

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

以齧齒類動物研究維生素B3作為能量限制模仿劑的能力與機制 (第3年)

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：NSC 102-2320-B-040-016-MY3
執行期間：104年08月01日至105年07月31日
執行單位：中山醫學大學營養學系(所)

計畫主持人：楊乃成

計畫參與人員：碩士級-專任助理人員：陳嫩嫻
碩士班研究生-兼任助理人員：李盈
碩士班研究生-兼任助理人員：陳佳雯
碩士班研究生-兼任助理人員：洪儀芝
碩士班研究生-兼任助理人員：鄧凱誠

中華民國 105 年 10 月 28 日

中文摘要：熱量限制可以藉由增加細胞內NAD⁺濃度，進而活化SIRT1而能延長壽命和降低老化相關疾病的發生率。熱量限制模仿劑(CRM)指化學分子或天然分子具有和熱量限制相同的作用，但不需要透過飲食限制的方式。維生素B3為NAD⁺的前趨物質，理論上可以作為熱量限制模仿劑，值得深入研究。本計畫的目的是以菸鹼醯胺及六菸鹼酸肌醇作為維生素B3代表分子，來探討維生素B3延長齧齒類動物壽命的能力和機制，並了解不同維生素B3分子之間作為熱量限制模仿劑的差異性。我們以30隻的F344/NNar1公大鼠，分成五組分別管餵不同劑量之IHN (0~1000mg/kg BW)，我們發現IHN不會有肝毒性，IHN分子本身應該不會被腸胃道吸收，因為在大鼠血中偵測不到完整的IHN分子。雖然IHN的溶解度很低，但IHN可以溶於胃酸，而且被吸收的比率極高，而且IHN可以顯著地增加大鼠肝臟和紅血球中的NAD^t，顯示IHN是一個有效的維生素B3分子。再來我們將8週齡的F344/NNar1公大鼠80隻，分成8組，比較不同劑量的IHN與NAM補充，對肝臟及RBC中NAD⁺濃度的影響，及對熱量限制相關生理指標、機制、血中濃度變化與肝毒性的影響，結果顯示IHN和NAM皆可以增加肝臟及RBC中NAD⁺濃度，但組織中的SIRT1活性並未上升，此結果不支IHN及NAM可以作為熱量限制模仿劑。重要的是，我們發現SIRT1去乙酰化反應僅需要約100uM的NAD當輔受質，超過100uM NAD並不能額外增加SIRT1的活性，顯示過量的維生素B3補充並不能增加SIRT1的活性。我們進一步利用人類Hs68細胞證明利用FK866誘發維生素B3缺乏模擬狀態可導致細胞衰老。重要的是，我們發現IHN及NAM等分子，只有在維生素B3缺乏時才能顯示具有熱量限制模仿劑的潛力，未來可進一步利用動物試驗確認細胞試驗所獲得的結論。

中文關鍵詞：熱量限制模仿劑、維生素B3、菸鹼醯胺、六菸鹼酸肌醇、NAD⁺、SIRT1

英文摘要：Calorie restriction (CR) extends lifespan and decreases the occurrence of age-related diseases through the increase in intracellular NAD⁺ levels followed by activation of SIRT1 protein. A calorie restriction mimetic (CRM) refers to any intervention that can evoke similar effects on aging, health and lifespan to those of CR but without actually restricting caloric intake. Because vitamin B3 is the precursor of NAD⁺, it theoretically can be a CRM. The purpose of this project was designed to take nicotinamide (NAM) and inositol hexanicotinate (IHN) as representative molecules to study the ability and mechanisms of vitamin B3 to be CRM. In this study, numbers of 30 of F344/NNar rats were divided into 5 groups and administrated different doses of INH orally (0~1000mg/kg BW). We found that INH has no hepatotoxicity. We also found that IHN itself cannot be absorbed by the digestive system, since we did not find any IHN molecules in rat plasma. Although with the low solubility of IHN in water, we found that the IHN can be dissolved in the simulated gastric juice, and the most of administered INH were absorbed and not found in stool. IHN

also significantly increased the levels of NAD^t in rat liver and RBC, suggesting that IHN is an efficacy vitamin B3 molecule. In addition, numbers of 80 of F344/NNar rats were divided into 8 groups to compare the effects of IHN and NAM on NAD⁺ levels in the liver and RBC, and the physiological functions, liver toxicity and the mechanisms of longevity of NAM and IHN. We found that IHN and NAM have ability to increase the NAD⁺ level in rat liver and RBC, but the SIRT1 activity in several tissues were not increased. These results dose not support that IHN and NAM can be a CRM. Importantly, we found that about 100M of NAD⁺ were needed as co-substrate for the deacetylated reaction for SIRT1. The exceeding levels of NAD⁺ were useless to increase the activity of SIRT1. These results have suggested that administration of vitamin B3 with overdoses cannot increase the SIRT1 activity. We further used a cell model of human Hs68 cells to demonstrate that the vitamin B3 deficiency induced by a chemical FK866 has ability to cause cell senescence. Importantly, we found that vitamin B3 molecules including IHN and NAM etc. could exert their CMR potential when the cells grown under this vitamin B3 deficient condition. Further investigations are warranted to support our contention raised from the cell-model studies by advanced animal tests.

英文關鍵詞：calorie restriction mimetic, vitamin B3, nicotinamide, inositol hexanicotinate, NAD⁺, SIRT1

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

(計畫名稱)

以齧齒類動物研究維生素 B₃ 作為熱量限制模仿劑的能力與機制

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 102-2320-B-040 -016 -MY3

執行期間： 2013 年 08 月 01 日至 2016 年 07 月 31 日

計畫主持人：楊乃成

共同主持人：

計畫參與人員：胡淼琳、宋祖瑩、陳嫩嫻

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學 營養學系

中 華 民 國 2016 年 10 月 30 日

前言

熱量限制可以藉由增加細胞內 NAD^+ 濃度，進而活化 SIRT1 而能延長壽命和降低老化相關疾病的發生率。熱量限制模仿劑指化學分子或天然分子具有和熱量限制相同的作用，但不需要透過飲食限制的方式。維生素 B_3 為 NAD^+ 的前趨物質，理論上可以作為熱量限制模仿劑，值得深入研究。廣義的維生素 B_3 分子包括：菸鹼酸、菸鹼醯胺、菸鹼醯胺核苷及六菸鹼酸肌醇等，本實驗室先前的研究證實許多維生素 B_3 分子具有延長人類 Hs68 細胞壽命的能力。本計畫擬進一步以動物試驗模式探討補充維生素 B_3 延長齧齒類動物體壽命的能力及機制，並與熱量限制作比較。但由於低劑量的補充菸鹼酸(約 $>30\text{mg/day}$)常會產生潮紅等不適的副作用；菸鹼醯胺核苷則因未商品化，價錢昂貴(目前已商品化)；過量補充菸鹼醯胺則有產生肝毒性的風險，因此，六菸鹼酸肌醇成為最有潛力作為熱量限制模仿劑的維生素 B_3 分子，但在未產生肝毒性的劑量下，菸鹼醯胺是否具有熱量限制模仿劑的作用亦值得研究。是故本三年計畫選擇菸鹼醯胺及六菸鹼酸肌醇作為維生素 B_3 代表分子來進行動物試驗，第一年將以 C57BL/6 小鼠進行菸鹼醯胺及六菸鹼酸肌醇的生存試驗，第二及第三年則以 F344/NNarl 大鼠分別進行 NAM 及 IHN 生理功效、肝毒性及機制的探討。本研究將有助於了解維生素 B_3 抗老化的作用和機制，並且提供 2~3 位學生學習動物試驗、分子生物及儀器分析的技術。

