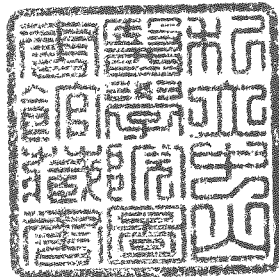


R
008.8
2682

中山醫學院營養科學研究所碩士論文

飲食中脂質的量及種類對於老鼠肝中細胞色素
P-450 活性之調節

Amount and type of dietary fat modulate rat
hepatic cytochrome P-450 activity



指導教授：陳暉雯 教授

研究生：吳美香 撰

中華民國八十六年六月

中山醫學院圖書館



C046138

參考書恕不外借

授權書

(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學院 營養科學研究所
_____ 組 85 學年度第 2 學期所撰 碩士 學位論文。

論文名稱：飲食中脂質的量及種類對於老鼠肝中細胞色素 P-450 活性之調節

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文提要，授予國家圖書館、本人畢業學校及行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得重製成電子資料檔後收錄於該單位之網路，並與台灣學術網路及科技網路連線，得不限地域時間與次數，以光碟或紙本重製發行。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得不限地域時間與次數以微縮、光碟重製後發行，並得享該中心微縮小組製作之研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔資料等值新台幣伍佰元之服務。本論文因涉及專利等智慧財產權之申請，請將本論文全文延後至民國 __ 年 __ 月後再公開。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限時間與地域，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。

指導教授姓名：陳暉雯

研究生簽名：吳美香 學號：r84307
(親筆正楷)

日期：民國 86 年 7 月 4 日

- 備註：1. 上述同意與不同意之欄位若未勾選，本人同意視同授權。
2. 授權第二項者，請再交論文一本予承辦人員。
3. 本授權書已於民國 85 年 4 月 10 日送請著委會修正定稿。

簽署人須知

1. 依著作權法的規定，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先得到著作財產權人授權，請分別在三種利用方式的同意欄內鈎選並填妥各項資料。
2. 所謂非專屬授權是指被授權人所取得的權利並非獨占性的使用權，授權人尚可將相同的權利重複授權給他人使用；反之即為專屬授權，如果您已簽署專屬授權書予其他法人或自然人，請勿簽署本授權書。
3. 授權人的權利與義務：
在美國授權博碩士論文予 UMI 公司(博碩士論文全文資料發行公司)製作發行，須交付美金 45 元的出版費，銷售年逾七件以上時得享收入 10% 的權利金約美金 20 元；在國內本計畫之經費全數由政府支應，收入亦應歸國庫，為答謝您的支持，科資中心特為您提供新台幣 500 元的等值資料服務(以研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔為限)，請逕洽本案聯絡人，地址電話詳如第 5 項。義務方面唯一要注意是，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可以授權其他自然人或法人上述的行為。
4. 全國博碩士論文全文資料微縮片整合計畫的宏觀效益：
在個人方面，您的論文將可永久保存(微縮技術在理論上可保存八百年，實證已逾百年)，也因為您的授權，使得後進得以透過電腦網路與光碟多管道檢索，您的論文將因而被充分利用。在國家總體利益方面，紙本容易因影印而造成裝訂上的傷害，圖書館中孤本的公開陳列與外借也有破損之虞，唯有賴政府全面性的整合，借助科技設備才能一舉完成保存與利用的全方位效益，回憶您過去尋找資料之不便經驗，學弟與學妹確實須要您的論文與授權書。
5. 本案聯絡電話：(02)7377746 江守田、王淑貞
地址：台北市和平東路二段 106 號 17 樓 1702 室

研究生姓名：吳美香 聯絡電話：(04) 8852302

地址：彰化縣溪湖鎮太平街 56 號

本論文為中山醫學院授與理學碩士學位之必備條件之一，經中山醫學院營養科學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

私立中國醫藥學院營養系副教授

沈立言 博士

沈立言

私立中山醫學院營養系教授

李宗貴 博士

李宗貴

私立中山醫學院營養系教授

陳暉雯 博士

(論文指導教授)

陳暉雯

中華民國八十六年六月

學生吳美香論文題目為飲食中脂質的量及種類對於老鼠
肝中細胞色素 P-450 之調節，其論文已經中山醫學院營養
科學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過，並
由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：陳暉雯 博士

簽名：陳暉雯

中華民國八十六年六月

誌謝

回首求學生涯二十載，晃如昨日，歷歷在目，有波折、有辛勞、有歡樂，都即將在此劃下休止符。井底之蛙永遠不知天下之大，離開古井始知自己識見短淺。告誡著我，學海無涯，廣博浩瀚，離開學校不是學問的終止，而是另一種學習的開始。

感謝指導教授陳暉雯博士於課業、實驗以及論文寫作上悉心指導與教誨，師恩浩瀚，永懷難忘。文稿初成，復蒙沈立言博士及李宗貴博士詳加批閱斧正，並提供許多寶貴意見及改進建議使論文更臻完善，謹以卷首致由衷感謝。

本實驗蒙李暉老師提供設備完善的超高速離心機，使實驗能夠順利進行，在此獻上最誠摯的謝意。

實驗進行期間，感謝王世宗學長、歐珠琴學姊熱心教導，感謝Hitachi公司洪煥琛學長於儀器分析之操作指導，並感謝振宇、俊茂、晉慧在實驗及課業上之切磋勉勵，也感謝明才、韻蘭、玉珍、威撒、科銘、國鋒對本實驗付出許多心力，使實驗能順利完成，在此致上最誠摯的謝意。同時感謝系上老師的照顧及寶貴意見，並感謝好友民瑋、俊明、筱雯、中丕、金恩給我精神上的支柱，在此一一致謝。

感謝父 母親二十多年來對我的付出與呵護，及感謝家人的支持及鼓勵，使我能順利的完成碩士學位。最後願將此成果與所有關心我的人分享，並獻給我最敬愛的 母親。

目錄

| | 頁次 |
|---|----|
| 中文摘要..... | 1 |
| 英文摘要..... | 3 |
| 文獻回顧..... | 6 |
| 材料與方法..... | 18 |
| 一、材料..... | 18 |
| 二、方法..... | 19 |
| (一) 動物飼養..... | 19 |
| (二) 飼料中油脂的脂肪酸分析..... | 20 |
| (三) 肝臟磷脂質脂肪酸分析..... | 21 |
| (四) 肝臟微粒體的製備..... | 22 |
| (五) 蛋白質濃度測定..... | 23 |
| (六) 肝臟 total cytochrome P450 content 之測定..... | 24 |
| (七) 肝臟 cytochrome P450 reductase 之測定..... | 24 |
| (八) 肝臟 N-nitrosodimethylamine (NDMA) demethylase 活性 之測定..... | 25 |
| (九) 肝臟 Pentoxyresorufin O-Deakylase 活性之測定..... | 26 |
| (十) 肝臟 Glutathione S-Transferase (GST) 活性分析..... | 27 |
| SDS-聚丙烯胺板膠電泳法及西方墨點法..... | 28 |
| 統計分析..... | 33 |
| 結果..... | 34 |
| (一) 本實驗飼料組成..... | 34 |
| (二) 本實驗飼料中油脂的脂肪酸組成..... | 34 |
| (三) 不同油脂在 saline 處理下對於老鼠生長情形的影響.... | 34 |
| (四) 不同油脂在 Phenobarbital 處理下對於老鼠生長情形的 影響..... | 35 |
| (五) 不同油脂在 Acetone 處理下對於老鼠生長情形的影響.. | 35 |
| (六) 不同油脂在 Saline 處理下對於老鼠肝臟磷脂質脂肪酸組 成的影響..... | 35 |
| (七) 不同油脂在 phenobarbital 處理下對於老鼠肝臟磷脂質 脂肪酸組成的影響..... | 36 |
| (八) 不同油脂在 Acetone 處理下對於老鼠肝臟磷脂質脂肪酸 組成的影響..... | 37 |
| (九) 不同油脂在 Saline 處理下對於老鼠肝臟微粒體及細胞質 酵素的影響..... | 38 |
| (十) 不同油脂在 phenobarbital 處理下對於老鼠肝臟微粒體 及細胞質酵素的影響..... | 38 |

| | |
|--|----|
| (十一) 不同油脂在 Acetone 處理下對於老鼠肝臟微粒體及細胞質酵素的影響..... | 39 |
| (十二) 不同油脂在 Saline、Phenobarbital、Acetone 處理下，對於老鼠肝臟微粒體 P-450 IIB1 apoprotein 的影響..... | 39 |
| (十三) 不同油脂在 Saline、Phenobarbital、Acetone 處理下，對於老鼠肝臟微粒體 P-450 IIE1 apoprotein 的影響..... | 39 |
| 討論..... | 41 |
| (一)不同油脂對於老鼠生長情形的影響..... | 41 |
| (二)不同油脂在對於老鼠肝臟磷脂質脂肪酸組成的影響..... | 43 |
| (三)不同油脂在對於老鼠肝臟微粒體及細胞質酵素的影響..... | 44 |
| 結論..... | 50 |
| 表次..... | 51 |
| 圖次..... | 62 |
| 參考文獻..... | 64 |

中文摘要

本研究主要目的在於探討飲食中油脂量及來源對於大鼠肝臟微粒體解毒酵素系統的影響。實驗對象為四週齡的雄性 Sprague-Dawley 大鼠，首先餵食 AIN-76 diet 四天，接著空腹二天，將老鼠分為 saline、phenobarbital(75mg/kg)、丙酮(5ml/kg)三種處理組，每個處理組下分別給予六種不同飲食餵食四天，phenobarbital、saline 處理組從給予個別飲食第二天起分別連續腹腔注射三天，而丙酮處理組於大鼠犧牲前一天灌食，以誘發肝中解毒酵素系統的活性。最後以斷頭法將大鼠犧牲，取出肝臟將微粒體製備貯存。本實驗分析肝臟磷脂質脂肪酸組成及 glutathione S-transferase (GST)活性並分析微粒體中 P450 總量、P450 reductase、P450 II B1、P450 II E1 活性。

結果顯示：在三種不同處理下，飲食中給予不同油脂對於大鼠的生長狀況、肝臟磷脂質脂肪酸組成及微粒體酵素系統均有顯著影響 ($P < 0.05$)。P450 總量在 saline 處理組除餵食橄欖油組外均顯著高於無脂肪組 ($P < 0.05$)；在 phenobarbital 處理下，20%油脂攝取組均顯著高於無脂肪組 ($P < 0.05$)；在丙酮處理下，除玉米油組外，其他油組均顯著高於無脂肪組 ($P < 0.05$)。P450 reductase 在 saline 處理下，除餵食玉米油組外，牛油、橄欖油組顯著低於無脂肪組而亞麻油、鯊魚油組顯著高於無脂肪組 ($P < 0.05$)；在 phenobarbital 處理下，除橄欖油及玉米油組外其他油組與無脂肪組比較均顯著較高 ($P <$

0.05)；在丙酮處理下，僅亞麻油組及鯊魚油組顯著高於無脂肪組 ($P < 0.05$)。P450 II B1 活性在 saline 處理下，僅鯊魚油組顯著高於無脂肪組 ($P < 0.05$)；在 phenobarbital 處理下，除玉米油外，其他油組顯著高於無脂肪組 ($P < 0.05$)；在丙酮處理下，僅亞麻油組及鯊魚油組顯著高於無脂肪組 ($P < 0.05$)。P450 II E1 活性在 saline、phenobarbital 處理下，除橄欖油組外，其他油組均顯著高於無脂肪組 ($P < 0.05$)；在丙酮處理下，除橄欖油及玉米油組外，其他油組均顯著高於無脂肪組 ($P < 0.05$)。GST 活性在 saline 處理下，各組間均無顯著差異；在 phenobarbital 處理下，20%油脂攝取對 GST 活性有明顯提升作用 ($P < 0.05$)；在丙酮處理下，僅亞麻油組及鯊魚油組顯著高於無脂肪組 ($P < 0.05$)。

由以上結果證實，高油脂量及不同油脂來源確實會改變肝中解毒酵素系統活性，其中以富含 n-3PUFA 的亞麻油和鯊魚油組最為顯著。

ABSTRACT

The main objective of this study was to investigate the effects of amount and type of dietary fat on rat hepatic cytochrome P-450 activity. Weaning male Sprague-Dawley rats were fed AIN-76 diet for four days followed by two days of fasting. Seventy-two rats were randomly assigned to three groups of twenty-four rats each. Each group was subdivided into six subgroups receiving zero (fat free) or 20% fat. Three groups of rats were subjected to the following treatments: group 1, no inducer (vehicle only); group 2, intraperitoneal injection of phenobarbital at a daily dosage of 75mg/kg body weight for three days before killing; group 3, an intragastric administration of acetone (5ml/kg body weight) one day before killing. Following decapitation, liver microsomal and cytosolic fractions of rats were prepared. Hepatic phospholipid fatty acid composition, GST activity, microsomal total P-450 content, P-450 reductase, P-450 IIB1, P-450 IIE1 activities were determined.

Results showed that dietary fat significantly affect growth, hepatic phospholipid fatty acid composition and microsomal enzyme activities under three different treatments ($p < 0.05$). Except olive oil, rats fed 20% fat had significantly greater hepatic total P-450 content than rats fed fat-free diet in saline treatment ($p < 0.05$). In phenobarbital treatment, rats fed 20% fat had significantly greater hepatic total P-450 content than rats fed fat-free diet ($p < 0.05$). Except corn oil, rats fed 20% fat had significantly greater hepatic total P-450

content than rats fed fat-free diet in acetone treatment ($p < 0.05$). In saline treatment, rats fed linseed and menhaden oil diets had significantly greater P-450 reductase activity than rats fed fat-free diet ($p < 0.05$). Except olive oil and corn oil, rats fed 20% fat had significantly greater P-450 reductase activity than rats fed fat-free diet ($p < 0.05$). In phenobarbital and acetone treatments, rats fed linseed and menhaden oil diets had significantly greater P-450 reductase activity than rats fed fat-free diet ($p < 0.05$). In saline treatment, P-450 IIB1 activity of rats was significantly greater in menhaden oil group than in fat-free group ($p < 0.05$). Except corn oil, rats fed 20% fat had significantly greater P-450 IIB1 activity than rats fed fat-free diet ($p < 0.05$) in phenobarbital treatment. In acetone treatment, rats fed linseed and menhaden oil diets had significantly greater P-450 IIB1 activity than rats fed fat-free diet ($p < 0.05$). Except olive oil, rats fed 20% fat had significantly greater P-450 IIE1 activity than rats fed fat-free diet in the saline and phenobarbital treatments ($p < 0.05$). Except olive oil and corn oil, rats fed 20% fat had significantly greater P-450 IIE1 activity than rats fed fat-free diet in the acetone treatment ($p < 0.05$). In the saline treatment, amount and type of dietary fat had no effect on GST activity. In phenobarbital treatment, 20% fat significantly increased GST activity compared to fat-free ($p < 0.05$). In acetone treatment, linseed and menhaden oil significantly increased GST activity compared to fat-free ($p < 0.05$).

The results suggest that the amount and type of dietary fat may modulate the activity of hepatic cytochrome P-450 especially the

linseed and menhaden oils.

