyl sulfide were purchased from Merck. Eucalyptol, (-)- α -pinene and citronellol were respectively purchased from Fluka and alfa aesar. Reagents for quantitative real-time reverse transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) were ordered from BIO-RAD.

2.1.2 Adult rat olfactory nerve ensheathing cells (Rolf B1. T cells).

Rolf B1.T cells have an antigenic phenotype which closely resembles that of olfactory ensheathing cells. In routine culture conditions, Rolf B1.T cells constitutively express glial fibrillary acidic protein, S100, the low-affinity neurotrophin receptor p75 NGF, laminin, tenascin, and the neural cell adhesion molecule (N-CAM). Rolf B1.T cells supplied by the European Collection of Cell Culture (ECACC, Porton Down, Salisbury, UK). Rolf B1.T cells maintained in DMEM + 2mM Glutamine + 10% Foetal Bovine Serum at 37°C and 5% CO₂. For each assay, cells were clutured to medium at 37°C and 5% CO₂ for 48 h.

2.1.3 *In Vitro* Cytotoxicity of spices.

The cytotoxicity of 13 spices (capsaicin, citral, citronellal, citronellol, curcumin, diallyl disulfide, diallyl sulfide, eucalyptol, geraniol, methyl phenylacetate, (-)- α -Pinene, 1-octen-3-ol, and vanillin) were used at 5×10^5 cells/ml for all experiments. Cells were seeded on 96-well plates and 13 spices treatment were supplemented 24h after seeding. General viability of cultured cells was determined by the reduction of 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) to formazan. The MTT assay was performed after incubation of cells with various concentrations of 13 spices for 15 min at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. MTT (2 mg/mL) was added to each well in a 100 μ L. Cells were incubated at 37°C for 3 h, and dimethylsulfoxide (DMSO) was added to dissolve the formazan crystals. The absorbance was then measured at 570 nm using microplate reader. The entire experiment was performed in triplicate, and results were confirmed by three independent experiments.

2.1.4 *Expression of NPY mRNA in Rolf B1. T treated different spices*

For sample treatment: Rolf B1. T cells (5×10^5 cells/mL) were cultured two days and treated with different spices for 10 min at 37°C in 5% CO₂ atmosphere.

Determination of NPY mRNA level: after 10 min of exposure, cells were washed with 4°C DEPC-PBS, and RNA was extracted using Geneaid RNA Mini kit. Thereafter, RNA samples were quantitated by Nanodrop-100, and cDNA was synthesized by BIO-RAD iScript™ cDNA Synthesis Kit. For all cDNA samples, a qRT-PCR (iQ5, BIO-RAD) of NPY and, β -actin was performed. β -actin was used as the housekeeping gene as its expression was not influenced by either of the sample. Therefore, amplification of NPY gene was normalized to β -actin gene amplification.

2.1.5 *Statistical Analysis*

The statistical significance of the cytotoxicity result and NPY mRNA levels were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's test using SAS software. The data are expressed as mean $\pm$ S.D. Significance was defined by $p < 0.05$.

2.2 Clinical trail

2.2.1 Subjects

All subjects (31 healthy adult people ranging in age from 22 to 31 years old) were divided into five groups-water, limonene, linalool, pinene, and octenol (Table 2) and data was collected from these groups. Each subject signed an information agreement in which all procedures, benefits and possible risks of the study were indicated. The subjects were required to abstain from alcohol and excessive eating in the days before the experiments. On the days of the experiments, the subjects were required to have breakfasted before 0900 hours and to abstain from food, drink, and exercise for 2 h prior to the experiment. Each measurement was taken between 1030 and 1200 hours.

2.2.2 Procedure

The participants were randomly assigned to the control group (water, n=6), the negative control group (limonene, n=7), the positive control group (linalool, n=6), the test group (pinene, n=6) or to the test group (octenol, n=6) for 3 weeks (exposure to 5 min/1 week; 10 min/ 2nd week; 15 min/ 3th week). The odor was sprayed through Ultrasonic Aromatherapy Atomizer (SL-1D6, KWANGHWA). The spray rate of the odors was 50-60 mL/h and its particle size was about 3 μ m. Before experiment was begun, the subjects rest for at least 10 min in a sitting position in a quiet and relaxed manner. In the meantime, the subjects filled in the personal information or questionnaire, and then they performed the anthropometry and experiment test. Before and after experiment, blood was collected into EDTA tube for plasma NPY and leptin concentrations assay.

2.2.3 Correlation between ages, BMI, body fat, gender and plasma NPY, leptin levels before clinical trail

Simple correlations were assessed by Pearson's correlation coefficients.

