

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

大豆蛋白對於非酒精性脂肪變性肝炎的影響

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2320-B-038-041-

執行期間：94年08月01日至95年07月31日

執行單位：臺北醫學大學保健營養學系

計畫主持人：陳俊榮

共同主持人：楊素卿

計畫參與人員：曾雅惠

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 10 月 5 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

大豆蛋白對於非酒精性脂肪變性肝炎的影響

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC94-2320-B-038-041

執行期間：2005年08月01日至2006年07月31日

計畫主持人：陳俊榮

共同主持人：楊素卿

計畫參與人員：曾雅惠

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：臺北醫學大學保健營養學系

中華民國九十五年十月

摘要

本研究目的是探討大豆蛋白對於酒精性脂肪變性肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis, NASH) 的影響。實驗餵食雄性 SD 大白鼠四週高油飲食以誘發 NASH，之後依體重分為四組：N 組 (NASH 誘發飲食)、S 組 (標準飲食)、NS 組 (NASH 誘發飲食 + 大豆蛋白)、SS 組 (標準飲食 + 大豆蛋白)。結果發現：飲食中以大豆蛋白取代部分酪蛋白作為蛋白質來源時，可改善因 NASH 飲食所造成之胰島素抗性，並可以降低血漿膽固醇的濃度、減少體脂肪的堆積、改善 NASH 飲食所造成之肝臟膽固醇和三酸甘油酯堆積的情形。大豆蛋白的攝取也可以促進肝臟抗氧化酵素的活性，減少肝中脂質過氧化物的堆積，此外也可降低 CYP2E1 蛋白質的表現量及 TNF- α 濃度。由研究結果推論，大豆蛋白可藉由其特殊的生理活性，包括：改善胰島素抗性、調節血脂質濃度、降低肝臟脂質堆積、提高抗氧化能力，並減輕肝臟的發炎反應，以改善 NASH 所造成的肝細胞損害，並延緩 NASH 進展至肝硬化的進程。

關鍵詞：非酒精性脂肪變性肝炎、大豆蛋白、胰島素抗性、血脂質組成

Abstract

The aim of this study was to investigate the effects of soy protein on insulin resistance and hepatic steatosis in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Forty male Sprague-Dawley rats were fed a high-fat diet for 4 weeks to induce NASH and then were divided into four groups: the N group (NASH diet), S group (standard diet), NS group (NASH diet + soy protein), and SS group (standard diet + soy protein). After the 10-week experimental period, the results showed that soy protein significantly improved insulin resistance induced by NASH diet and it lowered plasma cholesterol concentrations and body fat accumulation. Additionally, soy protein intake also reduced the hepatic lipid depots of triglycerides and cholesterol, and decreased the concentrations of lipid peroxides. In an analysis of the antioxidant status, rats fed the soy protein diet showed improved antioxidant potential due to increases in superoxide dismutase and catalase activities and a decrease in the protein expression of CYP2E1. In conclusion, soy protein may improve the liver function in patients with NASH by lowering lipid levels in the blood and liver, increasing the antioxidant capacity, and improving insulin resistance.

Key words: Soy protein, Non-alcoholic steatohepatitis, insulin resistance, blood lipids profile

目錄

摘要	II
ABSTRACT	III
目錄	IV
前言	1
研究目的	2
文獻探討	2
材料與方法	6
結果	10
討論	12
總結	15
參考文獻	15
圖一、口服葡萄糖耐受試驗—葡萄糖濃度變化	19
圖二、口服葡萄糖耐受試驗—胰島素濃度變化	19
圖三、肝臟 CYP2E1 蛋白質的表現量	20
圖四、肝臟 TNF- α 濃度	20
圖五、各組肝臟組織切片圖	21
圖六、各組糞便中中性固醇的濃度	21
圖七、各組糞便中膽酸的濃度	22
表一、各組飼料組成	23
表二、各組實驗末體重、食物攝取及血液生化分析	23
表三、各組脂肪與肝臟重量、肝臟脂質及氧化狀態分析	24

前言

根據行政院衛生署的統計，台灣地區 2005 年十大死因中，慢性肝病以及肝硬化位居第七位。肝臟疾病的類型和發生的原因很多，根據研究顯示：非酒精性脂肪肝病 (Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 為肝臟疾病中最為常見的一種，且發生率有逐年增加的趨勢 (Bacon et al., 1994)。一般來說，NAFLD 是指無飲酒史患者之肝細胞實質有脂肪堆積的現象，在病理學上，廣義地涵蓋了單純脂肪變性、非酒精性脂肪變性肝炎、肝細胞發炎、壞死及纖維化，甚至肝硬化等不同程度的肝傷害 (Mulhall et al., 2002)。而在 NAFLD 進展至硬化的過程中，非酒精性脂肪變性肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis, NASH) 則扮演了一個相當重要的角色。

