



計畫編號： DOH93-TD-F-113-048-(2)

行政院衛生署九十三年度科技研究計畫

探討紅甘藷葉對餵食炸油之 F344 大鼠  
結直腸細胞病變之保護效應

**The protective effects of *Ipomoea batatas*  
on the colorectal carcinoma of  
oxidized frying oil-fed rats**

## 研究報告

執行機構：臺北醫學大學

計畫主持人：劉珍芳

研究人員： 鄭雅分、陳巧明、黃美子

執行期間： 93 年 8 月 1 日至 94 年 7 月 31 日

\*本研究報告僅供參考，不代表本署意見，依合約之規定：如對  
媒體發布研究成果應事先徵求本署同意\*

# 目錄

表目錄 .....	4
圖目錄 .....	6
中文摘要 .....	7
英文摘要 .....	8
第一章 前言 .....	9
第二章 材料與方法 .....	11
第一節 實驗設計 .....	11
第二節 實驗材料.....	12
第三節 實驗方法.....	16
第三章 結果 .....	30
第一節 油脂於油炸過程中品質之變化 .....	30
第二節 飼料中多酚類之含量分析 .....	31
第三節 餵食炸油對以 DMH 誘發 F344 大鼠結直腸病變細胞之影響(實驗一) .....	32
第四節 餵食紅甘藷葉後，對以 DMH 誘發且餵食炸油飲食之 F344 大鼠結直 腸病變細胞之影響 (實驗二).....	45
第四章 討論 .....	61
第一節 油脂品質的分析 .....	61

第二節 炸油對動物體的傷害 .....	61
第三節 炸油對大鼠結直腸癌之影響 .....	64
第四節 紅甘藷葉及大鼠血漿中多酚類之含量分析及其代謝情形 .....	65
第五節 紅甘藷葉中多酚類對餵食炸油大鼠之生理影響 .....	66
第六節 多酚類在大鼠體內代謝情形及抗氧化狀況之影響 .....	67
第七節 紅甘藷葉中多酚類對大鼠結直腸癌之影響 .....	69
第五章 結論 .....	70
第六章 參考文獻 .....	71

## 表目錄

表一 動物分組及各組之飲食配方 .....	13
表二 飼料成分表.....	14
表三 新鮮黃豆油於油炸過程中品質之變化 .....	30
表四 紅甘藷葉中多酚類含量之分析 .....	31
表五 飼料中多酚類含量之分析 .....	31
表六 餵食新鮮油或炸油飼料 32 週後，大鼠體重增加、飼料攝食量 及攝食效率之影響 .....	35
表七 餵食新鮮油或炸油飼料 32 週後，大鼠之肝重及相對肝重 ...	36
表八 餵食新鮮油或炸油飼料 32 週後，大鼠之結腸重及相對結腸重 .....	37
表九 餵食新鮮油或炸油飼料 32 週後，大鼠之血液生化值 .....	38
表十 餵食新鮮油或炸油飼料 32 週後，大鼠肝臟中 Cytochrome P450 之含量 .....	39
表十一 餵食新鮮油或炸油飼料 32 週後，大鼠肝臟中 Quinone reductase 之活性 .....	40
表十二 餵食新鮮油或炸油飼料 32 週後，大鼠血漿中 TAS、TBARS 之濃度.....	41
表十三 餵食新鮮油或炸油飼料 32 週後，大鼠血漿中維生素 A、E 之濃度.....	42

表十四 餵食含紅甘藷葉之炸油飼料 32 週後，大鼠體重增加、飼料攝食量及攝食效率之影響 .....	49
表十五 餵食含紅甘藷葉之炸油飼料 32 週後，大鼠之肝重及相對肝重 .....	50
表十六 餵食含紅甘藷葉之炸油飼料 32 週後，大鼠之結腸重及相對結腸重 .....	51
表十七 餵食含紅甘藷葉之炸油飼料 32 週後，大鼠之血液生化值 .....	52
表十八 餵食含紅甘藷葉之炸油飼料 32 週後，大鼠肝臟及血漿中多酚類之含量 .....	53
表十九 餵食含紅甘藷葉之炸油飼料 32 週後，大鼠肝臟中 Cytochrome P450 之含量 .....	54
表二十 餵食含紅甘藷葉之炸油飼料 32 週後，大鼠肝臟中 Quinone reductase 之活性 .....	55
表二十一 餵食含紅甘藷葉之炸油飼料 32 週後，大鼠血漿中 TAS、TBARS 之濃度 .....	56
表二十二 餵食含紅甘藷葉之炸油飼料 32 週後，大鼠血漿中維生素 A、E 之濃度 .....	57
表二十三 F344 大鼠受 DMH 誘發之總 ACF 數目及大腸腫瘤發生率 .....	58

## 圖目錄

圖一 餵食新鮮油或炸油飼料 32 週後，大鼠平均體重之變化.....	34
圖二 餵食新鮮油或炸油飼料 32 週後，大鼠結直腸黏膜組織中 ODC 蛋白質 表現量 .....	43
圖三 餵食新鮮油或炸油飼料 32 週後，大鼠結直腸黏膜組織中 COX-2 蛋白 質表現量 .....	44
圖四 餵食含紅甘藷葉之炸油飼料 32 週後，大鼠平均體重之變化.....	48
圖五 餵食含紅甘藷葉之炸油飼料 32 週後，大鼠結直腸黏膜組織中 ODC 蛋 白質表現量 .....	59
圖六 餵食含紅甘藷葉之炸油飼料 32 週後，大鼠結直腸黏膜組織中 COX-2 蛋白質表現量 .....	60
圖七 Quercetin 結構式 .....	68

## 中文摘要

本研究之目的乃在探討多酚類含量豐富之台灣鄉土蔬菜—紅甘藷葉，對餵食炸油和皮下注射 DMH (1,2-dimethylhydrazine) 之 F344 大鼠，所引發結直腸細胞之保護作用。本實驗所使用之炸油為黃豆油經 24 小時， $200\pm 5^{\circ}\text{C}$  油炸馬鈴薯而成。自國家動物中心購入，54 隻 5~6 週雄性 F344 大白鼠，其中 27 隻經皮下注射 30 mg DMH/kg BW，每週一次，連續注射六週，再隨機分成 3 組 (n=9)，分別餵食含 20% 新鮮油之 FD0 組、20% 炸油之 OD0 組及含有 20% 炸油及添加 2.5% 紅甘藷葉粉末之 OD2.5 組；對照組則分別為注射生理食鹽水之 FS0、OS0、OS2.5。大鼠餵食 32 週後予以犧牲，取出其肝臟、結腸組織、血漿進行分析。結果顯示，經 24 小時油炸之炸油其酸價及紫外光吸收值皆高於新鮮油，顯示油脂已有裂解和酸敗的現象。當給予高量炸油飲食 (OS0 組) 之後大鼠體內之脂質過氧化物 (TBARS) 顯著高於等量新鮮油飲食組 (FS0)，然而其總抗氧化力 (TAS) 及抗氧化物—Vitamin E 則顯著低於新鮮油飲食組；當餵予含紅甘藷葉之炸油飼料 (OS2.5 組) 後，TBARS 顯著降低，同時 TAS 也有顯著性的增加，並有節省 Vitamin E 消耗之作用。血漿中所測得之多酚類含量 OS2.5、OD2.5 顯著地高於 OS0、OD0 組，但在肝臟中所測得之多酚類並無顯著差異。在結直腸部位腫瘤之發生情形顯示，對照組皆無腫瘤之生成，於注射 DMH 的各組中，則發現腫瘤發生率於 FD0、OD0、OD2.5 組分別為 66.7%、50%、44.5%。在結直腸方面，發現 Aberrant crypt foci (ACF) 結直腸之前病灶於三組間並無顯著差異，但攝食紅甘藷葉後 (OD2.5 組)，可減少老鼠結直腸中 Ornithine decarboxylase (ODC) 及 Cyclooxygenase-2 (COX-2) 蛋白質的表現量。由結果可知，飼料中添加紅甘藷葉可以改善餵食炸油所帶來老鼠體內之氧化壓力，並具有降低結直腸細胞病變之潛在效應。

關鍵字：炸油、DMH、紅甘藷葉、結直腸癌、ACF

## 英文摘要

The aim of this study was to investigate the effect of *Ipomoea batatas* and oxidized frying oil (OFO) on colorectal carcinoma of F344 rats treated with DMH (1,2-dimethylhydrazine). Eighteen Male F344 rats received 30mg/kg body weight DMH by intraperitoneal injection, once weekly for 6 weeks. Vehicle-treated groups received an equal volume of normal saline. Rats were assigned to 4 groups which diets containing 20% fresh soybean oil (FO): FS0 and FD0, 20% OFO: OS0 and OD0, 20% OFO with 2.5% *Ipomoea batatas*: OS2.5 and OD2.5. Rats were sacrificed after feeding with experimental diets for 32 weeks; liver were examined for quinone reductase (QR) 、 cytochrome P450 (CYP450), colon for the measurements of Aberrant crypt foci (ACF) 、 Ornithine decarboxylase (ODC), and plasma for total antioxidant status(TAS)、thiobarbituric-acid-reactive-substances (TBARS). The results showed that QR and CYP450 activity were both elevated by OFO feeding. TAS was elevated and TBARS was decreased after feeding *Ipomoea batata*; there was no significant difference in DMH-groups, but in saline-group. Aberrant crypt foci and preneoplastic lesions had no significant difference in both OD0 and OD2.5. The results of ODC and COX-2 protein expression were lower in OD2.5 group. In conclusion, fed rats with *Ipomoea batatas* could lower phase I enzyme activity, increase antioxidant activity, and decreased ODC protein expression.

Keywords: *Ipomoea batatas*, colon cancer, ACF, oxidized frying oil,

DMH



## 第一章 前言

近年來，隨著經濟的成長，人們的飲食也漸漸精緻化，油脂的攝取量也逐漸增加。油脂在烹煮加熱的過程中會產生許多的氧化物質，攝入體內後會增加人體內的氧化壓力，進而增加罹患心血管疾病及癌症之機率。

結直腸癌是世界上最普遍的惡性腫瘤，民國九十三年行政院衛生署統計，其為癌症死亡原因的第三名。研究顯示，遺傳因素在結腸直腸癌的發生上，有其一定的角色。另一與結腸直腸癌有極密切關係的就是飲食習慣，過去許多研究顯示飲食習慣的改變，尤其是高油脂的飲食，會增加罹患結直腸癌的機率，但相對的在攝取低油高纖飲食的地區，其結直腸癌的盛行率就較低。不少研究結果建議，每日飲食若能包括五份水果蔬菜和六份穀類或者豆類，並減少動物性油脂的攝取，尤其是飽和性脂肪酸，則可降低罹患結直腸癌之機率。油脂與結直腸癌的關係，可能是由於油脂會刺激腸道中膽酸鹽的分泌，及產生一些脂肪酸代謝物，這些物質均會刺激結直腸黏膜，並增加癌症發生的機率。

多吃蔬菜、水果在我們飲食習慣中扮演著重要的角色，除了其含有豐富的纖維素及礦物質外，還有現在漸漸被重視的植物中的化學成分 (phytochemicals) 如多酚類 (polyphenol) ...等。多酚類是具有一

個以上芳香環並帶有一個以上氫氧基，經過縮合及加成作用聚合而成的衍生物，具有特殊的生物活性，如：抗氧化作用及清除自由基的能力。許多的研究報告顯示，多酚類對人體具有調節新陳代謝、抗氧化 (Hayase and Kato, 1984; Mohamed and Hussein, 1994; Jong and Chau, 1998; Hong et al., 2001)、抗發炎 (Kinsella et al., 1993; Teissedre et al., 1996)、抗癌細胞增殖 (Makino et al., 1998) 等功效。

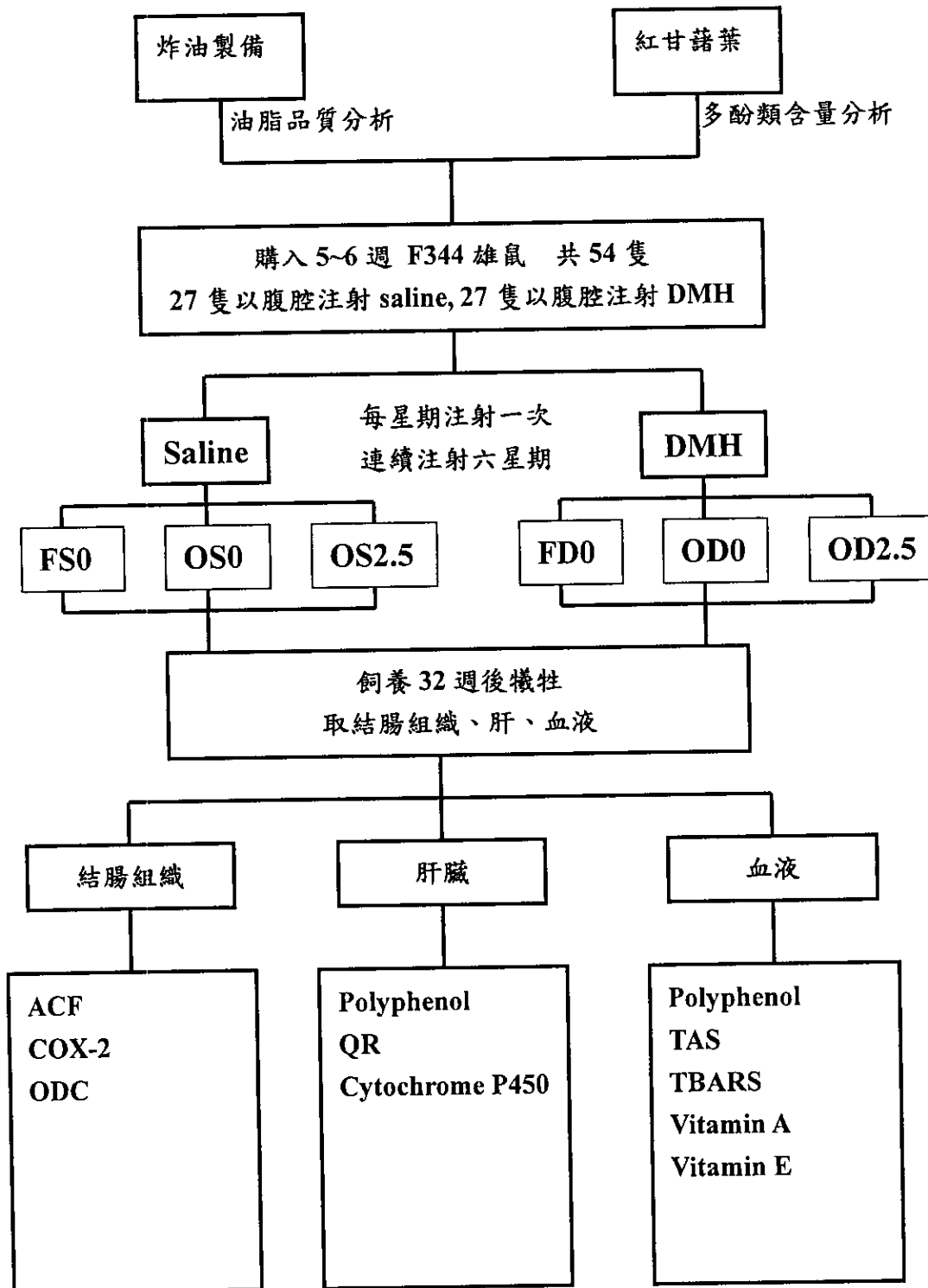
過去也有許多研究指出，多酚類具促進健康的好處，但多侷限於紅酒或是茶的探討，體外 (in vitro) 實驗也多過於體內 (in vivo) 實驗。因此，本次研究將以動物作為實驗模式，選定一種多酚類含量豐富之台灣鄉土蔬菜-紅甘藷葉，探討其對餵食炸油的大鼠體內之氧化狀況，及結直腸黏膜細胞增殖之影響。