研究發現大鼠補充 500~1000 毫克/公斤高劑量的 NA 或 NAM，2 週，其紅血球及肝臟中 NAD^+ 大約增加 40~60% (Sauve 2008)，此外，NA 用於降血脂及 NAM 用於治療糖尿病，也都使用高劑量 >1500 毫克/天，是故，申請人推論維生素 B_3 作為熱量限制模仿劑，可能需使用到高劑量。在維生素 B_3 的分子中，由於 NA 在較低的劑量(約 $>30\text{mg/天}$)即可能會產生潮紅的副作用，故

運用性低。此外，目前商業化的 NR 很貴，10mg 價錢為 10000 元新台幣，而本實驗室自行以酵素生產之 NR 產量，亦不足以應付長期動物試驗之所需，而且生產成本同樣很高，因此，本計畫之動物試驗擬將 NR 摒除在外。而 IHN 無潮紅的副作用，而且目前為止未見有毒性的報告，理論上，極具有潛力開發作為熱量限制模仿劑，而且目前文獻對於 IHN 的研究仍然有限，因此，本計畫選擇以 NAM 及 IHN 作為維生素 B_3 的代表分子進行動物試驗。

研究目的

本計畫的目的是以菸鹼醯胺及六菸鹼酸肌醇作為維生素 B_3 代表分子，來探討維生素 B_3 延長齧齒類動物壽命的能力和機制，並了解不同維生素 B_3 分子之間作為熱量限制模仿劑的差異性。

因此本三年計畫擬探討

第一年：探討 NAM 及 IHN 延長小鼠壽命的能力：12 月的 C57BL/6 小鼠補充低、中、高 (88 毫克/公斤、880 毫克/公斤及 4.4 克/公斤飼料，相當於 10、100、500mg/kg B.W./day)劑量之 NAM 及 IHN 延長小鼠壽命的能力，實驗以熱量限制作為正控制組，加入中、高劑量之肌醇(193.6 毫克/公斤及 968 毫克/公斤飼料)作為肌醇控制組。生命期試驗約需二年的時間才能完成，故須在第一年開始執行。

第二年：探討補充 NAM 對熱量限制相關生理指標的影響、機制、血中濃度變化與肝毒性：F344/NNarl 大鼠在少齡開始補充低、中、高 (如前述)之 NAM，一定時間(1~6 個月)後，評估各處理組別對健康生理及生化指標改善的能力並與熱量限制組比較。檢查項目包括：體重、體脂肪重、血壓、血脂、血糖、GOP、GPT、insulin 等等，並探討 NAM 延長壽命的機制與 NAD^+ 、SIRT1、IGF-1、mTOR、PGC-1 α 及 AMPK 等分子的

關係及與熱量限制的異同點，並定期監測肝毒性與血中 NAM 的濃度與 SIRT1 及 PARP 活性抑制的情形。

3. 第三年：探討補充 IHN 對熱量限制相關生理指標的影響、機制、血中濃度變化與肝毒性：F344/NNarl 大鼠在少齡開始補充低、中、高之 IHN，另，加入中、高劑量之肌醇作為肌醇控制組，一定時間(1~6 個月)後，評估各處理組別對健康生理及生化指標改善的能力並與熱量限制組比較。檢查項目包括：體重、體脂肪重、血壓、血脂、血糖、GOP、GPT、insulin 等等，並探討 IHN 延長壽命的機制與 NAD⁺、SIRT1、IGF-1、mTOR、PGC-1 α 及 AMPK 等分子的關係及與熱量限制的異同點，並定期監測血中 IHN, NA 的濃度及是否有毒性反應產生。

結果與討論

壹、細胞試驗(一)

由於動物實驗準備需要時間，而本實驗室有已建立之細胞老化研究模式，因此，本計畫同時進行 IHN 的細胞試驗。亦即以細胞試驗研究 IHN 作為細胞熱量限制模仿劑之潛力。因為 IHN 的溶解度很低，過去研究發現 IHN 僅可以溶於鹽酸的水溶液，而以鹽酸水溶液作為溶劑，其酸性可能造成試驗的干擾。本研究剛開始先探討如何克服 IHN 之酸性溶劑的問題，然後我們進一步以 Hs68 細胞研究 INH 作為 CRM 的潛力。細胞內 NAD⁺ 濃度以酸萃取結合酵素循環呈色法測定。細胞複製型壽命(replicative lifespan)以累積性生長曲線(cumulative population doubling level (PDL) growth curve)測定。預先酸鹼平衡則利用培養基的碳酸緩衝液來中和溶劑的酸性，再以預先酸鹼平衡之培養基來培養細胞。FK866 為細胞內 nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT)的抑制劑，可以有效的降低細胞內的 NAD⁺濃度，進而縮短細胞壽命，故實驗亦 FK866 來模

擬維生 B3 缺乏的情況，以拮抗 FK866 細胞壽命縮短能力，來評估 INH 作為維生素 B3 來增加細胞 NAD⁺濃度能力。

結果如下：

一、IHN 的溶解度

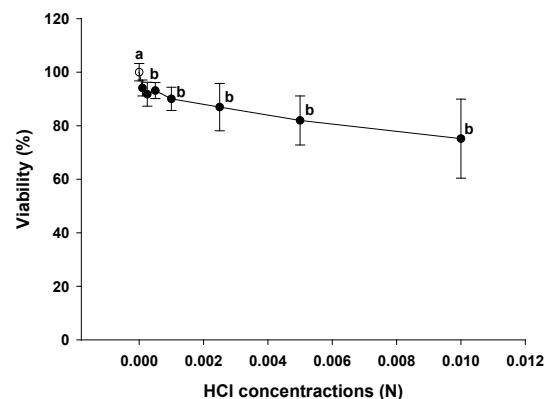
Solvent	Solubility
H ₂ O	insoluble
Methanol	insoluble
Eethanol	insoluble
DMSO	insoluble
n-hexane	insoluble
Olive oil	insoluble
Corn oil	insoluble
Glycerol	insoluble
THF	little soluble
1N HCl in H ₂ O	soluble

