

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

三種不同分子量之蒟蒻水解物對結腸癌危險因子的調控作用 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 95-2320-B-040-028-
執行期間：95年08月01日至96年07月31日
執行單位：中山醫學大學營養學系

計畫主持人：陳曉鈴

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理：林友梅

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

中華民國 96年08月16日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

三種不同分子量之蒟蒻水解物對 結腸癌危險因子的調控作用

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC 95-2320-B-040-028

執行期間：95年8月1日至96年7月31日

主持人：陳曉鈴 中山醫學大學營養系

計畫參與人員：林友梅 中山醫學大學營養科學研究所

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：精簡報告

中 華 民 國 九 十 六 年 八 月 二 日

一、中文摘要

蒟蒻主要成分是葡甘聚糖 (glucomannan)，是一種可溶性纖維；由 D-葡萄糖和 D-甘露糖以 β -1,4 糖苷鍵結而成。本研究目的將比較未水解蒟蒻纖維、三種不同分子量之蒟蒻纖維部分水解物 (平均聚合度為 16, 8, 4) 對大腸癌之預測生物指標 (如糞便水液成分對人類大腸腺癌細胞株產生之毒性) 及影響這些作用的因素 (如糞便 pH、短鏈脂肪酸濃度及致癌相關細菌酵素活性等) 的調控作用。

將六週齡之 Balb/c 小鼠隨機分配，每組 12 隻，分別餵食不含纖維及含 5% 不同膳食纖維 (Cellulose, C; Pectin, P; Konjac glucomannan, K; Konjac glucomannan hydrolysis fraction 1、fraction 2、fraction 3, F1、F2、F3; Inulin, I; 及 Fructooligosaccharides, FO) 實驗飲食 21 天。犧牲前三天 (第 18-20 天) 連續收集 72 小時糞便並馬上冷凍保存。隔夜禁食後第 22 天犧牲，採集血液及大腸，並秤取肝臟及盲腸內容物重冷凍儲存於 -20°C 冰箱。

結果顯示飼料攝取量以 FO 組較高，食物利用率方面則是以 K 組利用率最低，然而在體重增加方面各組間並無差異。相對器官重部份：相對肝臟重以 FF 組顯著高於其他各組，相對盲腸重部份則是以 FO 組最高，每日排便乾重部份，除 FF 組外攝取其他纖維皆可增加糞便乾重。糞便酵素方面 β -glucosidase 以 F1 組活性最高； β -galactosidase 是以 P 組活性最高； β -glucuronidase 則是以 F2 組最高。在糞便 pH 值及短鏈脂肪酸含量部份，糞便 pH 值以 P 組最低與攝食其他膳食纖維的 pH 值相似，C 組最高；在每日短鏈脂肪酸排出量方面，不論是乙酸、丙酸、正丁酸或異丁酸皆以 F3 組最高；乙酸、正丁酸或異丁酸 FF

組最低。

在糞便水細胞及基因毒性測試部分，細胞毒性測試結果顯示；補充任何一種膳食纖維皆可以改善糞便水對細胞之毒性；基因毒性測試方面，以 FF 組傷害程度最大，P 及 I 組的 DNA 傷害程度最低；進一步以 H_2O_2 誘發 DNA 傷害發現，以 FF 組傷害程度最大，F3 組的 DNA 傷害程度最低。

縱合上述結果顯示，蒟蒻水解物 F3 (DP=4) 在腸道發酵產生的短鏈脂肪酸最高，且對於改善糞便水對於細胞毒性及基因性效果最顯著。

關鍵字：蒟蒻、葡甘聚糖、蒟蒻水解物、短鏈脂肪酸、糞便酵素、細胞毒性、基因毒性、彗星影像分析

Abstract

Konjac, a soluble dietary fiber, is rich in glucomannan polysaccharides which is composed of D-glucose and D-mannose by β -1,4 glycosidic bond. The purpose of this study was to compare the effect of Konjac (K), Konjac hydrolysate fractions (F1, F2, F3; the degree of polymerization was 16, 8, 4 respectively), inulin (I), fructooligosaccharide (FO) and cellulose (C) on the concentrations of short chain fatty acids (SCFA) in the feces, and the fecal enzyme, fecal water pH, the cytotoxicity and genotoxicity on Caco-2 cell.

The 6-wk-old BALB/c mice were randomly allocated to consume AIN-93 control fiber free (FF), and 5% K, F1, F2, F3, I, FO or C diet for three weeks. The feces of mice were collected for three days before sacrifice. The mice were sacrificed on the 22nd day. After sacrificing, the main organs was collected and weighted to analyze.

