

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* *****
* 計 畫
* : 黑蒜乙醇水萃取物對脂肪細胞脂質生合成之影響
* 名 稱
* *****

執行計畫學生： 王貫宇
學生計畫編號： MOST 105-2815-C-040-039-B
研究期間： 105年07月01日至106年02月28日止，計8個月
指導教授： 徐慶琳

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學營養學系（所）

中華民國 106年03月08日

105 年度大專生研究計畫
核定編號：105-2815-C-040-039-B

黑蒜乙醇水萃取物對 3T3-L1 脂肪細胞
脂質生合成之影響

Effects of ethanol-water extracts of black garlic on
adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes

指導教授：徐慶琳 博士 Chin-Lin Hsu, Ph.D.

大專生：王貫宇 Guan-Yu Wang

中華民國一百零六年二月

February, 2017

一、摘要

肥胖為全球關注的公共衛生議題之一，除了體態上的改變外，亦會伴隨著多種代謝性疾病的發生，例如：高血壓、高血脂與第二型糖尿病等。研究指出，經生物技術轉換之黑大蒜具有較高之多酚化合物、類黃酮與含硫化合物之含量，其具改善代謝症候群、降血脂、增強免疫功能與抗癌等作用。本研究將利用黑蒜 0-100% 乙醇水萃取物 (0-100% ethanol-water extract of black garlic, 0-100 EEBG)，探討抗肥胖之潛力。在總多酚含量結果顯示，以 0 EEBG 具最高之總多酚含量。以 0-100 EEBG 處理 3T3-L1 脂肪細胞後，以 20 EEBG 與 60 EEBG 最具降低 3T3-L1 脂肪細胞數目和胞內三酸甘油酯含量之作用。並進一步分析其對甘油三磷酸去氫酶 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase, GPDH) 活性、脂聯素 (adiponectin) 與瘦體素 (leptin) 含量之影響。結果顯示，20 EEBG 具有較佳抑制 GPDH 活性與瘦體素含量，並可顯著提升脂聯素之含量。綜合上述結果，20 EEBG 可顯著抑制 3T3-L1 脂肪細胞脂質生合成之作用。

二、研究動機與研究問題

疾病預防為一重要之世界潮流，如何從生活中，藉由食物攝取獲得天然機能性成分，以達到預防或延緩疾病的效果，是目前醫學相關研究的目標。大蒜 (*Alliums sativum* L.) 為百合科鱗莖植物，在國內為重要的經濟作物，但面臨加入世界貿易組織，開放大蒜進口所造成國內大蒜生產過剩的危機，故本研究以增加大蒜利用價值為出發點，期望能解決大蒜盛產滯銷的問題。大蒜具有多種營養成分，其中富含之硫化合物，為大蒜本身特殊風味與生理活性之來源。已知其具有多種生物活性，包括：抑制癌細胞增生、抗發炎、抗氧化、抗血栓、降血脂與降血糖等作用 (Pittler and Ernst, 2007; Heidarian et al., 2011)。本研究以調整溫濕度之生物轉換技術 (biotransformation) 應用於黑蒜頭 (black garlic) 之生產開發，所生產之黑蒜頭除了改善大蒜原有的特殊風味，亦可提高營養成分 (胺基酸、含硫化合物和多酚化合物) 之含量 (Seo et al., 2009)。Chen 等 (2014) 研究指出，黑蒜甲醇萃取物可透過調控脂質生合成與脂質分解作用路徑，達到抑制高脂飲食所誘導大鼠肥胖症。但是，由於甲醇萃取物應用於保健食品開發上，會有甲醇溶劑殘留之疑慮。因此，本研究構想是擬以不同比例之乙醇與水混合溶劑，進行黑蒜之萃取物製備，並由製備得之黑蒜乙醇水萃取物進行體外 3T3-L1 脂肪細胞在抑制脂質生合成之評估，此研究結果，亦會同時與黑蒜甲醇萃取物進行比較，以釐清黑蒜乙醇水萃取物是否能優於已知之黑蒜甲醇萃取物。預期本研究成果，未來可進一步應用於體內高脂飲食所誘導大鼠肥胖症模式之評估，最終期望能應用於黑蒜保健食品之開發應用。

三、文獻回顧與探討

(一) 大蒜簡介

大蒜，別名葫、葫蒜或獨頭蒜，學名 *Allium sativum* L.，為百合科蔥屬多年草本鱗莖植物，底部鱗瓣所聚合的部位即為蒜球，亦即俗稱的「蒜頭」（徐等，2004）。大蒜的使用上已有數千年的歷史，長久以來被使用作為調味的辛香料，以及藥用的植物。傳統醫學記載，「大蒜，性溫、味辛平；入脾、胃、肺經。行滯氣，暖脾胃，消癥積，解毒，殺蟲，療飲食積滯，脘腹冷痛，水腫脹滿，泄瀉，痢疾，癰疽腫毒，毒蟲咬傷」（周，2005）。在古埃及和希臘等國家，都有記載大蒜被用來治療心臟疾病、腫瘤、發燒、感冒、蚊蟲叮咬與增強體力等作用（Rahman, 2007）。

近年來已有許多文獻探討大蒜之生理活性功能，其被廣泛的應用在許多疾病的預防以及治療上，已知大蒜具有多種生理功能，包括抑菌（Moriyama et al., 2007）、抗疲勞（Moriyama et al., 2007）、降血脂（Gorinstein et al., 2007）、降血壓、抗發炎（Aggarwal and Shishodia, 2004; Liu et al., 2007）、抗氧化（Lee et al., 2009）、抗癌（Pittler and Ernst, 2007）與降血糖（Liu et al., 2007）等作用。文獻指出，攝食大蒜活性成分可抑制多種腫瘤細胞之生長，例如：大腸癌、乳腺癌與前列腺癌（Fleischauer and Arab, 2001; Hsing et al., 2002; Ishikawa et al., 2006; Tanaka et al., 2006; Viry et al., 2011）。Diallyl disulfide (DADS) 與 diallyl sulfide (DAS) 在動物試驗中，具有抑制腫瘤和保護 DNA 損傷（Arunkumar et al., 2006; Nigam and Shukla, 2007）。大蒜具有抑制 streptozocin (STZ) 以及 alloxan 所誘導之糖尿病發生，其抑制作用與大蒜所具有之抗氧化、抗發炎、抗糖基化、增加胰島素分泌以及增加胰島素敏感性等作用有關（Liu et al., 2007）。大蒜對於抑制高血壓的作用上，在臨床試驗中，給予高血壓的病患服用大蒜製劑，可有效的減少收縮壓和舒張壓分別達到 8 和 5 mmHg（Andrianova et al., 2002）。文獻指出，大蒜精油及其含硫化合物 (diallyl disulfide) 具有降低高脂飲食所誘導大鼠之體重增加（Sheen et al., 1999）。在高脂飲食的模式下，給予大鼠 4% 碾碎後的生大蒜，觀察其血漿中總膽固醇、三酸甘油酯、低密度脂蛋白膽固醇、肝臟三酸甘油酯含量以及 phosphatidate phosphohydrolase (促進體內磷脂質和三酸甘油酯合成的酵素) 等皆有明顯降低現象（Heidarian et al., 2011）。給予第二型糖尿病患 300 mg/day 之大蒜粉末為期六週，在總膽固醇、低密度脂蛋白膽固醇以及血壓方面皆有明顯降低（Parastouei et al., 2006）。在動物研究中，給予 500 mg/kg 之大蒜粉末製劑最具明顯效用，因此認為大蒜對於降血脂的效果必須在適當的劑量下才具有顯著效力，否則服用過多可能造成反效果（Gorinstein et al., 2006）。攝食大蒜亦會產生口臭，引起皮膚接觸性過敏、胃灼熱、腸胃不適、抗凝血和藥物交互作用（例如：抗凝血與治療 AIDS 之藥物），雖然大蒜具有這些副作用，但截至目前為止大蒜對於體內相關的實驗上，並不會造成生理失調和嚴重疾病發生（Borrelli et al., 2007）。

黑蒜頭 (black garlic) 最早起源於日本，現今在日本、韓國等地方已被認為是一種具強抗氧化能力以及抗發炎的機能性食品。黑蒜頭是經由不同生物轉換技

術 (biotransformation) 例如：醋酸菌醱酵、蒜氨酸酶及自然醱酵等方式製成。在蕭等 (2008) 研究指出，利用調整溫濕度 (溫度：65-75°C、濕度：40-60%) 進行自然生物轉換 30 天，所製成之黑蒜頭，在抗氧化能力和機能性成分上皆顯著較醋酸菌和蒜氨酸酶等製成方法為高。黑蒜頭除了可改善大蒜原本刺激性臭味的問題，亦可較一般蒜頭增加多酚化合物、類黃酮、植物生物鹼、SOD-like 以及有機硫化合物 (ajoene、DAS、DADA、DATS 和 S-allylcystein) 的含量 (Sato et al., 2006; 蕭等, 2008)。研究指出，將人類胃癌細胞 (AGS) 培養於黑蒜水萃取液中，可顯著提升細胞凋亡蛋白之表現，進而抑制胃癌細胞生長並誘發其細胞凋亡。同樣地，在黑蒜氣仿萃取液和其分離物 5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF) 中，其會顯著抑制 TNF- α 所誘導的 ROS 產生、NF- κ B 活化和細胞黏附分子 (VCAM-1 與 ICAM-1) 的表現。此外，在攝食 5% 黑蒜頭的 db/db mice 體內，發現其具有降低脂質過氧化物以及提升抗氧化酵素能力 (Lee et al., 2009)。在 Seo 等 (2009) 研究指出，給予老鼠 5% 黑蒜頭具有降低血清三酸甘油酯、總膽固醇和提升高密度脂蛋白膽固醇，以及降低血糖和改善胰島素阻抗的能力。Kim 等 (2011) 研究指出，在慢性酒精攝取的大鼠中，給予黑蒜會顯著降低動物體內脂質過氧化物和肝指數 (ALT、AST 和 ALP)，並提升抗氧化酵素活性，進而達到保護肝臟的作用。以上文獻證實，黑蒜頭確實具有較高生物活性成分，因此黑蒜頭比起生大蒜在保健營養上更具開發潛力。