2.2.4 Questionnaire

These questionnaires included two parts. Part one was assessment of feeling during experimental process and part two was examination of feeling after one week.

2.2.5 Anthropometry

We recorded body weight, body fat (Tanita, BF-700), blood pressure (OMRON HEM-7020) and ear temperature (Fora, TD-1116) before and after the study.

2.2.6 Plasma NPY and leptin concentrations

Plasma NPY concentration was measured by using commercially available NPY (Human, Rat, Mouse) EIA kit (Phoenix pharmaceuticals). Plasma leptin concentration was measured by using commercial available Human Leptin Immunoassay SLP00 (Quantikine[®], R&D).

2.2.7 Statistical Analysis

The statistical significance of plasma NPY and leptin levels, variation of body weight, body fat, blood pressure and ear temperature were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by duncan's test using SAS software. The data are expressed as mean $\pm$ S.D. Significance was defined by $p < 0.05$.

3. RESULTS AND DISSCUSIONS

3.1 Different spices affect NPY mRNA expression of Rolf B1.T cells

3.1.1 In Vitro Cytotoxicity of spices

Because it was necessary to exclude cytotoxic effects, the influence of spices on the viability of Rolf B1.T cells was tested in a preliminary experiment. In vitro cytotoxicity experiments were conducted with DMEM as the control medium. The viabilities of Rolf B1.T cells were considered to be unaffected by 15 min of coincubation with up to 0.08% citronellal, 0.08% citronellol, 0.04% citral, 0.05% curcumin, 0.25% capsaicin, 0.35% diallyl sulfide, 0.08% diallyl disulfide, 0.35% eucalyptol, 0.04% geraniol, 0.08% methyl pgenylacetate, 0.35% octenol, 0.35% pinene and 0.25% vanillin (Table 1). The Rolf B1.T cells were more sensitive to citral, curcumin and geraniol. In addition, diallyl sulfide had higher cell viability on Rolf B1.T than diallyl disulfide. It might be due to diallyl disulfide having one more sulfur-group. To date, there are very few reports on the cytotoxicity of these spices on Rolf B1.T cells. And then, to avoid confounding the expression of NPY mRNA, subsequent experiments were performed with spice concentrations that yielded cell viability $\geq 100\%$.

3.1.2 Expression of NPY mRNA in Rolf B1. T cells treated different spices

Fig.1 and Fig. 2 showed representative experiments of NPY mRNA level in Rolf B1.T cells using solvent as the control group. In NPY expressing screening model, our results indicated that approximately 2.3-fold increase in NPY mRNA level was found in 0.04% methyl phenylacetate ($p < 0.01$). Especially, in the 0.17% octenol and 0.17% pinene treatments caused significant increase of NPY mRNA level in the Rolf B1.T cells which were respectively 6.5 - fold and 5.1 - fold increase in NPY mRNA level ($p < 0.01$). In addition, approximately 1.8-fold increase in NPY mRNA level was found in 0.02% citral but it had no significant difference. However, the following spices, including 0.04% citronellal, 0.04% citronellol, 0.17% eucalyptol, 0.02% geraniol, 0.125% vanillin, 0.125% capsaicin, 0.025% curcumin, 0.17% diallyl sulfide, and 0.04% diallyl disulfide, all decreased NPY mRNA level in the Rolf B1.T cells (Fig. 1, Fig. 2). It has been shown previously that garlic extract and Chinese herbs such as clove and anise could stimulate NPY mRNA levels in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) in a concentration dependent manner (Zhang, 2007). Besides, effects of spices such as limonene and linalool on the IL-6 formation have been revealed (Held et al., 2007). In this study, we found that octenol, pinene, and methyl phenylacetate could significantly stimulate NPY mRNA level in Rolf B1.T cells. In the following clinical trial, we chose octenol and pinene as the test samples.

3.2 Clinical trial

3.2.1 Correlation between ages, BMI, body fat, gender and plasma NPY, plasma leptin levels before clinical trial in all subjects

Before clinical trial, a simple linear regression analysis revealed that a significant positive correlation between body fat and plasma leptin in all subjects ($p < 0.01$). In the same way, there was a positive correlation between BMI and plasma leptin ($p < 0.01$) (Fig. 3). This might be caused by the fact that leptin is secreted from adipose tissue, circulating at levels that are proportional to body adipose stores (Bell et al., 2005).

3.2.2 Questionnaire

Relationship between factor of questionnaire and plasma NPY, plasma leptin were not significantly related (data not shown).

