

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

以不同成因的發炎性疾病（代謝症候群及僵直性脊椎炎）
探討維生素 B-6 在發炎反應及脂質過氧化之角色：病例-對
照及介入研究
研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 96-2320-B-040-034-
執行期間：96年08月01日至97年07月31日
執行單位：中山醫學大學營養學系

計畫主持人：黃怡嘉
共同主持人：黃建寧、魏正宗
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：孫志銘

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 97年08月02日

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

以代謝症候群探討維生素 B-6 在發炎反應及脂質過氧化之角色

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 96- 2320 - B - 040 - 034 -

執行期間： 96 年 8 月 1 日至 97 年 7 月 31 日

計畫主持人：黃怡嘉 教授

共同主持人：黃建寧 醫師

計畫參與人員：孫志銘

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 營養系

中 華 民 國 97 年 7 月 31 日

中文摘要

代謝症候群指標中，最簡易測量的指標—腹部肥胖，已被證實與許多發炎反應及脂質過氧化指標具相關性。近年來，B-維生素〈維生素 B-6、B-12、葉酸〉與發炎反應或脂質代謝的關係也被廣泛討論。因此，本研究目的是探討代謝症候群患者的 B-維生素與發炎反應及脂質過氧化指標的相關性。本橫斷面研究是依據行政院衛生署國民健康局之代謝症候群定義，由台中市中山醫學大學附設醫院新陳代謝科募集 55 位代謝症候群受試者。代謝症候群受試者依其是否具有腹部肥胖指標（男性腰圍 ≥ 90 cm，女性腰圍 ≥ 80 cm）分為：腹部肥胖組（共 42 人）及非腹部肥胖組（共 13 人）。受試者接受體位測量及抽取空腹血液，分析臨床血液生化值、血清葉酸與維生素 B-12、血漿維生素 B-6（磷酸吡哆醛）、發炎反應指標〈高敏感度 C-反應蛋白、白細胞介素 6、纖維蛋白〉及脂質過氧化指標〈氧化型低密度脂蛋白、硫代巴比妥酸反應物〉。研究結果顯示，非腹部肥胖組的血漿磷酸吡哆醛濃度 (78.4 ± 40.5 vs. 53.1 ± 34.1 nmol/L) 顯著高於腹部肥胖組；高敏感度 C-反應蛋白 (0.1 ± 0.1 vs. 0.4 ± 0.4 mg/dL) 及纖維蛋白 (287.2 ± 75.9 vs. 350.1 ± 72.5 mg/dL) 則顯著低於腹部肥胖組。血清葉酸、維生素 B-12 與脂質過氧化指標在兩組間則無顯著差異。腹部肥胖組的血漿磷酸吡哆醛與高敏感度 C-反應蛋白 ($r = -0.31, p = 0.045$)，非腹部肥胖組的血漿磷酸吡哆醛與白細胞介素 6 ($r = -0.57, p = 0.044$) 皆呈顯著負相關。但血清葉酸及維生素 B-12 與發炎反應及脂質過氧化指標在任何一組皆無顯著相關性。當所有受試者合併分析後，血漿磷酸吡哆醛與高敏感度 C-反應蛋白 ($r = -0.40, p = 0.003$) 仍呈顯著負相關。代謝症候群具腹部肥胖指標的受試者有顯著較低的血漿磷酸吡哆醛及較高的發炎反應指標濃度，且維生素 B-6 與發炎反應指標呈顯著相關性。

關鍵字：代謝症候群、B-維生素、發炎反應、脂質過氧化

英文摘要

Central obesity is the easiest measurement among indicators of metabolic syndrome and has been documented to be related to inflammatory response and lipid peroxidation. Recently, the relationship between B-vitamins (vitamin B-6, B-12 and folate) and inflammatory responses and lipid peroxidation has been widely discussed. This cross-sectional study was undertaken to study the relationship between B-vitamins and inflammatory responses and lipid peroxidation in metabolic syndrome. The inclusion criteria of metabolic syndrome was based on Bureau of Health Promotion, Department of Health in Taiwan. Fifty-five subjects with metabolic syndrome were recruited from the division of Metabolism, Chung Shan Medical University hospital, Taichung. Subjects were further divided into either central obesity group ($n = 42$) or non-central obesity ($n = 13$) according to whether subjects having abdominal obesity (waist circumference ≥ 90 cm in men; ≥ 80 cm in women). Subjects' weight and height were measured and body mass index was then calculated. Fasting blood sample was obtained to estimate hematological parameters, serum B-12 and folate, plasma B-6 (pyridoxal 5'-phosphate, PLP), inflammatory (high-sensitivity C-reactive protein, hs-CRP; interleukin-6, IL-6; fibrinogen) and lipid peroxidation indicators (thiobarbituric acid reactive substances, TBARs; oxidized low-density lipoprotein cholesterol, ox-LDL). Results showed that plasma PLP concentration (78.4 ± 40.5 vs. 53.1 ± 34.1 nmol/L) was significantly higher in the non-central obesity group than did in the central obesity group; while levels of hs-CRP (0.1 ± 0.1 vs. 0.4 ± 0.4 mg/dL) and fibrinogen (287.2 ± 75.9 vs. 350.1 ± 72.5 mg/dL) were significantly lower in the non-central obesity group than did in the central obesity group. There were no significant differences in serum B-12 and folate, inflammatory and lipid peroxidation indicators between two groups. Plasma PLP was negatively correlated with hs-CRP ($r = -0.31$, $p = 0.045$) in the central obesity group and with IL-6 ($r = -0.57$, $p = 0.044$) in the non-central obesity group. No significant correlation was found between vitamin B-12 or folate and inflammatory responses or lipid peroxidation indicators in any groups. Negative correlation still remained between plasma PLP and hs-CRP after subjects were pooled ($r = -0.40$, $p = 0.003$). Metabolic syndrome subjects with central obesity had significantly lower plasma PLP and higher inflammatory response indicators; in addition, plasma PLP had a significant correlation with inflammatory responses.