(二) 肥胖簡介

肥胖是二十一世紀社會所面臨的嚴重健康問題，它被認為是全球性的流行病，在世界衛生組織 (World health organization, WHO) 以及食品藥物管理局 (Food and drug administration, FDA) 都將其列為重要的公共衛生議題之一。隨著生活型態的不同，尤其是飲食習慣和社會經濟的改變，肥胖的盛行率已逐年增加，世界衛生組織 (WHO) 在 2008 年的統計資料顯示，目前世界上約有 15 億的成年人人口體重過重，超過十分之一的人口有肥胖的問題，預計 2023 年將有超過 23 億人口會有體重過重的問題 (Mariela and Itamar, 2011)。肥胖不僅是外觀臃腫而已，它被認為是一種慢性疾病之一，其亦是造成代謝症候群、高血壓、心臟病等疾病的主因。肥胖的定義可由多種指標評估，目前已知可由身體質量指數 (body mass index, BMI)、腰圍 (waist circumference)、腰臀比 (waist-to-hip ratio, WHR)、皮層脂肪厚度 (skinfold thickness) 以及生物阻抗 (bioimpedance) 等方法作評估肥胖的標準。根據 WHO 對於肥胖的定義以 BMI 做為標準，BMI 值在 25.0~29.9 kg/m² 為過重，而 BMI 大於 30.0 kg/m² 則為肥胖，或者腰圍絕對值 (男性大於 102 cm，女性大於 88 cm) 都可做為肥胖的診斷標準。

造成肥胖的主要原因是長期體內能量的失衡，導致多餘的能量以三酸甘油酯的形式儲存於脂肪組織，過多的脂肪組織累積在體內因而造成肥胖，其會對人體健康產生負面影響，目前已知其是許多疾病的危害因子。造成熱量攝取及消耗不平衡的原因是錯綜複雜的，例如：遺傳因素、生理因素、心理疾病因素、生活因

素和環境因素等。遺傳因素：肥胖基因會造成肥胖，文獻指出父母皆肥胖，則後代有 80% 機率是肥胖症患者；而體重正常的父母其後代只有 10% 是肥胖症患者 (Kral and Rauh, 2010; Raj and Kumar, 2010)。此外，亦有少數原因會造成肥胖，例如：甲狀腺機能低落、憂鬱症、服用某些類固醇與抗憂鬱藥劑。相較於上述這些因素，生活型態與環境因素才是造成肥胖的主要原因。生活型態與環境因素：因飲食習慣的改變、熱量攝取過多或是熱量消耗不足，都可能是造成肥胖的原因。熱量攝取過多和肥胖的發生率是息息相關的，飲食中如經常攝取高熱量食物，例如：高油脂或含精緻糖等，高熱量的食物，容易造成體內過多的熱量堆積 (Caballero, 2007)。研究指出，肥胖的人除了可能因攝取較高的熱量外，亦可能因活動不足而導致體內能量的消耗過低，造成體內能量過度的累積，最終導致肥胖的發生 (Raj and Kumar, 2010)。肥胖會衍生出許多相關疾病，例如第二型糖尿病、動脈粥狀硬化、心血管疾病、非酒精性脂肪肝、高血壓、高血脂、哮喘、睡眠呼吸中止症與癌症等 (Finer, 2011)。研究指出，肥胖所導致的致死率增加與過高或過低的 BMI 有關，當 BMI 在 21-24 之間因肥胖導致的死亡率最低，然而隨著 BMI 的增加或減少，死亡率都會隨之上升，特別是 BMI 大於 32 以上則會使死亡率加倍 (Pischon et al., 2008)。

(三) 肥胖之預防與控制

肥胖可藉由降低熱量攝取、運動、藥物控制和手術等方式來達到改善。其中飲食控制和運動是最有效且安全的體重控制方式。利用手術方式治療肥胖的風險最大，例如胃腸道改道手術 (bariatric surgery)，因潛藏有併發症發生的風險，故未能廣泛應用於肥胖症患者。在藥物的使用方面 orlistat 為一種胃腸脂酶抑制劑 (gastrointestinal lipase inhibitor)，而 sibutramine 是一種單胺回收抑制劑 (monoamine-reuptake inhibitor)，其會造成血壓與脈搏速率增加的副作用，但由於近年來的研究指出 sibutramine 對心血管疾病患者具有高度風險，故 2010 年 Food and drug administration (FDA) 決定停止使用含有 sibutramine 之藥物 (Mariela and Itamar, 2011)。因此，如能從天然食材獲得具控制肥胖的有效成分，不僅可以降低許多副作用的風險，亦能達到改善肥胖之目的，故利用補充或替代療法的方式來達到肥胖的控制，將是未來保健營養的發展趨勢。

四、研究方法及步驟

(一) 實驗設計

黑蒜不同溶劑萃取物對脂肪細胞脂質生合成之影響

黑蒜不同溶劑比例之乙醇水萃取物製備

0% 乙醇

20% 乙醇

40% 乙醇

60% 乙醇

80% 乙醇

100% 乙醇

甲醇萃取物
(對照組)

總多酚含量測定

3T3-L1脂肪細胞之分化培養

脂肪細胞
油紅染色
分析

胞內三酸
甘油酯含
量分析

甘油-3-磷
酸去氫酶
活性分析

脂聯素
含量分析

瘦體素
含量分析

(二) 材料

黑蒜材料由中州科技大學講座教授兼校長曾慶瀛博士提供，大蒜原料購自雲林地區，本研究所使用之黑蒜是利用調整溫濕度（溫度：60-75°C、濕度：40-60%），進行自然生物轉換技術 (biotransformation) 30 天，進而生產出黑蒜原料，此黑蒜原料再進行冷凍乾燥，即可製成黑蒜粉，供後續之分析使用。

(三) 方法

1. 黑蒜乙醇水萃取物與甲醇萃取物之製備

黑蒜原料經冷凍乾燥並磨成粉末後，取 1g 之黑蒜原料粉末加入 10 mL 的不同乙醇與水溶劑混合比例 (0、20、40、60、80 與 100% 乙醇) 或 100% 甲醇溶劑，用 parafilm 將管壁封好。使用震盪萃取方式於室溫下震盪 24 小時，經由過濾後以減壓濃縮或冷凍乾燥（針對水萃取物）方式，進行濃縮與定量，每一種溶劑進行三重複試驗，並計算萃取率。

2. 總多酚含量測定

取 100 μ L 之不同濃度之黑蒜乙醇水萃取物加入 2 mL Na_2CO_3 (2%) 混合均勻，反應 2 分鐘，加入 100 μ L 50% Folin-Ciocalteu reagent 混合均勻，於室溫下反應 30 分鐘，測試 750 nm 之吸光值，以 gallic acid 作標準曲線，計算樣品總多酚化合物的含量。

3. 3T3-L1 前脂肪細胞

前脂肪細胞株 3T3-L1 (BCRC No. 60159) 購自財團法人食品工業發展研究所，生物資源保存及研究中心 (台灣，新竹)。

4. 3T3-L1 前脂肪細胞之培養

將冷凍保存之 3T3-L1 前脂肪細胞株自液態氮桶取出後，置於 37°C 水浴迅速解凍，將細胞種入 T75 flask 培養盤中，加入適量之培養基【91% Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM 含有 4 mM L-glutamine 與 4.5 g/L glucose) 外加 1.5 g/L sodium bicarbonate、9% bovine calf serum 與 1% antibiotic】，於 37°C、5% 二氧化碳培養箱培養，平均每兩天更換一次培養液。

5. 脂肪細胞之分化培養

3T3-L1 前脂肪細胞以 6 well 之培養盤培養至單層 (monolayer) 後細胞會形成 confluent，而細胞數不會再增加，以顯微鏡觀察時細胞約長至全滿。約兩天後即可加入分化 A 培養基 (分化 A 培養基包括 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine、1 μ M dexamethasone、1 μ M insulin、1.5 g/L sodium bicarbonate、8% fetal bovine serum 與 1% antibiotic 溶於 high glucose DMEM) 培養四天，接著再分別以分化 B 培養基 (1 μ M insulin、1.5 g/L sodium bicarbonate、8% fetal bovine serum 與 1% antibiotic 溶於 high glucose DMEM) 培養四天之後，換回原來之 culture medium (culture medium 包括 1.5 g/L sodium bicarbonate、9% bovine calf serum 與 1% antibiotic 溶於 high glucose DMEM)，分化過程每天更換一次培養液，持續培養至分化第八天，細胞即慢慢分化完成。隨著脂肪細胞的分化，於顯微鏡下觀察，細胞會由紡錘狀變為球狀，細胞內會堆積許多圓亮的脂肪滴，即可做為脂肪細胞實驗使用。

6. 3T3-L1 脂肪細胞油紅 (Oil red O) 染色

經分化培養完成之 3T3-L1 脂肪細胞，以不同溶劑比例之黑蒜乙醇水萃取物處理 48 小時。待加藥處理完成，將細胞培養液移除並以 PBS 清洗兩次，以 10% neutral buffered formalin 固定細胞 20 分鐘以上，倒掉固定液後以 1 mL 之 100% propylene glycol 覆蓋 3 分鐘，再除去 propylene glycol 溶液，並加入 1 mL 之 oil red o 試劑反應 60 分鐘，移除 oil red o 試劑後，加入 60% propylene glycol 溫和攪拌脫色，以 ddH₂O 沖洗後置於 37°C 烘箱乾燥 1 小時。以 100 \times 視野於顯微鏡下進行型態觀察，並以 Charge Coupled Device (CCD) 相機與 Carl Zeiss AxioVision microscopy software 4.9 進行拍照。接著加入 200 μ L 之 isopropanol 至細胞中，利用攪拌器攪拌萃取細胞之染劑，此萃取液經定量後，即可利用分光光度計於 510 nm 波長作測定。OROSM (oil red O stained material) 可作為測定脂肪細胞數目之試驗，其可藉由測定之脂肪細胞染色吸光值，並以控制組細胞染色吸光值，計算出相對脂肪細胞數目。