3.2.3 Anthropometry

The five groups were comparable regarding all the baseline anthropometric characteristics. We found no change in blood pressure and ear temperature within the control group, the negative control limonene, the positive control linalool, pinene and octenol (data not shown).

3.2.4 Plasma NPY concentrations

Using water as the control group, we found that when the experimental period was 10 min, limonene, it has been verified to decrease appetite in rats (Shen et al., 2005), as the negative control decreased plasma NPY level, and in NPY expressing screening model it caused significant decrease of NPY mRNA level in the Rolf B1.T cells. Thus, it indicated that limonene might inhibit appetite. On the other hand, when the experimental period were 5, 10 min, linalool, it has been verified to increase appetite in rats (Shen et al., 2005), as the positive control, increased plasma NPY level, and in NPY expressing screening model it caused significant increase of NPY mRNA level in the Rolf B1.T cells. Therefore, it indicated that linalool might stimulate appetite. Furthermore, octenol, it caused significant increase of NPY mRNA level in the Rolf B1.T cells, could stimulate plasma NPY level when the experimental period were 5, 10 and 15 min. It revealed that octenol might be a potent stimulator of food intake. Conversely, the plasma NPY level in the pinene group had no obvious changes at any experimental time (Fig. 4).

NPY both in the plasma and hypothalamus correlate closely with appetite. (Seeley et al., 1995 ; Ammar et al., 2000 ; Benoit et al., 2005 ; Kobeissy et al., 2007). Besides, serum NPY and body weight show a steady decrease in treatment of cigarette smoke, MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamin) and METH (methamphetamine) exposure in rats (Kobeissy et al., 2007 ; Chen et al., 2006). It might suggest that olfactory stimulation with aroma could affect appetite. In our study, we found that exposed to limonene might inhibit appetite; and linalool and octenol might be a potent stimulator of food intake. In addition, compared with limonene and linalool, octenol is more close to food flavor so that the mechanism of appetite regulation might be more direct than essence flavor. Besides, plasma NPY levels of subjects were influenced by not only several stress conditions but also BMI value, obesity, age and sympathetic activity (Carrasco and Van de Kar, 2003; Morgan et al., 2000; Czermak et al., 2008;

Baranowska et al., 1997; Lin et al., 2007; Morris et al., 1986). Thus, plasma NPY levels might be influenced by individual diversity, and this might be the reason of inconclusive result of this study.

3.2.4 Plasma leptin concentrations

Using water as the control group, the clinical trial showed that plasma leptin concentrations decreased almost in every group (Fig. 5). Leptin, an anorexigenic hormone secreted by adipocytes, modulates the level of NPY and other peptides and plays a role in the regulation of food intake and energy expenditure (Mercer et al., 1997). In octenol group, the trend of plasma NPY levels and plasma leptin levels displayed the opposite. Our results suggest that octenol might be a potent stimulator of food intake result from stimulating NPY production and inhibiting leptin formation. However, leptin circulates in both free (16.7 kDa) and protein-bound (>70 kDa) forms in plasma might affect measurement accuracy (Zeng et al., 1997). Besides, plasma leptin concentrations were easily influenced by many other physiological factors, such as sex, nutritional status, adipocyte number and fat content, so that it is difficult to make a conclusion (Baranowska et al., 1997; Bell et al., 2005; Chilliard et al., 2001; Zeng et al., 1997).

4. CONCLUSION

In NPY expressing screening model, our results indicated that octenol, pinene, and methyl phenylacetate caused significant increase of NPY mRNA level in the Rolf B1.T cells. Moreover, the results of clinical trial showed that limonene might inhibit appetite, both linalool and octenol might be a potent stimulator of food intake, and pinene did not show any influence on appetite. In the future, the relationships between spices, NPY and appetite showed be investigated using human subjects with a more careful and controllable experimental design and conditions.