文獻回顧

一、生物轉化酵素系統 (Biotransformation enzyme systems) 與藥物代謝

Xenobiotic-biotransformation enzymes 廣泛地分佈於全身組織，而且也存在於很多的細胞間質中。尤其肝臟是動物體內進行藥物代謝及解毒的主要器官，也是這些 biotransformation enzyme systems 的主要存在區域。藥物或毒物等外來物從腸道吸收後由門脈系統將這些物質運送到肝臟，在此進行代謝清除作用。除肝臟外，這些酵素系統也位於皮膚、肺、鼻黏膜細胞、眼睛及腸胃道。

生物轉化酵素系統催化外來物的作用主要在細胞的內質網或細胞質中，少部分則在粒腺體、細胞核及溶小體中進行，其代謝作用主要分為兩個階段(Phase I 及 Phase II)。Phase I biotransformation enzyme system 的代謝作用包括氧化、還原及水解，這些反應可視為功能性反應(functionalization reactions)，其反應產物可作為 Phase II 代謝作用之受質 (Anders, 1985 ; Guengerich and Liebler, 1985)。Phase I biotransformation enzyme system 首先改變 xenobiotic 現有的功能基，使這些產物較易溶於水。而 Phase II biotransformation enzyme system 則是合成反應(synthetic reaction)，是將內生性的 sulfate、glucuronic acid、amino acids 或是 glutathione 等水溶性小分子接合上既有或是經 Phase I 作用生

成的新的功能基，增加這些物質的水溶解性使得這些物質易於排出體外(Paulson et al., 1986)。

肝臟微粒體中 cytochrome P-450 是主要 Phase I 酵素，P-450 在固醇類荷爾蒙、膽酸、脂溶性維生素、脂肪酸、前列腺素、藥物之代謝扮演重要角色。P-450 酵素是一種含鐵蛋白 (heme-containing protein)，其 heme iron 的型式通常為 ferric (Fe^{3+})，當還原成 ferrous (Fe^{2+}) 時，P-450 會結合配位子 (ligand) (如氧、一氧化碳)，此時 ferrous P-450 及一氧化碳複合物最大吸光值大約在 450 nm 附近，因此以 cytochrome P-450 命名。cytochrome P-450 催化之基本反應是 monooxygenation，將氧原子併入受質，再由 NADPH 獲得電子將受質形成具有氫氧基複合物及水的過程 (Guengerich, 1991)。

Phase I biotransformation enzyme system 中 P-450 酵素系統又稱 mixed function oxidases，其功能單位除 P-450 酵素本身外尚包括有 NADPH cytochrome P-450 reductase。除了 P-450 系統外，Phase I biotransformation enzyme 尚包含有另一系統稱為 monoamine oxidases 與 P-450 最大的不同是 monoamine oxidases 利用 FADH_2 當作氫的提供者而不是 NADPH。它們的反應包括有 xenobiotics 之水解、還原及氧化等生物轉化作用，使 xenobiotics 的親水性增加利於快速排出或利於 Phase II biotransformation 的反應。

Phase II biotransformation enzyme system 主要分佈在肝細胞細胞質中，包含的酵素有 sulfotransferase、UDP-

glucuronosyl transferase、glutathione S-transferase、N-acetyltransferase、amino acid conjugation、methylation。其反應包括 glucuronidation、sulfation、acetylation、methylation、及與 glutathione 或氨基酸的結合。Phase II biotransformation enzyme system 作用後可顯著增加 xenobiotic 的親水性，因此大幅提升外來物被排除出體外的機率，其代謝已被視為一種解毒機制(Paulson et al., 1986)。

但最近也有研究顯示 Phase II 的酵素催化作用亦可為一種生物活化作用 (bioactivation reactions)。例如：sulfate、glucuronide conjugate 的形成對 N-hydroxy acetylaminofluorene 即是一種生物活化作用 (Hanna and Banks, 1985)。至於在 Phase II 的代謝途徑中，glutathione conjugate 生成物代謝轉變形成 cysteine S-conjugate 以及 cysteine conjugate N-acetylation 一般也被視為一種解毒機制，然而，最近研究也顯示 glutathione conjugate 的形成在很多 xenobiotics 的生物活化作用扮演起始者的角色，其代謝中間產物具有毒性或致突變性 (Anders et al., 1988; Dekant et al., 1988, 1989)。除此外，亦有文獻指出，Phase I 酵素也是生物活化作用的起始者，在許多致癌物的轉化過程中是需要 cytochrome P-450 參與的，如 Czygen 等人(1973) 研究即指出 dimethylnitrosamine 被代謝或活化成致突變物的過程有 cytochrome P-450 的參與。

二、飲食因子影響生物轉化酵素系統和藥物代謝能力的機制

飲食和營養素是可調節藥物代謝的因子 (Anderson et al., 1985 ; Bidlack et al., 1986) 。飲食因子可以影響藥物在體內的吸收、分布並且改變 Phase I 及 Phase II 代謝這些化合物的能力。飲食因子影響生物轉化酵素系統和藥物代謝的可能機制如下 (Yang and Yoo, 1988) :

1. 改變 P-450 的組成。

很多飲食因子如蛋白質中的胺基酸 (例如 : 色胺酸) 、十字花科蔬菜中的 indoles 、及燒烤食物中的多環碳氫化合物 , 都已知是特定 P-450 isoenzymes 的誘發者 , 攝入這些化合物會誘發特定的 P-450 isoenzymes 。也有某些飲食因子或環境中的化學物可能會造成選擇性不活化某些特定 P-450s , 而這些不活化作用有可能是改變細胞膜上 P-450 isoenzymes 組成所引起。因為不同的 P-450 isoenzymes 具有不同的受質。所以改變位於微粒體膜上 P-450 isoenzymes 的組成 , 預期可以改變某些藥物的代謝速率 , 但對其他藥物的代謝則沒有影響。所以透過飲食因子改變位於微粒體膜上 P-450 isoenzymes 的組成 , 是可能和一些特定藥物代謝及其代謝途徑有關。

2. NADPH-P-450 Reductase(P-450 還原酵素)活性、NADPH 濃度的改變及其他因素。

由於核黃素是 FAD 及 FMN 的前驅物 , FAD 和 FMN 則是

NADPH-P-450 reductase 的 coenzymes，所以特定的飲食狀況如核黃素的缺乏或攝入核黃素拮抗劑，可能會造成 NADPH-P-450 reductase 活性下降。NADPH-P-450 Reductase 活性的下降將阻礙電子從 NADPH 到 P-450 的傳遞，導致 monooxygenase 的活性被抑制。

除了核黃素外，NADPH 的可利用率也是影響 MFO 活性的重要因子。胞內 NADPH 可由三個來源提供：六碳醣磷酸路徑的葡萄糖六磷酸脫氫酵素（glucose-6-phosphate dehydrogenase）、檸檬酸循環的異檸檬酸脫氫酵素(isocitrate dehydrogenase)及林擒酸脫氫酵素(malic dehydrogenase)。在大部份的組織中，六碳醣磷酸路徑是提供 NADPH 的主要途徑，由葡萄糖六磷酸（glucose-6-phosphate）和葡萄糖六磷酸脫氫酵素將 NADP 還原而形成 NADPH。除此外，葡萄糖六磷酸的可獲率也和血醣濃度、肝醣貯存、醣質新生作用有關。

胞內在一些特定狀況下，例如氧化緊迫時，由於大量氧化態 GSH 的生成，此時 NADPH 將被 glutathione reductase 用來將氧化態 glutathione 還原為還原態 glutathione，此時 NADPH 的供應可能是 MFO 活性的限制因子。

三、飲食中油脂對於生物轉化酵素系統的影響

1. 飲食中油脂對於膜構造的影響

Cytochrome P-450 是受質及氧結合時所在，而 P-450 reductase 則是電子攜帶者，可將電子從 NADPH 傳至 cytochrome



P-450 上。至於膜中磷脂質則可加速電子從 NADPH cytochrome P-450 reductase 轉移到 cytochrome P-450(Lu et al., 1976) 。唯有當 phosphatidylcholine 存在時，電子從 NADPH 轉移到細胞色素 P-450 才能使受質產生 hydroxylation 的反應(Coon et al., 1971; Strobel et al., 1970) 。

Cytochrome P-450 存在於肝臟細胞的內質網上，而內質網乾重的 30-40 % 是油脂構成，大部分是以磷脂質的形式存在 (Siekevitz, 1963) 。Phase I biotransformation enzyme system 是一個 membrane-bound enzyme system ，所以膜的構造對於 cytochrome P450 與受質間的結合是相當重要的。膜上磷脂質的改變能影響藥物代謝速率，所以肝細胞中內質網上的磷脂質對於維持膜上酵素活性扮演重要的角色 (Ingelman-Sundberg and Gustafsson, 1975) 。因此位於微粒體膜上之藥物代謝酵素可藉由磷脂質的質與量來調控(Choi et al., 1992) 。

大部分的研究均指出不論有無 P-450 inducers 的存在，飲食中的油脂對於 xenobiotic 代謝都扮演著重要的角色。藉由飲食中不同的脂肪酸組成可改變微粒體膜的流動性及調節微粒體膜上的酵素活性，因為微粒體膜之流動環境可改變電子從 NADPH 轉移到 cytochrome P-450 及調節微粒體混合型功能氧化系統是否處在一個 active form 的情形下 (Lu, 1976 ; Yang, 1975 & 1977) 。

磷脂質是脂質雙層膜的主要成分，其流動性受脂肪酸組成影響(Castuma et al., 1983)。當 n-3 、 n-6 PUFA 連接到磷脂質之

C-2 位置時，可影響膜的流動性(Davison and Wills, 1974 ; Hammer and Wills, 1979 ; Iritani and Fujikawa, 1982)。1983 年 Brenner 以及 Catsuma 認為雙鍵鍵結指數增加與增加膜的流動性及細胞質 UDP-glucuronyltransferase 的活性有關，因膜流動性增加提供了一個更適合之環境讓混合型功能氧化酵素及 glucuronidation 之酵素能夠交互作用。而且電子由 NADPH 經 NADPH cytochrome P-450 reductase 流向 cytochrome P-450 之速率隨著雙鍵指數增加而增強 (Yang, 1975 & 1977)。當帶有較長鏈多元不飽和脂肪酸的磷脂質及 phosphatidylcholine 存在時，細胞膜會具有較高的流動性，因而造成細胞質 UDP-glucuronyltransferase(UDPGT)活性增強 (Castuma and Brenner, 1983)。

另外，也有報告指出油脂中的不飽和程度對於未經誘發劑處理的 cytochrome P-450 酵素活性有影響。例如：飲食中含有較多 PUFA 的魚油能增加肝臟微粒體對於外來物代謝的能力(Yang et al., 1993)。改變飲食中 n-6/n-3 脂肪酸比例，對於未經誘發劑以及經由 phenobarbital 誘發混合型功能氧化酵素活性也有顯著影響(Saito, 1994)，研究顯示 n-3 及 n-6 PUFA 在有或無 phenobarbital 處理下，混合型功能氧化酵素均提升，將 P/S 比例固定及降低 n-6/n-3 比例，phenobarbital 誘導混合型功能氧化酵素活性更顯著增加。(Saito, 1994)。n-3 不飽和脂肪酸(EPA 及 DHA)比一般 n-6 不飽和脂肪酸具有更多的雙鍵及較長的碳鏈，因而可增加微粒體膜之流動性，使膜上混合型功能氧化酵素之結

構更具彈性，進而增加混合型功能氧化酵素活性。(Castuma and Brenner, 1983; Muriana and Ruiz-Gutierrez, 1992; Stubbs and Smith, 1984; Zakim and Vessey, 1975)。

除了 cytochrome P-450 受到飲食中脂質影響外，1991 年 Cave 也證實飲食中的脂質可改變前致癌物之代謝作用，並推論是因細胞內的結合(binding)或催化代謝作用(catalysis)受到改變所致。因此推論 n-3 脂肪酸能藉由增加 phase II enzyme 活性來保護或降低化學致癌物生成。

2. 飲食中油脂對 cytochrome P-450 生合成的影響

另外，油脂可以影響 Phase I biotransformation enzyme system 也有可能是透過影響 cytochrome P-450 的生合成所致，其影響層次可能是在轉錄 (transcription) 或轉譯 (translation) 或是蛋白質合併進入膜的過程中 (Yang and Yoo, 1988)。Wade and Norred (1973) 即指出飲食中脂質在藉由 phenobarbital 的處理下，加強 P-450 酵素活性，應是作用在轉錄層次。而 Yoo 等人於 1990 年也證實酵素活性可由轉錄、轉譯、mRNA 或 protein 之穩定性所決定。

3. 飲食中油脂對於 cytochrome P-450 酵素活性的影響

由於多種化學物質的親脂特性，例如有機氯化物殺蟲劑、除草劑等，在進入體內後會傾向聚集在脂肪組織很長一段時間。對於這些化合物在脂肪組織之分佈及從脂肪組織游離出再進入

血液中，化合物在肝中之代謝及從體內之排出速率是重要的影響因子。因此 1995 年 Umegaki 等人的實驗，在給予老鼠不同油脂下觀察他們對於 pentachlorobenzene(PECB)排出及代謝的影響，結果顯示：餵食魚油老鼠比餵食豬油、大豆油老鼠有較少的脂肪組織重，而較少的脂肪組織重可減少 PECB 在組織中之聚積，因此而加速 PECB 在肝中的代謝。除此外，也有學者證實飲食中的脂質的確可影響脂肪組織重(Parrish et al., 1990)及肝中藥物代謝酵素之活性(Saito et al., 1990; Yang et al., 1993; Yoo et al., 1992)。

從飲食中食入較多的多元不飽和脂肪酸(18:2n-6, 18:3n-3, 20:5n-3, 22:6n-3)，會刺激肝臟微粒體混合型功能氧化酵素系統(Saito et al., 1990)。1979 年 Hammer 及 Wills 進行實驗，給與老鼠含椰子油、豬油、玉米油、鯡魚油飲食 25 天，其脂肪酸組成分別為 7.6%、10.3%、25.1%的亞麻油酸及 5.1%亞麻油酸與 27.2% n-3 PUFA，並以甲醛的生成作為去甲基速率的指標，結果顯示：不同油脂的確可影響肝中微粒體的去甲基速率，其中以餵食鯡魚油組的去甲基速率 6.53 nmol/min/mg protein 最高。因此證實飲食中亞麻油酸在肝臟微粒體調節氧化去甲基作用上扮演著重要角色，但其角色可被飲食中 20:5n-3，22:6n-3 脂肪酸所取代。

飲食中 18:2n-6 增加，cytochrome P-450 總量會增加，而 18:3n-3 也有類似情形，因此暗示著 18:3n-3 會影響肝臟微粒體混合型功能氧化酵素活性。1973 年 Century 的實驗，給予亞麻

油(linseed oil)其中富含 18:3n-3，也有相似的結果。高比例的飽和脂肪酸，可降低肝臟微粒體混合型功能氧化酵素活性，可能暗示著相對於飽和脂肪酸適當比例的 18:2n-6, 18:3n-3 是肝臟微粒體混合型功能氧化酵素能正常運作所必需的(Saito et al., 1990)。

1993 年 Saito and Yamaguchi 實驗中，探討老鼠餵食含不同百分比的亞麻油酸，並在 phenobarbital 誘發下，對於混合型功能氧化酵素活性的影響。結果顯示，混合型功能氧化酵素系統活性不會隨飲食中亞麻油酸增加而增加，然而飲食中亞麻油酸增加，P/S 比例及雙鍵指數增加，確實可導致微粒體膜流動性增加，使混合型功能氧化酵素結構更 flexible。