NASH 首先於 1980 年由 Ludwig 等所提出 (1980)，主要描述無飲酒史病患的肝臟切片，在組織學上的變化及臨床表徵皆與酒精性肝炎相似。流行病學調查發現，肥胖、高脂血症、糖尿病及高血壓等代謝異常的疾病，是造成 NASH 的危險因子，研究認為可能與這些疾病所造成的胰島素抗性有關 (Marchesini et al., 1999)。

胰島素抗性所導致的代謝不平衡，會使得血中游離脂肪酸濃度升高 (Sanyal et al., 2001)，而當脂肪酸濃度超過肝臟代謝能力時，就會造成脂質的堆積，進而導致肝細胞發炎和壞死；另一方面，高游離脂肪酸濃度會誘發 Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) 基因的表現，產生活性氧自由基，提高氧化壓力及脂質過氧化現象 (Robertson et al., 2001)，同樣會造成細胞發炎和壞死。流行病學的調查結果指出，肥胖、糖尿病及高脂血症等與胰島素抗性相關的疾病，其發生率有日益增加的趨勢，因此如何延緩或治療 NASH 所導致的傷害是相當重要的課題。

大豆及大豆製品是一種高營養價值的食品，為亞洲民族重要的蛋白質來源 (Hodgson et al., 1996)，其所含的營養成分具有許多生理機能，具有健康促進的功效。1999 年，美國食品與藥品管理行政局 (Food and Drug Administration, FDA) 許可於大豆加工食品上標示「每天攝取 25 公克大豆蛋白有助於預防心血管疾病」之健康訴求 (FDA, 1999)。流行病學研究指出：美國 NASH 的發生率為 23%，相較於美國，日本的發生率僅為 14% (Nomura et al., 1988)，可能與生活習慣及飲食中大豆製品的攝取量有關；然而，目前仍未有直接針對大豆蛋白與 NASH 間相關機轉的研究報告。

以往對於 NASH 的治療重點僅在改善單一症狀，如胰島素抗性、降低氧化壓力或是提高肝細胞的存活率 (Harlander et al., 2001; Harrison et al., 2002)，對於疾病進程的延緩或預防卻無明顯的幫助。

研究目的

因此，本研究的目的是以飲食誘發 NASH 的疾病動物模式下，利用大豆蛋白取代部分的酪蛋白，來探討大豆蛋白的各項生理活性，對於 NASH 疾病進程的影響。

文獻探討

一、大豆蛋白：

大豆中蛋白質成分約佔 40%，經由脫脂處理可獲得脫脂大豆粉 (soybean flour)，含有 50%的蛋白質；將脫脂大豆粉中可溶性醣類及灰份等成分去除後，則為濃縮大豆蛋白 (soybean protein concentration; SPC)，其中蛋白質約含有 65%；而分離大豆蛋白 (soybean protein isolate; SPI) 即是將濃縮大豆蛋白中非蛋白質部分去除後所得，SPI 蛋白質含量高，約佔 90%以上。

早期以胺基酸積分 (amino acid score) 來評估蛋白質品質，而大豆蛋白因含硫胺基酸含量低，所得積分較小，並以甲硫胺酸作為其第一限制胺基酸，而認為大豆蛋白為低生理價的蛋白質。以動物實驗測定蛋白質效率 (protein efficiency ratio; PER)，大豆蛋白雖在 2 以上，但仍低於動物性蛋白質，因此認為大豆蛋白並非人體的良好蛋白質來源。然而先前的研究是利用動物實驗進行評估，卻忽略了實驗中所使用的大白鼠其含硫胺基酸的需要量約為人體的 1.5 倍，因此無法真正反應大豆蛋白在人體的蛋白質效率。之後學者利用甲硫胺酸添加與否來進行比較，實驗結果指出：即使是沒有添加甲硫胺酸的大豆蛋白，仍舊可以維持人體正常生長所需的胺基酸 (Zezulka and Calloway, 1976)；另外在 Young 等 (1991) 的研究顯示，無論是濃縮大豆蛋白或是分離大豆蛋白，皆可提供足量人體所需要的甲硫胺酸。美國食品與藥物管理行政局 (FDA) 與世界衛生組織 (World Health Organization; WHO) 也於 1991 年採用 Protein digestibility corrected amino acid score (PDCAAS) 方法來評定蛋白質品質，而此法修正了原先的胺基酸積分的評估方法，校正了蛋白質的消化率等，大豆蛋白與動物性蛋白所得積分相同，表示兩者品質相同，皆為高生理價蛋白質。