REFERENCES

- 張文傑。誘引劑對於點帶石斑 (*Epinephelus coioides*) 腦內攝食調控基因表現、攝食與成長之影響。2007。海洋大學碩士論文。
- Ammar, A. A.; Sederholm, F.; Saito, T. R.; Scheurink, A. J.W.; Johnson, A. E.; Sodersten, P. NPY-leptin: opposing effects on appetitive and consummatory ingestive behavior and sexual behavior. *Am. J. Physiol.* **2000**, 278, 1627-1633.
- Baranowska, B.; Wasilewska-Dziubinska, E.; Radzikowska, M.; Ptonowski, A.; Roguski, K. Neuropeptide Y, galanin and leptin release in obese women and in women with anorexia nervosa. *Metabolism.* **1997**, 46, 1384-1389.
- Bell, C. G.; Walley, A. J.; Froguel, P. The genetics of human obesity. *Genetic.* **2005**, 6, 221-232
- Benoit, S. C.; Clegg, D. J.; Wood, S. C.; Seeley, R. J. The role of previous exposure in the appetitive and consummatory effects of orexigenic neuropeptide. *Peptides.* **2005**, 26, 751-757.
- Bessot, J. C.; Gourdon, C.; Pauli, G. Respiratory allergy to Fenugreek. *Rev Fr Allergol Immunol Clin.* **1996**, 36, 510-512.
- Bray, G. A.; Oomura, Y.; Tarui, S. Inoue, T.; Shimazu E. The MONALISA hypothesis: most obesities known are low in sympathetic activity. *Progress in Obesity Research.* **1990**, 53, 61-66.
- Carrasco, G. A.; Van de Kar, L. D. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, 463, 235-272.
- Chen, H.; Hansen, M. J.; Jones, J. E.; Vlahos, R.; Bozinovski, S.; Anderson, G. P.; Morris, M. J. Cigarette smoke exposure reprograms the hypothalamic neuropeptide Y axis to promote weight loss. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2006**, 173, 1248-1254.
- Czermak, C.; Hauger, R.; Drevets, W. C.; Luckenbaugh, D. A.; Geraci, M.; Charney, D. S.; Neumeister, A. Plasma NPY concentrations during tryptophan and sham depletion in medication-free patients with remitted depression. *J. Affective Disorders.* **2008**, 110, 277-281.
- Eppl, G.; Bryant, B. P.; Mezine, I.; Lewis, S. *Zanthoxylum piperitum*, an asian spice, inhibits food intake in rats. *J. Chem. Ecology.* **2009**, 27, 1627-1639.
- Held, S.; Schieberle, P.; Somoza, V. Characterization of α -terpineol as an

- anti-inflammatory component of orange juice by in vitro studies using oral buccal cells. *J. Agric. Food chem.* **2007**, *55*, 8040-8046.
- Kobeissy, F. H.; Jeung, J. A.; Warren, M. W.; Geier, J. E.; Gold, M. S. Changes in leptin, ghrelin, growth hormone and neuropeptide-Y after an acute model of MDMA and methamphetamine exposure in rats. *Addiction Biology.* **2007**, *13*, 15-25.
- Lin, L. C.; Lin, H. S.; Yang, R. C. Neuropeptide Y gene polymorphism and plasma neuropeptide Y level in febrile seizure patients in Taiwan. *Kaohsiung J. Med. Sci.* **2007**, *23*, 560-566.
- Mercer, J. G.; Moar, K. M.; Rayner, D. V.; Trayhurn, P.; Hoggard, N. Regulation of leptin receptor and NPY gene expression in hypothalamus of leptin-treated obese (ob/ob) and cold-exposed lean mice. *FEBS Lett.* **1997**, *402*, 185-188.
- Morgan III, C. A.; Wang, S.; Southwick, S. M.; Rasmussen, A.; Hazlett, G.; Hauger, R. L.; Charney, D. S. Plasma neuropeptide-Y concentration in human exposed to military survival training. *Biol. Psychiatry.* **2000**, *47*, 902-909.
- Raghavan, S. Handbook of Spices, Seasonings, and Flavorings Second edition. *Taylor & Francis.* **2007**.
- Robbins, W. Clinical applications of capsaicinoids. *Clin J Pain.* **2000**, *16*, S86-S89.
- Seeley, R. J.; Payne, C. J.; Woods, S. C. Neuropeptide Y fails to increase intraoral intake in rats. *Am. J. Physiol.* **1995**, *37*, 423-427.
- Shen, J.; Nijima, A.; Tanida, M.; Horii, Y.; Maeda, K.; Nagai, K. Olfactory stimulation with scent of lavender oil affects autonomic nerves, lipolysis and appetite in rats. *Neurosci. Lett.* **2005**, *383*, 188-193.
- Shen, J.; Nijima, A.; Tanida, M.; Horii, Y.; Maeda, K.; Nagai, K. Olfactory stimulation with scent of grapefruit oil affects autonomic nerves, lipolysis and appetite in rats. *Neurosci. Lett.* **2005**, *380*, 289-294.
- Zeng, J.; Patterson, B. W.; Klein, S.; Martin, D. R.; Dagogo-Jack, S.; Kohrt, W. M.; Miller, S. B.; Landt, M. Whole body leptin kinetics and renal metabolism in vivo. *Am. Physiological society.* **1997**, *273*, 1102-1106.