肝臟微粒體在給予無脂肪或低脂肪飲食時，微粒體膜會有較高的 16:1n-7, 18:1n-9 脂肪酸，較低的 18:2n-6, 20:4n-6 脂肪酸，因此膜流動性會降低，混合型功能氧化酵素活性亦降低(Wade and Norred, 1976)。Yoo 等人更於 1992 年證實餵食 25% corn oil 老鼠其 enflurane 代謝速率比餵食 0.5% corn oil 老鼠高二倍，結果顯示飲食中之脂質可調節 P450 酵素活性。

四、Acetone 及 Phenobarbital 誘發 Cytochrome P-450 的機制

1981, 1983 年 Tu 等人證實飢餓、酒精攝取及 streptozotocin 誘發之糖尿病三種情形，會誘發老鼠肝臟微粒體 NADPH-dependent NDMA demethylase 活性，此現象學者認為是特定 P-450 isoenzyme 受到誘發所致。接著 Miller 以及 Yang 於 1984

年實驗證實飢餓時可增加老鼠內生性丙酮生成，而飢餓時內生性丙酮與 NDMA demethylase 活性之關係，經由二項實驗證實，飢餓時 NDMA demethylase 活性顯著高於丙酮處理組，飢餓時內生性丙酮顯著低於丙酮處理組其血中丙酮的量，因此作者由以上結果推論因飢餓而產生的丙酮不能完全解釋可誘發 NDMA demethylase 活性。1986 年 Song 等人實驗證實丙酮誘發 P1E1 蛋白質約 6 倍，但並沒有增加 P1E1 mRNA，因此推論 P-450 調節機制為 post-transcription。而丙酮誘發 P1E1 蛋白質可能是轉譯速率的增加或蛋白質的分解降低，因此 Song 等人接著進一步探討轉譯速率的增加或蛋白質的分解降低是否為誘發 P1E1 之機制？他們分別利用單株抗體及 $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ 或 $[^3\text{H}]$ leucine，測 P1E1 的合成及分解速率。結果顯示：丙酮誘發 P1E1，主要是增加 P1E1 蛋白質之穩定性。由於丙酮也是 P1E1 的受質，所以 Song 等人認為這可能是受質誘發酵素的穩定性。

1992 年 Waxman 及 Azaroff 證實 phenobarbital 誘發 CYP 1B1 及 CYP 1B2 之機制是啟動轉錄。1996 年 Agrawal 及 Shapiro 給予雄性及雌性老鼠不同劑量的 phenobarbital (1mg、10mg PB/day)，探討 phenobarbital 對於 CYP 1B1 mRNA 及 CYP 1B2 mRNA 的影響，結果顯示，phenobarbital 可誘發 CYP 1B1 mRNA 及 CYP 1B2 mRNA 的量，且雄性老鼠體內所誘發的程度顯著高於雌性老鼠。除了 mRNA 表現外，實驗也證實雄性老鼠 CYP 1B1、1B2 蛋白質的表現也顯著高於雌性老鼠。因此作者認為不同性別間不同激素的分泌可能是造成不同結果的原因，其中生長激素分泌形

態的不同是最有可能的原因之一，雌性老鼠持續分泌的生長激素比雄性老鼠間歇性分泌的生長激素能更有效的抑制 CYP 11B 之誘發。雖然生長激素抑制 phenobarbital 誘發 11B1 或 11B2 之實際角色到目前為止仍不清楚，但生長激素可能是藉由影響轉錄之減材 (splicing)，RNA 之轉運及穩定性，mRNA 之轉譯，轉譯酵素之活性來調節 P-450 基因的表現。換句話說，生長激素可調節 CYP 11B 轉錄及蛋白質的合成及穩定性，進而影響 P-450 基因的表現。依此觀點，作者也進行 CYP 11B1、11B2 mRNA 及蛋白質分析，了解 CYP 11B 的合成及分解。結果顯示：phenobarbital 誘發 11B1 完全增加於 mRNA 層次，而 CYP 11B2 轉譯增加於蛋白質合成，因此由以上結果 Agrawal 等人證實性別之差異性可影響 phenobarbital 誘發 CYP 11B1 的機制是在 mRNA 層次，或是影響 CYP 11B2 在蛋白質合成層次，因此可知 phenobarbital 對於 CYP 11B1 與 CYP 11B2 的作用是不同的。

五、本實驗動機：

過去本實驗室，曾發現飲食中不同油脂可顯著影響老鼠肝中微粒體蛋白質的濃度。由於細胞色素 P-450 是微粒體中主要蛋白質，且在藥物代謝上扮演重要角色，因此本研究針對油脂量及各種不同油脂，探討它們對於微粒體中 cytochrome P-450 活性的影響。

材料與方法

一. 材料

- (一) KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , KCl , Ethylene-diaminetetraacetic acid (EDTA), NaOH , Albumin Bovine (BSA), Potassium Sodium Tartrate (Na-K-tartrate), Folin & Ciocalteu's, Sodium Hydrosulfite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, Reduced form (β -NADPH), Magnesium Chloride, Trizama Base (Tris), Barium Hydroxide, Zinc Sulfate, Acetylacetone, N-Nitrosodimethylamine (NDMA), 7-pentoxyresorufin (POD), Resorufin, Dimethylsulfoxide (DMSO), Reduced Glutathione (GSH), 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) 等購自 Sigma Chemical Co.
- (二) Trichloroacetic acid (TCA), Na_2CO_3 , CuSO_4 , Cytochrome c 等購自 Merck Chemical Co.
- (三) Acetic acid, Benzene, Hexane 等購自 Fisher Scientific Chemical Co.
- (四) Ammonium acetate (和光純藥工業株式會社), Potassium Carbonate (K_2CO_3) (和光純藥工業株式會社), Methanol (Tedia Company, Inc.), Acetyl Chloride (Janssen Chemical), Chloroform (Tedia Company, Inc.), Diethylether (Tedia Company, Inc.), Acetone (Tedia Company, Inc.)
- (五) 飼料成分
1. Casein, Corn starch, Cellulose, Choline Bitartrate, DL-

Methionine, Corn oil, Olive oil, Beef tallow 等購自 Teklad, Madison, WI.

2. AIN vitamin mixture, AIN mineral mixture, Menhaden oil, Linseed oil 等購自 ICN Biomedicals, Inc.

3. Phenobarbital 購自 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.

二、方法

(一) 動物飼養

本實驗採用 Yoo et al. (1990) 所提出之方法，雄性離乳 Sprague-Dawley rats，體重 90-100 克，首先老鼠餵食 AIN-76 diet 4 天，接著空腹 2 天，然後將老鼠分成三大組，各組老鼠再分成六小組，每組 4 隻，每隻老鼠獨立飼養在一個不銹鋼網籠中給予含不同油脂的飲食 4 天，老鼠飼料與水以任食方法給予。由於 Phenobarbital (PB) 有誘發 Cytochrome P450 IIB1 及 IIB2 活性的作用，所以一大組老鼠 (24 隻) 給予腹腔注射 PB (9g/L saline)，劑量為每天每公斤體重 75mg，犧牲前連續注射 3 天。而 Acetone 可誘發 Cytochrome P450 IIE1，因此另外 24 隻老鼠，則在犧牲前一天給與胃管灌 acetone (25%)，劑量為每公斤體重 5 毫升。其餘 24 隻老鼠則當作是對照組，由腹腔注射 saline，動物房溫度控制在 22 ± 1 °C，光照時間 8:00-

20:00，實驗開始及結束時分別稱量體重。老鼠以斷頭方式犧牲，取出肝臟，其中部份肝臟（約 1 g）隨即放置於零下 80 °C 冷凍櫃待日後分析脂肪酸組成，其他部份進行微小體製備，製備完成的微小體放入零下 80 °C 冷凍櫃，待日後進行各項分析。而細胞質部份亦儲存於零下 80 °C 冷凍櫃中待日後分析 Glutathione S-transferase (GST) 活性。

本實驗採用 modified AIN-76 diet 作為實驗的飲食配方，配方成份列於表一。

（二）飼料中油脂的脂肪酸分析

採用 Morrison 和 Smith(1964)所描述的方法

取 0.25g Beef tallow, Olive oil, Corn oil, Linseed oil, Menhaden oil 溶於 10ml CH₂Cl₂:MeOH (2:1) 從中取出 0.5ml 以氮氣吹乾後加入 0.5ml 去離子水，再加入 0.4ml 50% KOH (W/V), 1.1 ml BHT(W/V in ethanol) 混合後置於水浴中皂化 1 小時。冷卻後以 5ml Petroleum ether 重覆萃取 2 次將上層液丟棄，下層液加入 3 滴 0.1% Bromphenol blue (in ethanol)，混合後加入濃鹽酸直到溶液呈黃色。再以 5ml Petroleum ether 重覆萃取 2 次收集上層液以氮氣吹乾。加入 1ml 14% BF₃ (w/v, in methanol)，置於沸騰水浴中 2 分鐘。取出冷卻後，加入

2ml n-hexane 萃取，收集上層液以氮氣吹乾。最後加入 50 μ l n-hexane 溶解後，以過濾膜過濾。取 1 μ l 注射於 GC 中測定脂肪酸成分。GC 系統包括：Gas Chromatograph G3000 (Hitachi Tokyo, Japan)，D-2500 integrator (Tokyo, Japan)，GC column: SP-2330 fused Silica capillary column 30m \times 0.25mmID，0.20 μ m film thickness (Supelco Bellefonte, PA)，以 nitrogen 為 carrier gas 管柱溫度為 150 $^{\circ}$ C 持續 8 分鐘後再以 3 $^{\circ}$ C/min 速度上升到 190 $^{\circ}$ C，injector 及 detector(FID)的溫度皆為 220 $^{\circ}$ C，所出現的 peaks 再與脂肪酸標準品 (Alltech, Deerfield, IL) 滯留時間作比較，每個脂肪酸百分比是以總面積之比來計算。各種不同油脂的脂肪酸比例列於表二。

(三) 肝臟磷脂質脂肪酸成分分析

使用 Lepage 及 Roy(1986)提出的方法

取 0.2g 肝臟加入 1.5ml CH₃Cl:MeOH (2:1)，充分均質後以濾紙過濾，再用氮氣吹乾後，加入 50 μ l CH₃Cl 將脂質萃取物充分振盪混合均勻。採用 TLC aluminum sheets (20 \times 20cm)，其上覆蓋 0.2mm silica gel 60 (Merck) 來分離脂質中各種不同成分，將脂質萃取物點在 TLC sheets 上。以 hexane/diethylether/formic acid (80:20:4, v/v/v) 展開液分離不同成分，待脂質萃取物中的各成分分離後取

出吹乾。噴上呈色液 2', 7'-dichlorofluorescein(0.1% w/v in methanol)，在 UV-light (366nm)照射下顯示出 phospholipid 的位置。將磷脂質部分刮下，收集在有蓋玻璃試管中，加入 2ml methanol:benzene (4:1, v/v)，充分混合。然後沿管壁慢慢加入 200 μ l acetyl chloride，蓋子鎖緊後充分振盪，置於 90-92 $^{\circ}$ C 水浴 1 小時。冷卻後加入 5ml 6% K₂CO₃ 混合均勻，在 3000 rpm 下離心 10 分鐘，取上層液以氮氣吹乾，加入 20 μ l n-hexane。取 1 μ l 注射於 GC 中測定。GC 的測定條件及計算方式同飼料中油脂脂肪酸分析。

(四) 肝臟中微粒體之製備

老鼠以斷頭方式犧牲，取其新鮮肝臟，先以 4 倍體積 (w/v) 的 0.01M potassium phosphate buffer，(pH 7.4 含 1.15% KCl) 均質，均質液先以 10,000xg，4 $^{\circ}$ C 下高速離心 30 分鐘，取上清液再以 100,000xg，4 $^{\circ}$ C 進行超高速離心 43 分鐘，取其沈澱物為微粒體部份，將所得之微粒體，加入 1ml 微粒體懸浮溶液(0.05M microsome suspension buffer, 含 1mM EDTA 及 potassium phosphate buffer, pH 7.6) 後，封存於 -80 $^{\circ}$ C。

(五) 蛋白質濃度測定

採用 Lowry et al. (1951) 所描述的方法。取 50 μ l 樣品加入等量 10% trichloroacetic acid (TCA), 靜置 30 分鐘, 使蛋白質沈澱。在 10,000 rpm 下離心 3 分鐘, 捨棄上清液。加入 300 μ l NaOH, 將蛋白質溶解。標準曲線製備: 配製牛血清白蛋白在分光光譜儀 280nm 下測其吸光值(假設為 0.493)。由於 280nm/cm 下 BSA 之理論標準值 ϵ 為 0.667, 因此 BSA 實際濃度為 $0.493/0.667=0.77\text{mg/ml}$ 。接著將 0.77mg/ml 的 BSA 配製成濃度為 0.5mg/ml 的最終濃度, 方法如下: 取 875 μ l BSA 溶液加入 125 μ l 8N NaOH 使成為 1N NaOH-BSA 溶液 (0.67mg/ml), 取 746.3 μ l BSA (0.67mg/ml) 再加入 253.7 μ l 1N NaOH, BSA 最後濃度為每 μ l 含有 0.5 μ g。

| | | | | | |
|-------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 0 | 4 | 8 | 12 | 24 |
| BSA(μ l) | 0 | 8 | 16 | 24 | 32 |
| 1N NaOH(μ l) | 100 | 92 | 84 | 76 | 52 |
| 最後體積 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

蛋白質樣品取 40 μ l 加 1N NaOH 60 μ l, 使最終的量為 100 μ l。加 200 μ l 去離子水及 100 μ l 反應液 (25% Na₂CO₃:2% Na-K tartrate:1% CuSO₄ 反應液=8:1:1), 在室溫靜置 10 分鐘。加 1ml Folin Ciocalteu reagent (Folin Ciocalteu

reagent:H₂O=1:19.5),混合均勻後在 37°C 水浴 20 分鐘,再放置室溫冷卻 10-15 分鐘。在分光光譜儀波長 660 nm 下測其吸光值並與標準曲線比較算出蛋白質濃度。

(六) 肝臟 total cytochrome P450 content 之測定

採用 Omura and Sato(1964)所描述的方法

由零下 80°C 冷凍櫃取出微粒體,將微粒體解凍並磨開,使其均勻分佈在微粒體懸浮溶液中,稀釋待測物溶液使其蛋白質濃度在 1.0-1.5mg/ml 左右。取 2ml 此微粒體懸浮液,加入約 1-2mg Na₂S₂O₄ 混合均勻。接著各取 1ml 置於 cuvette 中,同時置於分光光譜儀 reference cell 及 sample cell 中,作 400-500nm 之波長掃描,記錄 450nm 及 490nm 之吸光值。而後取出 sample cell 之 cuvette,使其慢慢的通入約 40 個一氧化碳氣泡,混合後,再進行 400nm-500nm 之波長掃描,並記錄 450nm 及 490nm 之吸光值。

計算公式如下: nmol/mg protein =

$$\frac{[(A_{450\text{nm}}-A_{490\text{nm}})_{\text{observed}}-(A_{450\text{nm}}-A_{490\text{nm}})_{\text{baseline}}]}{0.091*1.5}$$