Key words: metabolic syndrome, B-vitamin, inflammatory responses, lipid peroxidation

前言

腹部肥胖與否在代謝症候群之診斷標準中的重要性，除了可在台灣 2006 年所修改的代謝症候群定義中一窺究竟之外（去除身體質量指數為診斷標準，只留下腰圍之定義），2005 年國際糖尿病聯盟更規定，腹部肥胖為代謝症候群的必要條件，並且對於不同種族給予不同腰圍標準，此一規定，更突顯出腹部肥胖是定義代謝症候群的重要指標。

Després 等人 (2008) 針對腹部肥胖與代謝症候群其他指標之關係，提出以下幾個觀點：1) 腹部肥胖使腹部脂肪處於高度分解狀態，肝臟暴露於高濃度的游離脂肪酸下，導致肝臟功能代謝受損，進一步造成高胰島素血症（降低胰島素清除效果）、葡萄糖耐受性降低（增加肝臟葡萄糖產生）及高三酸甘油酯血症；2) 脂肪組織亦為內分泌器官，為許多脂肪激素 (adipokines) 來源，例如：adiponectin 及 cytokines 等。脂肪激素除了增加胰島素阻抗外，也會造成前發炎 (pro-inflammatory) 狀態、前栓塞 (pro-thrombotic) 狀態及前高血壓 (pro-hypertensive) 狀態；3) 皮下脂肪具有保護身體避免脂肪再生不良 (lipodystrophy) 的功能，一旦腹部脂肪過多，使得皮下脂肪失去此功能，因此造成脂肪細胞肥大及胰島素敏感度下降。由以上觀點可得知，腹部肥胖為診斷代謝症候群的主要原因，也更加證實腹部肥胖對於代謝症候群的重要性。

代謝症候群的各项指標當中，包含了腹部肥胖、血糖值異常（胰島素阻抗／糖尿病）及血壓值異常（高血壓），皆被認為是發炎反應的狀態 (Pradhan et al., 2001; Després et al., 2008; Ferroni et al., 2008)。發炎反應為體內一種正常的防禦機制，當組織受傷或是有微生物入侵時，所產生的一種保護性反應。發炎反應產生時，體內組織或器官會藉由分泌一些物質來調節發炎反應作用，例如：肝臟細胞分泌的 C-反應蛋白 (C-reactive protein, CRP)、纖維蛋白 (fibrinogen)、巨噬細胞分泌的細胞介素 (interleukin)、腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 等。因此，可以藉由測得這些發炎指標的濃度高低來評估體內發炎的狀況。許多研究指出，代謝症候群受試者較非代謝症候群受試者有顯著較高的 C-反應蛋白、纖維蛋白及細胞介素-6 濃度，被認為是處在前發炎反應 (pro-inflammatory) 的狀態，可視為代謝缺陷所引起的發炎性疾病 (Pickup et al., 1997; Fröhlich et al., 2000; Ford, 2003; Kraja et al., 2007)。Lee 等人 (2007) 指出，若代謝症候群受試者符合越多代謝症候群指標，則會有顯著較高濃度的發炎反應指標 (C-反應蛋白)。Yudkin 等人 (2000) 也發現發炎反應指標與代謝症候群的症狀（如：胰島素阻抗）有顯著的相關性。另外有研究指出，腹部肥胖之代謝症候群受試者，發炎反應指標（C-反應蛋白、細胞介素-6）顯著高於未符合腹部肥胖指標之代謝症候群受試者 (Nishida et al., 2007; Nakamura et al., 2008)。從上述結果得知，代謝症候群或許與慢性發炎反應有關，而此長期的發炎反應將使代謝症候群患者增加罹患心血管疾病的機會。

代謝症候群各項指標中，就有兩項與脂質相關——三酸甘油酯過高及高密度脂蛋白膽固醇過低。因此，脂質代謝異常在代謝症候群診斷扮演重要的角色。脂質過氧化 (lipid

peroxidation) 是指，脂肪酸經過自由基攻擊的一種過程；當自由基攻擊細胞膜上的多元不飽和脂肪酸後，會進行自由基的連鎖反應，導致脂質過氧化作用。而脂質過氧化物的產生是脂肪酸遭受自由基攻擊的一種指標。體內最常受到自由基攻擊的為低密度脂蛋白膽固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)，因此受攻擊所造成的氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL) 便成為最常見的脂質過氧化指標。Demircan 等人 (2008) 的 case-control 研究指出，代謝症候群受試者比起非代謝症候群受試者有顯著較高的脂質過氧化產物—丙二醛 (malondialdehyde, MDA) (1.14 ± 0.25 nmol/mL vs. 0.89 ± 0.18 nmol/mL, $p < 0.01$)。Yamagishi 等人 (2007) 在日本的研究也指出，符合越多代謝症候群指標的受試者，血液氧化型的低密度脂蛋白會顯著上升 ($p < 0.0001$)。Knopp 等人 (2006) 更進一步推論代謝症候群受試者是因為腹部肥胖增加氧化壓力，因而促進低密度脂蛋白過氧化。雖然代謝症候群與脂質過氧化的相關研究並不是很多，但是從上述研究可推測代謝症候群可能因為發炎反應的增加，促使自由基產生，攻擊不飽和脂肪酸因而增加脂質過氧化反應。

研究指出血漿磷酸吡哆醛濃度低下可能與發炎反應有關。壓力、疾病及其他臨床狀況可能會增加內生性維生素 B-6 的利用、促進維生素 B-6 代謝的轉換 (metabolic turnover) 及降低其體內的貯存 (lower body pools)。包括其他 (Galloway et al., 2000; Friso et al., 2001; Talwar et al., 2003a) 及我們 (Huang et al., 2005) (plasma PLP vs. hs-CRP, $r = -0.352$, $p < 0.001$) 先前的研究都指出低血漿磷酸吡哆醛濃度與發炎反應的重要指標—C-反應蛋白，有顯著相關性。Friso 等人 (2001) 根據 C-反應蛋白的值將 891 位受測者分成 2 組，group 1 (CRP < 6 mg/L) 及 group 2 (CRP ≥ 6 mg/L)，結果發現 group 2 的血漿磷酸吡哆醛濃度顯著低於 group 1 (36.5 nmol/L vs. 55.8 nmol/L, $p < 0.001$)，多重回歸分析也顯示血漿磷酸吡哆醛濃度與 C-反應蛋白呈高度相關 ($p = 0.003$)。