大豆的營養價值高、取得方便且價格低廉，為亞洲民族主要的蛋白質來源；大豆蛋白含有的營養成分，具有許多生理機能，有益健康，透過許多動物實驗 (Nagata et al., 1981; Yashiro et al., 1985) 及人體實驗 (Carroll and Kurowska, 1995) 證實大

豆可有效降低血中膽固醇濃度，並預防心血管疾病的發生，此外也有不少研究發現大豆蛋白可以預防癌症及抗老化等健康促進功效 (Kritchevsky, 1995; Sirtori et al., 1995)。FDA 更於 1999 年提出「每日攝取 25 公克大豆蛋白有助於預防心血管疾病」之健康主張。雖然，目前尚無研究針對大豆蛋白與 NASH 間的相關性，然而以現有的文獻所知，大豆中可能會影響 NASH 的物質成分為大豆蛋白及大豆異黃酮素。

二、大豆蛋白影響胰島素抗性之可能機轉：

不論是臨床或動物實驗中皆發現，攝取大豆蛋白會影響體內荷爾蒙的濃度。研究以沙鼠 (gerbil) 為實驗對象，發現大豆蛋白會提高動物體內 thyroxine 的濃度，而 thyroxine 會改變膽固醇的代謝，加速膽固醇排出體外 (Forsythe, 1986; Ness et al., 1990)。另外，飲食攝取大豆蛋白也可增加昇糖激素的分泌，並降低體內胰島素的濃度 (Forsythe, 1990; Sanchez and Hubbard, 1991)，除了可藉此影響體內脂質代謝之外，還可改善胰島素抗性。許多動物實驗指出，不論是攝取含有高濃度或是低濃度大豆異黃酮素的大豆蛋白，皆可藉由提高胰島素敏感性以降低禁食血糖與胰島素濃度 (Bartk et al., 2004; Davis et al., 2005)；此外可增加大白鼠脂肪及肝臟組織 insulin receptor mRNA 的表現來增加對於胰島素的敏感性 (Irtani et al., 1997)。而在另一動物實驗則指出，相較於酪蛋白，大豆蛋白可維持大白鼠餐後血糖的恆定性，並增加胰島素的分泌及降低 hepatic insulin extraction，因此可以改善由高脂高糖飲食所造成大白鼠的胰島素抗性 (Lavigne et al., 2000)。

三、大豆蛋白影響脂質之可能機轉：

先前的臨床實驗指出，大豆蛋白可降低高膽固醇血症病患之血脂質濃度 (Yashiro and Sugano, 1985)，另外飲食中攝取大豆，或以大豆蛋白取代動物性蛋白時，可改善血脂質狀況 (Anderson et al., 1995)。也有學者認為，高脂血症患者若每天攝取 25 公克大豆蛋白可有效降低血脂異常 (Erdman, 2000)。而在動物實驗方面，以大白鼠為實驗對象，發現飲食中不同種類蛋白質對血脂質有不同的影響，其中酪蛋白會提高血脂質濃度，而大豆蛋白確有降低血脂質的效果 (Nagata et al., 1981)。此外，在許多動物模式中亦證實，大豆蛋白的攝取可降低血中總膽固醇和低密度脂蛋白

膽固醇濃度 (Potter, 1996)；大豆蛋白分離物更被認為可預防動脈粥瘤的形成 (Weihua et al., 1998)。

不管是在動物或是人體實驗中，皆發現大豆蛋白對於血脂有正面的影響，以目前的研究認為大豆蛋白降低血脂質之可能機分述如下：

(一) 增加糞便固醇與膽酸排出：先前研究提出大豆蛋白可藉由抑制飲食中膽固醇、增加糞便中性/酸性固醇以及膽酸排出，而影響腸肝循環，加速體內膽固醇代謝的作用，以利降低血膽固醇 (Potter, 1995; Sugano et al., 1988)；同時 Bakhit 等人也認為大豆蛋白在腸道中扮演膳食纖維的角色，可與膽酸結合而促進糞便中膽酸的排出，加速肝臟中膽固醇再合成膽酸的速率，進而影響脂質的代謝 (Bakhit et al., 1994)。因此推測大豆蛋白可藉由其降低血中與肝中脂質濃度的健康促進功效。

(二) 影響肝中膽固醇的代謝：大豆蛋白對於肝中膽固醇代謝的影響主要可由兩方面探討，即為降低膽固醇合成及加速膽固醇的代謝。在內生性脂質合成過程中，需要許多酵素參與反應，而研究發現大豆蛋白可降低 SREBP 的表現，藉以調節脂質代謝酵素活性，例如：fatty acid synthase、malic enzyme、hydroxyl-methylglutaryl-CoA reductase 及 synthase，以降低脂質的合成的速率 (Ascencio et al., 2004)。而在加速膽固醇的代謝方面，有學者發現 (Lin et al., 2004)，飲食中攝取大豆蛋白可增加膽固醇代謝酵素 7 α -hydroxylase 活性，而 7 α -hydroxylase 為肝中膽酸合成酵素，因此有利於膽酸生成，藉以加速膽固醇代謝。