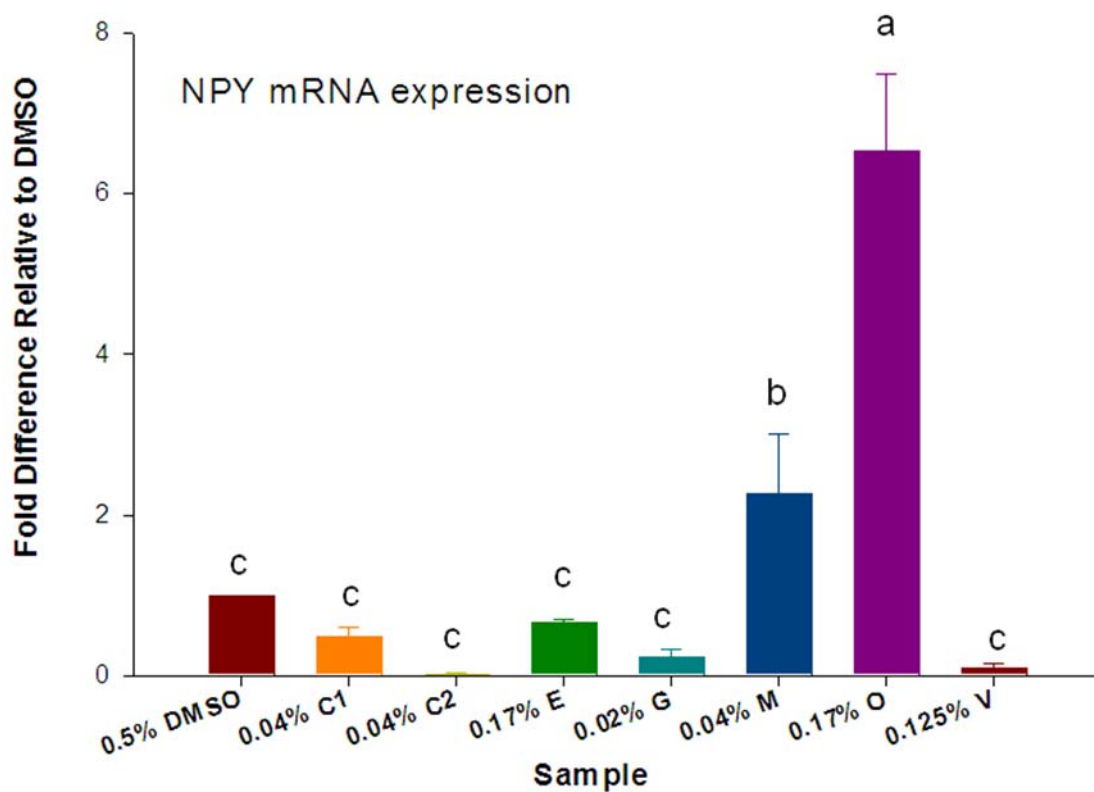


Figure 1. Gene expression of NPY mRNA in Rolf B1.T cells treated with different samples for 10 mins. (n=3, mean $\pm$ SD, $P < 0.01$)

*The comparative changes in gene expression of NPY mRNA were determined by real-time PCR analysis. Values were normalized using β -actin mRNA levels as a reference.

*a, b, c: Base with different letters are significantly different from the control group (0.5% DMSO). $P < 0.01$

*C1: Citronellal, C2: Citronellol, E: Eucalyptol, G: Geraniol, M: methyl phenylacetate, O: Octenol, V: vanillin