IHN 為難溶性極高的酯類，經測試發現，IHN 不溶於甲醇、乙醇、DMSO、n-hexane、THF 等溶劑，亦不溶於橄欖油、礦物油、玉米油及甘油等，僅有酸性的水溶液則可溶解 IHN，研究發現 IHN 在 1N HCl 其溶解度最高約達 100mM。

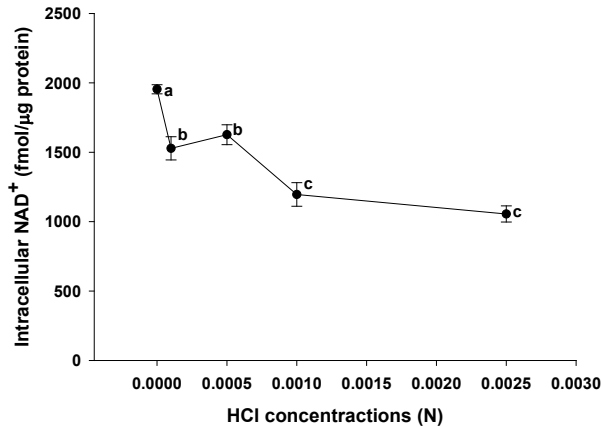
二、HCl 對細胞的影響

由於 IHN 以 HCl 作為溶劑，實驗必須先瞭解 HCl 本身對細胞的影響。

(1) 培養基中的 HCl 濃度會降低細胞存活率



將細胞種入培養盤，加入 HCl 使培養基的濃度為圖中所示，24 小時後，以 MTT 方法進行毒性試驗。結果顯示，培養基中外加酸(HCl)會降低細胞存活率。

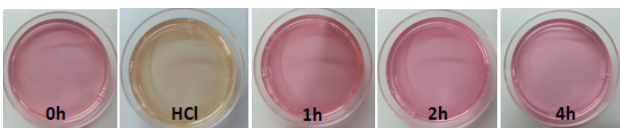


(2) 培養基中的 HCl 濃度會降低細胞內 NAD⁺濃度

細胞種入培養盤，加入 HCl 使培養基的濃度為圖中所示，24 小時後，以 MTT 方法進行毒性試驗。結果顯示外加酸(HCl)亦會降低細胞內 NAD⁺濃度，並且呈現濃度效應。

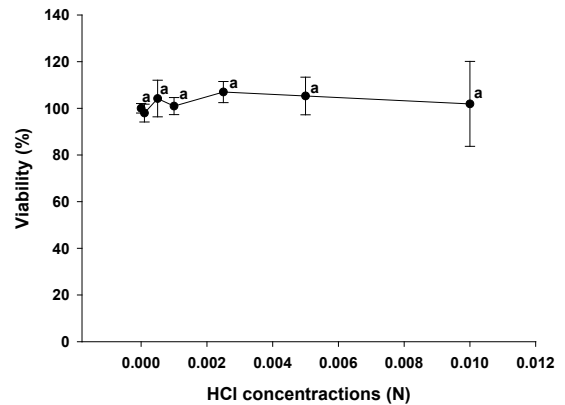
三、利用培養基本身的碳酸緩衝系統中和 HCl 之後對細胞的影響

(1) 碳酸緩衝系統中和 HCl 的能力



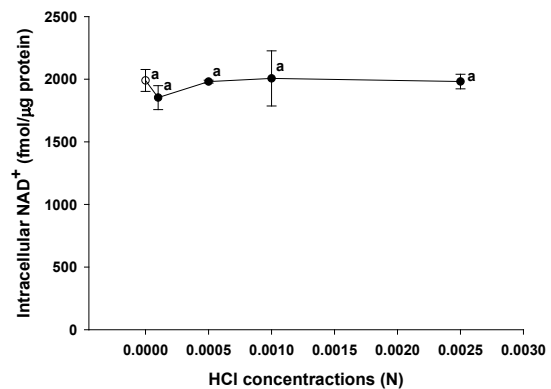
培養細胞的培養基中，含有碳酸緩衝溶液及指示劑，因而，培養基含有 0.001N HCl 時，培養基成黃色(酸性)。但，放置二氧化碳培養箱 1~4 小時，結果顯示約 2 小時後，培養基的顏色恢復成紅色(中性)。因此，可以利用培養基預先酸鹼平衡中和(指 cell free condition) 2 小時以上，再以預先酸鹼中和的培養基進行細胞培養。

(2) 以預先酸鹼中和培養基培養細胞對細胞存活率的影響



細胞以預先酸鹼中和>2 小時含不同濃度 HCl 之培養基，培養細胞 24 小時，細胞存活率不會降低($p>0.05$)。

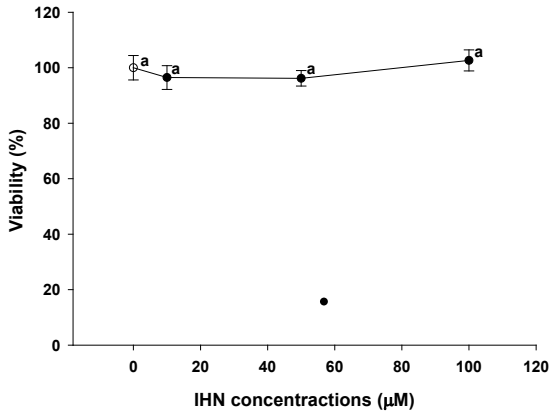
(3) 以預先酸鹼中和培養基培養細胞對細胞內 NAD⁺濃度的影響



細胞以預先平衡 2 小時含不同濃度 HCl 之培養基，培養細胞 24 小時，細胞內 NAD⁺濃度不會降低($p>0.05$)。顯示預先培養可以有效中和 HCl 酸性，並抑制酸性所誘發的效應。