7. 3T3-L1 脂肪細胞胞內三酸甘油酯含量測定

經分化培養完成之 3T3-L1 脂肪細胞，以不同溶劑比例之黑蒜乙醇水萃提取物處理 48 小時。待加藥處理完成，將細胞培養液移除並以 PBS 清洗兩次，加入 lysis buffer (1% Triton X-100 in PBS) 刮下細胞後，再以超音波破碎細胞，此細胞液即可作為細胞內三酸甘油酯含量分析。胞內三酸甘油酯含量之測定分成三酸甘油酯與蛋白質含量測定兩部分。三酸甘油酯含量部分利用三酸甘油酯測定套組 (TG assay kit, Teco diagnostics, U.S.A.) 進行測定，取 96 well plate 分別加入 2 μ L 之細胞均質液與 200 μ L 之 TG assay kit，將其置於暗室反應 10 分鐘後，於 520 nm 測定其吸光值。樣品吸光值除以標準液吸光值乘上標準液濃度，即可得知樣品中三酸甘油酯濃度。細胞蛋白質含量部分利用 bio-rad protein dye 進行測定，取 96 well plate 分別加入 10 μ L 之細胞均質液與 200 μ L 之 bio-rad protein dye 於暗室反應 15 分鐘後，利用全波長酵素免疫分析儀，於 595 nm 作吸光值測定，另外分別以不同濃度之 bovine serum albumin 所作出之標準曲線，即可進行蛋白質含量之計算。

8. 3T3-L1 脂肪細胞胞內甘油-3-磷酸去氫酶 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase, GPDH) 活性分析

GPDH 酵素在肥胖上扮演重要角色，其會使得甘油-3-磷酸轉換成三酸甘油。GPDH 酵素活性是使用市售 GPDH 活性分析套組 (Cat. No. K640-100, Bio Vision, Milpitas, CA, USA) 進行分析。將分化培養完成之 3T3-L1 脂肪細胞，以最具潛力之黑蒜乙醇水萃提取物處理 48 小時，待加藥處理完成，將脂肪細胞培養液移除，並以 PBS 清洗兩次，加入冰的 GPDH assay buffer 刮下細胞後，置入離心機 (12000 g、5 分鐘、4°C) 離心，收集上清液部分。取 96 well plate 分別加入 50 μ L 上清液【或 reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) standard】和 50 μ L 混合反應試劑 (GPDH assay buffer、GPDH probe 和 GPDH substrate)，利用分光光度計 (microplate reader) 測定 37°C、0-30 分鐘間 (間隔 2 分鐘測一次) 之 450 nm 吸光值，標準品以其相對吸光值所做之標準曲線，換算樣品中 NADH 產生量，再依下列公式計算甘油-3-磷酸去氫酶酵素活性。

甘油-3-磷酸去氫酶 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase, GPDH) 活性 (mU/mL) = NADH 產生量 \div ($\Delta T \times$ 反應體積) \times 樣品稀釋倍數。 ΔT 為兩個時間點差。

9. 3T3-L1 脂肪細胞之脂聯素 (adiponectin) 含量分析

經分化培養完成之 3T3-L1 脂肪細胞，以最具潛力之黑蒜乙醇水萃提取物處理 48 小時，待加藥處理完成，取細胞培養液作為脂肪細胞之脂聯素 (adiponectin) 含量分析。測定 adiponectin 含量使用市售分析套組 (mouse Adiponectin/Acrp30 Quantikine ELISA Kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 進行分析。首先取 96 well plate 於每孔當中加入 100 μ L 已知濃度之標準品或稀釋之細胞培養液，置

於 37°C 下反應 90 分鐘後，將細胞培養液移除，每孔加入 100 µL Biotinylated detection Ab 於 37°C 下反應 60 分鐘後移除液體，每孔加入 300 µL wash buffer 清洗三次，每孔加入 100 µL concentrated HRP conjugate，置於 37°C 下反應 30 分鐘後移除液體，每孔加入 300 µL wash buffer 清洗五次，每孔加入 90 µL substrate reagent 於 37°C 下，反應 15 分鐘。於避光之環境下每孔加入 50 µL stop solution 終止反應，利用分光光度計 (microplate reader) 測定 450 nm 吸光值，標準品以其相對吸光值所做之標準曲線，換算細胞培養液中 adiponectin 含量。

10. 3T3-L1 脂肪細胞瘦體素 (leptin) 含量分析

經分化培養完成之 3T3-L1 脂肪細胞，以最具潛力之黑蒜乙醇水萃取物處理 48 小時。待加藥處理完成，取細胞培養液作為脂肪細胞之瘦體素 (leptin) 含量分析。測定 leptin 含量使用市售分析套組 (mouse leptin ELISA Kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 進行分析。首先取 96 well plate 於每孔當中加入 100 µL 已知濃度之標準品或稀釋之細胞培養液，置於 37°C 下反應 90 分鐘後，將細胞培養液移除，每孔加入 100 µL biotinylated detection Ab 於 37°C 下反應 60 分鐘後移除液體，每孔加入 300 µL wash buffer 清洗三次，每孔加入 100 µL concentrated HRP conjugate，置於 37°C 下反應 30 分鐘後移除液體，每孔加入 300 µL wash buffer 清洗五次，每孔加入 90 µL substrate reagent 於 37°C 下，反應 15 分鐘。於避光之環境下每孔加入 50 µL stop solution 終止反應，利用分光光度計 (microplate reader) 測定 450 nm 吸光值，標準品以其相對吸光值所做之標準曲線，換算細胞培養液中 leptin 含量。

11. 統計分析

實驗數據使用 SPSS 電腦統計軟體進行分析。變異數分析則以 PROC ANOVA 與 Duncan's multiple range test 進行分析， $p < 0.05$ 為具有顯著性差異。

五、研究結果

第一部分 黑蒜萃取與基本組成成分分析

(一) 黑蒜 0-100% 乙醇水萃取物和甲醇萃取物之萃取率和總多酚含量分析

表 1 為黑蒜 0-100% 乙醇水萃取物 (0-100% ethanol-water extract of black garlic, 0-100 EEBG) 和甲醇萃取物之萃取率和總多酚含量分析。本實驗將黑蒜經冷凍乾燥後搗碎成粉末以不同比例之乙醇 (ethanol) 與去離子水 (0%、20%、40%、60%、80% 和 100%) 進行萃取，同時以 100% 甲醇萃取作為對照組。將其分別定義：黑蒜 0% 乙醇萃取物即為黑蒜 100% 水萃取物 [0% ethanol-water extract of black garlic (100% water extract of black garlic, 0 EEBG)]；黑蒜 20% 乙醇水萃取物 (20% ethanol-water extract of black garlic, 20 EEBG)；黑蒜 40% 乙醇水萃取物 (40% ethanol-water extract of black garlic, 40 EEBG)；黑蒜 60% 乙醇水萃取物 (60%

ethanol-water extract of black garlic, 60 EEBG)；黑蒜 80% 乙醇水萃取物 (80% ethanol-water extract of black garlic, 80 EEBG)；黑蒜 100% 乙醇萃取物 (100% ethanol extract of black garlic, 100 EEBG)；黑蒜 100% 甲醇萃取物 (100% methanol extract of black garlic, 100 MEBG)。由結果得知，0 EEBG、20 EEBG、40 EEBG、60 EEBG、80 EEBG、100 EEBG 和 100 MEBG 之萃取率分別為 67.65%、71.83%、59.66%、40.36%、62.20%、28.01% 和 52.42%。0 EEBG、20 EEBG、40 EEBG、60 EEBG、80 EEBG、100 EEBG 和 100 MEBG 之總多酚含量分別為 176.93、139.15、146.66、124.48、132.64、53.67 和 91.00 mg/g extract。

第二部分 以細胞模式評估黑蒜乙醇水萃取物之抗肥胖潛力

(一) 黑蒜 0-100% 乙醇水萃取物和甲醇萃取物對 3T3-L1 脂肪細胞油紅染色之影響

表 2 與圖 1 為黑蒜 0-100% 乙醇水萃取物和甲醇萃取物對 3T3-L1 脂肪細胞油紅染色之影響。本實驗利用分化成熟之脂肪細胞以不同濃度 (0、10、25、50、100 和 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 之黑蒜乙醇水萃取物處理 48 小時後，以 oil red O solution 進行染色，於顯微鏡下觀察 3T3-L1 脂肪細胞油紅染色情形。並以異丙醇 (isopropanol) 回溶被油滴吸附之染劑進行定量，以 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作為控制組，定義為 100%。由結果得知 0 EEBG (10 與 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、20 EEBG (50、100 與 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、40 EEBG (10 與 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、60 EEBG (10 與 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、100 EEBG (10 與 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和 100 MEBG (10、25、50 與 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 等皆可顯著降低 3T3-L1 脂肪細胞之數目 ($p < 0.05$)。

(二) 黑蒜 0-100% 乙醇水萃取物和甲醇萃取物對 3T3-L1 脂肪細胞胞內三酸甘油酯之影響

表 3 為黑蒜 0-100% 乙醇水萃取物和甲醇萃取物對 3T3-L1 脂肪細胞胞內三酸甘油酯之影響。本實驗利用分化成熟之脂肪細胞以不同濃度 (0、10、25、50、100 和 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 之黑蒜 0-100% 乙醇水萃取物和甲醇萃取物處理 48 小時後，測定 3T3-L1 脂肪細胞內三酸甘油酯含量，以 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作為控制組，定義為 100%。由結果得知，20 EEBG (10、25、50、100 與 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、40 EEBG (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、60 EEBG (10、25、50、100 與 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、80 EEBG (10、25 與 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、100 EEBG (10 與 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 與 100 MEBG (25、50、100 與 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 等皆可顯著降低 3T3-L1 脂肪細胞之胞內三酸甘油酯含量 ($p < 0.05$)。綜合上述實驗結果得知，黑蒜 20% 乙醇水萃取物 (20 EEBG) 與 60% 乙醇水萃取物 (60 EEBG) 具有最佳抑制脂肪細胞數目及脂肪細胞胞內三酸甘油酯含量之作用。因此，本實驗後續將挑選 20 EEBG 與 60 EEBG 作為探討脂肪合成酵素 (GPDH 活性) 與脂肪細胞激素影響之潛力樣品。

(三) 黑蒜 20%和 60%乙醇水萃取物對 3T3-L1 脂肪細胞中甘油三磷酸去氫酶活性之影響

表 4 為黑蒜 20%和 60%乙醇水萃取物對 3T3-L1 脂肪細胞中甘油三磷酸去氫酶活性之影響。本實驗利用分化成熟之脂肪細胞以不同濃度 (0、10、25、50、100 和 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 之黑蒜 20%與 60%乙醇水萃取物處理 48 小時後，測定 3T3-L1 脂肪細胞中甘油三磷酸去氫酶活性，以 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作為控制組，定義為 100%。由結果得知，黑蒜 20%乙醇水萃取物 (20 EEBG)(25、50、100 與 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 與 60%乙醇水萃取物 (60 EEBG)(10、100 與 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，可顯著降低 3T3-L1 脂肪細胞中甘油三磷酸去氫酶的活性 ($p<0.05$)。