本實驗研究目的為：

1. 探討不同品質的油脂或/及給予 DMH 時是否會導致大鼠結直腸細胞發生病變。
2. 探討台灣產紅色鄉土蔬菜—紅甘藷葉中之多酚類是否會對因餵食炸油或 / 及給予 DMH 所導致之大鼠結直腸病變細胞具有保護的作用。

## 第二章 材料與方法

### 第一節 實驗設計



## 第二節 實驗材料

### 1. 炸油的製備

將 18 公斤之黃豆油置於鐵鍋中加熱，以瓦斯爐直接加熱，油溫維持在  $200\pm 5^{\circ}\text{C}$ 。馬鈴薯經削皮後，每次取 200 公克，油炸 2~3 分鐘，每 30 分鐘炸一次，連續油炸 4 天，每天 6 小時。4 天油炸完成後，收集炸油且放置於  $-20^{\circ}\text{C}$  中保存，作為日後實驗用油炸油(oxidized frying oil, OFO)。

### 2. 紅甘藷葉來源

紅甘藷葉由桃園農業改良場委託民間良山農場種植，採收之後，送至實驗室，先清洗、擦乾後，以冷凍乾燥法進行乾燥且儲存於  $-20^{\circ}\text{C}$  備用。欲進行實驗時以磨粉機進行研磨，磨成粉末，以適當比例混於飼料中。

### 3. 動物分組與飼養

自國科會動物中心購入 54 隻，週齡為 5~6 週之 F344 雄鼠，飼養於不鏽鋼籠中，溫度維持在  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，光照與黑暗週期各為 12 小時，經一星期之適應期後分組。27 隻大鼠先以腹腔注射法(intraperitoneal, i.p.) 注射 30 mg DMH (1,2-dimethylhydrazine) /kg body weight，每週注射一次，連續注射六週。再依重量隨機分成 3 組，分別餵食含 20%新鮮油之 FD0，20%炸油之 OD0，炸油添加 2.5%紅甘藷葉粉末之 OD2.5。剩餘

27 隻則依相同方式給予 saline，亦依重量隨機分成 3 組，分別餵食含 20% 新鮮油之 FS0，20% 炸油之 OS0，炸油添加 2.5% 紅甘藷葉粉末之 OS2.5 (表一)。除了油脂及纖維素外，其他成分比例依 AIN-93 (Reeves et al, 1993) 配製為實驗飼料 (表二)。又因紅甘藷葉中富含高量之  $\beta$ -carotene (117.10 $\mu$ g/g wet weight) (林，2004)，故將動物飼料中 Vitamin A 含量調整成每一組均相同。

表一 動物分組及各組之飲食配方

Table 1 The oil and *Ipomoea batatas* content of six experimental diets

組別	油脂種類/紅甘藷葉含量	Saline/DMH
FS0	Fresh Soybean Oil (20%) / 0%	Saline
OS0	Oxidized Fried Oil (20%) / 0%	Saline
OS2.5	Oxidized Fried Oil (20%) / 2.5%	Saline
FD0	Fresh Soybean Oil (20%) / 0%	DMH
OD0	Oxidized Fried Oil (20%) / 0%	DMH
OD2.5	Oxidized Fried Oil (20%) / 2.5%	DMH

表二 飼料成分表

Table 2 Composition of test diet (g/kg diet)

	FS0	OS0	OS2.5
	FD0	OD0	OD2.5
Cornstarch	499.5	449.5	432
Casein	180	180	100
Sucrose	100	100	
Fresh oil	200		
Oxidized frying oil (OFO)		200	200
Fiber	20	20	18.4
Mineral <sup>1</sup>	35	35	35
Vitamin <sup>2</sup>	10	10	10
L-cystine	3	3	3
Choline	2.5	2.5	2.5
Tetra-butylhydroquinone	0.014	0.014	0.014
Vitamin A palmitate	0.013	0.013	0
紅甘藷葉粉末	0	0	25

1. AIN-93 mineral mixture

2. AIN-93 vitamin mixture without vitamin A

#### 4. 動物犧牲及樣本收集

動物隔夜禁食，秤量體重後，以乙醚進行麻醉，將針頭以 heparin 潤濕後自腹腔靜脈採血，收集於含有 heparin 的採血管中。然後迅速取下肝臟及結直腸部位組織，以生理食鹽水清洗瀝乾後，置入液態氮快速冷凍存於-80°C，以供日後分析使用。

##### (1) 血液前處理

血液於 1,000 xg、4°C 下，離心 15 分鐘，取上層血漿待測。紅血球則以 0.9% NaCl 清洗兩次後收集於 eppendoff 中，並儲存於-80°C，以供日後分析使用。

##### (2) 組織均質

- a. 肝臟：加入冰冷的 homogenate buffer (0.01M potassium phosphate buffer, pH7.4, 含 1.15%KCl)，以組織均質機均質化後，以紗布過濾去除結締組織，以 homogenate buffer 定量體積成 25% (w/v) 的肝均質液，並儲存於-80°C 冰箱中。
- b. 結直腸黏膜：將結直腸洗淨，去除糞便，刮取結直腸上黏膜，收集於 eppendoff 中，並儲存於-80°C 冰箱中。

### 第三節 實驗方法

#### (1) 油脂品質分析

##### a. 酸價(acid value)

依 A.O.C.S official method Cd 3a-63 法測定。

酸價是指用來測量油脂中之游離脂肪酸之含量。通常以消耗 1 公克油中所含的脂肪酸，所需的氫氧化鉀之量來計量。

實驗步驟：

取適當的油脂 (S)，加入酒精與乙醚 (1：1) 混合溶 25~30 mL，使油脂完全溶解，加入 2mL 的酚酞指示劑，以 0.1N KOH 溶液滴定至指示劑呈粉紅色後，維持 30 秒視為滴定點。

$$AV = \frac{56.108 \times (A-B) \times N \times F}{S}$$

A = KOH 溶液消耗量

B = 空白實驗所消耗 KOH 溶液量 (mL)

N = KOH 的當量濃度

F = KOH 溶液的力價 (Factor)

S = 油脂樣品的秤取量 (g)



## b. 共軛雙烯值之測定

共軛雙鍵是指多烯烴類中具有二雙鍵中夾一單鍵之結構者。當油品氧化時，所形成的共軛雙鍵可吸受強紫外線，波長約為 234 nm。故當油脂中所形成的共軛雙鍵含量越多，其吸光值也越大。

實驗步驟：

UV234 值代表樣品中共軛雙烯的生成。秤取適當量的油脂樣品 (W 克)，以 n-hexane 稀釋與定量 (V 毫升)。以 n-hexane 作為 blank 對照，測溶液於 234 nm 的吸光值。

$$\text{UV234} = A_{234} \times \frac{V}{W}$$

## (2) 多酚類(polyphenol)測定

### a. 蔬菜中多酚類萃取

取 0.1 g 紅甘藷葉粉末加入 5 mL methanol 用震盪混合器混合均勻，再用旋轉混合器萃取 30 分鐘後，離心 3,000 rpm、4°C、5 分鐘，取上清液，重複三次。之後加入 5 mL methanol，不需再使用旋轉混合器，直接震盪均勻，離心 3,000 rpm、4°C、5 分鐘，取上清液，重複至上清液無顏色止。

### b. 組織中多酚類萃取

取 125  $\mu$ L sample 於離心管中，加入 0.5 mL 1mol/L HCl，震盪 60 秒後，在 37°C 水浴 30 分鐘；再加入 0.5 mL 2mol/L NaOH in methanol，震盪 3 分鐘後，水浴 30 分鐘 (37°C)；加 0.5 mL 0.75mol/L MPA 後，離心 3,000 rpm、10 分鐘取上清液 (全程避光)；下層則以 0.5 mL acetone: water (1:1) 再萃取之後離心 3,500 rpm、15 分鐘，其所得之上清液再與原上清液混合均勻，經過濾後則可測定多酚類含量。

### c. 多酚類含量之測定

實驗步驟：

取 100  $\mu$ L 的萃取液於比色管中，加入 2 mL 之 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>，混

合均勻後靜置 2 分鐘。加入 100  $\mu$ L 50% Folin-Ciocalteau's phenol reagent，混合均勻後於室溫下靜置 30 分鐘。利用分光光度計在波長 750 nm 下進行比色分析。

以 gallic acid 為標準品，利用以 0.3% HCl 酸化的 methanol/water (60 : 40, v/v) 溶液，分別調配出不同濃度的標準液 0.025~0.8 mg/mL，再依上述的方法測出吸光值，求得標準曲線。將所得樣本的吸光值利用標準曲線計算後得到樣本中多酚類的含量，血漿及紅甘藷葉萃取液以 mg GAE/mL 表示 (gallic acid equivalent, GAE); 肝臟及飼料中則分別以 mg GAE/g liver 及 mg GAE/g dry weight 表示。

### (3) 氧化狀態

#### a. 血液中脂質過氧化物 (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS)

採用 Griesmacher 等人 (1995) 之方法，由於細胞膜上之脂質富含多元不飽和脂肪酸，在代謝過程中若受到自由基的攻擊，膜上的這些不飽和脂肪酸則會進行一連串自由基連鎖反應，造成脂肪的過氧化反應。此氧化反應的次級產物 MDA (malondialdehyde) 可與 TBA (Thiobarbituric acid) reagent 結合形成一紅色物質 TBARS 在 535 nm 下有吸光值，而亦可用螢光光度計來測量。故 TBARS 值可作為動物體中脂質过氧化物的指標。

實驗步驟：

將下列反應溶液混合：

100  $\mu$  L plasma、4 mL 0.22%  $H_2SO_4$ 、0.5 mL 10% phosphotungstic acid、1 mL 0.67% TBA (in  $H_2O$  : acetic acid=1 : 1)，在 95°C 下，水浴 1 小時，取出後以冰浴降低其溫度，再加入 3 mL butanol 萃取 30 分鐘後，於 3,000 rpm，離心 15 分鐘。取出上層液，以螢光光度計於 Ex : 515nm/Em : 555nm，測定吸光值，以 MDA 表示 TBARS 濃度。

#### b. 總抗氧化能力 (Total antioxidant status, TAS)

以市售之酵素組合試劑 (Randox, NX 2332) 測定之。

其測定原理是將 Abts 和 peroxidase、metmyoglobin 及  $H_2O_2$  作用，產生帶正電 Abts 自由基，此產物是一種藍綠色物質，在 600 nm 下有最大之吸光值。可藉由此方法來評估血漿中的抗氧化狀況。

實驗步驟：

取 10  $\mu$  L plasma (取去離子水作為空白試劑組)，加入 0.5 mL 色素原 (chromogen)，混合均勻後，在 600 nm 下讀取吸光值： $A_1$ 。再加入 100  $\mu$  L 的受質試劑後，於 37°C 水浴中反應 3 分鐘，同樣在 600 nm 下讀取吸光值： $A_2$ 。 $\Delta A = A_2 - A_1$  為 plasma 所測得之吸光值，與標準溶液(1.65 mmol/L) 吸光值之比值乘以標準液濃度，便可求得樣品中總抗氧化能力。

總抗氧化力之計算：

$$(\text{mmol/L}) = \text{標準液濃度} \times \frac{\Delta A \text{ 空白試劑組} - \Delta A \text{ plasma}}{\Delta A \text{ 空白試劑組} - \Delta A \text{ 標準液}}$$

#### (4)血中 Vitamin A、E 含量測定

實驗步驟：

將 250  $\mu$ L 血漿，加入 1 mL 絕對酒精 (含 1%pyrgallol)，500  $\mu$ L 蒸餾水和 2.5 mL n-hexane 混勻後震盪萃取 2 分鐘，離心分層後取定量體積 n-hexane 於真空抽乾機中去除溶劑，加入 250  $\mu$ L methanol 充分溶解後，注入 HPLC 分析。Vitamin A 和 Vitamin E 標準溶液的配製，將 all-trans-retinol 和  $\alpha$ -tocopherol 粉末，分別以絕對酒精溶解稀釋成不同濃度，以真空抽乾機去除溶劑，再以 methanol 回溶，作出標準曲線。