There were no differences in

body weight gain across groups. FO group has the highest daily food intake, and K group has the lowest food efficiency. FF group has the highest liver relative weight, and FO group has the highest cecum relative weight. All of the fiber used in this study can increase the daily feces dry weight.

On the fecal enzyme, F1 group has the highest β -glucosidase activation; P group has the highest β -galactosidase activation; F2 group has the highest β -glucuronidase activation. Compare the fecal SCFA, F3 group has the highest concentrations of fecal acetate, propionate, and butyrate.

In the cytotoxicity on Caco-2 cell, all of the fiber used in this study can improve the fecal water induce cell toxicity. In the genotoxicity on Caco-2 cell, P and I group has the lowest DNA damage. After using the H₂O₂ inducing DNA damage, F3 group has the best effect on prevent DNA from H₂O₂ damage.

In conclusion, the Konjac hydrolysate fractions 3 (DP = 4) could increase the concentrations of fecal short chain fatty acids, and prevent the Caco-2 cell from fecal water damage.

Key words: konjac, glucomannan, konjac hydrolysate fractions, short chain fatty acid, fecal enzyme, cytotoxicity, DNA damage, comet assay

二、緣由與目的

根據衛生署 95 年最新公布之資料顯示⁽¹⁾，惡性腫瘤位居國人十大死亡原因之首位，其中直結腸癌為癌症死亡原因中排名第三。先前研究顯示，蒟蒻飼料可以降低 1,2-dimethylhydrazine (DMH) 所誘發之大腸癌^(2,3)。此外，老鼠每天餵予

10%蒟蒻飼料 2 個月後，蒟蒻組之糞便中 nitroreductase、azoreductase 及 β -glucuronidase 之酵素活性顯著較對照組低⁽²⁾，因此推測蒟蒻可抑制大腸癌之發生。

蒟蒻塊莖富含之葡甘聚醣 (glucomannan) 是一種粘稠性水溶性纖維，由 D-葡萄糖和 D-甘露糖以 β -1,4 糖苷鍵鍵結而成的一種多醣類⁽⁴⁾。本實驗室曾以三種不同聚合度之蒟蒻水解產物 (聚合度=16, 8, 4)，探討其對腸道菌相⁽⁵⁾及排便頻率⁽⁶⁾等腸道效應之影響。在腸道菌相方面，發現三種蒟蒻水解物均有提升總厭氧菌的趨勢。在排便影響部分，發現蒟蒻增加小鼠排便顆數效果較三種蒟蒻水解物效果佳；顯示腸道利用低聚合度蒟蒻纖維的能力高於高聚合度之蒟蒻纖維。

由以上討論可發現，小分子 (低 DP) 難消化性碳水化合物較大分子 (高 DP) 容易在腸道中被發酵利用，而且有較強的益生質作用。因此，本研究目的將比較未水解蒟蒻纖維、三種不同分子量之蒟蒻纖維部分水解物 (平均聚合度為 16, 8, 4) 對大腸癌之預測生物指標 (如糞便水液成分對人類大腸腺癌細胞株產生之毒性) 及影響這些作用的因素 (如糞便 pH、短鏈脂肪酸濃度、二級膽酸濃度及致癌相關細菌酵素活性等) 的調控作用。

三、結果與討論

餵食 3 週飼料後，各組間體重增加皆無顯著差異，顯示餵食不同膳食纖維不會影響小鼠正常生長。在糞便 pH 值部份，比較 F1、F2 及 F3 組，發現其 pH 值隨聚合度降低而有下降的情形 (表一)。在糞便短鏈脂肪酸部分，以 F3 組的糞便乙酸、丙酸、丁酸及總短鏈脂肪酸濃度皆最高。說明蒟蒻水解物可被腸道菌利用發酵且聚合度愈低發酵能力佳 (表二)。

在糞便水液成分對人類大腸腺癌

細胞株產生之毒性試驗方面，以糞便水與 Caco-2 細胞培養 3 小時後比較 F1、F2 及 F3 組，發現其存活率隨聚合度降低而有上升的情形（表三）。進一步分析 DNA 傷害情形發現，在以 H₂O₂ 誘發 DNA 傷害下，比較 F1、F2 及 F3 組，發現其 DNA 傷害程度隨聚合度降低而有下降的情形（表四）。顯示，低聚合度先為對於保護細胞免於細胞及 DNA 傷害有顯著的功效。

在糞便 β -glucosidase 活性以 F2 組最高； β -galactosidase 活性以 P 組最高； β -glucuronidase 活性則是以 F2 組最高（表五）。對照糞便細菌酵素及細胞毒性與 DNA 傷害程度發現，以正常飲食而言，糞便細菌酵素活性並不是很好的大腸癌預測指標。