Folsom 等人 (2003) 在 45-65 歲健康人中，將血漿磷酸吡哆醛、維生素 B-12 及葉酸五分位後，發現隨著維生素 B-12 濃度越高其 C-反應蛋白 ($p = 0.04$) 及纖維蛋白 ($p = 0.02$) 有顯著下降之差異；但血漿磷酸吡哆醛及葉酸與發炎反應指標則無顯著差異。Friso 等人 (2004) 也指出，罹患冠狀動脈心臟病的患者比沒有罹患冠狀動脈心臟病的受試者有顯著較低的血漿磷酸吡哆醛、維生素 B-12、葉酸及顯著較高的纖維蛋白與高敏感度 C-反應蛋白；進一步將受試者依高敏感度 C-反應蛋白與纖維蛋白四分位之後，發現高敏感度 C-反應蛋白與纖維蛋白濃度越高，血漿磷酸吡哆醛濃度則越低 ($p < 0.001$; $p < 0.001$)。B-維生素已於許多研究模式中被探討與發炎反應之相關性，但卻少有研究是以代謝症候群為研究模式探討發炎反應與 B-維生素之相關性。

Taysi (2005) 指出維生素 B-6 缺乏的老鼠較對照組的老鼠，其肝臟組織有顯著較低的 glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, total superoxide scavenger activity, non-enzymatic superoxide scavenger activity 及 superoxide dismutase activity antioxidant potential；結果顯示維生素 B-6 缺乏導致前述的抗氧化防禦系統能力降低並且增加肝臟

組織的氧化壓力。因此缺乏維生素 B-6 可能增加身體的氧化壓力，進而影響脂質過氧化作用。Jain 等人 (2001) 指出比哆醇及比哆胺可以顯著降低超氧自由基及脂質過氧化產物—丙二醛之生成。Joshi 等人 (2001) 於細胞實驗中發現，葉酸為有效的自由基清除者，因此可以降低脂質過氧化情形。Bunout 等人 (2000) 給予罹患冠狀動脈心臟病的患者短期補充含有維生素 B-12 (0.4 μg) 及葉酸 (0.65 mg) 的補充劑可以降低氧化型低密度脂蛋白 ($p < 0.001$)，但是因為補充劑中還含有其他抗氧化維生素 (維生素 C、E 等)，因此不能完全確定降低氧化型低密度脂蛋白是因為維生素 B-12 及葉酸的關係。

從上述文獻中可得知：1) 代謝症候群各項指標中，腹部肥胖是代謝症候群的重要指標，且腹部肥胖為最易獲得的數據；2) 許多臨床研究已證實 B-維生素對於同半胱胺酸及發炎反應之重要性，但卻少有以代謝症候群為研究模式之探討。因此本研究目的是以代謝症候群為模式，依據有無腹部肥胖探討 B-維生素與同半胱胺酸、發炎反應及脂質過氧化指標之相關性。

材料與方法

本研究以橫斷面研究 (cross-sectional study) 進行。研究計畫經過中山醫學大學人體試驗審查委員會核准同意後進行。研究計畫進行前皆徵求受試者同意，並請受試者簽署同意書。

研究對象

本研究對象為代謝症候群受試者。受試者的募集是在中山醫學大學附設醫院新陳代謝科進行。代謝症候群的診斷是依照行政院衛生署國民健康局於 2006 年公告之臨床診斷準則；1) 腹部肥胖 (central obesity)，男性腰圍 ≥ 90 cm，女性腰圍 ≥ 80 cm；2) 收縮壓/舒張壓 $\geq 130/85$ mmHg (包含目前正在服用降血壓藥物，且無論血壓是否正常者)；3) 高密度脂蛋白膽固醇過低，男性 < 40 mg/dL，女性 < 50 mg/dL；4) 空腹血糖濃度 ≥ 100 mg/dL (包含目前正在服用降血糖藥物，且無論血糖是否正常者)；5) 三酸甘油酯濃度 ≥ 150 mg/dL (包含目前正在服用降血脂藥物，且無論血脂是否正常者)；若符合上述任 3 項診斷 (包含 3 項)，則定義為代謝症候群。

受試者若具有下列條件則排除於本研究外，包括：1) 懷孕或服用任何口服避孕藥；2) 貧血 (hemoglobin ≤ 10 mg/dL)；3) 血小板過低 (platelet count $\leq 50,000/\mu\text{L}$)；4) 癌症及 5) 服用的藥物會干擾 B-維生素代謝 (例如：isoniazid, hydralazine, penicillamine, cycloserine)。受試者所服用的藥物也一併記錄。

符合本研究納入條件的受試者共募集 55 位。將受試者依據有無腹部肥胖標準 (男性腰圍 ≥ 90 cm，女性 ≥ 80 cm) 分組，分為腹部肥胖組 (central obesity group) 共 42 人及非腹部肥胖組 (non-central obesity group) 共 13 人。

研究方法

由研究人員紀錄受測者的基本資料，包括：性別、年齡、血壓、病歷記錄（包含過去病史、家族史及服用藥物狀況）、生活習慣（包含抽菸、喝酒、吃檳榔、運動及服用補充劑狀況）。若受試者為女性，則記錄是否停經，若已停經則紀錄停經年齡。

由研究人員測量受試者的身高、體重、體脂肪、腰圍、臀圍、上臂環圍及三頭肌皮層厚度。並計算受試者的身體質量指數、上臂肌肉環圍、臂肌肉面積及臂肌肉脂肪面積。

本研究由受過訓練的研究人員以 24 小時飲食回憶法 (24-hour recall) 經紀錄受試者抽血前一天的飲食攝取。營養素攝取量是利用御廚皇營養師專業軟體加強版 (E-Kitchen Business Corporation, Taiwan, 2006) 計算營養素攝取情形。