HPLC 分析系統如下：

管柱：C<sub>18</sub>、4.6 mm × 250 mm、5  $\mu$ m

移動相：Pure methanol

流速：1.0 ml/min

壓力：38-39 kg/cm<sup>2</sup>

紫外光波長：295 nm

滯留時間：Retinol 為 2.1 分鐘， $\alpha$ -tocopherol 為 5.5 分鐘

(5) 肝臟解毒酵素系統相關酵素之測定

a. Post mitochondria supernatant (PMS) 之製備

取新鮮肝均質液，經 12,000  $\times g$ ，於 4°C 下離心 20 分鐘，取上層液即為 PMS。

b. 肝微粒體之製備

取 1mL PMS 於 105,000  $\times g$  (54000rpm)，在 4°C 下進行超高速離心一小時 (Beckman, Rotor TLA 100.2)，得到微粒體沉澱 (microsomal pellet)，加入 1 mL microsomal suspension buffer (0.05M potassium phosphate buffer, pH7.6, 含 1mM EDTA)，置於 -80°C 以待日後分析。

c. 蛋白質定量

利用 Bio-Rad protein assay kit 測定蛋白質濃度。

d. 肝微粒體中 Total cytochrome P450 含量的測定

採 Omura and Sato (Omura and Sato, 1962) 之方法，利用還原之 CYP form 與 CO binding 後之 difference spectrum 來測定其含量。

將 2 mL microsomal suspension (蛋白質含量約 1.2~1.5 mg/mL) 加入約 2 mg  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  混合均勻。各取 2.5 mL suspension 於兩個 cuvette 中，作 400~500 nm 之 wavelength 以此作為 baseline，並

記下 420、450、490 nm 之吸光值。將 sample cuvette 慢慢通入約 40 個 CO 氣泡混勻後，再次進行 400~500 nm 之 wavelength scan，並記下 420、450、490 nm 之吸光值。

CYP 之含量計算：

利用  $\Delta \epsilon_{450} = 91 \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  來計算 CYP 之含量

$$\text{nmole CYP/mL} = (A_{450} - A_{490})_{\text{observed}} - (A_{450} - A_{490})_{\text{baseline}} / 0.091$$

e. Quinone reductase 醣素活性之測定

採 Benson 等人 (1980) 的方法。取新鮮製備之肝均質液，以 30 mM Tris-HCl Buffer 先作適當稀釋，使得肝均質液濃度為 1 mg protein/mL，並加入下列各反應物於 cuvette 中：100  $\mu\text{L}$  liver homogenate、

100  $\mu\text{L}$  7% BSA (Bovine Serum Albumin)、

100  $\mu\text{L}$  0.3% Tween20、

100  $\mu\text{L}$  0.15 mM FAD、

100  $\mu\text{L}$  6 mM NADPH、

100  $\mu\text{L}$  0.3 mM dicoumarol 混合均勻後，隨即加入 100  $\mu\text{L}$  40  $\mu\text{M}$  之 2,6-DCIP (2,6-dichloroindophenol) 作為受質混合後，測 600 nm 之吸光質。



依  $\epsilon$  值為  $2.1 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  來計算 QR 之活性。

酵素活性單位表示每分鐘可以轉換 nmole 受質的酵素量。

#### (6) 結直腸組織病理變化 Aberrant crypt foci (ACF)

ACF 為人類啮齒動物結直腸癌的前病灶，是一個很好的生化指標，亦可作為評估結直腸癌形成過程的調節情形。

實驗步驟：

取下結腸至肛門段並紀錄長度，依縱切方向剪開直腸，再以食鹽水沖洗並等分成三個段部，且由同一方向取下約 1 公分片段置於兩張濾紙間，並以 4% formalin 之固定液固定 24 小時後，再以 0.5% methylene blue 染色約 1 分鐘，並以生理食鹽水清洗，將染色過的結腸組織置於玻片上，在顯微鏡 40 倍率下觀察並計算數目。首先計算此 1 公分片段的結直腸組織 ACF 數目及型態，再乘以估該腸段的長度倍數，以估算整個結直腸中的總 ACF 數目。

## (7) 細胞增殖之生化指標

### Ornithine decarboxylase (ODC) 蛋白質含量

Ornithine decarboxylase 為代謝 Polyamine (PA) 的主要酵素，PA 包括 spermidine、spermine、putrescine 等，廣泛存在於哺乳動物的細胞中，對細胞的生長分化與功能的維持非常重要。當細胞生長停止時 PA 的合成也會受到抑制，相對的在快速生長的細胞和組織中有較高含量。因此，ODC 之蛋白質表現量可作為細胞增殖之生化指標。

#### 實驗步驟：

將均質化緩衝液 (RIPA : 50 mM Tris-HCl, pH 7.4、10% Triton X-100、10% sodium deoxycholate、1% SDS、150 mM NaCl、150  $\mu$ L protein inhibitor) 加入黏膜組織中，經 12,000  $\times$ g 離心 30 分鐘後取上清液，以 Bio-Rad protein assay kit 測定蛋白濃度，取 75  $\mu$ g 樣品蛋白質混合等體積的 2 倍之 treatment buffer (0.1% bromophenol blue、25%  $\beta$ -mercaptoethanol、12% SDS、25 mM EDTA, pH 3.8、0.3 M Tris-HCl、20% glycerol) 於 95°C 下加熱 5 分鐘，使蛋白質變性。將變性後的樣品蛋白質與 protein marker 注入製備好的膠片中。本實驗所測得的 ODC 之蛋白質分子量為

53 kDa，故以 10% SDS-PAGE 電泳槽 (Hoeter 450E) 進行分離，於室溫下 120V/50 mM 進行 2 小時的電泳分離。

利用濕式轉印槽，轉印 16 小時，將膠片上的蛋白質轉印至硝化纖維膜上 (Immobilon-nitrocellulose membrane, 0.45  $\mu$ m, Millipore)，並以原子筆標定蛋白質分子量之位置。

將含有蛋白質的硝化纖維膜放入 Blocking buffer (5% 脫脂奶粉) 中，並置於 4°C 下作用隔夜，以去除膜上的非特異性鍵結。之後先置於室溫下作用 2 小時，再取出硝化纖維膜，以 TBS-T 清洗 3 次 (每次 5 分鐘)；接著加入以 TBS-T 溶液稀釋 1,000 倍的 ODC 一級單株抗體 (mouse anti-rat monoclonal antibody, NeoMakers MP16-2)，於室溫下作用 2 小時，再以 TBS-T 清洗硝化纖維膜 3 次 (每次 5 分鐘)；隨後再以 TBS-T 溶液稀釋 5,000 倍的二級抗體 (goat anti-mouse IgG-HRP)，於室溫下作用 1 小時，以 TBS-T 清洗硝化纖維膜 3 次 (每次 5 分鐘)。將硝化纖維膜稍微瀝乾後加入 1 mL western luminal reagent (reagent A: reagent B=1:1) 反應，作用約 1 分鐘後，將硝化纖維膜稍微瀝乾，並將其包裹在保鮮膜內置入壓片夾中，在暗房內利用 Kodak 底片與壓片夾中的硝化纖維膜相疊約 3-5 分鐘，送入洗片機，最後以影像分析軟體

(Phoretix 1D Lite 4.0, Phoretix International Ltd.) 定量結直腸黏膜中 ODC 蛋白質的含量。

#### (8) 脂肪酸代謝相關酵素

COX (cyclooxygenase) 參與 Arachidonic acid (AA) 代謝，COX 有 2 種 Isoforms 即 COX-1 與 COX-2，二者的大小、受質專一性相似，但分布及表現不同 (Kam and See, 2000)。有研究指出，在人體及實驗動物的腫瘤中，均發現有 COX-2 大量表現的情形，而 COX-1 的表現並不會改變 (Williams et al., 1999)。

本實驗所欲測的 COX-2 之蛋白質分子量為 72 kDa，以 10% SDS-PAGE 電泳槽 (Hoeter 450E) 進行分離，室溫下 120V/50 mM 進行 2 小時的電泳分離。利用濕式轉印槽，轉印 16 小時，將膠片上的蛋白質轉印至硝化纖維膜上 (Immobilon-nitrocellulose membrane, 0.45  $\mu$  m, Millipore)，並以原子筆標定蛋白質分子量之位置。將含有蛋白質的硝化纖維膜放入 Blocking buffer (5% 脫脂奶粉) 中，並置於 4°C 作用隔夜，以去除膜上的非特異性鍵結。之後先置於室溫下作用 2 小時，再取出硝化纖維膜，以 TBS-T 清洗 3 次 (每次 5 分鐘)；接著加入以 TBS-T 溶液稀釋 1,000 倍的 COX-2 一級單株抗體 (mouse anti-goat polyclonal antibody)，於 4°C 下作用隔夜，

再以 TBS-T 清洗硝化纖維膜 3 次 (每次 5 分鐘)；隨後再以 TBS-T 溶液稀釋 5,000 倍的二級抗體 (goat anti-mouse IgG-HRP)，於室溫下作用 1 小時，以 TBS-T 清洗硝化纖維膜 3 次 (每次 5 分鐘)。將硝化纖維膜稍微瀝乾後加入 1 mL western luminal reagent (reagent A: reagent B=1:1) 反應，作用約 1 分鐘後，將硝化纖維膜稍微瀝乾，並將其包裹在保鮮膜內置入壓片夾中，在暗房內利用 Kodak 底片與壓片夾中的硝化纖維膜相疊約 3-5 分鐘，送入洗片機，最後以影像分析軟體 (Phoretix 1D Lite 4.0, Phoretix International Ltd.) 定量結直腸黏膜中 COX-2 蛋白質的含量。

#### 第四節 統計分析

全部實驗統計結果以 Mean  $\pm$  SD 或 Mean  $\pm$  SEM 表示。以 SAS 統計軟體，進行數據分析，所有結果均以一因子或二因子變異分析 (One-way ANOVA or Two-way ANOVA) 分析；再以 Fisher's least significant difference test 檢定組間差異性。 $P < 0.05$  表示有統計上差異。

## 第三章 結果

### 第一節 油脂於油炸過程中品質之變化

表三顯示油脂在油炸過程中品質的變化。結果顯示，新鮮黃豆油經 6、12、18 及 24 小時高溫油炸後，油脂品質明顯地產生變化。其酸價及共軛雙烯值皆隨著時間的增加而增加。酸價由 0.11 增加到 1.91，為新鮮油的 17.4 倍，當酸價愈高，代表游離脂肪酸愈多，油脂之酸敗情形越嚴重。共軛雙烯值來自不飽和脂肪酸在氧化初期時，發生雙鍵的重排而產生共軛雙烯鍵，經 24 小時高溫油炸後，其吸光值約為新鮮油的 3.7 倍。由以上分析結果可知，油脂經過 24 小時高溫油炸過程中已有劣變酸敗的情形發生。

表三 新鮮黃豆油於油炸過程中品質之變化<sup>1</sup>

Table 3 The change of the quality of soybean oil during frying process<sup>1</sup>

Sample oil	Acid value (mg KOH/g oil)	UV234 (Abs/g oil)
Fresh oil	0.11	1820.5
OFO <sup>1</sup>		
6hrs	0.34	2697.8
12hrs	0.67	3892.0
18hrs	0.79	5298.8
24hrs	1.91	6794.9

1. OFO : Oxidized frying oil

## 第二節 飼料中多酚類之含量分析

本實驗中所使用之紅甘藷葉其廢棄率為 45.5 %，含水量為 82.54 %，多酚類含量為  $37.95 \pm 2.44$  mg GAE/g dry weight (表四)。

如表五所示，三種不同成分飼料，20%新鮮油飲食 (FS0、FD0)、20% 炸油飲食 (OS0、OD0)、20% 炸油及添加 2.5%紅甘藷葉粉末飲食(OS2.5、OD2.5) 中，多酚類含量分別為 1.19、1.00、9.34 mg GAE/g dry weight。

表四 紅甘藷葉中多酚類含量之分析<sup>1</sup>

Table 4 Polyphenol content of leafy *Ipomoea batatas*<sup>1</sup>

廢棄率	水分含量	多酚類含量
(%)	(%)	(mg GAE/g dry weight)
45.5	82.54	$37.95 \pm 2.44$

1. Each value presents Mean $\pm$ SD (n=6)

表五 飼料中多酚類含量之分析<sup>1</sup>

Table 5 Polyphenol content of leafy *Ipomoea batatas* powder diet<sup>1</sup>

Group	Polyphenol mg GAE/g dry weight
FS0、FD0	1.19
OS0、OD0	1.00
OS2.5、OD2.5	9.34

1. GAE: Gallic acid equivalent

### 第三節 餵食炸油對以 DMH 誘發 F344 大鼠結直腸病變細胞之影響(實驗一)

這部分的實驗主要是想探討餵食炸油對以 DMH 誘發 F344 大鼠結直腸病變細胞之影響。所以在這部分中先將 FS0、FD0 (新鮮油組)，OS0、OD0 (炸油組) 四組作比較。

#### 一、炸油對大鼠體重增加、飼料攝食量及攝食效率之影響

大鼠之生長及攝食情形如圖一、表六所示，四組間大鼠的體重皆隨著飼養時間增加而增加；四組間大鼠攝食量並無顯著差異，但在攝食效率方面，炸油組卻比新鮮油組差。油脂的品質對其體重之增加及攝食效率有顯著之影響。

#### 二、炸油對大鼠肝重 / 結腸重之影響

大鼠之肝重 / 結腸重如表七、表八所示，大鼠之相對肝重會受到油脂品質及 DMH 注射之影響，炸油組 (OS0、OD0) 其相對肝重顯著地比新鮮油組 (FS0、FD0) 高。大鼠之結腸重也會受到油脂品質及 DMH 注射之影響，炸油組之重量則是顯著地比新鮮油組低。

#### 三、炸油對大鼠血液生化值之影響

大鼠之血液生化值如表九所示，新鮮油組其血漿中 Albumin 濃度比炸油組低，Cholesterol、TG、HDL-C 濃度則是比炸油組高。注射 DMH 老鼠血漿中 Albumin、Cholesterol、TG、HDL-C 濃度顯著地降低。