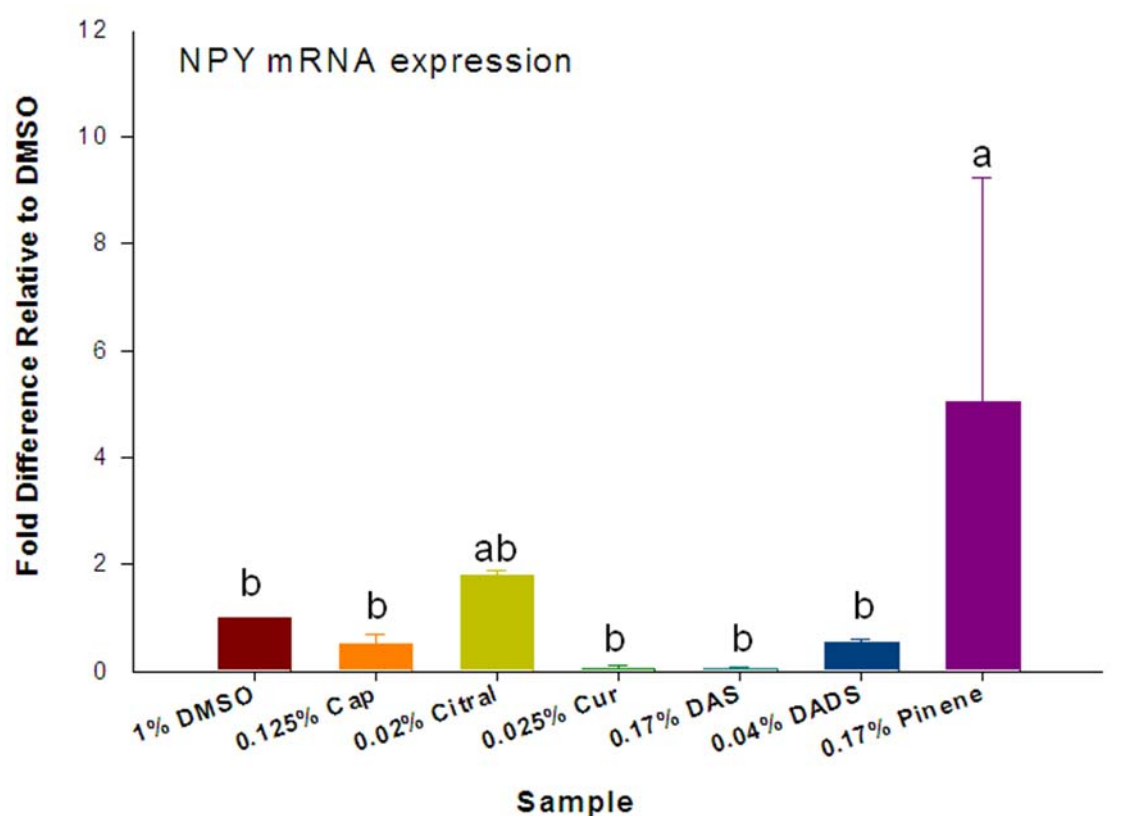


Figure 2. Gene expression of NPY mRNA in Rolf B1.T cells treated with different samples for 10 mins (n=3, mean±SD, P < 0.01).

*The comparative changes in gene expression of NPY mRNA were determined by real-time PCR analysis. Values were normalized using β -actin mRNA levels as a reference.

*a, b: Base with different letters are significantly different from the control group (10000 ppm DMSO). P < 0.01