(四) 黑蒜 20%和 60%乙醇水萃取物對 3T3-L1 脂肪細胞中脂聯素含量之分析

表 5 為黑蒜 20%和 60%乙醇水萃取物對 3T3-L1 脂肪細胞中脂聯素含量之分析。本實驗利用分化成熟之脂肪細胞以不同濃度 (0、10、25、50、100 與 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 之黑蒜 20%與 60%乙醇水萃取物處理 48 小時後，測定 3T3-L1 脂肪細胞中脂聯素的含量，以 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作為控制組，定義為 100%。由結果得知，黑蒜 20%乙醇水萃取物 (20 EEBG)(10 與 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 可顯著增加 3T3-L1 脂肪細胞中脂聯素之含量 ($p<0.05$)。而黑蒜 60%乙醇水萃取物 (60 EEBG) 對 3T3-L1 脂肪細胞中脂聯素之含量，並無提升之作用。

(五) 黑蒜 20%和 60%乙醇水萃取物對 3T3-L1 脂肪細胞中瘦體素含量之分析

表 6 為黑蒜 20%和 60%乙醇水萃取物對 3T3-L1 脂肪細胞中瘦體素含量之分析。本實驗利用分化成熟之脂肪細胞以不同濃度 (0、10、25、50、100 和 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 之黑蒜 20%與 60%乙醇水萃取物處理 48 小時後，測定 3T3-L1 脂肪細胞中瘦體素的含量，以 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作為控制組，定義為 100%。由結果得知，黑蒜 20%乙醇水萃取物 (20 EEBG)(10、25、50、100 與 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 與黑蒜 60%乙醇水萃取物 (60 EEBG)(50、100 與 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 皆可顯著降低 3T3-L1 脂肪細胞中瘦體素之含量 ($p<0.05$)。

六、討論

第一部分 黑蒜乙醇水萃取率與基本組成成分分析

本研究將黑蒜以 0-100% 乙醇水與 100% 甲醇進行萃取，其萃取率在 0 EEBG、20 EEBG、40 EEBG、60 EEBG、80 EEBG、100 EEBG 和 100 MEBG，分別為 67.65%、71.83%、59.66%、40.36%、62.20%、28.01% 和 52.42%。在本實驗室過去之研究，將黑蒜以水、甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯和正己烷進行萃取，其萃取率分別為 58.39%、56.36%、33.95%、1.94%、0.52% 和 0.19% (張，2011)，此結果中乙醇溶劑的萃取率均低於水和甲醇溶劑的萃取率，與本實驗之結果相似。黑蒜 20% 乙醇水萃取物 (20 EEBG) 的萃取率最高 (71.83%)，而 100% 乙醇萃取物 (100 EEBG)

的萃取率最低 (28.01%)(表1)。進一步換算黑蒜中總多酚含量【黑蒜總多酚 (mg/g sample) = 黑蒜萃取物總多酚 (mg/extract) × 萃取率 (%)】，結果得知黑蒜 0-100% 乙醇水與 100% 甲醇萃取物推算回黑蒜總多酚含量分別有 119.69、99.95、87.50、50.24、82.50、15.03 和 47.71 mg/g sample。其中黑蒜 100% 乙醇萃取物 (100 EEBG) 在萃取率與總多酚含量都是最低的。Wang 等 (2011) 的研究中，將石榴皮分別以甲醇、水、乙醇、丙酮與乙酸乙酯進行萃取，並測其總多酚含量。結果顯示，石榴皮乙醇萃取物在萃取率與總多酚含量上，相較於甲醇和水萃取物皆較低。

第二部分 以細胞模式評估黑蒜萃取物之抗肥胖潛力

肥胖的盛行率在全世界不斷的攀升，世界衛生組織 (World health organization, WHO) 將其定義為一種全球的流行病 (Zhang et al., 2012)。此外，肥胖亦是罹患代謝症候群、糖尿病、心血管疾病與癌症等疾病發生之危險因子 (Weisberg et al., 2003; Meigs et al., 2006)。在先前的研究中指出，黑蒜水萃取物能夠抑制 3T3-L1 脂肪細胞分化並降低油滴數目 (Park et al., 2011)。張 (2011) 研究指出，黑蒜甲醇萃取物具抑制 3T3-L1 脂肪細胞之脂質生合成作用，此外，Chen 等 (2014) 研究亦指出，黑蒜甲醇萃取物可透過調控脂質生合成與脂質分解作用路徑，達到抑制高脂飲食誘導大鼠之肥胖症。因此，本試驗將以黑蒜甲醇萃取物作為對照組，進行黑蒜不同比例乙醇水萃取物之體外抗肥胖潛力篩選評估。

過去的研究指出，黑蒜中所含之主要活性成分 thiacremonon 或 diallyl trisulphide，在體外 3T3-L1 脂肪細胞之油紅染色試驗顯示，皆具有降低脂肪細胞數目之作用 (Kim et al., 2012; Chang et al., 2015)。本實驗油紅染色分析結果得知，0 EEBG (10 與 50 μg/mL)、20 EEBG (50、100 與 250 μg/mL)、40 EEBG (10 與 50 μg/mL)、60 EEBG (10 與 50 μg/mL)、100 EEBG (10 與 25 μg/mL)、100 MEBG (10、25、50 與 250 μg/mL) 可顯著降低 3T3-L1 脂肪細胞數目 ($p < 0.05$)(表 2)。Chang 等 (2015) 研究指出，大蒜之主要活性成分二烯丙基三硫化物 (diallyl trisulphide) 可顯著抑制 3T3-L1 脂肪細胞胞內三酸甘油酯之含量。本實驗結果得知，20 EEBG (10、25、50、100 與 250 μg/mL)、40 EEBG (10 μg/mL)、60 EEBG (10、25、50、100 與 250 μg/mL)、80 EEBG (10、25 與 50 μg/mL)、100 EEBG (10 與 100 μg/mL) 與 100 MEBG (25、50、100 與 250 μg/mL) 可顯著降低 3T3-L1 脂肪細胞之胞內三酸甘油酯之含量 ($p < 0.05$)(表 3)。因此，由上述結果顯示，20 EEBG 和 60 EEBG 在降低 3T3-L1 脂肪細胞胞內三酸甘油酯含量上，相對於其它組別具有較佳之抑制效果；在脂肪細胞數目結果顯示，20 EEBG 具有最佳之抑制脂肪細胞數目。因此，在本試驗後續將挑選 20 EEBG 與 60 EEBG，進一步分析脂肪細胞中甘油三磷酸去氫酶活性和脂肪細胞激素之含量影響。

甘油三磷酸去氫酶 (glycerol 3-phosphate dehydrogenase, GPDH) 為促進三酸

甘油酯生成的重要酵素 (Muhlhausler et al., 2010)。Swierczynski等 (2003) 研究亦指出，脂肪細胞中GPDH活性的增加，會促使體內甘油三磷酸合成增加，進而造成三酸甘油酯堆積於脂肪組織最終造成肥胖。因此，抑制GPDH活性亦可作為減少脂肪細胞分化與脂質堆積之有效手段之一 (Kim et al., 2012)。本研究結果顯示，20 EEBG處理3T3-L1脂肪細胞後，可顯著抑制脂肪細胞胞內GPDH之活性 (表4)。然而，以60 EEBG處理3T3-L1脂肪細胞後，則無抑制脂肪細胞胞內GPDH活性之作用。

Adiponectin是脂肪組織內含量豐富的蛋白質。研究指出，adiponectin具有抗發炎、改善胰島素阻抗、抗糖尿病與抗粥樣動脈硬化等特性。肥胖與胰島素阻抗患者，其血漿中adiponectin的含量較低，減重或投與藥物治療後，會增加血漿中adiponectin的含量，進而改善胰島素阻抗等作用 (Brochu-Gaudreau et al., 2010; Matsuzawa, 2010; Cui et al., 2011)。蒜頭是一種有機含硫化合物的天然來源，其中的含硫成分，例如：diallyl disulfide、diallyl trisulfide和S-allyl cysteine已經被證實可做為調節hydrogen sulfide濃度的作用 (Gu et al., 2011)。文獻指出，血中hydrogen sulfide的含量和adiponectin的含量呈顯著之正相關 (Jain et al., 2012)。故適度提升體內adiponectin的分泌對人體之健康具有益處。本研究顯示，20 EEBG (10和25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 具顯著增加3T3-L1脂肪細胞中脂聯素的含量，而60 EEBG則並無提升3T3-L1脂肪細胞中脂聯素之含量。瘦體素 (leptin) 具有抑制食慾、促進異化代謝與抑制脂質生合成路徑的功能，並扮演調控人體能量代謝的重要激素 (Jung et al., 2013)。體內瘦體素之含量與全身總脂肪量之多寡呈正相關 (Macciò et al., 2010)。研究指出，肥胖患者相對於體重正常之受試者，體內瘦體素之濃度會顯著增加 (Bełtowski, 2012)。而當肥胖患者體內長期處於高胰島素下，會誘使其發展為高瘦體素血症 (hyperleptinemia)，進而使細胞對瘦體素產生負調節反應與瘦體素阻抗之發生 (Knight et al., 2010)。在本研究結果顯示，20 EEBG (10、25、50、100與250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 與60 EEBG (50、100與250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 可顯著降低3T3-L1脂肪細胞中瘦體素之含量。由第二部分討論得知，20 EEBG相較於60 EEBG具較佳抑制甘油三磷酸去氫酶和瘦體素之含量，並可顯著提升脂聯素之含量。因此，20 EEBG具較佳之抑制脂質生合成與抗肥胖之潛力，將來可以20 EEBG進行動物實驗，評估黑蒜在體內動物實驗的抗肥胖潛力。

七、總結論

綜合上述討論，由黑蒜 0-100% 乙醇水萃取物與 100% 甲醇萃取物中，挑選出黑蒜 20% 乙醇水萃取物 (20 EEBG) 具有最佳抑制 3T3-L1 脂肪細胞數目、胞內三酸甘油酯之含量、GPDH 酵素活性與瘦體素之含量。此外，20EEBG 亦可顯著

提升 3T3-L1 脂肪細胞中脂聯素之含量。因此，20%黑蒜乙醇水萃取物 (20EEBG) 具顯著抑制體外細胞之脂質生合成作用，未來可進一步利用體內動物試驗探討其抗肥胖之作用潛力。

表 1、黑蒜 0-100% 乙醇水萃取物和甲醇萃取物之萃取率和總多酚含量分析

Table 1. The extraction yields and total polyphenolic contents of 0-100% ethanol-water extracts and 100% methanol extract of black garlic

Black garlic extracts	0 EEBG	20 EEBG	40 EEBG	60 EEBG	80 EEBG	100 EEBG	100 MEBG
Extraction yields (%)	67.65±2.08 ^{ab}	71.83±3.16 ^a	59.66±2.40 ^{bc}	40.36±8.55 ^d	62.20±6.74 ^b	28.01±1.98 ^e	52.42±1.78 ^c
Total polyphenolics (mg/g extract)	176.93±6.12 ^a	139.15±4.24 ^c	146.66±0.43 ^b	124.48±4.16 ^e	132.64±1.44 ^d	53.67±0.47 ^g	91.00±0.96 ^f

The reported values are the mean ± SD (n=3). Mean values with different letters were significantly different ($p < 0.05$). 0% ethanol-water extract of black garlic (100% water extract of black garlic), 0 EEBG; 20% ethanol-water extract of black garlic, 20 EEBG; 40% ethanol-water extract of black garlic, 40 EEBG; 60% ethanol-water extract of black garlic, 60 EEBG; 80% ethanol-water extract of black garlic, 80 EEBG; 100% ethanol extract of black garlic, 100 EEBG; 100% methanol extract of black garlic, 100 MEBG.