(七) 肝臟 cytochrome P450 reductase 之測定

採用 Phillips and Langdon(1962)所使用的方法。

樣品製備同 total P450 content, 並稀釋待測物溶液使其

蛋白質濃度為 0.5mg/ml，於 1ml cuvette 中加入 240 μ l 0.5mM cytochrome c，30 μ l microsome protein (0.5mg/ml)，270 μ l 0.3M potassium phosphate buffer(pH 7.7)，混合後置於室溫下平衡 3 分鐘。接著加入 30 μ l 10mM NADPH，混合均勻後，於 550nm 波長下掃描記錄 3 分鐘內之吸光值變化。

計算公式如下： $\text{nmol cytochrome c /min/mg protein} = \frac{\Delta A_{550\text{nm}}}{3/27.7/0.015}$

(八) 肝臟 N-nitrosodimethylamine (NDMA) demethylase 活性測定

本實驗採用 Nash et al.(1953)所描述的方法。樣品製備同 total P450 content，並稀釋待測物溶液使其蛋白質濃度為 1mg/ml。於 1.5ml cuvette 中加入 100 μ l 100mM MgCl₂，100 μ l 1.5M KCl，400 μ l microsome protein (1mg/ml)，100 μ l 40mM NDMA，200 μ l 50mM Tris-HCl (pH 7.4)使總體積達 900 μ l。混合均勻後加入 100 μ l 100mM NADPH 於 37°C 下進行反應 10 min。加入 50 μ l 25% ZnSO₄ 及 50 μ l 飽和 Ba(OH)₂ 中止反應。(空白實驗則在加入 NADPH 前先加入中止反應試劑)。中止反應後以 1000 X g，離心 5min 取 0.7ml 上清液。加入 0.3ml 新鮮配製 Nash 氏液，其配方如下，5g ammonium acetate 及 0.1ml acetylacetone 溶於 6ml 3% acetic acid 中。混合後於 50°C

下作用 30 分鐘，最後以 412nm 測其吸光值，並以已知濃度
 甲醛做標準曲線定量之。

標準曲線配製如下：

| | | | | | | | |
|----------------|-----|------|------|------|-----|------|-----|
| 280nmole/ml 甲醛 | 0 | 0.01 | 0.02 | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 |
| 去離子水(ml) | 0.7 | 0.69 | 0.68 | 0.65 | 0.6 | 0.55 | 0.5 |
| 濃度(nmol) | 0 | 2.8 | 5.6 | 14 | 28 | 42 | 56 |

計算公式如下： $\text{nmol/min/mg protein} =$
 $(\text{sample-blank}) * 1.1 / 0.7 / 10 / 0.4$

(九) 肝臟 Pentoxoresorufin O-Depentylase 活性測定

本實驗採用 Lubet et. al. (1985) 所描述的方法。

樣品製備同 total P450 content，並稀釋待測物溶液使其
 蛋白質濃度為 1mg/ml。於 1.5ml cuvette 中加入 100 μ l
 500mM MgCl₂，400 μ l microsome protein (1mg/ml)，20 μ l
 1mM pentoxoresorufin，380 μ l 50mM Tris-HCl (pH 7.5)
 使總體積達 900 μ l。混合均勻後加入 100 μ l 2.5mM NADPH
 反應 5 分鐘。加入 200 μ l 5% ZnSO₄ 及 200 μ l 飽和 Ba(OH)₂ 中
 止反應。(空白實驗則在加入 NADPH 前先加入中止反應試
 劑)。然後以 1000Xg 離心 5min，取 0.5ml 上清液置於螢光
 分光光度計下進行掃描，記錄其光度變化(Excitation

$\lambda=522\text{nm}$, Emission $\lambda=586\text{nm}$) 。並以已知濃度 resorufin 做標準曲線定量之。

標準曲線配製如下:

| 濃度(μM) | resorufin(100,000pmol/cc) | Tris-HCl(pH7.5) |
|---------------------|---------------------------|-----------------|
| 0 | 0 | 1000 |
| 0.4 | 4 | 996 |
| 0.8 | 8 | 992 |
| 1.0 | 10 | 990 |

計算公式如下: $\text{pmol}/\text{min}/\text{mg protein} =$
 $(\text{sample-blank}) * 1.4/5/0.4 * 10^6$

(十) 肝臟 Glutathione S-Transferase (GST) 活性分析

利用 Habig et al. (1974) 所提出之方法

樣品製備同微粒體製備, 而採用超高速離心(100,000g, 43min) 所分離出的上清液即為 cytosolic fraction, 檢測蛋白質濃度及 GST 活性。反應液為 100mM 磷酸鉀緩衝液含 1mM GSH (pH 6.5) 。取 880 μl 反應液, 依序加入 20 μl 50mM 1-chloro-2,4 dinitrobenzene (CDNB)(溶於 100% ethanol) , 80 μl 10mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) 及 20 μl 經 100mM potassium phosphate buffer (pH 6.5) 稀釋 20 倍後的樣品。利用分光光度計(U-3000,

Hitachi, Tokyo, Japan)以 340nm 波長在 25°C 下測 3 分鐘記錄其吸光值變化，活性以 nmol CDNB conjugate formed/mg protein/min 表示。

SDS-聚丙烯胺板膠電泳法(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)及西方墨點法(Western blotting)

1.10% SDS-聚丙烯胺板膠之製備

A. 器材:

垂直式電泳組合: Mini-PROTEAN II (Bio-Rad)

a. 電泳夾板: 2 組

b. 製備凝膠固定盤

c. 玻璃片(長 × 寬 × 厚)

(1) 10.2cm × 8.3cm × 0.1cm-1 片

(2) 10.2cm × 7.2cm × 0.1cm-1 片

d. 電泳齒梳(comb)-1 個

e. spacer-共 2 條

B. 試劑及緩衝溶液:

a. 1.5M Tris-HCl (pH 8.8) 緩衝溶液

b. 10%(w/v) SDS 溶液

- c.過硫酸銨(ammonium persulfate , 10mg/ml)
- d.30%丙烯醯銨(acrylamide)-0.8%N,N' methylene-bis-acrylamide 溶液
- e.N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)
- f.0.5M Tris-HCl(pH 6.8) 緩衝溶液
- g.protein loading buffer (pH 6.8):取 0.5M Tris-HCl(pH 6.8) 10ml , glycerol 1.6ml, 10% (w/v) SDS 溶液 1.6ml, 2-mercaptoethanol 0.4 ml , 0.1% (w/v) bromophenol blue 0.2 ml, 最後加入 ddH₂O 至 8.0ml
- h.molecular weight standard:取 5 μ l low molecular weight standard (Bio-Rad) 加入 95 μ l SDS reducing buffer 再以 100°C 加熱 5 分鐘即可

C.製膠

a 裝置

將大小兩玻片(10.2cm \times 8.3cm \times 0.1cm, 10.2cm \times 7.2cm \times 0.1cm)洗淨, 烘乾拭淨後左右兩側利用兩條 spacer(8.8cm \times 0.95cm \times 0.1cm)為間隔固定於夾板中, 再將此夾板放置於 水平固定盤上, 使其夾板下方緊密與塑膠墊底接合, 而中空上方則準備容納凝膠

b 配製 10%聚丙烯銨的 Separating gel: (抽氣 10 分鐘)

取 2.5ml 1.5M Tris-HCl(pH 8.8) 緩衝溶液, 加入 0.1ml 10%(w/v) SDS 溶液, 新鮮配製的過硫酸銨(ammonium

persulfate, 10mg/ml) 50 μ l , 3.4ml 的 30% acrylamide-0.8% N,N' methylene-bis-acrylamide 溶液 , 5 μ l TEMED , 最後加入 ddH₂O 至總體積為 10ml 。將以上配製的凝膠溶液即時混均 , 並分別注入兩組夾板之玻璃中 , 並在膠面上覆蓋一層 H₂O-saturated iso-butanol 使膠面保持水平 , 於室溫下靜置 1 小時待凝膠界面形成倒掉 H₂O-saturated iso-butanol 部分再繼續做 stacking gel 。

c. 配製 4% 聚丙烯胺的 stacking gel:

取 1.25ml 0.5M Tris-HCl(pH 6.8) 緩衝溶液 , 加入 0.05ml 10%(w/v) SDS 溶液 , 新鮮配製的過硫酸銨(ammonium persulfate, 10mg/ml) 50 μ l , 0.67ml 的 30% acrylamide-0.8% N,N' methylene-bis-acrylamide 溶液 , 5 μ l TEMED , 最後加入 ddH₂O 至總體積為 5ml 。將以上配製的凝膠溶液即時混均 , 並分別注入兩組已凝膠之 separating gel 上方 , 隨後放入電泳齒梳模板(comb)於灌滿之 stacking gel 中 , 於室溫下靜置 40 分鐘 , 待膠層凝膠後取下齒梳模板即形成樣品凹型槽。

2. 樣品處理

同微粒體製備 , 將待測物樣品溶液稀釋為 mg/ml , 且等量加入 sample buffer , 置於 95°C 下煮 5 分鐘。

3. 電泳操作

A. 器材

a. 垂直式電泳槽組合: Mini-PROTEAN II(Bio-Rad)

b. 電源供應器: Atto CrossPow 500

B. 試劑及緩衝液

a. Tray buffer: 秤 3g 之 Tris, 14.7g glycine, 10ml 之 10% SDS 溶液, 最後加入 ddH₂O 至總體積為 1000ml。

C. 電泳

將製膠完成的兩組夾板固定於固定架上, 並裝於電泳槽中, 兩夾板中倒入 tray buffer, 使夾板間之緩衝液達全滿而夾板外之緩衝液至少淹過底膠, 取 10 μ l 的 molecular weight standard 及等量蛋白質樣品分別注入凹型槽中, 接上電極後, 於 200 伏特下進行電泳, 待指示劑移行至距底板 0.5 公分左右, 停止通電, 將固定架之夾板拆下, 並取下凝膠。

D. Transfer blotting

Transfer buffer(pH 7.4, 含 25mM Tris, 192mM NaCl, 2% methanol)之配製: 秤取 Tris 12.11g, glycine 57.06g, methanol 800ml, 最後加入 ddH₂O 至 4L。將電泳後 stacking gel 部分切除, 將 separating gel 浸於 transfer buffer 15 分鐘, 將大小與 separating gel 相同的 PVDF membrane (0.2 micron), 浸潤在 methanol 5 分鐘後, 接著依序放置於塑膠板,

海綿，濾紙，膠片，PVDF membrane，濾紙，海綿，並固定在三明治式塑膠板中，隨後放在電泳槽內，並於電泳槽內加入 transfer buffer，接上電極後，於 100 伏特下進行轉移 1 小時，停止後，取出 PVDF membrane，以 buffer A(含 25mM Tris，150 mM NaCl，0.3% Tween-20，pH 7.4)沖洗 3 次，每次 5 分鐘，最後放置於 blocking solution(20cc buffer B 加 normal goat serum 150 μ l)中 overnight。(buffer B 為 25mM Tris，150 mM NaCl)

E. 抗原抗體染色

- a. 取出浸泡於 blocking solution 內之 PVDF membrane，以 buffer A 沖洗 3 次，每次 5 分鐘。
- b. 倒入 1:1000 之 1^oAb (Monoclonal anti-rat cytochrome P-450 Π E1 或 Π B1 抗體)，於 37 $^{\circ}$ C 水浴下振盪 30 分鐘。
- c. 取出以 buffer A 沖洗 3 次，每次 5 分鐘。
- d. 接著到入 2^oAb(20cc buffer B 加 goat anti-mouse IgG antiserum 50 μ l)，於 37 $^{\circ}$ C 水浴下振盪 30 分鐘。
- e. 取出並以 buffer A 沖洗 3 次，每次 5 分鐘。
- f. 接著倒入 A-B complex(Avidin-Horseradish Peroxidase)，於 37 $^{\circ}$ C 水浴下振盪 30 分鐘。
- g. 取出並以 buffer A 沖洗 3 次，每次 5 分鐘。
- h. 最後加入 DAB(3,3'-Diaminobenzidine)及 H₂O₂(10cc buffer B

加入 4 μ l 3% hydrogen peroxide 及 40 μ l 25mg/ml DAB) 呈色。

統計分析

使用 SAS(SAS institute, Cary NC) 進行 ANOVA 統計分析，並以 Duncan's test 來測試不同組別間的差異，當 $p < 0.05$ 代表統計上有顯著的差異性存在。

結果

(一) 本實驗飼料組成

結果顯示(見表一),無脂肪組中蔗糖佔飼料量的 57.6%,其他油組所佔的脂質比例為飼料量的 20%。

(二) 本實驗飼料中油脂的脂肪酸組成

結果顯示(見表二),牛油組所佔的脂肪酸百分比以 C16:0、C18:1n-9 脂肪酸較多。橄欖油組所佔的脂肪酸百分比以 C18:1n-9 脂肪酸較多。玉米油組所佔的脂肪酸百分比以 C18:2n-6 脂肪酸較多。亞麻油組所佔的脂肪酸百分比以 C18:3n-3 脂肪酸較多。鯊魚油組所佔的脂肪酸百分比以 C20:5n-3、C22:6n-3 脂肪酸較多。

(三) 不同油脂在 saline 處理下對於老鼠生長情形的影響

結果顯示(見表三),鯊魚油組與玉米油組比較,飼料攝取量無顯著差異,而鯊魚油組與其他組別比較飼料攝取量顯著低於其他組別($p < 0.05$)。鯊魚油組與無脂肪組比較,體重的增加量無顯著差異,但與其他組別比較顯著低於其他組別($p < 0.05$)。無脂肪組肝重顯著高於玉米油組、鯊魚油組($p < 0.05$),而與其他組別比較無顯著差異。無脂肪組肝重佔總體重百分比顯著高於其他組別($p < 0.05$)。

(四) 不同油脂在 Phenobarbital 處理下對於老鼠生長情形的影響

結果顯示(見表四)，鯊魚油組飼料攝取量顯著低於其他組別($p < 0.05$)。牛油組與玉米油組體重增加量顯著高於無脂肪組($p < 0.05$)，但與其他組別比較無顯著差異。

(五) 不同油脂在 Acetone 處理下對於老鼠生長情形的影響

結果顯示(見表五)，無脂肪組飼料攝取量、體重增加量顯著高於鯊魚油組($p < 0.05$)，然而與其他組別比較無顯著差異。無脂肪組肝重、肝重佔總體重百分比顯著高於其他組別($p < 0.05$)，鯊魚油組肝重顯著低於無脂肪組、牛油組、亞麻油組($p < 0.05$)。鯊魚油組肝重佔總體重百分比顯著低於無脂肪組、亞麻油組($p < 0.05$)。

(六) 不同油脂在 Saline 處理下對於老鼠肝臟磷脂質脂肪酸組成的影響

結果顯示(見表六)，鯊魚油組 C16:0 脂肪酸與無脂肪組比較無顯著差異，但顯著高於其他組別($p < 0.05$)。無脂肪組 C16:1n-7 脂肪酸顯著高於其他組別($p < 0.05$)。亞麻油組 C18:0 脂肪酸顯著高於鯊魚油組及無脂肪組($p < 0.05$)，然而與其他組別比較無顯著差異。無脂肪組 C18:1n-9 脂肪酸顯著高於其他組別($p < 0.05$)，橄欖油組 C18:1n-9 脂肪酸顯著高於玉米油組、亞麻油組、鯊魚油組，但牛油組及橄

