

東海大學畜產與生物科技學系

Department of Animal Science and Biotechnology

Tunghai University

碩士論文

Master Thesis

指導教授：謝長奇博士

Advisor: Chang-Chi Hsieh, Ph. D.

葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿飲食誘導肝代謝綜合症  
小鼠模式之調節作用

**The Regulatory Effect of Grape Skin Extract on High-fat and  
High-fructose Corn Syrup Induced Hepatic Manifestations of the  
Metabolic Syndrome in Murine Model**

研究生：許珉瑞

Graduate student: Min-Ruei Syu

中華民國一〇四年七月

July 2015

# 論文口試委員審定書

## 東海大學碩士班研究生

### 論文口試委員審定書

畜產與生物科技學系 許珉瑞(學號 G03610006) 君所  
提之論文：

葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿飲食誘導肝代  
謝綜合症小鼠模式之調節作用，經本委員會審議，認為符  
合碩士資格標準。

論文指導教授 謝長奇 (簽章)

畜產與生物科技學系主任 羅敏文 (簽章)

考試委員 林文川：林文川 (簽章)

謝長奇：謝長奇 (簽章)

楊錫坤：楊錫坤 (簽章)

\_\_\_\_\_ (簽章)

\_\_\_\_\_ (簽章)

中華民國 104 年 7 月 3 日

## 致謝

踏入實驗室的這兩年飛快地過去，當初在大學部四年級時向系上申請五年一貫的學程，因緣際會來到了高階研究的領域。感觸最深的是在就讀大學以前，學校經常把實驗課改上正課，失去許多實際操作的寶貴經驗，有幸在進入大學後有很多機會接觸實驗。在正式進入研究所的這一年，不論在實驗、參展及報告方面都有所增長，更加強了身為研究者的一份信心，但是學海無涯，仍需要不間斷地努力。當然學習的過程中，接受了很多人的幫助與支持，讓我這段研究之旅走得平穩踏實。

承蒙恩師 謝長奇教授在修業期間的指導及提供良好的研究環境，讓我順利在五年內完成學士及碩士學位，亦感謝東海大學 楊錫坤教授與中國醫藥大學 林文川教授撥冗審查論文，並在口試時給予評論及指教。修業期間亦蒙受系所諸位老師及各位實驗室同仁幫助，助理新雅學姐、助理秀芳學姐、治暄學長、佑軒學長、婕妤學姐、炯呈學長、宜潔學姐、定邦學長、羽萱學姐、至傑學長、維儒學長、介文學長、君涵學姐、家豪同學、皓仁同學、明駿同學、宴宏同學、迪鈞學弟、育佑學弟、維德學弟、沁玲學妹、朱禕學妹、亭瑩學妹、淑嫻學妹、佳文學妹、羿霏學妹，食科系巧玲學姐、健峰學長、宥勝學長、明興學長及儒碩學姐，在此由衷感謝他們於實驗上的協助，以順利完成各項實驗成果。

最後感謝在艱難的時候陪伴在我身旁的家人和女朋友乙晨，研究所的路途中有他們的支持及鼓勵，讓我能自由發揮、無後顧之憂。完成一件事需要許多人的相助相挺，想要達成設定的目標更需要契機。俗話說「天時、地利、人和」，我想我是幸運的那一個，感謝的話道不盡，期盼在往後的道路上能回饋母校、回饋社會。

# 目錄

摘要	1
Abstract	2
前言	3
壹、 文獻回顧	4
一、 肝臟	4
(一) 肝臟之形態	4
(二) 肝臟之組成	4
(三) 肝臟之功能性指標	5
(四) 肝臟之脂肪組織	6
(五) 肝臟之炎症反應	7
(六) 肝臟之抗氧化系統與指標	13
(七) 肝臟之組織切片	17
二、 腸道菌叢	19
(一) 乳酸菌	20
(二) 大腸桿菌	20
三、 肝代謝綜合症	21
四、 肥胖症	21
五、 糖尿病	22
六、 非酒精性脂肪肝	22

(一) 非酒精性脂肪肝之定義	22
(二) 非酒精性脂肪肝與炎症反應	22
(三) 非酒精性脂肪肝與胰島素阻抗	23
(四) 非酒精性脂肪肝與脂肪酸氧化	23
(五) 非酒精性脂肪肝與腸道菌叢	23
七、 葡萄皮萃取物	24
(一) 功能性成分	24
貳、 研究動機與目的	26
參、 材料方法	27
一、 藥品材料	27
(一) 藥品、試劑	27
(二) 設備、器材	28
二、 實驗方法	30
(一) 實驗動物飼養與試驗分組	30
(二) 肝代謝綜合症之造型模式	30
(三) 實驗動物樣本採集	30
(四) 實驗動物樣本測定項目	31
三、 試驗用藥成分分析	37
(一) 葡萄皮萃取物之白藜蘆醇含量測定	37
四、 統計分析	38

(一) 單因子變異數分析-----	38
<b>肆、 結果-----</b>	<b>39</b>
一、 葡萄皮萃取物之白藜蘆醇含量-----	39
二、 葡萄皮萃取物對肝代謝綜合症之調節-----	39
(一) 實驗小鼠之體重、脾臟、肝臟及脂肪重量-----	39
(二) 口服葡萄糖耐受性試驗-----	39
(三) 血清之肝功能指標測定-----	40
(四) 血清之三酸甘油酯和膽固醇含量-----	40
(五) 肝臟之細胞激素含量-----	40
(六) 肝臟之脂聯素及瘦素含量-----	41
(七) 肝臟之三酸甘油酯含量-----	41
(八) 肝臟病理型態圖-----	41
三、 葡萄皮萃取物對肝代謝綜合症中肝臟病理切片之分析-----	41
(一) 肝臟紅油染色-----	41
(二) 肝臟蘇木紫與伊紅染色-----	41
(三) 肝臟免疫組織化學染色-----	42
四、 葡萄皮萃取物對腸道菌叢之調節-----	42
<b>伍、 討論-----</b>	<b>43</b>
<b>陸、 結論-----</b>	<b>53</b>
<b>柒、 參考文獻-----</b>	<b>54</b>



## 附表及表目錄

附表一	世界衛生組織 BMI 之定義	21
附表二	葡萄皮萃取物相關研究對照表	45
附表三	白藜蘆醇對非酒精性脂肪肝之調節	47
附表四	白藜蘆醇對 C57BL/6J 小鼠糖尿病模式產生炎症反應之調節	48
附表五	白藜蘆醇對 C57BL/6J 小鼠肥胖模式產生炎症反應之調節	49
附表六	白藜蘆醇與腸道菌叢之關係	51
附表七	白藜蘆醇與腸道菌叢對肥胖症之影響	52
表一	葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠之體增重、 肝臟重及脾臟重之影響	69
表二	葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠之腹部脂肪 重、腎周脂肪重及附睪脂肪重之影響	70
表三	葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠之促發炎細 胞激素 IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 TNF- $\alpha$ 之影響	71
表四	葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠之抗發炎細 胞激素 IL-4 之影響	72
表五	葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠之其他細胞 激素 MCP-1、TSLP 及 TGF- $\beta$ 1 之影響	73
表六	葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠之肝臟脂聯 素及瘦素之影響	74





## 附圖及圖目錄

附圖一	脂肪酸進行 $\beta$ 氧化過程	13
附圖二	超氧歧化酶和麩胱甘肽過氧化酶作用機制	14
附圖三	麩胱甘肽作用機制	16
圖一	高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠每週體重記錄	76
圖二	葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠中口服葡萄糖耐受性試驗之影響	77
圖三	葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠中口服葡萄糖耐受性試驗血糖值曲線下面積之影響	78
圖四	葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠中血清天門冬胺酸轉胺酶之影響	79
圖五	葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠中血清丙胺酸轉胺酶之影響	80
圖六	葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠中血清三酸甘油酯之影響	81
圖七	葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠中血清總膽固醇之影響	82
圖八	葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠中肝臟三酸甘油酯之影響	83

圖九	葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠之肝臟病理 形態圖之影響 -----	84
圖十	葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠之油紅染色 (400 x)-----	85
圖十一	葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠之蘇木紫與 伊紅染色 (100 x)-----	86
圖十二	葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠之肝組織切 片 TLR-4 免疫組織化學染色 (400 x)-----	87
圖十三	葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠之肝組織切 片 4-HNE 免疫組織化學染色 (400 x)-----	88
圖十四	白藜蘆醇標準品之 HPLC 圖譜-----	89
圖十五	葡萄皮萃取物之 HPLC 圖譜-----	90

## 摘要

近年來，人們飲食習慣的改變，伴隨著許多代謝相關的慢性疾病產生，過去已有報告指出，肥胖、第二型糖尿病及非酒精性脂肪肝都與肝臟代謝異常相關。本研究主要針對肝代謝綜合症進行探討。於此研究中，我們以 30% 高果糖玉米糖漿及 60% 高脂質飼糧誘導肝代謝綜合症，誘導小鼠額外給予 120、360、600 mg/kg/day 之葡萄皮萃取物十週。測定血清中天門冬胺酸轉胺酶、丙胺酸轉胺酶、三酸甘油酯、總膽固醇及發炎相關細胞激素，利用油紅染色、H&E 染色及 TLR-4、4-HNE 免疫組織化學染色來檢測脂肪堆積。結果顯示，葡萄皮萃取物可以減少血清中天門冬胺酸轉胺酶、丙胺酸轉胺酶、三酸甘油酯、總膽固醇。葡萄皮萃取物也可以調節 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、MCP-1 及 TSLP 等細胞激素在肝臟中含量。另外，在油紅染色及 H&E 染色結果觀察到，葡萄皮萃取物可以減少脂肪的堆積。根據以上結果，葡萄皮萃取物在肝代謝綜合症中具有改善脂肪堆積和炎症反應之作用。

(關鍵字：細胞激素、炎症反應、肝代謝綜合症、葡萄皮萃取物)

## Abstract

In recent years, changes in people's dietary, along with many metabolic-related chronic diseases. This study aimed to explore the hepatic manifestations of the metabolic syndrome (HMMS) including obesity, type II diabetes and non-alcoholic fatty liver disease. In this study, we want to evaluate of grape skin extract against the onset of HMMS induced by 60% high-fat diet and drinking with 30% high-fructose corn syrup solution. Mice administered with grape skin extract (120, 360 and 600 mg/kg/day) for 10 weeks. Serum aspartate aminotransferase (sAST) alanine aminotransferase (sALT), triglyceride (sTG) and total cholesterol (sTC) and inflammatory cytokines were determined. Lipid accumulation in liver tissue sections were determinate by Oil-Red O staining, H&E staining and immunohistochemical staining for toll-like receptor 4 (TLR-4), 4-hydroxy-trans-2-nonenal, 4-hydroxynonenal (4-HNE). Our result indicated grape skin extract could reduce sALT, sTG and sTC. Furthermore, grape skin extract could regulate hepatic interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) and thymic stromal lymphopietin (TSLP). In addition, the histology stained by Oil-Red O and H&E revealed grape skin extract decreased lipid accumulation. According to these results, it is suggested that grape skin extract could improve lipid accumulation in and inflammatory in HMMS.

(Keywords: Cytokine, Inflammation, Hepatic manifestations of the metabolic syndrome, Grape skin extract)

## 前言

近代人們的生活品質提升，身處精緻的飲食文化，外加交通運輸普及和缺乏運動的生活形態下，肥胖的人口劇增，進而產生許多代謝相關的疾病。在現今社會中，肥胖被認為是一種疾病，為身體積累過多的能量，被轉換成脂肪組織儲存在體內所導致。肥胖症的患者，其脂質代謝速率較為快速，而產生大量脂肪酸異常堆積。已有許多研究證實，因肥胖所誘發的疾病如：第二型糖尿病、非酒精性脂肪肝和心血管疾病。2011 年世界衛生組織的報告指出，全世界約有 3.46 億人患有糖尿病，超過 80% 的糖尿病死亡發生在低收入和中等收入國家 (WHO web, 2013)。根據 102 年國人死因統計結果，因患有糖尿病死亡與上一年度比較排名上升到第四位，糖尿病為一種慢性代謝疾病，特徵是血糖在長時間內處在超標的狀態，而且患者會出現吃多、喝多、尿多及體重下降此三多一少的症狀，還會引發許多併發疾病，如中風、慢性腎臟病、足底潰爛及視網膜病變等 (MOHW web, 2015)。另一方面，脂肪肝是指肝臟內所積聚的脂肪重量超過肝臟重量的 5%，或是在肝臟組織切片中超過 10% 以上的肝細胞有脂肪空泡浸潤之情形。脂肪肝在病因上可分為酒精性、非酒精性及其他特殊病因，在病理組織學上，有脂肪變性、脂肪肝炎、肝纖維化甚至肝硬化等階段病徵。根據流行病學的探討，一般人非酒精性脂肪肝盛行率約在 10-24%，其中發現伴隨有脂肪肝炎約 2.7-18.5%，另外患有肥胖者的非酒精性脂肪肝盛行率則高達 58-74%，其中發現伴隨有脂肪肝炎約 20-25%，而在第二型糖尿病患者中約有 75% 罹患非酒精性脂肪肝。臺灣地區近三十年來，由於經濟環境以及飲食的改變，國民疾病型態也跟著改變 (Lin *et al.*, 1992)。慢性病以糖尿病上升速度最為明顯，糖尿病患者逐年增加，對於醫療資源是相當大的負擔，非酒精性脂肪肝的盛行率亦有逐年增高的趨勢。肝臟是脂質代謝的主要謝器官之一，而上述之代謝相關疾病自然與肝臟更是有著密不可分的連結，這些代謝相關之疾病在肝臟中的表現被稱為「肝代謝綜合症」。當肝臟受到脂肪浸潤造成肝細胞損傷，可能導致肝纖維化、肝硬化甚至肝癌。本研究以模擬高油高糖之飲食習慣，給予實驗小鼠 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿之飲水及 60% 之高脂飼糧，誘導肝代謝綜合症產生。並使用葡萄皮萃取物額外餵食實驗小鼠，探討對肝代謝綜合症之影響。

## 壹、 文獻回顧

### 一、 肝臟

#### (一) 肝臟之形態

肝臟為人體內重要的代謝器官，位於人體右側橫膈膜下之腹腔位置，可粗略分為左葉和右葉，而右葉較左葉大，占全部肝臟 60% 以上。正常肝臟呈現紅褐色且外表光滑，質地上較柔軟脆弱，大部分有肋骨來遮蔽保護。肝臟主要有兩個血管通往，分別為肝動脈 (hepatic artery) 和肝門靜脈 (hepatic portal vein)，肝動脈運輸來自心臟動脈的血液，供給肝臟氧氣，肝門靜脈運輸來自消化道的血液，供給肝臟養分。

#### (二) 肝臟之組成

肝臟主要由實質細胞 (parenchymal cell) 和非實質細胞 (nonparenchymal cell) 組成，實質細胞為肝細胞 (hepatocyte)，而非實質細胞種類較多，如：庫氏細胞 (Kupffer cell)、星狀細胞 (stellate cell)、肝竇內皮細胞 (sinusoidal endothelium cell) 及上皮細胞 (epithelial cell) 等。

##### 1. 肝細胞 (hepatocyte)

肝細胞在肝臟中所占比例最多，而肝細胞聚集形成肝小葉，肝小葉為多角形柱狀結構，中間有肝靜脈通過，稱為中央靜脈。肝細胞以中央靜脈為中心呈放射狀排列，肝小葉間的結締組織分佈肝門靜脈、肝動脈及肝管 (bile ductule)，運輸肝細胞分泌的膽汁來協助消化作用。

##### 2. 庫氏細胞 (Kupffer cell)

庫氏細胞為肝竇內的巨噬細胞，由骨髓產生於的單核球，經血液運輸進入肝竇發育成庫氏細胞。庫氏細胞的活化在肝臟炎症反應扮演重要的角色，當肝臟受到來自腸道細菌的脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS) 這類內毒素 (endotoxin) 刺激時，庫氏細胞的細胞膜上 TLR4 受體與 CD14 受體會被活化，誘發許多促進發炎的物質產生，如：細胞激素 (cytokines) 和趨化因子 (chemokines) 等，進而引發更多的免疫細胞產生炎症反應。

##### 3. 肝竇內皮細胞 (sinusoidal endothelium cell)

內皮細胞位於肝竇腔的肝細胞之間，單層圍繞形成靜脈竇，肝門靜脈和肝動脈分支流入管腔，進入肝靜脈。內皮細胞為非連續性排列且具有高度通透性，因此血漿能通過而進入肝細胞，同時也讓肝細胞產生的物質進入血液中。肝細胞和靜脈竇之間的空間構成了竇旁腔

(perisinusoidal) 或迪氏腔 (space of Dissue) ，此為血液和肝細胞物質交換的主要場所。內皮細胞是發生炎症反應主要的對象，當它們受到損傷會導致血管病變和器官功能障礙 (Aird, 2003) 。

#### 4. 肝臟星狀細胞 (hepatic stellate cell, HSC)

主要位於竇旁腔間隙，形態為不規則型，緊鄰著肝細胞和肝竇內皮細胞，常伸出數個星狀細胞突與鄰近星狀細胞接觸。在肝臟正常情況下，星狀細胞處於靜止期，有絲分裂活動低且主要儲存維生素 A (Al-Rasheed *et al.*, 2015)。當肝臟受到損傷時，星狀細胞會活化轉型成類肌纖維母細胞 (myofibroblast-like cells)，此時進入活化狀態，並開始釋放結蛋白 (desmin) 和  $\alpha$ -平滑肌肌動蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) (Al-Rasheed *et al.*, 2015; Friedman, 2008)。活化的星狀細胞會分泌促進發炎和纖維化的細胞激素，造成細胞外基質 (extracellular matrix, EMC) 不正常增生，影響周邊其他細胞，是肝臟纖維化的主要成因之一。

#### 5. 上皮細胞 (epithelial cell)

上皮細胞是位於肝臟最外圍的組織，上皮細胞與內皮細胞屏障 (epithelial/endothelial barrier) 的損傷和細胞的凋亡會導致炎症反應，並且活化 Toll-like receptor (TLR) 的訊息傳遞，於受傷組織中釋放細胞激素，如 Interleukin 33 (IL-33) 和 Thymic stromal lymphopietin (TSLP)，再進一步活化 Kupffer cell 分泌促發炎細胞激素 (pro-inflammation)，如：IL-6、Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )，造成肝臟持續發炎 (Wigg *et al.*, 2011)。

### (三) 肝臟之功能性指標

肝臟參與了新陳代謝、解毒、造血及免疫防禦等功能，富含有許多酶蛋白，其中天門冬胺酸轉胺酶 (aspartate aminotransferase, AST) 和丙胺酸轉胺酶 (alanine aminotransferase, ALT) 所占比例最高。正常肝細胞由於有細胞膜的屏障，AST 和 ALT 不會進入血液，若肝臟受到損傷而肝細胞產生變性，細胞膜通透性增加或是破裂後，AST 和 ALT 就會從細胞漿釋放到血液中。在判斷肝細胞損害方面，ALT 相較於 AST 敏感性高，是目前臨床上普遍使用的指標。

#### 1. 天門冬胺酸轉胺酶 (aspartate aminotransferase, AST)

AST 廣泛存在於心臟、肝臟、腎臟、肌肉及腦中，在人血清中正常值範圍在 40~50 U/L 之間；而小鼠血清中正常值範圍在 60~100 U/L 之間。若這些組織器官受到損傷，AST 就會釋放到血液中，造成血液中 AST 濃度上升，AST 相對於 ALT 較沒有專一性，可做為診斷肝臟損



傷的輔助因子。

## 2. 丙胺酸轉胺酶 (alanine aminotransferase, ALT)

ALT 主要存在於肝細胞中，在人血清中正常值範圍在 30~40 U/L 之間。當肝臟受到損傷時，ALT 就會釋放到血液中，造成血液中 ALT 濃度上升，而 ALT 較具專一性，在肝臟中 ALT 的總活性為血清中的數千倍以上，對肝臟損傷反應靈敏，可做為診斷肝臟損傷的指標因子。

### (四) 肝臟之脂肪組織

脂肪組織長久以來被認為是單純儲存能量的場所，近年來，已經有證據顯示脂肪組織實際上是一個活躍的內分泌 (endocrine) 和旁分泌 (paracrine) 器官，分泌的物質包括荷爾蒙、細胞激素及生長因子，它們被統稱為脂肪細胞激素 (adipokines)，其中有些主要由脂肪細胞合成，如脂聯素 (adiponectin)、瘦素 (leptin)；另外一些源自其他來源，如抵抗素 (resistin)、促發炎細胞激素 (pro-inflammatory cytokines)。脂肪細胞激素參與多種生理的調節作用，包括葡萄糖和脂質代謝中對胰島素之反應，以及內皮細胞上細胞激素信號傳遞產生的炎症反應 (Li *et al.*, 2011)。

#### 1. 脂聯素 (Adiponectin)

脂聯素為脂肪組織分泌的細胞激素，與 type VIII、type X 的膠原蛋白及補體因子 C1q (complement factor C1q) 為同源。脂聯素被發現位於末梢血液 (peripheral blood) 擁有很高的含量，且存在許多不同分子所組成的異構體 (Oh *et al.*, 2007)。脂聯素的信號會透過兩個受體 AdipoR1 (在骨骼肌較常表現) 和 AdipoR2 (在肝臟中表現) 傳遞，當脂聯素鍵結在 AdipoR1 和 AdipoR2 上後，會刺激活化 AMPK 和 PPAR $\gamma$  及其他分子 (Kadowaki *et al.*, 2008)。在肝臟中，脂聯素會增加脂肪酸的氧化並且減少葡萄糖的合成，在脂聯素基因剔除 (knockout) 小鼠實驗中，給予一般飼糧的小鼠身上沒有發現很大的變化，但在給予高脂飼糧的小鼠身上則發現，嚴重的胰島素阻抗和肌肉中脂肪蓄積。病態肥胖的患者血清中脂聯素含量較低，而在體重減少或是給予藥物來增加其胰島素敏感性，如：胰島素增敏劑 (thiazolidinediones)，皆會使血清中脂聯素含量提高 (Oh *et al.*, 2007; Kadowaki and Yamauchi, 2005)。脂聯素在心血管疾病、第二型糖尿病及代謝綜合症扮演重要的角色 (Swellam *et al.*, 2009)，臨床研究指出能改善胰島素抗性、動脈硬化及第二型糖尿病。它在先天免疫和適應性免疫系統皆有相關作用，會協助多種不同類型細胞的胰島素敏感性增加、抑制炎症反應及抗細胞凋亡 (Turer and

Scherer, 2012)。脂聯素會抑制巨噬細胞的吞噬活性 (phagocytic) 和IL-6、TNF產生，還可促使人體單核球、樹突細胞及巨噬細胞產生抗發炎介質，如：IL-10、IL-1RA (Wolf *et al.*, 2004)。具有抗發炎的作用，同時對肝細胞也有保護的效果。

## 2. 瘦素 (Leptin)

瘦素第一次被描述是在1994年 (Zhang *et al.*, 1994)。瘦素又名肥胖荷爾蒙，是由肥胖基因 (*ob gene*) 編碼的蛋白質，為脂肪細胞分泌，功能為調節脂肪的儲存，加速生物新陳代謝，與下視丘協同作用來抑制食慾。另外，瘦素可以增加交感神經的活性，啟動脂肪細胞膜上的腎上腺素受體增加能量消耗，對胰島素的合成、分泌發揮負反饋調節作用。瘦素還會直接作用於肝臟與骨骼肌細胞，促使脂肪酸氧化，從而減少脂肪堆積。若生物 *ob gene* 缺失，食慾旺盛、體重增加，最後導致病態肥胖。瘦素的訊號因子經由瘦素受體 (leptin receptor, ObR) 傳遞，它存在許多異構型 (isoforms) (Villanueva and Myers, 2008)。瘦素是免疫系統重要的調節者，瘦素缺陷 (*ob/ob*) 或瘦素接受體 (*db/db*) 缺陷的小鼠其胸腺會萎縮造成免疫缺陷 (Howard *et al.*, 1999)。瘦素被認為是一種促進發炎的脂肪細胞因子 (pro-inflammatory adipokine)，因為它存在免疫系統許多的細胞中，包括單核球 (monocytes)、巨噬細胞 (macrophages)、樹突細胞 (dendritic cell)、嗜中性球 (neutrophils)、嗜鹼性球 (eosinophils)、嗜酸性球 (basophils)、自然殺手細胞 (natural killer cells) 及淋巴細胞 (Ahima, 2006; Moraes-Vieira *et al.*, 2014; Andrade-Oliveira *et al.*, 2015)。在人體中，瘦素證實會促使抗原呈現CD4之T細胞朝Th1輔助細胞分化，並且刺激單核球活化和增殖。瘦素在活化的單核球和巨噬細胞中輔助細胞吞噬活性，並且產生白三烯 (leukotriene)、環氧酶 (cyclooxygenases)、一氧化氮及促進發炎的細胞激素 (Zarkesh-Esfahani *et al.*, 2001)。

### (五) 肝臟之炎症反應

肝臟可能由病毒、藥物、酒精或代謝異常引起肝炎 (hepatitis)，又分為慢性和急性肝炎兩種。最常見的原因是病毒感染造成，如廣為人知的B型肝炎和C型肝炎。肝臟發炎會導致肝細胞受損，進而影響肝臟在代謝系統的運作異常。非酒精性脂肪肝炎與酒精性肝炎相類似，不同點是非酒精性脂肪肝炎患者沒有酗酒習慣，是由於肥胖或新陳代謝疾病引發，共同點是肝臟中脂肪油滴的浸潤和發炎細胞激素的分泌，以下介紹這些與炎症反應有關的細胞激素。

#### 1. 白血球介素 1 (Interleukin 1, IL-1)

IL-1 是第一個被確立的白血球介素，IL-1 幾乎影響到所有細胞和器官，主要調節自體免疫、傳染病及退化性疾病等 (Dinarello *et al.*, 2010; Dinarello *et al.*, 2012; Garland *et al.*, 2013)。IL-1 為一個典型的內源性致熱源，會引起發燒，藉此提高溫度來增加白血球的活動。另外，還會刺激下視丘-腦垂體-腎上腺軸 (hypothalamus-pituitary-adrenal axis, HPA axis) 下游的皮質醇 (cortisol)，來調節免疫系統和炎症反應。IL-1 $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  鍵結相同的受體 (IL-1R1)，但由不同的基因所編碼，具有相似的生理性質。IL-1 $\alpha$  前驅物存在肺臟、肝臟、腎臟及腸胃道的上皮及內皮細胞中，當 IL-1 $\alpha$  前驅物分泌後會引發細胞壞死。IL-1 $\alpha$  前驅物本身具有活性，透過快速啟動發炎細胞激素和趨化因子 (Chen *et al.*, 2007; Rider *et al.*, 2011)，來引發早期的炎症反應 (Berda-Haddad *et al.*, 2011)。相反地，IL-1 $\beta$  是由造血細胞 (hematopoietic cells)、巨噬細胞、樹突細胞和微膠細胞 (microglia) 經 TLR、補體 (complement) 及其他細胞激素刺激後所分泌 (Dinarello, 2011)。而 IL-1 $\beta$  前驅物不像前述 IL-1 $\alpha$  前驅物一樣本身具有活性，未活化的 IL-1 $\beta$  前驅物經由和凋亡蛋白酶 1 (caspase 1) 形成複合物，最後裂解成具有活性的細胞激素 (Garland *et al.*, 2013)。IL-1 $\beta$  由脂肪組織所表現和分泌，並且為促進發炎的細胞激素，在第一型糖尿病中胰腺  $\beta$  細胞的損壞有著重要的作用。

## 2. 白血球介素 4 (Interleukin 4, IL-4)

IL-4 首次被發現是由 Th2 細胞分泌的細胞激素 (Chomarat and Banchereau, 1997)，之後陸續發現自然殺手 T 細胞 (NK T cells)、嗜鹼性球 (basophil)、嗜酸性球 (eosinophils) 及肥大細胞 (mast cells) 皆會分泌 IL-4。由於 IL-4 與 CD40 協同作用刺激 B 細胞分化和增殖，被認為是 B 細胞的生長因子 (Idzerda *et al.*, 1990)。在 IL-4 刺激下，一些免疫球蛋白也會隨著產生，如：IgG、IgE (Paul, 1987)，促使往第二型的免疫反應發展。IL-4 在 B 細胞也會誘導第二型主要組織相容性複合體 (MHC class II) 表現量增加。IL-4 是由活化的 CD4<sup>+</sup> Th2 細胞產生，並促使未分化之 T 細胞分化成 Th2 細胞 (Thieu *et al.*, 2007)。IL-4 做為調節免疫反應之調節器，也會促使其他抗發炎細胞激素產生和抑制炎症反應。

## 3. 白血球介素 6 (Interleukin 6, IL-6)

IL-6 是由 184 個胺基酸殘基經轉譯後修飾，形成 4 個互相連結的  $\alpha$  螺旋結構之醣蛋白，為一種強力刺激免疫系統和促進炎症反應的細胞激素 (Hammacher *et al.*, 1994)。IL-6 受到病毒感染 (Paludan, 2001) 或 LPS 刺激 (Eggesbo *et al.*, 1996; Beurel and Jope, 2009) 下而分泌，在

受損的組織中，IL-6 的產生通常也促進了 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的產生，主要由軟骨細胞、成骨細胞、巨噬細胞及脂肪細胞分泌 (Guerne *et al.*, 1990)。起初，IL-6 由於增加 B 細胞免疫球蛋白產生，如：IgG、IgM，而被命名為 B 細胞刺激因子 2 (B cell stimulation factor 2) (Hirano *et al.*, 1985)。IL-6 的分泌對 B 細胞會產生更劇烈地炎症反應和自體免疫現象，相反地，若缺乏 IL-6 會導致免疫缺乏，例如：IL-6 缺陷之小鼠其 B 細胞不會輔助 T 細胞極化成 Th17，使得串聯起整個炎症反應的過程中斷 (Bao and Cao, 2014)。在人體中，在全身性紅斑性狼瘡 (Systemic lupus erythematosus) 和 Castleman's 症的患者上皆檢測到 IL-6 之升高 (Bao and Cao, 2014; Yoshizaki *et al.*, 1989)。綜上所述，B 細胞產生 IL-6 促使炎症反應，製作抵抗致病菌之抗體並且使 T 細胞增殖 (Vazquez *et al.*, 2015)。

#### 4. 白血球介素 10 (Interleukin 10, IL-10)

IL-10 主要由 Th2 細胞、巨噬細胞分泌，是一種抗發炎的細胞激素，會抑制其他促進發炎的細胞激素產生，如：IL-1 及 TNF- $\alpha$  (De Waal Malefyt *et al.*, 1991)。IL-10 可以負調節免疫細胞上 MHC class II 表現 (De Waal Malefyt *et al.*, 1991)，還能抑制自然殺手細胞 (Naturalkiller cell, NK cell) 活性，干擾 NK cell 和巨噬細胞產生促進發炎細胞激素；另一方面則是促進 B 細胞分化產生抗體。研究結果顯示，IL-10 在小鼠由 CD4+ Th2 細胞產生，並且抑制巨噬細胞產生其他細胞激素 (Fiorentino *et al.*, 1989)。IL-10 在人類則是透過負調節 MHC class II 來降低抗原呈現的能力，並抑制 T 細胞增殖。例如：當單核球受到 LPS 刺激產生細胞激素，促使炎症反應抵禦外來有害物質，當環境不再受到威脅時，IL-10 可抑制 IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 TNF- $\alpha$ ，降低炎症反應 (De Waal Malefyt *et al.*, 1991)。

#### 5. 白血球介素 13 (Interleukin 13, IL-13)

IL13 與 IL4 的基因位置相近，位於人類第 5 條染色體及小鼠第 11 條染色體。IL-13 和 IL-4 可以刺激相同的調節分子，並且在過敏組織中可以分離出這些細胞激素。CD4+ Th2 細胞能同時表達 IL-13 和 IL-4，為改善過敏性疾病 (allergic disease) 的指標 (Catley *et al.*, 2011)。

#### 6. 白血球介素 33 (Interleukin 33, IL-33)

IL-33 為一個 30 kDa 大小的蛋白質，與凋亡蛋白酶 1 (caspase 1) 形成複合體會失去活性 (Cayrol and Girard, 2009)。IL-33 參與了 Th2 細胞的免疫反應，當細胞壞死或是異常的情形發生，IL-33 便會被活化分泌 (Lefrancais *et al.*, 2012)。在巨噬細胞中，IL-33 有利於脂多醣依

賴性 (LPS-dependent) 的細胞激素和趨化因子產生，並有研究指出 IL-33 和 receptor ST2 結合後，其下游的細胞訊息會負向調節 TLR，增加 LPS 接受體 (MD2/CD14 and TLR-4) 和 MyD88 連接器 (adaptor) 的表現 (Espinassous *et al.*, 2009)。

