

Summary

This experiment is aimed at discussing the mechanism of gaining weight of women between “ Postmenopausal ” from “ Primenopausal ”. During the research, using “ Ovariectomy – induced obesity model ” to observing how leptin plays a role during the procedure.

During a 17-week-long experiment, we observed the variation and influence of the leptin when the “ Estrogen ” is loses and “ Estrogen ” gain of in rats. According to the results, the weight gaining on the OVX group, which “Ovariectomy-induced obesity model ” was applied, was far ahead than the other two groups in their average weight in three weeks and continued increasing until the last week. The leptin level in blood was increased with the weight gain of the OVX group. However, the above leptin level, which was at the unit of $(0.216 \pm 0.132\text{ng/ml})$, was hardly detected when at mid-term of the 7 th week. After this, its leptin level started gaining to the unit of $(3.182 \pm 0.936\text{ng/ml})$ until the final procedure of the experiment. It is obvious that the level of the leptin was around four times than it was before the operation $(0.818 \pm 0.242\text{ng/ml})$. The fluctuation of leptin’s level were caused by the “Ovariectomy” induces the increase of weight, which is caused by the leptin level decreased in the early stage. However, the final increasing of leptin level and its weight gain may be influenced by the sensitivity of the leptin signal.

中文摘要

本實驗主要是探討停經前及停經後的婦女(postmenopausal)，體重增加的機制，在這個研究中，使用卵巢切除來誘導肥胖的大白鼠模式，來探討 leptin 在這過程中所扮演的角色。在這實驗過程中，進行長達 17 週長時間的監控紀錄大白鼠在失去雌性素(estrogen)之後，血清中平均 leptin 的變化，同時觀察給予雌性素對於 leptin 的影響。

結果顯示，除去卵巢那組 (OVX) 平均的體重在三星期後已經遠高於其它兩組老鼠的平均體重，並且持續的增加直到實驗終止。OVX 組隨著重量的增加，同時也伴隨著血中平均 leptin 濃度的改變，到了實驗一半期間第 7 週時，OVX 組大部分的老鼠血清中平均 leptin 的濃度幾乎無法被偵測到 ($0.216 \pm 0.132\text{ng/ml}$)，隨後它的濃度開始升高，到了實驗結束終了，leptin 平均的濃度測得為 ($3.182 \pm 0.936\text{ng/ml}$)，很明顯地比手術前所測得 leptin 平均的濃度 ($0.818 \pm 0.242\text{ng/ml}$) 大約高於四倍左右，這些血清 leptin 數值的上下波動應造因於卵巢的切除，而雌性素的補充則會使此現象消失。

本論文的證據顯示卵巢切除平均誘導體重的增加，可能是因為早期平均 leptin 濃度的降低所造成的，而最後平均 leptin 的升高和平均體重的增加，很可能與 leptin 訊息的敏感度的下降有所關連。

緒 言

一、Leptin 的發現與作用：

(一) 肥胖基因 (ob gene) 的發現

肥胖基因是在 1950 年, Ingalls, Dickie & Snell 等人由肥胖基因突變的老鼠發現, 這種老鼠的特徵是具有高胰島素症 (hyperinsulinemia) 高血糖症 (hyperglycemia), 對胰島素產生抗性 (insulin resistance) 過度攝食 (hyperphagia), 中樞神經系統活性變化、棕色脂肪組織 (brown adipose tissue, BAT) 代謝率下降以及白色脂肪組織增生等症狀 (1, 2)。到了 1970 年代, 科學家已找出幾株由單一基因突變所造成的肥胖老鼠, 其中二株命名為 ob(obese)及 db (diabetes) 的肥胖老鼠, 其肥胖的特徵上幾乎完全一樣, 只有當與正常老鼠「並聯共生」(parabiosis) 時, 才會呈現不同的反應。而所謂「並聯共生」技術就是利用手術將兩隻老鼠的循環系統接合在一起, 使血中因子能相互流通, Coleman 於 1973 年從事此項研究, 發現與正常老鼠並聯後, ob/ob(表示兩套染色體上的 ob 基因都突變) 老鼠的體重下降恢復正常, 而 db 老鼠體重卻不會下降(見圖 1), 故 Coleman 教授猜測 ob/ob 老鼠因為基因的突變而缺乏一種在血液中循環, 而可以調控體重的因子, 而 db/db 老鼠所突變的基因, 則可能是負責接受該因子訊號的物質, 這個

假設在二十年後被證實是正確的。

1994 年洛克菲勒大學 Freidman 教授所領導的研究小組，花了八年的時間，利用定位篩選法 (positional cloning) (3)，逐步尋找老鼠第六號染色體區域的基因，終於找到 obese 基因。並由老鼠脂肪組織所得到的瘦身蛋白是由肥胖基因 (ob gene) 轉譯出來的一條蛋白質，含有 146 個氨基酸分子量，約 16kD (現已被命名為 leptin)，而 Geffroy 等人(4)1995 年則確定人類肥胖基因的所在，是位於第七對染色體的長臂上 (7q 32.1) 的位置，以基因重組 (recombinant) 的大腸桿菌 (E.coli) 所生產的人類 leptin，純化後經電泳分析所得分子量為 15926.3 (dalton) (5)，由於這種特殊的蛋白質，不管是人類或是老鼠的，皆可以迅速減輕肥胖基因發生突變，所導致異常肥胖的情形，因此把 leptin 譯為瘦身蛋白。

(二) 瘦身蛋白 (leptin) 的作用

ob (obese) 基因來自父母雙方的兩種複本皆發生突變 (ob/ob)，由於不能製造 leptin，而使得他們永遠處於飢餓的狀態，不能生殖、保暖和正常的發育，因為食慾不受控制，所以導致嚴重的肥胖現象，其體重是正常老鼠體重的二 三倍多。由 leptin 的結構來看，它的 N 端具有一段典型的訊號肽 (signal

peptide), 表示 leptin 是被分泌到細胞外的蛋白質 (secreted protein), 而在 ob 肥胖老鼠體內的 ob 基因上, 發現一個 G T 的突變, 使得第 105 個胺基酸(arginine), 變成轉譯停止碼 (stop codon), 而無法表現出具有功能的產物, 此外 ob 基因的 mRNA 只有在脂肪組織中表現, 從這些特徵推測, leptin 是由脂肪細胞合成後, 送入血液中循環的一種類似荷爾蒙的調控因子, 也就是說, 當體內脂肪貯存量過高時, 脂肪細胞就合成 leptin 分泌到血液中, 經由體重控制中心, 下達減少攝食及增加運動, 以消耗多餘的脂肪, 而這個控制中心, 目前已有証據指出是在腦部的下視丘 (hypothalamus)。

1995 年 7 月, 包括 Freidman 教授、加州 Amgen 生技公司及紐澤西州 Roche 藥廠三個不同研究小組, 在同一期科學期刊 (Science) 上發表證實 leptin 在老鼠體內具有調節體重的功能, 其一為發現 ob gene 序列的研究小組所作 (6), 他們發現 leptin 作皮下注射可以使 65g 重的肥胖基因突變的老鼠 (ob/ob) 體重減輕 40%, 在這同時伴隨有明顯食慾衰退的現象 (7), 由這現象推測 leptin 可能類似內分泌腺體的作用, 因為食慾的減退, 而造成體重明顯的下降, 另外他們又發現, 攝取同量食物的 ob/ob 老鼠, 有注射 leptin 者體重, 比未注射者, 體重減少 50%, 此一現

象經由另一組研究小組發現 (8)，是由於代謝率的增加所導致，因為他們測得老鼠體溫提高 2℃，單位時間耗氧量增加 90% (9)，同時正常老鼠處於飢餓狀態時，其脂肪組織 leptin 的表現會下降，飽足時又會增加，顯示 leptin 和攝食有密切的關係存在 (10, 11)，由此說明 leptin 的作用是同時經由降低食慾和增加代謝率等兩種途徑，來達到有效的控制體重的目的。

此外，Campfield 等人 (1995) 從另外一個角度來探討 leptin 的作用，他們發現如果在腦部注射 leptin，只要微劑量就有良好有效的抑制食慾，由此可以推測 leptin 是可以經由神經網路，被不知名的受體所接受，而啟動細胞訊息物質分泌，作用在相關的細胞上來執行功能，另外一個發現是，leptin 對於肥胖基因正常成年之後才開始肥胖的老鼠，具有顯著的治療效果，這類因攝食引起的肥胖症 (diet-induced obese, DIO)，其生理特徵具有類似糖尿病的醣代謝障礙，包括有高血糖和高胰島素的現象，當注射 leptin 之後，除了減少老鼠高脂肪性食物的攝取之外，同時也會降低血糖和胰島素的濃度至接近於正常狀態，在這同時 Mac Djougald 等人 (11) 的研究則指出胰島素可能和 leptin 的調控有關，其立論根據是在由黴菌病毒所引起的糖尿病的老鼠所取出的脂肪組織中，加入胰島素可以促進 leptin mRNA 的表現。這些

研也顯示 leptin 除了與肥胖症狀關係密切外，可能也參與某些疾病的形成有關，例如 Type-II 糖尿病患者或是成人型肥胖症患者，可能是因為胰島素或是 leptin 的訊息傳遞發生問題而導致病狀出現。

由於 Science (6,8,12)這三篇的研究報告，改變了我們對於脂肪組織傳統的認知，同時也告訴我們，脂肪組織不只是一個能量儲存的場所，更可能是能量代謝控制的所在；繼此之後有關 leptin 的研究不斷有突破性的發現，人們對於複雜的肥胖問題，也因此有了更測刻的瞭解。

近年來許多實驗室對於 leptin 的研究不遺餘力，對於 leptin 的作用機轉、調控等提出許許多多的研究報告，諸如對於複雜的中樞神經系統（CNS）整合中樞和周邊有關腦部代謝及訊息傳遞的研究；leptin 對於月經週期、生殖、哺乳及造血功能的影響；leptin 對於神經內分泌系統的調節作用等，相信在不久的將來能夠完全掌控 leptin 的作用機制，以解決許多因遺傳或疾病而導致肥胖的因素。

（三）Leptin 受體的發現及探討

自從 1995 年 7 月三篇在同一期 Science 期刊上，證實 leptin 在老鼠體內具有調節老鼠體重的功能之後，費得曼的研究小組也

發現如果將 leptin 打入 db/db 老鼠體內，發現並沒有減輕體重的效果，同時也發現 db/db 老鼠血清中 leptin 的含量較正常老鼠的 leptin 含量高，因此懷疑 db 基因的產物，有可能是 leptin 的受器 (receptor, OB-R)。

在這同時，有許多報告指出，大部份肥胖的人，血中 leptin 的含量並不比瘦者低，因此懷疑問題似乎出在受器的基因上，或是在其下游訊息傳遞 (signal transduction) 的路徑，有可能出了問題；結果在 1995 年的年底 OB-R 就被找到了。他們利用放射性碘標定的 leptin 或是用與鹼性磷酸水解 (alkaline phosphatase) 融合的 leptin 作探針，在各種細胞株與組織切片中尋找可與之結合 (binding) 的蛋白質，結果發現在第三腦室及側腦室的脈絡叢 (choroid plexus) 有明顯的結合反應，並成功的選殖出 OB-R 的 cDNA，而這 cDNA 所譯出的蛋白質含有 894 個胺基酸，包括胞外區 (extracellular domain) 816 個胺基酸，穿膜區 (transmembrane domain) 23 個胺基酸乃胞內區 (cytoplasmic domain) 34 個胺基酸，OB-R 是找到了，但由 OB-R 的 cDNA 所譯出的蛋白質胞內區來看，這麼短的胞內區是否具有訊息傳遞的功能呢？是令人質疑的，而另一個疑惑則是 OB-R 的 cDNA 被定位在老鼠的第 4 號染色體上，與 db 基因的位置非常的接近，約 5.1 centi-Morgan 的

距離，但從 db/db 老鼠所選出的 OB- cDNA 序列卻與正常老鼠的序列一樣，並且沒有發現有任何的突變，難道 OB-R 的基因不是 db 基因，這些的疑惑，是大家急欲解開的謎題。答案在三個月後被解開了，Morgenstern、Freidman 及 Leibel (13-15) 三個研究小組，分別發表在 Cell, Nature, 及 Science 三本著名的期刊上，證實 OB-R 的基因就是 db 基因，並且證明在 db/db 老鼠內 OB-R 的突變機制(圖 2); 原來 Morgenstern 等人所找到的 OB-R cDNA 只不過是六種不同的剪接型 (spliced form) 中的其中一種 OB-Ra; 而在人類細胞中發現的，能在下視丘中 (hypothalamus) 表現的 OB-Rb 型，它可以轉譯出具有 302 個胺基酸的胞內區，才是具有傳遞 leptin 訊息的受器。