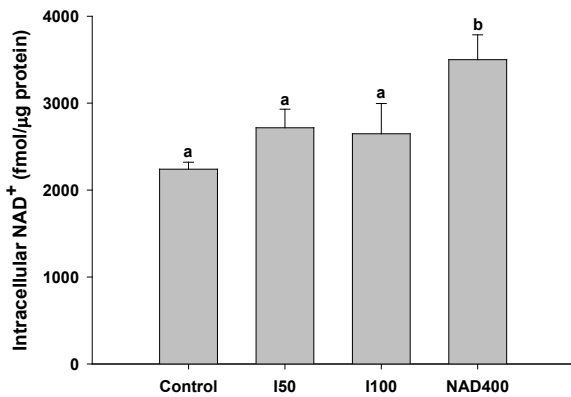
四、IHN 對細胞之影響

(1) IHN 對細胞存活率的影響



細胞以平衡>2 小時含不同濃度 IHN(0, 10, 50, 100, 250, 500, 1000μM)之培養基，培養 24 小時後，IHN 不會對細胞造成毒性，且但當濃度 $\geq 250\mu\text{M}$ 時，IHN 會因溶解度低而析出，顯示在中性的水溶液下 IHN 最高的溶解度約為 100mM。

(2) IHN 對細胞內 NAD^+ 濃度的影響

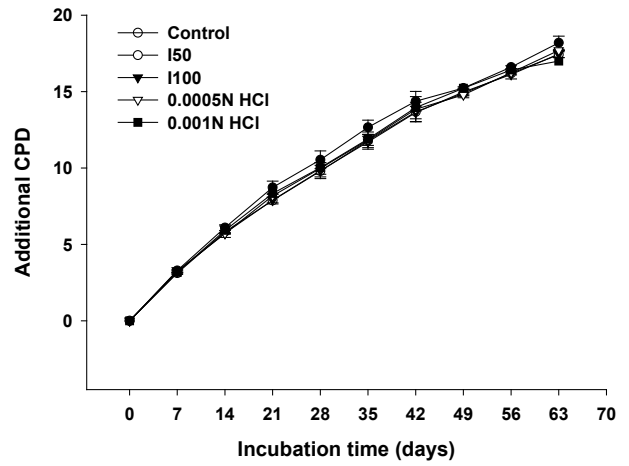


細胞以平衡>2 小時之 IHN 0~100μM (I50, I100)培養基，作用 24 小時後，細胞內 NAD^+ 濃度並不會上升($p>0.05$)，而在培養基額外添加 NAD^+ 400μM (正控制組)則可顯著的增加細胞內的 NAD^+ 濃度($p<0.05$)。此，結果應該再作確認，理論上，IHN 100uM 應該可以顯著的增加細胞中 NAD 濃度。

(3) 對細胞壽命之影響

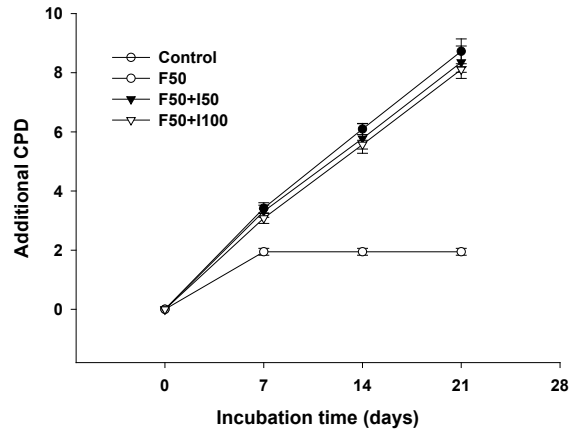
實驗發現 IHN 50 和 100μM 皆不會延長細胞壽命，我們也嘗試將 IHN 的濃度降低，仍得到相同的結論 IHN1~10μM 並不會延長

細胞壽命 (data not shown)。

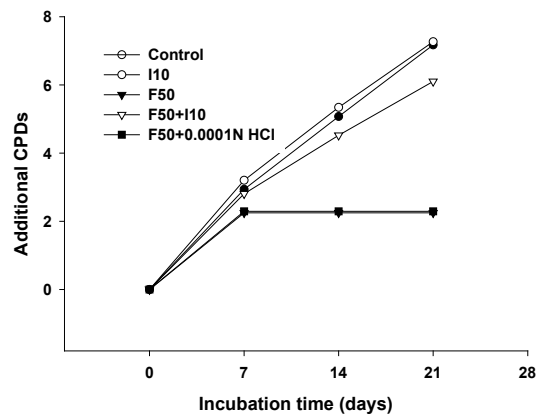


(4) IHN 拮抗 FK866 誘發之類細胞衰老生長抑制(senescence-like growth arrest)作用

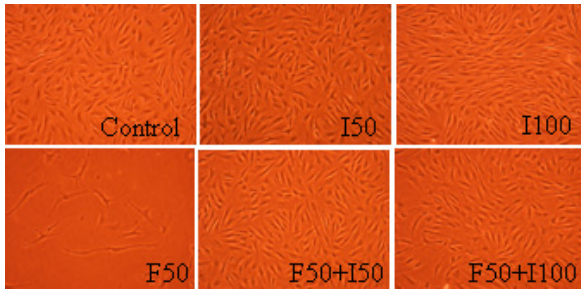
(a)



(b)



(c)



培養基中外加 FK866 50nM (F50)，會使 FK866 誘發之類細胞衰老生長抑制 (圖 a, b)。IHN 50 μ M、100 μ M (預先平衡 2 小時) 可以拮抗 FK866 誘發之類細胞衰老生長抑制作用，顯示 IHN 在細胞缺乏 NAD 時，具有作為 B3 的功能可以增加細胞內的 NAD 濃度。此外，降低 IHN 濃度為 1~10 μ M 仍顯示出拮抗 FK866 的結果(圖 c)。

(5) IHN 在培養基中的穩定度

100 μ M 的 IHN 加入培養基中 24 小時，我們以 HPLC 來測 IHN 的穩定性結果發現 >99% 的 IHN 皆水解產生 NA。顯示以細胞試驗來測試 IHN，實際上是測定 NA 的能效和 Inositol 相加的能效。值得一提的是 100 μ M IHN 已接近最高溶解度，因此，再多加 IHN 可能亦無法提高培養基中 NA 的濃度。

貳、動物試驗

第二年 本計畫原本探討補充 NAM 對熱量限制相關生理指標的影響、機制、血中濃度變化與肝毒性。但由於審查意見食建議 IHN 是否產生肝毒性的劑量應先執行。因此我們首先進行單一劑量管餵 IHN 之動物試驗，並且 F344/NNarl 公大鼠 55 隻(25+30 隻; 分二批)，分成

- [1] 控制組(0 毫克/公斤)
- [2] 低劑量組(IHN 10 毫克/公斤)
- [3] 中劑量組(IHN 100 毫克/公斤組)
- [4] 高劑量組(IHN 500 毫克/公斤組)
- [5] 超高劑量組(IHN 1000 毫克/公斤組)
(僅第二批)
- [6] IHN 2000 毫克/公斤組 (僅第一批)