#### 7. 腫瘤壞死因子 (Tumor necrosis factor, TNF)

TNF 為急性反應蛋白中重要的細胞激素之一，它調節許多炎症反應且牽涉多種疾病的病理機制，如癌症、敗血症、類風濕性關節炎、糖尿病及炎性腸病 (Wong *et al.*, 2008; Bassi *et al.*, 2012; Castoldi *et al.*, 2012)。因為 TNF 在肥胖小鼠和人體中是由脂肪組織分泌，所以被認為是一種脂肪細胞激素 (adipokine) (Hotamisligil *et al.*, 1995; Uysal *et al.*, 1997)。在人體中 TNF 有兩種形式，分別為 TNF- $\alpha$  和 TNF- $\beta$ ，除了造成關節發炎，也會導致發燒、厭食、休克、肝臟壞死等症狀。TNF- $\alpha$  主要作用是調節免疫細胞的功能，為一種內源性致熱原，它能夠促使發熱，引起細胞凋亡。包括凋亡蛋白酶 (caspases)、核轉錄因子  $\kappa$ B (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- $\kappa$ B)、促分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAP kinase)，這些信號傳遞途徑之間的相互作用，會促使 TNF 分泌產生炎症反應 (Janes *et al.*, 2006)。TNF 的信號傳遞會誘使促進發炎細胞激素表現，如：IL-1 $\beta$ 、IL-6，而這些促進發炎細胞激素會再啟動更進一步的炎症反應。在肥胖大鼠實驗中，對 TNF 的中和作用 (neutralization) 會誘導胰島素對周圍葡萄糖的攝取增加 (Spiegelman and Hotamisligil, 1993)，而在小鼠 TNF 基因缺失的實驗中，不論是在單基因 (monogenetic) 或是飲食誘導肥胖模式下，其胰島素敏感性 (insulin sensitivity) 皆顯著改善 (Uysal *et al.*, 1997)，這些結果顯示阻斷 TNF 可能會改善胰島素敏感性和其相關好處。確實地，在另外給予小鼠抗 TNF 的抗體的實驗中，減少了炎症反應，並防止了飲食誘導造成的肥胖和胰島素抵抗 (Li *et al.*, 2003; Liang *et al.*, 2008)。

#### 8. 單核球趨化蛋白-1 (Monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)

MCP-1 又稱為趨化激素配體 (Chemokine ligand 2, CCL2)，其主要功能為活化和趨化單核球、巨噬細胞及 T 細胞 (Taub *et al.*, 1995)，促使巨噬細胞浸潤組織並產生炎症反應。研究顯示，單核球本身會產生 MCP-1，表示這些細胞可以自行調節在組織中的表現，另發現到纖維母細胞的腫瘤組織 (fibroblasts tumor cells)、平滑肌細胞 (smooth muscle cells) 及內皮細胞 (Endothelial cells) 皆會產生 MCP-1。而內毒素和促進發炎細胞激素，如：IL-1、TNF- $\alpha$ ，則會

刺激 MCP-1 產生 (Colotta *et al.*, 1994)。

#### 9. 胸腺基質淋巴細胞生成素 (Thymic stromal lymphopoietin, TSLP)

TSLP最早被發現在老鼠的胸腺基質細胞，TSLP主要由非造血組織分泌的細胞激素，如纖維細胞或上皮細胞。TSLP 和IL-7為兩個主要調控小鼠B細胞發育的細胞激素 (Vosshenrich *et al.*, 2004)，也能活化樹突細胞 (Watanabe *et al.*, 2005)。在體外試驗 (*in vitro*) 中，TSLP會誘導小鼠胎兒的骨髓和肝臟的原B細胞 (pro-B cells) 發育。B細胞在發育過程中，會發展出免疫球蛋白抗原之受體 (Ig antigen receptors) (Stocker *et al.*, 1974)。此階段原B細胞重新排列免疫球蛋白重鏈 (Ig heavy chain) 的蛋白質組成 (Hardy *et al.*, 1991)，並且與免疫球蛋白輕鏈 (Ig light chain) 配對，由 $\gamma 5$ 和Vpre-B所構成，形成了前B細胞受體 (pre-B cell receptor, pBCR)，而在小鼠身上的前B細胞缺乏 $\gamma 5$ ，以至B細胞的前驅物於無法形成pBCR。研究發現，小鼠B細胞進入發育晚期時，其肝臟不需要pBCR，TSLP也會繼續促進肝臟的原B細胞增殖，而骨髓的B細胞則需要TSLP與前B細胞 (pre-B cells) 的受體反應才能進行後續發展 (Vosshenrich *et al.*, 2004; Levin *et al.*, 1999)。

#### 10. 轉型生長因子- $\beta 1$ (Transforming growth factor $\beta 1$ , TGF- $\beta 1$ )

TGF- $\beta$ 為一種多功能的細胞激素 (cytokine)，透過特殊的細胞受體來調節特定細胞的生長、分化及死亡。當TGF- $\beta$ 自細胞分泌至血液中時，並不具有生物活性 (biological activity) 而為潛伏型 (latent form)，且與攜帶蛋白 (carrier protein,  $\alpha 2$ -macroglobulin) 相結合循環於全身 (Massague *et al.*, 1990)。在胞漿素 (plasmin) 的輔助下，休眠狀態的TGF- $\beta$ 與細胞膜上轉型生長因子的受體結合而被活化，並透過一連串的訊號傳遞表現其功能。TGF- $\beta$ 為刺激HSCs促進纖維化的關鍵因子，纖維化過程中隨著TGF- $\beta$ 活性上升，HSCs增殖且膠原蛋白沉積，使器官功能喪失。因此，TGF- $\beta$ 在肝臟中大量表現會導致肝纖維化現象產生。TGF- $\beta$ 有三種不同的異構體TGF- $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 及 $\beta 3$ ，目前最被廣泛研究的是TGF- $\beta 1$ 。在HSCs中，TGF- $\beta 1$ 會促進其轉型為肌纖維母細胞且大量產生細胞基質沉積 (Gressner and Weiskirchen, 2006)。

#### 11. 干擾素 $\gamma$ (Interferon gamma, IFN- $\gamma$ )

IFN- $\gamma$  為一種對抗病毒和胞內細菌感染的細胞激素，並且能活化巨噬細胞。IFN- $\gamma$  的表現量異常，通常與炎症反應和免疫相關疾病有關。有研究發現，IFN- $\gamma$  在炎症反應和脂肪細胞的增生中有著密切的作用 (Rocha *et al.*, 2008; Wellen and Hotamisligil, 2003)。另外有動物研究

指出，IFN- $\gamma$  具有抗纖維化之效果，顯示 IFN- $\gamma$  會抑制 HSCs 活化並刺激 NK 細胞攻擊活化的 HSCs (Jeong *et al.*, 2006; Baroni *et al.*, 1996)。在 B 型肝炎和 C 型肝炎患者身上，使用 IFN- $\gamma$  治療有改善肝纖維化的現象 (Muir *et al.*, 2006)，但在肝臟疾病晚期的臨床試驗中，則沒有顯著的影響 (Pockros *et al.*, 2007)。綜合上述試驗，IFN- $\gamma$  可能有益於治療早期階段的肝纖維化，而晚期階段的肝硬化則沒有太大作用。

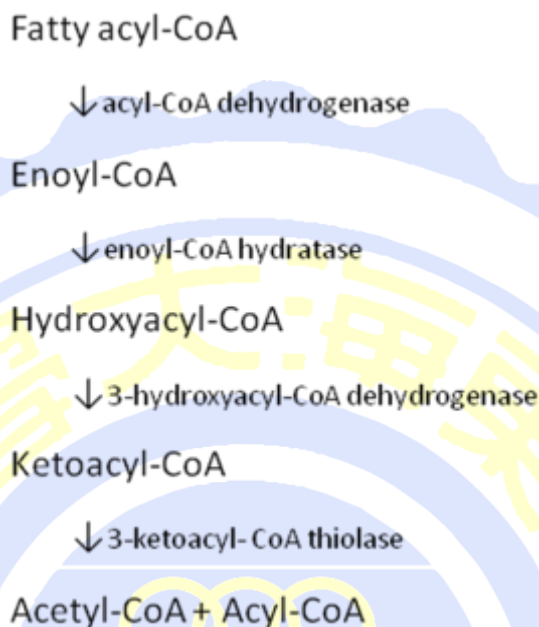
## 12. 核轉錄因子 $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- $\kappa$ B)

NF- $\kappa$ B 是由不同的次單元 (subunits) 組成的二聚體 (dimers)，正常情況下，NF- $\kappa$ B 和其抑制蛋白 (inhibitor of NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B) 鍵結位於細胞質中，為未活化的狀態。當細胞接受外來的訊息刺激後，如：脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS)，I $\kappa$ B 會被其激酶 (I $\kappa$ B kinase, IKK) 將其磷酸化，使 I $\kappa$ B 降解而失去抑制作用。此時 NF- $\kappa$ B 便轉移進入細胞核中，與其調控基因的啟動子 (promoter) 結合，進而活化該基因的表現 (多半為誘發炎症反應的基因) (Zhang and Frei, 2001)。目前研究證明，NF- $\kappa$ B 可以調節細胞激素 (cytokines)、趨化激素 (chemokines) 及黏附分子 (adhesion molecules) 的表現 (Zhang and Frei, 2001)。當細胞受到刺激時，這些激素會被釋放出來，並且影響細胞的生長、活化、發炎、免疫力及組織修補等功能。這些激素不僅作用到免疫細胞，其他如：內皮細胞、神經細胞都會受到影響。影響 NF- $\kappa$ B 活性之機制有許多，其中之一為細胞膜上 TNF- $\alpha$  與腫瘤壞死因子受體 (TNF receptor) 結合後會誘導腫瘤壞死因子受體之相關死亡蛋白 (TNF receptor-associated death domain protein; TRADD)、受體互動蛋白 (receptor-interacting protein, RIP) 及腫瘤壞死因子受體相關因子-2 (TNF receptor-associated factor 2, TRAF 2) 等的活化。接著，腫瘤壞死因子受體相關因子-2 會活化 IKK，活化的 IKK 藉由抑制 I $\kappa$ B 之功能使 NF- $\kappa$ B 被釋，NF- $\kappa$ B 即可進入細胞核中成為轉錄因子或是抑制細胞凋亡作用。

### (六) 肝臟之抗氧化系統與指標

脂肪酸主要是透過  $\beta$  氧化 ( $\beta$ -oxidation) 來產生能量，此過程是在粒線體基質中進行，當中有 acyl-CoA dehydrogenase、enoyl-CoA hydratase、3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and 3-ketoacyl-CoA thiolase 這四個酵素參與催化作用 (Eaton *et al.*, 1996)。肉鹼棕櫚酸轉移酶 (Carnitine palmitoyltransferase, CPT) 為粒線體調節  $\beta$ -oxidation 的關鍵酵素，它會催化脂醯輔酶 A (fatty acyl-CoAs) 轉變成 fatty acyl-carnitine，然後進入粒線體基質繼續進行反應 (Kerner

and Hoppel, 2000)。另外，醯基輔酶 A 氧化酶(Acyl-CoA oxidase, ACO) 為過氧化小體 (peroxisomal) 分泌的酵素，涉及脂肪酸的氧化反應 (Duplus and Forest, 2002)。脂肪酸進行  $\beta$  氧化過程如下 (附圖一) 所示。



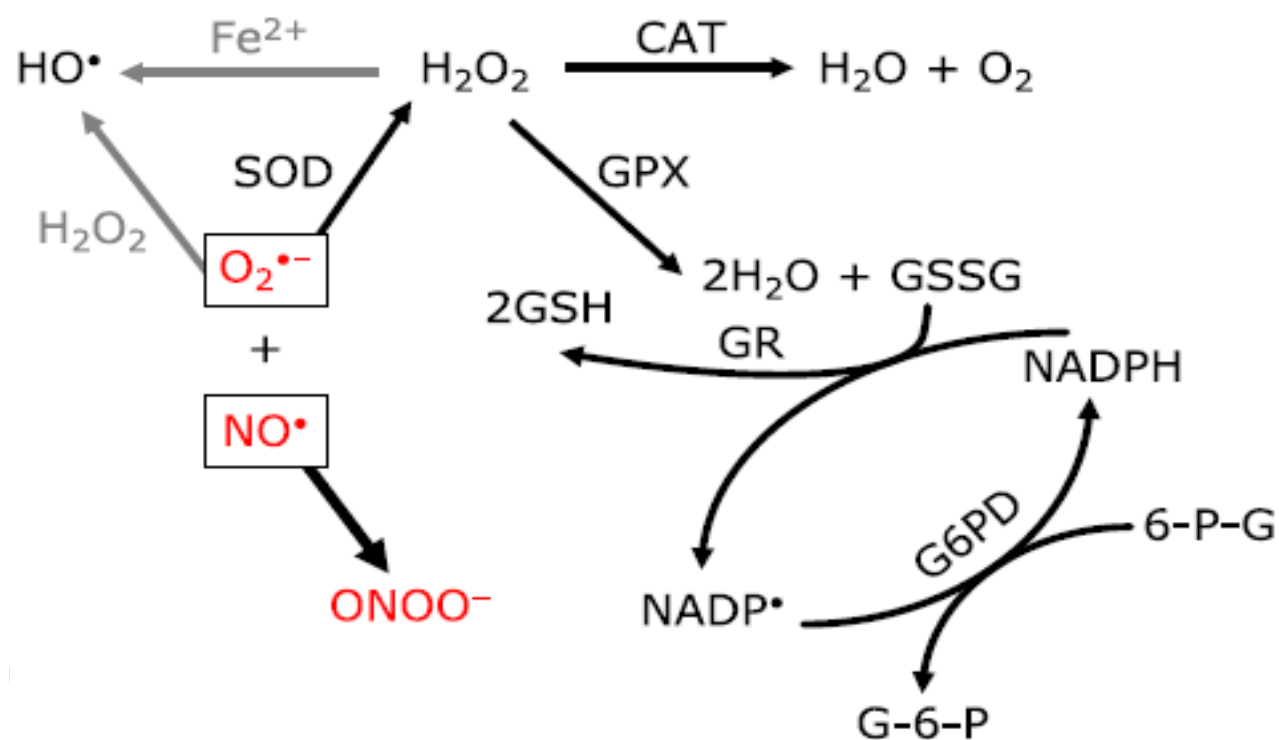
附圖一、脂肪酸進行  $\beta$  氧化過程

當正常的脂肪酸氧化過程改變，轉而變成帶有自由基的脂質時，不但不會產生能量，反而會沉積在血管壁上引發疾病。研究報告指出，當組織受到外界病原體入侵造成疾病時，脂質過氧化的作用會明顯增加，如：糖尿病、類風濕性關節炎、動脈硬化及酒精性脂肪肝等。因此，脂質過氧化可以被作為組織氧化傷害的指標。脂質過氧化為自由基對細胞膜上的多元不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid) 進行自我催化連鎖反應 (autocatalytic chain reaction)，此作用產生許多脂質過氧化物。細胞膜上的不飽和脂肪 (unsaturated lipid) 與自由基反應產生脂質過氧化物 (lipid hydroperoxides)。當自由基作用於多元不飽和脂肪酸，和  $H^+$  作用形成脂烴自由基 (lipid alkyl radical)，在多元不飽和脂肪酸雙鍵上產生共振，轉變成共軛二烯 (conjugated diene)。接著，共軛二烯與氧接觸反應形成脂質過氧自由基 (lipid peroxy radical)。脂質過氧自由基與  $H^+$  作用形成不穩定的脂質過氧化物，最後會分解代謝成醛類、烷類或烯類，其中丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 為醛類代謝的產物。

生物體內會產生自由基，造成細胞或組織的損傷，而生物體自身擁有抗氧化的防禦機制，可以去除活性氧和自由基的產生，並修復自由基造成的損傷。肝臟中也存有一些抗氧化系統，



可分為酵素型如：超氧歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和麩胱甘肽過氧化酶 (glutathione peroxidase, GPx)；非酵素型如：麩胱甘肽 (glutathione, GSH) 等 (Jacob *et al.*, 1995)。SOD 和 GPx 作用機制如下 (附圖二) 所示。



附圖二、超氧歧化酶和麩胱甘肽過氧化酶作用機制

### 1. 丙二醛 (Malondialdehyde, MDA)

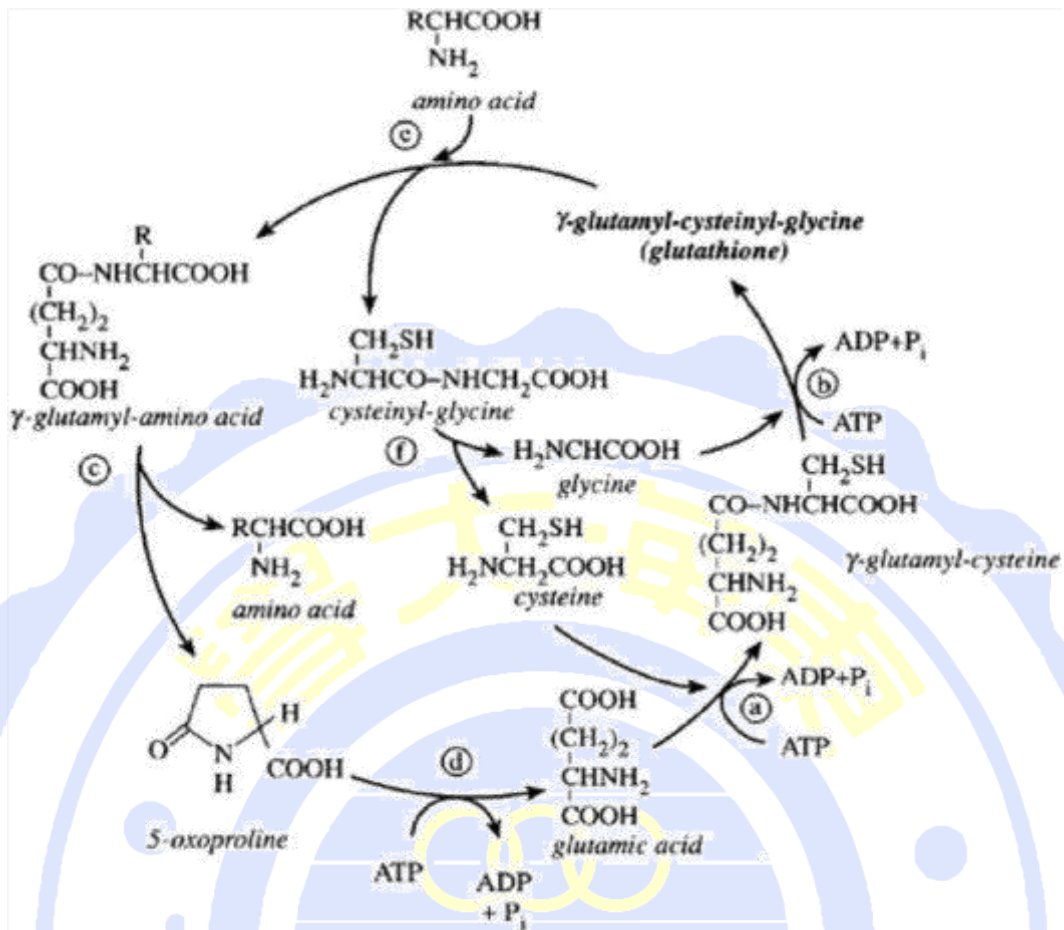
MDA 為脂質過氧化的產物之一，由於細胞膜磷脂 (phospholipids) 降解，MDA 被釋放到細胞外並進入血液，常被當作生物體過氧化傷害或是食品脂肪酸過氧化之指標 (Dalle-Donne *et al.*, 2006)。MDA 是不飽和脂肪酸代謝的副產物經過氧化分解所產生，過多的 MDA 生成會造成組織損傷，且會與游離胺基酸結合形成複合物，這些被修飾過的蛋白其生理特性產生改變 (Stocker and Keaney, 2004)。臨床上，發現到 MDA 與動脈粥狀硬化 (atherosclerosis) 高度相關 (Berliner and Heinecke, 1996)，在糖尿病患者身上發現到血漿 MDA 濃度明顯增加 (Slatter *et al.*, 2000)。研究上廣泛使用硫代巴比妥酸 (thiobarbituric acid, TBA) 與 MDA 產生反應呈色，兩物質結合後產生粉紅色產物 TBARS，TBARS 顏色越明顯也間接顯示 MDA 量越多。

## 2. 超氧歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)

1938 年 Marn 等人首次從牛紅血球中分離得到超氧化物歧化酶開始算起，人們對 SOD 的研究已有七十多年的歷史。1969 年 McCord 等重新發現這種蛋白，並且發現了它們的生物活性 (McCord and Fridovich, 1969)，SOD 催化過氧陰離子 (Superoxide anion) 經歧化反應轉換成  $H_2O_2$  和  $O_2$  ( $O_2^{\bullet-} \rightarrow H_2O_2 + O_2$ )，故正式命名為超氧化物歧化酶，普遍存在好氧的生物體。SOD 為一種金屬酶 (metalloenzyme)，根據螯合特定的金屬輔因子而有不同功用，如：銅 (copper)、鋅 (zinc)、錳 (manganese)、鐵 (iron) 及鎳 (nickel)。在人體中發現有三種 SOD 異構物，在細胞質中與銅鋅螯合 (SOD1)，在於粒線體與錳螯合 (SOD2)，在細胞外與銅鋅螯合 (SOD3) (Romao, 2015)。2004 年一篇研究指出，給予小鼠 SOD 穀膠蛋白 (gliadin) 會促進 IL-10 產生，並且降低了 TNF- $\alpha$  減緩炎症反應 (Vouldoukis *et al.*, 2004)。

## 3. 麩胱甘肽 (glutathione, GSH)

GSH 幾乎存在哺乳類動物各個組織器官中，特別是在肝臟。GSH 為參與細胞抗氧化的主要非蛋白硫醇 (non-protein thiol)，由半胱氨酸 (cysteine)、麩氨酸 (glutamic acid) 及甘氨酸 (glycine) 組成的三肽，半胱氨酸上的硫氫基 (-SH) 為其活性基團。GSH 容易與鉛、汞、砷等重金屬螯合，尤其在肝細胞內 GSH 的生理作用之一就是解毒，將體內有害物質轉化並排出體外。在細胞中，GSH 有還原型 (G-SH) 和氧化型 (G-S-S-G) 兩種形式，游離的 GSH 在一般生理條件下以還原型占絕大多數，受到氧化壓力刺激便轉化為氧化型，可透過麩胱甘肽還原酶 (glutathione reductase) 作用而回復成還原型。細胞的氧化還原狀態取決於還原型和氧化型的比例 (GSH/GSSG)，在正常條件下，還原型和氧化型的比例大於 100，而在氧化壓力訊號刺激後，比例會降低至 10~1 之間 (Chai *et al.*, 1994)。GSH 可以保護細胞膜不受氧化損傷，且有助於許多蛋白質維持正常功能。反之，當細胞無法維持其 GSH 含量時，細胞也容易遭受破壞 (Pastore *et al.*, 2003)。GSH 作用機制如附圖三所示。



附圖三、麩胱甘肽作用機制

#### 4. 麩胱甘肽過氧化酶 (glutathione peroxidase, GPx)

GPx 發現於 1957 年，幫助紅血球抵禦氧化損傷。後續又分離出幾種不同類型的 GPx，在哺乳類動物的組織中，根據其胺基酸序列分離出六種異構物，其中主要四種 GPx 對硒具有依賴性 (selenium dependent)，第一型麩胱甘肽過氧化酶(classical GPx, GPx1) 在肝臟、肺臟及腎臟發現；第二型麩胱甘肽過氧化酶 (gastrointestinal GPx, GPx2) 存在腸胃道上皮組織；第三型麩胱甘肽過氧化酶 (plasma GPx, GPx3) 和第四型麩胱甘肽過氧化酶 (phospholipid GPx, GPx4) 廣泛分佈於不同組織中，GPx1、2 及 3 為同源四聚體 (homotetramers)，GPx4 為單體 (monomer) (Brown *et al.*, 2000)。另外兩種 GPx 的活化位則缺乏 selenocysteine，GPx5 存在附睪、GPx6 存在嗅器上皮。GPx 利用還原型 GSH 將過氧化氫或有機過氧化氫催化還原成水 ( $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow GSSG + 2H_2O$ ) (Margis *et al.*, 2008)。

#### (七) 肝臟之組織切片

##### 1. 油紅染色 (Oil-Red-O stain)

油紅為是蘇丹染劑之一，是一種重氮脂肪染劑，用於中性脂肪的冷凍切片或脂蛋白的石蠟切片染色，正常情況下為紅色粉末狀。在光學顯微鏡下，脂肪細胞產生的油滴經油紅染色後，呈現紅色或橙色 (Kinkel *et al.*, 2005)。

## 2. 蘇木紫與伊紅染色 (hematoxylin & eosin stain, H&E stain)

染料蘇木紫可以將組織嗜鹼性結構染成藍紫色，而伊紅可以將組織嗜酸性結構染成粉紅色。嗜鹼性結構通常包括含有核酸的部分，如：核糖體、細胞核，富含核糖核酸 (RNA) 的區域等。嗜酸性結構則通常細胞內及細胞間的蛋白質，如：路易體 (Lewy body)、酒精小體 (Mallory body)、細胞質的大部分等。此種染色原理是利用組織結構對不同染料的結合程度不同呈現出結果。

## 3. 免疫組織化學染色法 (immunohistochemistry, IHC)

免疫組織化學染色法是運用免疫反應中，抗原 (antigen, Ag) 和抗體 (antibody, Ab) 間的專一結合性，並藉抗體上所呈現的訊號來觀察細胞或組織切片，是否有目標抗原存在。免疫組織化學染色法在現今臨床醫學和研究上，是相當常用且重要的方法，它不但具有很好的特異性 (specificity) 和靈敏度 (sensitivity)，也更為簡便快速。

### (1.) 類鐸受體-4 (Toll-like receptor 4, TLR-4)

TLRs 為模式辨識受體 (pattern recognition receptors, PRRs) 家族成員之一，是哺乳類動物中與果蠅身上發現的 Toll 同源之轉運膜蛋白，TLRs 在人類身上已經被鑑定出有 11 種，而在小鼠身上發現有 13 種。TLRs 會辨認病原體衍生的分子，如：細菌、真菌及病毒的特殊結構物質，並且刺激發炎細胞激素和干擾素分泌。TLRs 在有關肝臟的疾病中扮演著重要的角色，這歸因於肝細胞病理生理機制中 TLRs 廣泛表達，當中 TLR-4 是表達巨噬細胞和其他細胞內毒素信號傳遞的表面功能性受體，可辨識革蘭氏陰性菌的脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS)。Cluster of differentiation 14 (CD14) 是先天免疫系統中的一種蛋白分子，CD14 會與 LPS 鍵結後呈現給 TLR-4，經由 myeloid differentiation factor 88 (MyD 88) 刺激細胞內信號傳遞，導致 NF- $\kappa$ B 活化，促進發炎細胞激素的分泌 (Kawaratani *et al.*, 2013)。

### (2.) 4-羥基反式 2-壬烯 (4-hydroxy-trans-2-nonenal, 4-hydroxynonenal, 4-HNE)

4-HNE 在脂質過氧化過程為最終產物之一，在細胞病理學中，被認為有一定程度造成氧化壓力 (Poli and Schaur, 2000)，4-HNE 表現出廣泛的生物活性，包括抑制 RNA 和 DNA 的合

成、刺激嗜中性球 (neutrophil) 的遷移 (migration) (Luckey *et al.*, 2002)、抑制酵素作用 (Uchida *et al.*, 1993)、透過轉錄因子刺激壓力信號 (stress-signaling) 傳導 (Camandola *et al.*, 1997; Parola *et al.*, 1998) 等。研究顯示，將細胞用4-HNE培養，會使得細胞內麩胱甘肽和 GSH/GSSG濃度降低，透過傳遞凋亡信號至粒線體，活化caspase 3、caspase 8及caspase 9，會導致細胞功能改變和死亡 (Dubinina and Dadali, 2010)。4-HNE也被證實具強氧化能力，能與蛋白質形成共價鍵結產物-胍合物 (protein adduct)，破壞鈣離子恆定，導致細胞死亡。

### (3.) 脂肪酸合成酶 (Fatty acid synthase, FASN)

在哺乳類動物中，FASN 為脂肪酸合成所必需的關鍵酵素，哺乳類動物有兩種類型，第一型為細胞質 FASN (type I cytosolic FASN)，第二型為粒線體 FASN (type II mitochondrial FASN)，兩者皆能促使脂質合成。FASN 可將攝入的碳水化合物轉換為長鏈的飽和胺基酸 (Wu *et al.*, 2014)。

### (4.) 葡萄糖轉運蛋白 2 (Glucose transporter type 2, GLUT2)

許多細胞利用葡萄糖氧化或非氧化作用來產 ATP，葡萄糖轉運蛋白 (glucose transporter, GLUT) 是一種獨立的能量系統，GLUT2 為人類和啮齒類動物肝臟和胰臟細胞主要的葡萄糖轉運蛋白 (Fukumoto *et al.*, 1988)。研究顯示，GLUT2 在糖尿病患者過度表達，代謝環境的條件會影響 GLUT2 調節肝細胞葡萄糖的進出，當受到葡萄糖刺激後造成鉀離子通道 (potassium ion channel) 關閉，而鈣離子通道 (calcium ion channel) 開啟，促進胰島素分泌，可以把運送到小腸絨毛內的葡萄糖、果糖、半乳糖轉運到血液中。血液中胰島素和葡萄糖濃度上升時，GLUT2 表現會上升，增加肝細胞對葡萄糖的攝入 (Narasimhan *et al.*, 2015)。

### (5.) 葡萄糖轉運蛋白 4 (Glucose transporter type 4, GLUT4)

1980 年有研究報告指出，大鼠脂肪細胞受到胰島素刺激後，觀察到儲存於細胞內的醣類轉運器移動到細胞膜上 (Suzuki and Kono, 1980; Cushman *et al.*, 1980)。當 GLUT4 被確立是細胞中主要的葡萄糖轉運蛋白後，這移位 (translocation) 的假說才得以證實，GLUT4 常表現在肌肉和脂肪細胞中，是在細胞內小管和囊泡的複合體網絡被發現 (Bryant *et al.*, 2002)，為骨骼肌中主要的葡萄糖轉運蛋白 (Henriksen *et al.*, 1990)。當受到葡萄糖刺激後，胰島素會促使帶有 GLUT4 胞內小泡轉移到細胞膜上，並鑲嵌在細胞膜的脂質分子雙層中，可以迅速調節血

糖，達到攝食後降低血糖的效果，它已被證實在第二型糖尿病和嚴重胰島素阻抗患者的骨骼肌上表現顯著降低 (Kampmann *et al.*, 2011; Gaster *et al.*, 2001)。

#### (6.) 葡萄糖轉運蛋白 5 (Glucose transporter type 5, GLUT5)

動物實驗顯示 GLUT5 是主要針對果糖進行運輸的轉運蛋白，而 GLUT2 扮演著促進和引導的角色 (Douard and Ferraris, 2008; Jones *et al.*, 2011)。GLUT5 在許多組織中表現，包括小腸、腎臟、肌肉組織、脂肪及大腦 (Schurmann, 2008)，能將腸道中的果糖進行促進性擴散 (facilitated diffusion) 轉運至腸道細胞內，在肝臟中表現量也很高。在齧齒類動物 GLUT5 基因剔除 (knockout) 模式中，攝入果糖後產生吸收不良、腸道擴張的現象，類似果糖不耐症患者的病徵 (Barone *et al.*, 2009)。另外，在嬰幼兒體內 GLUT5 表現量較低，果糖吸收不良機率也較高 (Douard and Ferraris, 2013)。在第二型糖尿病患者腸道中，觀察到 GLUT5 和 GLUT2 表現量提高，被證實與果糖的過度吸收有關 (Dyer *et al.*, 2002)。

## 二、腸道菌叢

人體擁有許多細菌存在腸道中，其中也包括一定數量之有害細菌。這些細菌會利用經宿主消化系統分解的分子當作養分，來維持自身在腸道的生長，也會因為宿主的飲食內容改變而影響腸道菌叢。然而現今人們高鹽高油高糖的飲食方式，造成許多代謝疾病產生，同時也破壞了腸道菌叢的平衡，造成有害細菌的過度生長危害人體健康。將腸道中細菌分類，一類為維持和促進宿主健康之有益菌，如：乳酸桿菌 (*Lactobacillus*) 和雙歧桿菌 (*Bifidobacterium*)，此類菌群能維持腸道功能正常並抑制病原菌生長，具有幫助養分消化和合成維生素等功能 (Gibson and Roberfroid, 1995)。另一類有害細菌則會產生胺類、硫化物等物質，危害宿主健康，造成腹瀉、感染及組織損傷等症狀，降低宿主免疫力，如：由革蘭氏陰性菌 (Gram-negative bacteria) 產生的脂多醣 (Lipopolysaccharides, LPS)，為一種內毒素 (endotoxin)，當它進入生物體循環刺激免疫系統活化，導致促發炎細胞激素分泌，在急性和慢性肝臟疾病中息息相關 (Nalon *et al.*, 2010)。

### (一) 乳酸菌

乳酸菌之定義為能分解、消化食物中所含的乳糖，產生發酵作用後製造出乳酸的細菌，主要功能是可以促進腸道蠕動、幫助消化。另外有一解釋是乳酸菌是指能夠代謝醣類，產生 50% 以上乳酸之細菌，如：乳酸桿菌、鏈球菌 (*Streptococcus*)、念球菌 (*Leuconostoc*) 等。乳酸

菌為習慣用語，並不是分類學上正式用語。常見的雙歧桿菌也會產生乳酸，但乳酸產率不到 50%，嚴格來說不可以稱為乳酸菌。從保健營養觀點來看，雙歧桿菌同樣具有安全、健康等益處。