那這些 OB-R short form 是如何產生的，原來 db/db 老鼠的 OB-Rb cDNA 多出一段長 106 個核甘酸的插入序列，而在這段序中含有一個轉譯停止碼，迫使轉譯作用提早中斷，故只能做出較短胞內區的 OB-R 蛋白。而造成 106 個核甘酸序列插入的原因是因為染色體上一個 G T 的點突變，而產生了一個剪接提供訊號 (splice donor site)，使得位在突變點前的序列被接入 OB-Rb 的 mRNA 中。而轉譯出較短的 OB-R (圖 2)。

1996 年 Lee 等人 (16) 更進一步指出,OB-R 基因位在老鼠

第 4 對染色體稱之為 db 區間 (interval) 上 , 擁有 3×10^5 個鹼基對 , 至少有六種錯誤的結合方式 , 可以導致 leptin 受體的功能障礙 , 此障礙會導致 leptin 在下視丘 (hypothalamus) 部位無法被接受 , 中樞神經系統則因為訊導無法傳遞而失去調節食慾和體重的功能 , 而造成嚴重肥胖的症狀出現。

(四) Leptin 與 Estrogen 之相關文獻探討

儘管目前我們很清楚 , 肥胖與很多疾病有所關連 , 例如第二型糖尿病 (Type II diabetes) , 高血壓 (hypertension)、冠狀動脈疾病 (coronary artery disease) 和癌症 (cancer) 等 , 但對於它發展確切的機制並不很清楚 , 由於 leptin 荷爾蒙的發現 , 使得這個難以理解的問題 , 露出了新曙光。例如 ob 基因 (肥胖基因) 的產物 leptin , 是由 white fat cells (白色脂肪細胞) 所支配分泌的 , 並且循環在血漿中 , 作用如同內分泌媒介 , 來調控身體脂肪的儲存 (6)。由研究顯示 leptin 能掌管週邊外 , 也能調控中樞 , ob 蛋白除了能減輕體重外 , 也能降低對於食物的攝取 , 並且能對基因突變的 obese mice (ob/ob) , 或因食物的誘導而導致肥胖的老鼠和 wild-type mice , 降低其身體中的脂肪 (6, 8, 12)。更進一步地 , 對於 metabolic rate , body temperature 和它的活動性 , 會因為給予 leptin 而使其降低 (12) , 至於正常的 rats 和 mice 因飢餓而造

成明顯壓抑 ob 基因的表現，但如果供應給予食物，則情況會反轉回來。另外有些研究發現，肥胖的人，他血清中 leptin 的量高於正常個體 leptin 量，並且 leptin 的量會隨著體重的喪失而降低 (17)，這些數據說明 leptin 會影響體脂肪在有機組織中的百分比，並且也扮演一個如同“adipostat”借著抑制食慾和增加能量的支出，來調控脂肪組織的體積和質量。

自從 leptin 被發現以後，對於 conventional、hereditary 或 physiological 等肥胖的模式，被重新拿來探討研究這個 hormone 它所扮演的角色。Ovariectomy-induced (卵巢切除誘導) 肥胖的模式，就是其中的一種。這個方法經常被用來模擬 postmenopausal (停經後) 的婦女狀況，臨床研究顯示，在更年期的婦女會增加體重，並且會增加 body mass index (BMI) (18-20)，尤其是停經後的婦女，其 cardiovascular disease 的危險指數增加更是與停經有所關連 (21, 22)。過去 estrogen 被用來取代治療，不但能防止停經後體重的增加 (23)，而且能降低心臟血管疾病的危險指數 (24)。為了要研究婦女停經前到停經後體重的改變和脂肪分佈的機制，故我們使用了齧齒類卵巢移除誘導模式，來研究在失去 estrogen 之後，肥胖是如何發展的；雖然有些研究 data 証實，除去卵巢的老鼠 (OVX)，每天攝食食物量增

加並且體重也增加了 (25), 然而在 estrogen 的給予下, 情況會被改變過來, 但它確實的機制, 目前依然不很清楚。這暗示 leptin 與 estrogen 之間據有相關性, 最近在體內與體外的研究中被詳述, 證明 estrogen 能直接影響 leptin 的表現 (26-29)。因此, 這是一個有趣的實驗, 在卵巢切除後的老鼠, 它 estrogen 失去後, 如何來影響 leptin 的產生。Shimizu 等人兩個月的研究 (26), 證明在在老鼠卵巢切除後的第 8 週, 它的白色脂肪中的 ob gene 的表現是降低了。Yoneda 等人 (27) 也發現在老鼠卵巢切除後的第 4 週, leptin 的量降低了。由這兩者的研究結果, 提供一個解釋這些動物體重為何會增加, 由於低量的 leptin, 在下視丘的飽食中樞中, 因此有較小的壓制所造成的緣故。然而, 這個結果與我們所了解認知的, leptin 量與 BMI (17, 30-32) 是正向地相關性有所抵觸, 為了進一步了解, 卵巢切除誘導肥胖的發展機制, 所以設計一個較長時間的觀察研究 (卵巢切除手術後持續 15 週), 並且使用連續的監控, 來看切除卵巢後, 老鼠 leptin 的量在固定時間點所產生的任何改變及 estrogen 補充後的影響。

(五) Leptin 與 leptin receptor 在 hypothalamus 及 brain 內之作用 文獻探討

目前我們對於 leptin 及 leptin receptor 所知很少, 對於它在

hypothalamus 及 brain 內，作用的部位及如何來調控的知道的更少，我們所知道的是 leptin 的缺乏歸於 ob gene (in ob/ob mice) 的突變 (33) 和 leptin 受到抑制則歸於 leptin receptor (in db/db mice 和 fa/fa rat) 的突變 (34)，兩者導致過度的攝食和過度的肥胖，如果給予 leptin 在 ob/ob mice 及正常的 mice，會降低它們對食物的攝取，和體重的降低 (35-38)，1993 年 Wilding 等人發現，neuropeptide Y (NPY) 在 ob/ob 老鼠的 hypothalamus 裏有過量表現的情形 (39)，就如同 db/db 老鼠 (40)，fa/fa 老鼠 (41) 一樣，如果使用 leptin 來處理 ob/ob 老鼠的 arcuate nucleus (ARC) 會產生較低濃度的 NPY mRNA (42, 43)，1996 年 Schwartz 等人 (44) 也發現禁食會抑制 hypothalamus 裏 arcuate nucleus 內 NPY 基因的表現，並且會降低 circulating leptin 的濃度 (45)，除此之外禁食也會降低 corticotrophin releasing hormone (CRH) 在 PVN 內的表現 (46, 47)，因此 CRH 在腦部 PVN 區內是扮演抑制食物的攝取和增加能量支出的角色 (48, 49)，Schwartz 等人於是提出一個假設，如果 leptin 是直接作用在 hypothalamus 的 neurons，來誘導 neuropeptide 基因表現的改變，leptin receptor mRNA 在腦內作用區域，應該被測得到是主要的關鍵。

至於我們對 leptin receptor 的了解，目前只知道 leptin-R 是單

一穿過細胞膜的受體，是屬於 cytokine receptor superfamily 的一員 (50-52)，leptin-R_L 能夠調節生物的效應 (50)，leptin-R_S 它在生理的角色，目前並不很清楚，但最近的研究證明它可以調節 leptin-R_L 的活性 (53, 54)，對於 leptin 而言是扮演如同一個運送蛋白質的角色 (50, 55)，並且具有一些傳遞訊息的能力 (56)，1998 年 Robinson 等人 (57) 用 situ hybridization 的方法來分析 leptin-R 基因的表現，並使用 probes 來確認所有 receptor 的 isoforms 或使用特異性的 leptin-R_L 來偵測，並靠著 leptin-R probe 來作 transcripts 的辨識，以了解腦部各區域 leptin-R 分佈的情形，結果發現 arcuate nucleus (ARC) 弓型細胞核，ventromedial nucleus (VMN) 腹部中間細胞核，thalamus (TH) 視丘，和 piriform cortex (PC) 梨狀皮質區域 leptin-R_L 的 transcript 被偵測到，但 choroid plexus (CP) 脈絡膜網狀組織，並沒有被偵測到，如果用 E2 來處理，則發現 ARC 和 VMN 區域 leptin-R_L 基因的表現有降低的現象，但 TH 和 PC 區域並沒有改變，而 OVX 組則對 leptin-R_L mRNA 的表現並沒有影響，但對於 leptin-R 的 transcripts 則有明顯的增加，同時他們也發現 fasting 也會對 leptin-R_L mRNA 在腦部各區域造成不同的調控，禁食會在 TH 區增加 leptin-R 的 transcripts，儘管在這個區域 leptin-R level 是降低的，由上面之發現，可以說

明 leptin 的 transcripts encoding leptin-R_S 和 leptin-R_L , 對於 oestrogen 有不相同的敏感差異性 , 僅有 OVX 處理才會增加 leptin-R_S 的 transcripts , 而禁食會降低 leptin-R 的 transcripts 和增加 leptin-R_L 的 transcripts , 那如禁食同時給予 E2 的話似乎會造成 leptin-R_S 量的降低 , 故 Robinson 等人認為 leptin-R 基因的調控呈現出複雜性 , 故目前對於如何在 hypothalamus 及 brain 內的調控機制並不是很清楚。

研究動機

肥胖 (obesity) 在現今已開發的國家中，已是一項日趨嚴重的問題，1992 年根據調查，歐美即有 20% 人口比例有過重或肥胖的傾向，日本青少年中有 10% 體重過重，而台灣肥胖兒童的比例則已增加到 20%，到了 1996 年美國統計，有將近 1/3 的美國人，超過標準體重 20%，每年花費在減肥瘦身上的費用超過三百億美元，同時因肥胖而引發的慢性疾病，例如第二型糖尿病、冠狀動脈疾病、高血壓和癌症等所造成社會成本的負擔，更是無法估計，了解肥胖形成的原因，是目前非常迫切重要的課題，如此才能對症下藥解決問題。

近兩年來的研究報告顯示瘦身蛋白 (leptin) 應該就是體內調節能量儲存的傳訊者，當瘦身蛋白失去作用時，極可能是某些肥胖症發生的原因，因此它對於不同型式的肥胖中所扮演的角色，如能夠詳加了解，可能有助於疾病的治療。

而本實驗將以卵巢切除後，所引起的肥胖模式，來模擬停經後的婦女，普遍引起肥胖的情形，來探討雌性素與 leptin 之間的關係。

實驗材料與方法

一、藥品與試劑：

1. Protein assay dye reagent, TEMD 購自 Bio-Rad laboratory (U.S.A)
2. Coomassie brilliant blue R-250 , 購自 Serva chemical Co. (Germany)。
3. Serum leptin RIA kit , 購自 (Linco Research Inc, St Charles, Mo, U.S.A)
4. Serum Immulite estradiol kit , 購自 (Diagnostic Products Corporation, LOS Angeles, CA, U.S.A)
5. Triton X-100 , 購自 American Biorganics Inc. (U.S.A)。