第一批每組 5 隻，管餵 24 小時，測定血清中 IHN 及 NA 的濃度、GOP，GPT，及糞便中 IHN 濃度等，結果 IHN 並未顯示有肝毒性。我們也測定糞便中 IHN 的含量，發現 IHN 吸收率很高，在 2000mg/kg INH 組別約有 90% (註：期中報告時我們指出 2000mg/kg INH 的吸收率不佳，是因為計算錯誤，應更正)，但因第一批 2000mg/kg 因 IHN 劑量太高，管餵不好操作，造成管餵劑量不準，使得 IHN 的吸收率會高估，(測得 90% 而理論上應小於 85%)，故在第二批試驗時我們將 2000mg/kg INH 組別刪除，改成 1000mg/kg，並重覆試驗。第二批每組 6 隻。管餵 24 小時後，測定血清中 IHN 及 NA 的濃度、GOP，GPT，及糞便中 IHN 濃度，0~1000 毫克劑量組別其 GOT，GPT 與控制組比較皆未明顯上升，顯示單一劑量 IHN 並不會產生肝毒性。此外，在糞便中 IHN 的含量與管餵的劑量成正比，且結果顯示 IHN 的吸收率非常好，各組 IHN 吸收率接近 100%，超高劑量組 IHN 吸收率仍達 85% (如下表及下圖 a~c)。此外，結果發現血中測不到 IHN 的存在 (如下圖 d)，由此推測人體不會直接吸收 IHN，IHN 經胃酸溶解後，經過胰液中中和酸性後，估計約僅有 100 μ M 可以溶解在腸液中，並經自然的水解或經 lipase 催化水解，成游離態的 NA 和 inositol，然後吸收進血中。另，紅血球及肝臟中 NADt (NAD+NADH) 的濃度皆顯著增加顯示 IHN 具有 B3 的功能可以增加組織的 NAD 含量。紅血球的 NADt 上升呈現濃度效應，而肝臟則否。這可能因為單一劑量的 IHN 供給，肝臟中 NADt 經 24 小時後動力學變化所致。此結果確定 IHN 具有作為 B3 分子的能力。

(a) IHN 標準品 HPLC 圖

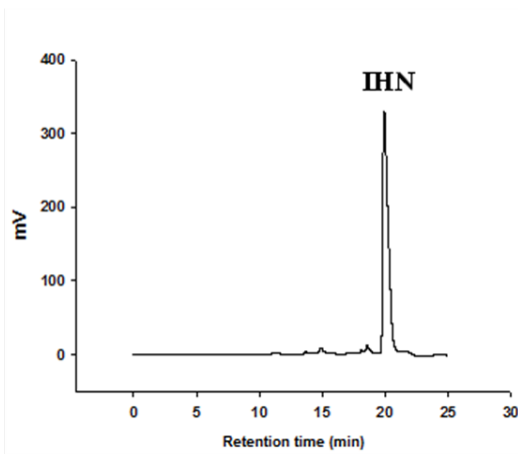
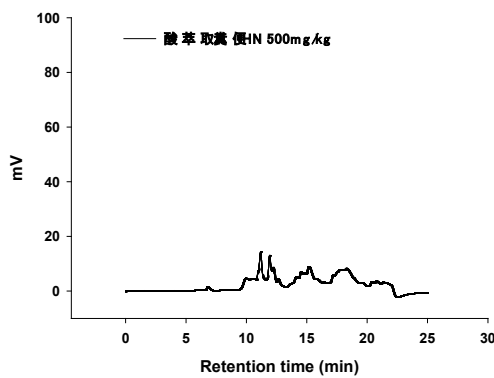


Table 1 Absorption rate of oral IHN with different doses in F344 rats

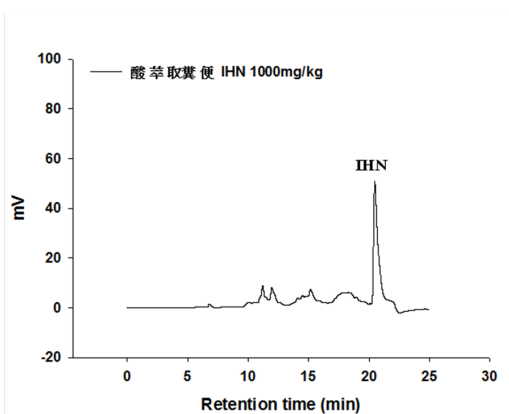
Group (IHN dose)	n	Oral IHN mg/rat	Faecal IHN mg/rat*	Absorption rate (%) [#]
Control (0mg/kg)	6	0 ± 0	0	100
Low dose (10mg/kg)	6	1.4 ± 0	0.00	100
Mediate dose (100mg/kg)	6	14.4 ± 0.8	0.04	100
High dose (500mg/kg)	6	54.5 ± 5.9	0.97	98
Super high dose (1000mg/kg)	6	130 ± 8.2	19.8	85

*# Mean of faecal IHN and absorption rate from the six rats, respectively.

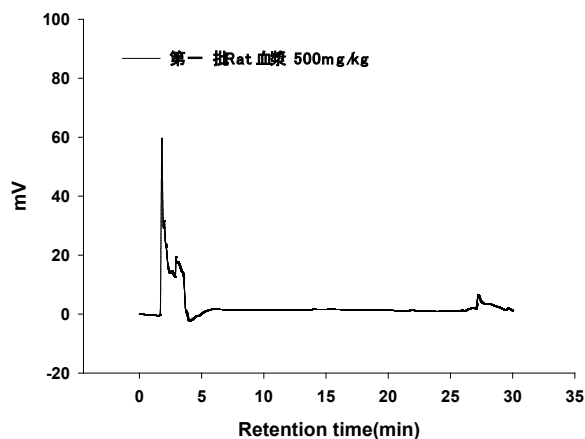
(b)



(c)



(d)



之後，我們進行長期的試驗，比較 IHN 與 NAM 補充，對熱量限制相關生理指標的影響、機制、血中濃度變化與肝毒性。由於之前單一劑量的研究 IHN 不會有肝毒性且劑量太高並不會有效增加血中 NA 的濃度，而且是中長劑的試驗，因此，我們將 8 週齡的 F344/NNarl 公大鼠 80 隻，分成 8 組：

- [1]自由進食控制組
- [2]肌醇控制組-高(968 毫克/公斤飼料)
- [3]NAM 低劑量組(88 毫克/公斤飼料)
- [4]NAM 中劑量組(880 毫克/公斤飼料)
- [5]NAM 高劑量組(4.4 克/公斤)
- [6]IHN 低劑量組(88 毫克/公斤飼料)
- [7]IHN 中劑量組(880 毫克/公斤飼料)
- [8] IHN 高劑量組(4.4 克/公斤飼料)