欖油組 C18:1n-9 脂肪酸比較無顯著差異。玉米油組與亞麻油組 C18:2n-6 脂肪酸與其他組別比較顯著較高($p < 0.05$)。牛油組、橄欖油組、玉米油組 C20:4n-6 脂肪酸顯著高於其他組別($p < 0.05$)。亞麻油組與鯊魚油組 C20:5n-3 脂肪酸與其他組別比較顯著較高($p < 0.05$)，而以亞麻油組 C20:5n-3 脂肪酸濃度最高。鯊魚油組 C22:6n-3 脂肪酸顯著高於其他組別($p < 0.05$)，而牛油組 C22:6n-3 脂肪酸顯著高於無脂肪組、橄欖油組、玉米油組($p < 0.05$)，但與亞麻油組比較無顯著差異。

(七) 不同油脂在 phenobarbital 處理下對於老鼠肝臟磷脂質脂肪酸組成的影響

結果顯示(見表七)，無脂肪組及鯊魚油組 C16:0 脂肪酸顯著高於其他組別($p < 0.05$)。而無脂肪組 C16:1n-7 脂肪酸顯著高於其他組別($p < 0.05$)。無脂肪組及鯊魚油組 C18:0 脂肪酸顯著低於其他組別($p < 0.05$)。無脂肪組 C18:1n-9 脂肪酸顯著高於其他組別($p < 0.05$)。亞麻油組 C18:2n-6 脂肪酸顯著高於玉米油組($p < 0.05$)，而且此二組也顯著高於其他組別($p < 0.05$)。玉米油組 C20:4n-6 脂肪酸顯著高於其他組別($p < 0.05$)，而牛油組，橄欖油組 C20:4n-6 脂肪酸與其他三組比較也有顯著較高($p < 0.05$)。鯊魚油組 C20:5n-3 脂肪酸顯著高於亞麻油組($p < 0.05$)，而此二組油 C20:5n-3 脂肪酸也顯著高於其他組別($p < 0.05$)。鯊

魚油組 C22:6n-3 脂肪酸顯著高於其他組別($p < 0.05$)，而牛油組 C22:6n-3 脂肪酸也顯著高於無脂肪組、橄欖油組、玉米油組($p < 0.05$)，但與亞麻油組比較無顯著差異。

(八) 不同油脂在 Acetone 處理下對於老鼠肝臟磷脂質脂肪酸組成的影響

結果顯示(見表八)，無脂肪組 C16:0，C16:1n-7 脂肪酸顯著高於其他組別($p < 0.05$)。牛油組、橄欖油組、亞麻油組 C18:0 脂肪酸顯著高於無脂肪組及鯊魚油組($p < 0.05$)。無脂肪組 C18:1n-9 脂肪酸顯著高於其他組別($p < 0.05$)。亞麻油組 C18:2n-6 脂肪酸顯著高於玉米油組($p < 0.05$)，而且二組油也顯著高於其他組別($p < 0.05$)。玉米油組 C20:4n-6 脂肪酸顯著高於其他組別($p < 0.05$)，而牛油組、橄欖油組 C20:4n-6 脂肪酸與其他三組比較也有顯著較高($p < 0.05$)。亞麻油組 C20:5n-3 脂肪酸顯著高於鯊魚油組($p < 0.05$)，且二組油也顯著高於其他組別($p < 0.05$)。鯊魚油組 C22:6n-3 脂肪酸顯著高於其他組別($p < 0.05$)，且牛油組、橄欖油組、亞麻油組 C22:6n-3 脂肪酸也顯著高於無脂肪組、玉米油組($p < 0.05$)。

(九) 不同油脂在 Saline 處理下對於老鼠肝臟微粒體及細胞質酵素的影響

結果顯示(見表九), 鯊魚油組 P-450 總量顯著高於其他組別 ($p < 0.05$), 牛油組、玉米油組、亞麻油組 P-450 總量也顯著高於無脂肪組、橄欖油組 ($p < 0.05$)。亞麻油組與鯊魚油組 P-450 reductase 活性顯著高於其他組別 ($p < 0.05$)。鯊魚油組 7-Pentoxoresorufin (POD) 活性顯著高於其他組別 ($p < 0.05$)。牛油組、亞麻油組、鯊魚油組 N-nitrosodimethylamine (NDMA) 活性顯著高於其他組別 ($p < 0.05$), 而玉米油組 NDMA 活性也顯著高於無脂肪組、橄欖油組 ($p < 0.05$)。Glutathione S-transferase (GST) 活性在 saline 處理下各組間無顯著差異。

(十) 不同油脂在 Phenobarbital 處理下對於老鼠肝臟微粒體及細胞質酵素的影響

結果顯示(見表十), 鯊魚油組 P-450 總量顯著高於其他組別 ($p < 0.05$), 牛油組、橄欖油組、玉米油組、亞麻油組 P-450 總量也顯著高於無脂肪組 ($p < 0.05$)。亞麻油組、鯊魚油組、牛油組 P-450 reductase 活性顯著高於無脂肪組 ($p < 0.05$)。牛油組、亞麻油組、鯊魚油組 POD 活性顯著高於其他組別 ($p < 0.05$)。亞麻油組、鯊魚油組 NDMA 活性顯著高於其他組別 ($p < 0.05$), 牛油組、玉米油組 NDMA 活

性也顯著高於無脂肪組、橄欖油組($p < 0.05$)。無脂肪組 GST 活性在 phenobarbital 處理下顯著低於其他組別($p < 0.05$)。

(十一) 不同油脂在 Acetone 處理下對於老鼠肝臟微粒體及細胞質酵素的影響

結果顯示(見表十一)，亞麻油組、鯊魚油組 P-450 總量顯著高於其他組別($p < 0.05$)，牛油組、橄欖油組、P-450 總量也顯著高於無脂肪組($p < 0.05$)，但與玉米油組比較則無顯著差異。鯊魚油組 P-450 reductase 及 POD 活性顯著高於其他組別($p < 0.05$)，亞麻油組 P-450 reductase 活性顯著高於無脂肪組($p < 0.05$)，而與牛油組、橄欖油組、玉米油組比較則無顯著差異。亞麻油組 POD 活性顯著高於無脂肪組、牛油組($p < 0.05$)。鯊魚油組 NDMA 活性顯著高於其他組別($p < 0.05$)，亞麻油組 NDMA 活性顯著高於無脂肪組、橄欖油組、玉米油組($p < 0.05$)，而與牛油組比較無顯著差異。鯊魚油組 GST 活性顯著高於其他組別($p < 0.05$)，亞麻油組 GST 活性顯著高於無脂肪組($p < 0.05$)。

(十二) 不同油脂在 Saline、Phenobarbital、Acetone 處理下對於老鼠肝臟微粒體 P-450 ΠB1 apoprotein 的影響
結果顯示(見圖一)， Phenobarbital 處理下，不同油脂對於 P-450 ΠB1 apoprotein 的量比 Saline 處理下顯著增加。而 Acetone 處理下，除鯊魚油組外， P-450 ΠB1 apoprotein 的量與 Saline 處理下無顯著差異。

(十三) 不同油脂在 Saline、Phenobarbital、Acetone 處理下對於老鼠肝臟微粒體 P-450 ΠE1 apoprotein 的影響
結果顯示(見圖二): Acetone 處理下，不同油脂對於 P-450 ΠE1 apoprotein 的量比 Saline 處理下顯著增加。而 Phenobarbital 處理下， P-450 ΠE1 apoprotein 的量與 Saline 處理下無顯著差異。

討 論

(一) 不同油脂對於老鼠生長情形的影響

- (1) 本實驗結果顯示：鯊魚油組老鼠飼料攝取量、體重增加量顯著低於無脂肪組($p < 0.05$)，尤其以丙酮處理老鼠最顯著。1960年 Andrews 等人推論這可能是富含n-3 PUFA的鯊魚油，脂質過氧化導致生長速率下降。1983年 Kobatake 等人實驗，給予老鼠餵食含n-3多元不飽和脂肪酸及含豬油的飽和脂肪酸飲食，結果證實餵食含n-3多元不飽和脂肪酸的老鼠，飼料攝取量、生長情形比餵食含豬油的飽和脂肪酸的飲食慢。1986年 Mounie 等人實驗，給予老鼠餵食不同油脂；分別為低脂質(2g/kg)、椰子油(60g/kg)、花生油(60g/kg)、玉米油(60g/kg)、魚油(60g/kg)，結果顯示：餵食魚油老鼠生長速率比餵食其他油脂慢，且餵食魚油組老鼠肝臟微粒體脂質過氧化情形顯著高於其他組別($p < 0.05$)。1990年 Yoo 等人實驗結果也顯示，以丙酮處理老鼠飼料攝取量、體重增加量顯著低於 phenobarbital、saline 處理組($p < 0.05$)，因此認為此乃管灌給予丙酮，造成短暫的食慾降低。1996年 Chen 等人，實驗分別給予老鼠餵食魚油及玉米油，結果顯示：魚油組老鼠飼料攝取量比玉米油組顯著較低($p < 0.05$)，而體重增加量魚油組也較低，但無顯著差異。

(2) 在肝重方面，本實驗結果顯示：餵食無脂肪組老鼠肝重也較其他組別來的重，而本實驗無脂肪組中所含的蔗糖約占飼料的 57.6%，比其他組別高。1972 年 William 等人實驗顯示：餵食無脂肪組老鼠肝重較餵食 3% 玉米油組、10% 玉米油組重。而 1985 年 Hei 等人實驗也證實飲食中之蔗糖，會增加肝細胞中脂質的量及增加肝重。1986 年 Glauert 及 Pitot 研究證實飲食中蔗糖之多寡，會影響脂肪肝發生率及增加肝重。因此推論無脂肪組老鼠肝重增加的原因，可能是飲食中之蔗糖增加而導致脂肪肝發生所產生的現象。1990 年 Yoo 等人實驗也證實，在正常、phenobarbital、丙酮處理下，餵食無脂肪組老鼠肝重均比餵食玉米油組重。而本實驗犧牲老鼠時也發現：餵食無脂肪組老鼠肝表面顏色比餵食鯊魚油組白，phenobarbital 處理的老鼠肝重比丙酮、saline 處理的老鼠重。1994 年 Saito 等人實驗也發現 phenobarbital 處理的老鼠肝臟顯著較重，可能是肝細胞中平滑內質網、RNA、微粒體上的酵素活性增加，使得肝細胞肥大 (Peraino et al., 1975) 或肝細胞增殖所致 (Schulte-Hermann, 1985)。

(二) 不同油脂對於老鼠肝臟磷脂質脂肪酸的影響

- (1) 內質網膜上的脂質有 95%由磷脂質組成(Victoria and Barber, 1969)，因此肝臟內質網膜上脂肪酸的比例意謂著脂肪酸併入膜上磷脂質的結果。本實驗給予老鼠餵食不同油脂四天，肝臟磷脂質脂肪酸的組成有顯著的變化。1979年 Hammer 等人實驗餵食老鼠一至二天的飲食，結果也可觀察到脂肪酸組成的變化。

- (2) 肝臟磷脂質脂肪酸的組成主要反應飲食油脂中之脂肪酸組成。因為玉米油中主要的脂肪酸為 C18:2n-6，而鯊魚油中主要的脂肪酸為 C20:5n-3 和 C22:6 n-3，所以餵食玉米油組老鼠比餵食鯊魚油組老鼠肝臟磷脂質有顯著較高的 C18:2n-6 脂肪酸，並且有顯著較低的 C20:5n-3 和 C22:6 n-3($p < 0.05$)，此外，在 n-6 PUFA 合成過程中，亞麻油酸(C18:2n-6)可經由 $\Delta 6$ desaturase、elongase 及 $\Delta 5$ desaturase 等酵素作用轉變為花生四烯酸 (C20:4n-6)。本實驗結果顯示餵食鯊魚油組老鼠肝臟磷脂質比餵食玉米油組老鼠有顯著較低的 C20:4n-6 脂肪酸($p < 0.05$)。Garg 等人於 1988 年研究顯示 n-3 PUFA 會抑制 $\Delta 6$ desaturase、 $\Delta 5$ desaturase 的活性，導致餵食魚油組之大白鼠肝臟微粒體中花生四烯酸含量降低。1994 年 Cho 等人也發現餵食魚油組比餵食大豆油的大鼠

肝臟磷脂質脂肪酸有顯著較低的花生四烯酸。

- (3) 本實驗結果顯示餵食無脂肪組老鼠肝臟磷脂質脂肪酸比其他組別有較高的 C16:0、C16:1n-7、C18:1n-9 脂肪酸($p < 0.05$)。1972 年 Wade 等人也發現餵食無脂肪組老鼠比餵食玉米油組老鼠肝臟磷脂質脂肪酸有較高的 C16:1n-7 和 C18:1n-9，較低的 C18:2n-6 和 C20:4n-6。本實驗結果也顯示除餵食無脂肪組老鼠外，餵食橄欖油組老鼠比其他油組含較多的 C18:1n-9。1995 年 Yaqoob 等人也發現餵食橄欖油組老鼠脾臟淋巴細胞磷脂質含較多的 C18:1n-9，較低的 C18:2n-6。本實驗在飼料中脂肪酸組成分析也顯示亞麻油含高量的 C18:3n-3，約 55.05%，而肝臟磷脂質脂肪酸分析也顯示比其他油組含較多的 C18:3n-3(資料沒有顯示)。1988 年 Kelley 等人實驗分析亞麻油含高量的 C18:3n-3，與本實驗結果相似。而本實驗分析磷脂質脂肪酸結果顯示，餵食牛油組老鼠肝臟磷脂質 C22:6n-3 顯著高於餵食玉米油組老鼠($p < 0.05$)，而餵食玉米油組老鼠肝臟磷脂質 C18:2n-6 顯著高於餵食牛油組老鼠($p < 0.05$)。1984 年 Clinton 等人的實驗，脂肪酸分析結果顯示，餵食玉米油組老鼠肝臟磷脂質 C18:2n-6 高於餵食牛油組老鼠，而餵食牛油組老鼠肝臟磷脂質 C16:0、C18:0 和 C18:1n-9 高於餵食玉米油組老鼠。

(三) 不同油脂對於老鼠肝臟微粒體及細胞質酵素的影響

- (1) 在 P-450 總量和 P-450 reductase 效應方面，本實驗結果顯示，餵食鯊魚油組老鼠肝臟微粒體 P-450 總量高於其他組別 ($p < 0.05$)。1981 年 Smith 及 Wills 實驗證實餵食鯊魚油組老鼠比餵食蔬菜油組老鼠有效的增加老鼠肝臟微粒體 P-450 總量。1986 年 Mounie 等人實驗，給予老鼠餵食不同油脂；分別為低脂質、椰子油、花生油、玉米油、魚油，結果顯示，餵食魚油組老鼠肝臟微粒體 P-450 總量及脂質過氧化情形顯著高於其他組別 ($p < 0.05$)。本實驗結果也顯示，餵食玉米油、牛油組老鼠肝臟微粒體 P-450 總量及 P-450 reductase 活性無顯著差異。1984 年 Clinton 等人實驗給予老鼠餵食三種不同油脂，20%牛油、20%玉米油、混合油(10%牛油、10%玉米油)，結果顯示，餵食玉米油、混合油組老鼠肝臟微粒體 P-450 總量及 P-450 reductase 活性顯著高於餵食牛油組老鼠 ($p < 0.05$)。根據 1994 年 Saito 等人研究顯示，將 P/S 比例固定，同時降低 n-6/n-3 比例，可增加混合型功能氧化酵素活性，因此推論 n-3，n-6 脂肪酸含量及比例可能影響 P-450 酵素系統的活性。而本實驗結果也顯示，餵食亞麻油、鯊魚油組老鼠 P-450 reductase 活性顯著高於其他組別 ($p < 0.05$)。1973 年 Century 證實餵食亞麻油、鯊魚油組老鼠藥物代謝能力較強，因為飲食中含較高的 n-3 多元不飽和脂肪酸。