#### 1. 乳酸桿菌 (*Lactobacillus*)

乳酸桿菌為兼性厭氧的革蘭氏陽性菌，普遍存在於人體內之益生菌，會利用碳水化合物發酵產生乳酸，而被稱為乳酸桿菌。可以用於製造優酪乳、奶酪、醃漬食品等發酵產品，尤其乳酸桿菌的免疫調節能力最受關注。乳酸桿菌產生的有機酸能降低腸道 pH 值，與非益生菌群競爭，減少其增殖，維持腸道健康。

#### 2. 雙歧桿菌 (*Bifidobacterium*)

1899 年由法國學者 Tissier 從幼兒的糞便中分離出，為厭氧的革蘭氏陽性菌，因為末端分叉，而稱為雙歧桿菌。研究發現，雙歧桿菌具有維護腸道菌叢平衡，並且抑制病原菌生長的功能，也能幫助腸道增加對胺基酸、維生素的吸收。另有研究指出，雙歧桿菌能降低血液中膽固醇的含量，有助於防止高血壓、心血管疾病的發生。

### (二) 大腸桿菌群 (Coliform group)

大腸桿菌群為非特定菌株，而是一群在生物體腸胃道內有相同生理活性的菌群，具有使葡萄糖發酵轉換成乳糖的能力，相較其他腸胃道病原體比較容易被隔離檢測。大腸桿菌群主要包括 *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* 及 *Klebsiella* 四個菌屬，這些菌屬為革蘭氏陰性菌，能在 35°C、48 小時內發酵乳糖並產生氣體，可以在有氧或厭氧環境下生長，大腸桿菌群之細菌多存在溫血動物糞便或是糞便汙染的地方，因此大腸桿菌群常作為食品受到糞便汙染之指標。

#### 1. 大腸桿菌 (*Escherichia coli*)

屬革蘭氏陰性菌，外觀為桿狀，兩端橢圓，具有鞭毛可以進行運動。大腸桿菌菌落呈白色或淡黃色圓形，菌落表面光滑有反光，低平或微突起。在人類和溫血動物腸道內普遍存在，一般情況下並不會引起疾病，但若過度生長侵入人體其他部位時，會造成腹膜炎、膽囊炎、膀胱炎及腹瀉等症狀。感染特定種類的大腸桿菌後還可能致命，如：*E. coli* O157:H7。

### 三、 肝代謝綜合症 (Hepatic Manifestations of the Metabolic Syndrome, HMMS)

代謝綜合症的形成與現代人生活、飲食型態的改變及缺乏運動密切相關。研究指出，內

臟脂肪相較皮下脂肪活躍，內臟脂肪的活性大，會釋放出游離脂肪酸，產生胰島素阻抗作用，引起代謝異常，進而造成高血糖、高血壓、高血脂等疾病。針對肝臟產生的代謝紊亂，稱之為肝代謝症候群，常伴隨著肥胖、第二型糖尿病、胰島素阻抗及非酒精性脂肪肝，並且發展至非酒精性脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH) (Li *et al.*, 2014)。非酒精性脂肪肝為較常見的肝臟疾病，通常發生在沒有酗酒習慣和肝臟三酸甘油酯過度積聚的患者身上，造成脂肪重量超過肝臟總重 5%，肥胖和糖尿病患者的脂肪肝患病率也高達 70~90% (Castro *et al.*, 2011)。

#### 四、 肥胖症 (Obesity)

在現今社會中肥胖被認為是一種疾病，當體內的脂肪過度累積時，會對健康產生負面的影響。肥胖與胰島素阻抗、葡萄糖耐受性不良及脂肪肝相關的代謝紊亂綜合症。在此疾病中，白色脂肪組織 (white adipose tissue, WAT) 為脂質主要儲存的場所，在脂肪的積聚上扮演著重要的關鍵。提高熱量的攝取使得脂肪細胞體積擴大，壓力途徑隨之活化，此過程增發炎細胞浸潤脂肪細胞，造成代謝異常和胰島素敏感性下降 (Johnson and Olefsky, 2013; Olefsky and Glass, 2010)。一些簡單常用的人體測量指標，如：身體質量指數 (BMI)、腰圍或腰臀圍比，其中 BMI 和腰圍為目前最普遍使用的肥胖指標。世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 於 1997 年提出以 BMI 來換算肥胖程度 (附表一)，BMI 計算方式為體重 (kg) 除以身高 (m) 的平方，範圍在 25-30 kg/m<sup>2</sup> 內定義為超重，而超過 30 kg/m<sup>2</sup> 定義為肥胖，多數定義以 BMI 為篩選肥胖者的指標，主要因為秤得體重、量身高就可換算出來，且 BMI 和身體脂肪比例、疾病發生率及死亡率都有高度相關性。

附表一、世界衛生組織 BMI 之定義

Classification	BMI(kg/ m <sup>2</sup> )	Risk of co-morbidities
Normal range	18.5-24.9	Average
Overweight	≥25	
Pre-obese	25.0-29.9	Increased
Obese class I	30.0-34.9	Moderate
Obese class II	35.0-39.9	Severe
Obese class III	≥40	Very severe
BMI= Weight (kg) /Height (m <sup>2</sup> )		WHO,1998



## 五、 糖尿病 (Diabetes mellitus)

世界衛生組織 2011 年的報告指出全世界有 3.46 億人患有糖尿病，超過 80% 的糖尿病死亡發生在低收入和中等收入國家 (WHO web, 2013)。糖尿病為一種慢性代謝疾病，其特徵是血糖在長時間內處在超標的狀態，而且患者會出現吃多、喝多、尿多及體重下降此三多一少的症狀，還會引發許多併發疾病，如：心血管疾病、中風、慢性腎臟病、足底潰爛及視網膜病變等。糖尿病的發生可以分成兩種類型：第一型糖尿病 (type 1 diabetes)，是由於體內無法產生足夠量的胰島素 (insulin)，導致血液中的葡萄糖居高不下，無法有效地將葡萄糖轉換成肝糖 (glycogen) 形式儲存，故也稱作胰島素依賴型糖尿病 (insulin dependent diabetes mellitus, IDDM)，需要額外注射 insulin 來控制血糖。另外，也是大家比較熟知的第二型糖尿病 (type 2 diabetes)，直至 2013 年全球共有 3.82 億名糖尿病患者，當中有 90% 是第二型糖尿病。為細胞上 insulin receptor 有缺陷或是數量不足，使得細胞對 insulin 反應不靈敏，所以稱作非胰島素依賴型糖尿病 (non-insulin dependent diabetes mellitus, NIDDM)。

## 六、 非酒精性脂肪肝 (Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)

### (一) 非酒精性脂肪肝之定義

脂肪肝 (fatty liver) 是肝臟細胞積聚脂肪而成。當攝取的熱量超過人體所能負荷的時候，肝臟便會漸漸積聚脂肪組織。若脂肪組織佔肝臟體積 5% 以上時，便稱之為脂肪肝。脂肪肝的發生為肝臟中單純的脂肪變性或伴隨著非酒精性脂肪肝炎，而單純性的脂肪肝通常不會使肝臟受到嚴重損傷。肥胖症中，非酒精性脂肪肝是最嚴重的併發症之一，是一種漸進性的肝臟疾病，其脂肪的積聚並非過量飲酒所導致，肝臟一旦開始積聚脂肪，很容易繼續引發後續的脂肪酸過氧化，導致肝臟發炎。在肝臟病理學包括廣泛，從簡單的脂肪變性 (steatosis) 到非酒精性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH)，逐漸轉變成肝纖維化 (fibrosis)、肝硬化 (cirrhosis) 甚至誘發產生肝癌 (hepatocellular carcinoma)。在組織學觀點中，非酒精性和酒精性脂肪肝的病變主要發生在肝小葉上，臨床上病理變化為脂肪積聚和肝細胞的脂肪酸變性 (Saito *et al.*, 2007)。

### (二) 非酒精性脂肪肝與炎症反應

非酒精性脂肪變性肝炎 (Nonalcoholic steatohepatitis, NASH) 這個名稱首先在 1980 年提出，過去幾年來，NASH 的病例逐漸增加，現在已被認為是一專門的臨床疾病。同時衍生出

了雙衝擊假說 (Two-hit hypothesis) ，此假說認為第一次的打擊是肝臟中脂肪的堆積，造成胰島素阻抗和肝細胞損傷，逐漸往炎症反應發展。第二次的打擊為氧化壓力和多種炎症因子的釋放，引起脂肪變性的肝細胞發炎、壞死。在許多研究中指出，脂肪細胞會分泌多種蛋白質，稱為脂肪細胞激素 (adipocytokine) ，其中有白細胞介素 (interleukin) 、腫瘤壞死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、脂聯素 (adiponectin) 及瘦素 (leptin) 等，若脂肪細胞激素過度分泌會造成體內代謝系統發生問題。當攝取過多熱量轉換成脂肪組織積聚在肝臟時，脂肪組織會分泌這些脂肪細胞激素對肝臟產生炎症反應，並且降低或抑制胰島素訊息傳遞。所以當脂肪組織增加，便會產生大量促進發炎的細胞激素使巨噬細胞浸潤。

### (三) 非酒精性脂肪肝與胰島素阻抗

當細胞或組織對胰島素產生對抗，使得胰島素敏感度降低，胰島素在週邊組織或細胞無法發揮作用，導致血液中的葡萄糖無法進入細胞，此時胰臟會代償性的產生更多胰島素來幫助血糖降低，造成高胰島素血症，進而發生第二型糖尿病及血壓升高、血脂異常等情形。

### (四) 非酒精性脂肪肝與脂肪酸氧化

肝臟在脂質的代謝及運輸的過程中扮演著極為重要的角色。血液中的游離脂肪酸 (free fatty acid, FFA) ，會在肝臟中合成三酸甘油酯並儲存，或以極低密度脂蛋白 (Very low density lipoprotein, VLDL) 的形式將三酸甘油酯轉運出肝臟進入血液。當肝臟受到損傷後，會導致脂質在肝細胞內異常的代謝及堆積。造成脂質代謝異常的原因大致上可以分類成以下四種：一、由於個體攝取過多的高脂飲食並導致高脂血症，相對會使血清 FFA 異常增加；二、肝細胞合成 FFA 或由碳水化合物轉化成三酸甘油酯增加；三、FFA 在肝細胞線粒體內氧化及利用率降低，而轉變為三酸甘油酯；四、由於 VLDL 本身合成的減少，而導致三酸甘油酯轉運發生障礙。脂肪組織及肝細胞間的脂質代謝動態失衡，以及肝細胞中三酸甘油酯合成及分解之間的平衡發生障礙，導致三酸甘油酯在肝細胞內過度屯積，最後衍生成脂肪變性。

### (五) 非酒精性脂肪肝與腸道菌叢

許多研究指出，腸道菌叢受到日常的飲食、生活作息及運動影響，高鹽高油高糖的飲食習慣造成很多代謝相關的慢性疾病產生，在非酒精性脂肪肝形成的過程中，代謝系統的紊亂使得腸道微生物的組成和功能也受到影響，腸道細菌過度生長及腸道內膜通透性增加，內毒素得以穿透腸道表皮層，進入門靜脈的血液流到肝臟中，誘發肝臟中的 Kuffer cell 進行吞噬

作用，並且釋放出 IL-1 $\beta$ 、IL-6，促使肝臟產生炎症反應 (Uesugi *et al.*, 2002)。在非酒精性脂肪肝炎中，LPS 也會促進 TNF- $\alpha$  和其他促發炎細胞激素產生 (Kudo *et al.*, 2009)。

## 七、 葡萄皮萃取物 (Grape skin extract)

本研究是使用葡萄皮之萃取物進行試驗。近數十年來研究結果顯示葡萄皮、葡萄籽具有多項用途，除了一般人熟知是天然的抗氧化物質外，在預防心血管疾病、肝臟疾病、糖尿病及癌症上也有不少研究。其中被廣泛討論的兩種成分為白藜蘆醇和原花青素，兩者皆與擁有很強的抗氧化能力，現今也有很多相關市售產品推出。

### (一) 功能性成分

#### 1. 白藜蘆醇 (Resveratrol)

白藜蘆醇是一種非黃酮類的多酚類化合物 (non-flavonoid polyphenol)，在許多植物中存在，屬於芪；二苯乙烯基 (stilbenes group)，是天然的植物性抗生素，稱為抗毒素 (phytoalexin)。當植物受到環境壓力、真菌及細菌感染時，便會產生抗毒素來抵抗外界的入侵，而白藜蘆醇就是其中之一 (Leiberer *et al.*, 2013)。最初被發現是在白藜蘆根之中，後也陸續在其他植物中發現，如：葡萄、莓果、紅葡萄酒及堅果 (Burns *et al.*, 2002)。白藜蘆醇存在兩種分子形式，順式白藜蘆醇 (*cis-resveratrol*) 和反式白藜蘆醇 (*trans-resveratrol*)，而反式為自然存在的形式且相對穩定 (Borriello *et al.*, 2010)。經研究證實，白藜蘆醇在清除自由基、抗氧化、抗發炎及抑制腫瘤生長已有相當好的成效，也有一說白藜蘆醇是「長壽仙丹」，原因為在熱量限制的環境下，它能活化酵母菌的 silent information regulator 2 (Sir2) 基因，而研究發現 Sir2 為長壽基因之一 (Tissenbaum and Guarente, 2001; Garsin *et al.*, 2003)。

#### (1.) 白藜蘆醇與 SIRT1

在哺乳類動物中，Sirtuin 1 (SIRT1) 是最常被研究 sirtuin 之一，在人體中 SIRT1 的活性通常隨著年齡增加而下降 (Massudi *et al.*, 2012)，哺乳動物中 SIRT1 與酵母菌的 Sir2 為同源基因，SIRT1 是一種 NAD<sup>+</sup>-dependent class III protein deacetylase，它利用 NAD<sup>+</sup> 進行去乙酰化 (deacetylation) 產生 nicotinamide 和 acetyl-ADP-ribose (Haigis and Guarente, 2006)。SIRT1 存在大腦、肝臟、胰臟及脂肪組織中，經由去乙酰化組蛋白 (histones)、轉錄因子及轉錄調節因子來調控代謝基因的表現 (Silva *et al.*, 2010)。白藜蘆醇被發現可以有效活化 SIRT1 (Howitz *et al.*, 2003)，已廣泛於動物和細胞實驗中進行研究 (Baur *et al.*, 2006; Lagouge *et al.*, 2006)。另有報

告指出，人類和齧齒類在禁食或熱量限制的條件下，SIRT1 的表現量和活性會增加，而在營養過剩的情況下會減少 (Rodgers *et al.*, 2005; Kanfi *et al.*, 2008)。在脂肪組織中，SIRT1 透過抑制 PPAR $\gamma$  和 NF- $\kappa$ B 的活性來調控脂肪的分解和抑制炎症反應 (Picard *et al.*, 2004; Yoshizaki *et al.*, 2009)。另外有研究發現，在肥胖的人體中其皮下脂肪的巨噬細胞浸潤與 SIRT1 表現呈負相關 (Gillum *et al.*, 2011)。因此，活化 SIRT1 可以當作改善肥胖和代謝相關疾病的目標 (Park *et al.*, 2012; Poulsen *et al.*, 2013)。

## (2.) 白藜蘆醇與細胞凋亡 (apoptosis)

細胞凋亡是一種細胞執程序性自殺的過程，在大多數具有核的細胞，其重要的存活因子被去除後，便會刺激細胞啟動這一作用 (Thornberry *et al.*, 1998; Aguirre *et al.*, 2014)。細胞凋亡會藉由某些特定細胞嚴重損傷或者特異性的誘導死亡配體 (death ligands) 來引發 (Aguirre *et al.*, 2014)，此過程有 caspases 參與作用 (Thornberry *et al.*, 1998)。在哺乳動物中，caspases 由兩種訊號途徑刺激而活化，內在途徑 (intrinsic pathway) 控制特定凋亡蛋白活化因子 (caspases-activating factors) 從粒線體釋放出來 (Adams and Cory, 1998)；外在途徑 (extrinsic pathway) 是將 death ligands 通過細胞膜運送至細胞內，刺激細胞內的 caspases 作用。此兩種訊號途徑可直接或間接相互作用 (Aguirre *et al.*, 2014)。

## (3.) 白藜蘆醇與脂肪新生成 (*de novo* Lipogenesis)

脂肪組織中調控脂肪堆積有兩個重要的代謝機制，為脂肪新生成和來自三酸甘油酯之攝取。脂肪新生成是利用乙醯輔酶 A (acetyl-CoA) 來合成酯化的脂肪酸，並以其當作基質再合成三酸甘油酯。主要有乙醯輔酶 A 羧化酶 (acetyl-CoA carboxylase, ACC) 和脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase, FASN) 兩種酵素參與。前者催化 acetyl-CoA 產生丙二醯輔酶 A (malonyl-CoA)，後者催化 acetyl-CoA 和 malonyl-CoA 合成脂肪酸 (Vázquez-Vela *et al.*, 2008)。

## (4.) 白藜蘆醇與脂肪分解 (Lipolysis)

脂肪分解為三酸甘油酯在脂肪細胞中被分解成脂肪酸和甘油 (glycerol)，並釋放到血液中。脂肪分解的過程主要有兩個的酵素參與，三酸甘油酯脂解酶 (adipose triglyceride lipase, ATGL) 和激素敏感脂解酶 (hormone-sensitive lipase, HSL) (Aguirre *et al.*, 2014)，此外，SIRT1 已被指出能引發脂肪分解，透過給予白藜蘆醇刺激 SIRT1，間接啟動脂肪分解。

## 貳、 研究動機與目的

有鑑於現今科技及社會的發展，近代飲食文化愈趨精緻，經常可以看到人人手上拿著飲料、吃著油炸食品，很容易就過量攝取碳水化合物、脂質，當中隱藏著肥胖、糖尿病及脂肪肝等代謝相關疾病。俗話說「吃葡萄不吐葡萄皮」，其實是有它的道理存在，由於葡萄皮中含有大量白藜蘆醇，而白藜蘆醇可以減少脂肪形成並降低炎症反應的發生，進而改善生物體的代謝。故在本研究中，我們要探討葡萄皮萃取物在高脂及高果糖玉米糖漿誘導小鼠肝代謝綜合症之造型模式下，如何來降低脂肪產生與調節炎症反應，進而改善小鼠肝代謝綜合症的形成。



## 參、 材料方法

### 一、 藥品材料

#### (一) 藥品、試劑

藥品名稱	廠牌
葡萄皮萃取粉	羅頓貿易有限公司，臺中市，臺灣
Resveratrol	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, Mo, USA
High-fat-diet	Bio-cando biotechnology Inc., Taoyuan, Taiwan
Fonen fructose corn syrup	Fonen and FonHer Ent. Co. LTD., Tainan, Taiwan
Hydrogen peroxide, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis. MO, USA
10% formalin	Union Chemical Works LTD., Hsin-Chu, Taiwan
Xylene	Union Chemical Works LTD., Hsin-Chu, Taiwan
Ethyl ether	Union Chemical Works LTD., Hsin-Chu, Taiwan
Ethanol (99%)	Merck & Co. Inc., Darmstadt, Germany
Chloroform	Amreso LLC., Solon, OH, USA
Isopropanol	Merck & Co. Inc., Piscataway, NJ, USA
Insulin kit	Mercodia Inc., Uppsala, Sweden
AST (GOT)	F. Hoffmann-La Roche LTD., Basel, Switzerland
ALT (GPT)	F. Hoffmann-La Roche LTD., Basel, Switzerland
Cholesterol	F. Hoffmann-La Roche LTD., Basel, Switzerland
Triglycerides	F. Hoffmann-La Roche LTD., Basel, Switzerland
Total protein kit	F. Hoffmann-La Roche LTD., Basel, Switzerland
ELISA kit	eBiosciences Inc., San Diego, CA, USA
IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, TNF- $\alpha$ , MCP-1, TSLP, TGF- $\beta$ 1, IFN $\gamma$	

ELISA kit	R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA
Adiponectin, Leptin	
IHC kit	LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA, USA
Anti-TSLP antibody, Anti-4-HNE antibody, Anti-TLR-4 antibody	
Oil-Red-O	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, Mo, USA

## (二) 設備、器材

### 設備、器材、耗材

### 廠牌、代理商

桌上型離心機 HERMLE、HSIANGTAI	Hermle Labortechnik GmbH Co. LTD., Gosheim, Germany
落地式離心機 KUBOTA 6200	Kubota Corporation, Tokyo, Japan
血清生化全自動分析儀 CoBAS MIRA PLUS	F. Hoffmann-La Roche LTD., Basel, Switzerland
顯微鏡 Nikon E-200/D70	Nikon Precision Taiwan LTD., Hsinchu, Taiwan
顯微鏡傳輸器 Nikon TS-100/DS-U2	Nikon Precision Taiwan LTD., Hsinchu, Taiwan
ELISA reader (Multiskan FC)	Thermo Labsystem, Waltham, MA, USA
高效能液相層析儀 High performance liquid chromatography, HPLC	
層析壓力泵 Pump HITACHI L-710	Kabushiki Kaisha Hitachi Seisakusho, Tokyo, Japan
紫外光偵測器	Kabushiki Kaisha Hitachi Seisakusho, Tokyo, Japan

UV detectorHITACHI L-7400

分離管住

Chen Si Technology LTD., Taichung, Taiwan

CNW C18 LC Column

管柱定溫箱

Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan

Column oven

自動上樣機

Kabushiki Kaisha Hitachi Seisakusho, Tokyo, Japan

HITACHI L-7200

分析軟體

Scientific Information Service Corporation, Davis, U.S.A.

SISC™ software

超音波清洗器

Delta New Instrument Co. LTD., Taipei Hsien, Taiwan

Ultrasonic cleaner DC400H

---



## 二、 實驗方法

### (一) 實驗動物飼養與試驗分組

本篇研究使用之實驗動物為雄性 5 週齡小鼠，採無特定病源之 C57BL/6JNarl 品系，購買自財團法人國家實驗動物中心 (National Laboratory Animal Center, NLAC, Taipei, Taiwan)。依照體重平均分配，各組平均體重無顯著差異，試驗開始前給予 3 週適應環境，達 8 週齡後即進行試驗。試驗將小鼠分為五組：

1. 正常組 (Naïve 組，n = 6)
2. 對照組 (Control 組，n = 6)
3. 葡萄皮萃取物低劑量組 (Grape skin extract 120 mg/kg，GSEL 組，n = 6)
4. 葡萄皮萃取物中劑量組 (Grape skin extract 360 mg/kg，GSEM 組，n = 6)
5. 葡萄皮萃取物高劑量組 (Grape skin extract 600 mg/kg，GSEH 組，n = 6)

實驗之小鼠皆飼養於飼養籠內，動物房溫度維持  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，光照及黑暗各 12 小時。試驗期間給予實驗小鼠充足飼料和飲水，每週記錄小鼠體重。

### (二) 肝代謝綜合症之造型模式

試驗給予實驗小鼠連續 10 週之滅菌蒸餾水或 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿水溶液，以及給予一般飼糧或 60% 之高脂飼糧，誘導肝代謝綜合症產生。在第 4 和第 8 週時進行口服葡萄糖耐受性試驗 (oral glucose tolerance test, OGTT)，評估胰島素阻抗產生之情形。在試驗第 8 週的 OGTT 經統計後得到顯著差異之結果，並於試驗第 10 週進行犧牲，採集小鼠全身血液，離心後取其血清，並摘取脾臟、肝臟、腎臟及脂肪秤重，另外還採集小鼠盲腸區段，依編號包裝保存於  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱，待後續進行分析。

### (三) 實驗動物樣本採集

#### 1. 血清

試驗小鼠使用活寧液 (isofluane) 進行麻醉，待試驗小鼠無法自主活動後，便使用手術器械剪開小鼠腋窩之動脈，以 1 mL 針筒收集小鼠全血，靜置待血液凝固，進行離心條件為 14,000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ , 10 min，將上層血清取出保存於  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱，待後續進行分析。

## 2. 肝臟

在小鼠採集全身血液並以頸椎脫臼法犧牲後，摘取小鼠肝臟秤重記錄，並拍照記錄完整外觀。接著進行小鼠肝臟的分切，取其肝臟之最大葉橫切成兩半，其中一半以 10% formalin 固定，脫水後製成蠟塊，組織之切片可進行蘇木紫與伊紅染色 (hematoxylin & eosin stain, H&E stain) 和免疫組織化學染色 (immunohistochemistry stain, IHC stain)；另外一半以 15% 砂糖水溶液浸泡 24 小時，隔天更換成 30% 砂糖水溶液浸泡 24 小時，接著將肝臟組織修飾後進行冷凍包埋，組織之切片可進行油紅染色 (Oil-Red-O stain)，染色之切片使用光學顯微鏡觀察並拍攝存檔。小鼠肝臟之第二大葉也橫切成兩半，取其中一半約  $0.10 \pm 0.02$  g，加入 1 mL 均漿液 (PBS)，使用電動研磨機將肝臟組織均質至無明顯組織塊後，進行離心條件為 14,000 rpm, 4°C, 10 min，將上層清澈液體取出保存於 -80°C 冰箱，待後續進行分析。剩餘肝臟組織使用滅菌過之鋁箔紙包裝，保存於 -80°C 冰箱，以備其他項目進行分析。

## 3. 腎臟

摘取小鼠腎臟秤重記錄，將腎臟浸泡 10% formalin 固定，脫水後製成蠟塊，組織之切片可進行蘇木紫與伊紅染色 (hematoxylin & eosin stain, H&E stain)。

## 4. 脂肪

摘取小鼠腹脂、腎周脂及附睪脂秤重記錄，將腹脂、腎周脂及附睪脂浸泡 10% formalin 固定，脫水後製成蠟塊，組織之切片可進行蘇木紫與伊紅染色 (hematoxylin & eosin stain, H&E stain)。

## 5. 盲腸

摘取小鼠盲腸區段，放入 1.5 mL eppendorf 保存於 -80°C 冰箱，待後續進行分析。

### (四) 實驗動物樣本測定項目

#### 1. 葡萄糖耐受性試驗 (oral glucose tolerance test, OGTT)

在試驗第 4 週和第 8 週時進行口服葡萄糖耐受性試驗，將實驗小鼠飼糧淨空，只給予飲用一般滅菌蒸餾水，並且更換成乾淨墊料之飼養籠，禁食 12~16 小時後，口服給予 2 g/kg 葡萄糖。分別在口服葡萄糖前第 0 分鐘和口服葡萄糖後第 30、60、90、120 及 150 分鐘採集小鼠尾巴靜脈血液。使用市售血糖檢測機 (I-SENS, Inc. Korea)，測定空腹和各採血時間點的血糖值，利用血液中葡萄糖與血糖試紙上的葡萄糖氧化酶反應產生過氧化氫，接著血糖試紙另

外的過氧化酶則將過氧化氫分解成氧氣和水，這時候氧氣再與血糖試紙上的染劑進行氧化反應產生呈色，最後以光線感應辨識呈色物質的量，計算出其血糖數值。

## 2. 血清之肝功能指標

使用血清生化全自動分析儀 (CoBAS MIRA PLUS, Basel, Switzerland) 進行測定，原理為 L-天門冬胺酸或 L-丙胺酸和  $\alpha$ -酮戊二酸在 AST 或 ALT 作用下生成草醯乙酸和 L-谷胺酸，草醯乙酸在蘋果酸脫氫酶作用下生成 L-乳酸，同時 NADH 被氧化為 NAD<sup>+</sup>，在 340 nm 波長可以測得呈下降趨勢，與 AST 或 ALT 活性成正比，因此可以根據還原性輔酶 (nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase, NADH) 吸光度下降程度來計算 AST 或 ALT 濃度。

## 3. 血清之三酸甘油酯

使用血清生化全自動分析儀 (CoBAS MIRA PLUS, Basel, Switzerland) 進行測定，原理為三酸甘油酯經脂蛋白酶作用，分解成甘油 (glycerol) 和游離脂肪酸 (free fatty acid, FFA)，甘油在 ATP 和甘油激酶 (glycerokinase) 作用下生成 glycerol-3-phosphateoxidase，再經由磷酸甘油氧化酶作用下，氧化產生過氧化氫 (hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)，而 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在 peroxidase、4-aminoantipyrin 及 3,5-dimethoxy-N-ether-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-aniline (DAOS) 作用下，氧化產生紫青色色素，在 500 nm 波長測定其吸光值，再計算成三酸甘油酯濃度。

## 4. 血清之總膽固醇

使用血清生化全自動分析儀 (CoBAS MIRA PLUS, Basel, Switzerland) 進行測定，原理為總膽固醇 (Total cholesterol, TC) (包括游離膽固醇 (free cholesterol, FC) 和膽固醇酯 (cholesteryl ester, CE))。血清中膽固醇酯可以被脂蛋白酯酶水解成游離膽固醇和游離脂肪酸，另外，膽固醇在膽固醇氧化酶作用下產生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，而 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在 peroxidase、4-aminoantipyrin 及 3,5-dimethoxy-N-ether-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-aniline (DAOS) 作用下，氧化產生紫青色色素，在 500 nm 波長測定其吸光值，再計算成總膽固醇濃度。

## 5. 肝臟之總蛋白質

使用市售試劑組 (BCA Protein Assay Reagent, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) 進行測定，原理為蛋白質結構中的肽鍵 (-CONH-) 在鹼性溶液環境下能與銅離子作用產生紫紅色化合物，一定範圍內與蛋白質含量呈正比。使用滅菌之去離子水以序列稀釋之方式稀釋 Albumin Standard (BSA)，並取 150  $\mu$ L 樣本和標準品溶液加入 ELISA 96 well plate。使用試劑組之試

劑 A、B、C 以 25:24:1 比例混合配製成 Working Reagent，並取 150  $\mu\text{L}$  加入 96 well plate 中平板搖動 30 秒混合均勻，在 37°C 下培養 2 小時，培養完成後，以 562 nm 波長判讀吸光值，並使用蛋白質標準品濃度製作檢量回歸線計算樣本之濃度。

#### 6. 肝臟之細胞激素

將保存於 -80°C 冰箱之肝臟均漿液取出，使用市售 ELISA 試劑組 (eBiosciences Inc., San Diego, CA, USA) 進行測定，檢測項目如：IL-1 $\beta$ 、IL-4、IL-6、IL-10、IL-13、TNF- $\alpha$ 、MCP-1、TSLP、TGF- $\beta$ 1 及 IFN $\gamma$  等。使用試劑組之捕捉抗體 (capture antibody) 和 coating buffer 進行稀釋，並將稀釋後的抗體取 100  $\mu\text{L}$  加入 ELISA 96 well plate (NUNC, LabPlanet, a division of OpticsPlanet, Inc., USA)，存放於 4°C 冰箱培養 12~16 小時。培養完成後，以 wash buffer (Dulbecco's phosphate buffer saline with 0.05% Tween 20, PBST) 清洗 5 次，加入 200  $\mu\text{L}$  blocking buffer 在室溫培養 1 小時。培養完成後，以 wash buffer 清洗 5 次，加入 100  $\mu\text{L}$  之樣品均漿液和 IL-1 $\beta$ 、IL-4、IL-6、IL-10、IL-13、TNF- $\alpha$ 、MCP-1、TSLP、TGF- $\beta$ 1 及 IFN- $\gamma$  等標準品溶液，標準品溶液以序列稀釋之方式進行稀釋，在室溫培養 2 小時。培養完成後，以 wash buffer 清洗 5 次，去除未鍵結之抗體，並加入 100  $\mu\text{L}$  之偵測抗體 (biotin conjugated detection antibody)，在室溫培養 1 小時。培養完成後，以 wash buffer 清洗 5 次，加入 100  $\mu\text{L}$  之 avidin-HRP 在室溫下作用 30 分鐘與 Biotin 結合，此過程需避光。反應完成後，以 wash buffer 清洗 7 次，去除未鍵結之 avidin-HRP，加入 100  $\mu\text{L}$  substrate solution (TMB) 之受質與 avidin-HRP 反應後呈色，最後加入 50  $\mu\text{L}$  之 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 終止反應，以 450 nm 波長判讀吸光值，並使用各個細胞激素標準品濃度製作檢量回歸線計算樣本之濃度。

#### 7. 肝臟之脂聯素

使用市售 ELISA 試劑組 (Adiponectin, R&D System Inc., Minneapolis, MN, USA) 進行測定。使用試劑組之捕捉抗體 (capture antibody) 和 PBS 進行稀釋，並將稀釋後的抗體取 100  $\mu\text{L}$  加入 ELISA 96 well plate (NUNC, LabPlanet, a division of OpticsPlanet, Inc., USA)，存放於 4°C 冰箱培養 12~16 小時。培養完成後，以 wash buffer (Dulbecco's phosphate buffer saline + 0.05% Tween 20, PBST) 清洗 3 次，加入 300  $\mu\text{L}$  稀釋液 (working reagent, 1% BSA in PBS) 在室溫培養 1 小時。培養完成後，以 PBS 清洗 3 次，加入 100  $\mu\text{L}$  之樣品均漿液和脂聯素標準溶液，標準品溶液以序列稀釋之方式進行稀釋，在室溫培養 2 小時。培養完成後，以 PBS 清洗 3 次，