採取受試者空腹禁食至少八小時後的全血。另外以含有 EDTA (ethylenediamine-tetraacetic acid) 抗凝血劑的真空採血管抽取受試者 20 毫升的血液，保持在 4°C 的環境，並在抽完血 30 分鐘內，以 4°C，3000 rpm，10 分鐘的超高速離心機分離血漿 (plasma) 及紅血球 (erythrocyte)。分別抽取其上清液（血漿）及介於血漿與紅血球間的白血球衣 (buffy coat)。將血漿分裝於 1.5 mL 的 eppendroff 儲存於 -80°C 的冷凍冰箱直到分析。所有處理血液的過程皆需避光。尿液收集的部分，採取受試者抽血當天早晨空腹第一次尿液，並使用錫箔紙將裝尿液的離心管包覆避光，並置於 4°C 的環境。

受試者的臨床常規血液檢驗是委託中山醫學大學附設醫院檢驗科進行分析。檢驗項目，包括白血球 (white blood cell, WBC)、血紅素 (hemoglobin, Hb)、血比容 (hematocrit, Hct)、平均紅血球容積率 (mean corpuscular volume, MCV)、平均紅血球血色素 (mean corpuscular hemoglobin, MCH)、淋巴球 (lymphocytes)、單核球 (monocytes)、血液尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、肌酸酐 (creatinine)、天門冬胺酸轉胺酶 (aspartate aminotransferase, AST)、丙胺酸轉胺酶 (alanine aminotransferase, ALT)、鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、白蛋白 (albumin)、空腹血糖 (fasting blood glucose)、三酸甘油酯 (triglyceride, TG)、總膽固醇 (total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白膽固醇 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白膽固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 及高敏感度 C-反應蛋白 (high-sensitivity C-reactive protein, hs-CRP)。

受試者血清葉酸及維生素 B-12 濃度，是委託台中市世博檢驗所，利用競爭性酵素連結免疫吸附法 (competitive enzyme linked immunosorbent assay) 分析。血清葉酸正常值為 > 6.80 nmol/L，血清維生素 B-12 正常值為 132.84-674.54 pmol/L。

血漿磷酸比哆醛及 4-比哆酸的分析是參考 Talwar 等人 (2003b) 的方法，以高效能液相層析法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 分析。於暗室冰浴的條件下，取 1000 μL 血漿，加入 80 μL 的 D.A. 【semicarbazide (250 mg/dL) + glycine (250 mg/dL)】，混合均勻後置於 25 $^{\circ}\text{C}$ 恆溫水浴槽 30 分鐘，再加入 80 μL 的過氯酸 (HClO_4) 後，混合一分鐘，以高速離心機離心 (11000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$ 10 分鐘)，取 600 μL 上清液，加入 60 μL 的 25% NaOH (調整 pH 值 3.0~5.0) 混合均勻後，取上清液以過濾膜 (Filter: 0.45 μm , PVDF 材質, Millipore 公司, 美國) 過濾後取 150 μL 作分析。

使用之分離管柱為 Synergi 4u Fusion RP 80A (內徑 5 μm , 250 \times 4.6 mm, Phenomenex, 美國)。移動相 (mobile phase) 包含 60 mmol/L 的 NaH_2PO_4 ，內含 9.5% methanol (v/v) 及 400 mg/L 的 EDTA，並以 85% 的 H_3PO_4 調整 pH 值至 6.5。幫浦流速為 1.5 mL/min。分析血漿磷酸比哆醛的螢光檢測器設定的 excitation 波長為 380 nm，emission 波長為 450 nm，滯留時間約為 9-10 分鐘。分析血漿 4-比哆酸的螢光檢測器設定的 excitation 波長為 320 nm，emission 波長為 420 nm，滯留時間約為 20-21 分鐘。以標準品的磷酸比哆醛及 4-比哆酸作出標準曲線，計算出受試者血漿磷酸比哆醛及 4-比哆酸的濃度，單位以 nmol/L 表示。血漿磷酸比哆醛組間變異係數為 2.03% (n=6)，組內變異係數為 1.21% (n=4)，再現性為 100.04% (n=7)。血漿 4-比哆酸組間變異係數為 2.54% (n=6)，組內變異係數為 0.86% (n=4)，再現性為 82.30% (n=7)。

維生素 B-6 的代謝產物是以 4-比哆酸的形式由尿液排出。本研究參考 Gregory 和 Kirk (1979) 的方法，以高效能液相層析法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 分析。取 2 mL 的尿液，加入 0.5 mL 的二次水及 0.5 mL 的 40% trichloroacetic acid (TCA) 混勻，避免 4-PA lactone 的形成，之後加以離心 (2500 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 分鐘)，取上清液以過濾膜 (Filter: 0.45 μm , PVDF 材質, Millipore 公司, 美國) 過濾後取 200 μL 進行分析。使用之分離管柱為 LiChrospher[®] 100 RP-18e (250 mm \times 4 mm I.D., Merck, 德國)，guard column 為 LiChrospher[®] 100 RP-18e (5 μm , Merck, 德國)。移動相包括 0.33 M 的 H_3PO_4 及 5% 的 methanol，以 6 N 的 KOH 調整 pH 值至 2.2。幫浦流速為 2.0 mL/min。螢光檢測器設定的 excitation 波長為 355 nm，emission 波長為 436 nm，滯留時間約為 4-5 分鐘。以標準品的 4-比哆酸作出標準曲線，計算出受試者尿液 4-比哆酸的濃度。由於受試者的尿液僅收集當天第一次尿液，無法作為每日排出量，故尿液 4-比哆酸的濃度是以尿液肌酸酐的排出量作校正，以 $\mu\text{mol/g}$ 的單位表示之。尿液 4-比哆酸組間變異係數為 2.49% (n=7)，組內變異係數為 0.52% (n=4)，再現性為 99.35% (n=7)。

血漿同半胱氨酸濃度的分析主要是參考 Araki 及 Sako (1987) 與 Radha Rama Devi 等人 (2006) 的方法，以高效能液相層析法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 來分析。取 100 μL 血漿，加入 200 μL 的 0.125 M borate buffer 內含 4 mM EDTA (pH=9.22) 混合均勻後再加入 10 μL N-dimethyl-formamide (DMF) 內含 12.3 % tri-n-butylphosphine (TBP)，混合均勻後於 4 $^{\circ}\text{C}$ 下靜置 30 分鐘。之後，加入 300 μL 10 % 的 trichloroacetic acid (TCA) 混合均勻，離心 (11000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 分鐘)。之後，取 200 μL 的上清液加入 40 μL 1.5 M