二、儀器：

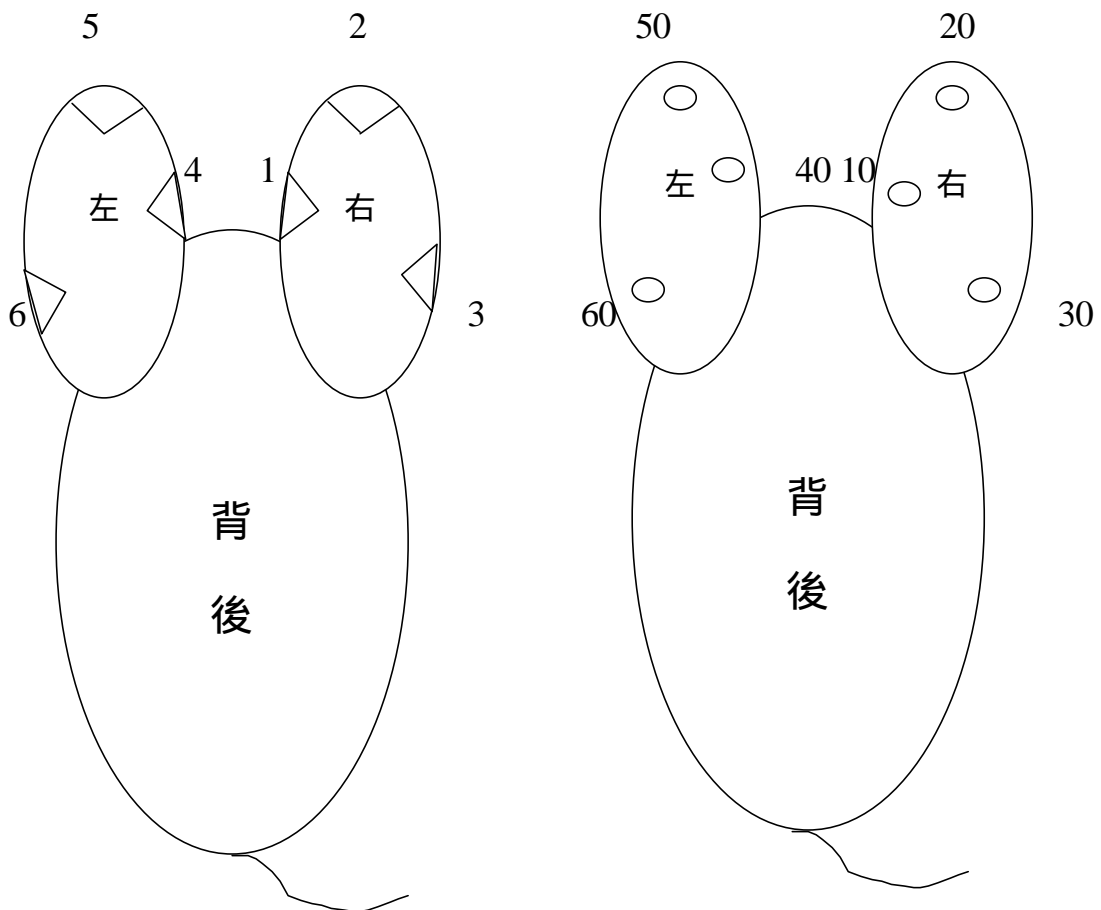
1. 超過速離心機：Beckman L-80。
2. 分光光度計：Beckman DU640 Spectrophotometer。
1. 3.-70 冰箱：SANYO Ultra Low。
2. 4.-20 冰箱：SANYO Ultra Low。
6. Chemiluminescent enzyme immunoassay IMM Ulite-2000 全自動冷光免疫分析儀：佑康股份有限公司。
7. α -counter：PARK (U.S.A)。

動物處理方法

Sprague-Dawley 的雌鼠一批，體重約 200 克左右 (附錄一)，先剪耳朵編號 (P.19) 編成三組飼養，在室溫 24 濕度 50%，每天光照度 12 小時 (由 AM5 點到 PM5 點) 之控制室內培養。(老鼠來源：National Science Council Animal Center, Taipei, Taiwan)。三分之二的老鼠使用輕微的乙醚麻醉後，切除兩側的卵巢 (Ovx)。剩餘的老鼠也作同樣的手術 (假手術) 即沒有切除其卵巢，只造成相同的緊迫 (stress) sham n=10。一半卵巢切除的老鼠補充 estradiol benzoate (EB, 25ug/kg 重；Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) 作背部皮下注射，一週注射兩次，在手術後第三週開始實施直到實驗結束為止 (n=12 次)。另一半卵巢切除老鼠，則給予相同劑量的 sesame oil 注射 (n=12 次)。某些老鼠因手術而引起發炎，腫瘤或卵巢去除手術作的不完全的 (在實驗結束時解剖檢查) 從實驗中剔除。最後存留用來作分析的老鼠分別為 sham-operated 組有 9 隻，Ovx 組 8 隻，Ovx + EB 10 隻。所有的血液檢體每隔一週由老鼠的尾巴抽取，在老鼠注射 EB 或 sesame oil 之後兩天採血。每週老鼠的體重量測後記錄下來 (附錄一)，並且從 sham-operated 那組老鼠在抽血的當天，作 Vaginal smears (陰道抹片) (附錄二) 記錄其發情階段 (P.20)。這個實驗操作持續 17 週。

老鼠剪耳及編碼方法

方法：使用三角形剪耳器，由右耳內側開始為 1 號，右耳尖 2 號，右外側為 3 號，再由左耳內側為 4 號，左耳尖為 5 號，左外側為 6 號（如圖一）。10 號以後由右耳內側開始打圖洞代表 10，右耳尖處為 20，右耳外側為 30 如此類推，左耳內側 40，左耳尖為 50，左外側則為 60（如圖二）。



(圖一)

(圖二)

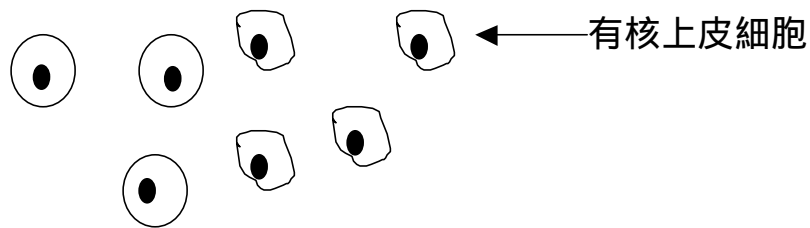
V：為個位數碼

O：為十位數碼

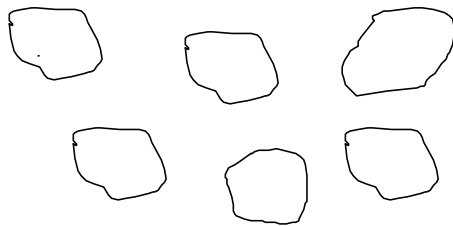
性週期 (Sexual Cycle) 的判定

雌性動物的性週期，叫作動情週期 (estrous Cycle)，而雌鼠自有性週期開始，全年均表現動情週期的循環，又稱為多青週期 (polyestrus -cycle)，在這過程中，可區分為以下四個階段以為區別：

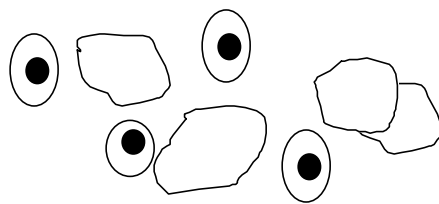
1.發情前期 (proestrus):可見很多卵圓形或紡錘形，有核的上皮細胞



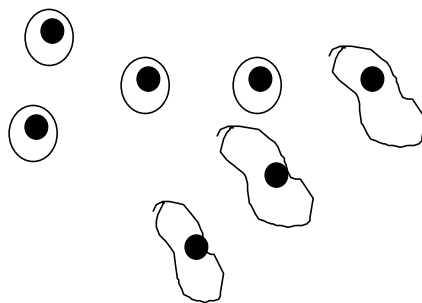
2.發情期 (estrus):可見極不規則扁平，大形角化上皮細胞。



3.發情後期 (metestrus):可見到角化上皮細胞和白血球。



4.間情期 (diestrus):可見到很多白血球和少量上皮細胞。



蛋白質定量測試方法

試管分別加入 1 g/100 l , 2.5 g/100 l , 5 g/100 l , 10 g/100 l , 12.5 g/100 l , 25 g/100 l 蛋白質標準液 100 l , 檢體血清稀釋液 100 l , 各準備兩管 , 加入 700 l d₂H₂O , 再加入 200 l 的 Coomassie brilliant blue G-250 reagent , 而 reagent blank 則由 200 l 的 Coomassie brilliant blue G-250 加入 800 l 的 d₂H₂O , 混合均勻 , 在室溫作用 10 分鐘 , 然後以 595nm 波長測 O.D 值 , 再與標準曲線比對 , 計算出所含的蛋白量 (附錄三)。

Estradiol Immunoassay 原理及操作方法

(一) 操作步驟原理：

IMMULITE Estradiol 是使用 solid-phase 的化學冷光免疫分析法，bead 是使用聚苯乙烯為材料，外層覆蓋對 estradiol 有特異性的兔子多株抗體，預測試之血清先和 alkaline phosphatase 與 estradiol 所形成的共軛複合體同時放入 test unit 內，然後 incubated 在 37 斷斷續續地劇烈震動約 60 分鐘，在這段期間內，預測血清內之 estradiol 會與酵素標記過的 estradiol 競爭 bead 上的抗體結合位子，沒有鍵結酵素複合體再利用離心機離心清洗，然後移除掉，加入 substrate test unit 培養要超過 10 分鐘。

Chemiluminescent substrate 是 adamantyl dioxetane 的磷脂質，經由 alkaline phosphatase 酵素水解不斷地產生不穩定的中間產物，因為不斷產生這些中間產物的結果，而導至維持光源不斷地放射，因此能利用它精確的測試，來為一個視窗提供多重的判讀，這些鍵結的複合物因此也產生光子的輸出，再靠著 luminometer 來測量，結果再以相對比例的倒算回去，求出在檢體內 estradiol 的濃度。

(二) 儀器分析操作步驟：

首先把 reagent wedge 插到 reagent carousel tray 上，並且按〔GO〕鍵，開始啟動讀條碼，然後檢查 reagent status screen，假如，所有需

要準備的事，都準備好的話，按〔GO〕鍵則開始分析，轉移預測試血清到至少能容納100 μ l的sample cup內，並且把它插入sample cup holder，再把sample cup Holder 放到loading platform上，然後選擇單項或多項測試。

Leptin Radioimmunoassay 方法

Assay set-up

先排好 Borosilicate glass tube (12×75mm) 並編上號碼，(1) (2) 號管不加 assay buffer，(3) (4) 號 NSB tube 各加入 300 μ l，(5) (6) 號 reference (Bo) tube 各加入 200 μ l，由 (7) 號管各加入 100 μ l，濃度 1ng/ml 的 standard，(11) (12) 號管各加入 100 μ l 2ng/ml 的 standard，(13) (14) 號管各加入 100 μ l 5ng/ml 的 standard，(15) (16) 號管各加入 100 μ l 10ng/ml 的 standard，(17) (18) 號管各加入 100 μ l 20ng/ml 的 standard，(19) (20) 號管各加入 100 μ l 50ng/ml 的 standard，(21) (22) 號管各加入 100 μ l 100ng/ml 的 standard，(23) (24) 號管各加入 100 μ l 的 QC1 reagent，(25) (26) 號管各加入 100 μ l 的 QC2 reagent，由 27 號管開始為 unknown sample 加入 100 μ l 的 sample serum，每個 sample 各做兩支，直到最後檢體由 (1) 號試管開始，每管加入 100 μ l 的 125 I-human leptin 來做 label。除了(1) (2) total count tubes 和 (3) (4) NSB tube 不加外，其餘各管加入 100 μ l 的 human leptin antibody。旋轉振盪，封蓋後，放入 4 incubate (20-24 小時)。

Next Day

除了 total count tubes (1) (2)外，每管各加入 1.0ml 的 cold (4) precipitating reagent。然後旋轉振盪，並且 incubate 在 4 20 分鐘。

除了(1) (2) total count tubes 外，其它各管在 4 , 2,000 3,000xg 轉速離心分離 20 分鐘。除了(1) (2)號 total count tubes 外，其餘各管直接緩緩倒出上清液，使沈澱物盡量排乾液體。然後每管放入 gamma counter 內測試 1 分鐘，紀錄測試值。

統計分析

所有的數據皆以平均值 (mean) \pm S.E 來表示 , 而兩個 Groups 之間的變異比較 , 則用 one-way analysis of variance (ANOVA)。如重覆比較確認分析則採用 by one way repeated measures analysis of variance (RMANOVA) , 固定點與點之間比較則用 post-hoc analysis of Student-Newman-Keuls Method。統計分析則用 : Sigma Stat Software (Jandel Scientific Software, U.S.A)。