#### 四、炸油對大鼠肝解毒酵素之影響

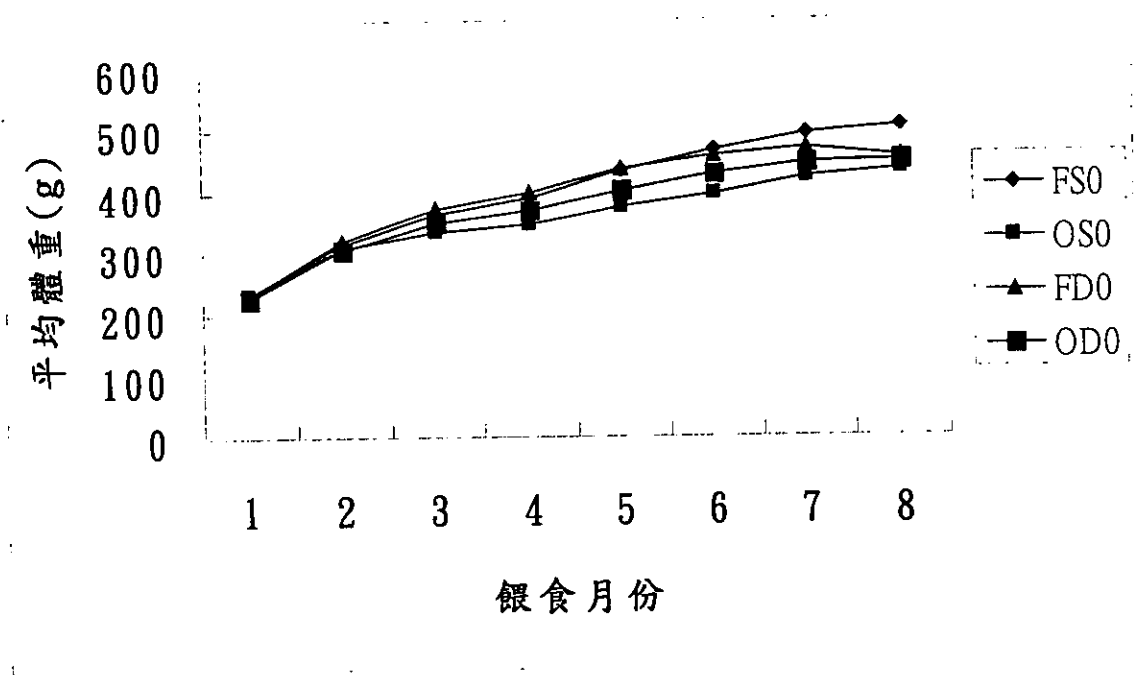
油脂品質會影響大鼠肝臟中 Phase I 肝解毒酵素 Cytochrome P450 之含量，其炸油組比新鮮油組高 (表十)。而 Phase II 肝解毒酵素 Quinone reductase 之活性於四組間則是無顯著差異 (表十一)。

#### 五、炸油對大鼠血漿中抗氧化力之影響

如表十二、表十三所示，炸油會降低老鼠血漿中總抗氧化力(TAS) 並增加其血漿中脂質過氧化物 (TBARS) 的濃度，注射 DMH 的 FD0、OD0 兩組老鼠，其血漿中脂質過氧化物濃度顯著地比 FS0、OS0 高。在血漿中 Vitamin A、E 濃度方面，炸油組 (OS0、OD0) 則顯著比新鮮油組 (FS0、FD0) 低。

#### 六、炸油對結直腸細胞病變之影響

給予 DMH 注射會增加老鼠結直腸黏膜中 ODC 蛋白質的表現 (圖二)，炸油飲食 (OD0) 其 ODC 蛋白質的表現量比新鮮油飲食 (FD0) 高。在 COX-2 蛋白質的表現量上，未給予 DMH 注射 (FS0、OS0) 時其 COX-2 之表現量為零，而注射 DMH 的新鮮油組 (FD0) 其 COX-2 之表現高於炸油組 (OD0) (圖三)。



圖一 餵食新鮮油或炸油飼料 32 週後，大鼠平均體重之變化<sup>1</sup>

Figure 1 The body weight gain of F344 rats fed with FO and OFO diets for 32 weeks<sup>1</sup>

1. FO: Fresh oil; OFO: Oxidized frying oil

表六 餵食新鮮油或炸油飼料 32 週後，大鼠體重增加、飼料攝食量及攝食效率之影響<sup>1,2</sup>

Table 6 The body weight gain, food intake and feed efficiency of F344 rats fed with FO and OFO diets for 32 weeks<sup>1,2</sup>

Group	Body weight gain (g/d)	Food intake (g/d)	Feed Efficiency (B.W gain/ food intake)
FS0	1.1±0. <sup>a</sup>	16.11±1.35	6.87±0.60 <sup>a</sup>
OS0	0.8±0.2 <sup>b</sup>	16.84±1.01	4.76±0.30 <sup>c</sup>
FD0	0.9±0.2 <sup>b</sup>	15.43±1.63	5.88±0.62 <sup>b</sup>
OD0	0.9±0.1 <sup>b</sup>	16.82±1.39	5.38±0.48 <sup>bc</sup>
Quality <sup>3</sup>	<i>p</i> <0.05	NS	<i>p</i> <0.05
Treat	NS	NS	NS
Quality × treat	<i>p</i> <0.05	NS	<i>p</i> <0.05

1. Each value represents mean±SD (n=7-10)

2. <sup>a, b, c</sup> Means significantly differs from one another by Fisher's least significant difference test (*p*<0.05)

3. Analyzed by two-way ANOVA

表七 餵食新鮮油或炸油飼料 32 週後，大鼠之肝重及相對肝重<sup>1,2</sup>

Table 7 The liver weight and relative liver weight of F344 rats fed with FO and OFO diets for 32 weeks<sup>1,2</sup>

Group	Liver Weight (g)	Relative of body weight (%)
FS0	11.14±0.67 <sup>a</sup>	2.30±0.04 <sup>c</sup>
OS0	10.97±0.85 <sup>ab</sup>	2.66±0.11 <sup>a</sup>
FD0	10.03±1.15 <sup>b</sup>	1.99±0.13 <sup>d</sup>
OD0	11.56±0.62 <sup>a</sup>	2.49±0.06 <sup>b</sup>
Quality <sup>3</sup>	NS	<i>p</i> <0.05
Treat	NS	<i>p</i> <0.05
Quality × treat	<i>p</i> <0.05	NS

1. Each value represents mean±SD (n=7)

2. <sup>a, b, c, d</sup> Means significantly differs from one another by Fisher's least significant difference test (*p*<0.05)

3. Analyzed by two-way ANOVA

表八 餵食新鮮油或炸油飼料 32 週後，大鼠之結腸重及相對結腸重<sup>1,2</sup>

Table 8 The colon weight and relative colon weight of F344 rats fed with FO and OFO diets for 32 weeks<sup>1,2</sup>

Group	Colon Weight (g)	Relative of body weight (%)
FS0	1.13±0.14 <sup>bc</sup>	0.21±0.03 <sup>b</sup>
OS0	0.75±0.07 <sup>c</sup>	0.17±0.02 <sup>b</sup>
FD0	1.98±1.08 <sup>a</sup>	0.43±0.18 <sup>a</sup>
OD0	1.38±0.13 <sup>b</sup>	0.27±0.05 <sup>b</sup>
Quality <sup>3</sup>	$p < 0.05$	NS
Treat	$p < 0.05$	NS
Quality × treat	NS	NS

1. Each value represents mean±SD (n=7)

2. <sup>a, b, c</sup> Means significantly differs from one another by Fisher's least significant difference test ( $p < 0.05$ )

3. Analyzed by two-way ANOVA

表九 餵食新鮮油或炸油飼料 32 週後，大鼠之血液生化值<sup>1,2</sup>

Table 9 The biochemical parameters of F344 rats fed with FO and OFO diets for 32 weeks<sup>1,2</sup>

	Albumin (mg/dL)	Cholesterol (mg/dL)	TG (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)
FS0	3.71±0.0 <sup>ab</sup>	54.63±9.0 <sup>a</sup>	150.3±30 <sup>a</sup>	50.29±6.8 <sup>a</sup>
OS0	4.09±0.2 <sup>a</sup>	43.29±12.6 <sup>b</sup>	87.7±25.6 <sup>b</sup>	44.86±6.7 <sup>a</sup>
FD0	3.34±0.2 <sup>c</sup>	30.43±5.3 <sup>c</sup>	73.57±15.7 <sup>bc</sup>	30.29±7.7 <sup>c</sup>
OD0	3.76±0.1 <sup>b</sup>	34.88±3.0 <sup>bc</sup>	50.50±12.5 <sup>c</sup>	37.29±3.2 <sup>b</sup>
Quality <sup>3</sup>	<i>p</i> <0.05	NS	<i>p</i> <0.05	NS
Treat	<i>p</i> <0.05	<i>p</i> <0.05	<i>p</i> <0.05	<i>p</i> <0.05
Quality × treat	NS	<i>p</i> <0.05	<i>p</i> <0.05	<i>p</i> <0.05

1. Each value represents mean±SD (n=7-10)

2. <sup>a, b, c</sup> Means significantly differs from one another by Fisher's least significant difference test (*p*<0.05)

3. Analyzed by two-way ANOVA

表十 餵食新鮮油或炸油飼料 32 週後，大鼠肝臟中 Cytochrome P450 之含量<sup>1,2</sup>

Table 10 The Cytochrome P450 of liver in F344 rats fed with FO and OFO diets for 32 weeks<sup>1,2</sup>

Group	Cytochrome P450 (n mol/mg microsomal protein)
FS0	0.22±0.05 <sup>b</sup>
OS0	0.33±0.02 <sup>a</sup>
FD0	0.24±0.03 <sup>b</sup>
OD0	0.27±0.05 <sup>b</sup>
Quality <sup>3</sup>	<i>p</i> <0.05
Treat	NS
Quality × treat	<i>p</i> <0.05

1. Each value represents mean±SD (n=6)

2. <sup>a, b</sup> Means significantly differs from one another by Fisher's least significant difference test (*p*<0.05)

3. Analyzed by two-way ANOVA

表十一 餵食新鮮油或炸油飼料 32 週後，大鼠肝臟中 Quinone reductase 之  
 活性<sup>1</sup>

Table 11 The Quinone reductase of liver in F344 rats fed with FO and OFO  
 diets for 32 weeks<sup>1</sup>

Group	Quinone reductase (n mol/min/mg liver homogenate protein)
FS0	560.3±12.0
OS0	545.2±35.2
FD0	534.1±22.2
OD0	557.9±33.7
Quality <sup>3</sup>	NS
Treat	NS
Quality × treat	NS

1. Each value represents mean±SD (n=6)

2. Analyzed by two-way ANOVA



表十二 餵食新鮮油或炸油飼料 32 週後，大鼠血漿中 TAS、TBARS 之濃度

1,2

Table 12 The TAS, TBARS of plasma in F344 rats fed with FO and OFO diets for 32 weeks<sup>1,2</sup>

Group	TAS (mmol/L plasma)	TBARS (nmol MDA/mg plasma protein)
FS0	0.48±0.10 <sup>a</sup>	3.97±0.30 <sup>a</sup>
OS0	0.34±0.19 <sup>a</sup>	4.05±0.28 <sup>a</sup>
FD0	0.40±0.17 <sup>a</sup>	3.20±0.30 <sup>b</sup>
OD0	0.33±0.10 <sup>a</sup>	3.53±0.28 <sup>b</sup>
Quality <sup>3</sup>	NS	NS
Treat	NS	<i>p</i> <0.05
Quality × Treat	NS	NS

1. Each value represents mean±SD (n=6)

2. <sup>a, b</sup> Means significantly differs from one another by Fisher's least significant difference test (*p*<0.05)

3. Analyzed by two-way ANOVA

表十三 餵食新鮮油或炸油飼料 32 週後，大鼠血漿中維生素 A、E 之濃度

1,2

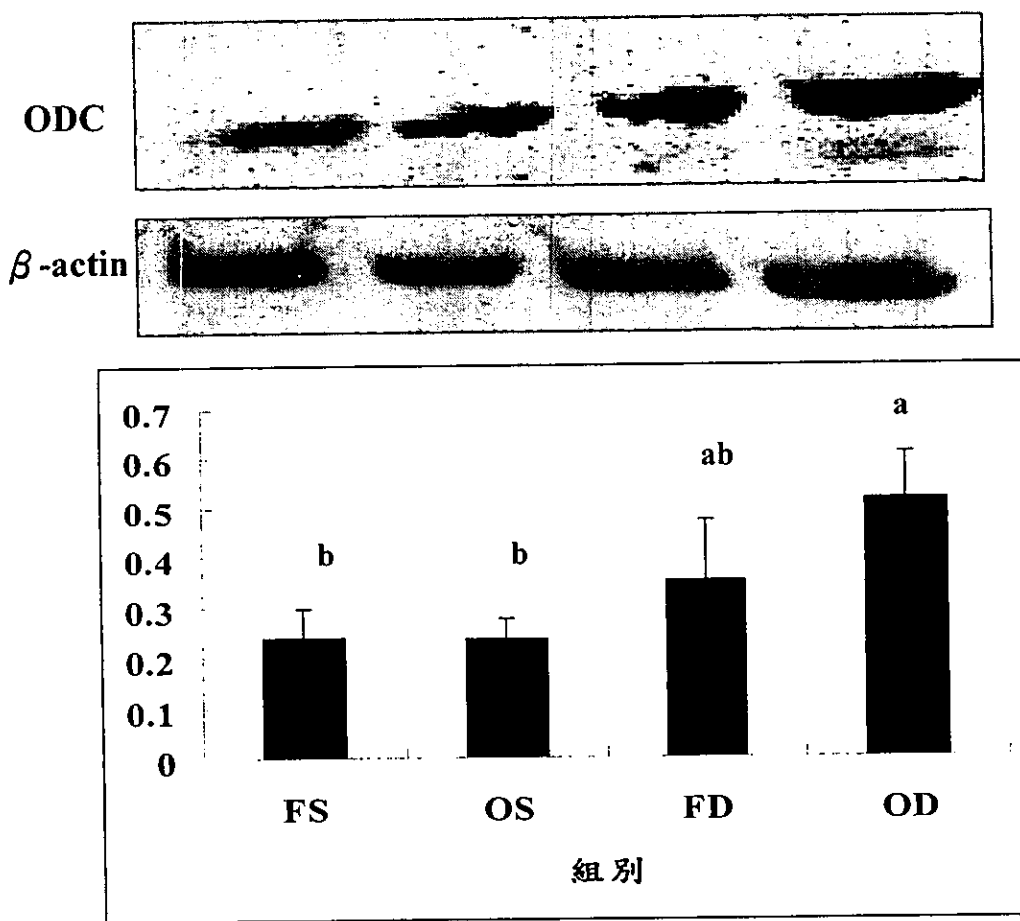
Table 13 The vitamin A, E concentration of plasma in F344 rats fed with FO and OFO diets for 32 weeks<sup>1,2</sup>