加入 100  $\mu\text{L}$  之偵測抗體 (biotin conjugated detection antibody)，在室溫培養 2 小時。培養完成後，以 PBS 清洗 3 次，加入 100  $\mu\text{L}$  之 Streptavidin-HRP 在室溫下作用 20 分鐘此過程需避光。反應完成後，以 PBS 清洗 3 次，去除未鍵結之 Streptavidin-HRP，加入 100  $\mu\text{L}$  substrate solution (TMB) 之受質與 Streptavidin-HRP 反應後呈色，最後加入 50  $\mu\text{L}$  之 2 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  終止反應，以 450 nm 波長判讀吸光值，並使用脂聯素標準品濃度製作檢量回歸線計算樣本之濃度。

#### 8. 肝臟之瘦素

使用市售 ELISA 試劑組 (Leptin, R&D System Inc., Minneapolis, MN, USA) 進行測定。使用試劑組之捕捉抗體 (capture antibody) 和 PBS 進行稀釋，並將稀釋後的抗體取 100  $\mu\text{L}$  加入 ELISA 96 well plate (NUNC, LabPlanet, a division of OpticsPlanet, Inc., USA)，存放於 4°C 冰箱培養 12~16 小時。培養完成後，以 wash buffer (Dulbecco's phosphate buffer saline with 0.05% Tween 20, PBST) 清洗 3 次，加入 300  $\mu\text{L}$  稀釋液 (woring reagent, 0.05% Tween 20 in PBS) 在室溫培養 1 小時。培養完成後，以 PBS 清洗 3 次，加入 100  $\mu\text{L}$  之樣品均漿液和瘦素標準溶液，標準品溶液以序列稀釋之方式進行稀釋，在室溫培養 2 小時。培養完成後，以 PBS 清洗 3 次，加入 100  $\mu\text{L}$  之偵測抗體 (biotin conjugated detection antibody)，在室溫培養 2 小時。培養完成後，以 PBS 清洗 3 次，加入 100  $\mu\text{L}$  之 Streptavidin-HRP 在室溫下作用 20 分鐘此過程需避光。反應完成後，以 PBS 清洗 3 次，去除未鍵結之 Streptavidin-HRP，加入 100  $\mu\text{L}$  substrate solution (TMB) 之受質與 Streptavidin-HRP 反應後呈色，最後加入 50  $\mu\text{L}$  之 2 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  終止反應，以 450 nm 波長判讀吸光值，並使用瘦素標準品濃度製作檢量回歸線計算樣本之濃度。

#### 9. 肝臟之三酸甘油酯

將保存於 -80°C 冰箱之肝臟組織取約 0.1g，加入 2 mL chloroform/methanol (2:1, v/v) 於玻璃試管中，以玻璃棒研磨肝臟組織，於室溫下靜置 1 小時，取上層之脂肪層，進行離心條件為 5,000  $\times\text{g}$ , 10 min，進一步吸取上層之脂肪層，並加入 2 倍體積 0.9% 生理食鹽水，均勻混合後應呈現乳白色，再以 5,000  $\times\text{g}$ , 5min 條件離心，離心後去除上層液體，接著將樣品放置乾熱器 55°C 加熱，並使用  $\text{N}_2$  將液體吹乾，待樣品完全乾燥後加入 1 mL tert-butyl alcohol/triton X-100/methanol (2:1:1, v/v)，即可存放於 -20°C 冰箱。

以血清生化全自動分析儀 (CoBAS MIRA PLUS, Basel, Switzerland) 進行測定，原理為三酸甘油酯經脂蛋白酶作用，分解成甘油 (glycerol) 和游離脂肪酸 (free fatty acid, FFA)，甘油

在 ATP 和甘油激酶 (glycerokinase) 作用下生成 glycerol-3-phosphateoxidase，再經由磷酸甘油氧化酶作用下，氧化產生過氧化氫 (hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ )，而  $H_2O_2$  在 peroxidase、4-aminoantipyrin 及 3,5-dimethoxy-N-ether-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl) -aniline (DAOS) 作用下，氧化產生紫青色色素，在 500 nm 波長測定其吸光值，再計算成三酸甘油酯濃度。

#### 10. 油紅染色 (Oil-Red-O stain)

Oil-Red-O 是蘇丹染劑之一，為一種弱酸性重氮染劑 (Diazo)，具有非極性及脂溶性功能，當染劑附著在脂肪細胞上便會溶入脂質中。常用於染中性脂肪的冷凍切片或脂蛋白的石蠟切片，正常情況下為紅色粉末狀。

Oil-Red-O 染劑配製：取 Oil-Red-O (Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis. Mo, USA) 0.015 g 粉末，溶入 50 mL 的 isopropanol 混合均勻，並使用濾紙 (ADVANTEC, Toyo Roshi Kaisha, Ltd.) 進行過濾，以濾紙去除較大顆粒的殘渣後，再以 5 mL 針筒取過濾後溶液，並裝上 0.2  $\mu m$  針筒過濾膜再次過濾為 working solution，以鋁箔紙包覆避光即可使用。

Oil-Red-O 切片染色：取實驗小鼠肝臟 O.C.T. 冷凍包埋後之組織塊，以 O.C.T. 冷凍切片膠將組織塊固定在冷凍切片機上，使用 8~10  $\mu m$  切片厚度進行切片，切取下來的組織片以 coating 過之玻片吸附，再將玻片以 50% isopropanol 潤洗 3 分鐘，目的為沖洗掉組織上 O.C.T. 冷凍切片膠，清掉多餘的 isopropanol 後以 Oil-Red-O working solution 滴在組織上，潤洗 10 分鐘確定組織有無著色後，再以 50% isopropanol 潤洗 3 分鐘，將多餘的 Oil-Red-O working solution 去除，待玻片風乾後，以封片膠滴附在玻片上用蓋玻片封片即完成染色作業，之後再使用光學顯微鏡觀察和拍照記錄。

#### 11. 蘇木紫與伊紅染色 (hematoxylin & eosin stain, H&E stain)

染料蘇木紫可以將嗜鹼性結構染成藍紫色，而伊紅可以將嗜酸性結構染成粉紅色。此種染色方法是利用組織結構對不同與染料的結合程度不同。

H&E 切片染色：取浸泡 10% formalin 之實驗小鼠肝臟組織，浸泡 24 小時以上，方可進行組織修飾，將組織切片修整切平後委外 (Bond Biotech., Inc., Taichung, Taiwan) 包埋成組織蠟塊，並且切片及 H&E 染色，再使用光學顯微鏡觀察和拍照記錄。

#### 12. 免疫組織化學染色法 (immunohistochemistry, IHC)

免疫組織化學染色法是運用免疫反應中，抗原 (antigen, Ag) 和抗體 (antibody, Ab) 間的專一結合性，並藉抗體上所呈現的訊號來觀察細胞或組織切片，是否有目標抗原存在。

IHC 切片染色：取浸泡 10% formalin 之實驗小鼠肝臟組織，浸泡 24 小時以上，方可進行組織修飾，將組織切片修整切平後委外 (Bond Biotech., Inc., Taichung, Taiwan) 包埋成蠟塊，並且切片成 IHC 專用玻片。將玻片以二甲苯 (xylene) 和酒精 (ethanol, EtOH) 潤洗，目的為脫蠟及復水，潤洗步驟依序使用 xylene、100% EtOH、90% EtOH、70% EtOH 及最後 50% EtOH。將脫蠟後的玻片浸泡於緩衝溶液 (10 mM citrate buffer, pH 6.0)，放入滅菌釜中隔水加熱使抗原復性，加熱至 121°C 後 3 分鐘關閉滅菌釜電源，將玻璃缸拿出緩緩沖水降溫，冷卻後使用玻片筆將玻片上組織畫圈圈起來，接著使用市售 NovoLink Max polymer detection system kit (Leica biosystems Newcastle, Ltd., UK) 進行染色，首先滴上 peroxidase blocking solution 5 分鐘，目的為除去過氧化物質干擾，再用 wash buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.05% Tween 20, 1×TTBS) 潤洗 2 分鐘兩次，然後滴上一級抗體 (anti-TRL-4, anti-4 HNE, anti-GLUT2, anti-GLUT4 等) 反應 1 小時後，重複潤洗步驟，滴上二級抗體 (anti-IgG) 反應 20 分鐘後，重複潤洗步驟，接著加入 3,3-diaminobenzidine (DAB) 與發生免疫反應部位呈色，反應時間大約 3 分鐘，最後滴上 hematoxylin 染色 7 分鐘，目的為將組織背景染色便於觀察，待風乾後封片即完成色作業，之後再使用光學顯微鏡觀察和拍照記錄。

### 13. 盲腸內容物之分離培養

實驗小鼠犧牲後，取其盲腸區段，將盲腸內之糞便擠出，取糞便  $0.1 \pm 0.02\text{g}$  加入厭氧稀釋液 1 mL 混合均勻，再十倍序列稀釋到適當稀釋倍數，並塗盤於配製之培養基進行培養，以倒皿法使稀釋樣品液與培養基混合均勻，待培養基冷卻凝固後倒置培養。

藥品配製：

#### (1). 厭氧稀釋液

秤取 gelatin 0.2 g、salt solution 50 mL 和 Resazurin solution (0.025%) 0.4 mL 混合均勻，加熱至沸騰，待冷卻後再加入 cystein 0.05 g，使用滅菌釜進行濕熱滅菌 121°C 5 mins，滅菌完成後稀釋液應呈現淡黃色，若是呈現粉紅色則表示液體中含有氧氣，需重新配製。

#### (2). 乳酸桿菌選擇性培養基

秤取 MRS broth 44 g、agar 12 g、Tween-80 8 g、cycetenine 0.4 g 以去離子水定量至 700 mL，使用滅菌釜進行濕熱滅菌 121°C 5 mins，滅菌完成後降溫至 50°C，另外配製 maltose 4 g 溶於 100 mL 去離子水，並使用 0.2 μm 濾紙過濾，接著於無菌操作臺中加入過濾後之 maltose 水溶液混合均勻，再倒入 9 cm 培養皿。

### (3). 雙歧桿菌選擇性培養基

秤取 MRS broth 44 g、agar 12 g、LiCl 0.4 g、cycetenine 0.4 g 以去離子水定量至 700 mL，使用滅菌釜進行濕熱滅菌 121°C 5 mins，滅菌完成後降溫至 50°C，外配製 raffinose 8 g 溶於 100 mL 去離子水，並使用 0.2 μm 濾紙過濾，接著於無菌操作臺中加入 raffinose 水溶液混合均勻，再倒入 9 cm 培養皿。

### (4). 大腸桿菌選擇性培養基

秤取 Coliform agar 10.6 g 以去離子水定量至 400 mL，使用滅菌釜進行濕熱滅菌 121°C 5 mins，滅菌完成後降溫至 50°C，於無菌操作臺中倒入 9 cm 培養皿。

培養條件：

Culture	Condition	Temperature (°C)	Time (hr)
<i>Lactobacillus</i>	20% CO <sub>2</sub>	37	72
<i>Bifidobacterium</i>	Anaerobic	45	48
Coliform group	Anaerobic	37	72

## 三、 試驗用藥成分分析

### (一)、 葡萄皮萃取物之白藜蘆醇含量測定

使用高效能液相層析儀 (high-performance liquid chromatography, HPLC) 進行測定，層析法是藉由移動相 (mobile phase) 與固定相 (stationary phase) 連續作用的動態過程。將欲分析物質透過移動相帶動，並與固定相交互作用加以分離。移動相為液體則稱為液相層析法，固定相管柱主要以矽膠或有機物鍵結於矽膠表面所組成，利用對分析物質的吸附作用 (adsorption) 和分配作用 (partition)，把分析物質分離成更單純的物質。

HPLC 基本組成：溶劑供給裝置 (solvent supply)、高壓泵 (pump)、樣品注入器 (injector)、分離管柱 (column)、偵測器 (detector) 及數據處理系統。高壓泵調控移動相溶劑的傳輸，可以控制輸出的壓力、輸送的速率。樣品注入器負責將樣品注射進入輸送管路進



行層析。

HPLC 實驗條件：

(1). 層析條件：

Mobile phase : A:0.1 M Sodium Acetate : Acetonitrile (97 : 3, v/v) ; B :  $\geq 99.9\%$  Acetonitrile

Flow rate : 1.0 mL / min

Injection volume : 20  $\mu$ L

Detector : 254 nm

Temperature : 38 $^{\circ}$ C

(2). 沖提梯度：

Time (min)	Flow (mL / min)	A%	B%
0	1	100	0
13	1	93	7
23	1	77	23
29	1	65	35
35	1	60	40
40	1	0	100
45	1	0	100
50	1	100	0

(3). 層析方法：

預先開啟 HPLC 各項設備，並以低流速沖提儀器管線，待訊號偵測穩定後，方可注入樣品開始分析。藉由 HPLC 高壓泵將 A、B 移動相溶液依照沖提梯度混合，將樣品沖提進入分離管柱，來達到分離效果。

#### 四、 統計分析

(一)、 單因子變異數分析

試驗結果之數據使用 One-way ANOVA 方法進行統計，以 Duncan's multiple-range test 進行檢定，組間的比較以不同字母標示顯著差異性 ( $P < 0.05$ )。

## 肆、 結果

### 一、 葡萄皮萃取物中所含之白藜蘆醇含量

結果如圖十四及圖十五顯示，以 120 mg/kg 之葡萄皮萃取物以二重複方式經 HPLC 分離層析，將其圖譜套用白藜蘆醇檢量線上分別換算出含有 17.624  $\mu\text{g/mL}$  及 20.645  $\mu\text{g/mL}$ ，取其平均值為 19.134  $\mu\text{g/mL}$ ，再換算單位為 19.134 mg/kg，推算此葡萄皮萃取物含有約 16% 之白藜蘆醇。

### 二、 葡萄皮萃取物對肝代謝綜合症之調節

#### (一)、 實驗小鼠之體重、脾臟、肝臟及脂肪重量

實驗小鼠之體重變化如圖一顯示，在十週的試驗期間各組別小鼠體重變化，經 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導肝代謝綜合症造型後，對照組之體重與正常組小鼠相比顯著增多 ( $P < 0.05$ )，而實驗組 (葡萄皮萃取物 120 mg/kg、360 mg/kg、600 mg/kg) 中，給予 360 mg/kg 和 600 mg/kg 之實驗組與對照組相比顯著降低 ( $P < 0.05$ )。實驗小鼠之體增重與肝臟、脾臟重量如表一顯示，體增重方面，對照組顯著高於正常組 ( $P < 0.05$ )，而實驗組 (葡萄皮萃取物 120 mg/kg、360 mg/kg、600 mg/kg) 中，給予 600 mg/kg 之實驗組與對照組相比顯著降低 ( $P < 0.05$ )，其他組別則與對照組無顯著差異。肝臟、脾臟重量方面，對照組顯著高於正常組 ( $P < 0.05$ )，而實驗組則與對照組無顯著差異。實驗小鼠之脂肪重量如表二顯示，腹部脂肪方面，對照組顯著高於正常組 ( $P < 0.05$ )，而實驗組 (葡萄皮萃取物 120 mg/kg、360 mg/kg、600 mg/kg) 中，給予 600 mg/kg 之實驗組與對照組相比顯著降低 ( $P < 0.05$ )。腎周脂方面，對照組顯著高於正常組 ( $P < 0.05$ )，而實驗組 (葡萄皮萃取物 120 mg/kg、360 mg/kg、600 mg/kg) 中，給予 360 mg/kg 和 600 mg/kg 之實驗組與對照組相比顯著降低 ( $P < 0.05$ )。附睪脂方面，對照組顯著高於正常組 ( $P < 0.05$ )，而實驗組 (葡萄皮萃取物 120 mg/kg、360 mg/kg、600 mg/kg) 中，給予 600 mg/kg 之實驗組與對照組相比顯著降低 ( $P < 0.05$ )。

#### (二)、 口服葡萄糖耐受性試驗

實驗小鼠之口服葡萄糖耐受性試驗如圖二和圖三顯示，從圖二可以觀察到，在給予葡萄糖後 30 分鐘有一高峰值，而後隨時間增加，實驗小鼠血糖濃度逐漸下降，其中，正常組下降

幅度相較其他組別平緩，而對照組各採血點也較正常組來得高，並有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。另外，實驗組 (葡萄皮萃取物 120 mg/kg、360 mg/kg、600 mg/kg) 中，給予葡萄皮萃取物 600 mg/kg 之實驗組與對照組相比，在第 90 分鐘以後之採血點顯著降低 ( $P < 0.05$ )。圖三為血糖曲線下面積之結果，利用口服葡萄糖耐受性試驗結果另外計算出個別曲線下面積，對照組顯著高於正常組 ( $P < 0.05$ )，而實驗組 (葡萄皮萃取物 120 mg/kg、360 mg/kg、600 mg/kg) 中，給予葡萄皮萃取物 600 mg/kg 之實驗組與對照組相比顯著降低 ( $P < 0.05$ )。

### (三)、 血清之肝功能指標測定

實驗小鼠血清之肝功能指數如圖四及圖五顯示，不論在 AST 或 ALT 之結果，對照組顯著高於正常組 ( $P < 0.05$ )，而實驗組 (葡萄皮萃取物 120 mg/kg、360 mg/kg、600 mg/kg) 中，在 AST 之結果，實驗組與對照組相比顯著降低 ( $P < 0.05$ )。ALT 之結果中，實驗組與對照組相比皆顯著較低 ( $P < 0.05$ )。

### (四)、 血清之三酸甘油酯和膽固醇含量

實驗小鼠血清之三酸甘油酯和膽固醇含量分別如圖六及圖七顯示，不論三酸甘油酯或膽固醇之結果，對照組顯著高於正常組 ( $P < 0.05$ )，而實驗組 (葡萄皮萃取物 120 mg/kg、360 mg/kg、600 mg/kg) 中，在三酸甘油酯之結果皆顯著低於對照組 ( $P < 0.05$ )。在膽固醇之結果，給予葡萄皮萃取物 360 及 600 mg/kg 之實驗組與對照組相比皆顯著降低 ( $P < 0.05$ )。

### (五)、 肝臟之細胞激素含量

實驗小鼠肝臟之細胞激素含量分別如表三、表四及表五顯示，表三為測定促發炎激素 IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 TNF- $\alpha$  含量，對照皆顯著高於正常組 ( $P < 0.05$ )，而實驗組 (葡萄皮萃取物 120 mg/kg、360 mg/kg、600 mg/kg) 中，給予葡萄皮萃取物 600 mg/kg 之實驗組與對照組相比顯著降低 ( $P < 0.05$ )。表四為測定抗發炎細胞激素 IL-4、IL-10 及 IL-13 含量，對照組顯著高於正常組 ( $P < 0.05$ )，而實驗組 (葡萄皮萃取物 120 mg/kg、360 mg/kg、600 mg/kg) 中，給予葡萄皮萃取物之實驗組與對照組相比皆顯著降低 ( $P < 0.05$ )。表五顯示，對照組顯著高於正常組 ( $P < 0.05$ )，而實驗組 (葡萄皮萃取物 120 mg/kg、360 mg/kg、600 mg/kg) 中，給予葡萄皮萃取物 600 mg/kg 之實驗組與對照組相比顯著降低 ( $P < 0.05$ )。由此研判，給予葡萄皮萃取物 600 mg/kg 能有效改善促進發炎細胞激素在炎症反應中的過度作用，負向調節炎症反應，抑制促進發炎細胞激素的產生，以達到減緩肝臟發炎之情形。

## (六)、 肝臟之脂聯素及瘦素含量

實驗小鼠肝臟之脂聯素及瘦素含量如表六顯示，在脂聯素之結果，對照組顯著低於正常組 ( $P < 0.05$ )，而實驗組 (葡萄皮萃取物 120 mg/kg、360 mg/kg、600 mg/kg) 與對照組相比皆無顯著差異，但有隨著葡萄皮萃取物劑量愈高而上升之趨勢。在瘦素之結果，對照組顯著高於正常組 ( $P < 0.05$ )，而實驗組 (葡萄皮萃取物 120 mg/kg、360 mg/kg、600 mg/kg) 中，給予葡萄皮萃取物 360 mg/kg 及 600 mg/kg 之實驗組與對照組相比顯著降低 ( $P < 0.05$ )。

## (七)、 肝臟之三酸甘油酯

實驗小鼠肝臟之三酸甘油酯含量如圖八顯示，對照組顯著高於正常組 ( $P < 0.05$ )，而實驗組 (葡萄皮萃取物 120 mg/kg、360 mg/kg、600 mg/kg) 中，結果皆顯著低於對照組 ( $P < 0.05$ )。

## (八)、 肝臟病理形態圖

實驗小鼠肝臟外觀如圖九顯示，犧牲後將肝臟取下拍照記錄，圖片中可以觀察到給予 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導後，對照組與正常組相比，對照組小鼠肝臟外觀粉白，為肝臟中脂肪積聚過多所導致，而另外給予葡萄皮萃取物 120 mg/kg、360 mg/kg、600 mg/kg 之實驗組，其小鼠肝臟外觀與對照組相比，較為紅潤有光澤。

## 三、 葡萄皮萃取物對肝代謝綜合症中肝臟病理切片之分析

### (一)、 肝臟紅油染色

實驗小鼠肝臟組織切片之紅油染色如圖十顯示，染上紅色部分為脂肪油滴，在正常組中無明顯油滴積聚，對照組則是大量積聚在組織之內，尤其為肝臟組織中央靜脈之周圍更為明顯。另外，實驗組 (葡萄皮萃取物 120 mg/kg、360 mg/kg、600 mg/kg) 中，可以觀察到隨著投藥劑量愈高，脂肪油滴積聚的情形愈輕微。

### (二)、 肝臟蘇木紫與伊紅染色

實驗小鼠肝臟組織切片之蘇木紫與伊紅染色如圖十一顯示，染料蘇木紫可以將嗜鹼性結構染成藍紫色，而伊紅可以將嗜酸性結構染成粉紅色。可以觀察到正常組的肝細胞排列緊密且整齊，而對照組在經 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導後，產生許多脂肪空泡，肝細胞排列較鬆散、凌亂，血管周圍也可以觀察到發炎細胞浸潤的情形。另外，實驗組 (葡萄皮萃取物 120 mg/kg、360 mg/kg、600 mg/kg) 中，在脂肪空泡產生和發炎細胞浸潤有不同程度的改善，而在給予葡萄皮萃取物 600 mg/kg 之實驗組，脂肪空泡積聚的情形與

對照組相比有減少的結果。

### (三)、 肝臟免疫組織化學染色

#### 1. TLR-4

TLR-4 是表達巨噬細胞和其他細胞內毒素信號傳遞的表面功能性受體，CD14 會與 LPS 鍵結後呈現給 TLR-4，傳遞訊息使 NF- $\kappa$ B 活化，促進發炎細胞激素的分泌。染色結果如圖十二顯示，透過步驟中 DAB 染色，與 TLR-4 抗體呈現陽性反應位置為深褐色。可以觀察到正常組無明顯的反應，而對照組中與 TLR-4 抗體反應的區域較多。另外，實驗組（葡萄皮萃取物 120 mg/kg、360 mg/kg、600 mg/kg）中，與 TLR-4 反應的區域有減少之情形，表示給予葡萄皮萃取物能降低 TLR-4 表現量，使後續發炎細胞激素的訊息傳遞中斷。

#### 2. 4-HNE

肝臟中 4-HNE 的累積可以表示脂質過氧化的程度，染色結果如圖十三顯示，透過步驟中 DAB 染色，與 4-HNE 抗體呈現陽性反應位置為深褐色。可以觀察到正常組無明顯的反應，而對照組中與 4-HNE 抗體反應的區域較多。另外，實驗組（葡萄皮萃取物 120 mg/kg、360 mg/kg、600 mg/kg）中，與 4-HNE 反應的區域有不同程度減少，表示給予葡萄皮萃取物能降低脂質過氧化的程度。

### 四、 葡萄皮萃取物對腸道菌叢之調節

腸道益生菌使用 MRS 培養基培養之乳酸桿菌屬和雙歧桿菌屬代表，非腸道益生菌以大腸桿菌群代表，結果如表七顯示，在乳酸桿菌和雙歧桿菌兩種常見腸道益生菌培養結果，在乳酸桿菌培養結果，各組之間皆無顯著差異；在雙歧桿菌培養結果，對照組菌落數皆顯著低於正常組 ( $P < 0.05$ )，而給予葡萄皮萃取物 (120 mg/kg、360 mg/kg、600 mg/kg) 之實驗組，菌落數皆顯著高於對照組 ( $P < 0.05$ )；非益生菌以大腸桿菌群為代表，其培養結果觀察到對照組菌落數顯著高於正常組 ( $P < 0.05$ )，而給予葡萄皮萃取物 (120 mg/kg、360 mg/kg、600 mg/kg) 之實驗組，菌落數皆顯著低於對照組 ( $P < 0.05$ )。

## 伍、 討論

本研究結果顯示，實驗小鼠經十週誘導及投藥後，對照組的體重（圖一）、肝臟重、脾臟重（表一）、腹部脂肪重、腎周脂重、附睪脂重（表二）與正常組相比皆有顯著增加（ $P < 0.05$ ），因此，對照組誘導肥胖造型成功。另外，給予葡萄皮萃取物（120 mg/kg、360 mg/kg、600 mg/kg）之實驗組中，給予 600 mg/kg 之實驗組與對照組相比，在體重、腹部脂肪重、腎周脂重、附睪脂重皆有顯著減少（ $P < 0.05$ ），初步推論，給予葡萄皮萃取物 600 mg/kg 有改善肥胖之情形。在肝臟外觀型態方面，因肝臟在誘導代謝綜合症過程中產生炎症反應，肝細胞受損後，其組織有修復之功能，修復過程中會產生促使纖維化之物質，造成肝臟組織結構發生改變，還有脂肪的堆積也會使得肝臟重量增加，從肝臟病理型態圖（圖九）可以觀察到，對照組與正常組相比較，對照組外觀較為粉白狀且肥大。

本研究血清中 AST 和 ALT 測定結果（圖四及圖五）顯示，對照組在 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導後，AST 和 ALT 含量顯著高於正常組（ $P < 0.05$ ），而給予葡萄皮萃取物（120 mg/kg、360 mg/kg、600 mg/kg）之實驗組，與對照組相比皆顯著降低血清中 AST 和 ALT 含量（ $P < 0.05$ ），顯示葡萄皮萃取物能調節肝臟，保護肝細胞不受到損傷。另外，對照組之血清及肝臟三酸甘油酯的含量（圖六及圖八）皆顯著高於正常組（ $P < 0.05$ ），而給予葡萄皮萃取物（120 mg/kg、360 mg/kg、600 mg/kg）之實驗組，與對照組相比皆顯著降低血清及肝臟中三酸甘油酯的含量（ $P < 0.05$ ）。在血清中總膽固醇（圖七）也有類似的結果，對照組顯著高於正常組（ $P < 0.05$ ），而在給予葡萄皮萃取物 600 mg/kg 之實驗組與對照組相比有顯著的降低（ $P < 0.05$ ）。根據國家實驗動物中心對 C57BL/6JNarl 小鼠品系小鼠血液分析項目之參考值，三酸甘油酯正常值為  $123.01 \pm 35.22$  mg/dL，總膽固醇正常值為  $117.54 \pm 7.86$  mg/dL，對照組皆高於此標準值，藉此推論出脂質的代謝產生異常，在經過額外給予不同濃度之葡萄皮萃取物十週後，其血清及肝臟中三酸甘油酯和血清總膽固醇皆有下降，顯示葡萄皮萃取物能改善肝臟對脂質的代謝能力。

有許多研究顯示，高脂質的攝取會導致過多的脂質生成及積聚，且造成炎症反應。另有研究指出，給予果糖更容易促使三酸甘油酯的形成。在確立以 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導會造成實驗小鼠肥胖及脂質代謝異常後，接著進行炎症反應相關細胞

激素的檢測，本研究結果顯示 (表三)，對照組其 IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 TNF- $\alpha$  含量皆顯著高於正常組 ( $P < 0.05$ )，而給予葡萄皮萃取物 (120 mg/kg、360 mg/kg、600 mg/kg) 之實驗組，與對照組相比皆顯著降低肝臟中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的含量 ( $P < 0.05$ )。由此結果推論，給予葡萄皮萃取物能減少脂質生成，並降低促進發炎細胞激素的產生。

本研究另外檢測了抗發炎細胞激素，結果顯示，給予葡萄皮萃取物能使抗發炎細胞激素正常作用，進而抑制炎症反應。由 MCP-1、TSLP 含量測定之結果暗示，給予葡萄皮萃取物 600 mg/kg 能有效改善促進發炎細胞激素在炎症反應中的過度作用，負向調節炎症反應，抑制促進發炎細胞激素的產生，以達到減緩肝臟發炎之情形。在探討肝臟與炎症反應之間的關係時，衍生出了雙衝擊假說 (two-hit hypothesis)，此假說認為第一次的打擊是肝臟中脂肪的堆積，造成胰島素阻抗和肝細胞損傷，逐漸往炎症反應發展。第二次的打擊為氧化壓力和多種炎症因子的釋放，引起脂肪變性的肝細胞發炎、壞死。奠基於此假說，本研究在肝臟組織切片進行 IHC 染色，4-HNE 在脂質過氧化過程為最終產物之一，在細胞病理學中，被認為有一定程度造成氧化壓力 (Poli and Schaur, 2000)。結果顯示 (圖十三)，對照組與 4-HNE 抗體反應的區域較多，給予葡萄皮萃取物 (120 mg/kg、360 mg/kg、600 mg/kg) 之實驗組，與 4-HNE 反應的區域有不同程度減少。藉此推論給予葡萄皮萃取物能降低脂質過氧化產生的氧化壓力。

附表二 葡萄皮萃取物相關研究對照表

Authors	Experimental Design	Effects
Jeong <i>et al.</i> , 2012	3T3-L1 preadipocytes	↓ PPARs gene
	200 mg/mL grape skin extract	↓ Lipid metabolism genes
Liang <i>et al.</i> , 2013	3T3-L1 preadipocytes	↓ FASN activity
	25, 50, 75, 100 $\mu$ M air-dried grape skin 48h	↓ lipid accumulation
Hogan <i>et al.</i> , 2011	male C57BLK/6Jmice	↓ body weight
	250 mg/kg body weight/day 12 week	↓ blood glucose and insulin ↓ CRP

綜合其他已發表研究 (附表二)與本研究結果相比較，在 3T3L-1 脂肪細胞試驗中，對其

脂肪代謝相關基因進行分析。PPARs 在脂肪細胞化和脂肪生成有關鍵作用，結果顯示 PPARs 基因表現在給予葡萄皮萃取物後顯著下降，而參與 PPAR 信號傳遞的基因，經過葡萄皮萃取物處理後表現也顯著下降 (Jeong et al., 2012)。另外有研究針對 FASN 進行探討，FASN 被認為是抑制肥胖的標靶，結果顯示葡萄皮萃取物對 FASN 有抑制之作用 (Liang et al., 2013)；在肥胖小鼠模式研究中，在給予誘導肥胖小鼠葡萄皮萃取物後，體重及脂肪重與對照組相比顯著下降，血糖及胰島素濃度與對照組相比也顯著下降，但其 MDA 和 GPx 無顯著差異 (Hogan et al., 2011)。本研究結果未對脂肪生成相關基因進行分析，但在犧牲後秤取脂肪組織之重量 (表二)，給予葡萄皮萃取物之實驗組與對照組相比皆有顯著降低。另外，脂聯素含量分析結果也間接顯示 (表六)，經誘導 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導小鼠脂聯素含量與正常組相比皆較低，而給予葡萄皮萃取物之實驗組與對照組相比有隨劑量增加而增加之趨勢。在口服葡萄糖試驗和曲線下面積之結果顯示 (圖二及圖三)，給予葡萄皮萃取物 600 mg/kg/da 之實驗組與對照組相比，顯著改善血液葡萄糖耐受性。在抵抗氧化壓力方面，小鼠之肝組織切片 4-HNE 免疫組織化學染色之結果 (圖十二)，對照組產生反應區域明顯較多顏色也較深，而給予葡萄皮萃取物之實驗組皆有減少之結果。



附表三 白藜蘆醇對非酒精性脂肪肝之調節

Authors	Experimental Design	Effects
Wang <i>et al.</i> , 2009	HepG2 cell	↓ Lipid accumulation
	0.1% resveratrol	↓ SREBP1
	24h	↑ SIRT1, FOXO1
Yanga and Lim, 2014	Male C57BL/6 J mice	↓ Liver weight, Triglyceride
	8 mg/kg/day of resveratrol	↓ Serum glucose and insulin
	4 week	↑ Serum adiponectine, SIRT1
Faghihzadeh <i>et al.</i> , 2014	Patients	↓ IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$
	500 mg <i>trans</i> -resveratrol	↓ AST, ALT
	12 week	↓ IL-6, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B

白藜蘆醇活化 SIRT1-FOXO1 之間的信號傳遞並抑制 SREBP-1，而 SREBP-1 為調節肝臟中脂肪合成的關鍵轉錄因子，給予白藜蘆醇能減少脂肪生成 (Wang *et al.*, 2009)。另有研究結果證實，白藜蘆醇有利於調節血糖，降低血清中葡萄糖和胰島素，並改善胰島素敏感性，增加血清中脂聯素，而脂聯素參與脂肪組織和肝臟中炎症反應，包括:IL-6、TNF- $\alpha$  (Yanga and Lim, 2014)。臨床試驗指出，給予 NAFLD 症患者白藜蘆醇能降低 AST、ALT、IL-6、TNF- $\alpha$  和 NF- $\kappa$ B (Faghihzadeh *et al.*, 2014)。