表 2、黑蒜 0-100% 乙醇水萃取物和甲醇萃取物對 3T3-L1 脂肪細胞油紅染色之影響

Table 2. Effects of 0-100% ethanol-water extracts and 100% methanol extract of black garlic on oil red O stained material (OROSM) in 3T3-L1 adipocytes

OROSM (% of control)	Black garlic extracts ($\mu\text{g/mL}$)					
	0	10	25	50	100	250
0 EEBG	100.00 \pm 0.53 ^d	93.42 \pm 0.82 ^f	104.89 \pm 1.44 ^c	97.45 \pm 0.54 ^e	107.89 \pm 0.53 ^b	109.71 \pm 0.00 ^a
20 EEBG	100.00 \pm 0.56 ^b	103.57 \pm 1.47 ^a	102.99 \pm 0.00 ^a	81.43 \pm 0.65 ^d	84.71 \pm 0.57 ^c	85.20 \pm 0.73 ^c
40 EEBG	100.00 \pm 0.35 ^{bc}	96.52 \pm 0.18 ^d	99.54 \pm 0.23 ^{bc}	98.32 \pm 1.09 ^{cd}	100.83 \pm 0.76 ^b	118.61 \pm 2.17 ^a
60 EEBG	100.00 \pm 1.48 ^b	89.06 \pm 0.62 ^d	99.39 \pm 1.34 ^b	93.64 \pm 1.34 ^c	104.30 \pm 0.00 ^a	105.60 \pm 0.00 ^a
80 EEBG	100.00 \pm 1.07 ^c	101.70 \pm 0.60 ^d	98.46 \pm 0.74 ^e	107.51 \pm 1.29 ^b	109.72 \pm 0.45 ^a	105.13 \pm 0.99 ^c
100 EEBG	100.00 \pm 0.89 ^c	93.31 \pm 1.08 ^d	94.21 \pm 1.36 ^d	102.84 \pm 0.25 ^b	110.68 \pm 1.56 ^a	102.05 \pm 0.62 ^b
100 MEBG	100.00 \pm 1.14 ^a	93.09 \pm 0.48 ^c	94.80 \pm 0.64 ^b	91.70 \pm 1.03 ^c	99.62 \pm 0.67 ^a	95.28 \pm 0.98 ^b

3T3-L1 adipocytes were incubated with 0, 10, 25, 50, 100, and 250 $\mu\text{g/mL}$ of 0-100% ethanol-water extracts and 100% methanol extract of black garlic for 48h at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator. The reported values are the mean \pm SD (n=3). Mean values with different letters were significantly different ($p < 0.05$). Percentage (%) is expressed as control at 100%.

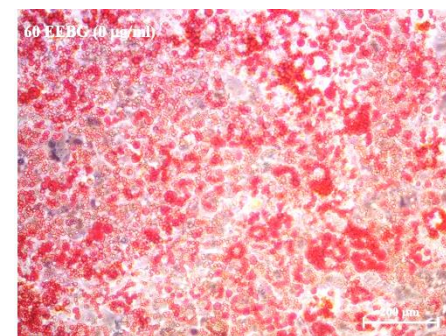
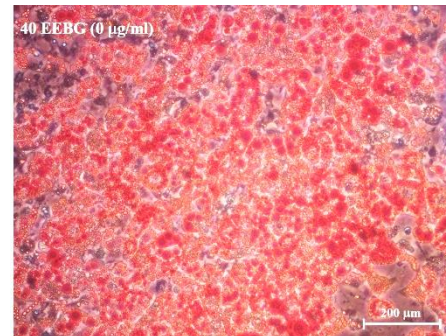
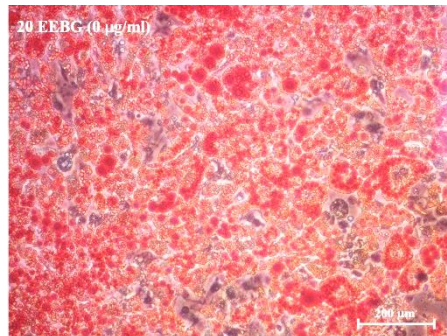
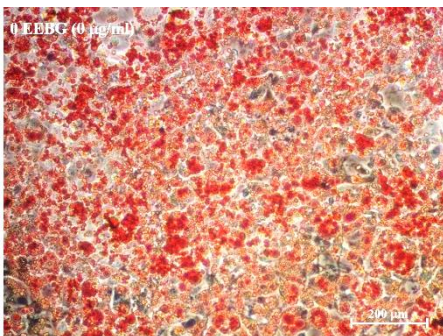
0 EEBG

20 EEBG

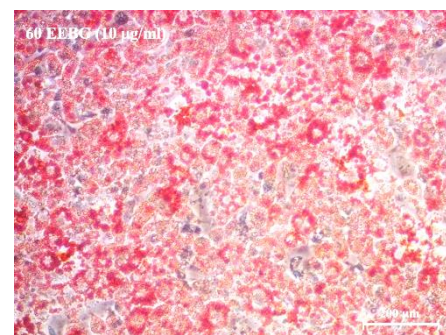
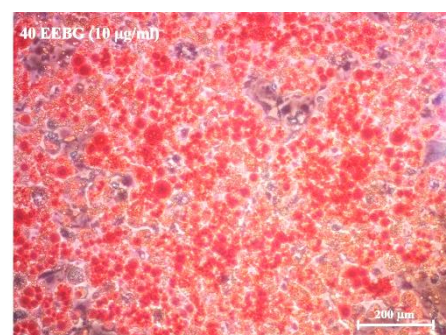
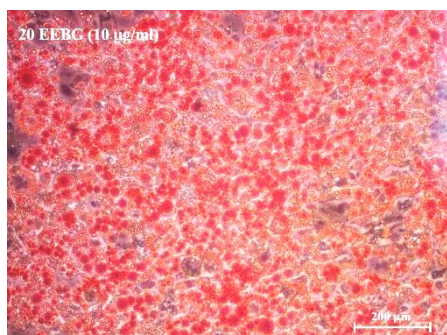
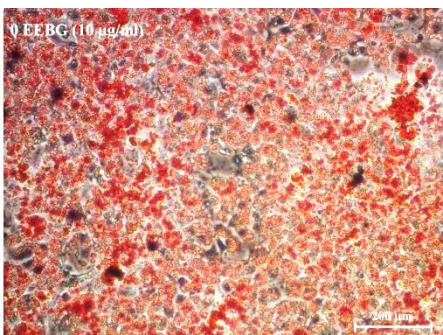
40 EEBG

60 EEBG

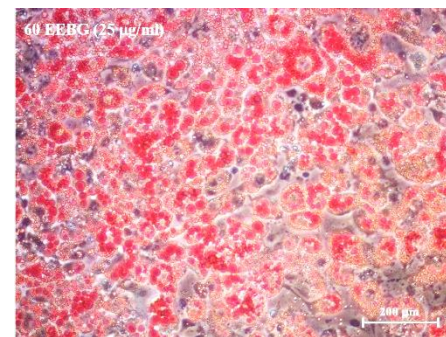
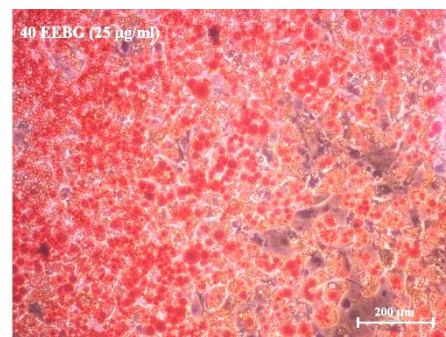
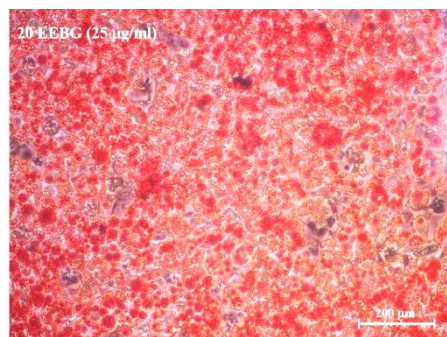
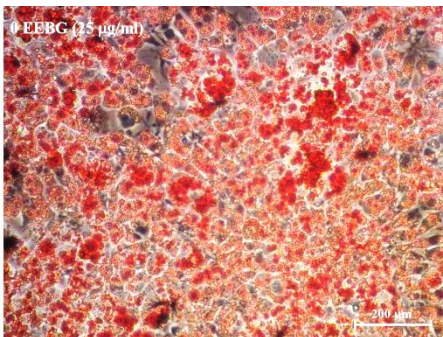
0 $\mu\text{g/mL}$