實驗結果

本實驗採用卵巢切除的方法，主要目的是用來排除內在 estrogen 的產生，以促使動物的體重上升，再利用 estradiol 的補充的產生作對照，由 Figure 3 顯示，在卵巢切除後 OVX 組 (n = 8) 平均的 estrogen level 是呈逐漸下降的走勢 (附錄四)，EB 供給組 (n = 10) 在實驗過程中，則一直保持較高平均濃度的 estrogen 狀態 (附錄四) 直至第 13 週。而於實驗最後(15 週) estrogen 則下降至極低的狀態，此現象可能是因為 estrogen 補充量未隨老鼠體重的增加而增加所造成的。而 sham-operated 組 (n = 9) (附錄四)，平均 estrogen 濃度的變動，則與老鼠動情期的週期階段有密切的關連 (附錄二)。至於切除卵巢是否真的導致肥胖，由 Figure 4 的數據顯示，OVX 組隨著平均動情素 (estrogen) 的下降 (附錄四)，很明顯的老鼠的體重逐漸的上升 (附錄一)。在卵巢切除手術後第三週，OVX 組老鼠的平均體重已高於 sham-operated (附錄一) 組老鼠的平均體重，此差異在統計上具有顯著性 ($p < 0.05$)，並且隨著時間的增加，平均體重也持續的增大，而呈現明顯的差距 ($p < 0.001$)。補充 EB (附錄一) 那組老鼠的平均體重，很明顯的增加速度較為緩和，而且在整個實驗的過程中，補充 EB 那組老鼠的平均體重與 sham-operated 那組的平均體重很接近。但若測定老鼠飼養 13 週後，所增加的平均體重，則發現有 EB 補充增加的

平均體重，很明顯的低於 sham-operated 那組老鼠的平均體重 $p < 0.001$ (Table 1)。

卵巢切除手術造成平均體重的改變，並且伴隨著血清內瘦身蛋白質 (leptin) 平均濃度的改變，OVX 組 (附錄五) 平均 leptin 的量，初期是呈現逐漸的降低，到了第七週左右下降到幾乎無法測得的濃度 (Figure 5)，而 OVX rats 那組平均 leptin 的量，在第五週到第九週之間，很明顯的低於有 EB (附錄五) 補充那組平均 leptin 的量。隨著實驗的進行，平均 leptin 的量往上提升，到了實驗第 13 週時，雖然其平均濃度與 EB 補充組的平均濃度不相上下，可是此時 OVX 組的平均濃度，已是實驗開始時的四倍，可是在實驗結束時 (第 15 週) 所測得之平均 leptin 濃度，卻掉到極低濃度，此現象與平均 estrogen 濃度的變化很相似，因此可能是因為 estrogen 的濃度，無法維持較高程度，而導致鼠體無法支持 leptin 的分泌所造成的。

EB 的補充，則將因為卵巢的切除，而對 leptin 產生的顯著影響，完全去除，EB 補充組在實驗過程中的各時間點，皆具有較高的平均 leptin 濃度，甚至在第 5,7,9 週，EB 補充組的平均 leptin 濃度，顯著地高於 OVX 組平均的 leptin 濃度 ($p < 0.05$, $p < 0.01$)。儘管 EB 供應這組血清 leptin 的平均濃度比 sham-operated (附錄五) 這組的 leptin 平均濃度高，然而兩組之間並無顯著的差異。

討 論

現今的研究不僅僅是要確認雌鼠在 leptin 產生的調控過程中，estrogen 是否包含在這個過程裏，並且最重要的是要證明去除卵巢後的動物體內的 leptin 濃度，會產生上下波動的變化。在這個實驗過程中，OVX 組老鼠體內 leptin 平均濃度顯示，起初是呈現逐漸的下降，並且是維持在低濃度的狀態直到第九週，這個過程含蓋了 Shimizu 等人的八週實驗（26）及 Yoneda 等人的四週實驗（27），他們兩位都發現雌鼠在卵巢切除後 ob 基因的表現降低，並且隨著老鼠體重的逐漸增加，而伴隨著體內 leptin 量的逐漸下降，這個 ob 蛋白質產量的降低，可能是造成 OVX 組老鼠體重增加的原因，因為 ob 蛋白量的降低，同時也降低對食慾的控制和減少能量消耗的支出，這些都可能與 OVX 組老鼠體重明顯的獲得有所關係，在那同時，血清內 leptin 的濃度也應該有顯著的改變才是，我們推測在卵巢手術後，起初 leptin 的濃度僅有一些的降低，如此要求得明顯統計上的變異，可能就很困難，此外，如何測知 leptin 量的改變，就是體重的改變，到目前為止並不很清楚。

一般人認為人類和老鼠體內 leptin 的濃度與 BMI (body mass index) 是呈正相關的(58-60)，因此，OVX 組老鼠平均 leptin 的濃度，我們預期比其它的 sham-operated 組和 EB estrogen 供應組低，因為

OVX 組的平均體重，很明顯的高於 sham-operated 組與 EB estrogen 供應組。在我們延長實驗中，發現並且證明我們所預期的結果，實驗的後半期 OVX 組 leptin 的量是增加了。但到了第 13 週時，OVX 組平均 leptin 的量，並沒有明顯的與其它兩組各平均 leptin 的量有所不同，僅有 OVX 組平均體重有明顯的增加而已。這個現象可能被解釋為 leptin 的平均濃度與平均體重的增加並無相關，然而 OVX 組其 13 週平均 leptin 的量，是實驗起始時的 4 倍，而其它兩組卻只有在基礎常數上。因此，leptin 量早期的下降，可能是造成以後升高的原因，然而其中所包含的機制，目前並不清楚。至於第 15 週的數據不合理的現象，我們推測應起因於 estrogen 的補充不足，因為整個曲線自第五週開始起，即呈現逐漸下降的趨勢，至實驗結束時，estrogen 的平均濃度已降至極低濃度。而 leptin 的分泌是靠著 estrogen 來促進的，因此第 15 週時，可能因為 estrogen 的快速消耗，使得其無法支持 leptin 的分泌，所以 leptin 的平均濃亦下降。此點亦可驗證 leptin 與 estrogen 之間有密切的關係。一般推測在肥胖的個體所觀察到，較正常體重的個體，有較高 leptin 量，可能是導因於 leptin 抗性產生的結果，而這個抗性的產生，可能是因為 hypothalamous 在接受或傳遞 leptin 的訊息時，敏感度的降低（61, 62），leptin 的傳送調控在穿越 blood-brain-barrier 時，可能是靠著 short leptin receptor isoform 來傳遞

的 (63-50), 因此這個 short leptin receptor isoform 對於 leptin 的敏感性, 可能扮演一個很重要的角色。

在最近 Bennett 等人的研究 (66) 描述老鼠在卵巢切除後兩週, short leptin receptor 在老鼠的腦內表現增加, 相反地, 注射 estrogen 在兩週後, 很明顯地降低 receptor 的轉錄, leptin receptor (short form) 在不同的物理狀況下, 產生不同的表現, 可能改變血清 leptin 的濃度, 就如同我們在這個實驗中所觀察到的, 對於 leptin 訊息敏感性的調控, 雖然如此, 長時間的研究 (>4 個月) 對於卵巢切除誘導肥胖的模式, 在腦內 leptin 如何的傳遞這是需要機制來說明的。

Murakami 等人 (67) 於體外實驗證明, 在 adipocytes 內加入 17- β -estradiol 培養 10 小時後, 會使得 ob mRNA 的表現增加, 顯示 estrogen 對於 ob 基因的表現有直接的影響。對於人類的組織, estrogen 誘導脂肪組織 leptin 的分泌有性別上的差異, 是指在女性組織可以而非男性組織 (68), 另外一些體內的實驗也支持體外所觀察到, 對於老鼠 leptin 的產生, estrogen 扮演著誘導的效應 (26, 27), 而且 leptin 和 estrogen 的濃度在人類體內, 亦有一個正相關的關係。 (26, 28, 29) 在本論文長時間的實驗, EB 組老鼠血清內的 estrogen, 因為借著供應 estrogen 而使得在實驗過程中, 一直維持在高濃度狀態, 而處理後的反應, 在 EB 組老鼠的血清內發現有較高濃度的平均

leptin 量，並且很明顯的導至較低的平均體重，由這個數據顯示，在老鼠體內 estrogen 對於 leptin 的產生是重要的。另一方面，最近在 ovary 內發現 leptin receptor 的存在(69-71)，並且 leptin 對於 ovarian cell 具有直接的影響（69）。證明 leptin 的產生和卵巢的功能上，存在有一個雙向（two-way）的聯繫方式。

Tritos 及 Mantzoros (73)基於動物實驗的模型研究，根據報告調查，人體血清中 leptin 與體重的關係，結果體重越重者血清中 leptin 的濃度愈高，尤其以體脂肪比率與血清中 leptin 的濃度關係更具有正相關性與脂肪的分佈情形無關；由此可發現人類極小部份是因缺乏 leptin 而引起肥胖的，大部份是對 leptin 具有抗性而導致的。故許多科學家進而推論 leptin resistant 發生於何處？歸納為三點：

- 1.post receptor signaling pathway：接受體有缺陷或氧化磷酸化過程出錯而導致無法傳出訊息。

- 2.brain transport system for leptin：當 leptin 進入 CSF 時要經過 BBB 受到阻礙，導致腦部無足夠有效的 leptin，由研究報告統計，就腦脊髓液內與血液內所含 leptin 濃度的比值（CSF leptin / plasma leptin），發現正常人較肥胖者比值高，換言之，肥胖者腦脊髓液中所含的 leptin 濃度相對於血漿中 leptin 而言含量較低。

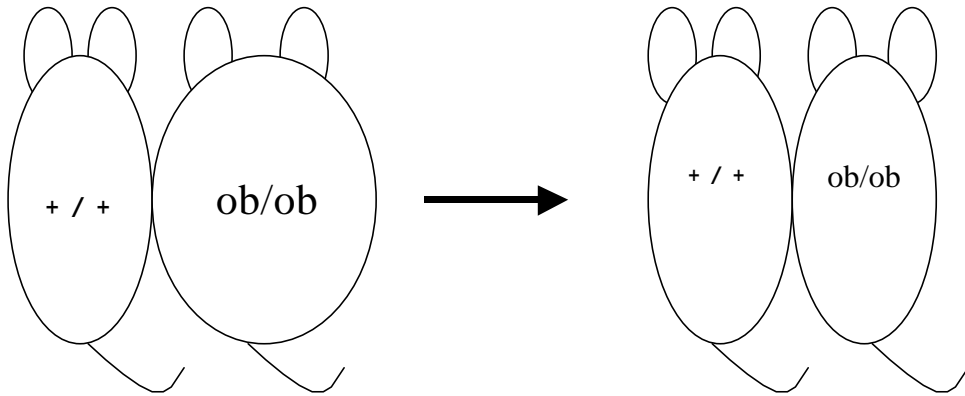
3.缺乏有效的 leptin：研究顯示，胖的人（BMI 平均值為 39）具有較多的 free form leptin，而正常人（BMI 平均值為 23）多為 bound form leptin，故推論 bound form leptin 較具有生物活性。

最後結論，在這 15 週的研究，最重要的發現是證明在切除卵巢後的老鼠，leptin 濃度是呈現雙向的發展，顯示早期平均 leptin 的濃度是逐漸的下降，然後接著升高，到了最後很明顯的高於手術前的平均 leptin 濃度，這個結果提供給我們一個有力的証據，對於可能造成明顯體重上的增加，這一些肥胖的動物，我們預期它有一個高的 leptin 濃度，如果我們給予 estrogen 的補充，是可以排除我們所觀察到的這個現象。

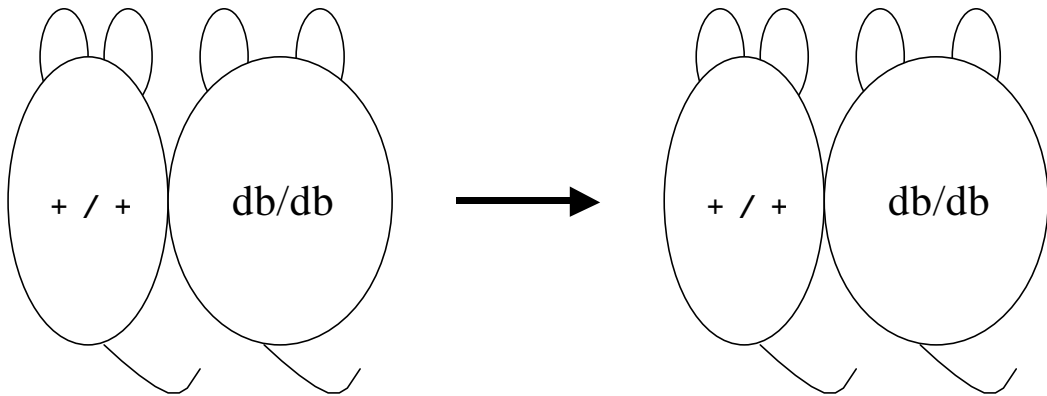
本篇結果已彙整成論文，發表於 Life Science 64: 2299-2306, 1999 (附錄六)。