四、計畫成果自評

本研究結果豐碩，實驗項目比提案更多。因為小鼠之排便量有限，因此原先估計之小鼠隻數有時無法有效區分補充不同膳食纖維於生理上之效應。本篇研究應適合在學術期刊發表。

五、參考文獻

1. 行政院衛生署. 行政院衛生署 衛生統計資料網. 2005.
2. Fujiwara S, Hirota T, Nakazato H, Muzutani T, Mitsuoka T. Effect of Konjac mannan on intestinal microbial metabolism in mice bearing human flora and in conventional F344 rats. *Food Chem Toxicol.* 1991;29:601-6.
3. Mizutani T, Mitsuoka T. Effect of Konjac mannan on 1,2-dimethylhydrazine-induced intestinal carcinogenesis in Fischer 344 rats. *Cancer Lett.* 1983;19:1-6.
4. Doi K. Effect of konjac fibre (glucomannan) on glucose and lipids. *Eur J Clin Nutr.* 1995; 49 Suppl 3:S190-7.
5. 林孟萱. 不同分子量膳食纖維對小鼠腸道菌相及糞便水基因毒性之探討.

中山醫學大學營養科學研究所碩士論文. 2004.

6. 向怡暉. 膳食纖維對小鼠腸道生理及血脂值之影響. 中山醫學大學營養科學研究所碩士論文. 2004.

表一、餵食不同膳食纖維對小鼠的糞便水 pH 值之影響^{1,2}

groups	pH	
FF	7.40	± 0.15 ^{bc}
C	7.54	± 0.36 ^c
P	6.97	± 0.36 ^a
K	7.13	± 0.19 ^{ab}
F1	7.25	± 0.24 ^{ab}
F2	7.09	± 0.10 ^{ab}
F3	7.08	± 0.23 ^{ab}
I	7.04	± 0.25 ^a
FO	7.08	± 0.18 ^{ab}

¹Date are expressed as means±SE, n=12/group.

²FF: fiber free; C: cellulose; P: pectin; K: konjac glucomannan; F1: konjac glucomannan hydrolysis fraction1; F2: konjac glucomannan hydrolysis fraction2; F3: konjac glucomannan hydrolysis fraction3; I: inulin; FO: fructooligosaccharides

表二、餵食不同膳食纖維之動物飼料對小鼠每日糞便短鏈脂肪酸排出量之影響^{1,2}

Fecal SCFA	Acetate	Propionate	<i>i</i> -butyrate	<i>n</i> -butyrate	Total
————— μmole/day —————					
FF	19.76 ± 13.10 ^a	3.83 ± 03.18 ^a	0.41 ± 0.22	2.45 ± 1.30 ^a	26.45 ± 17.67 ^a
C	37.72 ± 23.15 ^{ab}	3.42 ± 01.83 ^a	0.65 ± 0.33	3.86 ± 2.25 ^{ab}	45.65 ± 26.78 ^{ab}
P	73.69 ± 40.40 ^{bc}	9.28 ± 04.10 ^{ab}	1.25 ± 1.42	6.57 ± 2.97 ^{abc}	90.79 ± 45.84 ^{bc}
K	49.51 ± 29.23 ^{ab}	8.90 ± 07.25 ^{ab}	0.95 ± 0.76	6.39 ± 2.97 ^{abc}	65.75 ± 38.71 ^{ab}
F1	62.17 ± 31.82 ^{abc}	13.26 ± 06.77 ^b	2.17 ± 2.84	8.73 ± 5.07 ^{abcd}	86.33 ± 41.86 ^{abc}
F2	54.07 ± 24.85 ^{abc}	12.01 ± 04.90 ^{ab}	2.78 ± 4.37	9.89 ± 4.34 ^{bcd}	78.75 ± 33.66 ^{abc}
F3	101.01 ± 43.88 ^c	23.02 ± 11.07 ^c	3.32 ± 4.10	11.84 ± 6.37 ^{cd}	139.20 ± 62.10 ^c
I	59.78 ± 42.70 ^{abc}	15.08 ± 06.80 ^{bc}	4.06 ± 7.09	13.14 ± 8.22 ^{cd}	92.06 ± 51.13 ^{bc}
FO	98.56 ± 41.30 ^c	14.58 ± 07.43 ^{bc}	1.96 ± 1.91	14.67 ± 6.44 ^d	129.77 ± 54.31 ^c

¹Date are expressed as means±SE, n=12/group.