的sodium hydroxide (NaOH)，混合均勻後於4°C下靜置10分鐘。之後，加入500 µL的0.125 M borate buffer 內含 4 mM EDTA (pH=9.22) 混合均勻後再加入 200 µL 的 fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonic acid (SBDF) 混合均勻，置於60°C水浴1小時後冷卻至室溫，以過濾膜 (Filter: 0.45 µm, PVDF材質, Millipore公司, 美國) 過濾後取250 µL進行分析。使用之分離管柱為LiChrospher® 100 RP-18e (250 mm × 4 mm I.D, Merck, 德國)，guard column為LiChrospher® 100 RP-18e (5 µm, Merck, 德國)。移動相包括 0.1 M 的 potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄)，內含 0.1M KH₂PO₄ 及 35 mL/L acetonitrile，並用85% 的 phosphoric acid 調整pH值至3.5。幫浦流速為1.2 mL/min。螢光檢測器設定的excitation波長為385 nm，emission波長為515 nm，滯留時間約為5-6分鐘。以標準品的同半胱胺酸作出標準曲線，計算受試者血漿同半胱胺酸的濃度，單位以 µmol/L 表示。血漿同半胱胺酸組間變異係數為 2.19% (n=6)，組內變異係數為 3.36% (n=3)，再現性為 100.19% (n=7)。

受試者血漿纖維蛋白濃度，是委託台中市世博檢驗所，利用 Dade® Fibrinogen Determination Reagents 商業套組分析。血漿纖維蛋白正常值為 200-400 mg/dL。受試者血漿 IL-6 濃度，採用 eBioscience 公司分析 IL-6 之 kit package (eBioscience, San Diego, CA)，利用競爭性酵素連結免疫吸附法 (competitive enzyme linked immunosorbent assay) 分析。IL-6 標準品濃度的建議範圍為 2-200 pg/mL。血漿硫代巴比妥酸反應物濃度的分析主要是參考 Lapenna 等人(2001)的方法，利用低密度脂蛋白氧化過後的次級產物 malondialdehyde (MDA) 為指標，使用螢光光譜儀測定反應物的多寡，藉由反應物多寡判定 MDA 量，進而得知脂質氧化的情形。取 90 µL 血漿，加入 160 µL phosphate buffered saline (PBS) 混合均勻後加入 0.25 mL 3 % sodium dodecyl sulfate (SDS)，混合均勻後再加入 1 mL 0.1N hydrochloride (HCl)，混合均勻後再加入 0.15 mL 10 % phosphotungstic acid，混合均勻後加入 0.5 mL 0.7 % tribarbituric acid (TBA)，混合均勻後置入乾浴槽，於 100°C 下反應 30 分鐘後，置於冷水中冷卻，最後以 2.5 mL 之 n-butanol 萃取，混合均勻後離心 (2000 rpm, 10 分鐘)，取上清液 1 mL，於螢光光譜儀設定 excitation 波長 515 nm，emission 波長 555 nm 下測得其吸光值。因為 MDA 無法由化學方法合成，因此由其類似物 1,1,3,3-Tetramethoxypropane (TMP) 取代作出標準曲線 (standard curve)，計算出受試者血漿硫代巴比妥酸反應物的濃度，單位以 µmol/L 表示。血漿硫代巴比妥酸反應物組間變異係數為 3.16% (n=22)，組內變異係數為 3.57% (n=3)。血漿 ox-LDL 濃度的分析是採用 Mercodia 公司分析 ox-LDL 之 kit package (Mercodia AB, Sylveniusgatan 8A, SE-754 50 Uppsala, Sweden)，利用競爭性酵素連結免疫吸附法 (competitive enzyme linked immunosorbent assay)。ox-LDL 標準品濃度的建議範圍為 0-28 mU/L。

統計分析

本研究的統計分析以 SAS 9.12 版套裝軟體執行 (The SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)。以 Student's *t*-test 或 Wilcoxon rank sum test 比較腹部肥胖組及非腹部肥胖組的基本資料、血液生化值、營養素攝取量、B-維生素營養狀況、發炎反應及脂質過氧化指標值等連續變項的差異性。利用 Chi-square test 或 Fisher's exact test 比較腹部肥胖組與非腹部肥胖組的性別及生活型態 (抽菸狀況、酒精攝取、運動狀況及女性停經狀況) 等類別變項之差異性。使用 Spearman correlation coefficients 分析各項 B-維生素營養狀況指標值與發炎反應及脂質過氧化指標之相關性。

統計結果以 $p < 0.05$ 代表具有統計上的意義。描述性統計之數據皆以平均值加減標準差 (mean \pm SD) 表示，不呈常態分布之描述性統計數據則加以中位數 (median) 表示。

結果

基本資料與體位測量

受試者的基本資料及體位測量結果列於表一。代謝症候群受試者年齡分佈從 23 歲至 73 歲，腹部肥胖組及非腹部肥胖兩組的平均年齡是無顯著差異的。腹部肥胖組的體重、BMI、腰圍、臀圍、腰臀比、體脂肪及上臂環圍，皆顯著高於非腹部肥胖組。生活型態部分，非腹部肥胖組的飲酒習慣百分比顯著高於腹部肥胖組，但其抽煙及運動習慣或女性停經狀況在兩組間則無顯著差異。

血液生化檢驗值

受試者的臨床血液生化值列於表二。腹部肥胖組的白血球顯著高於非腹部肥胖組；但淋巴球計數百分比及白蛋白濃度則顯著低於非腹部肥胖組。其他臨床血液生化值在兩組間皆未達到統計上的顯著差異。