10 $\mu\text{g/mL}$



25 $\mu\text{g/mL}$



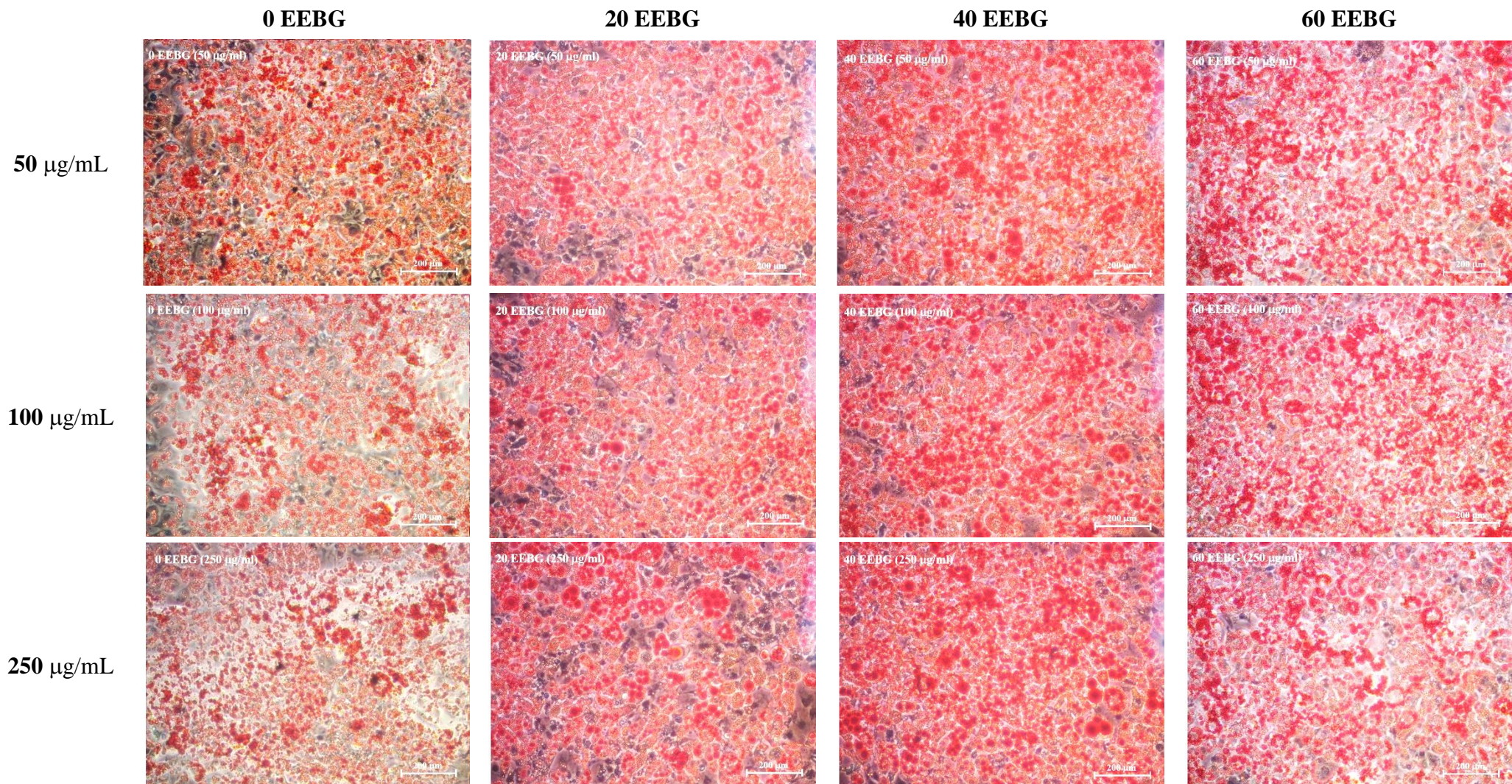


圖 1、黑蒜 0-100% 乙醇水萃取物和甲醇萃取物對 3T3-L1 脂肪細胞油紅染色細胞型態

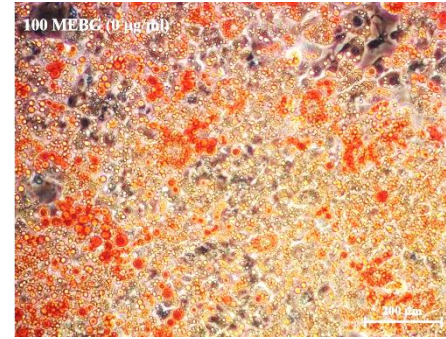
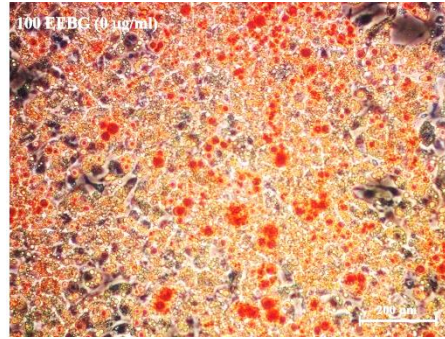
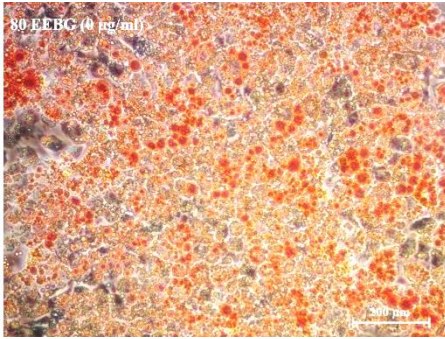
Figure 1. Cell morphological of 3T3-L1 adipocytes stained with oil red O stained material (OROSM) after treatment with 0-250 $\mu\text{g/mL}$ of 0-100% ethanol-water extracts and 100% methanol extract of black garlic for 48h at 37°C in a humidified 5% CO_2 incubator. Original magnification: 100 \times .

80 EEBG

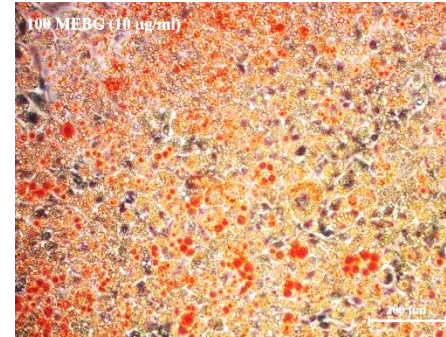
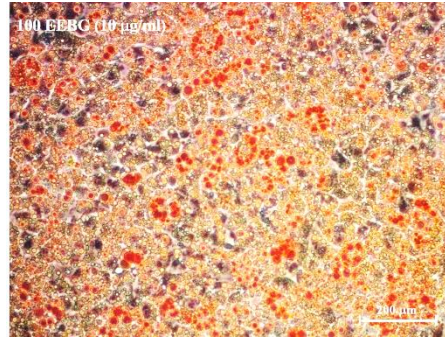
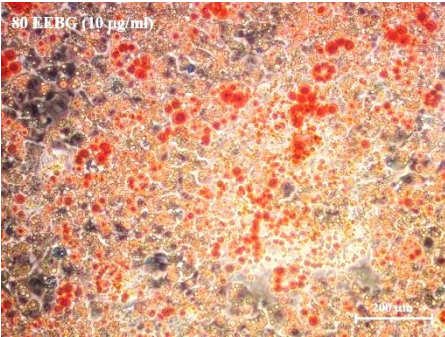
100 EEBG

100 MEBG

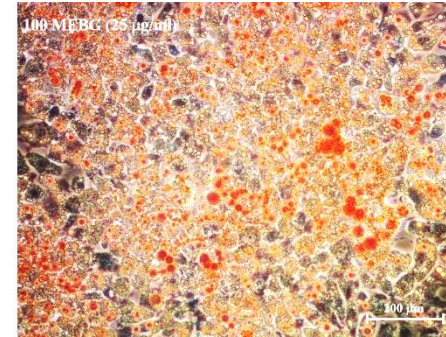
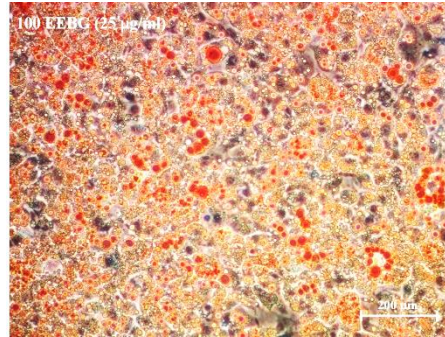
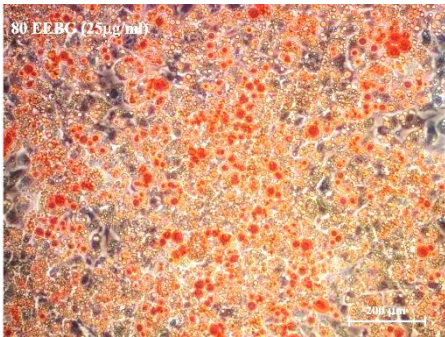
0 $\mu\text{g/mL}$