Group	Plasma retinal ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\alpha$ -tocopherol ( $\mu\text{g/mL}$ )
FS0	5.36 $\pm$ 0.88 <sup>a</sup>	1.71 $\pm$ 0.75 <sup>a</sup>
OS0	4.83 $\pm$ 0.41 <sup>ab</sup>	0.69 $\pm$ 0.14 <sup>bc</sup>
FD0	4.53 $\pm$ 0.47 <sup>b</sup>	1.06 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>
OD0	4.64 $\pm$ 0.43 <sup>b</sup>	0.57 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup>
Quality <sup>3</sup>	NS	$p < 0.05$
Treat	$p < 0.05$	$p < 0.05$
Quality $\times$ treat	NS	NS

1. Each value represents mean $\pm$ SD (n=6)

2. <sup>a, b, c</sup> Means significantly differs from one another by Fisher's least significant difference test ( $p < 0.05$ )

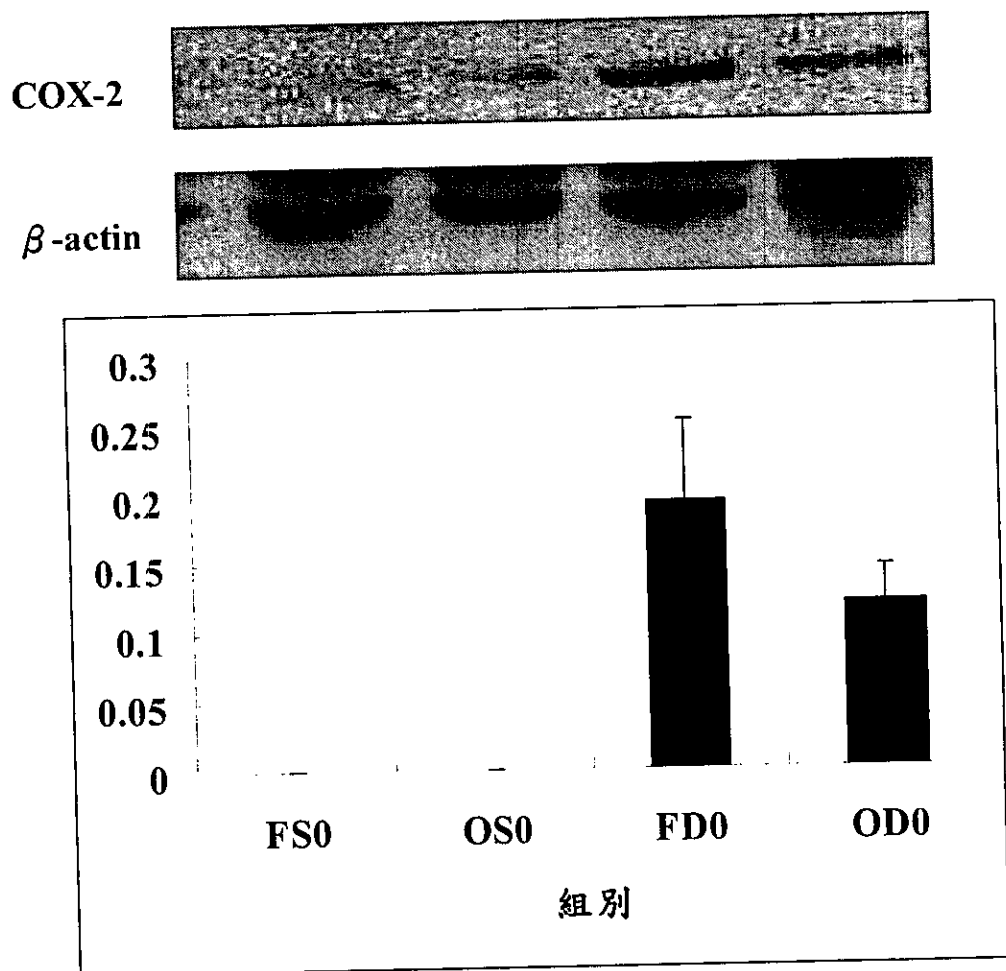
3. Analyzed by two-way ANOVA



圖二 餵食新鮮油或炸油飼料 32 週後，大鼠結直腸黏膜組織中 ODC 蛋白質表現量<sup>1,2</sup>

Figure 2 The effects on ODC protein expression of colorectum mucosa in F344 rats fed with FO and OFO diets for 32 weeks ( $\beta$ -actin was used as an internal control)<sup>1,2</sup>

1. Each value represents mean $\pm$ SEM (n=3)
2. <sup>a, b</sup> Means significantly differs from one another by Fisher's least significant difference test ( $p < 0.05$ )
3. Analyzed by two-way ANOVA



圖三 餵食新鮮油或炸油飼料 32 週後，大鼠結直腸黏膜組織中 COX-2 蛋白質表現量<sup>1,2</sup>

Figure 3 The effects on COX-2 protein expression of colorectum mucosa in F344 rats fed with FO and OFO diets for 32 weeks ( $\beta$ -actin was used as an internal control)<sup>1,2</sup>

1. Each value represents mean $\pm$ SEM (n=3)
2. Analyzed by two-way ANOVA

#### 第四節 餵食紅甘藷葉後，對以 DMH 誘發且餵食炸油飲食之 F344 大鼠結直腸病變細胞之影響（實驗二）

第二部份實驗主要是擬探討餵食紅甘藷葉後，對以 DMH 誘發且餵食炸油飲食之 F344 大鼠結直腸病變細胞是否具有保護之作用，故將 OS0、OD0（未給予紅甘藷葉組），OS2.5、OD2.5（餵食紅甘藷葉組）四組進行比較。

##### 二、紅甘藷葉對大鼠體重增加、飼料攝食量及攝食效率之影響

大鼠之生長及攝食情形如圖四、表十四所示，四組間大鼠的體重皆隨著飼養時間增加而增加，其飼料攝食量並無差異，但紅甘藷葉的給予會影響其體重增加及攝食效率，OD2.5 組每天體重增加及攝食效率皆顯著較 OD0 組低。

##### 三、紅甘藷葉對大鼠肝重 / 結腸重之影響

大鼠之肝重 / 結腸重如表十五、表十六所示，四組間肝重 / 結腸重並無顯著差異，但紅甘藷葉組 (OS2.5、OD2.5) 相對肝重及相對結腸重皆比未給予紅甘藷葉組 (OS0、OD0) 重。結果顯示，注射 DMH 會顯著地降低老鼠之肝重 / 相對肝重。

##### 四、紅甘藷葉對大鼠血液生化值之影響

大鼠之血液生化值如表十七所示，給予紅甘藷葉之大鼠其血液中 Albumin 濃度沒有顯著差異，注射 DMH 致癌物後之大鼠其 Albumin

濃度顯著地下降。Cholesterol、TG、HDL-C 濃度皆會受到紅甘藷葉及 DMH 注射之影響，顯著地降低。

#### 五、大鼠血漿及肝臟多酚類之濃度

餵食紅甘藷葉 32 週後，OS2.5、OD2.5 兩組大鼠血漿中之多酚類濃度顯著地比 OS0、OD0 高，但其肝臟中之多酚類並無顯著之差異。DMH 之注射也會影響大鼠血漿中多酚類濃度，但對肝臟中之多酚類，同樣地，也是無顯著之影響 (表十八)。

#### 六、紅甘藷葉對大鼠肝解毒酵素之影響

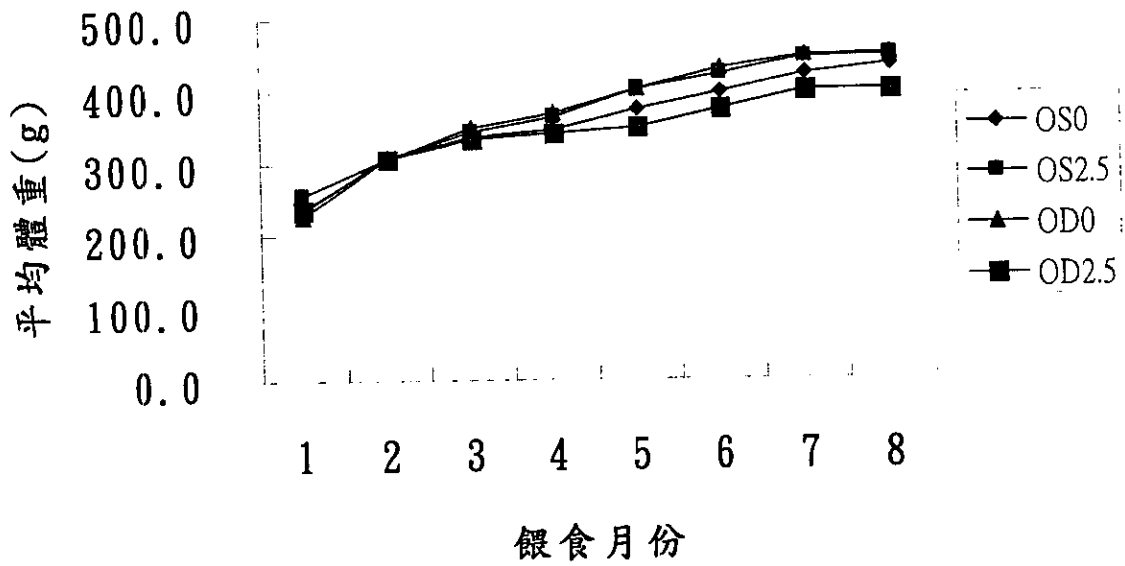
表十九、表二十顯示，紅甘藷葉組 (OS2.5、OD2.5) Phase I 肝解毒酵素 Cytochrome P450 含量有下降之趨勢。而 Phase II 肝解毒酵素 Quinone reductase 活性則是有上升之趨勢。

#### 七、紅甘藷葉對大鼠血漿中抗氧化力之影響

餵予大鼠含紅甘藷葉飼料 32 週後，結果顯示，紅甘藷葉會影響大鼠血漿中總抗氧化力 (TAS) 及脂質過氧化物 (TBARS) 含量，TAS 增加，TBARS 則降低，血中 Vitamin E 濃度也增加，但並無顯著差異。OS0、OS2.5 兩組間大鼠血漿中之 Vitamin A 並無顯著地差異，但 OD2.5 組顯著地比 OD0 組低。(表二十一、表二十二)

#### 八、紅甘藷葉對結直腸病變細胞之影響

在大腸腫瘤發生率方面，於 FD0、OD0、OD2.5 三組分別為 66.7%、50%、44.5%，總 ACF 數目三組間並無顯著之差異 (表二十三)。注射 DMH 大鼠結腸黏膜組織中 ODC 蛋白質表現量則較高；OS0、OS2.5 兩組間之 ODC 蛋白質表現量並無顯著差異；OD2.5 組之表現量比 OD0 少，但也無顯著之差異 (圖五)。在 COX-2 的蛋白質表現量方面，OS0、OS2.5 兩組之 COX-2 蛋白表現量為零，OD2.5 的 COX-2 表現量小於 OD0，給予紅甘藷葉後，大鼠結直腸黏膜中 COX-2 之表現量降低了 50% (圖六)。



圖四 餵食含紅甘藷葉之炸油飼料 32 週後，大鼠平均體重之變化<sup>1</sup>

Figure 4 The body weight gain of F344 rats fed with OFO and *Ipomoea batatas* diets for 32 weeks<sup>1</sup>

1. FO: Fresh oil; OFO: Oxidized frying oil



表十四 餵食含紅甘藷葉之炸油飼料 32 週後，大鼠體重增加、飼料攝食量及攝食效率之影響<sup>1,2</sup>

Table 14 The body weight gain, food intake and feed efficiency of F344 rats fed with OFO and *Ipomoea batatas* diets for 32 weeks<sup>1,2</sup>

Group	Body weight gain (g/d)	Food intake (g/d)	Feed Efficiency (BW gain/ food intake)
OS0	0.8±0.2 <sup>ab</sup>	16.84±1.01	4.76±0.30 <sup>b</sup>
OS2.5	0.8±0.2 <sup>ab</sup>	17.09±1.24	4.70±0.36 <sup>b</sup>
OD0	0.9±0.1 <sup>a</sup>	16.82±1.39	5.38±0.48 <sup>a</sup>
OD2.5	0.7±0.2 <sup>b</sup>	17.98±0.64	3.87±0.13 <sup>c</sup>
Diet <sup>3</sup>	<i>p</i> <0.05	NS	<i>p</i> <0.05
Treat	NS	NS	NS
Diet × treat	NS	NS	<i>p</i> <0.05

1. Each value represents mean±SD (n=7-10)

2. <sup>a, b, c</sup> Means significantly differs from one another by Fisher's least significant difference test (*p*<0.05)

3. Analyzed by two-way ANOVA

表十五 餵食含紅甘藷葉之炸油飼料 32 週後，大鼠之肝重及相對肝重<sup>1,2</sup>

Table 15 The liver weight and relative liver weight of F344 rats fed with OFO and *Ipomoea batatas* diets for 32 weeks<sup>1,2</sup>