B-維生素生化指標濃度

受試者 B-維生素的生化指標濃度列於表四。血清葉酸及維生素 B-12 濃度，在兩組間皆未達到顯著差異。

在維生素 B-6 部分，非腹部肥胖組的血漿磷酸吡哆醛濃度顯著高於腹部肥胖組。非腹部肥胖組的尿液吡哆酸濃度也顯著高於腹部肥胖組，但因為所收集的尿液並非 24 小時的總尿量，因此使用當次尿液中的肌酸酐做校正後，兩組的校正濃度則未達到顯著差異。

同半胱胺酸、發炎及脂質過氧化指標

受試者血液同半胱胺酸、發炎及脂質過氧化指標結果列於表五。兩組之平均同半胱胺酸濃度並無顯著差異。

在發炎反應指標部份，腹部肥胖組之高敏感度 C-反應蛋白及纖維蛋白濃度皆顯著高於非腹部肥胖組。但在細胞介素-6 濃度則兩組間並無達到顯著差異。

B-維生素與同半胱胺酸、發炎及脂質過氧化指標之相關性

利用 Spearman correlation coefficients 分析 B-維生素與同半胱胺酸、發炎及脂質過氧化指標之相關性，結果列於表六。

血漿磷酸比哆醛在腹部肥胖組及所有受試者中，皆與高敏感度 C-反應蛋白呈顯著負相關；與非腹部肥胖組細胞介素-6 呈顯著負相關；但是與所有受試者的硫代巴比妥酸反應物具有顯著正相關。

維生素 B-12 部分，僅與非腹部肥胖組及所有受試者的同半胱胺酸呈顯著負相關。

血清葉酸濃度不管是在腹部肥胖組、非腹部肥胖組或是所有受試者，皆與同半胱胺酸呈顯著負相關。

討論

代謝症候群—B-維生素與同半胱胺酸

Guyen 等人 (2005) 指出代謝症候群受試者有較高的同半胱胺酸濃度，可能是因為有較低的維生素 B-12，且代謝症候群受試者的同半胱胺酸與維生素 B-12 呈顯著負相關，不與葉酸呈顯著相關性。不論本研究之代謝症候群受試者的平均同半胱胺酸 (14.5 $\mu\text{mol/L}$ vs. 24.2 $\mu\text{mol/L}$) 濃度低於 Guyen 等人 (2005) 之研究，或是維生素 B-12 (317.8 pmol/L vs. 157.9 pmol/L) 及葉酸 (18.6 nmol/L vs. 11.8 nmol/L) 平均濃度高於 Guyen 等人 (2005) 之研究，維生素 B-12 與葉酸皆與同半胱胺酸呈顯著負相關。因此，代謝症候群受試者若能維持較高的維生素 B-12 及葉酸濃度或許可以降低同半胱胺酸的濃度。

雖然維生素 B-12 及葉酸與同半胱胺酸呈顯著負相關，但是代謝症候群受試者的維生素 B-6 與同半胱胺酸卻無顯著相關性，可能是因為禁食情況下 S-adenosylmethionine 比較傾向進行依賴維生素 B-12 及葉酸的再甲基化作用 (Selhub et al., 1992; Ubbink et al., 1996)。因此本研究與其他研究 (Lim et al., 2002; Bleie et al., 2007) 皆有相似結果：禁食情況下，同半胱胺酸與維生素 B-12 及葉酸呈顯著負相關，但與維生素 B-6 無顯著相關性。

代謝症候群—B-維生素與發炎反應

其他研究 (Nishida et al., 2007; Nakamura et al., 2008) 同樣以代謝症候群為研究模式，依照有無腹部肥胖標準分組發現，腹部肥胖較無腹部肥胖之代謝症候群受試者有顯著較高的發炎反應指標 (高敏感度 C-反應蛋白及纖維蛋白)。脂肪組織為體內重要的內分泌器官，分泌許多脂肪激素 (adipokines)，例如：adiponectin、cytokines 等，若脂肪

組織增加，使 cytokines 增加刺激肝臟釋出發炎反應蛋白，例如：C-反應蛋白及纖維蛋白等，將使發炎更加嚴重。

本研究發現，腹部肥胖較無腹部肥胖之代謝症候群受試者有顯著較低的血漿磷酸比哆醛，且與發炎反應指標（高敏感度 C-反應蛋白及細胞介素-6）呈顯著負相關。已知血漿磷酸比哆醛為蛋白質合成的重要輔酶，Friso 等人 (2001) 指出，較高發炎反應指標 (CRP \geq 6 mg/L) 之受試者降低的磷酸比哆醛並非因為飲食中的維生素 B-6 攝取下降，或是尿液排出比哆酸增加，而是發炎反應階段增加血漿磷酸比哆醛利用，因而降低血漿磷酸比哆醛濃度。

與許多研究有著相似的結果 (Friso et al., 2001; Folsom et al., 2003)，本研究中也未發現維生素 B-12 及葉酸與發炎反應指標具顯著相關性。Galloway 等人 (2000) 指出維生素 B-12 與葉酸與發炎狀況下並不會有顯著下降之情況。Bleie 等人 (2007) 給予冠狀動脈心臟病患者補充維生素 B-12 (0.4 mg) 及葉酸 (0.8 mg) 半年之後，結果顯示補充維生素 B-12 及葉酸並未顯著降低發炎反應指標 (C-反應蛋白及細胞介素-6)。維生素 B-12 與葉酸是否參與發炎反應之過程，可能需要更多研究討論。

代謝症候群—B-維生素與脂質過氧化

細胞實驗結果顯示，葉酸可幫助清除自由基，因而降低脂質過氧化程度 (Joshi et al., 2001)。有許多實驗給予不同受試者補充含有 B-維生素之補充劑，也都發現可以降低脂質過氧化反應指標 (氧化型低密度脂蛋白)，但補充劑卻不是單純 B-維生素，而是另外含有其他抗氧化維生素，例如：維生素 C、E 等 (Bunout et al., 2000; Earnest et al., 2003)，因此無法得知單純 B-維生素補充是否能達到降低脂質過氧化之效果。

雖然於細胞實驗中可見 B-維生素與脂質過氧化關係之端倪，但是本研究結果並未發現任何 B-維生素與脂質過氧化相關，可能是因為人體之代謝機制過於繁雜，因此沒辦法直接了解 B-維生素與脂質過氧化之關係。