Figure 1. 並聯共生

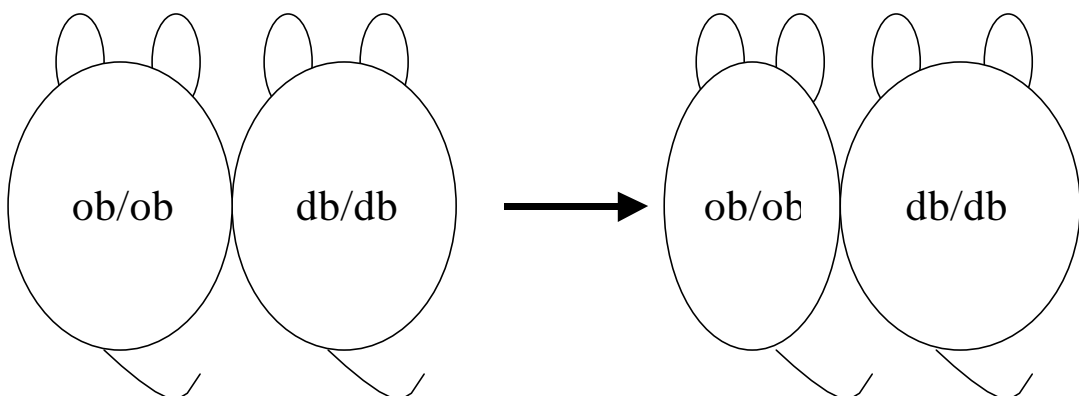
A



B



C



用“並聯共生”技術來推測 ob 及 db 基因的功能

Figure 2. OB-R 基因在 db/db 鼠中突變的機制

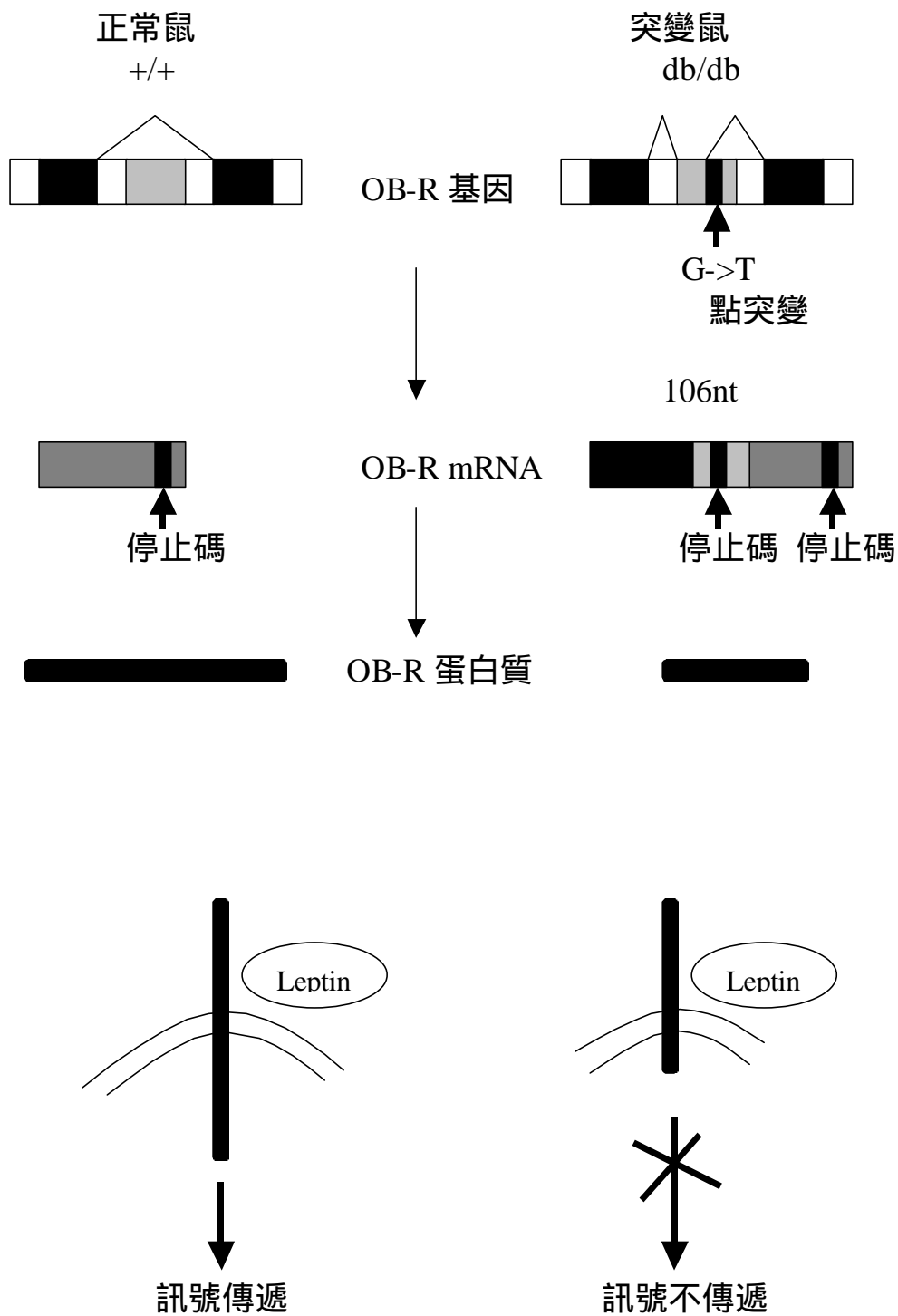


TABLE I

Effect of ovariectomy and EB supplement on the mean body weight and body weight gain.

Group	Body weight at 13 th week(g)	Body weight gain for 13 weeks(g)
Sham (n=9)	287.1 ± 7.9	78.8 ± 5.6
Ovx (n=8)	349.8 ± 7.4 ^a	144.1 ± 8.3 ^a
Ovx+EB (N=10)	273.5 ± 5.8	59.8 ± 3.2 ^b

^ap<0.001 vs. sham-operated and Ovx rats.

^bp<0.001 vs. sham-operated rats.

參考資料

1. Bray, G.A. and York, D.A. (1979) Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. *Physiological Reviews*, 59, 719-809.
2. Friedman, J.M. and Leibel, R.L. (1992) Tracking a weighty problem. *Cell*, 69, 2217-2220.
3. Zhang, Y., Proenca, R., Marten, M., Barone, M., Leopold, D., and Friedman, J.M., (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372, 425-431.
4. Geffroy, S., Vos, P.D., Staels, B., Duban, B., Auwerx, J. and Martinville, B.D. (1995) Localization of the human ob gene (OBS) to chromosome 7q32 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics*, 28, 603-604.
5. Fawzi, A.B., Zhang, H., Van Heek, M. and Graziano, M.P. (1996) Purification of milligram quantities of human leptin from recombinant *E. Coli*. *Hormone Metabolic Research*, 28, 694-697.
6. Halaas, J.L., Gajiwala, K.S., Maffei, M., Cohen, S.L., Chait, B.T., Rabinowitz, D., Lallone R.L., Berley, S.K. and Friedman, J.M., (1995) . Weight-Reducing Effects of the Plasma Protein Encoded by the obese Gene. *Science*, 269, 543-546
7. Taraglia, L.A., Dembski, M., Weng, X., Deng, X., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G.J., Campfield, L.A., Clark, F.T., Deeds, J., Muir, C., Sanker, S., Moriarty, A., Moore, K.J., Smutko. J.S., Mays, G.G., Wolf, E.A., Monroe, C.A. and Tepper, R.I., (1995)

- Identification and expression cloning of a leptin receptor. *OB-R. Cell*, 83, 1263-1271.
8. Campfield, L.A., Smith, E.J., Guisez, J., Devos, R. and Burn, P., (1995) Recombinant Mouse OB Protein ; Evidence for a Peripheral Signal Linking Adiposity and Central Neural Networks. *Science*, 269, 546-549
 9. Gray, G.A. and York, D.A. (1979) Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonoic and endocrine hypothesis. *Physiological Reviews*, 59, 719-809.
 10. Saladin, R., De Vos, P.D., Guerre-Millo, M., Leturgue, A., Girard, J., Staels, B. and Auwerx, J. (1995) Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature*, 337, 527-529.
 11. MacDougald, O.A., Hwang, C.S., Fan, H. and Lane, M.D. (1995) Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 9034-9037.
 12. Pelleymounter M.A., Cullen, M.J., Baker, M.B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T. and Collins, F. (1995) Effects of the obese Gene Product on Body Weight Regulation in ob/ob Mice. *Science*, 269, 540-542.
 13. Chen, H., Charlat, O., Taraglia, L.A., Woolf, E.A., Weng, X., Ellis, S.J., Lakey, N.D., Culpepper, J., Moore, K.J., Breitbart. R.E., Duyk, G.M., Tepper, R.I. and Morgenserm, J.P. (1996) Evidence that the

- diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*, 84, 491-495.
14. Lee, G.H., Proenca, R., Montez, J.M., Carroll, K.M., Darvishzadeh, J.G., Lee, J.I. and Fredman, J.M. (1996) Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*, 379, 632-635.
 15. Chua, Jr. S.C., Chung, W.K., Wu-Peng, X.S., Zhang, Y., Liu, S.M., Taraglia, L.A. and Leibel, R.L. (1996) Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science*, 271, 994-996.
 16. Lee, G.H., Proenca, R., Montez, J.M., Carroll, K.M., Darvishzadeh, J.G., Lee, K.I., and Fredman, J.M. (1996) Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*, 379, 632-635.
 17. Considine, R.V., Considine, E.L., Williams, C.J., Nyce, M.R., Magosin, S.A., Bauer, J.L., Rogato, E.L., Colberg, J. and Care, J.F. (1996) Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med*, 334, 292-295.
 18. Peiris, A., Sothmann, M., Hoffman, R., Wilson, C., Gustafson, A., Hennes, M. and Kisselbach, A., *Ann. (1989) J. Med*, 110, 867-872
 19. Wing, R.R., Matthews, K.A., Kuller, L.H., Meilahn, E.N. and Plantinga, P.L. (1991) Weight gain at the time of menopause. *Intern Med*. 151, 97-102.
 20. Pasquali, R., Asimiri, F., Labate, A.M., Tortelli, O., Pascal, G.,

- Anconetani, B., Gatto, M.R., Flamia, R., Capelli, M. and Barbara, L. (1994) Body weight, fat distribution and the menopausal status in women. The VMH Collaborative Group. *Intern. J. Obes. Rel. Metb. Disor*, 18, 614-621.
21. Lapidus, L., Bengtsson, C., Larsson, B., Pennert, K., Rybo, E. and Sjostrom, L. (1984) Distribution of adipose tissue and risk of cardiovascular disease and death: a 12 year follow up of participants in the population study of women in Gothenburg, Sweden. *BMJ*, 289, 1257-1261.
22. Wing, R.R., Matthews, K.A., Kuller, L.H., Meilahn, E.N. and Plantinga, P. (1991) Waist to hip ratio in middle-aged women. Associations with behavioral and psychosocial factors and with changes in cardiovascular risk factors. *Arterioscler. Thromb*, 11, 1250-1257.
23. Hassager, C. and Christiansen, C. (1989). Estrogen / Gestagen Therapy Change Soft Tissue Body Composition in Postmenopausal Women. *Metabolism*, 38, 662-665.
24. Stampfer, M.J. and Golditz, G.A. (1991) Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: a quantitative assessment of the eipdemiologic evidence. *Prev. Med*, 20, 47-63.
25. Shimomura, Y., Shimizu, H., Kobayashi, I. and Kobayashi, S. (1989) Importance of feeding time in pair-fed, ovariectomized rats. *Phys. And Behav*, 45, 1197-1200.
26. Shimizu, H., Shimomura, Y., Nakanishi, Y., Futawatari, T., Ohtani, K.,