(2) 7-Pentoxoresorufin O-dealkylase (POD)效應方面。本實驗結果顯示，saline、丙酮處理下，鯊魚油組老鼠 POD 活性顯著高於其他組別($p < 0.05$)。在 phenobarbital 處理下，牛油組、玉米油組、鯊魚油組老鼠 POD 活性顯著高於其他組別($p < 0.05$)。而在 phenobarbital 處理比 saline 處理下 POD 活性顯著增加，丙酮處理下 POD 活性誘發程度小於 phenobarbital 處理。1990 年 Yoo 等人實驗給予雄性 SD 老鼠餵食無脂肪或 20%玉米油飲食及分別給予無誘發、phenobarbital、丙酮三種處理，結果顯示，無誘發下，無脂肪組及 20%玉米油組 POD 活性無顯著差異。然而在 phenobarbital 處理下，無脂肪組及 20%玉米油組 POD 活性比無誘發下無脂肪組及 20%玉米油組 POD 活性顯著增加 150-300 倍($p < 0.05$)。而在 phenobarbital 處理下，20%玉米油組又比無脂肪組 POD 活性高二倍($p < 0.05$)。在丙酮處理下，誘發 POD 活性之程度比 phenobarbital 來的小。1977 年 Alvares 等人實驗也證實，可給予誘發物增加 P-450 活性，飲食中之脂質成分調節 P-450 活性(Norred and Wade, 1972)。1988 年 Labbe 等人也證實 phenobarbital 可誘發 P450 II B1 及 II B2，但並不局限於 P-450s，包括：aldehyde dehydrogenase，epoxide hydrolase，NADPH P-450 reductase，UDP-glucuronyltransferase 及 glutathione S-transferase 均可被 phenobarbital 誘發(Dunn et al., 1989; Kuriyama et al., 1969; Pickett et al., 1981; Pickett and Lu, 1989)。

1992年 Waxman and Azaroff 也證實 phenobarbital 誘發 P450 II B1 及 II B2 之機制是啟動轉錄，接著 1996年 Agrawal and Shapiro 也證實 phenobarbital 誘發 P450 II B1 及 B2 之機制是 pretranscriptional 及 posttranscriptional。

(3) N-nitrosodimethylamine (NDMA) 效應方面，本實驗結果顯示，丙酮處理老鼠誘發 NDMA 活性約三到四倍。1983年 Tu 等人實驗，給予老鼠丙酮處理誘發 NDMA 活性約三到五倍。而本實驗結果也顯示，餵食玉米油組老鼠比餵食無脂肪組老鼠 NDMA 活性顯著較高 ($p < 0.05$)，然而丙酮處理下，餵食玉米油組老鼠與餵食無脂肪組老鼠比較 NDMA 活性無顯著差異。1990年 Yoo 等人也實驗證實餵食老鼠 20% 玉米油飲食比餵食老鼠無脂肪飲食肝臟微粒體 NDMA 活性顯著高二倍 ($p < 0.01$)，然而丙酮處理下，20% 玉米油飲食與無脂肪飲食無顯著差異。本實驗結果也顯示，餵食玉米油組、鯊魚油組老鼠比餵食橄欖油組老鼠有顯著較高的 NDMA 活性 ($p < 0.05$)，但牛油組無顯著差異。1992年 Yoo 等人實驗證實餵食玉米油組、鯊魚油組老鼠比餵食豬油及橄欖油組老鼠有較高的 NDMA 活性，因此由以上結果可知，飲食中脂質的不飽和度(例如 n-3 PUFA)及量(20% 脂質)會影響肝中 NDMA 活性(Yoo et al., 1991)。而丙酮處理老鼠誘發 P450 II E1 活性在 1989年 Song 等人證實主要是增加 P450 II E1 蛋白質的穩定性，又因

為丙酮也可被 II E1 代謝，所以認為這可能是受質誘發酵素系統之穩定性。

- (4) Glutathione S-transferase (GST) 效應方面，本實驗結果顯示：富含 n-3 PUFA 的鯊魚油組老鼠 GST 活性顯著高於無脂肪組 ($p < 0.05$)，且 phenobarbital 處理下，GST 活性也顯著增加 ($p < 0.05$)。1990 年 Yoo 等人實驗證實，在 phenobarbital 處理下，餵食玉米油組與無脂肪組老鼠誘發 GST 活性約二倍 ($p < 0.01$)，1993 年 Yang 等人也實驗給予老鼠三種不同飲食，無脂肪、5% 玉米油、5% 魚油組，結果顯示，餵食 5% 魚油組老鼠 GST 活性最高，餵食無脂肪組老鼠 GST 活性最低。
- (5) 不同油脂對於老鼠肝臟微粒體蛋白質抗 P450 II E1 的免疫分析方面，本實驗結果顯示：acetone 處理下，不同油脂對於老鼠肝臟微粒體蛋白質 P450 II E1 apoprotein 的量顯著高於 saline 處理下 P450 II E1 apoprotein 的量，而 phenobarbital 處理下，只有鯊魚油組 P450 II E1 apoprotein 的量顯著高。1990 年 Yoo 等人也以免疫分析使用多株抗體抗 P450 II E，結果 P450 II E1 apoprotein 表現也與本實驗相似。

(6) 不同油脂對於老鼠肝臟微粒體蛋白質抗 P450 II B1 免疫分析方面，本實驗結果顯示：phenobarbital 處理下，不同油脂對於老鼠肝臟微粒體蛋白質 P450 II B1 apoprotein 的量顯著高於 saline 處理下 P450 II B1 apoprotein 的量，而 acetone 處理下，P450 II B1 apoprotein 與 saline 處理下無顯著差異。1990 年 Yoo 等人也以免疫分析使用多株抗體抗 P450 II B，結果 P450 II B1 apoprotein 表現也與本實驗相似。

綜合上述，證實飲食中的脂質可影響代謝外來物酵素活性(Yang et al., 1993)。也有證據顯示脂肪酸可調節基因表現，但機制尚不清楚(McDonough et al., 1992; Distel et al., 1992)，因此飲食改變細胞膜上脂肪酸的組成，或是藉由改變基因的表現，來調節代謝外來物酵素之能力，仍需進一步研究(Yang et al., 1993)。

結 論

高油脂量(20%)及富含 n-3PUFA 的油脂來源，確實會改變肝中解毒酵素系統活性，其中以亞麻油及鯊魚油組最為顯著。

表一、實驗飼料組成

Table 1. Composition of experimental diets

單位:g

| Ingredients | FF | BT | OO | CO | LO | MO |
|---------------------------------|------|------|------|------|------|------|
| Casein ^a | 20.0 | 20.0 | 20.0 | 20.0 | 20.0 | 20.0 |
| DL-Methionine ^a | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 |
| Corn Starch ^a | 15.0 | 15.0 | 15.0 | 15.0 | 15.0 | 15.0 |
| Sucrose ^a | 61.3 | 23.0 | 23.0 | 23.0 | 23.0 | 23.0 |
| Fiber ^a | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 |
| Beef tallow ^a | - | 17.0 | | - | - | - |
| Olive oil ^a | - | - | 17.0 | - | - | - |
| Corn oil ^a | - | - | - | 17.0 | - | - |
| Linseed oil ^a | - | - | - | - | 17.0 | - |
| Menhaden oil ^b | - | - | - | - | - | 17.0 |
| AIN-76 Min Mix ^b | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 3.5 |
| AIN-76 Vit Mix ^b | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| Choline bitartrate ^a | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 |

^aTeklad, Madison, WI.

^bICN Biomedicals, Inc.

FF:Fat-free

BT:Beef tallow

OO:Olive oil

CO:Corn oil

LO:Linseed oil

MO:Menhaden oil

表二. 飼料中油脂之脂肪酸組成

| Fatty acid(%) | BO | OO | CO | LO | MO |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 14:0 | 4.89 | 0.04 | 0.05 | 0.05 | 10.57 |
| 16:0 | 28.42 | 11.58 | 11.34 | 5.64 | 21 |
| 16:1 | 3.95 | 0.79 | 0.1 | 0.05 | 12.67 |
| 18:0 | 13.1 | 2.55 | 1.84 | 3.3 | 5.74 |
| 18:1 | 36.12 | 72.13 | 24.51 | 17.85 | 9.1 |
| 18:2 | 11.38 | 11.11 | 60.71 | 17.62 | 1.6 |
| 20:0 | 0.69 | 0.35 | 0.35 | - | 0.81 |
| 18:3 | 0.79 | 0.62 | 0.87 | 55.03 | 1.97 |
| 20:1 | - | 0.33 | 0.23 | - | 1.25 |
| 20:2 | 0.05 | 0.32 | 0.01 | 0.1 | 0.33 |
| 20:3 | 0.03 | - | - | - | - |
| 22:0 | 0.59 | 0.18 | - | 0.18 | 0.32 |
| 20:4 | - | 0.01 | - | 0.09 | 1.13 |
| 22:1 | - | - | - | - | 0.14 |
| 20:5 | - | - | - | - | 16.49 |
| 24:0 | - | - | - | 0.08 | - |
| 22:6 | - | - | - | - | 16.87 |

FF: Fat-free. BT: Beef tallow. OO: Olive oil. CO: Corn oil. LO: Linseed oil. MO:Menhaden oil.

表三. 不同油脂在 Saline 處理下對於老鼠生長情形的影響

| Group | n | Food intake (g) | Body weight gain (g) | Liver weight (g) | Liver weight/body weight (%) |
|-------|---|------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| FF | 4 | 147 ± 7 ^a | 46.0 ± 9.6 ^{ab} | 10.7 ± 2.8 ^a | 7.0 ± 0.6 ^a |
| BT | 4 | 145 ± 11 ^a | 55.5 ± 3 ^a | 8.5 ± 1.3 ^{abc} | 5.3 ± 0.3 ^{bc} |
| OO | 4 | 146 ± 8 ^a | 56.3 ± 8.4 ^a | 8.8 ± 0.6 ^{ab} | 5.5 ± 0.2 ^b |
| CO | 4 | 139 ± 20 ^{ab} | 55.3 ± 10.2 ^a | 7.5 ± 1.3 ^{bc} | 4.7 ± 0.4 ^{cd} |
| LO | 4 | 152 ± 7 ^a | 61.0 ± 3.6 ^a | 9.4 ± 1.3 ^{ab} | 5.6 ± 0.4 ^b |
| MO | 4 | 121 ± 21 ^b | 35.8 ± 17.0 ^b | 6.3 ± 1.5 ^c | 4.4 ± 0.2 ^d |

FF: Fat-free. BT: Beef tallow. OO: Olive oil. CO: Corn oil. LO: Linseed oil. MO:Menhaden oil.

Values are means ± standard deviation. Groups that do not share the same letters are significantly different from one another, $p < 0.05$.

表四. 不同油脂在 Phenobarbital 處理下對於老鼠生長情形的影響

| Group | n | Food intake (g) | Body weight gain (g) | Liver weight (g) | Liver weight/body weight(%) |
|-------|---|-----------------------|---------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| FF | 4 | 140 ± 8 ^a | 41.8 ± 5.3 ^b | 10.1 ± 0.7 ^a | 7.0 ± 0.4 ^a |
| BT | 4 | 141 ± 4 ^a | 58.3 ± 15.0 ^a | 10.1 ± 2.3 ^a | 6.3 ± 0.9 ^a |
| OO | 4 | 146 ± 13 ^a | 55.0 ± 11.8 ^{ab} | 10.7 ± 2.5 ^a | 6.8 ± 1.1 ^a |
| CO | 4 | 142 ± 12 ^a | 58.3 ± 6.6 ^a | 9.9 ± 0.2 ^a | 6.4 ± 0.3 ^a |
| LO | 4 | 144 ± 11 ^a | 55.5 ± 7.9 ^{ab} | 11.1 ± 1.5 ^a | 7.1 ± 0.6 ^a |
| MO | 4 | 125 ± 9 ^b | 45.0 ± 8.3 ^{ab} | 8.7 ± 0.7 ^a | 6.2 ± 0.5 ^a |

FF: Fat-free. BT: Beef tallow. OO: Olive oil. CO: Corn oil. LO: Linseed oil. MO:Menhaden oil.

Values are means ± standard deviation. Groups that do not share the same letters are significantly different from one another, $p < 0.05$.

表五. 不同油脂在 Acetone 處理下對於老鼠生長情形的影響

| Group | n | Food intake (g) | Body weight gain (g) | Liver weight (g) | Liver weight/body weight(%) |
|-------|---|------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| FF | 4 | 124 ± 9 ^a | 47.0 ± 9.9 ^a | 9.9 ± 0.5 ^a | 7.0 ± 0.3 ^a |
| BT | 4 | 114 ± 10 ^{ab} | 52.0 ± 3.6 ^a | 7.3 ± 0.8 ^b | 5.1 ± 0.4 ^{bc} |
| OO | 4 | 108 ± 22 ^{ab} | 46.3 ± 17.9 ^a | 7.1 ± 1.4 ^{bc} | 5.1 ± 0.4 ^{bc} |
| CO | 4 | 103 ± 19 ^{ab} | 40.5 ± 8.4 ^a | 7.2 ± 0.7 ^{bc} | 5.4 ± 0.7 ^{bc} |
| LO | 4 | 120 ± 13 ^{ab} | 52.0 ± 5.1 ^a | 8.3 ± 1.2 ^b | 5.7 ± 0.5 ^b |
| MO | 4 | 99 ± 11 ^b | 24.0 ± 6.6 ^b | 5.7 ± 1.1 ^c | 4.8 ± 0.3 ^c |

FF: Fat-free. BT: Beef tallow. OO: Olive oil. CO: Corn oil. LO: Linseed oil. MO:Menhaden oil.

Values are means ± standard deviation. Groups that do not share the same letters are significantly different from one another, $p < 0.05$.