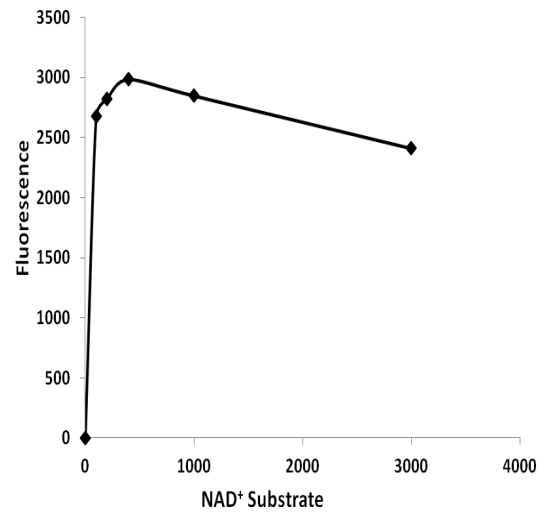
每組 10 隻，自由進食補充 3 個月後，評估各處理組別對健康生理及生化指標改善的能力。檢查項目包括：體重、GOP、GPT、insulin、IGF-1 測定、組織及紅血球中 NAD^+ 濃度測定、IHN 及 NA 血中濃度測定、西方墨點法測定 SIRT1、AMPK、AC-p53 和 p53 的表現。結果顯示相較於自由進食控制組，IHN 及 NAM 可以顯著增加紅血球和肝臟中 NAD^+ 的含量，並且呈現濃度效應。遺憾的是，Ac-p53 的程度並未因補充 NAM 或 IHN 而有所改變。SIRT1 及 AMPK 蛋白的表現亦無顯著的差異。肌醇對所有的檢測作用皆與控制組有顯著的差異。綜合上述所有的結果顯示，大鼠補充 IHN 及 NAM 並不能顯著增加體內 SIRT1 的活性，此結果

並不支持 IHN 和 NAM 可以作為熱量限制模仿劑，因此，我們決定回頭用細胞試驗來解答問題。

參、細胞試驗(二)

利用細胞試驗我們再次比較 NAM 及 nicotinamide riboside (NR; 菸鹼醯胺核苷) 等延長細胞壽命的能力。但這次我們購買商業化的 NR，而非自己合成的 NR。結果發現 NAM 和 NR 可以呈現濃度效應的增細胞內的 NAD 濃度，但是只有 NAM 可以有效的延長細胞的壽命，但 NAM 反而會增加 p53 的乙醯化。NR 可以增加細胞內 NAD 濃度，卻反而有縮短細胞壽命的作用，NR 亦無明顯降低 p53 的乙醯化的能力，而且 NR 會明顯的增加細胞 p53 蛋白的表現，此結果顯示，正常細胞培養的情況下，NAM 延長壽命和 NR 縮短壽命和細胞內 NAD 濃度增加無關，NAD 濃度的上升也未必會調升細胞內 SIRT1 的活性。

但是我們發現以 FK866 降低細胞內 NAD 的濃度，來模擬維生素 B3 缺乏的情形，發現在此模擬 B3 缺乏的情形下，p53 的乙醯化程度會上升，加 IHN, NAM, NR 甚至是 NA、NAD 等都具有延長細胞壽命，並且拮抗 FK866 因降低細胞內 NAD 濃度所造成的 p53 的乙醯化程度上升的作用。重要的是我們以 SIRT1 商業化的套組測定 SIRT1 去乙醯化時所需的 NAD 濃度只需要 100uM，過多的 NAD 並不會增在 SIRT1 的活性(如下圖)。因此，最後本計畫得到重要的結論，只有在維生素 B3 缺乏，致細胞內 NAD 濃度明顯的降低時，補充維生素 B3 才有延長細胞壽命的能力。



結論與建議

- (1) IHN 是廣泛用來作為維生素 B₃ 補充劑的型式之一，但目前相關文獻非常的少，本研究以細胞試驗說明 IHN 水中溶解度極低，最高也只能溶到約 100 μ M，實驗發現 100 μ M 的 IHN 在培養基中 24 小時會完全水解成 NA 和 inositol，顯示 100 μ M IHN 對細胞的能效和 600 μ M (6 倍濃度)的 NA 相類似(指當 inositol 無功效時)，IHN 可以增加組織中 NAD 濃度，顯示 IHN 具有維生素 B₃ 的功能。在 B₃ 缺乏的情況下，IHN 具有可作為熱量限制模仿劑的潛力。
- (2) 直接補充 IHN 及 NAM 並不能增加 SIRT1 的活性，因此，IHN 及 NAM 直接作小鼠生存試驗意義有限，建議未來應該待大鼠以 FK866 誘發維生素缺乏狀況，證實補充維生素 B₃ 具調升 SIRT1 活性的作用，得到驗證後，再進行 FK866 處理下，維生素 B₃ 的小鼠生命期實驗。
- (3) 單一劑量補充 IHN 的血液動力學變化研究顯示，IHN 分子本身不會被吸收，IHN 應該是水解成 IHN, inositol 後才被吸收，雖然 IHN 的溶解度很低，但被吸收的比率很高。IHN 溶解度低，為何具有高吸收率未來需進一步的研究。
- (4) 本研究發現 NAD 只需要約 100uM 即可符合 SIRT1 去乙醯化反應的需求，增加 NAD 的濃度並不能提升 SIRT1 的活性，

本研究的結果證實只有在 NAD 濃度低於 100uM，增在 NAD 濃度才有可能調升 SIRT1 的活性，亦即只有在維生素 B3 缺乏時，NAM，IHN 才能具有作為熱量限制模仿劑的潛力，而 NA 具潮紅副作用，NR 可能具有毒性，故縱使在 B3 缺乏的情形下，NA 及 NR 作為熱量限制模仿劑的潛力較低。

- (5) 上述的結果可推論，熱量限制可以藉由增加細胞內 NAD⁺濃度，進而活化 SIRT1 而能延長壽命和降低老化相關疾病的發生率，應該也是在生命體處於維生素 B3 缺乏時才發生的機轉，在維生素 B3 不缺乏時，熱量限制應該有其它的機制參與，值得進一步的研究。

參考文獻

Aguilar F, Charrondiere UR, Dusemund B. et al., Inositol hexanicotinate (inositol hexaniacinate) as a source of niacin (vitamin B3) added for nutritional purposes in food supplements. The EFSA Journal 2009; 949:1-20.

Baur JA, Pearson KJ, Price NL, et al., Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. Nature. 2006;444(7117):337-42.

Belenky P, Racette FG, Bogan KL, McClure JM, Smith JS, Brenner C. Nicotinamide riboside promotes Sir2 silencing and extends lifespan via Nrk and Urh1/Pnp1/Meu1 pathways to NAD⁺. Cell. 2007;129(3):473-84.