Group	Liver weight(g)	Relative of body weight(%)
OS0	10.97±0.85 <sup>a</sup>	2.66±0.1 <sup>ab</sup>
OS2.5	11.73±0.64 <sup>a</sup>	2.73±0.05 <sup>a</sup>
OD0	11.56±0.62 <sup>a</sup>	2.49±0.06 <sup>c</sup>
OD2.5	9.79±0.89 <sup>b</sup>	2.56±0.18 <sup>bc</sup>
Diet <sup>3</sup>	NS	NS
Treat	$p<0.05$	$p<0.05$
Diet × treat	$p<0.05$	NS

1. Each value represents mean±SD (n=7)

2. <sup>a, b, c</sup> Means significantly differs from one another by Fisher's least significant difference test ( $p<0.05$ )

3. Analyzed by two-way ANOVA

表十六 餵食含紅甘藷葉之炸油飼料 32 週後，大鼠之結腸重及相對結腸重

1,2

Table 16 The colon weight and relative colon weight of F344 rats fed with OFO and *Ipomoea batatas* diets for 32 weeks<sup>1,2</sup>

Group	Colon Weight (g)	Relative of body weight (%)
OS0	0.75±0.07 <sup>b</sup>	0.17±0.02 <sup>c</sup>
OS2.5	0.86±0.12 <sup>b</sup>	0.21±0.03 <sup>bc</sup>
OD0	1.19±0.13 <sup>a</sup>	0.27±0.05 <sup>b</sup>
OD2.5	1.88±1.06 <sup>a</sup>	0.35±0.11 <sup>a</sup>
Diet <sup>3</sup>	NS	$p < 0.05$
Treat	$p < 0.05$	$p < 0.05$
Diet × treat	NS	NS

1. Each value represents mean±SD (n=7)

2. <sup>a, b, c</sup> Means significantly differs from one another by Fisher's least significant difference test ( $p < 0.05$ )

3. Analyzed by two-way ANOVA

表十七 餵食含紅甘藷葉之炸油飼料 32 週後，大鼠之血液生化值<sup>1,2</sup>

Table 17 The biochemical parameters of F344 rats fed with OFO and *Ipomoea batatas* diets for 32 weeks<sup>1,2</sup>

Group	Albumin (mg/dL)	Cholesterol (mg/dL)	TG (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)
OS0	4.09±0.2 <sup>a</sup>	43.29±12.6 <sup>a</sup>	87.7±25.6 <sup>a</sup>	44.86±6.7 <sup>a</sup>
OS2.5	4.07±0.0 <sup>a</sup>	38.43±6.4 <sup>ab</sup>	70.67±9.0 <sup>a</sup>	41.71±4.6 <sup>ab</sup>
OD0	3.76±0.1 <sup>b</sup>	34.71±3.0 <sup>bc</sup>	50.50±12.5 <sup>b</sup>	37.29±3.2 <sup>b</sup>
OD2.5	3.81±0.2 <sup>b</sup>	27.14±4.1 <sup>c</sup>	41.29±10.8 <sup>b</sup>	32.14±4.6 <sup>c</sup>
Diet <sup>3</sup>	NS	<i>p</i> <0.05	<i>p</i> <0.05	<i>p</i> <0.05
Treat	<i>p</i> <0.05	<i>p</i> <0.05	<i>p</i> <0.05	<i>p</i> <0.05
Diet × treat	NS	NS	NS	NS

1. Each value represents mean±SD (n=7-10)

2. <sup>a, b, c</sup> Means significantly differs from one another by Fisher's least significant difference test (*p*<0.05)

3. Analyzed by two-way ANOVA

表十八 餵食含紅甘藷葉之炸油飼料 32 週後，大鼠肝臟及血漿中多酚類之  
含量<sup>1,2</sup>

Table 18 Polyphenol content in plasma and liver of F344 rats fed with OFO  
and *Ipomoea batatas* diets for 32 weeks<sup>1,2</sup>

Group	Polyphenol (mg GAE/mL plasma)	Polyphenol (mg GAE/g liver)
OS0	1.25±0.04 <sup>c</sup>	2.098±0.063 <sup>b</sup>
OS2.5	1.32±0.03 <sup>b</sup>	2.102±0.102 <sup>b</sup>
OD0	1.27±0.03 <sup>c</sup>	2.089±0.053 <sup>b</sup>
OD2.5	1.51±0.04 <sup>a</sup>	2.211±0.110 <sup>a</sup>
Diet <sup>3</sup>	$p < 0.05$	NS
Treat	$p < 0.05$	NS
Diet × Treat	$p < 0.05$	NS

1. Each value represents mean±SD (n=6)

2. <sup>a, b, c</sup> Means significantly differs from one another by Fisher's least significant difference test ( $p < 0.05$ )

3. Analyzed by two-way ANOVA

表十九 餵食含紅甘藷葉之炸油飼料 32 週後，大鼠肝臟中 Cytochrome P450 之含量<sup>1,2</sup>

Table 19 The Cytochrome P450 of liver in F344 rats fed with OFO and *Ipomoea batatas* diets for 32 weeks<sup>1,2</sup>

Group	Cytochrome P450 (n mol/mg microsomal protein)
OS0	0.33±0.02 <sup>a</sup>
OS2.5	0.27±0.03 <sup>b</sup>
OD0	0.27±0.05 <sup>b</sup>
OD2.5	0.24±0.04 <sup>b</sup>
Diet <sup>3</sup>	$p < 0.05$
Treat	$p < 0.05$
Diet × Treat	NS

1. Each value represents mean±SD (n=6)
2. <sup>a, b</sup> Means significantly differs from one another by Fisher's least significant difference test ( $p < 0.05$ )
3. Analyzed by two-way ANOVA

表二十 餵食含紅甘藷葉之炸油飼料 32 週後，大鼠肝臟中 Quinone reductase 之活性<sup>1</sup>

Table 20 The Quinone reductase of liver in F344 rats fed with OFO and *Ipomoea batatas* diets for 32 weeks<sup>1</sup>

Group	Quinone reductase (n mol/min/mg liver homogenate protein)
OS0	545.2±35.2
OS2.5	562.7±14.6
OD	557.9±33.7
OD2.5	565.1±23.5
Diet <sup>3</sup>	NS
Treat	NS
Diet × treat	NS

1. Each value represents mean±SD (n=6)
2. Analyzed by two-way ANOVA

表二十一 餵食含紅甘藷葉之炸油飼料 32 週後，大鼠血漿中 TAS、TBARS 之濃度<sup>1,2</sup>

Table 21 The concentration of TAS, TBARS of plasma in F344 rats fed with OFO and *Ipomoea batatas* diets for 32 weeks<sup>1,2</sup>

Group	TAS (mmol/L plasma)	TBARS (nmol MDA/mg plasma protein)
OS0	0.34±0.19 <sup>b</sup>	4.05±0.28 <sup>a</sup>
OS2.5	0.53±0.10 <sup>a</sup>	3.47±0.44 <sup>b</sup>
OD0	0.33±0.10 <sup>b</sup>	3.53±0.28 <sup>b</sup>
OD2.5	0.45±0.06 <sup>ab</sup>	2.91±0.20 <sup>c</sup>
Diet <sup>3</sup>	<i>p</i> <0.05	<i>p</i> <0.05
Treat	NS	<i>p</i> <0.05
Diet × treat	NS	NS

1. Each value represents mean±SD (n=6)
2. <sup>a, b, c</sup> Means significantly differs from one another by Fisher's least significant difference test (*p*<0.05)
3. Analyzed by two-way ANOVA



表二十二 餵食含紅甘藷葉之炸油飼料 32 週後，大鼠血漿中維生素 A、E 之濃度<sup>1,2</sup>

Table 22 The vitamin A, E concentration of plasma in F344 rats fed with OFO and *Ipomoea batatas* diets for 32 weeks<sup>1,2</sup>

Group	Plasma retinal ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\alpha$ -tocopherol ( $\mu\text{g/mL}$ )
OS0	4.83 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	0.69 $\pm$ 0.14
OS2.5	4.62 $\pm$ 0.44 <sup>a</sup>	0.69 $\pm$ 0.15
OD0	4.64 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>	0.57 $\pm$ 0.09
OD2.5	4.16 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	0.61 $\pm$ 0.13
Diet <sup>3</sup>	$p < 0.05$	NS
Treat	$p < 0.05$	NS
Diet $\times$ treat	NS	NS

1. Each value represents mean $\pm$ SD (n=6)

2. <sup>a, b</sup> Means significantly differs from one another by Fisher's least significant difference test ( $p < 0.05$ )

3. Analyzed by two-way ANOVA

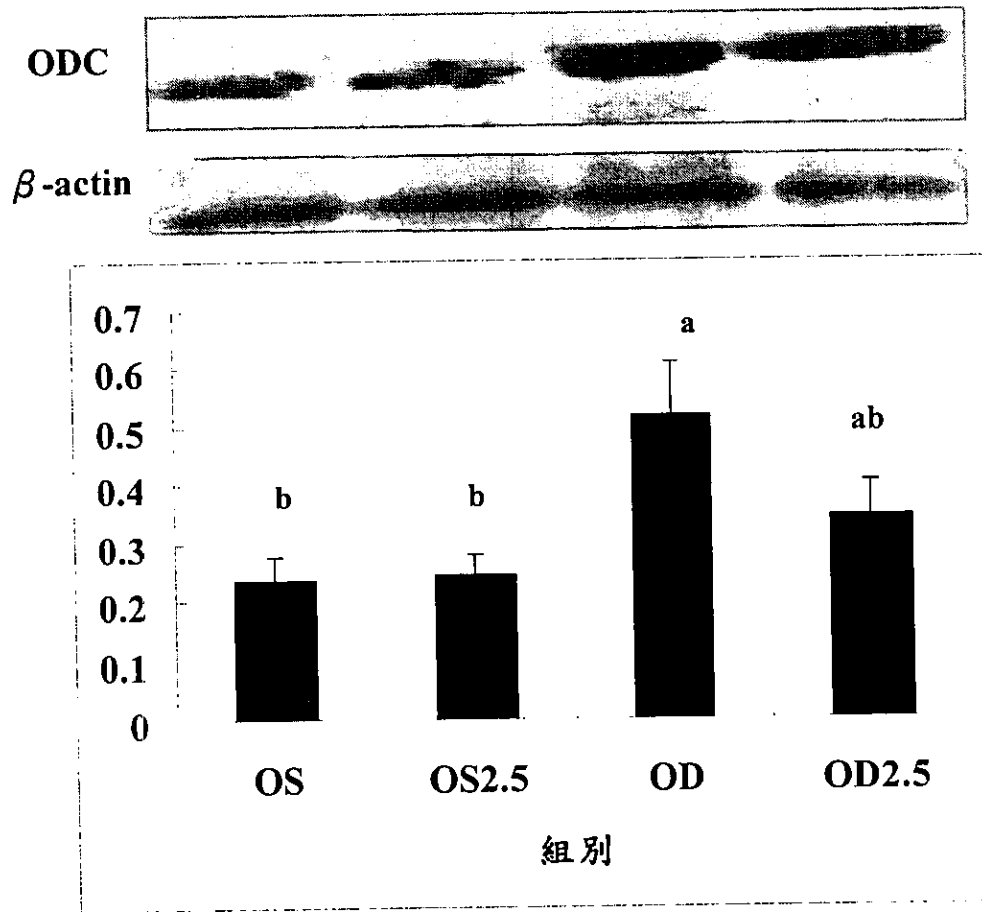
表二十三 F344 大鼠受 DMH 誘發之總 ACF 數目及大腸腫瘤發生率<sup>1</sup>

Table 23 The effects of ACF formation and tumor incidence on DMH-treated F344 rats fed with FO、OFO and *Ipomoea batatas* diets for 32 weeks<sup>1</sup>

Group	Total ACF	Tumor incidence (%)
FD0	136.2±13.3	66.7 %
OD0	109.0±79.8	50 %
OD2.5	163.5±64.2	44.5 %

1. Each value represents mean±SEM (n=3)

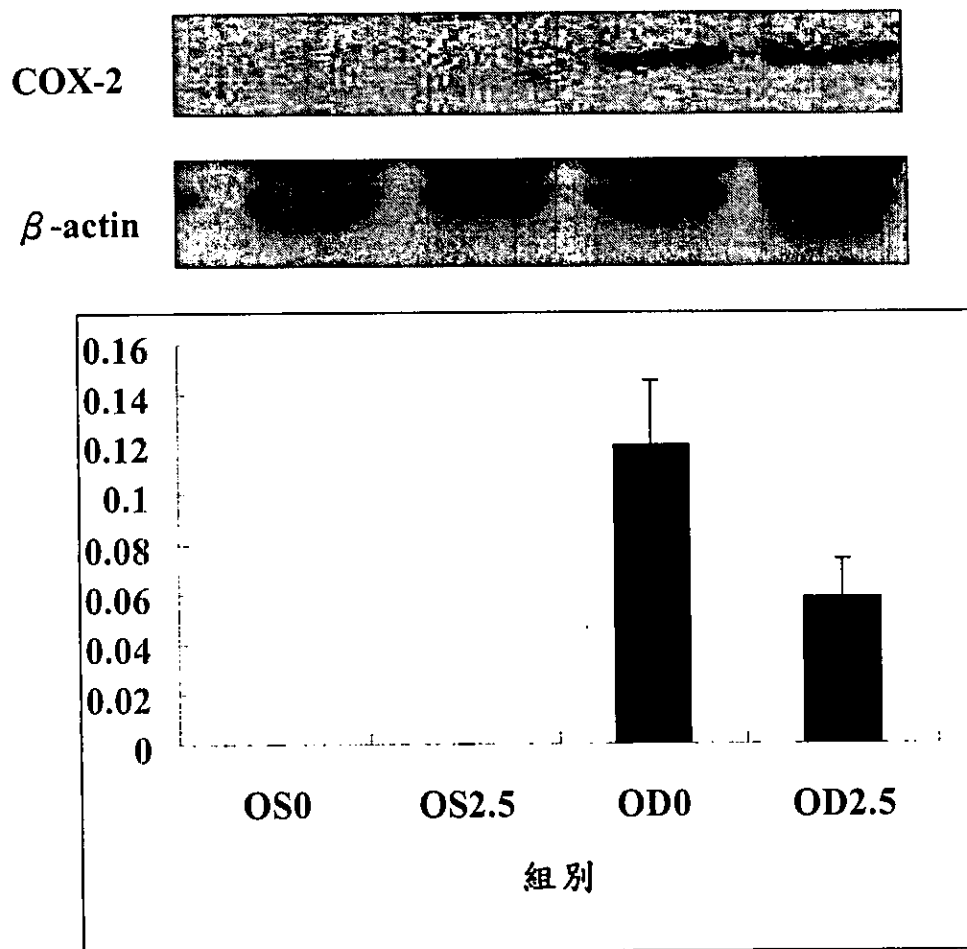
2. Analyzed by one-way ANOVA



圖五 餵食含紅甘藷葉之炸油飼料 32 週後，大鼠結直腸黏膜組織中 ODC 蛋白質表現量<sup>1,2</sup>

Figure 5 The effects on ODC protein expression of colorectum mucosa in F344 rats fed with OFO and *Ipomoea batatas* diets for 32 weeks ( $\beta$ -actin was used as an internal control)<sup>1,2</sup>