表六. 不同油脂在 Saline 處理下對於老鼠肝臟磷脂質脂肪酸組成的影響

| Group | n | 16:0 | 16:1n-7 | 18:0 | 18:1n-9 | 18:2n-6 | 20:4n-6 | 20:5n-3 | 22:6n-3 |
|-------|---|-------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| FF | 4 | 20.8 ± 2.5 ^a | 3.80 ± 0.9 ^a | 25.6 ± 0.9 ^{bc} | 12.3 ± 3.8 ^a | 6.1 ± 1.2 ^c | 20.6 ± 4.7 ^b | 0.40 ± 0.11 ^c | 6.5 ± 0.4 ^c |
| BT | 4 | 14.9 ± 1.8 ^b | 0.58 ± 0.2 ^{bc} | 27.0 ± 2.3 ^{abc} | 7.70 ± 1.7 ^{bc} | 7.4 ± 0.4 ^c | 32.0 ± 0.7 ^a | 0.16 ± 0.17 ^c | 10.4 ± 1.5 ^b |
| OO | 4 | 15.4 ± 2.4 ^b | 0.35 ± 0.03 ^c | 28.9 ± 2.3 ^{ab} | 8.70 ± 1.2 ^b | 5.8 ± 0.9 ^c | 33.4 ± 3.2 ^a | 0.03 ± 0.04 ^c | 7.5 ± 1.4 ^c |
| CO | 4 | 14.1 ± 2.8 ^b | 0.25 ± 0.12 ^c | 27.8 ± 0.7 ^{abc} | 3.00 ± 0.4 ^d | 12.5 ± 0.8 ^b | 36.1 ± 1.5 ^a | 0.02 ± 0.04 ^c | 6.3 ± 0.4 ^c |
| LO | 4 | 14.7 ± 1.1 ^b | 0.22 ± 0.06 ^c | 29.8 ± 1.5 ^a | 4.70 ± 1.0 ^d | 16.7 ± 0.7 ^a | 16.0 ± 0.6 ^c | 9.50 ± 2.0 ^a | 8.5 ± 1.1 ^{bc} |
| MO | 4 | 22.9 ± 2.7 ^a | 1.10 ± 0.3 ^b | 25.0 ± 4.0 ^c | 5.60 ± 1.0 ^{cd} | 7.1 ± 3.1 ^c | 15.9 ± 2.9 ^c | 5.10 ± 1.3 ^b | 17.4 ± 3.2 ^a |

FF: Fat-free. BT: Beef tallow. OO: Olive oil. CO: Corn oil. LO: Linseed oil. MO:Menhaden oil.

Values are means ± standard deviation. Groups that do not share the same letters are significantly different from one another, $p < 0.05$.

表七. 不同油脂在 Phenobarbital 處理下對於老鼠肝臟磷脂質脂肪酸組成的影響

| Group | n | 16:0 | 16:1 n-7 | 18:0 | 18:1n-9 | 18:2n-6 | 20:4n-6 | 20:5n-3 | 22:6n-3 |
|-------|---|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| FF | 4 | 23.3 ± 1.6 ^a | 4.90 ± 1.5 ^a | 22.9 ± 2.5 ^b | 20.6 ± 3.7 ^a | 7.0 ± 2.1 ^{cd} | 15.5 ± 1.7 ^c | 0.53 ± 0.02 ^c | 5.2 ± 1.3 ^c |
| BT | 4 | 15.6 ± 1.8 ^b | 0.61 ± 0.10 ^b | 30.7 ± 1.2 ^a | 8.2 ± 1.0 ^{bc} | 9.5 ± 2.4 ^c | 27.3 ± 1.8 ^b | 0.28 ± 0.20 ^c | 7.9 ± 1.2 ^b |
| OO | 4 | 14.3 ± 1.3 ^b | 0.30 ± 0.06 ^b | 32.0 ± 0.6 ^a | 10.4 ± 1.9 ^b | 7.0 ± 0.8 ^{cd} | 29.9 ± 2.6 ^b | 0.07 ± 0.09 ^c | 6.0 ± 1.3 ^c |
| CO | 4 | 13.1 ± 2.7 ^b | 0.20 ± 0.06 ^b | 30.9 ± 1.9 ^a | 3.1 ± 0.4 ^d | 13.1 ± 1.5 ^b | 34.4 ± 2.4 ^a | 0.01 ± 0.01 ^c | 5.3 ± 0.4 ^c |
| LO | 4 | 15.1 ± 2.3 ^b | 0.28 ± 0.10 ^b | 31.7 ± 2.0 ^a | 6.1 ± 1.8 ^{cd} | 17.4 ± 0.5 ^a | 13.8 ± 2.0 ^c | 9.36 ± 1.00 ^b | 6.3 ± 1.5 ^{bc} |
| MO | 4 | 21.6 ± 1.7 ^a | 1.14 ± 0.34 ^b | 24.0 ± 0.4 ^b | 4.3 ± 0.3 ^d | 5.9 ± 3.2 ^d | 12.9 ± 2.3 ^c | 12.0 ± 3.3 ^a | 18.2 ± 1.1 ^a |

FF: Fat-free. BT: Beef tallow. OO: Olive oil. CO: Corn oil. LO: Linseed oil. MO:Menhaden oil.

Values are means ± standard deviation. Groups that do not share the same letters are significantly different from one another, $p < 0.05$.

表八. 不同油脂在 Acetone 處理下對於老鼠肝臟磷脂質脂肪酸組成的影響

| Group | n | 16:0 | 16:1n-7 | 18:0 | 18:1n-9 | 18:2n-6 | 20:4n-6 | 20:5n-3 | 22:6n-3 |
|-------|---|-------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| FF | 4 | 24.0 ± 2.4 ^a | 3.54 ± 0.6 ^a | 22.8 ± 2.3 ^b | 17.7 ± 3.2 ^a | 6.0 ± 1.5 ^d | 19.1 ± 4.0 ^c | 0.26 ± 0.08 ^c | 6.6 ± 1.1 ^c |
| BT | 4 | 14.7 ± 1.7 ^c | 0.51 ± 0.07 ^{bc} | 27.0 ± 1.2 ^a | 8.0 ± 1.9 ^c | 11.2 ± 1.3 ^c | 27.7 ± 2.8 ^b | 0.38 ± 0.12 ^c | 10.5 ± 1.2 ^b |
| OO | 4 | 15.8 ± 1.7 ^c | 0.27 ± 0.03 ^c | 25.7 ± 1.4 ^a | 12.2 ± 2.0 ^b | 9.4 ± 1.4 ^c | 30.4 ± 0.5 ^b | 0.14 ± 0.10 ^c | 8.9 ± 1.2 ^b |
| CO | 4 | 16.0 ± 2.2 ^c | 0.19 ± 0.07 ^c | 24.7 ± 1.7 ^{ab} | 3.5 ± 0.7 ^c | 14.8 ± 1.6 ^b | 34.4 ± 1.0 ^a | 0.01 ± 0.02 ^c | 6.5 ± 1.3 ^c |
| LO | 4 | 15.1 ± 1.7 ^c | 0.20 ± 0.04 ^c | 26.2 ± 1.2 ^a | 4.6 ± 0.5 ^{dc} | 19.0 ± 0.7 ^a | 17.1 ± 2.0 ^c | 7.80 ± 1.8 ^a | 10.0 ± 0.5 ^b |
| MO | 4 | 19.9 ± 2.5 ^b | 0.71 ± 0.22 ^b | 19.2 ± 2.3 ^c | 6.3 ± 0.4 ^{cd} | 10.6 ± 1.9 ^c | 19.0 ± 2.5 ^c | 5.10 ± 2.2 ^b | 19.2 ± 2.4 ^a |

FF: Fat-free. BT: Beef tallow. OO: Olive oil. CO: Corn oil. LO: Linseed oil. MO:Menhaden oil.

Values are means ± standard deviation. Groups that do not share the same letters are significantly different from one another, $p < 0.05$.

表九. 不同油脂在 Saline 處理下對於老鼠肝臟微粒體及細胞質酵素的影響

| Group | n | P450 nmol/mg protein | P450rd nmol/(min. mg protein) | POD pmol/(min. mg protein) | NDMA nmol/(min. mg protein) | GST nmol/(min. mg protein) |
|-------|---|---------------------------|----------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| FF | 4 | 0.27 ± 0.11 ^d | 204 ± 22 ^b | 7 ± 0 ^b | 0.32 ± 0.13 ^c | 1617 ± 328 ^a |
| BT | 4 | 0.47 ± 0.12 ^{bc} | 171 ± 11. ^c | 7 ± 0 ^b | 1.10 ± 0.21 ^a | 1651 ± 181 ^a |
| OO | 4 | 0.39 ± 0.08 ^{cd} | 155 ± 13 ^c | 7 ± 0 ^b | 0.46 ± 0.11 ^c | 1518 ± 214 ^a |
| CO | 4 | 0.62 ± 0.14 ^b | 179 ± 21 ^{bc} | 7 ± 0 ^b | 0.76 ± 0.19 ^b | 1759 ± 274 ^a |
| LO | 4 | 0.56 ± 0.12 ^{bc} | 253 ± 26 ^a | 7 ± 0 ^b | 1.20 ± 0.16 ^a | 1498 ± 89 ^a |
| MO | 4 | 0.84 ± 0.09 ^a | 244 ± 13 ^a | 14 ± 0 ^a | 1.30 ± 0.22 ^a | 1559 ± 254 ^a |

P450: Total cytochrome P-450 content. P450rd: NADPH-P-450 reductase.

POD: 7-Pentoxoresorufin O- dealkylase. NDMA: N-nitrosodimethylamine.

GST: Glutathione-S-transferase.

FF: Fat-free. BT: Beef tallow. OO: Olive oil. CO: Corn oil. LO: Linseed oil. MO:Menhaden oil.

Values are means ± standard deviation. Groups that do not share the same letters are significantly different from one another, p < 0.05.

表十. 不同油脂在 Phenobarbital 處理下對於老鼠肝臟微粒體及細胞質酵素的影響

| Group | n | P450 nmol/mg protein | P450rd nmol/ (min.mg rotein) | POD pmol/ (min.mg rotein) | NDMA nmol/ (min.mg rotein) | GST nmol/(min.mg protein) |
|-------|---|--------------------------|---------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| FF | 4 | 0.48 ± 0.03 ^c | 273 ± 43 ^c | 143 ± 33 ^c | 0.41 ± 0.05 ^c | 1681 ± 367 ^b |
| BT | 4 | 1.00 ± 0.26 ^b | 387 ± 42 ^{ab} | 306 ± 66 ^a | 1.10 ± 0.2 ^b | 3502 ± 883 ^a |
| OO | 4 | 0.96 ± 0.13 ^b | 330 ± 76 ^{bc} | 222 ± 61 ^b | 0.57 ± 0.09 ^c | 2886 ± 237 ^a |
| CO | 4 | 1.10 ± 0.19 ^b | 336 ± 71 ^{bc} | 190 ± 64 ^{bc} | 1.30 ± 0.3 ^b | 2801 ± 932 ^a |
| LO | 4 | 1.30 ± 0.38 ^b | 399 ± 102 ^{ab} | 347 ± 28 ^a | 1.80 ± 0.6 ^a | 2788 ± 401 ^a |
| MO | 4 | 2.00 ± 0.31 ^a | 455 ± 69 ^a | 346 ± 40 ^a | 2.20 ± 0.5 ^a | 3373 ± 610 ^a |

P450: Total cytochrome P-450 content. P450rd: NADPH-P-450 reductase.

POD: 7-Pentoxoresorufin O- dealkylase. NDMA: N-nitrosodimethylamine.

GST: Glutathione-S-transferase.

FF: Fat-free. BT: Beef tallow. OO: Olive oil. CO: Corn oil. LO: Linseed oil. MO:Menhaden oil.

Values are means ± standard deviation. Groups that do not share the same letters are significantly different from one another, $p < 0.05$.

表十一. 不同油脂在 Acetone 處理下對於老鼠肝臟微粒體及細胞質酵素的影響

| Group | n | P450 nmol/mg protein | P450rd nmol/(min.mg protein) | POD pmol/(min.mg protein) | NDMA nmol/(min.mg protein) | GST nmol/(min.mg rotein)_ |
|-------|---|---------------------------|---------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| FF | 4 | 0.30 ± 0.01 ^c | 228 ± 23 ^c | 10.5 ± 4.0 ^c | 2.1 ± 0.2 ^d | 1344 ± 121 ^c |
| BT | 4 | 0.55 ± 0.15 ^b | 239 ± 11 ^{bc} | 19.3 ± 6.7 ^c | 3.1 ± 0.8 ^{bc} | 1455 ± 262 ^{bc} |
| OO | 4 | 0.65 ± 0.17 ^b | 245 ± 6 ^{bc} | 24.5 ± 9.0 ^{bc} | 2.0 ± 0.1 ^d | 1469 ± 56 ^{bc} |
| CO | 4 | 0.48 ± 0.13 ^{bc} | 256 ± 33 ^{bc} | 21.0 ± 7 ^{bc} | 2.4 ± 0.3 ^{cd} | 1454 ± 274 ^{bc} |
| LO | 4 | 0.93 ± 0.12 ^a | 303 ± 64 ^b | 35.0 ± 5.7 ^b | 3.5 ± 1.0 ^b | 1706 ± 195 ^b |
| MO | 4 | 1.10 ± 0.18 ^a | 397 ± 47 ^a | 102 ± 17 ^a | 4.8 ± 0.6 ^a | 2334 ± 197 ^a |

P450: Total cytochrome P-450 content. P450rd: NADPH-P-450 reductase.

POD: 7-Pentoxoresorufin O- dealkylase. NDMA: N-nitrosodimethylamine.

GST: Glutathione-S-transferase.

FF: Fat-free. BT: Beef tallow. OO: Olive oil. CO: Corn oil. LO: Linseed oil. MO:Menhaden oil.

Values are means ± standard deviation. Groups that do not share the same letters are significantly different from one another, $p < 0.05$.

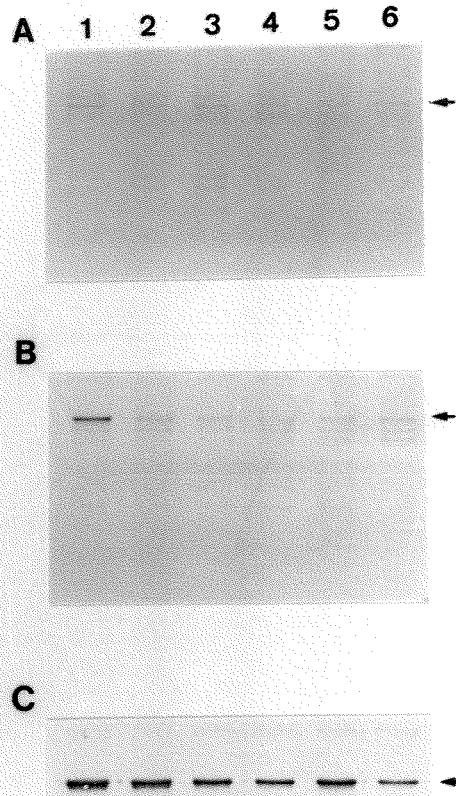


Figure 1.不同油脂對於老鼠肝臟微粒體蛋白質抗 P-450 CYP1B1 的免疫分析: A:saline 處理組, B: acetone 處理組, C: phenobarbital 處理組, 1:鯊魚油組, 2:亞麻油組, 3:玉米油組, 4:橄欖油組, 5:牛油組, 6:無脂肪組。每組為 2 μ g 微粒體蛋白質。

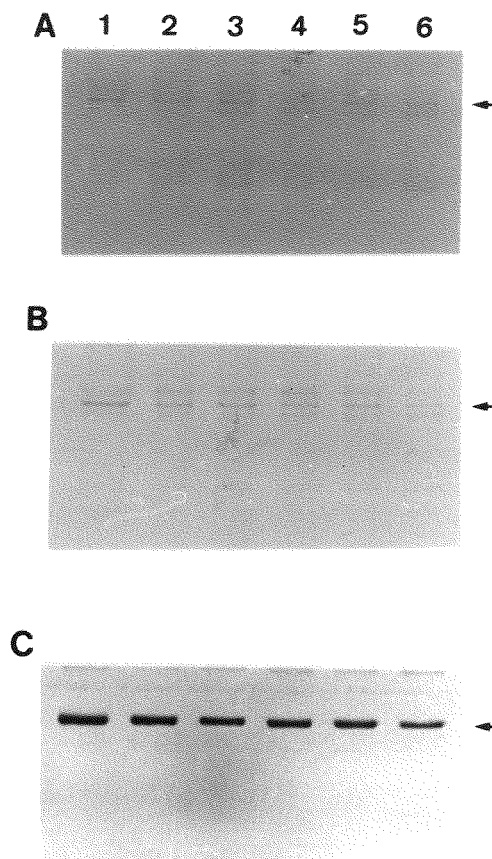


Figure 2.不同油脂對於老鼠肝臟微粒體蛋白質抗 P-450 11βHSD1 的免疫分析: A:saline 處理組, B: phenobarbital 處理組, C: acetone 處理組, 1:鯊魚油組, 2:亞麻油組, 3:玉米油組, 4:橄欖油組, 5:牛油組, 6:無脂肪組。每組為 5μg 微粒體蛋白質。

參考文獻

Agrawal, A.K. and Shapiro, B.H. : Phenobarbital induction of hepatic CYP1B1 and CYP1B2 : Pretranscriptional and post-transcriptional effects of gender, adult age, and phenobarbital dose. *Molecular Pharmacol.* 49, 523-531, 1996.