Bieganowski P, Brenner C. Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a Preiss-Handler independent route to NAD⁺ in fungi and humans. Cell. 2004;117(4):495-502.

Bogan KL, Brenner C. Nicotinic acid, nicotinamide, and nicotinamide riboside:

a molecular evaluation of NAD⁺ precursor vitamins in human nutrition. Annu Rev Nutr. 2008;28:115-30.

Bonkowski MS, Rocha JS, Masternak MM, Al Regaiey KA, Bartke A. Targeted disruption of growth hormone receptor interferes with the beneficial actions of calorie restriction. Proc Natl Acad Sci USA 2006;103:7901-7905.

Bordone L, Guarente L. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005;6(4):298-305.

Chen D, Guarente L. SIR2: a potential target for calorie restriction mimetics. Trends Mol Med 2007;13:64-71.

Donmez G, Guarente L. Aging and disease: connections to sirtuins. Aging Cell 2010;9:285-290.

Everitt AV, Roth GS, Le Couteur DG, Hilmer SN. Caloric restriction versus drug therapy to delay the onset of aging diseases and extend life Age (Dordr). 2005; 27(1): 39-48.

Frye RA. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000;273(2):793-798.

Gerasimenko, Julia V, et al; Bile Acids Induce Ca²⁺ Release from Both the Endoplasmic Reticulum and Acidic Intracellular Calcium Stores through Activation of Inositol Trisphosphate Receptors and Ryanodine Receptors, J Biol Chem, 2006;281:40154-40163.

Greenbaum CJ, Kahn SE, Palmer JP. Nicotinamide's effects on glucose metabolism in subjects at risk for IDDM. Diabetes. 1996;45(11):1631-4.

Guarente L. Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging. Gene Develop.

- 2000;14:1021-1026.
- Guarente L. Sirtuins as potential targets for metabolic syndrome. *Nature*. 2006 14;444(7121):868-74.
- Hagopian K, Ramsey JJ, Weindruch R. Caloric restriction counteracts age-related changes in the activities of sorbitol metabolizing enzymes from mouse liver. *Biogerontology*. 2009;10(4):471-9.
- Haigis MC, Sinclair DA. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol*. 2010;5:253–295.
- Hu Y, Liu J, Wang J, Liu Q. The controversial links among calorie restriction, SIRT1, and resveratrol. *Free Radic Biol Med*. 2011;51(2):250-6.
- Ingram DK, Zhu M, Mamczarz J, Zou S, Lane MA, Roth GS, deCabo R. Calorie restriction mimetics: an emerging research field. *Aging Cell* 2006; 5:97–108.
- Kamanna VS, Ganji SH, Kashyap ML. The mechanism and mitigation of niacin-induced flushing. *Int J Clin Pract*. 2009;63(9):1369-77.
- Klaus U. Studies on the toxicity and pharmacology of nicotinic acid. *JEPT*. 1939;65:95-103.
- Koubova J, Guarente L. How does calorie restriction work? *Genes Develop*. 2003;17:313-321.
- Liang D, Ma J, Wei B, Poon IO, Bell EC, Bates TR. Determination of inositol hexanicotinate in rat plasma by high performance liquid chromatography with UV detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2008;863(1):172-6.
- Lipman RD, Smith DE, Blumberg JB, Bronson RT. Effects of caloric restriction or augmentation in adult rats: longevity and lesion biomarkers of aging. *Aging (Milano)*. 1998;10(6):463-70.
- Mccay CM, Crowell MF, Maynakd LA. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. *J Nutr* 1935;10(1): 63-79.
- MacKay D, Hathcock J, Guarneri E. Niacin: chemical forms, bioavailability, and health effects. *Nutr Rev*. 2012;70(6):357-66.
- Miyauchi Y, Sano N, Nakamura T. Simultaneous determination of nicotinic acid and its two metabolites in human plasma using solid-phase extraction in combination with high performance liquid chromatography. *Int J Vitam Nutr Res*. 1993;63(2):145-9.
- Patel BP, Safdar A, Raha S, Tarnopolsky MA, Hamadeh MJ. Caloric restriction shortens lifespan through an increase in lipid peroxidation, inflammation and apoptosis in the G93A mouse, an animal model of ALS. *PLoS One*. 2010;5(2):e9386.
- Pugh TD, Oberley TD, Weindruch R. Dietary intervention at middle age: caloric restriction but not dehydroepiandrosterone sulfate increases lifespan and lifetime cancer incidence in mice. *Cancer Res*. 1999a;59(7):1642-8.
- Pugh TD, Klopp RG, Weindruch R. Controlling caloric consumption: protocols for rodents and rhesus monkeys. *Neurobiol Aging*. 1999b;20(2):157-65.
- Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1.

- Nature. 2005;434(7029):113-8.
- Rapiejko PJ, Northup JK, Evans T, Brown JE, Malbon CC. G-proteins of fat-cells. Role in hormonal regulation of intracellular inositol 1,4,5-trisphosphate. *Biochem J.* 1986;240(1):35-40.
- Roth GS, Ingram DK, Lane MA. Caloric restriction in primates and relevance to humans. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2001;928:305-315.
- Sauve AA. NAD⁺ and vitamin B3: from metabolism to therapies. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;324(3):883-93.
- To K, Yamaza H, Komatsu T, Hayashida T, Hayashi H, Toyama H, Chiba T, Higami Y, Shimokawa I. Down-regulation of AMP-activated protein kinase by calorie restriction in rat liver. *Exp Gerontol.* 2007;42(11):1063-71.
- Wang XX, Hu Y, Sun YZ, Bie MJ, Sun CJ. Simultaneous determination of five water-soluble vitamins in human serum by high performance liquid chromatography. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2010;41(1):158-61.
- Weidel, H. "Zur Kenntniss des Nicotins". *Justus Liebig's Annalen der Chemie und Pharmacie* 1873;165:330–349.doi:10.1002/jlac.18731650212.
- Weindruch R, Walford RL, Fligiel S, Guthrie D. The retardation of aging in mice by dietary restriction: longevity, cancer, immunity and lifetime energy intake. *J Nutr.* 1986;116(4):641-54.
- Yamaza H, Komatsu T, Chiba T, Toyama H, To K, Higami Y, Shimokawa I. A transgenic dwarf rat model as a tool for the study of calorie restriction and aging. *Exp Gerontol.* 2004;39(2):269-72.
- Yang NC, Song TY, Chen MY, Hu ML. Effects of 2-deoxyglucose and dehydroepiandrosterone on intracellular NAD(+) level, SIRT1 activity and replicative lifespan of human Hs68 cells. *Biogerontology.* 2011;12(6):527-36.
- Yang NC, Jhou KY, Tseng CY. Antihypertensive effect of mulberry leaf aqueous extract containing γ -aminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats. 2011;132:1792-1801.
- Yang T, Chan NY, Sauve AA. Syntheses of nicotinamide riboside and derivatives: effective agents for increasing nicotinamide adenine dinucleotide concentrations in mammalian cells. *J Med Chem.* 2007;50(26):6458-61.
- 衛生署, 健康食品之延緩衰老功能評估方法 (2003)衛署食字第 920401629 號公告