*Cap: capsaicin, Cur: Curcumin, DAS: Diallyl sulfide, DADS: Diallyl disulfide

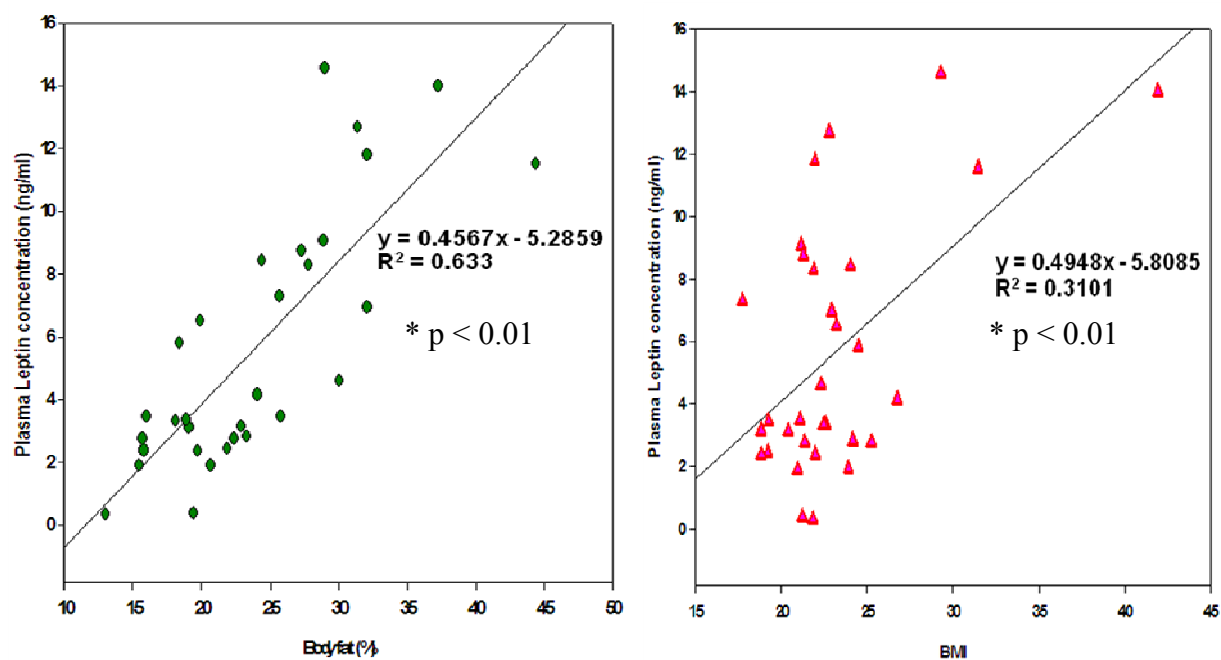


Figure 3. Relationship between body fat, BMI and plasma leptin of all subjects (n=31).
(*p < 0.01)



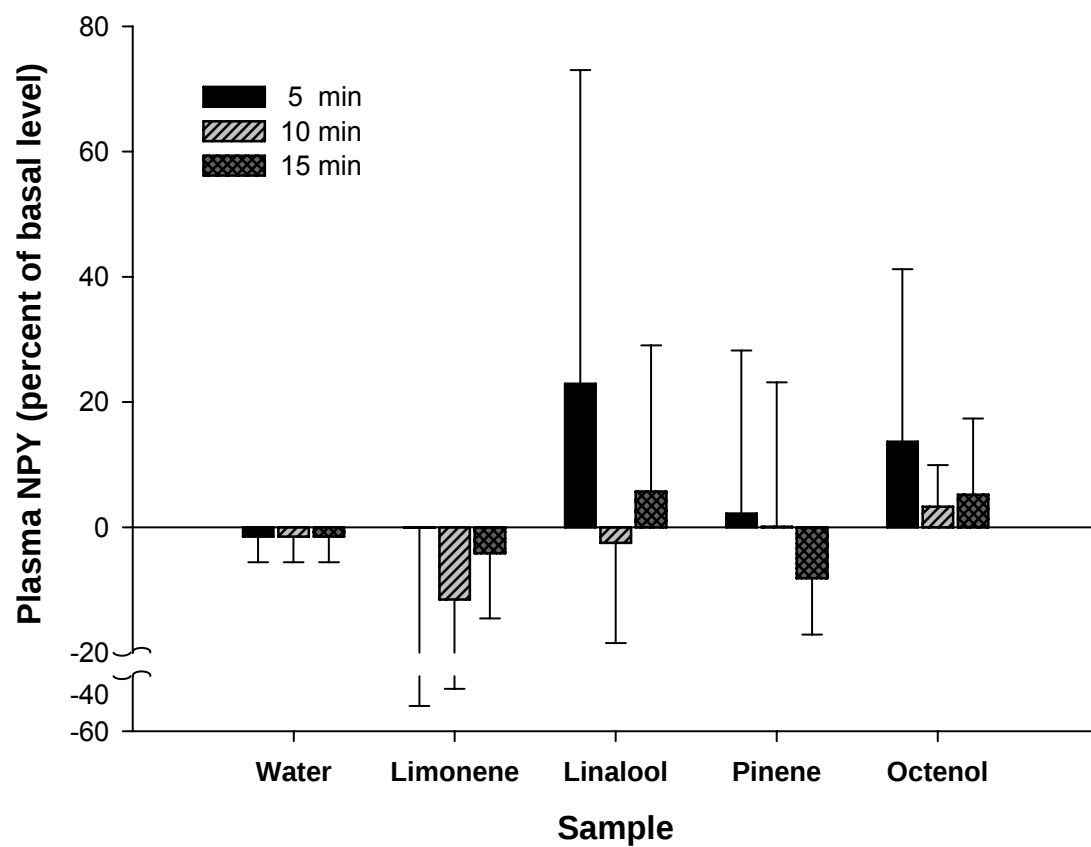


Figure 4. Changes of plasma NPY concentration after stimulating with various spices for 5, 10, 15 min (n=6, mean $\pm$ SD, $P < 0.05$).