²FF: fiber free; C: cellulose; P: pectin; K: konjac glucomannan; F1: konjac glucomannan hydrolysis fraction1; F2: konjac glucomannan hydrolysis fraction2; F3: konjac glucomannan hydrolysis fraction3; I: inulin; FO: fructooligosaccharides

表三、餵食不同膳食纖維對小鼠的糞便水於 37°C 下與細胞培養後的細胞存活率^{1,2}

groups	cell survival (%)	
	1 hour	3 hour
Blank	94.51 ± 0.19 ^b	92.48 ± 0.93 ^b
FF	84.22 ± 0.99 ^a	77.70 ± 0.38 ^a
C	89.64 ± 2.71 ^{ab}	90.32 ± 0.18 ^b
P	89.56 ± 1.63 ^{ab}	90.10 ± 2.24 ^b
K	91.57 ± 3.37 ^b	86.53 ± 2.78 ^{ab}
F1	91.00 ± 1.09 ^b	85.75 ± 0.59 ^{ab}
F2	89.61 ± 0.08 ^{ab}	87.75 ± 3.11 ^{ab}
F3	90.98 ± 1.69 ^b	89.36 ± 2.21 ^b
I	90.81 ± 2.84 ^b	89.79 ± 3.43 ^b
FO	89.55 ± 0.43 ^{ab}	89.50 ± 4.30 ^b

¹Date are expressed as means±SE, n=12/group.

²FF: fiber free; C: cellulose; P: pectin; K: konjac glucomannan; F1: konjac glucomannan hydrolysis fraction1; F2: konjac glucomannan hydrolysis fraction2; F3: konjac glucomannan hydrolysis fraction3; I: inulin; FO: fructooligosaccharides

表四、餵食不同膳食纖維對小鼠的糞便水基因毒性之影響^{1,2}

groups	DNA damage score (tail moment)	
	Fecal water	Fecal water + H ₂ O ₂ ³
Blank	1.24 ± 1.07 ^a	26.22 ± 9.74 ^a
FF	6.23 ± 3.31 ^d	36.78 ± 6.05 ^e
C	2.04 ± 1.49 ^c	29.37 ± 8.21 ^{bc}
P	1.42 ± 1.14 ^a	31.11 ± 8.33 ^d
K	1.82 ± 1.58 ^{bc}	31.53 ± 7.69 ^d
F1	1.68 ± 1.48 ^b	29.91 ± 5.23 ^c
F2	1.94 ± 1.55 ^{bc}	28.34 ± 6.95 ^b
F3	1.79 ± 1.55 ^{bc}	26.84 ± 5.87 ^a
I	1.35 ± 1.52 ^a	29.50 ± 6.03 ^{bc}
FO	1.67 ± 1.59 ^b	28.88 ± 6.89 ^{bc}

¹Date are expressed as means±SD, n=12/group.

²FF: fiber free; C: cellulose; P: pectin; K: konjac glucomannan; F1: konjac glucomannan hydrolysis fraction1; F2: konjac glucomannan hydrolysis fraction2; F3: konjac glucomannan hydrolysis fraction3; I: inulin; FO: fructooligosaccharides

³Hydrogen peroxide inducing conditions: 10 mM, 1 min, 4°C

表五、餵食不同膳食纖維之動物飼料對小鼠的糞便酵素影響^{1,2}

Fecal enzyme	IU/mg protein		
	β -glucosidase	β -galactosidase	β -glucuronidase
FF	1.88 \pm 2.92 ^{abc}	1.48 \pm 0.54 ^b	3.66 \pm 1.56 ^{ab}
C	0.25 \pm 0.20 ^a	0.48 \pm 0.36 ^a	2.09 \pm 1.41 ^a
P	0.53 \pm 0.31 ^a	2.50 \pm 0.88 ^c	4.08 \pm 1.22 ^a
K	2.39 \pm 1.05 ^{bc}	1.05 \pm 0.59 ^{ab}	7.10 \pm 4.01 ^{bc}
F1	3.07 \pm 1.71 ^c	1.28 \pm 0.35 ^b	6.25 \pm 4.10 ^{bc}
F2	2.53 \pm 1.19 ^{bc}	1.11 \pm 0.43 ^{ab}	8.54 \pm 4.36 ^c
F3	2.79 \pm 0.66 ^{bc}	1.75 \pm 0.36 ^b	5.71 \pm 1.97 ^{abc}
I	1.67 \pm 0.78 ^{abc}	1.20 \pm 0.39 ^b	3.76 \pm 1.38 ^{ab}
FO	1.15 \pm 0.32 ^{ab}	1.45 \pm 0.42 ^b	5.76 \pm 1.31 ^{abc}

¹Data are expressed as means \pm SE, n=12/group.

²FF: fiber free; C: cellulose; P: pectin; K: konjac glucomannan; F1: konjac glucomannan hydrolysis fraction1; F2: konjac glucomannan hydrolysis fraction2; F3: konjac glucomannan hydrolysis fraction3; I: inulin; FO: fructooligosaccharides