1. Each value represents mean $\pm$ SEM (n=3)
2. <sup>a, b</sup> Means significantly differs from one another by Fisher's least significant difference test ( $p < 0.05$ )
3. Analyzed by two-way ANOVA



圖六 餵食含紅甘藷葉之炸油飼料 32 週後，大鼠結直腸黏膜組織中  
COX-2 蛋白質表現量<sup>1,2</sup>

Figure 6 The effects on COX-2 protein expression of colorectum mucosa in  
F344 rats fed with OFO and *Ipomoea batatas* diets for 32 weeks  
( $\beta$ -actin was used as an internal control)<sup>1,2</sup>

1. Each value represents mean $\pm$ SEM (n=3)
2. Analyzed by two-way ANOVA

## 第四章 討論

### 第一節 油脂品質的分析

油脂在高溫油炸的過程中，會進行許多複雜的化學反應，如氧化、水解、裂解、聚合等。本實驗所使用的實驗用油，經 24 小時高溫油炸過後，其酸價及共軛雙烯值皆隨著加熱時間的增加而增加。

酸價是指用來測量油脂中之游離脂肪酸含量。通常以消耗 1 公克油中所含的脂肪酸，所需的氫氧化鉀之量來計量。以一般國際標準來說，品質良好之精製油的酸價為 0.2 mg KOH/g oil 以下，本實驗中炸油經 24 小時油炸後其酸價高達 1.91 mg KOH/g oil 為新鮮油的 17.4 倍。其共軛雙烯值也為新鮮油之 3.7 倍。油脂加熱過程中會產生許多過氧化物，過氧化物不穩定會繼續氧化產生醛類、酮類、有機酸和游離的脂肪酸 (Fritsh, 1981)，當這些產物攝入動物體後是有害的。

### 第二節 炸油對動物體的傷害

由結果顯示，餵食炸油後，老鼠的餵食效率較差；其血液生化值 Cholesterol、TG 濃度顯著地比新鮮油組低，有研究指出，炸油餵食會降低天竺鼠血漿中的 Cholesterol、TG 濃度；Cholesterol、TG 降低的主要原因可能是餵食效率降低所引起，另一原因可能是攝食炸油時造成吸收不良與腹瀉情形所致 (Lee and Liu, 1998)。

餵食炸油後大鼠的相對肝重顯著地增加。可能是因為炸油中成分可以促進 DNA transcription，而使得肝臟微粒體中蛋白質含量增加，除此之外，也可能造成內質網增生、CYP 含量增加，而導致動物體的肝腫大現象。在許多的動物實驗中餵食炸油飲食大鼠之肝、腎有腫大的情形（陳等，1983; Huang et al., 1988; 劉，1992; 湯，1994）。餵食炸油後，大鼠的相對結腸重則是顯著地降低。推測此為炸油造成大鼠生長受阻、餵食效率降低所致。

在肝臟解毒酵素系統方面，解毒酵素系統分 Phase I 及 Phase II 兩大反應，Phase I 反應主要由 Cytochrome P450 酵素系統所主導，進行氧化或去甲基化反應。而 Phase II 反應則是將一個大的、水溶性的分子加到受質上而使受質變得較為水溶性，以利其由腎臟或膽汁排出體外。當 Phase I 反應能與 Phase II 達成平衡，即稱為解毒作用。

本研究所測定的兩種肝解毒酵素，在 Phase I 方面，炸油飲食提高大鼠肝中 Cytochrome P450 的含量，陳氏 (2002) 論文研究結果也指出炸油餵食會造成大鼠肝微粒體中 Cytochrome P450 含量明顯增加。有研究也指出炸油會增加 Cytochrome P450 isoform CYP2C 及 CYP2B 之生成 (Liu et al., 2000; Chen et al., 2005)，推測其為本實驗中總 Cytochrome P450 含量上升之因。

在 Phase II 方面，QR (Quinone Reductase) 會加速 mutagen、carcinogen 及有毒物質之代謝並加速其排泄 (Benson et al., 1980)。在本實

驗中給予炸油及 DMH 注射會增加其肝臟中 QR 之活性，推測炸油及 DMH 皆為外來物質，會造成大鼠體內氧化壓力增加，而身體為預防外來物質之傷害，而必須提升肝臟解毒酵素系統之用。

本實驗所使用之炸油，經過 24 小時高溫加熱後，對動物體而言是很強的氧化壓力。陳氏論文 (2002) 指出炸油餵食會降低大鼠體內之總抗氧化力 (TAS)，但在本實驗結果顯示，不論是餵食炸油或新鮮油飲食，大鼠體內之總抗氧化力並無顯著差異，此結果與吳氏 (2004) 相同，推測因油脂含量過高 (每公斤飼料中含有 200 公克油脂)，所以油脂品質所造成的結果差異並不顯著。

本實驗結果顯示，餵食炸油大鼠血漿中之 VitaminA、E 濃度顯著地比新鮮油組低。推測可能是因為炸油飲食所帶來的氧化壓力，消耗了大鼠體內的抗氧化營養素，如 VitaminA、E 等。有研究指出給予大鼠 15% 經 6 小時 205°C 油炸之炸油飲食，6 週後，大鼠的附睪脂肪、血漿、肝、腎、肌肉、腦、肺中的  $\alpha$ -tocopherol 含量顯著的比對照組 (15% 新鮮油飲食) 低 (Liu and Huang, 1995)。

### 第三節 炸油對大鼠結直腸癌之影響

本實驗顯示，未給予 DMH 注射之 FS0、OS0 兩組大鼠無腫瘤之發生，而給予 DMH 注射之 FD0、OD0 兩組大鼠則有腫瘤之形成，顯示單純餵予炸油飲食之模式下並不會引起大鼠結直腸癌之發生。而在腫瘤發生率方面，其結直腸腫瘤發生率 FD0、OD0 分別為 66.7%、50%。推測其與油脂中花生四烯酸 (Arachidonic acid, AA) 之含量有關。花生四烯酸在體內會被 cyclooxygenase-2 (COX-2) 代謝轉變為 PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2α</sub> 等前列腺素。研究指出 PGE<sub>2</sub> 會刺激細胞增殖、抑制細胞凋亡及支持具有侵犯性之腫瘤細胞之血管新生作用 (Chan, 2002; Williams et al., 1999)，進而促進結直腸腫瘤之生成作用。而炸油中之 AA 在油炸過程中會受到破壞，因此其含量會比新鮮油還少，劉氏 (1992) 論文指出，油脂經 24 小時油炸後，其 AA 含量比新鮮油低 19.5%，推測其為新鮮油飲食結直腸腫瘤發生高於炸油飲食之因。本次實驗的結果，FD0 組 COX-2 之蛋白質表現量高於 OD0。而有研究指出，給予動物 COX-2 抑制劑可以有效地抑制大腸息肉及大腸癌之發生 (Fournier and Gordon, 2000)，因此有研究將 COX-2 作為評估大腸癌的一個指標 (施，2004)。由以上結果顯示，炸油飲食雖然會降低大鼠體內之抗氧化力，但非造成其結直腸癌形成之主要原因。

ODC (Ornithine decarboxylase) 為代謝 Polyamine (PA) 的主要酵



素，在快速生長之細胞和組織中有較高的含量，主要表現在癌細胞增殖之 promotion phase，可反應出早期之細胞複製蛋白質表現量之增加。本實驗中 FD0 組之 ODC 蛋白表現量低於 OD0 組，顯示大鼠在飼養 32 週期間，OD0 組癌細胞則多數仍處於 promotion phase，推測新鮮油中之 COX-2 表現量增加，因而促進結直腸腫瘤之生成，所以 FD0 組之腫瘤發生率大於 OD0 組；而 OD0 組之 ODC 的蛋白質表現量較高，顯示炸油也會增加結直腸癌細胞之形成，但因其 COX-2 表現量不高，故形成之時間較長。

#### 第四節 紅甘藷葉及大鼠血漿中多酚類之含量分析及其代謝情形

本實驗中所使用之紅甘藷葉來自桃園農業改良場（台北分場），其多酚類的含量為 37.95 mg GAE/g dry weight，與 2000 年湯氏研究之結果相似。每公斤飼料添加 25 g 紅甘藷葉粉末，相當於 60 公斤體重的人，每天攝食約 120 公克之紅甘藷葉，約為 1 份蔬菜的量。而紅甘藷葉所含的 flavonoids 中，以類黃酮的 quercetin 含量較為豐富（黃氏，2003）。本實驗中所使用之紅甘藷葉其 quercetin 含量為  $0.12 \pm 0.09$  mg/g dry weight。大鼠每天攝取 18.98 mg GAE 之多酚類，其中含有 0.06 mg quercetin。

本實驗結果顯示，餵食大鼠紅甘藷葉 32 週後，血漿中多酚類含量有顯著地增加 (OS2.5 > OS, OD2.5 > OD)，但其肝臟中多酚類含量並無顯著差異。此與陳氏論文 (2002) 有相同之結果，陳氏結果指出，多酚類在大鼠

體內之吸收率會隨其餵食劑量增加而有升高之趨勢，而隨著餵食的時間增加，肝臟中的多酚類含量並無顯著改變，推測肝臟可能參與部分多酚類代謝，而非多酚類的儲存器官。本實驗無法測得其血漿中 quercetin 含量，推測其與因炸油飲食降低大鼠的吸收率及增加多酚類的消耗有關。根據 Hackett (1986) 的研究指出，油脂在油炸過程中所產生的二級產物，如醛、酮、醇、碳氫化合物等，會抑制哺乳動物腸道菌叢分泌  $\beta$ -glycosidase，因而可能降低腸道對多酚類之吸收率。

#### 第五節 紅甘藷葉中多酚類對餵食炸油大鼠之生理影響

由結果顯示，餵食大鼠含紅甘藷葉之炸油飲食 32 週後，其血漿中 Cholesterol、TG 濃度顯著地降低，但是其 Albumin 濃度並無差異，顯示紅甘藷葉可以降低血脂，同時也不影響大鼠之營養狀況。

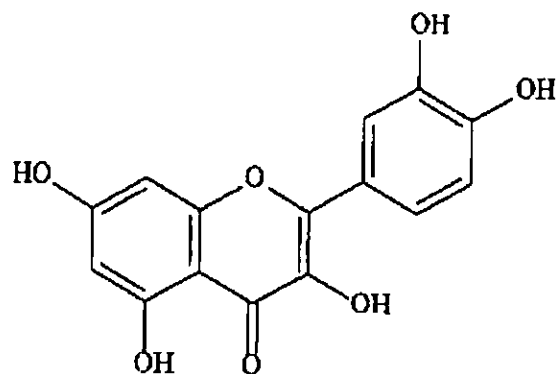
攝食紅甘藷葉之大鼠其結腸重及相對結腸重有增加之趨勢。有研究指出，給予大鼠多酚類含量豐富之飲食後，其結腸的重量顯著地增加，作者推測是一些不能被腸道消化吸收之多酚類被腸道中細菌利用後，其產物增加了結直腸之重量 (Manach et al., 1995)，同時也有研究指出，高多酚類含量之飲食除了會增加大鼠結直腸重量外，還會降低腸道中之 pH 值；而腸道中之 pH 值降低能抑制病原菌的生長。

在肝解毒酵素系統方面，肝微粒體中 Cytochrome P450 之含量在給予

紅甘藷葉後有降低之趨勢，QR 活性有上升的趨勢。有研究指出，給予大鼠高多酚類飲食會降低其 CYP1A1、CYP2B1 之含量 (陳，2002) 而其皆與 polycyclic aromatic hydrocarbon、aflatoxin、nitrosamine 等致癌物的活化有關。另外有研究指出，Tannic acid (polyphenol) 會顯著降低 CYP2E1 之蛋白表現量 (Violetta and Wanda, 2003)，推測其與本實驗總 Cytochrome P450 之含量下降之原因有關。因此推論紅甘藷葉中之多酚類化合物對 Phase I 酵素的抑制及對 Phase II 酵素的上升作用，對細胞而言有解毒及保護的作用。

#### 第六節 多酚類在大鼠體內代謝情形及抗氧化狀況之影響

餵食紅甘藷葉後，可以增加大鼠體內總抗氧化力 (TAS)，並且降低脂質過氧化物 (TBARS) 含量。黃氏論文 (2003) 指出，紅甘藷葉含有豐富的多酚類，在眾多的多酚類化合物種類中，又以屬類黃酮的 quercetin 含量最高。其酚類結構上之氫氧基具有清除自由基的功能，而 C 環上的酮基使其具有螯合金屬的能力 (圖七)；許多體外實驗也已證實類黃酮具有很強的抗氧化力。



圖七 Quercetin 結構式

Figure 7 Structure of quercetin

Hayek and Aviram (1997) 研究中，以 apo E deficient mice 為實驗動物，發現多酚類化合物可顯著抑制 LDL 之氧化。Nishiyama and Reeves (1991) 發現類黃酮可以有效抑制 squalene 及 ethyl linoleate 在 UV 放射線照射下 malonaldehyde 的生成，且其效果較 Vitamin E 及 BHT 顯著。