- Sato, N. and Mori M. (1997). Estrogen increases in vivo leptin production in rats and human subjects. *J. Endocrinol*, 154, 285-292.
27. Yoneda, M., Saito, S., Kimura, M., Yamada, M., Iida, M., Murakami, T., Irahara, M., Shima, K. and Aono, T. (1998) The influence of ovariectomy on ob gene expression in rats. *Horm. Metab. Res*, 30, 263-265.
28. Mannucci, E., Ognibene, A., Becorpi, A., Cremasco, F., Pellegrini, S., Ottanelli, S., Rizzello, S.M., Massi, G., Messeri, G. and Rotella, C.M. (1998) Relationship between leptin and oestrogens in healthy women. *Eur. J. Endocrinol*, 139, 198-201.
29. Paolisso, G., Rizzo, M.R., Mone, C.M., Tagliamonte, M.R., Gambardella A., Riondino, M., Carella, C., Varricchio, M. and D' onomo, F. (1998) Plasma sex hormones are significantly associated with plasma leptin concentration in healthy subjects. *Clin. Endocrinol, (Oxf)* 48, 291-297.
30. Frederich, R.C., Hamann, A., Anderson, S., Lollmann, B., Lowell, B.B. and Flier, J.S. (1995) Leptin levels reflect body lipid content in mice : evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nature Med*, 1, 1311-1314.
31. Lonnovist, F., Arner, P., Nordfors, L. and Schalling, M. (1995) Overexpression of the obese (ob) gene in adipose tissue of human obese subjects. *Nature Med*, 1, 950-953.
32. Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R.E., Lee, G.H., Zhang, Y., Fei, H., Kin, S., Lallone, R., Ranganatran, S., Kem, P.A. and

- Friedman, J.M. (1995) Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Med*, 1, 1155-1161.
33. Zhang, Y., Proenca, R., Barone, M., Leopold, L. and Friedman, J.M. (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, (Lond.) 372,425-432.
34. Lee, G.R., Proenca, J.M., Montez, K.M., Carroll, J.G., Darvishzadeh, J.L., and Friedman, J.M. (1996) Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*, (Lond) 379, 632-635.
35. Weigle, D.S., Bukowski, T.R., Foster, D.C., Holderman, S., Kramer, J.M., Lasser, G., Lofton-Day, C.E., Prunkard, D.E., Raymond, C. and Kuijper, J.L. (1995) Recombinant ob protein reduces feeding and body weight in the ob/ob mouse. *J. Clin. Invest*, 96, 2065-2070.
36. Campfield, L.A., Smith, F.J., Gulsez, Y., Devos, R. and Burn, P. (1995) Mouse OB Protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*, (Wash. DC) 269, 546-549.
37. Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Baker, M.B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T. and Collins, F. (1995) Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*, (Wash DC) 269, 540-543.
38. Halaas, J.L., Gajiwala, K.S., Maffel, M., Cohen, S.L., Chait, B.T., Rabinowitz, D., Lallone, R.L., Burley, S.K. and Friedman, J.M.

- (1995) Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*, (Wash DC) 269, 543-546.
39. Wilding, J.P.H., Gilbey, S.G., Bailey, C.J., Batt, R.A.L., Williams, G., Ghatei, M.A. and Bloom, S.R. (1993) Increased neuropeptide-Y messenger ribonucleic acid (mRNA) and decreased neurotensin mRNA in the hypothalamus of the obese (ob/ob)mouse. *Endocrinology*, 132, 1939-1944.
40. Chua, S.C., Brown, A.W., Kim, J., Hennessey, K.L., Leibel, R.L. and Hirsch, J. (1991) Food deprivation and hypothalamic neuropeptide gene expression: effects of strain background and the diabetes mutation. *Mol. Brain. Res*, 11, 291-299.
41. Sanacora, G., ershaw, M.K., Finkelstein, J.A. and White, J.D. (1990) Increased hypothalamic content of preproneuropeptide Y mRNA in genetically obese Zucker rats and its regulation by food deprivation. *Endocrinology*, 127, 730-737.
42. Stephens, T.W., Bashinski, M., Bristow, P.K., Bue-Vallesky, J.M., Burgetti, S.G., Craft, C., Prater, J., Hoffman, J., Huang, H.M., Kriasticinas, A., Mackeltar, W., Rostack, P.R., Schoner, B., Smith. D., Tinarley, F.C., Zhang, X.Y. and Metman, M. (1995) The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature*, (Lond.) 377, 530-534.
43. Schwartz, M.W., Baskin, D.G., Bukowski, T.R., Kuijper, J.L., Foster, D., Lasser, G., Prunkard, D.E., Porte, D., Woods, S.C., Seeley, R.J.

- and Weigle, D.S. (1996) Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes*, 45, 531-535.
44. Schwartz, M.W., Seeley, R.J., Campfield, L.A., Burn, P., Baskin, D. G. (1996) Identification of Targets of Leptin Action in Rat Hypothalamus. *J.Clin Invest*, 98, 1101-1106.
45. Frederich, R.C., Lollmann, B., Hamann, A., Napolitano-Rosen, A., Kahn, B.B., Lowell, B.B. and Flier, J.S. (1995) Expression of OB mRNA and its encoded protein in rodents. *J. Clin. Invest*, 96, 1658-1663.
46. Brady, L.S., Smith, M.A., Gold, P.W. and Herkenham, M. (1990) Altered expression of hypothalamic neuropeptide mRNA in food restricted and food-deprived rats. *Neuroendocrinology*, 52, 441-447.
47. Suemaru, S., Hashimoto, K., Hattori, T., Inoue, H., Kageyama, J. and Ota, Z. (1986) Starvation-induced changes in rat brain corticotropin-releasing factor (CRF) and pituitary-adrenocortical response. *Life Sci*, 39, 1161-1166.
48. Rothwell, N. (1989) Central Effects of CRF on metabolism and energy balance. *Neurosci. Biobehav, Rev*, 14, 263-271.
49. Arase, K., York, D.A., Shimizu, H., Shargil, N.S. and Bray, G.A. (1988) Effects of corticotropin releasing factor on food intake and brown adipose tissue thermogenesis in rats. *Am. J. Physiol*, 255,

E255-259.

50. Tartaglia, L.A. (1997) The leptin receptor. *J Biol Chem*, 272, 6093-6096.
51. Kishimoto, T., Taga, T., Akira, S. (1994) Cytokine signal transduction. *Cell*, 76, 253-262.
52. Tartaglia, L.A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G.J., Campfield, L.A., Clark, F.T., Deeds, J., Muir, C., Sanker, S., Moriarty, A., Moore, K.J., Smutko, J.S., Mays, G.G., Woolf, E.A., Monroe, C.A., Tepper, R.I. (1995) Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*, 83, 1263-1271.
53. Vaisse, C., Halaas, J.L., Horvath, C.M., Damell, J.E., Jr, Stoffel, M., Friedman, J.M. (1996) Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nat Genet*, 14, 95-97.
54. White, D.W., Kuropatwinski, K.K., Devos, R., Baumann, H., Tartaglia, L.A. (1997) Leptin receptor (OB-R) signaling: Cytoplasmic domain mutational analysis and evidence for receptor homo-oligomerization. *J. Biol Chem*, 272, 4065-4071.
55. Banks, W.A., Kastin, A.J., Huang, W., Jaspan, J.B., Maness, L.M. (1996) Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 17, 305-311.

56. Murakami, T., Yamashita, T., Iida, M., Kuwajima, M., Shima, K.
(1997) A short form of leptin receptor performs signal transduction.
Biochem Biophys RES Commun, 231, 26-29.
57. Pamela, A., Bennettp, K.L., Cecilia, K.I., C.A.F. Robinson, L.M.S.,
Carlsson, B.C.(1998) Differential expression and regulation of leptin
receptor isoforms in the rat brain : Effects of fasting and Oestrogen:
Neuroendocrinology; 67, 29-37.
58. Caro, J.F., Sinha, M.K., Kolaczynski, J.W., Zhang, P.L. and
Considine, R.V. (1996) Leptin: The tale of an obesity gene. Diabetes,
45, 1455-1462.
59. Flier, J.S. Proc. (1997) Leptin expression and action: New
experimental paradigms. Proc. Natl. Acad. Sci, 94, 4242-4245.
60. Campfield, L.A., Smith, F.J. and Burn, P. Horm. (1996). The ob
protein (leptin) pathway – A link between adipose tissue mass and
central neural networks. Horm. Metab. Res, 28, 619-632.
61. Caro, J.F., Kolaczynski, J.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P.,
Opentanova, I., Goldman, W.H., Lynn R.R., Zhang, P.L., Sinha, M.K.
and Considine, R.V., (1996) Decreased cerebrospinal-fluid/serum
leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance.
Lancet, 348, 159-161.
62. Schwartz, M.W., Peskind, E., Raskind, M., Boyko, E.J. and Porte, D.
Jr. (1996) Cerebrospinal fluid leptin levels: Relationship to plasma
levels and to adiposity in humans. Nat, Med, 2, 589-593.

63. Golden, P.L., Maccagnan, T.J. and Pardridge, W.M. (1997) Human blood-brain barrier leptin receptor: Binding and endocytosis in isolated human brain microvessels. *J. Clin. Invest*, 99, 14-18.
64. Tartaglia, L.A. (1997). The leptin receptor. *Chem. J. Biol*, 272, 6093-6096.
65. Bjorbaek, C., Elmquist, J.K., Michl, P., Ahima, R.S., Bueren, A., Mccall, A.L. and Flier, J.S., (1998). Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology*, 139, 3485-3491.
66. Bennett, P.A., Lindell, K., Karlsson, C., Robinson I.X., Carlsson L.M. and Carlsson, B. (1998) Differential expression and regulation of leptin receptor isoforms in the rat brain: Effects of fasting and oestrogen. *Neuroendocrinology*, 67, 29-36.
67. Murakami, T., Iida, M. and Shima K. *Biochem.* (1995) Dexamethasone regulates obese expression in isolated rat adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm*, 214, 1260-1267.
68. Casabiell, X., Pineiro, V., Peino R., Lage M., Camina J., Gallego R., Vallejo, L.G., Dieguez, C. and Casanueva, F.F. (1998) Gender differences in both spontaneous and stimulated leptin secretion by human omental adipose tissue in vitro: dexamethasone and estradiol stimulate leptin release in women, but not in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 83, 2149-2155.
69. Karlsson C., Lindell, K., Svensson, E., Bergh, C., Lind, P., Billig, H., Carlsson, L.M. and Carlsson B. (1997) Expression of Functional Leptin Receptors in the Human Ovary. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 82,

4414-4418.

70. Cioffi, J.A., Blerkom, J. Van, A.M., Shafer, A., Wittmer, S. and Snodgrass H.R. (1997) THE expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles. *Mol. Hum. Reprod*, 3, 467-472.
71. Zamorano, P.L., Mahesh V.B., Sevilla, L.M., De, Chorich, L.P., Bhat G.K. and Brann, D.W. (1997) Expression and localization of the leptin receptor and neuroendocrine tissue of the rat. *Neuroendocrinology*, 65, 223-228.
72. Zachow, R.J. and Magoffin, D.A. (1997) Direct intraovarian effects of leptin: impairment of the synergist action of insulin-like growth factor I on follicle-stimulating hormone-dependent estradiol-17 beta production by rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology*, 138, 847-850.

附錄一：

Table 1. 卵巢手術前各組稱重結果

編碼	S 組結果	編碼	O 組結果	編碼	E 組結果
1	200 gm	11	200 gm	23	190 gm
2	200 gm	12	200 gm	24	200 gm
3	200 gm	13	200 gm	25	220 gm
4	200 gm	14	200 gm	26	215 gm
5	200 gm	15	205 gm	27	205 gm
6	210 gm	16	210 gm	28	250 gm
7	200 gm	17	220 gm	29	210 gm
8	210 gm	18	210 gm	30	220 gm
9	230 gm	19	205 gm	31	210 gm
10	225 gm	20	225 gm	32	220 gm
		21	200 gm	33	220 gm
		22	210 gm	34	210 gm

Table 2. 卵巢手術後 Sham 組 15 週體重的變化

編碼	第一週	第二週	第三週	第四週	第五週	第六週	第七週
S-1	218gm	208gm	245gm	260gm	245gm	255gm	260gm
S-2	200gm	209gm	230gm	235gm	235gm	250gm	250gm
S-3	217gm	235gm	260gm	260gm	265gm	275gm	280gm
S-4	208gm	229gm	245gm	260gm	261gm	270gm	275gm
S-5	198gm	215gm	225gm	235gm	240gm	245gm	240gm
S-6	210gm	225gm	250gm	250gm	250gm	255gm	260gm
S-7	197gm	200gm	230gm	230gm	240gm	235gm	235gm
S-8	197gm	199gm	275gm	235gm	240gm	245gm	250gm
S-9	241gm	247gm	280gm	285gm	290gm	295gm	300gm
S-10	230gm	245gm	285gm	280gm	285gm	285gm	295gm