附表四 白藜蘆醇對 C57BL/6J 小鼠糖尿病模式產生炎症反應之調節

Authors	Experimental Design	Effects
Kim <i>et al.</i> , 2013	Male C57BLKS/J db/m and db/db mice	↓ Body weight, Kidney weight
	20 mg/kg/day of <i>trans</i> - resveratrol	↓ Triglyceride
	12 week	↓ TGF-β1
		↑ SIRT1, PGC-1α
Guo <i>et al.</i> , 2015	Male C57BL/KsJ <i>db/db</i> mice	↓ End weight
	Chow-containing resveratrol (0.3%)	↓ Fasting blood glucose
	8 week	↓ Plasma insulin
		↓ Total cholesterol, Triglyceride
		↓ MCP-1
		↓ p-IKK, p-IκB, p-NF-κB
Jeon <i>et al.</i> , 2012	Male C57BL/6J mice	↓ Serum glucose and insulin
	200 mg/kg/day of <i>trans</i> - resveratrol	↑ Serum adiponectine
	20 week	↓ Serum leptin
		↓ 4-HNE relative density
		↓ Serum TNF-α

在高脂飲食誘導肥胖小鼠模式中，白藜蘆醇能減少脂肪堆積並改善葡萄糖耐受性和胰島素敏感性。因肥胖所產生的脂肪組織會浸潤到各個器官，包括：附睪、心臟、肝臟和胰臟。確切地來說，肥胖的人和齧齒類動物其脂肪細胞受到巨噬細胞浸潤，產生炎症反應，是促進發炎細胞激素的主要來源 (Jeon *et al.*, 2012)。白藜蘆醇作用為活化 AMPK、SIRT1、PPAR $\gamma$  和 PGC-1 $\alpha$ ，在脂質和葡萄糖的調節有重要的作用 (Kim *et al.*, 2013)。白藜蘆醇能夠降低小鼠血漿與主動脈組織之 ICAM-1、VCAM-1 和 MCP-1 的含量。另外，磷酸化 IKK、磷酸化 I $\kappa$ B 和 NF- $\kappa$ B p65 給予白藜蘆醇後，皆低於未給予白藜蘆醇處理組之組別。顯示白藜蘆醇能負調節 NF- $\kappa$ B 表現 (Guo *et al.*, 2015)。

附表五 白藜蘆醇對 C57BL/6J 小鼠肥胖模式產生炎症反應之調節

Authors	Experimental Design	Effects
		↓Weight gain
		↓ Hepatic cholesterol and triglyceride
Kim <i>et al.</i> , 2011	male C57BL/6J mice high-fat diet contained 0.4% resveratrol 10 week	↓ Plasma glucose and insulin ↓ NF- $\kappa$ B, IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$ ↓TLR2, TLR4
Kang <i>et al.</i> , 2012	Male C57BL/6N mice 30 mg/kg/day of resveratrol 20 weeks	↓ Fasting blood glucose ↓ Serum insulin ↑ p-Akt, p-AMPK
Yanga and Lim, 2014	Male C57BL/6 J mice 8 mg/kg/day of resveratrol 4 week	↓ Liver weight, Triglyceride ↓ Serim glucose and insulin ↑ Serum adiponectine ↑ SIRT1 ↓ IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$
Jeon <i>et al.</i> , 2012	Male C57BL/6J mice 200 mg/kg/day of <i>trans</i> - resveratrol 20 week	↓ Serim glucose and insulin ↑ Serum adiponectine ↓ Serum leptin, TNF- $\alpha$ ↓ 4-HNE relative density

白藜蘆醇顯著降低高脂飲食誘導所產生的脂肪細胞激素 (PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , SREBP-1c, LXR)以及影響它們的標靶基因(FAS, LPL, AP2, Leptin)，TLR 參與先天免疫反應，它們受到微生物代謝產物刺激而活化，信息訊號經由 MyD88 再通過 TLR2 和 TLR4 使得 NF- $\kappa$ B 活化，最後造成促發炎細胞激素分泌，如: IL-6、TNF- $\alpha$  (Kim *et al.*, 2011)。前人研究中，白藜蘆醇在 3T3L-1 細胞和小鼠動物模式中，防止 I $\kappa$ B $\alpha$  降解和抑制 iNOS 的產生 (Kang *et al.*, 2012)。本

研究結果證實，白藜蘆醇有利於調節血糖，降低血清中葡萄糖和胰島素，並改善胰島素敏感性，增加血清中脂聯素。脂聯素被認為能刺激胰島素訊號因子傳遞。另外，最近的研究指出脂聯素可能參與脂肪組和肝臟中炎症反應，包括:IL-6、TNF- $\alpha$  (Yanga and Lim, 2014)。在高脂飲食誘導肥胖小鼠模式中，白藜蘆醇能減少脂肪堆積並改善葡萄糖耐受性和胰島素敏感性。因肥胖所產生的脂肪組織會浸潤到各個器官，包括:附睪、心臟、肝臟和胰臟。確切地來說，肥胖的人和齧齒類動物其脂肪細胞受到巨噬細胞浸潤，產生炎症反應，是促進發炎細胞激素的主要來源 (Jeon *et al.*, 2012)。

近年來許多研究指出，腸道菌相的變化會影響肝代謝綜合症相關的肥胖、非酒精性脂肪肝與糖尿病的發生，腸道菌叢受到日常的飲食、生活作息及運動影響，高鹽高油高糖的飲食習慣造成很多代謝相關的慢性疾病產生，代謝系統的紊亂使得腸道微生物的組成和功能也受到影響，腸道細菌過度生長及腸道內膜通透性增加，內毒素得以穿透腸道表皮層，進入門靜脈的血液流到肝臟中，誘發肝臟中的 Kuffer cell 進行吞噬作用，並且釋放出 IL-1 $\beta$ 、IL-6，促使肝臟產生炎症反應 (Uesugi *et al.*, 2002)。在非酒精性脂肪肝中，LPS 也會促進 TNF- $\alpha$  和其他促發炎細胞激素產生 (Kudo *et al.*, 2009)。本研究結果顯示 (表七)，取實驗小鼠之盲腸內容物，將其稀釋至適當倍數後，分別於乳酸桿菌、雙歧桿菌及大腸桿菌群選擇性培養基塗盤培養。觀察到，在雙歧桿菌培養結果，對照組菌落數皆顯著低於正常組 ( $P < 0.05$ )，而給予葡萄皮萃取物 (120 mg/kg、360 mg/kg、600 mg/kg) 之實驗組，菌落數皆顯著高於對照組 ( $P < 0.05$ )；非益生菌以大腸桿菌群為代表，其培養結果觀察到對照組菌落數皆顯著高於正常組 ( $P < 0.05$ )，而給予葡萄皮萃取物 (120 mg/kg、360 mg/kg、600 mg/kg) 之實驗組，菌落數皆顯著低於對照組 ( $P < 0.05$ )。綜合益生菌及非益生菌培養之結果，可以推論經 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導後，腸道細菌的生態環境受到改變，非益生菌明顯增加，而在給予葡萄皮萃取物後亦能改善實驗小鼠腸道菌叢，使益生菌正常發展。

附表六 白藜蘆醇與腸道菌叢之關係

Authors	Experimental Design	Effects
Qiao <i>et al.</i> , 2014	Male Kunming mice	↓ Final body weight
	200 mg/kg/day of resveratrol	↓ Blood glucose and insulin
	12 week	↓ Serum cholesterol ↓ PPAR $\gamma$ , FAS mRNA ↑ <i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i>
Etxeberria <i>et al.</i> , 2015	Wistar rats	= Weight gain, Liver weight
	<i>trans</i> -resveratrol 15 mg/kg	↓ Serum Insulin
	body weight/day	↓ TNF- $\alpha$ = <i>Lactobacillaceae</i>
Dao <i>et al.</i> , 2011	6 week	
	male C57Bl/6J and Glp1r <sup>-/-</sup>	↓ Blood glucose and AUC
	mice	↑ Plasma insulin
	5 mg/kg/day of resveratrol	↑ GLP-1
	5 week	↑ IL-10, TGF- $\beta$ mRNA ↓ TNF- $\alpha$

針對本研究使用之葡萄皮萃取物當中的白藜蘆醇進行更進一步的探討，並根據附表六所整理出相關的研究結果與其他已發表研究做比較，白藜蘆醇可以維持上皮細胞健康，降低上皮細胞所產生的促發炎激素產生，以阻斷炎症反應信號傳遞，調節細胞激素和趨化因子的產生 (Millhouse *et al.*, 2014)。另有研究發現，多酚化合物透過和細菌之細胞膜結構結合，對某些細菌能產生抑制作用，如：革蘭氏陰性菌比革蘭氏陽性菌對多酚化合物更為敏感。另觀察到，白藜蘆醇生物利用性低，但在小鼠結腸組織發現有大量累積，所以推論白藜蘆醇可透過調節腸道菌叢來達到防止肥胖之效果 (Qiao *et al.*, 2014)。受損的腸道屏障被認為是促進肥胖及相關代謝紊亂之因素，TLRs 家族中特別是 TLR2 和 TLR4，與胃腸道產生之炎症反應有高度相關。TLR2 辨識來自革蘭氏陽性菌衍生之產物，而 TLR4 會受到來自革蘭氏陰性菌產生之 LPS 刺激而活化。它們的表現是源自於宿主腸道微生物失衡產生的相互作用 (Etxeberria *et al.*,

2015)。已經知道腸道微生物會影響代謝系統，包括肥胖、糖尿病及心血管疾病。腸道菌叢會影響宿主對膽酸、膽固醇及膳食成分可能發展成動脈粥狀硬化。另外，由飲食誘導糖尿病小鼠模式中，觀察到白藜蘆醇能降低炎症反應，增加胰島素和 GLP-1 對葡萄糖敏感性，並且發揮益生元之作用以調節腸道微生物平衡。如上述，腸道微生物對宿主腸道代謝系統之影響，白藜蘆醇間接對肝臟膽酸的製造產生正面的效果 (Xiao *et al.*, 2014)。白藜蘆醇透過增加肝臟、肌肉及結腸產生 IL-10 降低炎症反應。另外，也減少了 TNF- $\alpha$  mRNA 表現。在高脂飲食誘導炎症反應會造成微生物失衡，並且減少小鼠 GLP-1 分泌。先前研究指出，給予益生元能維持上皮細胞健康，在本篇報告白藜蘆醇增加了 GLP-1 分泌，藉由恢復 GLP-1 分泌，改善了腸道菌叢和炎症反應 (Dao *et al.*, 2011)。

附表七 白藜蘆醇與腸道菌叢對肥胖症之影響

Authors	Experimental Design	Effects
Qiao <i>et al.</i> , 2014	Male Kunming mice 200 mg/kg/day of resveratrol 12 week	↓ Final body weight ↓ Blood glucose and insulin ↓ Serum cholesterol ↓ PPAR $\gamma$ , FAS mRNA ↑ <i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i>
Etxeberría <i>et al.</i> , 2015	Wistar rats <i>trans</i> -resveratrol 15 mg/kg body weight/day 6 week	= Weight gain, Liver weight ↓ Serum Insulin ↓ TNF- $\alpha$ = <i>Lactobacillaceae</i>

研究發現，多酚與抗菌活性有關，透過和細菌的細胞膜結構結合，對某些細菌能產生抑制作用。在細胞表面結構的差異可以解釋為什麼革蘭氏陽性菌比革蘭氏陰性菌對這些多酚化合物更為敏感 (Qiao *et al.*, 2014)。受損的腸道屏障被認為是促進肥胖及相關代謝紊亂之因素，TLRs 家族中特別是 TLR2 和 TLR4，與胃腸道產生之炎症反應有高度相關。TLR2 辨識來自革蘭氏陽性菌衍生之產物，而 TLR4 會受到來自革蘭氏陰性菌產生之 LPS 刺激而活化。

它們的表現是源自於宿主腸道微生物失衡產生的相互作用 (Etxeberria *et al.*, 2015)。而我們的研究結果也顯示(表七)，腸道雙歧桿菌培養結果，對照組菌落數皆顯著低於正常組 ( $P < 0.05$ )，而給予葡萄皮萃取物 (120 mg/kg、360 mg/kg、600 mg/kg) 之實驗組，菌落數皆顯著高於對照組 ( $P < 0.05$ )；大腸桿菌群培養結果觀察到對照組菌落數皆顯著高於正常組 ( $P < 0.05$ )，而給予葡萄皮萃取物 (120 mg/kg、360 mg/kg、600 mg/kg) 之實驗組，菌落數皆顯著低於對照組 ( $P < 0.05$ )。綜合益生菌及非益生菌培養之結果，可以推論經 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導後，腸道細菌的生態環境受到改變，非益生菌明顯增加，而在給予葡萄皮萃取物後亦能改善實驗小鼠腸道菌叢，使益生菌正常發展。

肥胖源自於遺傳和環境之間的相互作用，高脂肪飲食在誘導動物內臟肥胖為重要的關鍵因素。總結對白藜蘆醇之研究，顯示此化合物具有抗肥胖之效果。白藜蘆醇之生物利用率低，但在結腸組織發現有大量累積，初步推論，白藜蘆醇透過調節腸道微生物來達到抗肥胖之效果，並且進一步改善脂肪的儲存和代謝 (Qiao *et al.*, 2014)。已經知道腸道微生物會影響代謝系統，包括肥胖、糖尿病及心血管疾病。腸道微生物可透過影響炎症反應和宿主對膽酸、膽固醇及膳食成分發展成動脈粥狀硬化。另外，由飲食誘導糖尿病小鼠模式中，觀察到白藜蘆醇能降低炎症反應，增加胰島素和 GLP-1 對葡萄糖敏感性，並且發揮益生元之作用以調節腸道微生物平衡。如上述，腸道微生物對宿主腸道代謝系統之影響，白藜蘆醇間接對肝臟膽酸的製造產生正面的效果 (Xiao *et al.*, 2014)。

## 陸、 結論

綜合以上結果，實驗小鼠每日攝取高脂及高果糖玉米糖漿，過度攝取能量的情況下，轉而形成脂質堆積，尤其肝臟是脂質代謝的重要器官之一。當肝細胞及脂肪組織間的脂質代謝動態失衡，三酸甘油酯合成及分解之間發生障礙，導致三酸甘油酯在肝細胞內過度屯積，最後衍生成脂肪變性。另外，代謝系統的紊亂也使得腸道微生物的生態受到影響，腸道細菌過度生長及腸道內膜通透性增加，內毒素得以穿透腸道表皮層，進入門靜脈的血液流到肝臟中，肝臟在腹背受敵的環境下，最終產生病變。而在給予葡萄皮萃取物後，調節了脂質異常代謝造成的炎症反應及氧化壓力，降低脂肪組織的生成，進一步影響脂肪肝的形成與糖尿病的發生，達到改善肝代謝綜合症之目標。



## 柒、 參考文獻

- Adams, J. M., and S. Cory. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281:1322-1326.
- Aguirre, L., A. Fernández-Quintela, N. Arias, and M. P. Portillo. 2014. Resveratrol: anti-obesity mechanisms of action. *Molecules* 19:18632-18655.
- Ahima, R. S. 2006. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity* 14:242-249.
- Aird, W. C. 2003. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood* 101:3765-3777.
- Al-Rasheed, N. M., H. A. Attia, R. A. Mohamad, N. M. Al-Rasheed, M. A. Al-Amin, and A. Al-Onazi. 2015. Aqueous date flesh or pits extract attenuates liver fibrosis via suppression of hepatic stellate cell activation and reduction of inflammatory cytokines, transforming growth factor- $\beta$ 1 and angiogenic markers in carbon tetrachloride-intoxicated rats. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 2015:247357.
- Andrade-Oliveira, V., N. O. Câmara, and P. M. Moraes-Vieira. 2015. Adipokines as drug targets in diabetes and underlying disturbances. *J. Diabetes Res.* 2015:681612.
- Bao, Y., and X. Cao. 2014. The immune potential and immunopathology of cytokine-producing B cell subsets: a comprehensive review. *J. Autoimmun.* 55:10-23.
- Barone, S., S. L. Fussell, A. K. Singh, F. Lucas, J. Xu, C. Kim, X. Wu, Y. Yu, H. Amlal, U. Seidler, J. Zuo, and M. Soleimani. 2009. Slc2a5 (Glut5) is essential for the absorption of fructose in the intestine and generation of fructose-induced hypertension. *J. Biol. Chem.* 284:5056-5066.
- Baroni, G. S., L. D'Ambrosio, P. Curto, A. Casini, R. Mancini, A. M. Jezequel, and A. Benedetti. 1996. Interferon gamma decreases hepatic stellate cell activation and extracellular matrix deposition in rat liver fibrosis. *Hepatology* 23:1189-1199.
- Bassi, Ê. J., P. M. Moraes-Vieira, C. S. Moreira-Sá, D. C. Almeida, L. M. Vieira, C. S. Cunha, M. I. Hiyane, A. S. Basso, A. Pacheco-Silva, and N. O. Câmara. 2012. Immune regulatory properties of allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells in the treatment of

experimental autoimmune diabetes. *Diabetes* 61:2534-2545.

- Baur, J. A., K. J. Pearson, N. L. Price, H. A. Jamieson, C. Lerin, A. Kalra, V. V. Prabhu, J. S. Allard, G. Lopez-Lluch, K. Lewis, P. J. Pistell, S. Poosala, K. G. Becker, O. Boss, D. Gwinn, M. Wang, S. Ramaswamy, K. W. Fishbein, R. G. Spencer, E. G. Lakatta, D. Le Couteur, R. J. Shaw, P. Navas, P. Puigserver, D. K. Ingram, R. de Cabo, and D. A. Sinclair. 2006. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444:337-342.
- Berda-Haddad, Y., S. Robert, P. Salers, L. Zekraoui, C. Farnarier, C. A. Dinarello, F. Dignat-George, and G. Kaplanski. 2011. Sterile inflammation of endothelial cell-derived apoptotic bodies is mediated by interleukin-1 $\alpha$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 108:20684-20689.
- Berliner, J. A., and J. W. Heinecke. 1996. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* 20:707-727.
- Beurel, E., and R. S. Jope. 2009. Lipopolysaccharide-induced interleukin-6 production is controlled by glycogen synthase kinase-3 and STAT3 in the brain. *J. Neuroinflammation.* 6:1-9.
- Borriello, A., V. Cucciolla, F. Della Ragione, and P. Galletti. 2010. Dietary polyphenols: focus on resveratrol, a promising agent in the prevention of cardiovascular diseases and control of glucose homeostasis. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 20:618-625.
- Brown, K. M., K. Pickard, F. Nicol, G. J. Beckett, G. G. Duthie, and J. R. Arthur. 2000. Effects of organic and inorganic selenium supplementation on selenoenzyme activity in blood lymphocytes, granulocytes, platelets and erythrocytes. *Clin. Sci. (Lond).* 98:593-599.
- Bryant, N. J., R. Govers, and D. E. James. 2002. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:267-277.
- Burns, J., T. Yokota, H. Ashihara, M. E. Lean, and A. Crozier. 2002. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J. Agric. Food Chem.* 50:3337-3340.
- Camandola, S., A. Scavazza, G. Leonarduzzi, F. Biasi, E. Chiarotto, A. Azzi, and G. Poli. 1997. Biogenic 4-hydroxy-2-nonenal activates transcription factor AP-1 but not NF-kappa B in cells of the macrophage lineage. *Biofactors.* 6:173-179.

- Castoldi, A., T. T. Braga, M. Correa-Costa, C. F. Aguiar, Ê. J. Bassi, R. Correa-Silva, R. M. Elias, F. Salvador, P. M. Moraes-Vieira, M. A. Cenedeze, M. A. Reis, M. I. Hiyane, Á. Pacheco-Silva, G. M. Gonçalves, and N. O. Saraiva Câmara. 2012. TLR2, TLR4 and the MYD88 signaling pathway are crucial for neutrophil migration in acute kidney injury induced by sepsis. *PLoS. One.* 7:e37584.
- Castro, G. S., J. F. Cardoso, H. Vannucchi, S. Zucoloto, and A. A. Jordão. 2011. Fructose and NAFLD:metabolic implications and models of induction in rats. *Acta. Cir. Bras.* 26:45-50.
- Catley, M. C., J. Coote, M. Bari, and K. L. Tomlinson. 2011. Monoclonal antibodies for the treatment of asthma. *Pharmacol Ther.* 132:333-351.
- Cayrol, C., and J. P. Girard. 2009. The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 106:9021-9026.
- Chai, Y. C., S. S. Ashraf, K. Rokutan, R. B. Jr. Johnston, and J. A. Thomas. 1994. S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. *Arch. Biochem. Biophys.* 310:273-281.
- Chen, C. J., H. Kono, D. Golenbock, G. Reed, S. Akira, and K. L. Rock. 2007. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat. Med.* 13:851-6.
- Chomarat, P., and J. Banchereau. 1997. An update on interleukin-4 and its receptor. *Eur. Cytokine Netw.* 8:333-344.
- Colotta, F., F. L. Sclacca, M. Sironi, W. Luini, M. J. Rabiet, and A. Mantovani. 1994. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 by monocytes and endothelial cells exposed to thrombin. *Am. J. Pathol.* 144:975-85.
- Cushman, S. W., and L. J. Wardzala. 1980. Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 255:4758-4762.
- Dalle-Donne, I., R. Rossi, R. Colombo, D. Giustarini, and A. Milzani. 2006. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin. Chem.* 52:601-623.

- Dao, T. M., A. Waget, P. Klopp, M. Serino, C. Vachoux, L. Pechere, D. J. Drucker, S. Champion, S. Barthélemy, Y. Barra, R. Burcelin, and E. Séré. 2011. Resveratrol increases glucose induced GLP-1 secretion in mice: a mechanism which contributes to the glycemc control. *PLoS One*. 6:e20700.
- De Waal Malefyt, R., J. Abrams, B. Bennett, C. G. Figdor, and J. E. de Vries. 1991. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.* 174:1209-1220
- Dinarello, C. A. 2011. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*. 117:3720-3732.
- Dinarello, C. A., A. Simon, and J. W. van der Meer. 2012. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 11:633-652.
- Dinarello, C., W. Arend, J. Sims, D. Smith, H. Blumberg, L. O'Neill, R. Goldbach-Mansky, T. Pizarro, H. Hoffman, P. Bufler, M. Nold, P. Ghezzi, A. Mantovani, C. Garlanda, D. Boraschi, A. Rubartelli, M. Netea, J. van der Meer, L. Joosten, T. Mandrup-Poulsen, M. Donath, E. Lewis, J. Pfeilschifter, M. Martin, M. Kracht, H. Muehl, D. Novick, M. Lukic, B. Conti, A. Solinger, P. Kelk, F. van de Veerdonk, and C. Gabel. 2011. IL-1 family nomenclature. *Nat. Immunol.* 11:970-973.
- Douard, V., and R. P. Ferraris. 2008. Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. *Am. J. Physiol. Endocrinol Metab.* 295:E227-237
- Douard, V., and R. P. Ferraris. 2013. The role of fructose transporters in diseases linked to excessive fructose intake. *J. Physiol.* 591:401-414.
- Dubinina, E. E., and V. A. Dadali. 2010. Role of 4-hydroxy-trans-2-nonenal in cell functions. *Biochemistry (Mosc).* 75:1069-1087.
- Duplus, E., and C. Forest. 2002. Is there a single mechanism for fatty acid regulation of gene transcription? *Biochem. Pharmacol.* 64:893-901.
- Dyer, J., I. S. Wood, A. Palejwala, A. Ellis, and S. P. Shirazi-Beechey. 2002. Expression of monosaccharide transporters in intestine of diabetic humans. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver*

Physiol. 282:G241-248.

Eaton, S., K. Bartlett, and M. Pourfarzam. 1996. Mammalian mitochondrial beta-oxidation. *Biochem. J.* 320:345-357.

Eggesbø, J. B., I. Hjermann, A. T. Høstmark, and P. Kierulf. 1996. LPS induced release of IL-1 beta, IL-6, IL-8 and TNF-alpha in EDTA or heparin anticoagulated whole blood from persons with high or low levels of serum HDL. *Cytokine.* 8:152-60.

Espinassous, Q., E. Garcia-de-Paco, I. Garcia-Verdugo, M. Synguelakis, S. von Aulock, J. M. Sallenave, A. N. McKenzie, and J. Kanellopoulos. 2009. IL-33 enhances lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine production from mouse macrophages by regulating lipopolysaccharide receptor complex. *J. Immunol.* 183:1446-55.

Etxeberria, U., N. Arias, N. Boqué, M. T. Macarulla, M. P. Portillo, J. A. Martínez, and F. I. Milagro. 2015. Reshaping faecal gut microbiota composition by the intake of trans-resveratrol and quercetin in high-fat sucrose diet-fed rats. *J. Nutr. Biochem.* 26:651-660.

Faghihzadeh, F., P. Adibi, R. Rafiei, and A. Hekmatdoost. 2014. Resveratrol supplementation improves inflammatory biomarkers in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Nutr. Res.* 34:837-843.

Fiorentino, D. F., M. W. Bond, and T. R. Mosmann. 1989. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.* 170:2081-2095.

Fukumoto, H., S. Seino, H. Imura, Y. Seino, R. L. Eddy, Y. Fukushima, M. G. Byers, T. B. Shows, and G. I. Bell. 1988. Sequence, tissue distribution, and chromosomal localization of mRNA encoding a human glucose transporter-like protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 85:5434-5438.

Garlanda, C., C. A. Dinarello, and A. Mantovani. 2013. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity.* 39:1003-18.

Garsin, D. A., J. M. Villanueva, J. Begun, D. H. Kim, C. D. Sifri, S. B. Calderwood, G. Ruvkun, and F. M. Ausubel. 2003. Long-lived *C. elegans* *daf-2* mutants are resistant to bacterial

pathogens. *Science*. 300:1921.

Gaster, M., P. Staehr, H. Beck-Nielsen, H. D. Schröder, and A. Handberg. 2001. GLUT4 is reduced in slow muscle fibers of type 2 diabetic patients: is insulin resistance in type 2 diabetes a slow, type 1 fiber disease? *Diabetes*. 50:1324-1329.

Gillum, M. P., M. E. Kotas, D. M. Erion, R. Kursawe, P. Chatterjee, K. T. Nead, E. S. Muise, J. J. Hsiao, D. W. Frederick, S. Yonemitsu, A. S. Banks, L. Qiang, S. Bhanot, J. M. Olefsky, D. D. Sears, S. Caprio, and G. I. Shulman. 2011. SirT1 regulates adipose tissue inflammation. *Diabetes*. 60:3235-32345.

Gressner, A. M., and R. Weiskirchen. 2006. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J. Cell Mol. Med.* 10:76-99.

Guo, R., B. Liu, K. Wang, S. Zhou, W. Li, and Y. Xu. 2014. Resveratrol ameliorates diabetic vascular inflammation and macrophage infiltration in db/db mice by inhibiting the NF- $\kappa$ B pathway. *Diab. Vasc. Dis. Res.* 11:92-102.

Haigis, M. C., and L. P. Guarente. 2006. Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev.* 20:2913-2921.

Hardy, R. R., C. E. Carmack, S. A. Shinton, J. D. Kemp, and K. Hayakawa. 1991. Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J. Exp. Med.* 173:1213-1225.

Henriksen, E. J., R. E. Bourey, K. J. Rodnick, L. Koranyi, M. A. Permutt, and J. O. Holloszy. 1990. Glucose transporter protein content and glucose transport capacity in rat skeletal muscles. *Am. J. Physiol.* 259:E593-598.

Herbette, S., P. Roeckel-Drevet, and J. R. Drevet. 2007. Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. *FEBS J.* 274:2163-2180.

Hirano, T., T. Taga, N. Nakano, K. Yasukawa, S. Kashiwamura, K Shimizu, K. Nakajima, K. H. Pyun, and T. Kishimoto. 1985. Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 82:5490-5494.

- Hogan, S., C. Canning, S. Sun, X. Sun, H. Kadouh, and K. Zhou. 2011. Dietary supplementation of grape skin extract improves glycemia and inflammation in diet-induced obese mice fed a Western high fat diet. *J. Agric. Food Chem.* 59:3035-3041.
- Hotamisligil, G. S., P. Arner, J. F. Caro, R. L. Atkinson, and B. M. Spiegelman. 1995. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 95:2409-2415.
- Howard, J. K., G. M. Lord, G. Matarese, S. Vendetti, M. A. Ghatei, M. A. Ritter, R. I. Lechler, and S. R. Bloom. 1999. Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice. *J. Clin. Invest.* 104:1051-1059.
- Howitz, K. T., K. J. Bitterman, H. Y. Cohen, D. W. Lamming, S. Lavu, J. G. Wood, R. E. Zipkin, P. Chung, A. Kisielewski, L. L. Zhang, B. Scherer, and D. A. Sinclair. 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature.* 425:191-196.
- Idzerda, R. L., C. J. March, B. Mosley, S. D. Lyman, T. Vanden Bos, S. D. Gimpel, W. S. Din, K. H. Grabstein, M. B. Widmer, and L. S. Park. 1990. Human interleukin 4 receptor confers biological responsiveness and defines a novel receptor superfamily. *J. Exp. Med.* 171:861-873.
- Jacob, R. A. 1995. The integrated antioxidant system. *Nutrition Research.* 15:755-766.
- Janes, K. A., S. Gaudet, J. G. Albeck, U. B. Nielsen, D. A. Lauffenburger, and P. K. Sorger. 2006. The response of human epithelial cells to TNF involves an inducible autocrine cascade. *Cell.* 124:1225-1239.
- Jeon, B. T., E. A. Jeong, H. J. Shin, Y. Lee, D. H. Lee, H. J. Kim, S. S. Kang, G. J. Cho, W. S. Choi, and G. S. Roh. 2012. Resveratrol attenuates obesity-associated peripheral and central inflammation and improves memory deficit in mice fed a high-fat diet. *Diabetes.* 61:1444-1454.
- Jeong, W. I., O. Park, S. Radaeva, and B. Gao. 2006. STAT1 inhibits liver fibrosis in mice by inhibiting stellate cell proliferation and stimulating NK cell cytotoxicity. *Hepatology.* 44:1441-1451.
- Jeong, Y. S., J. H. Hong, K. H. Cho, and H. K. Jung. 2012. Grape skin extract reduces adipogenesis

- and lipogenesis-related gene expression in 3T3-L1 adipocytes through the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  signaling pathway. *Nutr. Res.* 32:514-521.
- Johnson, A. M., and J. M. Olefsky. 2013. The origins and drivers of insulin resistance. *Cell.* 152:673-684.
- Jones, H. F., R. N. Butler, and D. A. Brooks. 2011. Intestinal fructose transport and malabsorption in humans. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* 300:G202-206.
- Kadowaki, T., and T. Yamauchi. 2005. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr. Rev.* 26:439-451.
- Kadowaki, T., T. Yamauchi, and N. Kubota. 2008. The physiological and pathophysiological role of adiponectin and adiponectin receptors in the peripheral tissues and CNS. *FEBS Lett.* 582:74-80.
- Kampmann, U., B. Christensen, T. S. Nielsen, S. B. Pedersen, L. Ørskov, S. Lund, N. Møller, and N. Jessen. 2011. GLUT4 and UBC9 protein expression is reduced in muscle from type 2 diabetic patients with severe insulin resistance. *PLoS. One.* 6:e27854.
- Kanfi, Y., V. Peshti, Y. M. Gozlan, M. Rathaus, R. Gil, and H. Y. Cohen. 2008. Regulation of SIRT1 protein levels by nutrient availability. *FEBS Lett.* 582:2417-2423.
- Kang, W., H. J. Hong, J. Guan, D. G. Kim, E. J. Yang, G. Koh, D. Park, C. H. Han, Y. J. Lee, D. H. Lee. 2012. Resveratrol improves insulin signaling in a tissue-specific manner under insulin-resistant conditions only: in vitro and in vivo experiments in rodents. *Metabolism.* 61:424-433.
- Kawaratani, H., T. Tsujimoto, A. Douhara, H. Takaya, K. Moriya, T. Namisaki, R. Noguchi, H. Yoshiji, M. Fujimoto, and H. Fukui. 2013. The effect of inflammatory cytokines in alcoholic liver disease. *Mediators Inflamm.* 2013:495156.
- Kerner, J., and C. Hoppel. 2000. Fatty acid import into mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1486:1-17.
- Kim, M. Y., J. H. Lim, H. H. Youn, Y. A. Hong, K. S. Yang, H. S. Park, S. Chung, S. H. Ko, S. J. Shin, B. S. Choi, H. W. Kim, Y. S. Kim, J. H. Lee, Y. S. Chang, and C. W. Park. 2013.