10 $\mu\text{g/mL}$



25 $\mu\text{g/mL}$



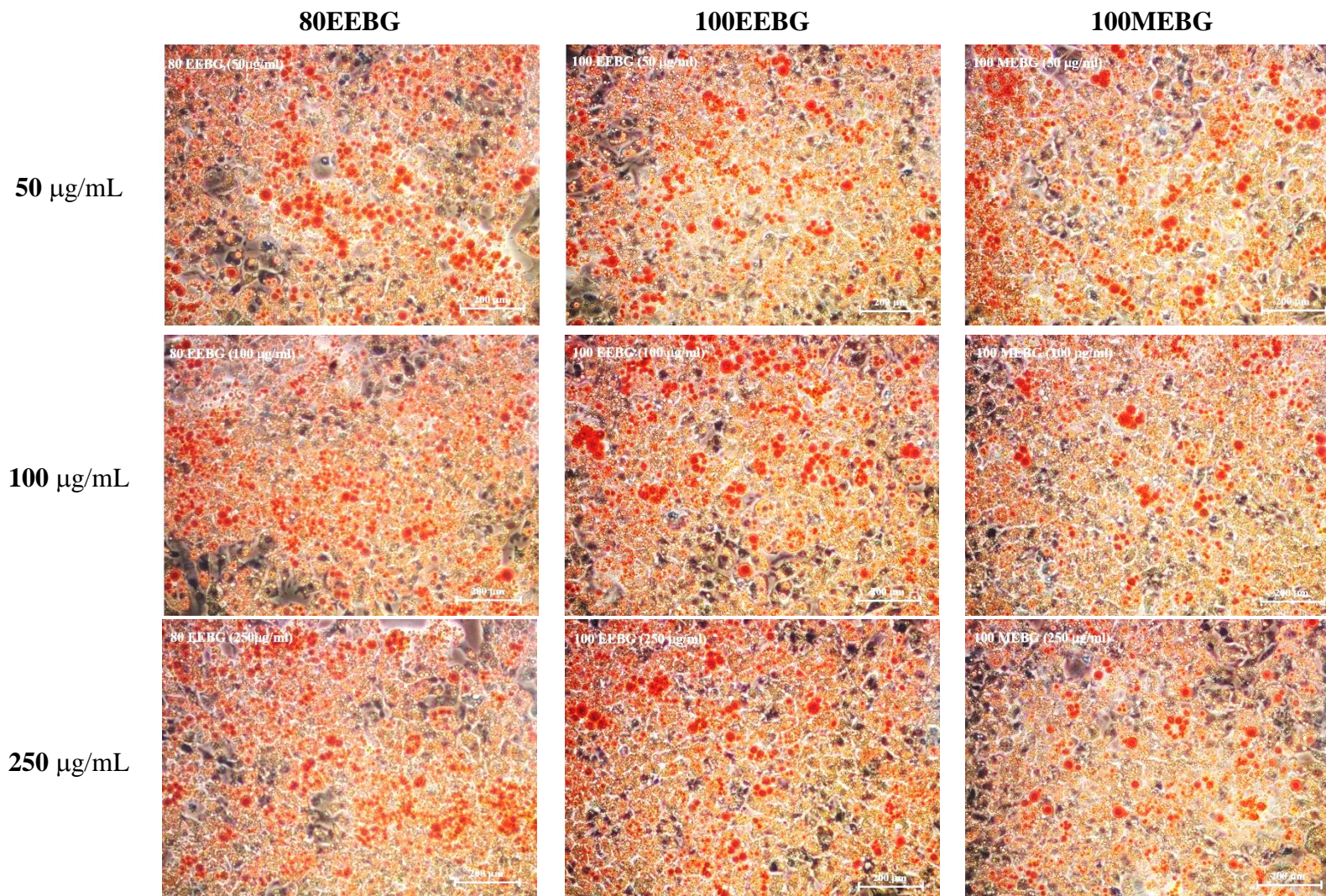


圖 1、黑蒜 0-100% 乙醇水萃取物和甲醇萃取物對 3T3-L1 脂肪細胞油紅染色細胞型態 (續)

Figure 1. Cell morphological of 3T3-L1 adipocytes stained with oil red O stained material (OROSM) after treatment with 0-250 $\mu\text{g/mL}$ of 0-100% ethanol-water extracts and 100% methanol extract of black garlic for 48h at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator. Original magnification: 100x.

表 3、黑蒜 0-100% 乙醇水萃取物和甲醇萃取物對 3T3-L1 脂肪細胞胞內三酸甘油酯之影響

Table 3. Effects of 0-100% ethanol-water extracts and 100% methanol extract of black garlic on the intracellular triglyceride in 3T3-L1 adipocytes

Intracellular triglyceride (% of control)	Black garlic extracts (µg/mL)					
	0	10	25	50	100	250
0 EEBG	100.00±0.95 ^e	106.35±3.39 ^d	122.82±0.77 ^b	123.01±4.67 ^b	129.97±0.97 ^a	115.64±1.10 ^c
20 EEBG	100.00±1.36 ^a	87.90±1.48 ^b	88.48±2.40 ^b	87.13±4.17 ^{bc}	84.73±2.38 ^{bc}	82.39±3.44 ^c
40 EEBG	100.00±2.57 ^{ab}	99.15±1.56 ^b	101.71±4.41 ^{ab}	105.53±2.8 ^{ab}	106.25±5.02 ^a	106.29±2.57 ^a
60 EEBG	100.00±0.36 ^a	94.17±0.56 ^b	92.86±0.85 ^b	73.85±0.16 ^d	75.74±0.18 ^{cd}	78.36±3.52 ^c
80 EEBG	100.00±3.95 ^a	86.77±4.09 ^b	78.66±2.03 ^c	84.63±5.33 ^{bc}	94.86±4.20 ^a	95.49±3.33 ^a
100 EEBG	100.00±2.71 ^b	89.03±6.98 ^d	104.03±3.14 ^a	103.32±0.87 ^a	91.47±0.76 ^c	104.48±0.49 ^a
100 MEBG	100.00±3.15 ^a	99.74±7.18 ^a	81.83±8.39 ^b	83.40±2.20 ^b	88.15±4.60 ^b	80.33±4.38 ^b

3T3-L1 adipocytes were incubated with 0, 10, 25, 50, 100, and 250 µg/mL of 0-100% ethanol-water extracts and 100% methanol extract of black garlic for 48h at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator. The reported values are the mean ± SD (n=3). Mean values with different letters were significantly different ($p < 0.05$). Percentage (%) is expressed as control at 100%.

表 4、黑蒜 20% 和 60% 乙醇水萃取物對 3T3-L1 脂肪細胞中甘油三磷酸去氫酶活性之影響

Table 4. Effects of 20% and 60% ethanol-water extracts of black garlic (20 EEBG and 60 EEBG) on the glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity in 3T3-L1 adipocytes

GPDH activity (% of control)	EEBG ($\mu\text{g/mL}$)					
	0	10	25	50	100	250
20 EEBG	100.00 \pm 5.13 ^a	98.36 \pm 11.49 ^a	53.97 \pm 8.43 ^b	46.94 \pm 12.75 ^b	27.42 \pm 7.83 ^c	26.10 \pm 7.72 ^c
60 EEBG	100.00 \pm 1.38 ^{ab}	86.94 \pm 0.65 ^c	97.60 \pm 1.84 ^{ab}	106.75 \pm 11.08 ^a	95.28 \pm 4.66 ^{bc}	94.33 \pm 3.28 ^{bc}

3T3-L1 adipocytes were incubated with 0, 10, 25, 50, 100, and 250 $\mu\text{g/mL}$ of 20% and 60% ethanol-water extracts of black garlic for 48h at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator. The reported values are the means \pm SD (n=3). Mean values with different letters were significantly different ($p < 0.05$). Percentage (%) is expressed as control at 100%.

表 5、黑蒜 20% 和 60% 乙醇萃取物對 3T3-L1 脂肪細胞中脂聯素含量之影響

Table 5. Effects of 20% and 60% ethanol-water extracts of black garlic on the content of adiponectin in 3T3-L1 adipocytes

Adiponectin (% of control)	EEBG ($\mu\text{g/mL}$)					
	0	10	25	50	100	250
20 EEBG	100.00 \pm 10.58 ^b	171.57 \pm 21.64 ^a	154.74 \pm 18.39 ^a	103.64 \pm 4.99 ^b	103.61 \pm 11.55 ^b	109.66 \pm 7.81 ^b
60 EEBG	100.00 \pm 10.41 ^a	75.63 \pm 7.62 ^b	89.33 \pm 2.48 ^{ab}	75.21 \pm 16.25 ^b	71.34 \pm 13.01 ^b	87.50 \pm 0.97 ^{ab}

3T3-L1 adipocytes were incubated with 0, 10, 25, 50, 100, and 250 $\mu\text{g/mL}$ of 20% and 60% ethanol extracts of black garlic for 48h at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator. The reported values are the means \pm SD (n=3). Mean values with different letters were significantly different ($p<0.05$). Percentage (%) is expressed as control at 100%.

表 6、黑蒜 20% 和 60% 乙醇萃取物對 3T3-L1 脂肪細胞中瘦體素含量之影響

Table 6. Effects of 20% and 60% ethanol-water extracts of black garlic on the content of leptin in 3T3-L1 adipocytes

Leptin (% of control)	EEBG (µg/mL)					
	0	10	25	50	100	250
20 EEBG	100.00±11.40 ^a	59.64±16.29 ^b	15.49±4.89 ^c	18.82±9.40 ^c	19.50±6.96 ^c	53.19±7.56 ^b
60 EEBG	100.00±11.62 ^a	80.41±11.41 ^a	89.83±16.10 ^a	40.97±11.13 ^b	52.86±15.07 ^b	45.39±19.78 ^b

3T3-L1 adipocytes were incubated with 0, 10, 25, 50, 100, and 250 µg/mL of 20% and 60% ethanol-water extracts of black garlic for 48h at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator. The reported values are the means ± SD (n=3). Mean values with different letters were significantly different ($p < 0.05$). Percentage (%) is expressed as control at 100%.

七、參考文獻

- 周聰成 (2005) 中醫營養學，173-178 頁，新文京開發出版股份有限公司。
- 徐鴻華、丁平、劉軍民、劉春鈴、杜勤、李薇、岑麗華、張丹雁、冼建春、賀紅、徐良、黃海波、詹若挺、潘超美 (2004) 中草藥彩色圖鑑 (三)，4-5 頁，西北出版社。
- 蕭奕夫 (2008) SOD-like 飲品及機能性大蒜產品之開發，國立嘉義大學食品科學系碩士論文。
- 張維棠 (2011) 以細胞及動物模式探討黑蒜頭對脂質生成之影響及其分子機制，中山醫學大學營養科學系碩士論文。
- Aggarwal, B.B., Shishodia, S. (2004). Suppression of the Nuclear Factor- κ B Activation Pathway by Spice-Derived Phytochemicals: Reasoning for Seasoning. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1030, 434-441.
- Andrianova, I., Fomchenkov, I., Orekhov, A. (2002). Hypotensive effect of long-acting garlic tablets allacor (a double-blind placebo-controlled trial). *Terapevticheski Arkhiv* 74, 76-78.
- Arunkumar, A., Vijayababu, M.R., Venkataraman, P., Senthilkumar, K., Arunakaran, J. (2006). Chemoprevention of rat prostate carcinogenesis by diallyl disulfide, an organosulfur compound of garlic. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 29, 375-379.
- Behtowsk, J. (2012). Leptin and the regulation of endothelial function in physiological and pathological conditions. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*. 39, 168-178.
- Borrelli, F., Capasso, R., Izzo, A.A. (2007). Garlic (*Allium sativum* L.): adverse effects and drug interactions in humans. *Molecular Nutrition & Food Research* 51, 1386-1397.
- Brochu-Gaudreau, K., Rehfeldt, C., Blouin, R., Bordignon, V., Murphy, B.D., Palin, M.F. (2010). Adiponectin action from head to toe. *Endocrine* 37, 11-32.
- Caballero, B. (2007). The global epidemic of obesity: an overview. *Epidemiologic Reviews* 29, 1-5.
- Chen, Y. C., Kao, T. H., Tseng, C. Y., Chang, W. T., Hsu, C. L. (2014). Methanolic extract of black garlic ameliorates diet-induced obesity via regulating adipogenesis, adipokine biosynthesis, and lipolysis. *Journal of Functional Foods* 9, 98-108.
- Cui, J., Panse, S., Falkner, B. (2011). The role of adiponectin in metabolic and vascular disease: a review. *Clinical Nephrology* 75, 26-33.
- Chang, W.T., Wu, C.H., Hsu, C.L. (2015) Diallyl trisulphide inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes through lipogenesis, fatty acid transport, and fatty acid oxidation pathways. *Journal of Functional Foods* 16, 414-422.
- Finer, N. (2011). Medical consequences of obesity. *Medicine* 39, 18-23.
- Fleischauer, A.T., and Arab, L. (2001). Garlic and cancer: a critical review of the epidemiologic literature. *The Journal of Nutrition* 131, 1032S-1040S.
- Gorinstein, S., Jastrzebski, Z., Namiesnik, J., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Trakhtenberg, S. (2007). The atherosclerotic heart disease and protecting properties