Table 3. 卵巢手術後 Sham 組 15 週體重的變化

編碼	第八週	第九週	第十週	第十週 一	第十週 二	第十週 三	第十週 四	第十週 五
S-1	265gm	260gm	260gm	265gm	274gm	279gm	278gm	282gm
S-2	265gm	255gm	256gm	255gm	257gm	255gm	251gm	256gm
S-3	300gm	298gm	300gm	300gm	285gm	295gm	294gm	285gm
S-4	285gm	285gm	298gm	292gm	292gm	292gm	281gm	289gm
S-5	260gm	250gm	260gm	261gm	264gm	265gm	255gm	252gm
S-6	275gm	272gm	275gm	278gm	270gm	290gm	278gm	275gm
S-7	240gm	250gm	260gm	275gm	245gm	245gm	245gm	238gm
S-8	260gm	265gm	265gm	275gm	270gm	284gm	270gm	285gm
S-9	315gm	315gm	315gm	319gm	315gm	325gm	318gm	300gm
S-10	295gm	310gm	320gm	325gm	318gm	316gm	315gm	310gm

Table 4. 卵巢手術後 O 組 15 週體重的變化

編碼	第一週	第二週	第三週	第四週	第五週	第六週	第七週
O-11	225gm	235gm	270gm	280gm	308gm	325gm	320gm
O-12	228gm	235gm	250gm	255gm	270gm	290gm	297gm
O-13	224gm	255gm	290gm	310gm	325gm	340gm	345gm
O-14	215gm	200gm	270gm	280gm	290gm	300gm	305gm
O-15	221gm	230gm	215gm × (感染)	×	×	×	×
O-16	216gm	260gm	250gm	270gm	276gm	280gm	300gm
O-17	201gm	218gm	290gm	300gm	305gm	305gm	325gm
O-18	201gm	255gm	235gm	235gm	235gm	230gm	240gm
O-19	223gm	260gm	285gm	300gm	305gm	300gm	320gm
O-20	221gm	206gm	275gm	290gm	290gm	290gm	308gm
O-21	202gm	240gm	225gm	230gm	235gm	240gm	255gm
O-22	233gm	gm	245gm	270gm	285gm	305gm	320gm

Table 5. 卵巢手術後 O 組 15 週體重的變化

編碼	第八週	第九週	第十週	第十週 一	第十週 二	第十週 三	第十週 四	第十週 五
O-11	345gm	355gm	355gm	369gm	368gm	380gm	374gm	380gm
O-12	315gm	310gm	310gm	322gm	319gm	326gm	328gm	339gm
O-13	360gm	362gm	365gm	380gm	375gm	385gm	381gm	385gm
O-14	320gm	320gm	318gm	330gm	330gm	340gm	334gm	344gm
O-15	x	x	x	x	x	x	x	x
O-16	320gm	330gm	320gm	340gm	332gm	352gm	330gm	340gm
O-17	325gm	330gm	316gm	335gm	331gm	345gm	326gm	345gm
O-18	255gm	260gm	255gm	270gm	262gm	278gm	256gm	262gm
O-19	330gm	340gm	340gm	358gm	345gm	360gm	350gm	365gm
O-20	315gm	310gm	315gm	335gm	338gm	350gm	335gm	344gm
O-21	270gm	262gm	268gm	261gm	260gm	260gm	250gm	255gm
O-22	335gm	342gm	348gm	364gm	360gm	375gm	367gm	375gm

O-15 卵巢切除手術後第三週感染 (剔除)

Table 6. 卵巢手術後 E 組 15 週體重的變化

編碼	第一週	第二週	第三週	第四週	第五週	第六週	第七週
E-23	193gm	205gm	225gm	230gm	235gm	240gm	242gm
E-24	205gm	216gm	230gm	220gm	225gm	230gm	225gm
E-25	220gm	240gm	240gm	245gm	243gm	245gm	249gm
E-26	212gm	220gm	245gm	245gm	250gm	255gm	255gm
E-27	212gm	219gm	235gm	245gm	230gm	237gm	240gm
E-28	259gm	240gm	260gm	265gm	270gm	278gm	290gm
E-29	205gm	210gm	230gm	235gm	235gm	238gm	250gm
E-30	229gm	238gm	255gm	260gm	265gm	260gm	270gm
E-31	216gm	230gm	250gm	255gm	258gm	255gm	260gm
E-32	204gm	245gm	270gm	280gm	280gm	265gm	280gm
E-33	216gm	231gm	245gm	250gm	255gm	255gm	265gm
E-34	204gm	210gm	240gm	240gm	240gm	248gm	255gm

Table 7. 卵巢手術後 E 組 15 週體重的變化

編碼	第八週	第九週	第十週	第十週 一	第十週 二	第十週 三	第十週 四	第十週 五
E-23	250gm	252gm	255gm	256gm	250gm	260gm	255gm	259gm
E-24	240gm	246gm	250gm	250gm	245gm	249gm	245gm	255gm
E-25	255gm	252gm	245gm	262gm	256gm	260gm	244gm	248gm
E-26	265gm	265gm	265gm	277gm	275gm	280gm	268gm	280gm
E-27	248gm	251gm	245gm	255gm	260gm	260gm	255gm	256gm
E-28	300gm	308gm	300gm	314gm	320gm	326gm	305gm	300gm
E-29	255gm	260gm	255gm	265gm	261gm	265gm	255gm	260gm
E-30	280gm	275gm	265gm	280gm	280gm	290gm	272gm	265gm
E-31	275gm	270gm	270gm	275gm	282gm	282gm	275gm	278gm
E-32	284gm	290gm	282gm	298gm	292gm	301gm	290gm	290gm
E-33	270gm	275gm	267gm	275gm	272gm	270gm	262gm	260gm
E-34	265gm	270gm	280gm	281gm	290gm	292gm	276gm	272gm

Table 8. 老鼠斷頭手術後卵巢組織稱重結果

編碼	S 組結果	編碼	O 組結果	編碼	E 組結果
1	0.82gm	11	0.20gm	23	0.85gm
2	0.58gm	12	0.35gm	24	0.533gm
3	0.89gm	13	0.14gm	25	1.341gm
4	1.96gm	14	0.152gm	26	1.779gm
5	5.794gm	15		27	1.339gm
6	0.75gm	16	0.266gm	28	0.998gm
7	0.58gm	17	0.118gm	29	0.702gm
8	0.84gm	18	0.817gm	30	2.177gm
9	0.73gm	19	0.160gm	31	1.184gm
10	0.59gm	20	0.615gm	32	0.709gm
		21	1.134gm	33	0.815gm
		22	0.351gm	34	0.984gm

S-5 剔除

O-18,O-20,O-21 (卵巢未切除完全)

E-30 (卵巢未切除完全)

附錄二：

Table 1. 卵巢手術前第一次陰道抹片鏡檢結果

編碼	S 組結果	編碼	O 組結果	編碼	E 組結果
1	D	11	E	23	M
2	E	12	D	24	D
3	E	13	P	25	E
4	D	14	D	26	P
5	E	15	D	27	D
6	M	16	E	28	E
7	M	17	P	29	E
8	M	18	D	30	M
9	M	19	E	31	M
10	P	20	P	32	D
		21	P	33	D
		22	P	34	E

Table 2. 卵巢手術前第二次陰道抹片鏡檢結果

編碼	S 組結果	編碼	O 組結果	編碼	E 組結果
1	E	11	M	23	P
2	D	12	P	24	E
3	M	13	P	25	M
4	E	14	E	26	E
5	D	15	E	27	P E
6	D	16	M	28	M
7	P	17	E	29	M
8	M	18	P E	30	P E
9	E	19	P	31	E
10	E	20	P	32	E
		21	M	33	M
		22	D	34	M

* 6 號與 16 號對調調整。

Table 3. 卵巢手術後 S 組陰道抹片結果

編碼	第三週	第五週	第七週	第九週	第十一週	第十三週	第十五週
S-1	P E	P E	M	E	M	E	E
S-2	M	M	P E	M	M	M	E
S-3	M	M	P E	M	M	E	E
S-4	E	D	P E	M	M	E	M
S-5	M	M	E	M	D	E	E
S-6	P E	D	E	M	E	E	M
S-7	E	M	E	M	E	M	E
S-8	E	E	E	D	E	M	M
S-9	D	D	M	M	D	E	M
S-10	M	M	P E	P	D	E	M

附錄三：

Table 1. 卵巢手術前及手術後 S 組蛋白質定量結果

編碼	手術前	第三週	第五週	第七週
S-1	52.30mg/ml			
S-2		47.10mg/ml		43.90mg/ml
S-3	51.80mg/ml		50.40mg/ml	54.00mg/ml
S-4	59.60mg/ml		55.80mg/ml	
S-5		62.30mg/ml		
S-6	59.30mg/ml	64.80mg/ml	60.00mg/ml	58.70mg/ml
S-7	51.30mg/ml		58.70mg/ml	66.90mg/ml
S-8	57.40mg/ml		56.20mg/ml	57.80mg/ml
S-9	61.20mg/ml	63.30mg/ml	65.70mg/ml	63.50mg/ml
S-10		55.50mg/ml		69.30mg/ml

空格為抽血失敗或血清量不足。

Table 2. 卵巢手術前及手術後 S 組蛋白質定量結果

編碼	第九週	第十一週	第十三週	第十五週
S-1	58.20mg/ml	62.20mg/ml		93.30mg/ml
S-2	54.70mg/ml	58.70mg/ml		129.70mg/ml
S-3	55.90mg/ml	68.20mg/ml		118.10mg/ml
S-4		53.70mg/ml	37.60mg/ml	90.00mg/ml
S-5				
S-6	63.40mg/ml	72.80mg/ml	78.40mg/ml	94.90mg/ml
S-7	58.70mg/ml	70.10mg/ml	51.10mg/ml	97.40mg/ml
S-8		84.90mg/ml	56.70mg/ml	107.90mg/ml
S-9	79.50mg/ml	80.70mg/ml	53.40mg/ml	108.10mg/ml
S-10		68.60mg/ml	40.00mg/ml	98.80mg/ml

空格為抽血失敗或血清量不足。

Table 3. 卵巢手術前及手術後 O 組蛋白質定量結果

編碼	手術前	第三週	第五週	第七週
O-1		49.20mg/ml		48.30mg/ml
O-2	58.70mg/ml		52.60mg/ml	54.30mg/ml
O-3	59.40mg/ml	55.80mg/ml	51.20mg/ml	53.90mg/ml
O-4	48.70mg/ml	48.10mg/ml		
O-5	55.50mg/ml			
O-6	53.30mg/ml	58.70mg/ml		
O-7	59.00mg/ml	46.10mg/ml		60.20mg/ml
O-8				
O-9	56.70mg/ml		42.50mg/ml	51.70mg/ml
O-10				
O-11				
O-12	64.30mg/ml	55.30mg/ml	37.80mg/ml	59.30mg/ml

空格為抽血失敗或血清量不足。

Table 4. 卵巢手術前及手術後 O 組蛋白質定量結果

編碼	第九週	第十一週	第十三週	第十五週
O-1	54.40mg/ml		47.20mg/ml	67.80mg/ml
O-2	69.90mg/ml	58.00mg/ml	55.10mg/ml	61.60mg/ml
O-3	66.10mg/ml	67.10mg/ml	70.60mg/ml	78.30mg/ml
O-4	67.70mg/ml			119.10mg/ml
O-5				
O-6		62.10mg/ml	51.80mg/ml	77.50mg/ml
O-7	71.30mg/ml	48.30mg/ml	72.80mg/ml	81.80mg/ml
O-8				
O-9		72.40mg/ml	64.10mg/ml	70.30mg/ml
O-10				
O-11				
O-12	55.50mg/ml	57.10mg/ml	65.30mg/ml	85.50mg/ml

空格為抽血失敗或血清量不足。

Table 5. 卵巢手術前及手術後 E 組蛋白質定量結果

編碼	手術前	第三週	第五週	第七週
E-1				
E-2	58.40mg/ml		51.30mg/ml	
E-3			45.70mg/ml	75.20mg/ml
E-4	56.30mg/ml	58.40mg/ml	55.40mg/ml	65.80mg/ml
E-5		54.20mg/ml	52.90mg/ml	79.90mg/ml
E-6	57.90mg/ml	64.00mg/ml	67.70mg/ml	92.90mg/ml
E-7	70.50mg/ml		73.90mg/ml	73.70mg/ml
E-8				
E-9		60.60mg/ml		69.70mg/ml
E-10	65.80mg/ml		55.00mg/ml	65.80mg/ml
E-11	50.60mg/ml	64.60mg/ml	45.80mg/ml	64.00mg/ml
E-12	43.40mg/ml	43.00mg/ml	53.50mg/ml	48.20mg/ml