本實驗結果顯示，給予紅甘藷葉飲食 32 週後，大鼠血漿中 Vitamin E 的濃度有上升的趨勢，但無顯著之差異。推測因 20% 炸油飲食消耗了過多大鼠體內抗氧化營養素，因此雖然紅甘藷葉中含豐富的抗氧化物質，但仍無法應付高量炸油對大鼠造成之氧化壓力。

由於紅甘藷葉中  $\beta$ -carotene 的含量豐富，而本實驗主要是針對紅甘藷葉中所含之多酚類作探討，為了避免受到  $\beta$ -carotene 的影響，因此在製備飼料時，即將各組飼料成分中之 Vitamin A 含量調整為一致；結果顯示，

Vitamin A 濃度在 OS0、OS2.5 兩組無顯著差異，表示其兩組飲食飼料中 Vitamin A 之含量均相同，因此可以排除為 Vitamin A 效用。

#### 第七節 紅甘藷葉中多酚類對大鼠結直腸癌之影響

結果顯示，餵食紅甘藷葉對大鼠結腸中 ACF 數目並沒有顯著之影響，一般在觀察結直腸中 ACF 的研究中，大鼠之餵養時間約在 4~16 週左右，本實驗大鼠因餵養時間過長，其腫瘤已生成。因此推測飼養 32 週後，觀察 ACF 數目並不適合作為代表結直腸腫瘤之情形。本研究結果顯示，紅甘藷葉可降低結直腸黏膜中 ODC 蛋白質之表現，因此推測紅甘藷葉中之多酚類具有抑制結直腸癌細胞增殖之功效。

COX-2 的過度表現會改變細胞間的附著性質、抑制細胞程式化凋亡 (Tsuji and Dubois, 1995)，在給予大白鼠致癌物誘導後，腫瘤組織中 COX-2 蛋白質的表現量會顯著地大於正常的結直腸黏膜組織 (Dubois et al., 1996)，而在本實驗中的結果顯示，OS0、OS2.5 兩組之 COX-2 表現量均為零。因 COX-2 為一經刺激所誘發之酵素，可被細胞激素、生長因子、腫瘤促進物質所誘發 (Eberhart and Dubois, 1995)，故在正常之細胞中表現量幾乎為零。本實驗中 COX-2 的表現量很弱，推測所取的樣品為整條腸黏膜組織所以稀釋了 COX-2 的含量。而 OD2.5 組之 COX-2 表現量小於 OD0 組，顯示紅甘藷葉可能可以減少促發炎反應物質之生成 (如 PGE<sub>2</sub>)，進而降低

結直腸腫瘤之形成。有研究指出，Apigenin, genistein 及 kaempferol (polyphenol) 能顯著地抑制 COX-2 的活性，其中又以 apigenin 的抑制效果最為顯著。Western blot 及 Northern blot 結果顯示，apigenin 能有效地抑制 COX-2 的 protein 及 mRNA 的表現 (梁，1998)。因此推測紅甘藷葉中之多酚類可以抑制 COX-2 促發炎酵素之作用，進而降低結直腸細胞之病變。

## 第五章 結論

本實驗結果顯示，含 20%之新鮮油飲食會促進大鼠結直腸黏膜細胞 COX-2 之表現，同時增加結直腸腫瘤之發生率。而當在含 20%炸油飼料中添加 2.5%的紅甘藷葉粉末，可以抑制結直腸癌細胞增殖及促發炎酵素 COX-2 之蛋白質之表現。

## 第六章 參考文獻

### 中文部份

李時珍 (1990) 本草綱目。大台北出版社。

林雅玲 (2004) 探討台灣鄉土蔬菜—紅甘藷葉中多酚類之生體可利用率及對人體抗氧化狀態之影響。台北醫學大學保健營養學研究所碩士論文。

吳依蟬 (2004) 探討飲食中油脂含量及品質對大鼠結直腸病變及促進癌化之作用。台北醫學大學保健營養學研究所碩士論文。

施純光 (2004) 薏仁對大腸癌形成之影響。國立台灣大學食品科技研究所博士論文。

陳美華、謝明哲、張瑞郎、蔡玉吉 (1983) 飼料中不同蛋白質含量對老鼠攝食炸油殘油之營養及毒性研究。中華民國營養學會雜誌 8: 21-28。

陳美伶 (1996) 不同飽和程度油脂經油炸處理對老鼠小腸及肝臟維生素 A 維生素及微粒體酵素系統 Cytochrome P450 的影響。國立台灣大學農業化學研究所碩士論文。

陳雅妍 (2002) 蕺菜對餵食炸油之大鼠肝解毒酵素系統之影響極其抗氧化與抗致突變力之效應。台北醫學大學保健營養學研究所碩士論文。

梁有志 (1998) 茶多酚與類黃素之抗癌化機制與抗發炎作用之探討。國立臺灣大學生化學研究所博士論文。

湯雅理 (1994) 炸油餵食對老鼠肝中維生素 A 含量及微粒體 Cytochrome P450 校素活性之影響。國立台灣大學農業化學研究所碩士論文。

湯淑貞 (2000) 台灣紅色鄉土蔬菜萃取物之抗氧化效力研究。私立中國文化大學生活應用科學研究所碩士論文。

黃為瑜 (2003) 台灣紅色鄉土蔬菜中類黃酮抗氧化力及其對淋巴球 DNA 氧化損傷的保護作用。私立中國文化大學生活應用科學研究所碩士論文。

劉珍芳 (1992) 炸油餵食對老鼠體內維生素 E 代謝之影響。國立台灣大學農業化學研究所博士論文。

## 英文部分

**Benson AM, Hunkeler MJ and Talalay P: Increase of NAD(P)H:quinone reductase by dietary antioxidants: possible role in the protection against carcinogenesis and toxicity. Proc Natl Acad Sci Inst 1980; 55: 547-554.**

**Bird RP: Observation and quantification of aberrant crypt foci in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. Cancer Lett 1987; 37: 147-151.**

**Bravo L: Polyphenol: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutr Rev 1998; 56:317-333.**

**Chen TA: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, apoptosis, and colon-cancer chemoprevention. Lancet Oncol2002; 3: 166-174.**

**Chen YY, Chen CW, Liu JF, Chao PU and Chang TJ: Effects of frying oil and *Houttuynia cordata* thund on the xenobiotic-metabolizing enzymes system of rodents. World J Gastroenterol 2005; 11(3): 389-392.**

**Cooper HK, Buecheler J and Kleihues P: DNA alkylation in mice with genetically different susceptibility to 1, 2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis. Cancer Res 1978; 38: 3063-3065.**

**Eberhart CE and Dubois RN: Eicosanoids and the dastrointestinal tract. Gastroenterology 1995; 109: 285-301.**

**Fritsh CW: Measurement of frying fat deterioration: A brief review. JAOCS 1981; 58:272-274.**

**Fournier DB and Gordon GB: COX-2 and colon cancer: potential targets for chemoprevention. J Cell Biochem Suppl 2000; 34: 97-102.**

**Gee JM, Hara H and Johnson IT: Suppression of intestinal Crypt Cell Proliferation and Aberrant Crypt Foci by Dietary Quercetin in Rats. Nutrition and Cancer 2002; 43:193-201.**

**Griesmacher A, Kindhauser M, Andert SE, Schreiner W, Toma C, Knoebl P,**



Pietschmann P, Prager R, Schnack C and Schernthaner G: Enhanced serum levels of thiobarbituric-acid-reactive substances in diabetes mellitus. *Am J Med* 1995; 98(5):469-75.

Hackett AM: The metabolism of flavonoid compounds in mammals. *Pro in Clin Biol Res* 1986; 213: 177-194.

Hayase F and Kato H: Antioxidative compounds of sweet potatoes. *J Nutr Sci Vitaminol* 1984; 30:37-46.

Hayek T and Aviram M: Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine or its polyphenol is associated with oxidation and aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2744-2752.

Hollman PCH, de Vries JHM, van Leeuwen SD, Mengelers MJB and Katan MB: Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr* 1995; 62: 1276-1282.

Hollman PCH, van Trijp JMP, Buysman NCP, van der Gaag MS and Mengelers MJB : Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various food in man. *FEBS Lett* 1997; 418: 152-156.

Hollman PCH, Hertog MGL and Katan MB: Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chem* 1996; 57: 43-46.

Hong J, Smith TJ, Ho CT, August DA and Yang CS: Effects of purified green and black tea polyphenols on cyclooxygenase and lipoxygenase-dependant metabolism of arachidonic acid in human colon mucosa and colon cancer tissue. *Biochem Pharmacol* 2001; 62:1175-1183.

Huang CJ, Cheung NS and Lu VR: Effects of deteriorated frying oil and dietary protein levels on liver microsomal enzymes in rats. *J Am Oil Chem Soc* 1988; 65: 1769-1803.

Jong TT and Chau SW: Antioxidant activities of constituents isolates from *Pandanus Odoratissimus*. *Phytochem* 1998; 49:2145-2148.

Kam PCA and See AU-L: Cyclooxygenase isoenzymes: physiological and

pharmacological role. *Anaesthesia* 2000; 55: 442-449.

Kinsella JE, Frankel E, German B and Kanner J: Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technol* 1993; 47:85-89.

Lee DY, Lupton JR, Aukema HM and Chapkin RS: Dietary fat and fiber alter rat colonic mucosal lipid mediators and cell proliferation. *J Nutr* 1993; 123:1808-1817.

Lee YW and Liu JF: Vitamin C supplementation restores the impaired vitamin E status of guinea pigs fed oxidized frying oil. *J Nutr* 1998; 128: 116-122.

Liu JF and Huang CJ: Tissue alpha-tocopherol retention in male rats is compromised by feeding diets containing oxidized frying oil. *J Nutr* 1995; 125: 3071-80.

Liu JF, Lee YW and Chang FC: Effects of oxidized frying oil and dietary vitamin C levels on the hepatic-metabolizing enzymes system of guinea pigs. *J Nutr Sci Vitaminol* 2000; 46:137-140.

Makino T, Ono T, Muso E and Honda G: Inhibitory effect of *Perilla Frutescens* and its phenolic constituents on cultured marine mesangial cell proliferation. *Planta Medica* 1998; 64:541-545.

Manach C, Morand C, Texier O, Favier ML, Agullo G, Demigen C, Regeat F and Remesy C: Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J Nutr* 1995; 125:1911-22.

Hollman PC, van trijp JM, Buysman MN, van der Gaag MS, Megelers MJ, de vries JH and Katan MB: Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various food in man. *FEBS Lett* 1997; 418:152-156.

Mohamed AI and Hussein AS: Chemical composition of purslane (*Portulaca oleraces*). *Plant foods for human Nutr* 1994; 45:1-9.

Murota K and Terao J: Antioxidative flavonoids quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Arch biochembiophys* 2003; 417:12-17.

Newell LE and Heddle JA: The potent colon carcinogen, 1,2-dimethylhydrazine induces

mutations primarily in the colon. *Mutat Res* 2004; 14: 564(1):1-7.

Nishiyama SE and Reeves PG: In vitro biotransformation of flavonoids by rat liver microsomes. *Xenobiotica* 1991; 28: 389-401.

Omura T and Sato R: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J Biol Chem* 1962; 239: 2370-2385.

Poling CE, Eagle E, Rice EE, Durand AMA and Fisher M: Long-term responses of rats to heat-treated dietary fat: IV. Weight gains, food and energy efficiencies, longevity and histopathology. *Lipids* 1970; 5: 128.

Ranelletti FO, Maggiano N and Serra FG: Quercetin inhibits p21-ras expression in human colon cancer cell lines and in primary colorectal tumor. *Int J Cancer* 1999; 85: 438-445.

Reddy BS: Diet and bile acid. *Cancer Res* 1981; 41: 3766-3768.

Reddy BS, Tanaka T and Simi B: Effect of different levels of dietary trans fat of corn oil on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *J Natl Cancer Inst* 1985; 75:791.

Reddy BS: Nutritional factors and colon cancer. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1995; 35: 175-190.

Reeves PG, Nielsen FH and Fahey GC: AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993; 123(11):1939-51.

Reeves PG, Rossow KL and Lindlauf J: Development and testing of the AIN-93 purified diets for rodents: results on growth, kidney calcification and bone mineralization in rats and mice. *J Nutr* 1993 ; 123(11):1923-31.

Rice-Evans CA and Miller NJ: Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem Soc Trans* 1996; 24: 790-795.

Ross JA: Maternal diet and infant leukemia: a role for DNA topoisomerase II inhibitors?

**Int J Cancer 1998; 11:26-28.**

**Scalbert A and Williamson G: Dietary intake and bioavailability of polyphenols. J Nutr 2000; 130 (8S Suppl):2073S-85S**

**Serraino M, Thompson LU: Flaxseed supplementation and early markers of colon carcinogenesis. Cancer Lett 1992; 63:159-165.**

**Teissedre PL, Frankel EN, Waterhouse AL, Peleg H and German JB: Inhibition of *in vitro* human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines. J Sci Food Agric 1996; 70:55-61.**

**Tsujii M and Dubois RN: Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endo-peroxide synthase-2. Cell 1995; 83: 493-501.**

**van Erk MJ, Roepman P, van der Lende TR, Aarts JMMJG, van Bladeren PJ and van Ommen B: Integrated assessment by multiple gene expression analysis of quercetin bioactivity on anticancer-related mechanisms in colon cancer cells *in vitro*. European Journal Nutrition 2004; 30: 1-14.**

**Violetta KK and Wanda BD: The effects of tannic acid on cytochrome P450 and phase II enzymes in mouse liver and kidney. Toxicol Lett 2003; 143:209-216.**

**Williams CS, Mann M and DuBois RN: The role of cyclooxygenase in inflammation, cancer, and development. Oncogene 1999; 18: 7908-7916.**

**Yang VW, Shields JM, Hamilton SR, Spannhake EW, Hubbard WC, Hyland LM, Robinson CR and Giardiello FM: Size-dependent increase in prostanoid levels in adenomas of patients with familial adenomatous polyposis. Cancer Res 1998; 58: 1750-1753.**

**Zhang XQ: Progress of study on suppressor, EGFR and PCNA in colorectal cancer. Xin Xiaohuabingxue Zazhi 1996; 4: 328.**