- of garlic: contemporary data. *Molecular Nutrition & Food Research* 51, 1365-1381.
- Gorinstein, S., Leontowicz, M., Leontowicz, H., Jastrzebski, Z., Drzewiecki, J., Namiesnik, J., Zachwieja, Z., Barton, H., Tashma, Z., Katrich, E. (2006). Dose-dependent influence of commercial garlic (*Allium sativum*) on rats fed cholesterol-containing diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 4022-4027.
- Gu, X., Zhu, Y.Z. (2011). Therapeutic applications of organosulfur compounds as novel hydrogen sulfide donors and/or mediators. *Expert Review of Clinical Pharmacology* 4, 123-133.
- Heidarian, E., Dehkordi, E.J., Nahal, A.S. (2011). Effect of garlic on liver phosphatidate phosphohydrolase and plasma lipid levels in hyperlipidemic rats. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 1110-1114.
- Hsing, A.W., Chokkalingam, A.P., Gao, Y.T., Madigan, M.P., Deng, J., Gridley, G., Fraumeni, J.F. (2002). *Allium* vegetables and risk of prostate cancer: a population-based study. *Journal of the National Cancer Institute* 94, 1648-1651.
- Ishikawa, H., Saeki, T., Otani, T., Suzuki, T., Shimosuma, K., Nishino, H., Fukuda, S., Morimoto, K. (2006). Aged garlic extract prevents a decline of NK cell number and activity in patients with advanced cancer. *The Journal of Nutrition* 136, 816S-820S.
- Jain, S.K., Micinski, D., Lieblong, B.J., Stapleton, T. (2012). Relationship between hydrogen sulfide levels and HDL-cholesterol, adiponectin, and potassium levels in the blood of healthy subjects. *Atherosclerosis* 225, 242-245.
- Jung, C.H., Kim, M.S. (2013). Molecular mechanisms of central leptin resistance in obesity. *Archives of Pharmacal Research* 36, 201-207.
- Kim, H.K., Kim, J.N., Han, S.N., Nam, J.H., Na, H.N., Ha, T.J. (2012). Black soybean anthocyanins inhibit adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Nutrition Research* 32, 770-777.
- Knight, Z.A., Hannan, K.S., Greenberg, M.L., Friedman, J.M. (2010). Hyperleptinemia is required for the development of leptin resistance. *PLoS One* 5, e11376.
- Kral, T.V.E., Rauh, E.M. (2010). Eating behaviors of children in the context of their family environment. *Physiology & Behavior* 100, 567-573.
- Kim, E.J., Lee, D.H., Kim, H.J., Lee, S.J., Ban, J.O., Cho, M.C., Jeong, H.S., Yang, Y., Hong, J.T., Yoon, D.Y. (2012) Thiacremonone, a sulfur compound isolated from garlic, attenuates lipid accumulation partially mediated via AMPK activation in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 23, 1552-1558.
- Lee, Y.M., Gweon, O.C., Seo, Y.J., Im, J., Kang, M.J., Kim, M.J., Kim, J.I. (2009). Antioxidant effect of garlic and aged black garlic in animal model of type 2 diabetes mellitus. *Nutrition Research and Practice* 3, 156-161.
- Liu, C.T., Sheen, L.Y., Lii, C.K. (2007). Does garlic have a role as an antidiabetic agent? *Molecular Nutrition & Food Research* 51, 1353-1364.
- Macciò, A., Madeddu, C., Gramignano, G., Mulas, C., Floris, C., Massa, D., Astara, G., Chessa, P., Mantovani, G. (2010). Correlation of body mass index and leptin with

- tumor size and stage of disease in hormone-dependent postmenopausal breast cancer: preliminary results and therapeutic implications. *Journal of Molecular Medicine* 88, 677-686.
- Matsuzawa, Y. (2010). Adiponectin: a key player in obesity related disorders. *Current Pharmaceutical Design* 16, 1896-1901.
- Meigs, J.B., Wilson, P.W., Fox, C.S., Vasan, R.S., Nathan, D.M., Sullivan, L.M., D'Agostino, R.B. (2006). Body mass index, metabolic syndrome, and risk of type 2 diabetes or cardiovascular disease. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 91, 2906-2912.
- Morihara, N., Nishihama, T., Ushijima, M., Ide, N., Takeda, H., Hayama, M. (2007). Garlic as an anti fatigue agent. *Molecular Nutrition & Food Research* 51, 1329-1334.
- Muhlhausler, B.S., Cook-Johnson, R., James, M., Miljkovic, D., Duthoit, E., Gibson, R. (2010). Opposing effects of omega-3 and omega-6 long chain polyunsaturated Fatty acids on the expression of lipogenic genes in omental and retroperitoneal adipose depots in the rat. *Journal of Nutrition and Metabolism*, doi: 10.1155/2010/927836.
- Nigam, N., Shukla, Y. (2007). Preventive effects of diallyl sulfide on 7, 12 dimethylbenz[a]anthracene induced DNA alkylation damage in mouse skin. *Molecular Nutrition & Food Research* 51, 1324-1328.
- Parastouei, K., Ravanshad, S., Mostafavi, H., Setoudehmaram, E. (2006). Effects of garlic tablet on blood sugar, plasma lipids and blood pressure in type 2 diabetic patients with hyperlipidemia. *Journal of Medicinal Plants* 5, 9-16.
- Park, J.A., Park, C., Han, M.H., Kim, B.W., Chung, Y.H., Choi, Y.H. (2011). Inhibition of Adipocyte Differentiation and Adipogenesis by Aged Black Garlic Extracts in 3T3-L1 preadipocytes. *Journal of Life Science* 21, 720-728.
- Pischon, T., Boeing, H., Hoffmann, K., Bergmann, M., Schulze, M.B., Overvad, K., van der Schouw, Y.T., Spencer, E., Moons, K.G., Tjønneland, A., Halkjaer, J., Jensen, M.K., Stegger, J., Clavel-Chapelon, F., Boutron-Ruault, M.C., Chajes, V., Linseisen, J., Kaaks, R., Trichopoulou, A., Trichopoulos, D., Bamia, C., Sieri, S., Palli, D., Tumino, R., Vineis, P., Panico, S., Peeters, P.H., May, A.M., Bueno-de-Mesquita, H.B., van Duynhoven, F.J., Hallmans, G., Weinehall, L., Manjer, J., Hedblad, B., Lund, E., Agudo, A., Arriola, L., Barricarte, A., Navarro, C., Martinez, C., Quirós, J.R., Key, T., Bingham, S., Khaw, K.T., Boffetta, P., Jenab, M., Ferrari, P., Riboli, E. (2008). General and Abdominal Adiposity and Risk of Death in Europe. *New England Journal of Medicine* 359, 2105-2120.
- Pittler, M.H., Ernst, E. (2007). Clinical effectiveness of garlic (*Allium sativum*). *Molecular Nutrition & Food Research* 51, 1382-1385.
- Rahman, K. (2007). Effects of garlic on platelet biochemistry and physiology. *Molecular Nutrition & Food Research* 51, 1335-1344.
- Raj, M., Kumar, R.K. (2010). Obesity in children & adolescents. *The Indian Journal of Medical Research* 132, 598-605.

- Sato, E., Kohno, M., Hamano, H., Niwano, Y. (2006). Increased anti-oxidative potency of garlic by spontaneous short-term fermentation. *Plant Foods for Human Nutrition* 61, 157-160.
- Seo, Y., Gweon, O., Lee, Y., Kang, M., Kim, J. (2009). Effect of garlic and aged black garlic on hyperglycemia and dyslipidemia in animal model of type 2 diabetes mellitus. *Journal of Food Science and Nutrition* 14, 1-7.
- Sheen, L.Y., Chen, H.W., Kung, Y.L., Liu, C.T., Lii, C.K. (1999). Effects of garlic oil and its organosulfur compounds on the activities of hepatic drug-metabolizing and antioxidant enzymes in rats fed high-and low-fat diets. *Nutrition and Cancer* 35, 160-166.
- Swierczynski, J., Zabrocka, L., Goyke, E., Raczynska, S., Adamonis, W., Sledzinski, Z. (2003). Enhanced glycerol 3-phosphate dehydrogenase activity in adipose tissue of obese humans. *Molecular and Cellular Biochemistry* 254, 55-59.
- Tanaka, S., Haruma, K., Yoshihara, M., Kajiyama, G., Kira, K., Amagase, H., and Chayama, K. (2006). Aged garlic extract has potential suppressive effect on colorectal adenomas in humans. *The Journal of Nutrition* 136, 821S-826S.
- Viry, E., Anwar, A., Kirsch, G., Jacob, C., Diederich, M., Bagrel, D. (2011). Antiproliferative effect of natural tetrasulfides in human breast cancer cells is mediated through the inhibition of the cell division cycle 25 phosphatases. *International Journal of Oncology* 38, 1103-1111.
- Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., Ferrante, A.W. Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation* 112, 1796-1808.
- Wang, Z., Pan, Z., Ma, H., Atungulu, G.G. (2011). Extract of Phenolics From Pomegranate Peels. *The Open Food Science Journal* 5, 17-25.
- Zhang, X.H., Huang, B., Choi, S.K., Seo, J.S. (2012). Anti-obesity effect of resveratrol-amplified grape skin extracts on 3T3-L1 adipocytes differentiation. *Nutrition Research and Practice* 6, 286-293.