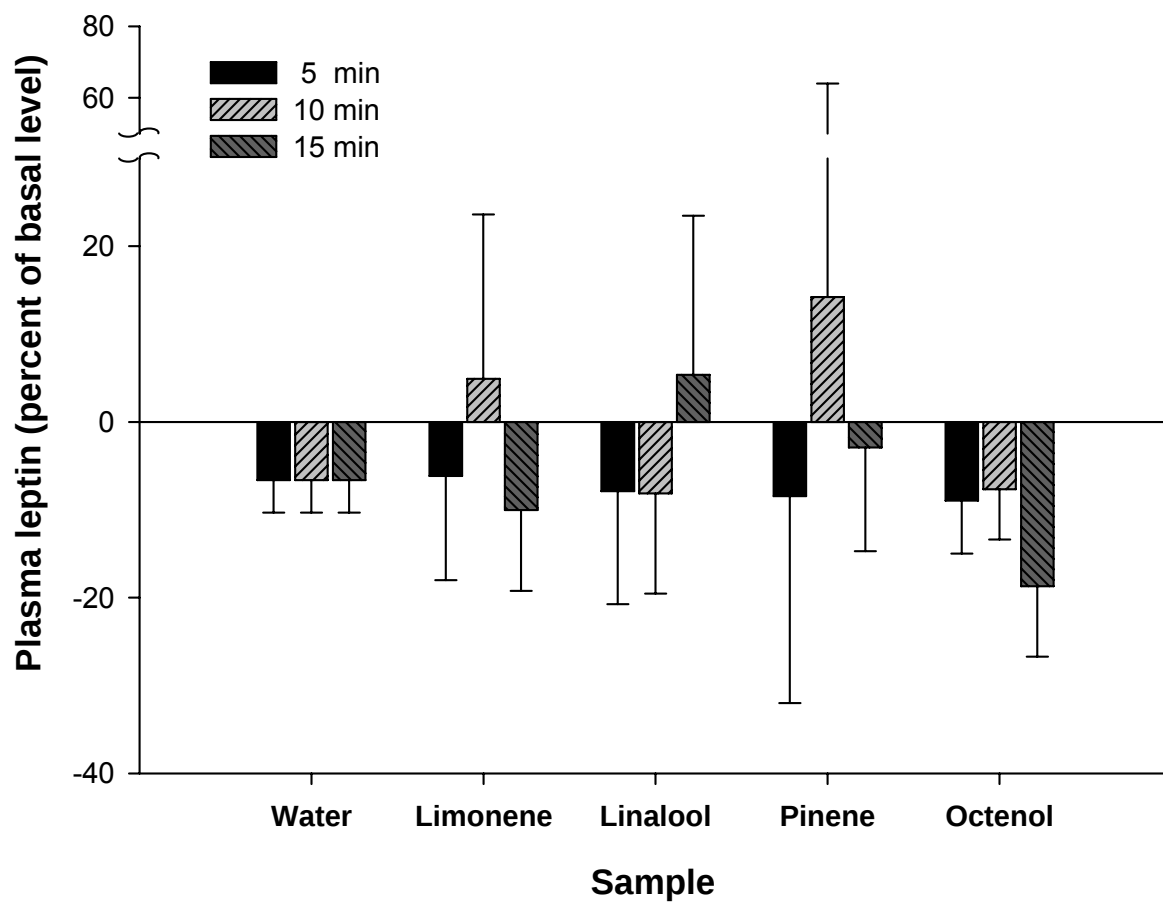


Figure 5. Changes of plasma leptin concentration after stimulating with various spices for 5, 10, 15 min (n=6, mean $\pm$ SD, $P < 0.05$).

Table 1. Limits of concentration used on Rolf B1.T cells for 15 min treatment.

Short name	spices	Limits of concentratuins used (v/v) (100% Cell Viability)
C1	Citronellal	0.08%
C2	Citronellol	0.08%
Citral	Citral	0.04%
Cur	Curcumin	0.05%
Cap	Capsaicin	0.25%
DAS	Diallyl sulfide	0.35%
DADS	Diallyl disulfide	0.08%
E	Eucalyptol	0.35%
G	Geraniol	0.04%
M	Methyl phenylacetate	0.08%
O	1-octen-3-ol	0.35%
P	(-)- α -Pinene	0.35%
V	Vanillin	0.25%



Table 2. Baseline characteristics of experimental subjects

		n	Sex	¹ BMI	Body fat (%)	Age (year)	Education
Control	Water	6	3M 3F	20.89	23.48	24.2	Graduated
Negative	Limonene (80 ppm)	7	4M 3F	23.35	24.63	26.4	Graduated
Positive	Linalool (320 ppm)	6	3M 3F	22.59	24.67	24.7	Graduated
Sample	Pinene (75 ppm)	6	4M 2F	22.10	21.3	25.2	Graduated
	Octenol (2 ppm)	6	4M 2F	26.59	25.3	27.2	Graduated

1: BMI: body weight (kg) /height² (m²)