結論

本研究顯示，代謝症候群受試者的同半胱胺酸與維生素 B-12 及葉酸呈顯著負相關。除此之外，腹部肥胖較無腹部肥胖之代謝症候群受試者有顯著較低的血漿磷酸比哆醛及較高的發炎反應指標 (hs-CRP 及 fibrinogen)；且血漿磷酸比哆醛與不同的發炎反應指標 (hs-CRP 及 IL-6) 呈顯著負相關。代謝症候群的 B-維生素與同半胱胺酸、發炎反應與脂質過氧化的關係仍需更多研究證實。

表一、腹部肥胖組與非腹部肥胖組之基本資料^{1,2}

Table 1. Descriptive characteristics of central obesity and non-central obesity subjects.^{1,2}

Characteristics	Central obesity (n=42)	Non-central obesity (n=13)	<i>p</i>
Age (y)	54.64 ± 10.60	51.77 ± 7.77	0.211
Male/Female	17/25	9/4	0.112
Height (cm)	159.73 ± 8.06	161.08 ± 10.16	0.744
Weight (kg)	72.16 ± 10.73	65.72 ± 12.06	0.049
BMI (kg/m ²)	28.37 ± 3.72	25.12 ± 2.04	0.003
Waist circumference (cm)	94.01 ± 8.56	83.43 ± 5.80	<0.001
Hip circumference (cm)	100.81 ± 7.00	94.3 ± 4.38	0.004
WHR	0.93 ± 0.07	0.88 ± 0.04	0.008
Body Fat (%)	34.22 ± 8.16	29.04 ± 5.94	0.022
TSF (mm)	22.09 ± 9.92	19.77 ± 8.11	0.539
MAC (cm)	30.60 ± 3.73	27.91 ± 2.68	0.013
MAMC (mm)	236.58 ± 41.98	217.00 ± 35.55	0.303
AMA (mm ²)	4593.22 ± 1688.75	3842.07 ± 1121.02	0.303
AFA (mm ²)	2967.86 ± 1345.87	2411.49 ± 958.64	0.160
Blood pressure			
SBP (mmHg)	144.76 ± 20.28	141.69 ± 18.16	0.727
DBP (mmHg)	92.76 ± 12.47	99.38 ± 12.09	0.112
Smoking (n, %)	9 (21.43)	3 (23.08)	1.000
Drinking (n, %)	5 (11.90)	5 (38.46)	0.045
Exercise ³ (n, %)	19 (45.24)	9 (69.23)	0.205
Menopause (n, %)	18 (72.00)	2 (50.00)	0.568

¹Values are mean ± SD. BMI, body mass index; WHR, waist to hip ratio; TSF, triceps skinfold thickness; MAC, mid-arm circumference; MAMC, mid-arm muscle circumference; AMA, arm muscle area; AFA, arm fat area; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure.

²The definition of central obesity is waist circumference ≥ 90 cm in male; ≥ 80 cm in female.

³Exercise was defined as doing regulate exercise at least 3 times/wk.

表二、腹部肥胖組與非腹部肥胖組之血液生化值¹

Table 2. Hematological values of central obesity and non-central obesity subjects.¹

Indicators	Central obesity (n=42)	Non-central obesity (n=13)	<i>p</i>
WBC (mm ³)	7014.52 ± 1374.79	5786.15 ± 899.54	0.007
Hb (gm/dL)	13.95 ± 1.59	14.52 ± 1.43	0.411
Hct (%)	42.68 ± 4.07	44.23 ± 3.80	0.246
MCV (fL)	88.87 ± 6.56 (89.85)	88.87 ± 8.52 (89.80)	0.766
MCH (pg)	29.06 ± 2.78 (29.45)	29.20 ± 3.22 (29.30)	0.774
Lymphocytes (%)	32.17 ± 6.75	37.50 ± 8.44	0.040
Monocytes (%)	4.85 ± 1.13	5.85 ± 2.18	0.127
BUN (mg/dL)	16.81 ± 4.89	16.38 ± 2.96	0.858
Creatinine (mg/dL)	0.97 ± 0.20	0.98 ± 0.16	0.712
ALT (IU/L)	28.88 ± 23.77	21.62 ± 9.67	0.599
AST (IU/L)	23.90 ± 11.78	19.00 ± 5.51	0.212
ALP (IU/L)	75.23 ± 23.90	67.31 ± 18.45	0.331
Albumin (g/dL)	4.43 ± 0.29	4.62 ± 0.24	0.048
Glucose (mg/dL)	172.28 ± 56.47	172.85 ± 54.32	0.975
Triglyceride (mg/dL)	199.76 ± 107.37 (182.00)	201.46 ± 88.56 (193.00)	0.835
TC (mg/dL)	204.49 ± 32.73	193.00 ± 25.98	0.242
HDL-C (mg/dL)	42.65 ± 9.46	47.17 ± 16.58	0.789
LDL-C (mg/dL)	121.43 ± 31.90	106.00 ± 21.82	0.096

¹Values are mean ± SD (median). WBC, white blood cell; Hb, hemoglobin; Hct, hematocrit; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; BUN, blood urine nitrogen; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ALP, Alkaline phosphatase; TC, total cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol.

表三、腹部肥胖組與非腹部肥胖組之與 B-維生素生化指標¹

Table 3. Biochemical indicators of B-vitamins in the central obesity and non-central obesity groups.¹

Indicators	Central obesity (n=42)	Non-central obesity (n=13)	<i>p</i>
Plasma PLP (nmol/L)	53.09 ± 34.14 (43.10)	78.43 ± 40.52 (61.30)	0.006
Plasma 4-PA (nmol/L)	16.76 ± 7.81 (14.58)	26.24 ± 28.76 (15.83)	0.373
Urine 4-PA (μmol/L)	5.82 ± 5.32 (4.03)	12.53 ± 13.24 (8.02)	0.008
Urine 4-PA/urine creatinine (μmol/g)	0.40 ± 0.29 (0.30)	0.79 ± 1.16 (0.40)	0.126
Serum vitamin B-12 (pmol/L)	306.66 ± 158.33 (285.61)	353.11 ± 146.06 (350.55)	0.307
Serum folate (nmol/L)	17.60 ± 7.42 (15.99)	21.79 ± 12.24 (17.97)	0.424

¹Values are mean ± SD (median). PLP, pyridoxal 5'-phosphate; 4-PA, 4-pyridoxic acid.