Anders, M.W., Lash, L.H., Dekant, W., Elfarra, A.A. and Dohn, D.R.: Biosynthesis and biotransformation of glutathione S-conjugates to toxic metabolites. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 18, 311-341, 1988.

Anderson, K.E., Pantuck, E.J., Conney, A.H. and Kappas, A. : Nutrition regulation of chemical metabolism in humans. *Fed. Proc.* 44, 130-133, 1985.

Andrews, J.S., Griffith, W.H., Mead, J.F. and Stein, R.A. : Toxicity of air-oxidized soybean oil. *J. Nutr.* 70, 199-210, 1960.

Bidlack, W.R., Brown, R.C. and Mohan, C. : Nutritional parameters that alter hepatic drug metabolism, conjugation and toxicity. *Fed. Proc.* 45, 142-148, 1986.

Castuma, C.E. and Brenner, R.R.: Effect of fatty acid deficiency on microsomal membrane fluidity and cooperativity of the UDP-glucuronyl-transferase. *Biochim. Biophys. Acta.* 729, 9-16, 1983.

Cave, W. T. : Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid effects on animal tumorigenesis. *FASEB J.* 5, 2160-2166, 1991.

Century, B. : A role of dietary lipids in the ability of phenobarbital to stimulate drug detoxification. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 185, 185-194, 1973.

Chen, H.W., Lii, C.K., Ko, J.J., Wang, S.T. and Hsu, J.D. : Regulatory effects of dietary n-3 and n-6 lipids on plasma and hepatic lipid levels, liver cell number and microsomal protein content in spontaneously hypertensive rats. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* 55, 329-335, 1996.

Cho, S.H. and Choi, Y.S. : Lipid peroxidation and antioxidant status is affected by different vitamin E levels when feeding fish oil. *Lipids* 29, 47-52, 1994.

Choi, Y.J., Lee-Kim, Y.C., Park J.S. and Cha, Y.-N. : Enhancement of hepatic drug metabolism in 3-week-old pups by maternal feeding of n-3 polyunsaturated fatty acid diets. *J. Nutr. Biochem.* 3, 580-586, 1992.

Clinton, S.K., Mulloy, A.L. and Visek, W.J. : Effects of dietary lipid saturation on prolactin secretion, carcinogen metabolism and mammary carcinogenesis in rats. *J. Nutr.* 114, 1630-1639, 1984.

Czygan, P., Greim, H., Garro, A.J., Hutterer, F., Schaffner, F., Popper, H., Rosenthal, O. and Cooper, D.Y.: Microsomal metabolism of dimethylnitrosamine and the cytochrome P-450 dependency of its activation to a mutagen. *Cancer Res.* 33, 2983-2986, 1973.

Davison, S.C. and Wills, E.D.: Studies on the lipid composition of the rat liver endoplasmic reticulum after induction with phenobarbitone and 20-methylcholanthrene. *Biochem. J.* 140, 461-468, 1974.

Dekant, W., Vamvakas, S. and Anders, M.W.: Bioactivation of nephrotoxic haloalkenes by glutathione conjugation: Formation of toxic and mutagenic intermediates by cysteine conjugate β -lyase. *Drug Metab. Rev.* 20, 43-83, 1989.

Distel, R.J., Robinson, G.S. and Spiegelman, B.M.: Fatty acid regulation of gene expression, transcriptional and post-transcriptional mechanism. *J. Biol. Chem.* 267, 5937-5941, 1992.

Dunn, T.J., Koleske, A.J., Lindahl, R. and Pitot, H.C. : Phenobarbital-inducible aldehyde dehydrogenase in the rat. cDNA sequence and regulation of the mRNA by phenobarbital in responsive rats. *J. Biol. Chem.* 264, 13057-13065, 1989.

Garg, M.L., Sebokova, E, Thomson, A.B.R. and Clandinin, M.T. : Δ^6 -Desaturase activity in liver microsomes of rats fed diets enriched with cholesterol and/or $\omega 3$ fatty acids. *Biochem. J.* 249, 351-356, 1988.

Garg, M.L., Thomson, A.B.R. and Clandinin, M.T. : Effect of dietary cholesterol and/or $\omega 3$ fatty acids on lipid composition and Δ^5 -desaturase activity of rat liver microsomes. *J. Nutr.* 118, 661-668, 1988.

Glaumann, H. and Dallner, G. : Lipid composition and turnover of rough and smooth microsomal membranes in rat liver. *J. Lipid Res.* 9, 720-729, 1968.

Glauert, H.P. and Pitot, H.C. : Influence of dietary fat on the promotion of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in female rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 181, 498-506, 1986.

Guengerich, F.P. and Liebler, D.C. : Enzymatic activation of chemicals to toxic metabolite. *CRC Crit.Rev.Toxicol.* 14, 259-307, 1985.

Guengerich, F.P. : Reaction and significance of cytochrome P450 enzyme. *J. Biol. Chem.* 266, 10019-10022, 1991.

Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B. : Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139, 1974.

Hammer, C.T. and Wills, E.D. : The effect of dietary fats on the composition of the liver endoplasmic reticulum and oxidative drug metabolism. *Br. J. Nutr.*, 41, 465-475, 1979.

Hanna, P.E. and Banks, R.B. : Arylhydroxylamines and arylhydroxamic acids: Conjugation reaction. In *Bioactivation of Foreign Compounds*. (M.W. Anders, Ed.) Academic Press, Orlando., 375-402, 1985.

Hei, T.K. and Sudilovsky, O. : Effect of a high-sucrose diet on the development of enzyme altered foci in chemical hepatocarcinogenesis in rats. *Cancer Res.* 45, 2700-2705, 1985.

Ingelman-Sundberg, M. and Gustafsson, J.A. : The role of phospholipids in cytochrome P-450-catalysed reactions. *Biochem. Soc. Trans.* 3, 977, 1975.

Iritani, N. and Fujikawa, S. : Competitive incorporation of dietary ω -3 and ω -6 polyunsaturated fatty acids into the tissue phospholipids in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 28, 621-629, 1982.

Kenneth, W., Miller and Yang, C.S. : Studies on the mechanisms of induction of N-Nitrosodimethylamine demethylase by fasting, acetone and ethanol. Arch. Biochem. Biophys. 229, 483-491, 1984.

Kobatake, Y., Hirahara, F., Innami, S. and Nishide, E. : Dietary effect of ω 3 type polyunsaturated fatty acids on serum and liver lipid levels in rats. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 29, 11-21, 1983.

Kurivama, Y., Omura, T., Siekevitz, P. and Palade, G.E. : Effects of phenobarbital on the synthesis and degradation of the protein components of rat liver microsomal membrane. J. Biol. Chem. 244, 2017-2026, 1969.

Labbe, D., Jean, A. and Anderson, A. : A constitutive member of the rat cytochrome P-450IIB subfamily : full-length codon sequence of the P-450IIB3 cDNA. DNA 7, 253-260, 1988.

Lepage, G. and Roy, C.C. : Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. J. Lipid Res. 27, 114-120, 1986.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275, 1951.

Lu, A.Y.H. : Liver microsomal drug-metabolizing enzyme system: functional components and their properties. Fed. Proc. 35, 2460-2463, 1975.

McDonough, V.M., Stuke, J.E. and Martin, C.E. : Specificity of unsaturated fatty acid regulated expression of the *Saccharomyces cerevisiae*. J.Biol.Chem. 267, 5931-5936, 1992.

Morrison, W.R. and Smith, L.M. : Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetal from lipid with boron fluoride-methanol. J. Lipid Res. 5, 600-608, 1964.

Mounie, J., Faye, B., Magdalou, J., Goudonnet, H., Truchot, R. and Siest, G. : Modulation of UDP-Glucuronosyltransferase activity in rats by dietary lipids. J. Nutr. 116, 2034-2043, 1986

Muriana F.J.G. and Ruiz-Gutierrez V. : Effect of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids ingestion on rat liver membrane-associated enzymes and fluidity. J. Nutr. Biochem. 3, 659-663, 1992.

Nash, T. : The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. Biochem. J. 55, 416-421, 1953.

Norred, W.P. and Wade, A.E. : Dietary fatty acid-induced alterations of hepatic microsomal drug metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 21, 2887-2897, 1972.

Omura, T, and Sato, R. : The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes II solubilization, purification and properties. *J. Biol. Chem.* 239, 2379-2385, 1964.

Parrish, C.C., Pathy, D.A. and Angel, A : Dietary fish oils limit adipose tissue hypertrophy in rats. *Metabolism* 39, 217-219, 1990.

Paulson, G.D., Caldwell, J., Hutson, D.H., Menn, J.J (eds) : *Xenobiotic Conjugation Chemistry*. Washington, DC. American Chemical Society, 1986.

Peraino, C., Fry, R.J.M., Staffeldt, E. and Christopher, J.P. : Comparative enhancing effects of phenobarbital, amobarbital, diphenylhydantoin, and dichlorodiphenyltrichloroethane on 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis in the rat. *Cancer Res.* 35, 2884-2890, 1975.

Pickett, C.B., Jeter, R.L., Morin, J. and Lu, A.Y.H. : Electroimmunochemical quantitation of cytochrome P-450, cytochrome P-488, and epoxide hydrolase in rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 256, 8815-8820, 1981.

Pickett, C.B. and Lu, A.Y.H. : Glutathione S-transferase : structure, regulation, and biology. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 743-764, 1989.

Saito, M. : Effect of dietary alpha-linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on liver microsomal mixed-function oxidases in rats. *Ann. Nutr. Metab.* 38, 313-321, 1994.

Saito, M., Oh-Hashi, A., Kubota, M., Nishide, E. and Yamaguchi, M. : Mixed function oxidases in response to different types of dietary lipids in rats. *Br. J. Nutr.* 63, 249-257, 1990.

Saito, M. and Yamaguchi, M. : Response of liver microsomal mixed function oxidases to dietary linoleic acid levels in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 39, 411-418, 1993.

Saito, M. and Yamaguchi, M. : Liver microsomal mixed-function oxidases in response to polyunsaturated/saturated and n-6/n-3 fatty acid ratios of dietary lipids in rats. *Ann. Nutr. Metab.* 38, 28-39, 1994.

Schulte-Hermann, R. : Tumor promotion in the liver. *Arch. Toxicol.* 57, 147-158, 1985.

Sickeritz, P. : Protoplasm : endoplasmic reticulum and microsomes and their properties. *Annu. Rev. Physiol.* 25, 15-40, 1963.

Song, B-J., Veech, R.L., Park, S.S., Gelboin, H.V. and Gonzalez, F.J. : Induction of rat hepatic N-nitrosodimethylamine demethylase by acetone is due to protein stabilization. *J. Biol. Chem.* 264, 3568-3572, 1989.

Strobel, H.W., Lu, A.Y.H., Heidema, J. and Coon, M.J. : Phosphatidylcholine requirement in the enzymatic reduction of hemoprotein P-450 and in fatty acid, hydrocarbon and drug hydroxylation. *J. Biol. Chem.* 245, 4851-4854, 1970.

Stubbs, C.D. and Smith, A.D. : The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acids composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochim. Biophys. Acta.* 779, 89-137, 1984.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. : Electrophoretic transfer proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4356, 1979.

Tu, Y.Y., Sonnenberg, J., Lewis, K.F. and Yang, C.S. : Pyrazole-induced cytochrome P-450 in rat liver micromes : an isozyme with high affinity for dimethylnitrosamine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 103, 905-912, 1981.

Tu, Y.Y., Peng, R., Chang, Z.F. and Yang, C.S. : Induction of a high affinity nitrosamine demethylase in rat liver microsomes by acetone and isopropanol. *Chem. Biol. Interact.* 44, 247-260, 1983.

Tu, Y.Y. and Yang, C.S. : High-affinity nitrosamine dealkylase system in rat liver microsomes and its induction by fasting. *Cancer Res.* 43, 623-629, 1983.

Umegaki, K., Ikegami S. and Ichikawa, T. : Fish oil enhances pentachlorobenzene metabolism and reduces its accumulation in rats. *J. Nutr.* 125, 147-153, 1995.

Wade, A.E. and Norred, W.P. : Effect of dietary lipids on drug-metabolizing enzymes. *Fed. Proc.* 35, 2475-2479, 1976.

Waxman, D.J. and Azaroff, L. : Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression. *Biochem. J.* 281, 577-592, 1992.

Yang, C.S. : The association between cytochrome P-450 and NADPH-cytochrome P-450 reductase in microsomal membrane. *FEBS Lett.* 54, 61-64, 1975.

Yang, C.S. : The organization and interaction of monooxygenase enzymes in the microsomal membrane. *Life Sci.* 21, 1047-1058, 1977.

Yang, C.S. and Yoo, J.S.H.: Dietary effects on drug metabolism by the mixed-function oxidase system. *Pharmacol. Ther.* 38, 53-72, 1988.

Yang, E.K., Radomska, A., Winder, B.S. and Dannenberg, A.J. : Dietary lipids coinduce xenobiotic metabolizing enzymes in rat liver. *Biochem Biophys. Acta* 1168, 52-58, 1993.

Yaqoob, P., Newsholme, E.A. and Calder, P.C. : Influence of cell culture conditions on diet-induced changes in lymphocyte fatty acid composition. *Biochim. Biophys. Acta* 1255, 333-340, 1995.

Yoo, J-SH., Hong, J.Y., Ning, S.M. and Yang, C.S. : Roles of dietary corn oil in the regulation of cytochromes P450 and glutathione S-transferase in rat liver. *J. Nutr.* 120, 1718-26, 1990.

Yoo, J-SH., Ning, S.M., Pantuck, C.B., Pantuck, E.J. and Yang, C.S. : Regulation of hepatic microsomal cytochrome P-450IIE1 level by dietary lipids and carbohydrates in rats. *J. Nutr.* 121, 959-965, 1991.

Yoo, J-SH., Smith, T.J., Ning, S.M., Lee, M.J., Thomas, P.E. and Yang, C.S. : Modulation of the levels of cytochromes P-450 in rat liver and lung by dietary lipid. *Biochem. Pharmacol.* 43, 2535-2542, 1992.

Zakim, D. and Vessey, D.A. : The effect of a temperature-induced phase change within membrane lipids on the regulatory properties of microsomal uridine diphosphate glucuronyltransferase. J. Biol. Chem. 250, 342-343, 1975.