- Resveratrol prevents renal lipotoxicity and inhibits mesangial cell glucotoxicity in a manner dependent on the AMPK-SIRT1-PGC1 $\alpha$  axis in db/db mice. *Diabetologia*. 6:204-217.
- Kim, S., Y. Jin, Y. Choi, and T. Park. 2011. Resveratrol exerts anti-obesity effects via mechanisms involving down-regulation of adipogenic and inflammatory processes in mice. *Biochem Pharmacol*. 81:1343-1351.
- Kudo, H., T. Takahara, Y. Yata, K. Kawai, W. Zhang, and T. Sugiyama. 2009. Lipopolysaccharide triggered TNF-alpha-induced hepatocyte apoptosis in a murine non-alcoholic steatohepatitis model. *J. Hepatol*. 51:168-175.
- Lagou, M., C. Argmann, Z. Gerhart-Hines, H. Meziane, C. Lerin, F. Daussin, N. Messadeq, J. Milne, P. Lambert, P. Elliott, B. Geny, M. Laakso, P. Puigserver, and J. Auwerx. 2006. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell*. 127:1109-1122.
- Lefrançois, E., S. Roga, V. Gautier, A. Gonzalez-de-Peredo, B. Monsarrat, J. P. Girard, and C. Cayrol. 2012. IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 109:1673-1678.
- Leiberer, A., A. Mündlein, and H. Drexel. 2013. Phytochemicals and their impact on adipose tissue inflammation and diabetes. *Vascul Pharmacol*. 58:3-20.
- Levin, S. D., R. M. Koelling, S. L. Friend, D. E. Isaksen, S. F. Ziegler, R. M. Perlmutter, and A. G. Farr. 1999. Thymic stromal lymphopoietin: a cytokine that promotes the development of IgM+ B cells in vitro and signals via a novel mechanism. *J. Immunol*. 162:677-683.
- Li, Y. C., and C. C. Hsieh. 2014. Lactoferrin dampens high-fructose corn syrup-induced hepatic manifestations of the metabolic syndrome in a murine model. *PLoS. One*. 9:e97341.
- Li, Z. Y., P. Wang, and C. Y. Miao. 2011. Adipokines in inflammation, insulin resistance and cardiovascular disease. *Clin. Exp. Pharmacol Physiol*. 38:888-896.
- Li, Z., S. Yang, H. Lin, J. Huang, P. A. Watkins, A. B. Moser, C. Desimone, X. Y. Song, and A. M. Diehl. 2003. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 37:343-350.

- Liang, H., B. Yin, H. Zhang, S. Zhang, Q. Zeng, J. Wang, X. Jiang, L. Yuan, C. Y. Wang, and Z. Li. 2008. Blockade of tumor necrosis factor (TNF) receptor type 1-mediated TNF- $\alpha$  signaling protected Wistar rats from diet-induced obesity and insulin resistance. *Endocrinology*. 149:2943-2951.
- Liang, Y., W. Tian, and X. Ma. 2013. Inhibitory effects of grape skin extract and resveratrol on fatty acid synthase. *BMC Complement Altern. Med.* 13:361-368.
- Luckey, S. W., M. Taylor, B. P. Sampey, R. I. Scheinman, and D. R. Petersen. 2002. 4-hydroxynonenal decreases interleukin-6 expression and protein production in primary rat Kupffer cells by inhibiting nuclear factor-kappaB activation. *J. Pharmacol Exp. Ther.* 302:296-303.
- Margis, R., C. Dunand, F. K. Teixeira, and M. Margis-Pinheiro. 2008. Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *FEBS J.* 275:3959-3970.
- Massudi, H., R. Grant., N. Braidy, J. Guest, B. Farnsworth, and G. J. Guillemin. 2012. Age-associated changes in oxidative stress and NAD<sup>+</sup> metabolism in human tissue. *PLoS. One.* 7:e42357.
- McCord, J. M., and I. Fridovich. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J. Biol. Chem.* 244:6049-6055.
- Moraes-Vieira, P. M., R. A. Larocca, E. J. Bassi, J. P. Peron, V. Andrade-Oliveira, F. Wasinski, R. Araujo, T. Thornley, F. J. Quintana, A. S. Basso, T. B. Strom, and N. O. Câmara. 2014. Leptin deficiency impairs maturation of dendritic cells and enhances induction of regulatory T and Th17 cells. *Eur. J. Immunol.* 44:794-806.
- Muir, A. J., P. B. Sylvestre, and D. C. Rockey. 2006. Interferon gamma-1b for the treatment of fibrosis in chronic hepatitis C infection. *J. Viral Hepat.* 13:322-328.
- Narasimhan, A., M. Chinnaiyan, and B. Karundevi. 2015. Ferulic acid regulates hepatic GLUT2 gene expression in high fat and fructose-induced type-2 diabetic adult male rat. *Eur. J. Pharmacol.* pii: S0014-2999(15)00405-7.
- Oh, D. K., T. Ciaraldi, and R. R. Henry. Adiponectin in health and disease. 2007. *Diabetes Obes.*

Metab. 9:282-289.

Olefsky, J. M., and C. K. Glass. 2010. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev. Physiol.* 72:219-246.

Paludan, S. R. 2001. Requirements for the induction of interleukin-6 by herpes simplex virus-infected leukocytes. *J. Virol.* 75:8008-8015.

Park, S. J., F. Ahmad, A. Philp, K. Baar, T. Williams, H. Luo, H. Ke, H. Rehmann, R. Taussig, A. L. Brown, M. K. Kim, M. A. Beaven, A. B. Burgin, V. Manganiello, and J. H. Chung. 2012. Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell.* 148:421-433.

Parola, M., G. Robino, F. Marra, M. Pinzani, G. Bellomo, G. Leonarduzzi, P. Chiarugi, S. Camandola, G. Poli, G. Waeg, P. Gentilini, and M. U. Dianzani. 1998. HNE interacts directly with JNK isoforms in human hepatic stellate cells. *J. Clin. Invest.* 102:1942-1950.

Pastore, A., G. Federici, E. Bertini, and F. Piemonte. 2003. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta.* 333:19-39.

Paul, W. E. 1987. Interleukin 4/B cell stimulatory factor 1: one lymphokine, many functions. *The FASEB Journal.* 6:456-461

Picard, F., M. Kurtev, N. Chung, A. Topark-Ngarm, T. Senawong, R. Machado De Oliveira, M. Leid, M. W. McBurney, and L. Guarente. 2004. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature.* 429:771-776.

Pockros, P. J., L. Jeffers, N. Afdhal, Z. D. Goodman, D. Nelson, R. G. Gish, K. R. Reddy, R. Reindollar, M. Rodriguez-Torres, S. Sullivan, L. M. Blatt, S. and Faris-Young. 2007. Final results of a double-blind, placebo-controlled trial of the antifibrotic efficacy of interferon-gamma1b in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis or cirrhosis. *Hepatology.* 45:569-578.

Poli, G., and R. J. Schaur. 2000. 4-Hydroxynonenal in the pathomechanisms of oxidative stress. *IUBMB Life.* 50:315-321.

Poulsen, M. M., P. F. Vestergaard, B. F. Clasen, Y. Radko, L. P. Christensen, H.

- Stødkilde-Jørgensen, N. Møller, N. Jessen, S. B. Pedersen, and J. O. Jørgensen. 2013. High-dose resveratrol supplementation in obese men: an investigator-initiated, randomized, placebo-controlled clinical trial of substrate metabolism, insulin sensitivity, and body composition. *Diabetes*. 62:1186-1195.
- Qiao, Y., J. Sun, S. Xia, X. Tang, Y. Shi, and G. Le. 2014. Effects of resveratrol on gut microbiota and fat storage in a mouse model with high-fat-induced obesity. *Food Funct*. 5:1241-9.
- Rider, P., Y. Carmi, O. Guttman, A. Braiman, I. Cohen, E. Voronov, M. R. White, C. A. Dinarello, and R. N. Apte. 2011. IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. *J. Immunol*. 187:4835-4843.
- Rodgers, J. T., C. Lerin, W. Haas, S. P. Gygi, B. M. Spiegelman, and P. Puigserver. 2005. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 $\alpha$  and SIRT1. *Nature*. 434:113-118.
- Romao, S. 2015. Therapeutic value of oral supplementation with melon superoxide dismutase and wheat gliadin combination. *Nutrition*. 31:430-436.
- Saito, T., K. Misawa, and S. Kawata. 2007. Fatty Liver and Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Internal Medicine*. 46:101-104
- Schürmann, A. 2008. Insight into the "odd" hexose transporters GLUT3, GLUT5, and GLUT7. *Am. J. Physiol. Endocrinol Metab*. 295:E225-226.
- Silva, J. P., and C. Wahlestedt. 2010. Role of Sirtuin 1 in metabolic regulation. *Drug. Discov. Today*. 15:781-791.
- Slatter, D. A., C. H. Bolton, and A. J. Bailey. 2000. The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus. *Diabetologia*. 43:550-557.
- Spiegelman, B. M., and G. S. Hotamisligil. 1993. Through thick and thin: wasting, obesity, and TNF alpha. *Cell*. 73:625-627.
- Stocker, J. W., D. G. Osmond, and G. J. V. Nossal. 1974. Differentiation of lymphocytes in the mouse bone marrow. *Immunology*. 27:795-806.
- Stocker, R., and J. F. Jr. Keaney. 2004. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol.*

Rev. 84:1381-1478.

Suzuki, K., and T. Kono. 1980. Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 77:2542-2545.

Swellam, M., M. S. Mahmoud, and A. Abdel-Fatah Ali. 2009. Clinical implications of adiponectin and inflammatory biomarkers in type 2 diabetes mellitus. *Dis. Markers.* 27:269-278.

Thieu, V. T., E. T. Nguyen, B. P. McCarthy, H. A. Bruns, R. Kapur, C. H. Chang, and M. H. Kaplan. 2007. IL-4-stimulated NF-kappaB activity is required for Stat6 DNA binding. *J. Leukoc. Biol.* 82:370-379.

Thornberry, N. A., and Y. Lazebnik. 1998. Caspases: enemies within. *Science.* 281:1312-1316.

Tissenbaum, H. A., and L. Guarente. 2001. Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 410:227-230.

Turer, A. T., and P. E. Scherer. 2012. Adiponectin: mechanistic insights and clinical implications. *Diabetologia.* 55:2319-2326.

Uchida, K., L. I. Szweda, H. Z. Chae, and E. R. Stadtman. 1993. Immunochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in oxidized hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 90:8742-8746.

Uesugi, T., M. Froh, G. E. Arteel, B. U. Bradford, M. D. Wheeler, E. Gäbele, F. Isayama, and R. G. Thurman. 2002. Role of lipopolysaccharide-binding protein in early alcohol-induced liver injury in mice. *J. Immunol.* 168:2963-2969.

Uysal, K. T., S. M. Wiesbrock, M. W. Marino, and G. S. Hotamisligil. 1997. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature.* 389:610-614.

Vazquez, M. I., J. Catalan-Dibene, and A. Zlotnik. 2015. B cells responses and cytokine production are regulated by their immune microenvironment. *Cytokine.* pii: S1043-4666(15)00066-6.

Vázquez-Vela, M. E., N. Torres, and A. R. Tovar. 2008. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch. Med. Res.* 39:715-728.

Villanueva, E. C., and M. G. Jr. Myers. 2008. Leptin receptor signaling and the regulation of

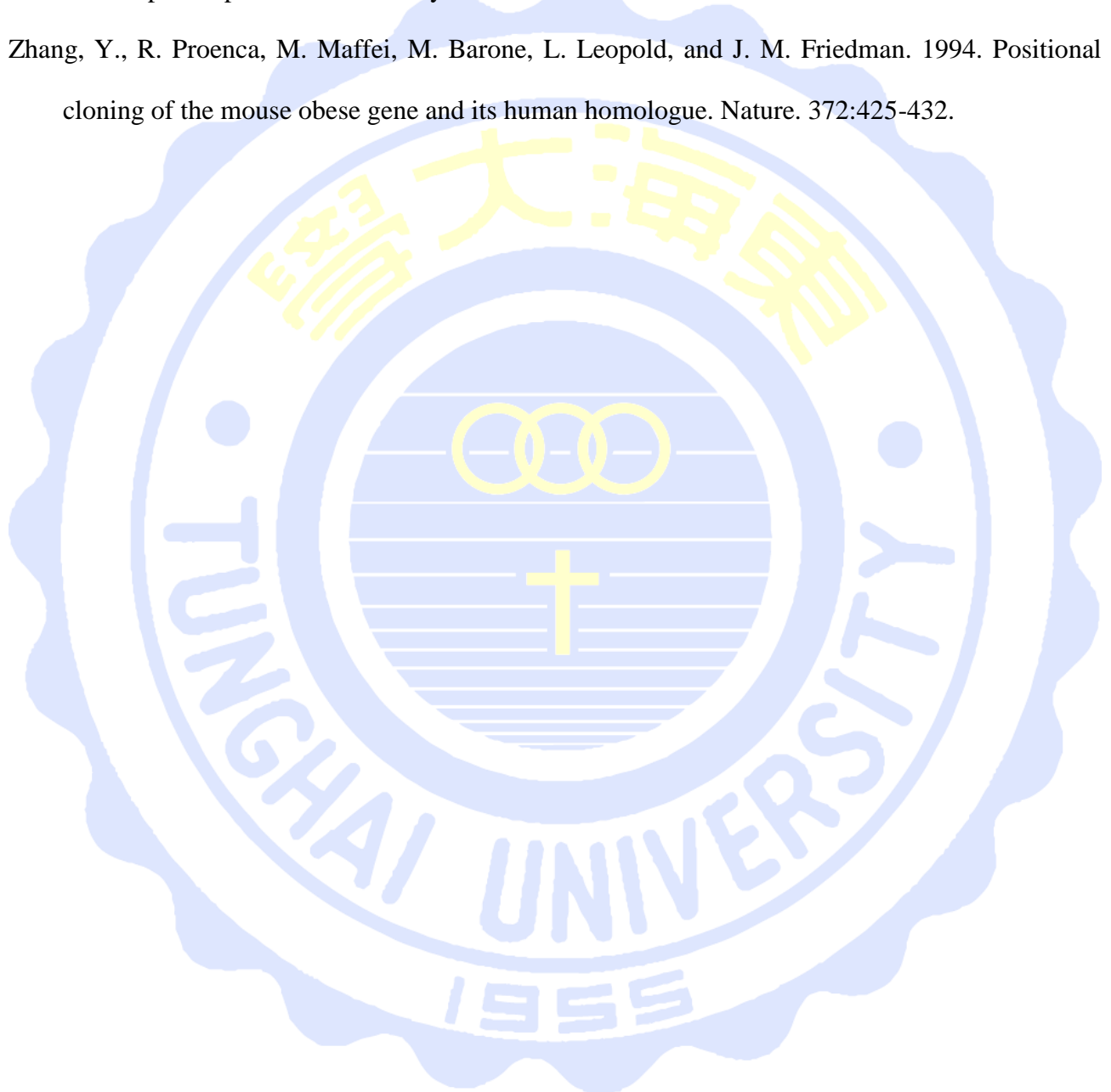
mammalian physiology. *Int. J. Obes. (Lond)*. 32 Suppl 7:S8-12.

- Vosshenrich, C. A., A. Cumano, W. Müller, J. P. Di Santo, and P. Vieira. 2004. Pre-B cell receptor expression is necessary for thymic stromal lymphopoietin responsiveness in the bone marrow but not in the liver environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101:11070-11075.
- Vouldoukis, I., D. Lacan, C. Kamate, P. Coste, A. Calenda, D. Mazier, M. Conti, and B. Dugas. 2004. Antioxidant and anti-inflammatory properties of a Cucumis melo LC. extract rich in superoxide dismutase activity. *J. Ethnopharmacol.* 94:67-75.
- Wang, G. L., Y. C. Fu, W. C. Xu, Y. Q. Feng, S. R. Fang, X. H. Zhou. 2009. Resveratrol inhibits the expression of SREBP1 in cell model of steatosis via Sirt1-FOXO1 signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380:644-649.
- Watanabe, N., Y. H. Wang, H. K. Lee, T. Ito, Y. H. Wang, W. Cao, and Y. J. Liu. 2005. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in human thymus. *Nature*. 436:1181-1185.
- Wolf, A. M., D. Wolf, H. Rumpold, B. Enrich, and H. Tilg. 2004. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323:630-635.
- Wong, M., D. Ziring, Y. Korin, S. Desai, S. Kim, J. Lin, D. Gjertson, J. Braun, E. Reed, and R. R. Singh. 2008. TNF $\alpha$  blockade in human diseases: mechanisms and future directions. *Clin. Immunol.* 126:121-136.
- Wu, X., L. Qin, V. Fako, and J. T. Zhang. 2014. Molecular mechanisms of fatty acid synthase (FASN)-mediated resistance to anti-cancer treatments. *Adv. Biol. Regul.* 54:214-221.
- Yang, S. J., and Y. Lim. 2014. Resveratrol ameliorates hepatic metaflammation and inhibits NLRP3 inflammasome activation. *Metabolism*. 63:693-701.
- Yoshizaki, K., T. Matsuda, N. Nishimoto, T. Kuritani, L. Taeho, K. Aozasa, T. Nakahata, H. Kawai, H. Tagoh, and T. Komori. 1989. Pathogenic significance of interleukin-6 (IL-6/BSF-2) in Castleman's disease. *Blood*. 74:1360-1367.
- Yoshizaki, T., J. C. Milne, T. Imamura, S. Schenk, N. Sonoda, J. L. Babendure, J. C. Lu, J. J. Smith,

M. R. Jirousek, and J. M. Olefsky. 2009. SIRT1 exerts anti-inflammatory effects and improves insulin sensitivity in adipocytes. *Mol. Cell Biol.* 29:1363-1374.

Zarkesh-Esfahani, H., G. Pockley, R. A. Metcalfe, M. Bidlingmaier, Z. Wu, A. Ajami, A. P. Weetman, C. J. Strasburger, and R. J. Ross. 2001. High-dose leptin activates human leukocytes via receptor expression on monocytes. *J. Immunol.* 167:4593-4599.

Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold, and J. M. Friedman. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 372:425-432.



表一、葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠之體增重、肝臟重、脾臟重及腎臟重之影響

Table 1. Effects of grape skin extract (GSE) on the weight gain, liver, spleen and kidney weight in high fat diet and high fructose syrup induced murine HMMS

Groups	Weight gain, g	Liver weight, g	Spleen weight, mg	Kidney weight, g
Naïve	1.97 ± 0.39 <sup>a</sup>	1.01 ± 0.03 <sup>a</sup>	39.12 ± 2.58 <sup>a</sup>	0.27 ± 0.01 <sup>a</sup>
Control	13.08 ± 0.79 <sup>d</sup>	1.28 ± 0.06 <sup>c</sup>	67.87 ± 3.74 <sup>c</sup>	0.33 ± 0.01 <sup>c</sup>
GSEL	11.45 ± 2.34 <sup>cd</sup>	1.11 ± 0.08 <sup>b</sup>	63.00 ± 7.71 <sup>bc</sup>	0.29 ± 0.02 <sup>b</sup>
GSEM	9.72 ± 0.98 <sup>c</sup>	1.06 ± 0.06 <sup>ab</sup>	62.13 ± 3.83 <sup>b</sup>	0.30 ± 0.01 <sup>b</sup>
GSEH	7.40 ± 2.11 <sup>b</sup>	1.05 ± 0.12 <sup>ab</sup>	59.03 ± 3.16 <sup>b</sup>	0.29 ± 0.02 <sup>b</sup>

在十週的試驗後，經 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導肝代謝綜合症造型之實驗小鼠，對照組體增重、肝臟重、脾臟重及腎臟重皆顯著高於正常組 ( $P < 0.05$ )；與實驗組相比，給予葡萄皮萃取物 360 及 600 mg/kg/day 之實驗組在體增重有顯著降低 ( $P < 0.05$ )。在肝臟、脾臟及腎臟重方面，給予葡萄皮萃取物 360 及 600 mg/kg/day 之實驗組與對照相比皆顯著降低 ( $P < 0.05$ )。數據以平均值±標準差表示，並以單因子變異數分析後，再使用 Duncan's multiple-range test 進行事後檢定。Naïve：正常組，未經任何處理之組別；Control：對照組，以 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導肝代謝綜合症造型之組別；GSEL：葡萄皮萃取物低劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 120 mg/kg/day；GSEM：葡萄皮萃取物中劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 360 mg/kg/day；GSEH：葡萄皮萃取物高劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 600 mg/kg/day。a-c 上標相異字母表示不同字母間有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

In the 10 weeks administration of grape skin extract (120, 360, 600 mg/kg), control group was significantly higher than naïve group in weight gain, liver, spleen and kidney weight ( $P < 0.05$ ). Grape skin extract treatment group were significantly lower than control group in weight gain, liver, spleen and kidney weight ( $P < 0.05$ ). Data present as mean ±SD (n=6) and was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. Naïve: untreated group; Control: high-fat and high-fructose corn syrup induced murine HMMS and administrated distilled water; GSEL 120 mg/kg: high-fat and high-fructose corn syrup induced murine HMMS and administrated 120 mg/kg grape skin extract; GSEL 360 mg/kg: high-fat and high-fructose corn syrup induced murine HMMS and administrated 360 mg/kg grape skin extract; GSEL 600 mg/kg: high-fat and high-fructose corn syrup induced murine HMMS and administrated 600 mg/kg grape skin extract. <sup>a-c</sup>: Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).



表二、葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠之腹部脂肪重、腎周脂肪重及附睪脂肪重之影響

Table 2. Effects of grape skin extract (GSE) on the abdominal fat, perirenal fat and epididymal fat weight in high fat diet and high fructose syrup induced murine HMMS

Groups	Abdominal fat, g	Perirenal fat, mg	Epididymal fat, mg
Naïve	0.17 ± 0.02 <sup>a</sup>	19.63 ± 6.47 <sup>a</sup>	25.30 ± 5.08 <sup>a</sup>
Control	1.70 ± 0.12 <sup>d</sup>	785.30 ± 47.80 <sup>d</sup>	279.60 ± 20.41 <sup>c</sup>
GSEL	1.21 ± 0.33 <sup>c</sup>	469.10 ± 129.10 <sup>c</sup>	254.57 ± 104.88 <sup>c</sup>
GSEM	1.05 ± 0.25 <sup>c</sup>	352.62 ± 121.37 <sup>b</sup>	131.97 ± 60.50 <sup>b</sup>
GSEH	0.59 ± 0.15 <sup>b</sup>	249.80 ± 79.87 <sup>b</sup>	100.38 ± 27.24 <sup>b</sup>

在十週的試驗後，經 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導肝代謝綜合症造型之實驗小鼠，對照組腹部脂肪重、腎周脂肪重及附睪脂肪重皆顯著高於正常組 ( $P < 0.05$ )；與實驗組相比，給予葡萄皮萃取物 600 mg/kg/day 之實驗組在腹部脂肪重、腎周脂肪重及附睪脂肪重與對照組相比皆有顯著降低 ( $P < 0.05$ )。數據以平均值±標準差表示，並以單因子變異數分析後，再使用 Duncan's multiple-range test 進行事後檢定。Naïve：正常組，未經任何處理之組別；Control：對照組，以 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導肝代謝綜合症造型之組別；GSEL：葡萄皮萃取物低劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 120 mg/kg/day；GSEM：葡萄皮萃取物中劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 360 mg/kg/day；GSEH：葡萄皮萃取物高劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 600 mg/kg/day。<sup>a-d</sup> 上標相異字母表示不同字母間有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

In the 10 weeks administration of grape skin extract (120, 360, 600 mg/kg), control group was significantly higher than naïve group in abdominal fat, perirenal fat and epididymal fat weight ( $P < 0.05$ ). Grape skin extract treatment group (360, 600 mg/kg) were significantly lower than control group in abdominal fat, perirenal fat and epididymal fat weight ( $P < 0.05$ ). Data present as mean ± SD (n=6) and was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. Group description was shown as Table 1. <sup>a-d</sup>: Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

表三、葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠之肝臟促發炎細胞激素 IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 TNF- $\alpha$  之影響

Table 3. Effects of grape skin extract (GSE) on the hepatic pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in high fat diet and high fructose syrup induced murine HMMS

Groups	IL-1 $\beta$ , ng/g	IL-6, ng/g	TNF- $\alpha$ , ng/g
Naïve	113.96 $\pm$ 51.65 <sup>a</sup>	98.30 $\pm$ 38.10 <sup>ab</sup>	55.57 $\pm$ 17.87 <sup>a</sup>
Control	205.36 $\pm$ 42.21 <sup>c</sup>	137.53 $\pm$ 30.31 <sup>c</sup>	82.01 $\pm$ 25.12 <sup>b</sup>
GSEL	189.80 $\pm$ 30.51 <sup>bc</sup>	114.04 $\pm$ 31.90 <sup>bc</sup>	60.92 $\pm$ 6.63 <sup>ab</sup>
GSEM	167.74 $\pm$ 51.10 <sup>bc</sup>	83.23 $\pm$ 23.42 <sup>ab</sup>	56.20 $\pm$ 21.04 <sup>a</sup>
GSEH	144.74 $\pm$ 32.85 <sup>ab</sup>	73.24 $\pm$ 30.52 <sup>a</sup>	50.39 $\pm$ 15.67 <sup>a</sup>

在十週的試驗後，經 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導肝代謝綜合症造型之實驗小鼠，對照組肝臟 IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 TNF- $\alpha$  皆顯著高於正常組 ( $P < 0.05$ )；與實驗組相比，給予葡萄皮萃取物 600 mg/kg/day 之實驗組在肝臟 IL-1 $\beta$  與對照組相比皆有顯著降低 ( $P < 0.05$ )。給予葡萄皮萃取物 360、600 mg/kg/day 之實驗組在肝臟 IL-6 及 TNF- $\alpha$  與對照組相比皆有顯著降低 ( $P < 0.05$ )。數據以平均值 $\pm$ 標準差表示，並以單因子變異數分析後，再使用 Duncan's multiple-range test 進行事後檢定。Naïve：正常組，未經任何處理之組別；Control：對照組，以 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導肝代謝綜合症造型之組別；GSEL：葡萄皮萃取物低劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 120 mg/kg/day；GSEM：葡萄皮萃取物中劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 360 mg/kg/day；GSEH：葡萄皮萃取物高劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 600 mg/kg/day。<sup>a-c</sup> 上標相異字母表示不同字母間有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

In the 10 weeks administration of grape skin extract (120, 360, 600 mg/kg), control group was significantly higher than naïve group in hepatic IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  ( $P < 0.05$ ). Grape skin extract treatment group (600 mg/kg) were significantly lower than control group in hepatic IL-1 $\beta$  ( $P < 0.05$ ). Grape skin extract treatment group (360, 600 mg/kg) were significantly lower than control group in hepatic IL-6 and TNF- $\alpha$  ( $P < 0.05$ ). Data present as mean  $\pm$  SD (n=6) and was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. Group description was shown as Table 1. <sup>a-c</sup>: Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

表四、葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠之肝臟抗發炎細胞激素 IL-4、IL-10 及 IL-13 之影響

Table 4. Effects of grape skin extract (GSE) on the hepatic anti-inflammatory IL-4, IL-10 and IL-13 in high fat diet and high fructose syrup induced murine HMMS

Groups	IL-4, ng/g	IL-10, ng/g	IL-13, ng/g
Naïve	20.01 ± 1.25 <sup>a</sup>	167.51 ± 103.15 <sup>a</sup>	48.37 ± 34.60 <sup>a</sup>
Control	25.21 ± 2.81 <sup>b</sup>	352.94 ± 73.53 <sup>b</sup>	88.29 ± 17.86 <sup>b</sup>
GSEL	21.16 ± 0.76 <sup>a</sup>	226.86 ± 34.12 <sup>a</sup>	63.47 ± 20.51 <sup>ab</sup>
GSEM	19.00 ± 2.75 <sup>a</sup>	158.46 ± 52.80 <sup>a</sup>	52.79 ± 13.12 <sup>a</sup>
GSEH	18.28 ± 3.81 <sup>a</sup>	203.92 ± 107.57 <sup>a</sup>	68.07 ± 36.07 <sup>ab</sup>

在十週的試驗後，經 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導肝代謝綜合症造型之實驗小鼠，對照組在肝臟 IL-4、IL-10 及 IL-13 皆顯著高於正常組 ( $P < 0.05$ )；與實驗組相比，給予葡萄皮萃取物 120、360 及 600 mg/kg/day 之實驗組在肝臟 IL-4 及 IL-10 皆有顯著降低 ( $P < 0.05$ )。數據以平均值±標準差表示，並以單因子變異數分析後，再使用 Duncan's multiple-range test 進行事後檢定。Naïve：正常組，未經任何處理之組別；Control：對照組，以 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導肝代謝綜合症造型之組別；GSEL：葡萄皮萃取物低劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 120 mg/kg/day；GSEM：葡萄皮萃取物中劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 360 mg/kg/day；GSEH：葡萄皮萃取物高劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 600 mg/kg/day。<sup>a-b</sup> 上標相異字母表示不同字母間有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

In the 10 weeks administration of grape skin extract (120, 360, 600 mg/kg), control group was significantly higher than naïve group in hepatic IL-4, IL-10 and IL-13 ( $P < 0.05$ ). Grape skin extract treatment group were significantly lower than control group in hepatic IL-4 and IL-10 ( $P < 0.05$ ). Grape skin extract treatment group (360 mg/kg) were significantly lower than control group in hepatic IL-13 ( $P < 0.05$ ). Data present as mean ± SD (n=6) and was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. Group description was shown as Table 1.  
<sup>a-b</sup>: Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

表五、葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠之肝臟其他細胞激素 MCP-1、TSLP 及 TGF-β1 之影響

Table 5. Effects of grape skin extract (GSE) on the hepatic others cytokine MCP-1, TSLP, and TGF-β1 in high fat diet and high fructose syrup induced murine HMMS

Groups	MCP-1, ng/g	TSLP, ng/g	TGF-β1, ng/g
Naïve	43.57 ± 7.38 <sup>a</sup>	65.55 ± 37.61 <sup>a</sup>	52.44 ± 18.68
Control	70.51 ± 25.94 <sup>b</sup>	124.46 ± 50.73 <sup>b</sup>	68.84 ± 27.23
GSEL	64.42 ± 20.07 <sup>ab</sup>	85.06 ± 21.13 <sup>ab</sup>	62.37 ± 7.03
GSEM	51.66 ± 22.22 <sup>ab</sup>	73.88 ± 46.35 <sup>a</sup>	50.63 ± 32.10
GSEH	43.63 ± 11.24 <sup>a</sup>	71.95 ± 35.98 <sup>a</sup>	47.86 ± 6.73

在十週的試驗後，經 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導肝代謝綜合症造型之實驗小鼠，對照組肝臟 MCP-1 及 TSLP 皆顯著高於正常組 ( $P < 0.05$ )。對照組肝臟 TGF-β1 與正常組相比則無顯著差異；與實驗組相比，給予葡萄皮萃取物 600 mg/kg/day 之實驗組在肝臟 MCP-1 與對照組相比有顯著降低 ( $P < 0.05$ )。給予葡萄皮萃取物 360 及 600 mg/kg/day 之實驗組在肝臟 TSLP 與對照組相比皆有顯著降低 ( $P < 0.05$ )。數據以平均值±標準差表示，並以單因子變異數分析後，再使用 Duncan's multiple-range test 進行事後檢定。Naïve：正常組，未經任何處理之組別；Control：對照組，以 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導肝代謝綜合症造型之組別；GSEL：葡萄皮萃取物低劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 120 mg/kg/day；GSEM：葡萄皮萃取物中劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 360 mg/kg/day；GSEH：葡萄皮萃取物高劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 600 mg/kg/day。<sup>a-b</sup> 上標相異字母表示不同字母間有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

In the 10 weeks administration of grape skin extract (120, 360, 600 mg/kg), control group was significantly higher than naïve group in hepatic MCP-1 and TSLP ( $P < 0.05$ ). Grape skin extract treatment group (600 mg/kg) were significantly lower than control group in hepatic MCP-1 ( $P < 0.05$ ). Grape skin extract treatment group (360, 600 mg/kg) were significantly lower than control group in hepatic TSLP ( $P < 0.05$ ). Data present as mean ± SD (n=6) and was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. Group description was shown as Table 1.