表四、腹部肥胖組與非腹部肥胖組之同半胱胺酸、發炎反應指標及脂質過氧化指標¹

Table 4. Homocysteine, inflammatory responses and lipid peroxidation indicators in the central obesity and non-central obesity groups.¹

Indicators	Central obesity (n=42)	Non-central obesity (n=13)	<i>p</i>
Plasma Hcy (μmol/L)	14.72 ± 5.65 (13.73)	13.92 ± 6.45 (12.42)	0.452
Inflammatory responses indicators			
Hs-CRP (mg/dL)	0.36 ± 0.40 (0.20)	0.13 ± 0.11 (0.11)	0.007
Fibrinogen (mg/dL)	350.09 ± 72.51	287.15 ± 75.93	0.011
IL-6 (pg/mL)	1.37 ± 0.85	1.23 ± 0.71	0.692
Lipid peroxidation indicators			
TBARs (μmol/L)	0.74 ± 0.14	0.83 ± 0.16	0.071
Ox-LDL (mU/L)	7.32 ± 3.86 (6.61)	6.37 ± 2.41 (6.03)	0.464

¹Values are mean ± SD (median). Hcy, homocysteine; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein; IL-6, interleukin-6; TBARs, thiobarbituric acid reactive substances; ox-LDL, oxidized low-density lipoprotein.

表五、B-維生素與同半胱氨酸、發炎反應及脂質過氧化指標之相關性¹

Table 5. Spearman correlation coefficients (*r*) between B-vitamins and homocysteine, inflammatory responses or lipid peroxidation indicators in the central obesity and non-central obesity groups.¹

Indicators	Plasma PLP			Serum vitamin B-12			Serum folate		
	Central obesity (n=42)	Non-central obesity (n=13)	Total (n=55)	Central obesity (n=42)	Non-central obesity (n=13)	Total (n=55)	Central obesity (n=42)	Non-central obesity (n=13)	Total (n=55)
	<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>
Plasma Hcy	-0.094	0.077	-0.075	-0.200	-0.593*	-0.314*	-0.388*	-0.632*	-0.471*
Hs-CRP	-0.311*	-0.280	-0.399*	-0.052	0.082	-0.070	-0.071	0.291	-0.012
Fibrinogen	0.067	0.481	-0.058	0.310	0.382	0.249	0.059	0.199	0.039
IL-6	-0.043	-0.566*	-0.174	-0.204	-0.055	-0.188	-0.116	-0.467	-0.218
TBARs	0.273	-0.275	0.269	-0.173	0.000	-0.099	0.296	-0.027	0.177
Ox-LDL	0.087	0.055	0.039	-0.124	0.253	-0.072	0.176	0.060	0.127

¹*r*, correlation coefficients; PLP, pyridoxal 5'-phosphate; Hcy, homocysteine; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein; IL-6, interleukin-6; TBARs, thiobarbituric acid reactive substances; ox-LDL, oxidized low-density lipoprotein.

**p*<0.05

参考文献

- Guven A, Inanc F, Kilinc M, Ekerbicer H. Plasma homocysteine and lipoprotein (a) levels in Turkish patients with metabolic syndrome. *Heart Vessels* 2005; 20: 290-5.
- Selhub J and Miller JW. The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. *Am J Clin Nutr* 1992; 55: 131-8.
- Ubbink JB, van der Merwe A, Delport R, Allen RH, Stabler SP, Riezler R, Vermaak WJ. The effect of a subnormal vitamin B-6 status on homocysteine metabolism. *J Clin Invest* 1996; 98: 177-84.
- Lim HS and Heo YR. Plasma total homocysteine, folate, and vitamin B12 status in Korean adults. *J Nutr Sci Vitaminol* 2002; 48: 290-7.
- Bleie Ø, Semb AG, Grundt H, Nordrehaug JE, Vollset SE, Ueland PM, Nilsen DW, Bakken AM, Refsum H, Nygård OK. Homocysteine-lowering therapy does not affect inflammatory markers of atherosclerosis in patients with stable coronary artery disease. *J Intern Med.* 2007; 262: 244-53.
- Nakamura H, Ito H, Egami Y, Kaji Y, Maruyama T, Koike G, Jingu S, Harada M. Waist circumference is the main determinant of elevated C-reactive protein in metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pract* 2008; 79: 330-6.
- Nishida M, Moriyama T, Sugita Y, Yamauchi-Takahara K. Abdominal obesity exhibits distinct effect on inflammatory and anti-inflammatory proteins in apparently healthy Japanese men. *Cardiovasc Diabetol* 2007; 6: 27-32.
- Folsom AR, Desvarieux M, Nieto FJ, Boland LL, Ballantyne CM, Chambless LE. B vitamin status and inflammatory markers. *Atherosclerosis* 2003; 169: 169-74.
- Friso S, Jacques PF, Wilson PW, Rosenberg IH, Selhub J. Low circulating vitamin B(6) is associated with elevation of the inflammation marker C-reactive protein independently of plasma homocysteine levels. *Circulation* 2001; 103: 2788-91.
- Galloway P, McMillan DC, Sattar N. Effect of the inflammatory response on trace element and vitamin status. *Ann Clin Biochem* 2000; 37: 289-97.
- Joshi R, Adhikari S, Patro BS, Chattopadhyay S, Mukherjee T. Free radical scavenging behavior of folic acid: evidence for possible antioxidant activity. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 1390-9.
- Bunout D, Garrido A, Suazo M, Kauffman R, Venegas P, de la Maza P, Petermann M, Hirsch S. Effects of supplementation with folic acid and antioxidant vitamins on homocysteine levels and LDL oxidation in coronary patients. *Nutrition* 2000; 16: 107-10.
- Earnest CP, Wood KA, Church TS. Complex multivitamin supplementation improves homocysteine and resistance to LDL-C oxidation. *J Am Coll Nutr* 2003; 22: 400-7.