空格為抽血失敗或血清量不足。

Table 6. 卵巢手術前及手術後 E 組蛋白質定量結果

編碼	第九週	第十一週	第十三週	第十五週
E-1	82.30mg/ml			93.50mg/ml
E-2	80.30mg/ml	60.70mg/ml	71.80mg/ml	79.00mg/ml
E-3	69.60mg/ml	65.40mg/ml	71.30mg/ml	97.10mg/ml
E-4	74.00mg/ml	49.60mg/ml	75.50mg/ml	97.90mg/ml
E-5	85.40mg/ml			104.40mg/ml
E-6		63.00mg/ml	90.10mg/ml	110.80mg/ml
E-7		72.50mg/ml	87.80mg/ml	103.00mg/ml
E-8				
E-9			67.30mg/ml	102.70mg/ml
E-10			74.70mg/ml	98.20mg/ml
E-11	80.30mg/ml	63.90mg/ml	79.00mg/ml	90.30mg/ml
E-12	63.10mg/ml	66.30mg/ml	78.70mg/ml	90.60mg/ml

空格為抽血失敗或血清量不足。

附錄四:

Table 1. 卵巢手術前及手術後 S 組 Estradiol 定量結果

編碼	手術前	第三週	第五週	第七週
S-1	135.00pg/ml			
S-2		71.40pg/ml		63.40pg/ml
S-3	238.00pg/ml		91.80pg/ml	171.00pg/ml
S-4	73.60pg/ml		76.10pg/ml	
S-5		69.20pg/ml		
S-6	158.00pg/ml	119.00pg/ml	58.10pg/ml	42.50pg/ml
S-7	46.00pg/ml		61.60pg/ml	140.00pg/ml
S-8	35.90pg/ml		29.50pg/ml	49.90pg/ml
S-9	42.40pg/ml	27.00pg/ml	63.90pg/ml	98.00pg/ml
S-10		42.20pg/ml		90.50pg/ml

空格為抽血失敗或血清量不足。

Table 2. 卵巢手術前及手術後 S 組 Estradiol 定量結果

編碼	第九週	第十一週	第十三週	第十五週
S-1	25.00pg/ml	27.40pg/ml		15.00pg/ml
S-2	26.30pg/ml	42.70pg/ml		22.00pg/ml
S-3	72.00pg/ml	142.00pg/ml		25.00pg/ml
S-4		69.80pg/ml	22.90pg/ml	26.80pg/ml
S-5				
S-6	47.30pg/ml	15.00pg/ml	36.40pg/ml	21.70pg/ml
S-7	54.30pg/ml	23.10pg/ml	54.60pg/ml	23.30pg/ml
S-8		22.60pg/ml	24.50pg/ml	15.00pg/ml
S-9	174.00pg/ml	35.80pg/ml	67.70pg/ml	23.50pg/ml
S-10		34.80pg/ml	47.80pg/ml	15.00pg/ml

空格為抽血失敗或血清量不足。

Table 3. 卵巢手術前及手術後 O 組 Estradiol 定量結果

編碼	手術前	第三週	第五週	第七週
O-1		56.00pg/ml		47.00pg/ml
O-2	48.10pg/ml		50.50pg/ml	29.80pg/ml
O-3	124.00pg/ml	46.90pg/ml	35.40pg/ml	61.00pg/ml
O-4	58.90pg/ml	49.60pg/ml		
O-5	41.40pg/ml			
O-6	58.40pg/ml	39.00pg/ml		
O-7	78.10pg/ml	50.90pg/ml		36.40pg/ml
O-8				
O-9	91.00pg/ml		50.80pg/ml	46.30pg/ml
O-10				
O-11				
O-12	64.40pg/ml	65.40pg/ml	22.00pg/ml	47.90pg/ml

空格為抽血失敗或血清量不足。

Table 4. 卵巢手術前及手術後 O 組 Estradiol 定量結果

編碼	第九週	第十一週	第十三週	第十五週
O-1	29.00pg/ml		44.10pg/ml	21.60pg/ml
O-2	26.40pg/ml	36.50pg/ml	35.00pg/ml	15.00pg/ml
O-3	37.70pg/ml	49.90pg/ml	35.70pg/ml	15.00pg/ml
O-4	32.20pg/ml			21.20pg/ml
O-5				
O-6		42.80pg/ml	36.20pg/ml	20.80pg/ml
O-7	39.70pg/ml	34.30pg/ml	20.30pg/ml	26.00pg/ml
O-8				
O-9		40.60pg/ml	60.00pg/ml	15.00pg/ml
O-10				
O-11				
O-12	23.90pg/ml	75.20pg/ml	65.90pg/ml	15.00pg/ml

空格為抽血失敗或血清量不足。

Table 5. 卵巢手術前及手術後 E 組 Estradiol 定量結果

編碼	手術前	第三週	第五週	第七週
E-1				
E-2	50.80pg/ml		70.50pg/ml	
E-3			145.00pg/ml	191.00pg/ml
E-4	76.80pg/ml	66.90pg/ml	32.50pg/ml	114.00pg/ml
E-5		55.30pg/ml	116.00pg/ml	125.00pg/ml
E-6	45.80pg/ml	75.20pg/ml	218.00pg/ml	134.00pg/ml
E-7	191.00pg/ml		243.00pg/ml	214.00pg/ml
E-8				
E-9		96.80pg/ml		139.00pg/ml
E-10	64.70pg/ml		161.00pg/ml	86.70pg/ml
E-11	37.80pg/ml	114.00pg/ml	145.00pg/ml	95.50pg/ml
E-12	95.70pg/ml	72.00pg/ml	30.60pg/ml	15.00pg/ml

空格為抽血失敗或血清量不足。

Table 6. 卵巢手術前及手術後 E 組 Estradiol 定量結果

編碼	第九週	第十一週	第十三週	第十五週
E-1	88.80pg/ml			15.00pg/ml
E-2	43.10pg/ml	84.20pg/ml	52.10pg/ml	15.00pg/ml
E-3	172.00pg/ml	52.80pg/ml	133.00pg/ml	24.90pg/ml
E-4	128.00pg/ml	72.50pg/ml	79.40pg/ml	29.60pg/ml
E-5	173.00pg/ml			15.00pg/ml
E-6		141.00pg/ml	21.80pg/ml	24.60pg/ml
E-7		136.00pg/ml	114.00pg/ml	15.00pg/ml
E-8				
E-9			45.50pg/ml	15.00pg/ml
E-10			107.00pg/ml	15.00pg/ml
E-11	153.00pg/ml	34.00pg/ml	15.00pg/ml	15.00pg/ml
E-12	47.10pg/ml	146.00pg/ml	32.90pg/ml	15.00pg/ml

空格為抽血失敗或血清量不足。

附錄五:

Table 1. 卵巢手術前及手術後 S 組 leptin 定量結果

編碼	手術前	第三週	第五週	第七週
S-1	0.2990ng/ml			
S-2		2.0070ng/ml		0.9500ng/ml
S-3	0.5170ng/ml		0.6400ng/ml	1.3400ng/ml
S-4	0.5340ng/ml		1.3360ng/ml	
S-5				
S-6	1.5370ng/ml	1.0870ng/ml	1.9810ng/ml	0.8490ng/ml
S-7	1.1760ng/ml		2.7130ng/ml	2.3780ng/ml
S-8	0.4740ng/ml		0.9220ng/ml	0.1120ng/ml
S-9	2.2900ng/ml	1.5380ng/ml	2.2140ng/ml	0.6650ng/ml
S-10		0.3820ng/ml		0.1500ng/ml

空格為抽血失敗或血清量不足。

Table 2. 卵巢手術前及手術後 S 組 leptin 定量結果

編碼	第九週	第十一週	第十三週	第十五週
S-1	0.2150ng/ml	0.5910ng/ml		1.1350ng/ml
S-2	0.7240ng/ml	1.5590ng/ml		2.6020ng/ml
S-3	0.4250ng/ml	1.5990ng/ml		1.2190ng/ml
S-4		1.3340ng/ml	0.6500ng/ml	0.8270ng/ml
S-5				0.7310ng/ml
S-6	1.8770ng/ml	9.9060ng/ml	2.1700ng/ml	2.0640ng/ml
S-7	4.7630ng/ml	2.7440ng/ml	1.5050ng/ml	2.7960ng/ml
S-8		1.0980ng/ml	0.8290ng/ml	0.8460ng/ml
S-9	2.5870ng/ml	1.3550ng/ml	1.7420ng/ml	0.5600ng/ml
S-10		1.9810ng/ml	1.4480ng/ml	0.7640ng/ml

空格為抽血失敗或血清量不足。

Table 3. 卵巢手術前及手術後 O 組 leptin 定量結果

編碼	手術前	第三週	第五週	第七週
O-1		0.2100ng/ml		0.0467ng/ml
O-2	0.5650ng/ml		0.4230ng/ml	0.0320ng/ml
O-3	1.3780ng/ml	0.4650ng/ml	1.0200ng/ml	0.1790ng/ml
O-4	0.4810ng/ml	0.2790ng/ml		0.1030ng/ml
O-5	0.4440ng/ml	0.5390ng/ml		
O-6	2.0010ng/ml	0.3340ng/ml		0.9960ng/ml
O-7	0.6690ng/ml		0.2030ng/ml	0.0390ng/ml
O-8	0.1860ng/ml	2.3430ng/ml	0.5170ng/ml	0.1130ng/ml
O-9				
O-10				

空格為抽血失敗或血清量不足。

Table 4. 卵巢手術前及手術後 O 組 leptin 定量結果

編碼	第九週	第十一週	第十三週	第十五週
O-1	0.4150ng/ml		0.8830ng/ml	0.8630ng/ml
O-2	0.1470ng/ml	1.2620ng/ml	0.6230ng/ml	1.3870ng/ml
O-3	1.8570ng/ml		5.7340ng/ml	2.0880ng/ml
O-4	0.1780ng/ml			0.8270ng/ml
O-5	0.2420ng/ml	0.3840ng/ml	3.1310ng/ml	0.7940ng/ml
O-6	0.2900ng/ml	0.3240ng/ml	2.6420ng/ml	1.3950ng/ml
O-7	0.0661ng/ml	1.6790ng/ml	7.2680ng/ml	1.0290ng/ml
O-8	0.3660ng/ml	1.5870ng/ml	1.9900ng/ml	2.3920ng/ml
O-9				
O-10				

空格為抽血失敗或血清量不足。

Table 5. 卵巢手術前及手術後 E 組 leptin 定量結果

編碼	手術前	第三週	第五週	第七週
E-1				
E-2	1.3780ng/ml		1.0840ng/ml	
E-3			2.6750ng/ml	0.9780ng/ml
E-4	0.9470ng/ml	1.3930ng/ml	1.0810ng/ml	2.4010ng/ml
E-5		2.6030ng/ml	1.2030ng/ml	0.5150ng/ml
E-6	1.8380ng/ml	5.4740ng/ml	3.4390ng/ml	1.9560ng/ml
E-7	1.6450ng/ml		3.0030ng/ml	2.1480ng/ml
E-8		2.1380ng/ml		1.3210ng/ml
E-9	0.8390ng/ml		2.2080ng/ml	2.0900ng/ml
E-10	0.9110ng/ml	1.4160ng/ml	2.0420ng/ml	1.9310ng/ml
E-11	0.5540ng/ml	0.2990ng/ml	0.5610ng/ml	0.2860ng/ml

空格為抽血失敗或血清量不足。

Table 6. 卵巢手術前及手術後 E 組 leptin 定量結果

編碼	第九週	第十一週	第十三週	第十五週
E-1	5.0190ng/ml			0.5800ng/ml
E-2	0.4890ng/ml	0.5640ng/ml	0.7240ng/ml	0.1430ng/ml
E-3	6.1870ng/ml	1.8600ng/ml	1.7690ng/ml	0.5930ng/ml
E-4	2.9020ng/ml	4.9450ng/ml	2.0600ng/ml	0.5390ng/ml
E-5	0.7330ng/ml	0.7480ng/ml		1.7020ng/ml
E-6		2.4900ng/ml	2.9480ng/ml	0.7180ng/ml
E-7	2.9010ng/ml	1.6920ng/ml	1.1850ng/ml	0.9250ng/ml
E-8			2.2540ng/ml	0.4160ng/ml
E-9			14.5510ng/ml	3.1200ng/ml
E-10	2.2690ng/ml	1.3180ng/ml	4.2640ng/ml	0.4010ng/ml
E-11	1.5540ng/ml	2.7700ng/ml	1.3490ng/ml	0.2300ng/ml

空格為抽血失敗或血清量不足