科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2016/10/09

科技部補助計畫	計畫名稱: 以齧齒類動物研究維生素B3作為能量限制模仿劑的能力與機制
	計畫主持人: 楊乃成
	計畫編號: 102-2320-B-040-016-MY3 學門領域: 保健營養
無研發成果推廣資料	

102年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：楊乃成			計畫編號：102-2320-B-040-016-MY3			
計畫名稱：以齧齒類動物研究維生素B3作為能量限制模仿劑的能力與機制						
成果項目		量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)		
國內	期刊論文		0			
	研討會論文		12	篇	<p>1) Nicotinamide riboside無法延長人類Hs68細胞壽命但卻可以拮抗FK866誘發細胞衰老的作用。第42屆台灣營養學會年會暨學術研討會，台北，台北醫學大學(2016)。</p> <p>2) 菸鹼醯胺延長Hs68細胞壽命機制的探討。第42屆台灣營養學會年會暨學術研討會，台北、台北醫學大學(2016)。</p> <p>3) 維生素B3缺乏可能導致人體老化。44次年會，高雄海洋科技大學(2014)。</p> <p>4) 以人類Hs68細胞模式來研究肌醇六菸鹼酸作為熱量限制模仿劑的潛力。第40屆營養年會暨學術研討會，輔仁大學(2014)。</p> <p>5) 調升NAMPT進而影響細胞中NAD⁺和nicotinamide濃度在葡萄糖限制延長人類Hs68細胞壽命的機制中扮演重要角色。台灣食品科技學會第43次年會，東海大學(2013)。</p> <p>6) Evaluating the potential of nicotinamide to be a calorie restriction mimetic using human fibroblast Hs68 cells.. 2013 International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods, Howard Civil Service International House, Taipei, Taiwan (2013).</p> <p>7) 維生素B3之菸鹼醯胺作為能量限制模仿劑潛力的評估。台灣營養學會第39屆年會，中國醫藥大學(2013)。</p>	
	專書		0	本		
	專書論文		0	章		
	技術報告		0	篇		
	其他		0	篇		
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件
				已獲得	0	
			新型/設計專利		0	
		商標權		0		

		營業秘密		0		
		積體電路電路布局權		0		
		著作權		0		
		品種權		0		
		其他		0		
	技術移轉	件數		0	件	
		收入		0	千元	
國外	學術性論文	期刊論文		8	篇	<p>1) Comparing the functional components, SOD-like activities, anti-mutagenicity and nutrient compositions of Phellinus igniarius and Phellinus linteus mushrooms. Journal of Food and Drug Analysis. 24, 343-349 (2015).</p> <p>2) A Nampt inhibitor FK866 mimics vitamin B3 deficiency by causing senescence of human fibroblastic Hs68 cells via attenuation of NAD(+)-SIRT1 signaling . Biogerontolgy. 16, 789-800 (2015).</p> <p>3) The anti-angiogenic action of 2-deoxyglucose involves attenuation of VEGFR2 signaling and MMP-2 expression in HUVECs. Life Sci. 139, 52-61 (2015).</p> <p>4) Up-regulation of nicotinamide phosphoribosyltransferase and increase of NAD+ levels by glucose restriction extend replicative lifespan of human fibroblast Hs68 cells. Biogerontolgy. 16, 31-42 (2015).</p> <p>5) J Chin Med Assoc.. 77, 535-543 (2014).</p> <p>6) The ScientificWorld Journal. 3013, 1-7 (2013).</p> <p>7) J Appl Physiol. 114, 274-285 (2013).</p> <p>8) PLOS ONE. 8, 5425- (2013).</p>
		研討會論文		0		
		專書		0	本	
		專書論文		0	章	
		技術報告		0	篇	
		其他		0	篇	
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件
已獲得				0		
新型/設計專利			0			

		商標權	0		
		營業秘密	0		
		積體電路電路布局權	0		
		著作權	0		
		品種權	0		
		其他	0		
	技術移轉	件數	0	件	
		收入	0	千元	
參與計畫人力	本國籍	大專生	0	人次	
		碩士生	4		
		博士生	0		
		博士後研究員	0		
		專任助理	1		
	非本國籍	大專生	0		
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士後研究員	0		
		專任助理	0		
其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)			(1)獲102年科技部特殊優秀人才獎勵。 (2)指導4位碩士生完成營養素的功能與機制研究碩士論文。		

科技部補助專題研究計畫成果自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現（簡要敘述成果是否具有政策應用參考價值及具影響公共利益之重大發現）或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以100字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

因大鼠動物實驗的結果並不支持維生素B3可以作為熱量限制模仿劑，由於經費上的考量(FK866太貴)，我們因而利用細胞試驗證實，只有在缺乏維生素B3的情況下，補充B3才有熱量限制模仿的能力。

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形（請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊）

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以200字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，以500字為限）

一、學術成就：

(1) 動物試驗證明IHN的吸收率極佳。IHN不溶於水，但可溶於胃酸，口服IHN血中測不到完整的IHN分子。單一劑量 IHN (0~1000mg/kg BW)不會產生肝毒性。

(2) 我們發現維生素B3缺乏會導致細胞衰老。只有在維生素B3缺乏時，補充維生素B3具有熱量模仿劑的潛力。

(3) 重要的是，我們發現SIRT1去乙酰化反應僅需要約100uM的NAD當輔受質，超過100uM NAD並不能額外增加SIRT1的活性。

二、技術創新

(1) 本研究開發了利用培養基及培養箱供給之CO₂所形成的碳酸緩衝系統，以不含細胞的預先培養方式，進行酸鹼中和，此法，可以推廣應用在其它只溶在酸性溶劑之化合物的細胞試驗。

(2) 本研究開發了測定血中、糞便及培養基中INH的HPLC方法，及測定組織中NAD、NADH及NADt的方法。

(4) 本研究開發了以FK866誘發化學性維生素B3缺乏模擬狀態的方法。

三、社會影響

本研究的結果提供缺乏維生素B3可能會導致老化，並且只有在缺乏維生素B3時，補充IHN, NAM等才有作為熱量限制模仿劑的潛力。NR可能有毒性需要進一步的研究。

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值：否 是，建議提供機關
(勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關)

本研究具影響公共利益之重大發現：否 是

說明：(以150字為限)