<sup>a-b</sup>: Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

表六、葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠之肝臟脂聯素及瘦素之影響

Table 6. Effects of grape skin extract (GSE) on the hepatic adiponectine and leptin in high fat diet and high fructose syrup induced murine HMMS

Groups	Adiponectine, ng/g	Leptin, ng/g
Naïve	151.36 ± 20.04 <sup>b</sup>	44.05 ± 9.41 <sup>a</sup>
Control	111.54 ± 13.27 <sup>a</sup>	66.90 ± 14.42 <sup>b</sup>
GSEL	138.48 ± 25.03 <sup>ab</sup>	57.61 ± 14.38 <sup>b</sup>
GSEM	136.92 ± 28.49 <sup>ab</sup>	39.85 ± 5.81 <sup>a</sup>
GSEH	140.16 ± 34.40 <sup>ab</sup>	34.25 ± 3.44 <sup>a</sup>

在十週的試驗後，經 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導肝代謝綜合症造型之實驗小鼠，對照組肝臟脂聯素顯著低於正常組 ( $P < 0.05$ )；與實驗組相比沒有顯著差異，但有隨著給予葡萄皮萃取物劑量愈高而升高之趨勢。另外，對照組肝臟瘦素顯著高於正常組 ( $P < 0.05$ )；與實驗組相比，給予葡萄皮萃取物 360 及 600 mg/kg/day 之實驗組皆顯著降低 ( $P < 0.05$ )。數據以平均值±標準差表示，並以單因子變異數分析後，再使用 Duncan's multiple-range test 進行事後檢定。Naïve：正常組，未經任何處理之組別；Control：對照組，以 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導肝代謝綜合症造型之組別；GSEL：葡萄皮萃取物低劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 120 mg/kg/day；GSEM：葡萄皮萃取物中劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 360 mg/kg/day；GSEH：葡萄皮萃取物高劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 600 mg/kg/day。<sup>a-b</sup> 上標相異字母表示不同字母間有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

In the 10 weeks administration of grape skin extract (120, 360, 600 mg/kg), control group was significantly lower than naïve group in hepatic adiponectine ( $P < 0.05$ ). control group was significantly higher than naïve group in hepatic leptin ( $P < 0.05$ ). Grape skin extract treatment group (360, 600 mg/kg) were significantly lower than control group in hepatic leptin ( $P < 0.05$ ). Data present as mean ±SD (n=6) and was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. Group description was shown as Table 1. <sup>a-b</sup>: Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

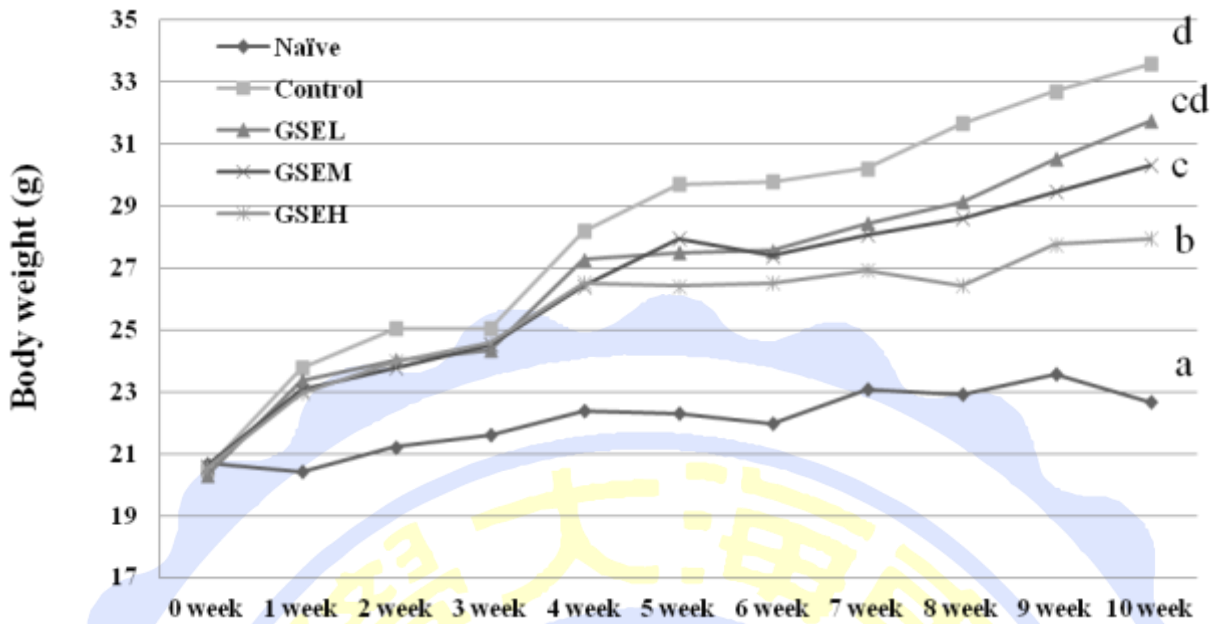
表七、葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠之腸道菌叢之影響

Table7. Effects of grape skin extract (GSE) on intestinal flora in high fat diet and high fructose syrup induced murine HMMS

Groups	<i>Lactobacillus</i> , Log CFU/g	<i>Bifidobacterium</i> , Log CFU/g	Coliform, Log CFU/g
Naïve	6.29 ± 0.03	5.17 ± 0.13 <sup>b</sup>	3.49 ± 0.13 <sup>a</sup>
Control	5.99 ± 0.16	3.52 ± 0.29 <sup>a</sup>	4.20 ± 0.09 <sup>c</sup>
GSEL	6.10 ± 0.14	5.53 ± 0.12 <sup>b</sup>	3.92 ± 0.09 <sup>b</sup>
GSEM	6.14 ± 0.12	6.24 ± 0.05 <sup>c</sup>	3.65 ± 0.07 <sup>a</sup>
GSEH	6.15 ± 0.07	6.44 ± 0.05 <sup>c</sup>	3.59 ± 0.12 <sup>a</sup>

在十週的試驗後，經 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導肝代謝綜合症造型之實驗小鼠，在 *Lactobacillus* 培養結果，各組別之間皆無顯著差異；在 *Bifidobacterium* 培養結果，對照組顯著低於正常組 ( $P < 0.05$ )，與實驗組相比，給予葡萄皮萃取物之實驗組皆顯著增加 ( $P < 0.05$ )；在 Coliform 培養結果，對照組顯著高於正常組 ( $P < 0.05$ )，與實驗組相比，給予葡萄皮萃取物之實驗組皆顯著降低 ( $P < 0.05$ )。數據以平均值±標準差表示，並以單因子變異數分析後，再使用 Duncan's multiple-range test 進行事後檢定。Naïve：正常組，未經任何處理之組別；Control：對照組，以 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導肝代謝綜合症造型之組別；GSEL：葡萄皮萃取物低劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 120 mg/kg/day；GSEM：葡萄皮萃取物中劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 360 mg/kg/day；GSEH：葡萄皮萃取物高劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 600 mg/kg/day。<sup>a-b</sup> 上標相異字母表示不同字母間有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

In the 10 weeks administration of grape skin extract (120, 360, 600 mg/kg), control group was significantly lower than naïve group in *Bifidobacterium* ( $P < 0.05$ ). Grape skin extract treatment group were significantly higher than control group in *Bifidobacterium* ( $P < 0.05$ ). Control group was significantly higher than naïve group in Coliform ( $P < 0.05$ ). Grape skin extract treatment group were significantly lower than control group in Coliform ( $P < 0.05$ ). Data present as mean ± SD (n=6) and was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. Group description was shown as Table 1. <sup>a-b</sup>: Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

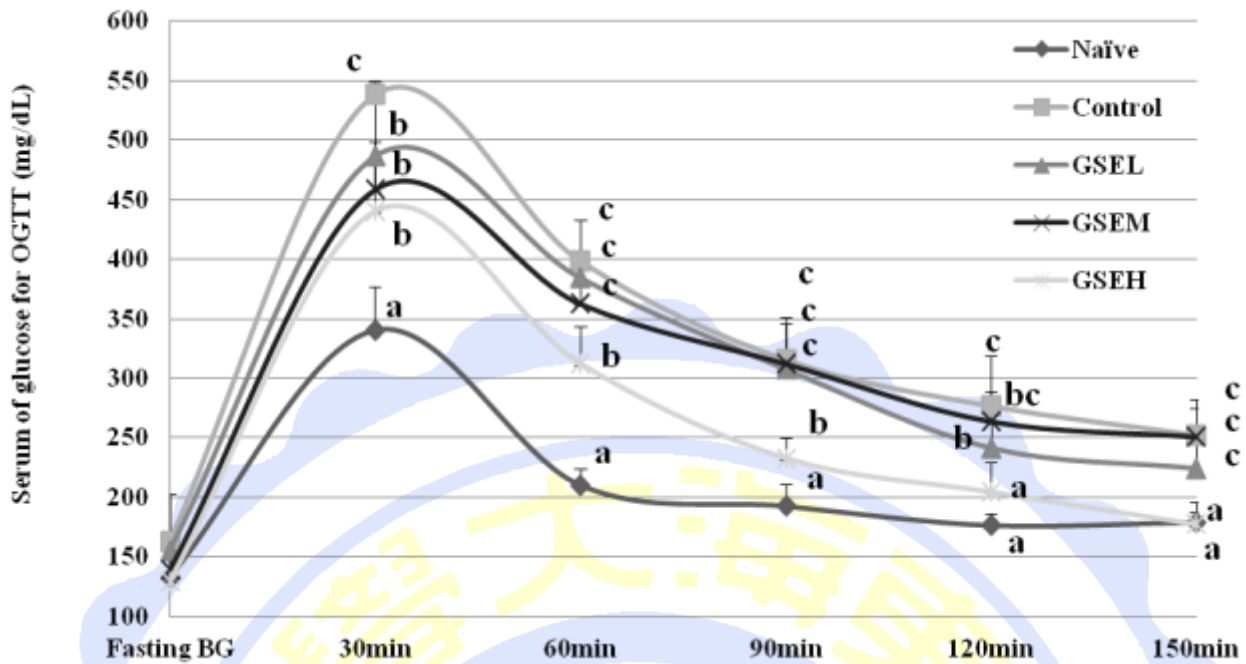


圖一、高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠每週體重記錄。

Figure 1. Effects of grape skin extract (GSE) on body weight in high fat diet and high fructose syrup induced murine HMMS.

在十週的試驗後，經 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導肝代謝綜合症造型之實驗小鼠，對照組顯著高於正常組 ( $P < 0.05$ )；與實驗組相比，在給予葡萄皮萃取物 600 mg/kg/day 之實驗組與對照組相比有顯著降低 ( $P < 0.05$ )。數據以平均值 $\pm$ 標準差表示，並以單因子變異數分析後，再使用 Duncan's multiple-range test 進行事後檢定。Naïve：正常組，未經任何處理之組別；Control：對照組，以 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導肝代謝綜合症造型之組別；GSEL：葡萄皮萃取物低劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 120 mg/kg/day；GSEM：葡萄皮萃取物中劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 360 mg/kg/day；GSEH：葡萄皮萃取物高劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 600 mg/kg/day。<sup>a-d</sup> 上標相異字母表示不同字母間有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

In the 10 weeks administration of grape skin extract (120, 360, 600 mg/kg), control group was significantly higher than naïve group in body weight ( $P < 0.05$ ). Grape skin extract treatment group (360, 600 mg/kg) were significantly lower than control group in body weight ( $P < 0.05$ ). Data present as mean  $\pm$ SD (n=6) and was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. Group description was shown as Table 1. <sup>a-d</sup>: Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).



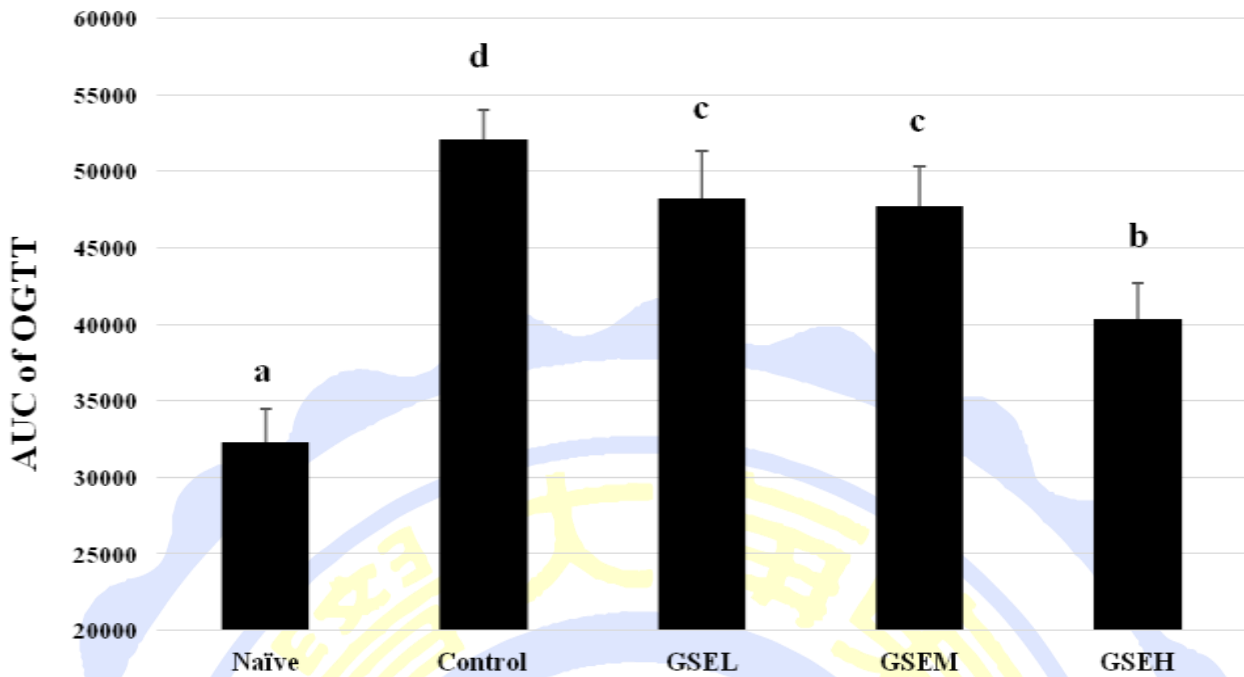
圖二、葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠中口服葡萄糖耐受性試驗之影響。

Figure 2. Effects of grape skin extract (GSE) on the blood glucose during an oral glucose tolerance test (OGTT) graph in high fat diet and high fructose syrup induced murine HMMS.

在十週的試驗後，經 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導肝代謝綜合症造型之實驗小鼠，在口服葡萄糖耐受性試驗各時間點上的血糖值，對照組皆顯著高於正常組 ( $P < 0.05$ )；與實驗組相比，在給予葡萄皮萃取物 600 mg/kg/day 之實驗組與對照組相比皆有顯著降低 ( $P < 0.05$ )。數據以平均值±標準差表示，並以單因子變異數分析後，再使用 Duncan's multiple-range test 進行事後檢定。Fasting BG：口服葡萄糖前之空腹血糖值；Naive：正常組，未經任何處理之組別；Control：對照組，以 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導肝代謝綜合症造型之組別；GSEL：葡萄皮萃取物低劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 120 mg/kg/day；GSEM：葡萄皮萃取物中劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 360 mg/kg/day；GSEH：葡萄皮萃取物高劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 600 mg/kg/day。<sup>a-c</sup> 上標相異字母表示不同字母間有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

In the 10 weeks administration of grape skin extract (120, 360, 600 mg/kg), control group was significantly higher than naïve group in OGTT graph ( $P < 0.05$ ). Grape skin extract treatment group (600 mg/kg) were significantly lower than control group in OGTT graph ( $P < 0.05$ ). Data present as mean ±SD (n=6) and was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. Group description was shown as Table 1. <sup>a-c</sup>: Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).



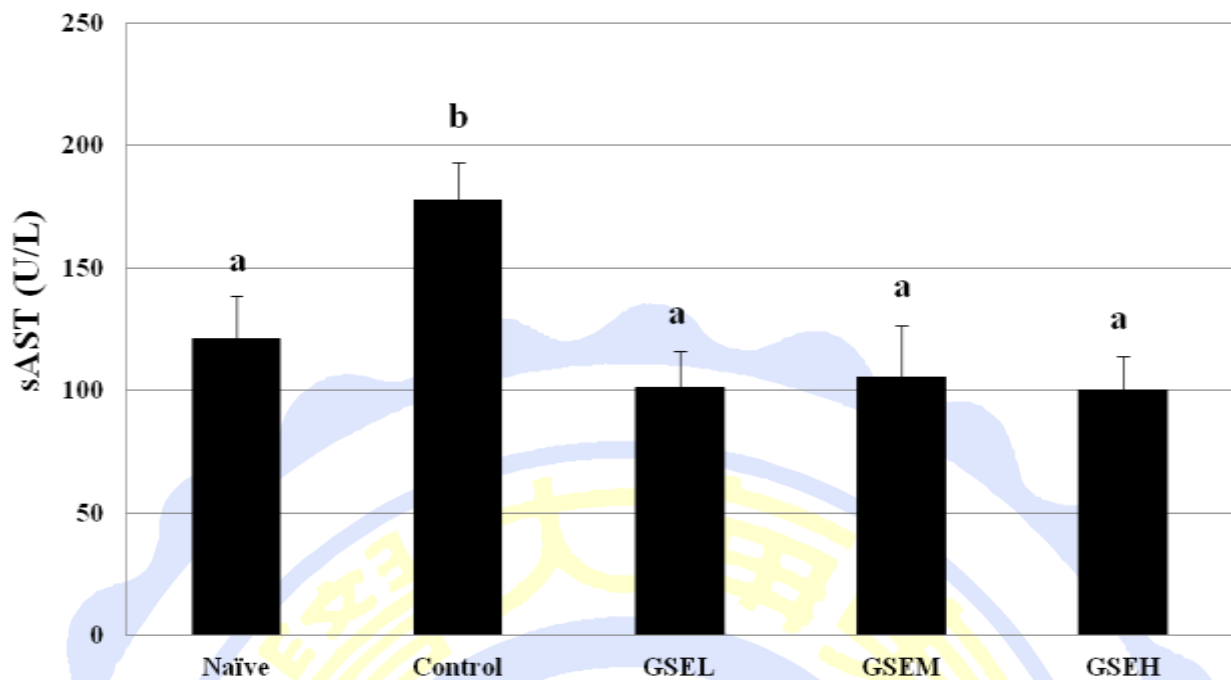


圖三、葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠中口服葡萄糖耐受性試驗血糖值曲線下面積之影響。

Figure 3. Effects of grape skin extract (GSE) on the area under curve (AUC) of oral glucose tolerance test (OGTT) graph in high fat diet and high fructose syrup induced murine HMMS.

在十週的試驗後，經 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導肝代謝綜合症造型之實驗小鼠，在口服葡萄糖耐受性試驗的血糖值曲線下面積，對照組顯著高於正常組 ( $P < 0.05$ )；與實驗組相比，在給予葡萄皮萃取物 600 mg/kg/day 之實驗組與對照組相比有顯著降低 ( $P < 0.05$ )。數據以平均值±標準差表示，並以單因子變異數分析後，再使用 Duncan's multiple-range test 進行事後檢定。Naïve：正常組，未經任何處理之組別；Control：對照組，以 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導肝代謝綜合症造型之組別；GSEL：葡萄皮萃取物低劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 120 mg/kg/day；GSEM：葡萄皮萃取物中劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 360 mg/kg/day；GSEH：葡萄皮萃取物高劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 600 mg/kg/day。<sup>a-d</sup> 上標相異字母表示不同字母間有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

In the 10 weeks administration of grape skin extract (120, 360, 600 mg/kg), control group was significantly higher than naïve group in AUC ( $P < 0.05$ ). Grape skin extract treatment group were significantly lower than control group in AUC ( $P < 0.05$ ). Data present as mean  $\pm$  SD ( $n=6$ ) and was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. Group description was shown as Table 1. <sup>a-d</sup>: Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

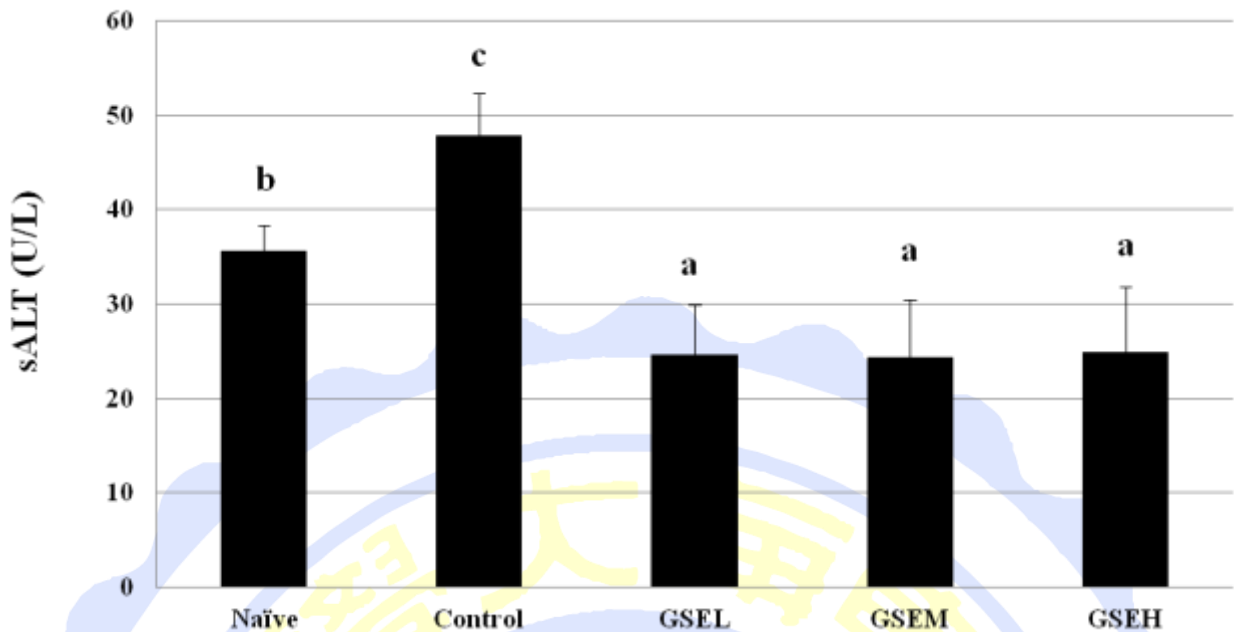


圖四、葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠中血清天門冬胺酸轉胺酶之影響。

Figure 4. Effects of grape skin extract (GSE) on the serum AST (sAST) in high fat diet and high fructose syrup induced murine HMMS.

在十週的試驗後，經 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導肝代謝綜合症造型之實驗小鼠，對照組血清天門冬胺酸轉胺酶顯著高於正常組 ( $P < 0.05$ )；與實驗組相比，在給予葡萄皮萃取物 120、360、600 mg/kg/day 之實驗組與對照組相比皆有顯著降低 ( $P < 0.05$ )。數據以平均值±標準差表示，並以單因子變異數分析後，再使用 Duncan's multiple-range test 進行事後檢定。Naïve：正常組，未經任何處理之組別；Control：對照組，以 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導肝代謝綜合症造型之組別；GSEL：葡萄皮萃取物低劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 120 mg/kg/day；GSEM：葡萄皮萃取物中劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 360 mg/kg/day；GSEH：葡萄皮萃取物高劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 600 mg/kg/day。<sup>a-b</sup> 上標相異字母表示不同字母間有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

In the 10 weeks administration of grape skin extract (120, 360, 600 mg/kg), control group was significantly higher than naïve group in sAST ( $P < 0.05$ ). Grape skin extract treatment group were significantly lower than control group in sAST ( $P < 0.05$ ). Data present as mean  $\pm$  SD ( $n=6$ ) and was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. Group description was shown as Table 1. <sup>a-b</sup>: Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

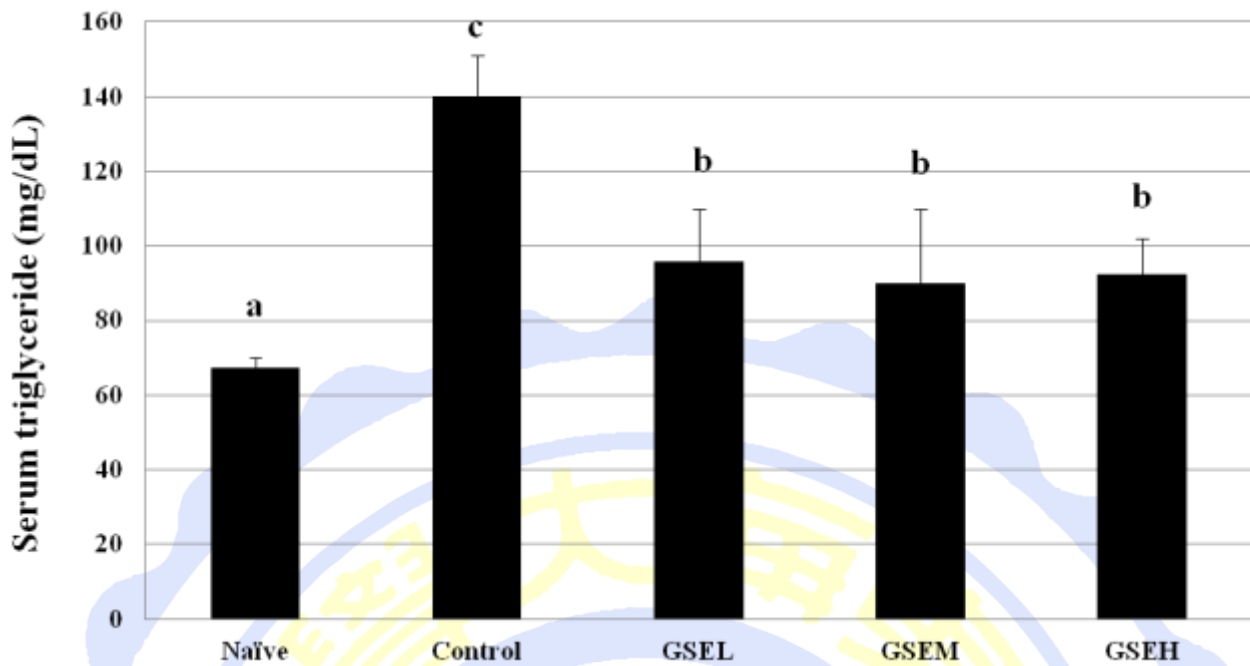


圖五、葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠中血清丙胺酸轉胺酶之影響。

Figure 5. Effects of grape skin extract (GSE) on the serum ALT (sALT) in high fat diet and high fructose syrup induced murine HMMS.

在十週的試驗後，經 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導肝代謝綜合症造型之實驗小鼠，對照組血清丙胺酸轉胺酶顯著高於正常組 ( $P < 0.05$ )；與實驗組相比，在給予葡萄皮萃取物 120、360、600 mg/kg/day 之實驗組與對照組相比皆有顯著降低 ( $P < 0.05$ )。數據以平均值±標準差表示，並以單因子變異數分析後，再使用 Duncan's multiple-range test 進行事後檢定。Naïve：正常組，未經任何處理之組別；Control：對照組，以 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導肝代謝綜合症造型之組別；GSEL：葡萄皮萃取物低劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 120 mg/kg/day；GSEM：葡萄皮萃取物中劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 360 mg/kg/day；GSEH：葡萄皮萃取物高劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 600 mg/kg/day。<sup>a-c</sup> 上標相異字母表示不同字母間有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

In the 10 weeks administration of grape skin extract (120, 360, 600 mg/kg), control group was significantly higher than naïve group in sALT ( $P < 0.05$ ). Grape skin extract treatment group were significantly lower than control group in sALT ( $P < 0.05$ ). Data present as mean  $\pm$ SD (n=6) and was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. Group description was shown as Table 1. <sup>a-c</sup>: Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ )

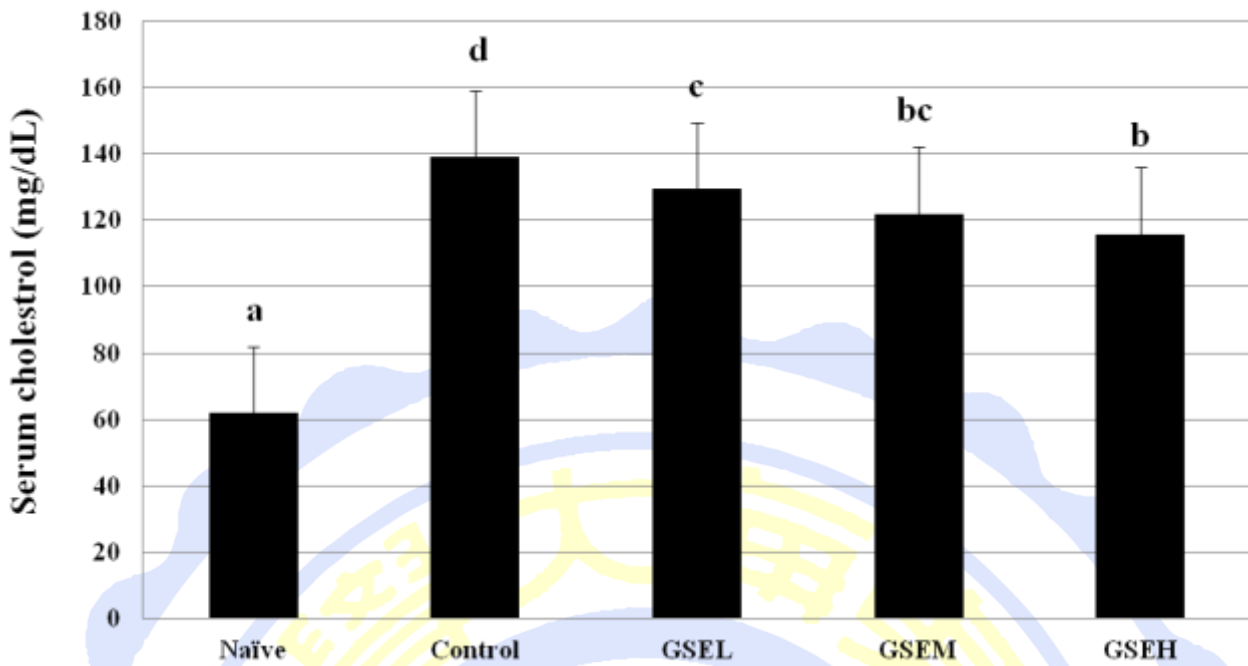


圖六、葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠中血清三酸甘油脂之影響。

Figure 6. Effects of grape skin extract (GSE) on the serum triglyceride (sTG) in high fat diet and high fructose syrup induced murine HMMS.

在十週的試驗後，經 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導肝代謝綜合症造型之實驗小鼠，對照組血清三酸甘油脂顯著高於正常組 ( $P < 0.05$ )；與實驗組相比，在給予葡萄皮萃取物 120、360、600 mg/kg/day 之實驗組與對照組相比皆有顯著降低 ( $P < 0.05$ )。數據以平均值±標準差表示，並以單因子變異數分析後，再使用 Duncan's multiple-range test 進行事後檢定。Naïve：正常組，未經任何處理之組別；Control：對照組，以 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導肝代謝綜合症造型之組別；GSEL：葡萄皮萃取物低劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 120 mg/kg/day；GSEM：葡萄皮萃取物中劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 360 mg/kg/day；GSEH：葡萄皮萃取物高劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 600 mg/kg/day。<sup>a-c</sup> 上標相異字母表示不同字母間有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

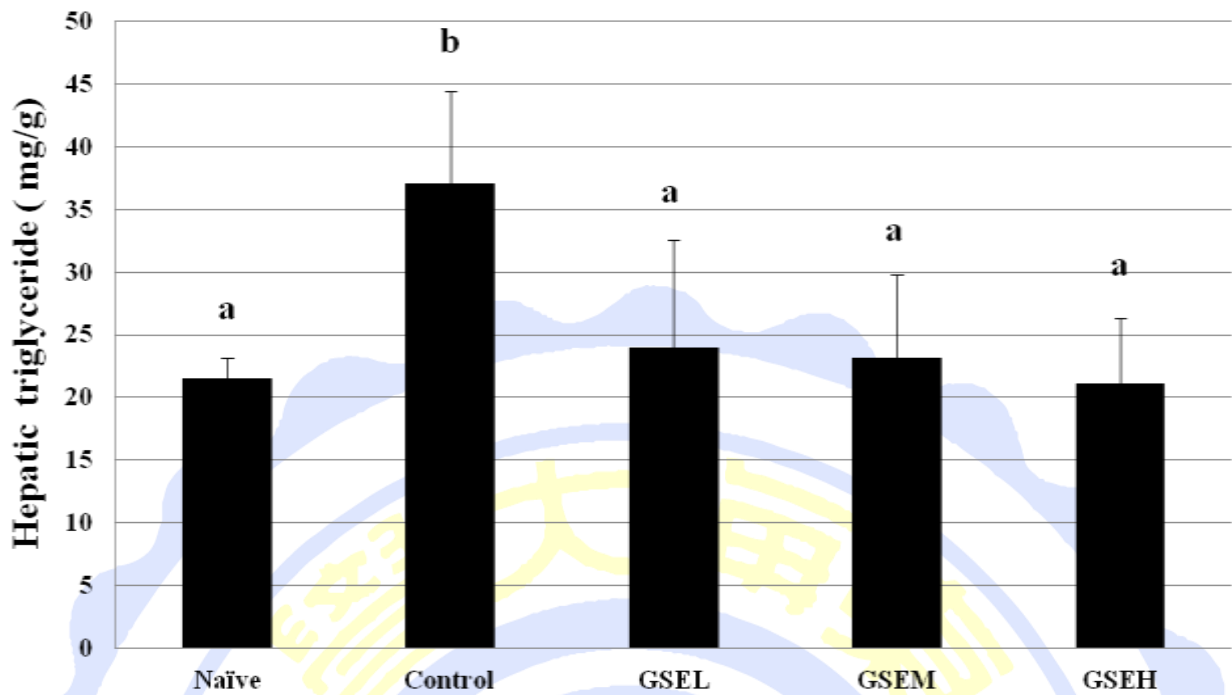
In the 10 weeks administration of grape skin extract (120, 360, 600 mg/kg), control group was significantly higher than naïve group in sTG ( $P < 0.05$ ). Grape skin extract treatment group were significantly lower than control group in sTG ( $P < 0.05$ ). Data present as mean  $\pm$  SD (n=6) and was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. Group description was shown as Table 1. <sup>a-c</sup>: Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ )



圖七、葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠中血清總膽固醇之影響。  
 Figure 7. Effects of grape skin extract (GSE) on the serum cholesterol (sTC) in high fat diet and high fructose syrup induced murine HMMS.

在十週的試驗後，經 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導肝代謝綜合症造型之實驗小鼠，對照組血清總膽固醇顯著高於正常組 ( $P < 0.05$ )；與實驗組相比，在給予葡萄皮萃取物 600 mg/kg/day 之實驗組與對照組相比有顯著降低 ( $P < 0.05$ )。數據以平均值±標準差表示，並以單因子變異數分析後，再使用 Duncan's multiple-range test 進行事後檢定。Naive：正常組，未經任何處理之組別；Control：對照組，以 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導肝代謝綜合症造型之組別；GSEL：葡萄皮萃取物低劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 120 mg/kg/day；GSEM：葡萄皮萃取物中劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 360 mg/kg/day；GSEH：葡萄皮萃取物高劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 600 mg/kg/day。<sup>a-d</sup> 上標相異字母表示不同字母間有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

In the 10 weeks administration of grape skin extract (120, 360, 600 mg/kg), control group was significantly higher than naïve group in sTC ( $P < 0.05$ ). Grape skin extract treatment group were significantly lower than control group in sTC ( $P < 0.05$ ). Data present as mean  $\pm$ SD (n=6) and was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. Group description was shown as Table 1. <sup>a-d</sup>: Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ )

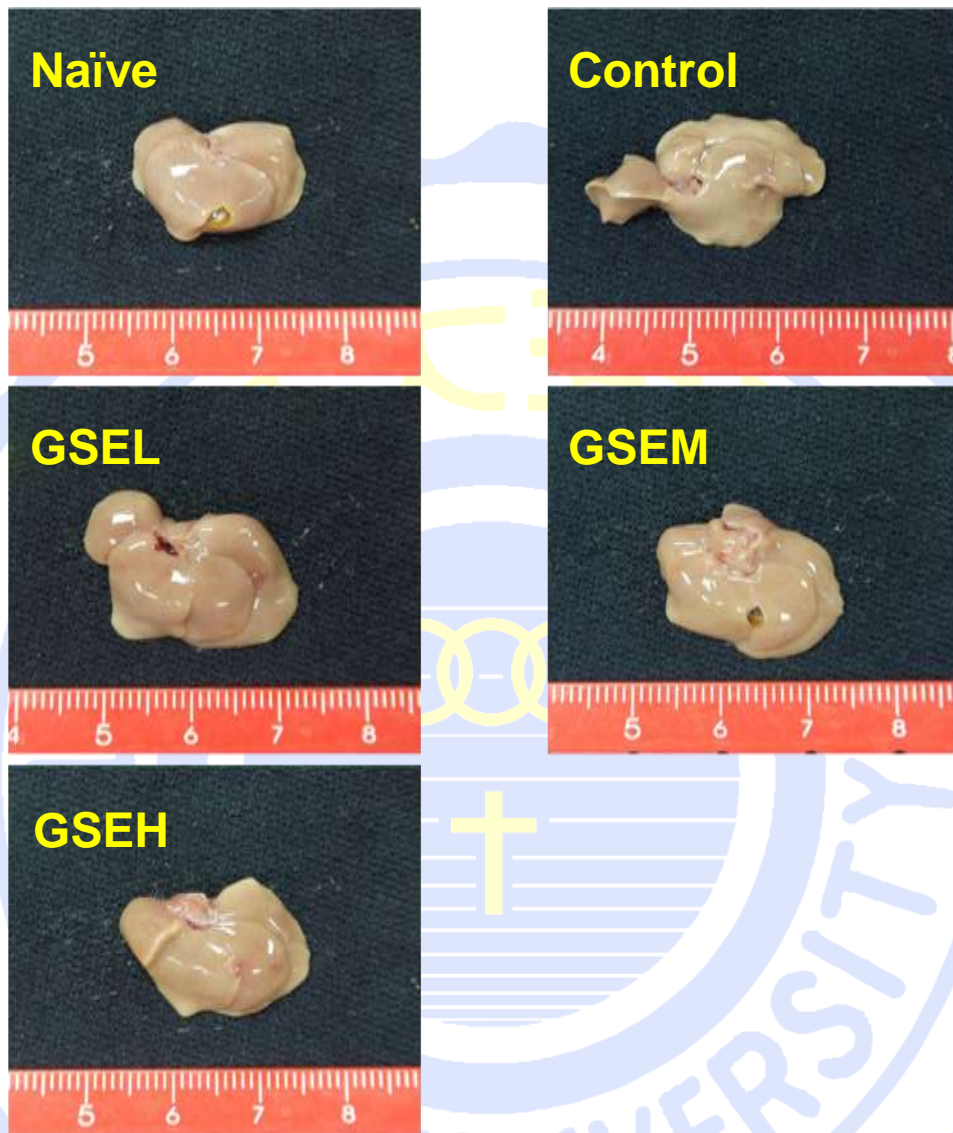


圖八、葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠中肝臟三酸甘油酯之影響。

Figure 8. Effects of grape skin extract (GSE) on the hepatic triglyceride (hTG) in high fat diet and high fructose syrup induced murine HMMS.

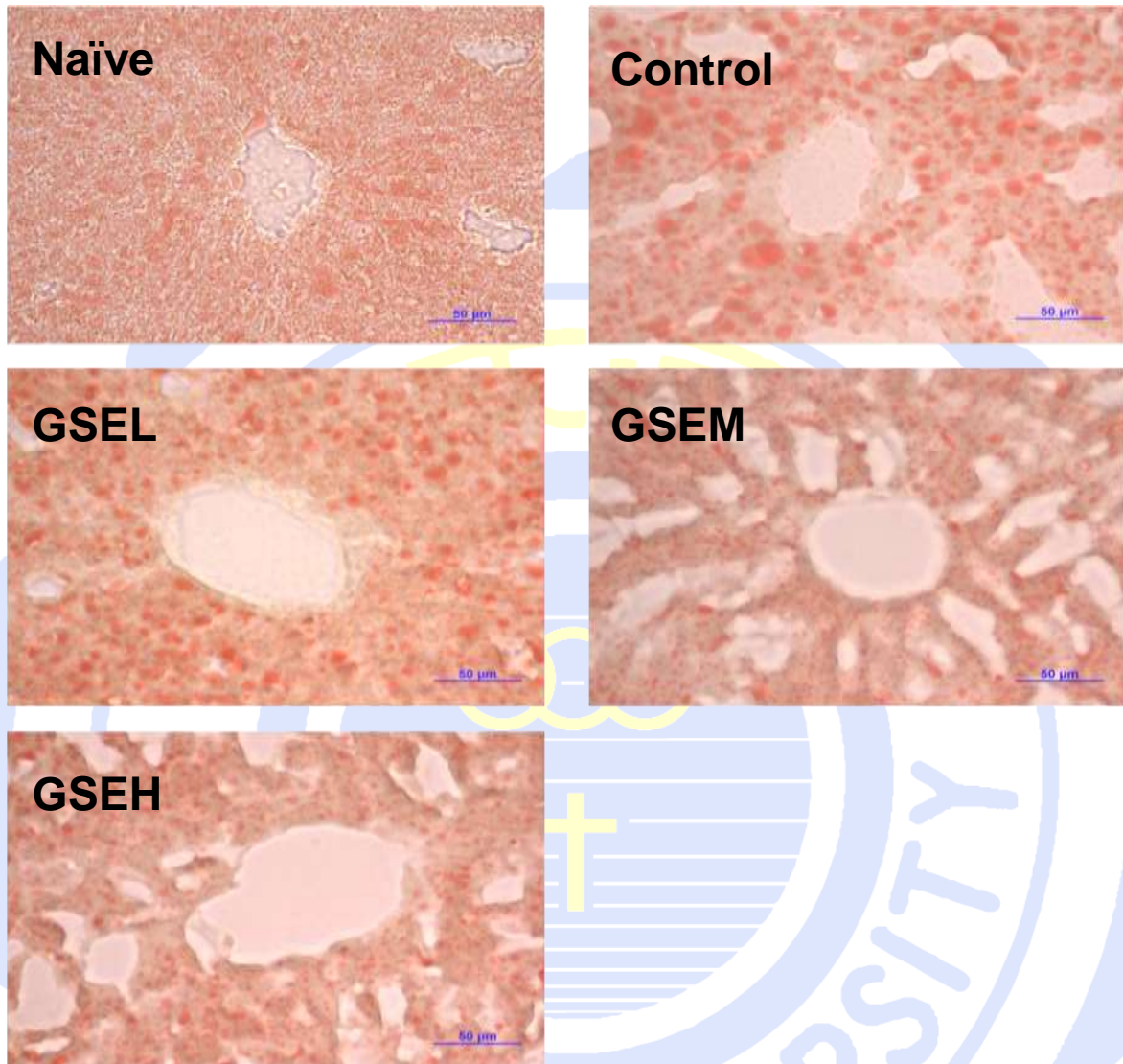
在十週的試驗後，經 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導肝代謝綜合症造型之實驗小鼠，對照組肝臟三酸甘油酯顯著高於正常組 ( $P < 0.05$ )；與實驗組相比，在給予葡萄皮萃取物 120、360、600 mg/kg/day 之實驗組與對照組相比皆有顯著降低 ( $P < 0.05$ )。數據以平均值±標準差表示，並以單因子變異數分析後，再使用 Duncan's multiple-range test 進行事後檢定。Naïve：正常組，未經任何處理之組別；Control：對照組，以 30% (v/v) 高果糖玉米糖漿飲水及 60% 高脂飼糧誘導肝代謝綜合症造型之組別；GSEL：葡萄皮萃取物低劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 120 mg/kg/day；GSEM：葡萄皮萃取物中劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 360 mg/kg/day；GSEH：葡萄皮萃取物高劑量組，額外給予葡萄皮萃取物 600 mg/kg/day。<sup>a-d</sup> 上標相異字母表示不同字母間有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

In the 10 weeks administration of grape skin extract (120, 360, 600 mg/kg), control group was significantly higher than naïve group in hTG ( $P < 0.05$ ). Grape skin extract treatment group were significantly lower than control group in hTG ( $P < 0.05$ ). Data present as mean  $\pm$ SD (n=6) and was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. Group description was shown as Table 1. <sup>a-d</sup>: Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ )



圖九、葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠之肝臟病理型態圖之影響。

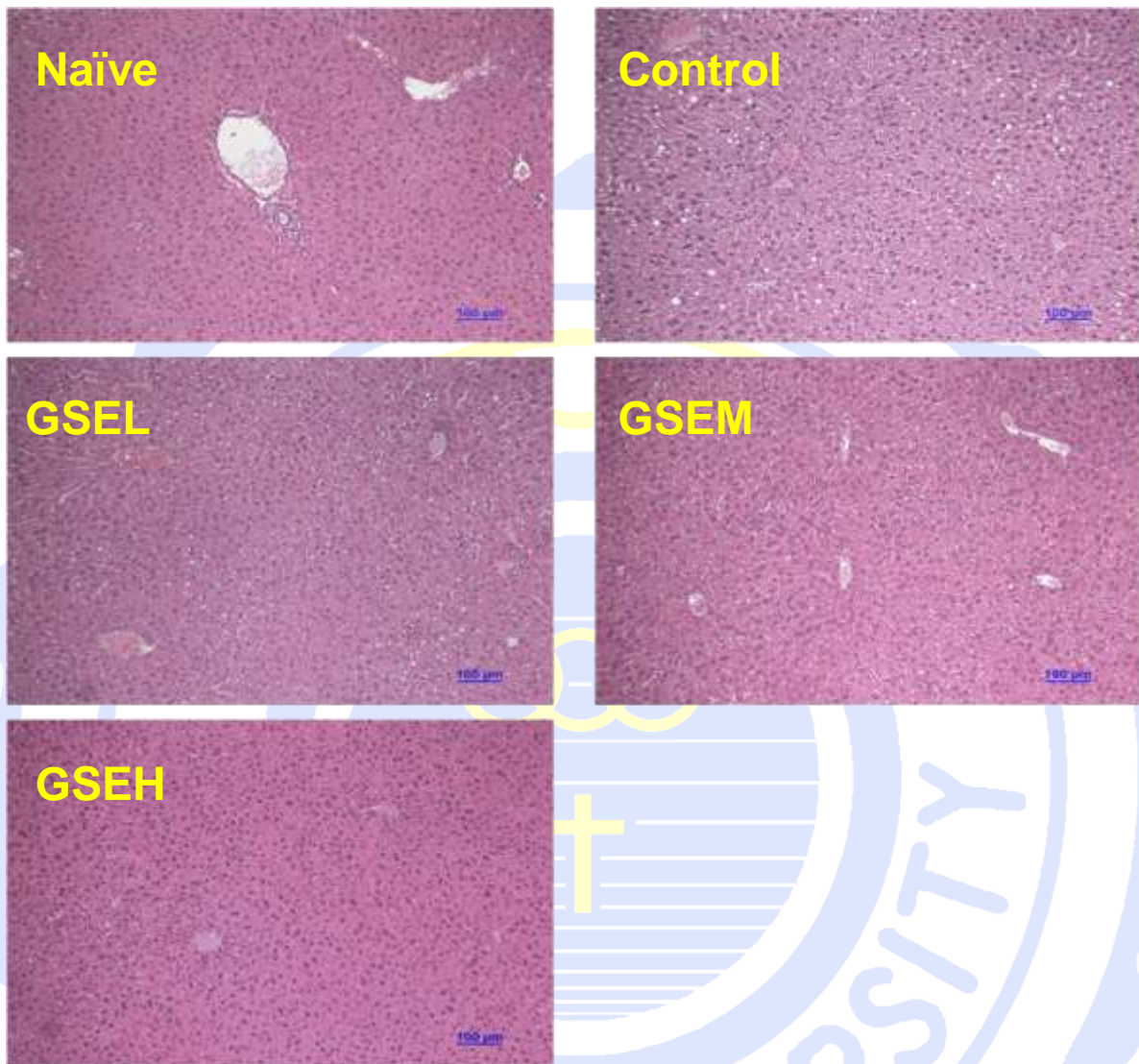
Figure 9. Effects of grape skin extract (GSE) on the liver gross in high fat diet and high fructose syrup induced murine HMMS.



圖十、葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠之油紅染色 (400 x)。

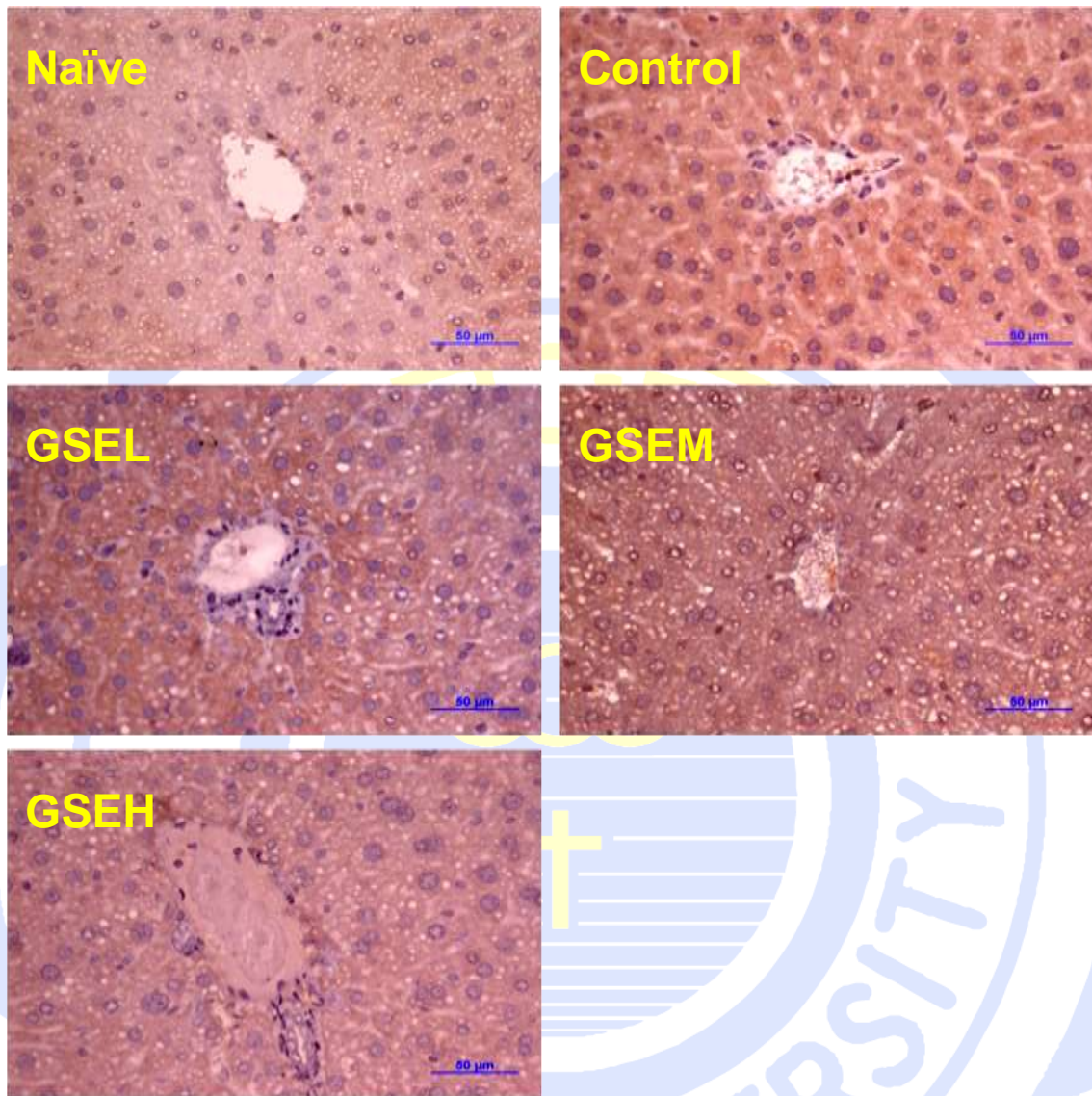
Figure 10. Effects of grape skin extract (GSE) on the hepatic lipid accumulation in high fat diet and high fructose syrup induced murine HMMS. Representative photomicrograph of Oil-red O staining in liver sections (400 x).





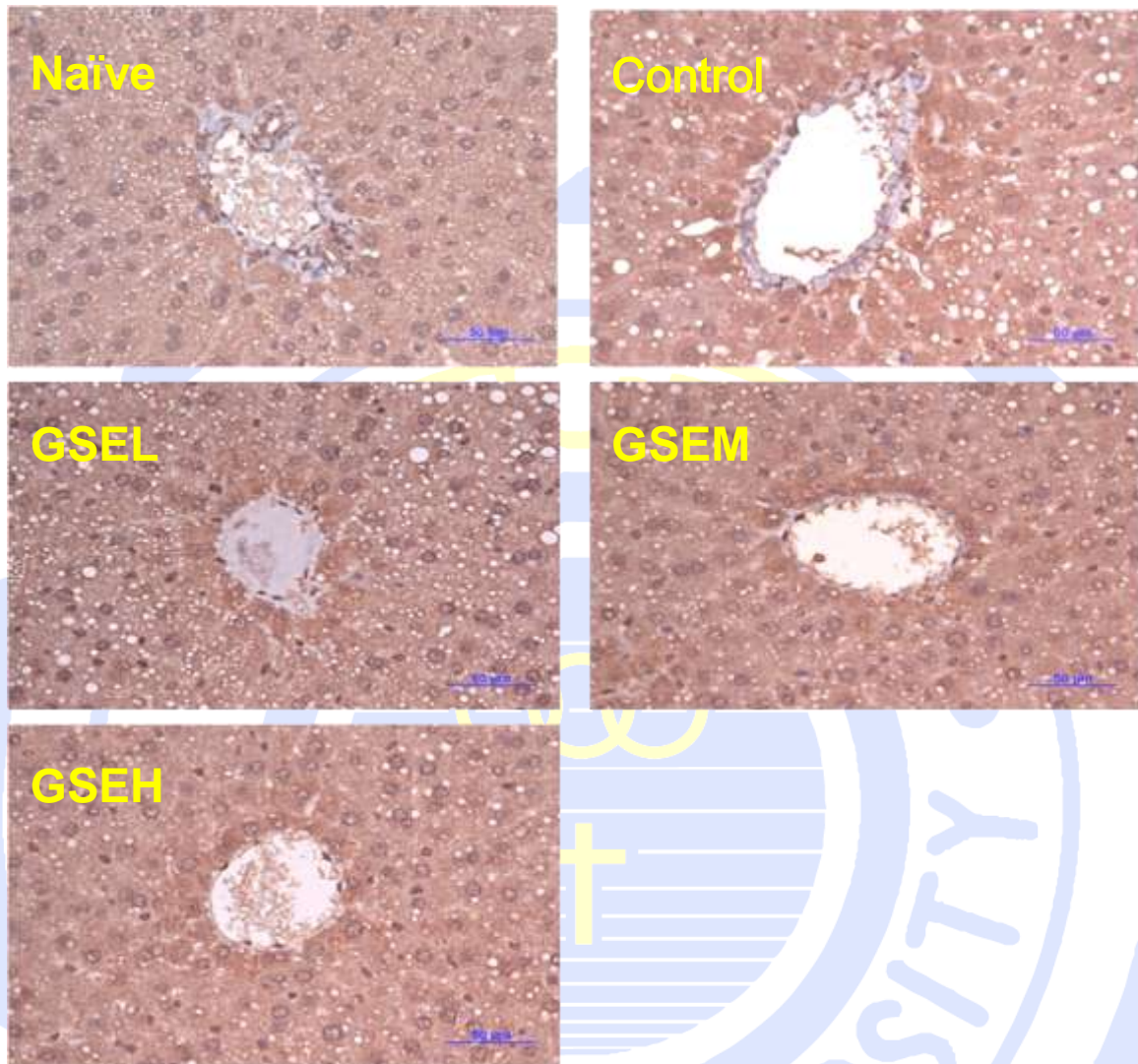
圖十一、葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠之蘇木紫與伊紅染色 (100 x)。

Figure 11. Effects of grape skin extract (GSE) on the hepatic lipid accumulation in high fat diet and high fructose syrup induced murine HMMS. Representative photomicrograph of hematoxylin and eosin staining in liver sections (100 x).



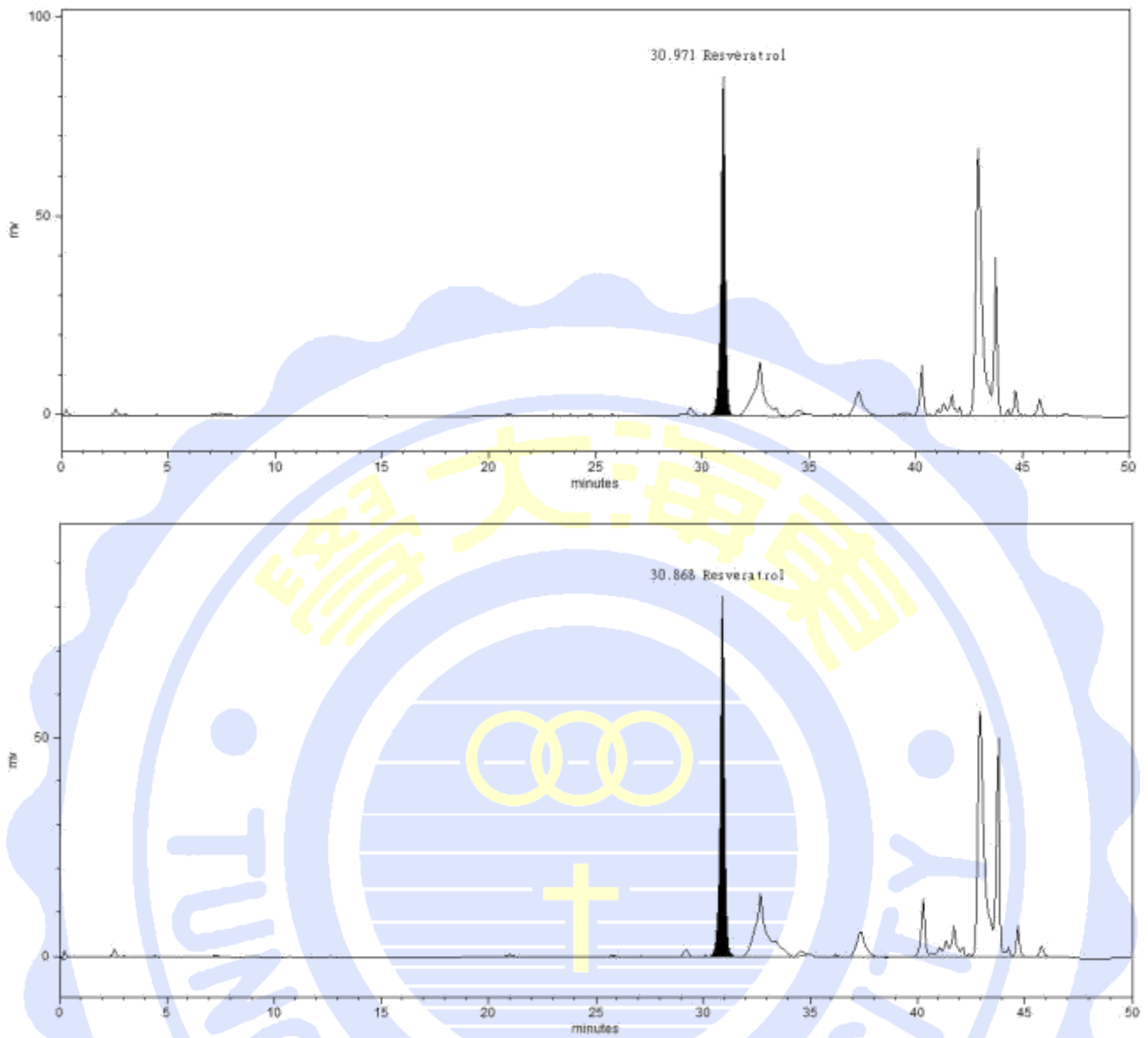
圖十二、葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠之肝組織切片 TLR-4 免疫組織化學染色 (400 x)。

Figure 12. Effects of grape skin extract (GSE) on the hepatic lipid peroxidation in high fat diet and high fructose syrup induced murine HMMS. Representative photomicrograph of immunohistochemical staining Toll-like receptor (TLR-4) in liver sections (400 x).



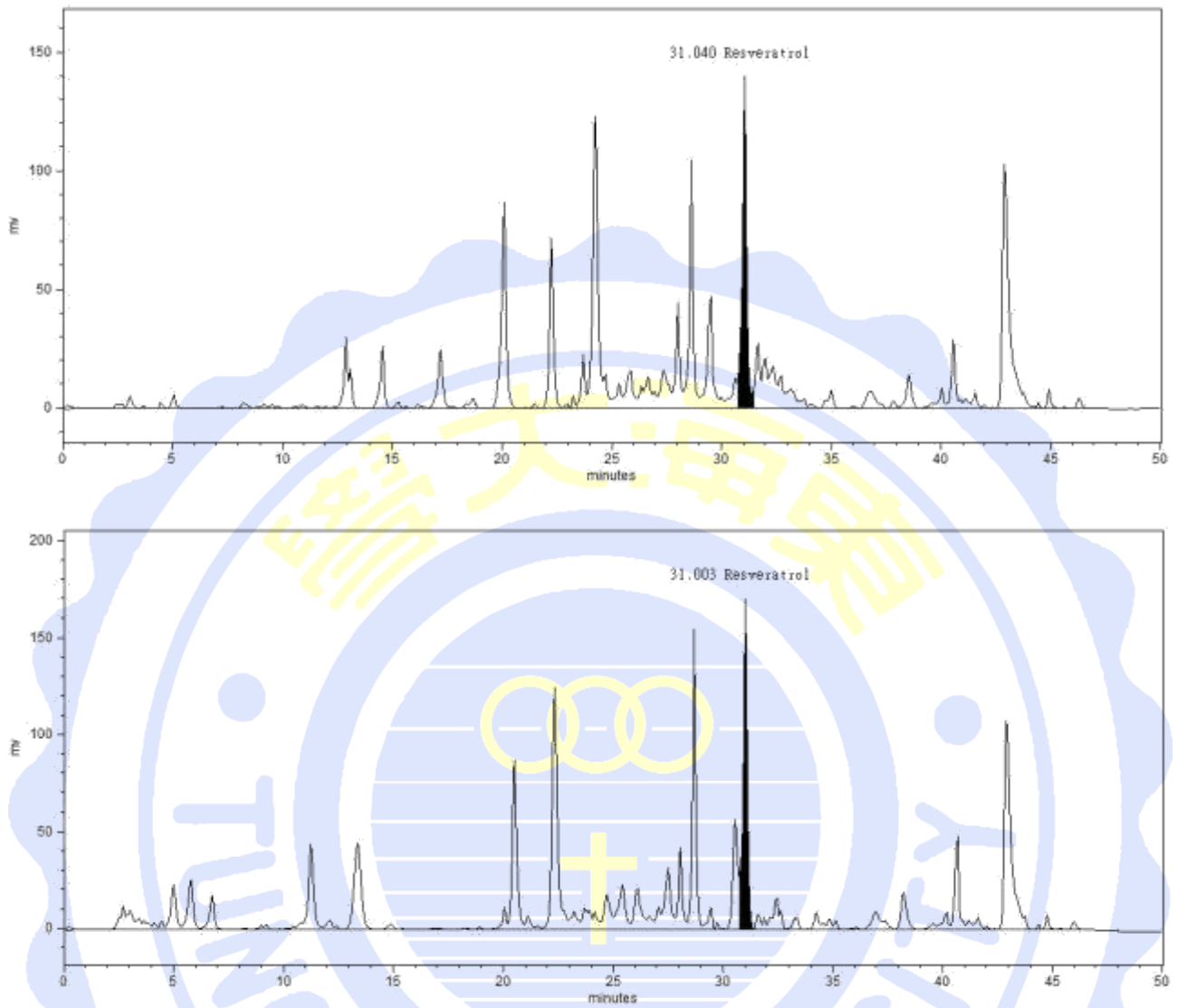
圖十三、葡萄皮萃取物對高脂與高果糖玉米糖漿誘導肝代謝綜合症小鼠之肝組織切片 4-HNE 免疫組織化學染色 (400 x)。

Figure 13. Effects of grape skin extract (GSE) on the hepatic lipid peroxidation in high fat diet and high fructose syrup induced murine HMMS. Representative photomicrograph of immunohistochemical staining 4-hydroxynonenal (4-HNE) in liver sections (400 x).



圖十四、白藜蘆醇標準品之 HPLC 圖譜

Figure 14. HPLC chromatogram of resveratrol standard.



圖十五、葡萄皮萃取物之 HPLC 圖譜

Figure 15. HPLC chromatogram of grape skin extract.

# 附件

## 附件一、實驗動物審查同意書

**東海大學**  
**實驗動物照護及使用委員會審查同意書**  
**Affidavit of Approval of Animal Use Protocol**  
**Tunghai University**

同意書編號： 104-08

計畫主持人(PI)： 謝長奇 職稱： 教授  
單位： 畜產與生物科技學系 飼養/應用地點： 農學院/實驗動物房室  
計畫名稱： 保健食品調節肝代謝綜合症評估試驗  
動物實驗申請表編號： 104-08

本計畫之「動物實驗申請表」業經實驗動物照護及使用委員會審查通過。

本計畫預定飼養應用之動物如下：

動物種別	動物數量	計畫執行期間
Mice-C57BL/6JNarl	120 隻	104 年 1 月 1 日 至 104 年 7 月 31 日

The animal use protocol listed below has been reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee or Panel (IACUC/ IACUP)

Protocol Title: The evaluation of health food in hepatic manifestations of the metabolic syndrome

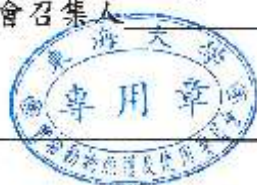
IACUC Approval No: 104-08

Period of Protocol: Valid From: 01/01/2015 To: 07/31/2015 (mm/dd/yyyy)

Principal Investigator (PI): Hsieh, Chang-Chi

實驗動物照護及使用委員會召集人 \_\_\_\_\_ 日期 \_\_\_\_\_

IACUC Chairman \_\_\_\_\_ Date \_\_\_\_\_



2015年6月10日

第二十九屆生物醫學聯合學術年會 投稿摘要表格（正本）

**The Effect of Grape Skin Extract on Nonalcoholic Fatty Acid Liver Disease in Murine Model**

許珉瑞 謝長奇<sup>1</sup>

Min-Ruei Hsu, Chang-Chi Hsieh<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Science and Biotechnology, Tunghai University

**Backgrounds:** Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is the progression of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). It is characterized aberrant lipid storage in hepatocyte and inflammatory progression to nonalcoholic steatohepatitis. **Materials and Methods:** In this study, we want to evaluate grape skin extract against the onset of NASH induced by high-fat diet and drinking with 30% fructose solution. C57BL/6 mice administered with grape skin extract (120 and 600 mg/kg/day) for 12 weeks. Serum alanine aminotransferase (ALT), triglyceride and cholesterol determination in serum or liver and oral glucose tolerance test (OGTT), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), and lipid accumulation in liver tissue sections by immunohistochemical staining for thymic stromal lymphopoietin (TSLP), Oil-Red O staining were determinate. **Results:** The results show that no significant differences on OGTT. Grape skin extract reduced ALT and triglycerides levels in serum, and also decreased accumulation of triglycerides in liver. Our results indicated that the treatment with grape skin extract can reduce NASH and insulin resistance by high-fat diet induced steatohepatitis. **Conclusion:** Grape skin extract reduced high-fat diet induced hepatic steatohepatitis in mice through involvement in down-regulated inflammation, including IL-1 $\beta$ , IL-6, TSLP and lipid peroxidation further hepatoprevention to release ALT.