(三) 大豆異黃酮素對於血脂的影響：大豆中富含異黃酮素，主要為 genistein 及 daidzein，結構類似於哺乳動物之雌激素；大豆異黃酮素具有許多生理活性，如：抗發炎、抗腫瘤 (Wang et al., 1997; Davis et al., 1998) 等。除了在降低發炎及預防癌症的作用之外，在 Honore 等 (1997) 的研究中更發現：富含異黃酮素的大豆蛋白，其降低血脂的效果優於不含有異黃酮素的大豆蛋白。另外有研究指出，在大豆蛋白中添加異黃酮素，可降低 LDL/HDL 比值 (Potter, 1995)，且可能會藉由降低細胞膜上 receptor 之主要調控酵素- tyrosine kinase 的活性，而達到調節 LDL-receptor 活性的效果 (Ogawara et al., 1989)。然而，也有文獻 (Greaves et al., 2000) 指出，單純給予異黃酮素並無法減少心血管系統疾病，或是具有降低血脂質的效果；因此，異黃酮素如何影響血脂質至今尚未有明確定論。

四、大豆蛋白影響氧化壓力之可能機轉：

許多研究指出大豆蛋白具有抗氧化活性，並可藉此來避免低密度脂蛋白的氧化，以降低心血管疾病。有研究發現因 paraquat 所引起之脂質過氧化現象，可藉由大豆蛋白的給予而獲得改善，以降低氧化壓力 (Takenaka et al., 2003)。由先前的研究結果指出，大豆蛋白所具有的抗氧化活性，可能源自大豆蛋白消化後所得胜肽 (Chen et al., 1996)，而目前有關這些抗氧化胜肽的研究也愈來愈多，因此認為大豆蛋白可藉由其所具有的抗氧化特性，以降低因 NASH 所造成的氧化傷害。

自由基是人體代謝之代謝產物，過多的自由基會對人體會造成傷害，例如：低密度脂蛋白之氧化，進而提高心血管疾病的罹患率 (Steinberg, 1997)。研究已證實，大豆異黃酮素可抑制吞噬細胞對於低密度脂蛋白的氧化修飾，與增加低密度脂蛋白抗氧化的能力 (Kapiotis et al., 1997)。另外，也有研究指出異黃酮素中之 genistein 可有效防止由銅離子所引發之低密度之蛋白的氧化現象，且血漿中 malondialdehyde (MDA) 也降低 (Kerry and Abbey, 1998)。因此認為大豆異黃酮素所具有之抗氧化特性可改善 NASH 所造成的氧化傷害。

五、大豆蛋白影響發炎反應之可能機轉：

近來有研究認為大豆異黃酮素具有抗發炎及改善免疫功能的作用，然而其相關機制目前尚無一致的定論，由研究結果指出，可能與其所扮演 tyrosine kinase inhibitor 的角色有關 (Duan et al., 2003)，而 tyrosine kinase 為發炎細胞產生與活化的關鍵酵素，此外發炎細胞的趨化、黏著及去顆粒化也需要藉由 tyrosine kinase 加以作用 (Mellado et al., 2001)。因此推論大豆異黃酮素可以以其抗發炎的作用，改善因 NASH 所造成的肝細胞損害。

材料與方法

一、實驗動物：

Sprague-Dawley 品系雄性大白鼠六週齡 40 隻，購自國家實驗動物繁殖及研究中心，置於室溫 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，溼度控制於 $55\% \pm 10\%$ ，12 小時明暗更替的飼育室內，給予固型飼料 (Rodent Laboratory Chow 5001) 及去離子水，預養一週後進行為期十週的實驗。本實驗飼料組成主要參考 Lieber 等 (2004) 所發表之 NASH 疾病動物誘發飲食為基礎，首先給予大白鼠四週高油飲食 (脂質佔總熱量 71%) 以誘發 NASH，後依平均體重分為 4 組 ($n = 10$)，其分組如下，N 組：NASH 誘發飲食、S 組：標準飲食、NS 組：NASH 誘發飲食 + 大豆蛋白、SS 組：標準飲食 + 大豆蛋白，其中 NS 與 SS 組之大豆蛋白是取代 50% 酪蛋白的給予量，各組詳細飼料配方如表一所示。

二、實驗設計：

實驗動物於預養一週後投予 NASH 誘發飲食，每日紀錄攝食量，每週測量一次體重。後依平均體重分為四組，分別投予 NASH 誘發飲食、標準飲食、NASH 誘發飲食 + 大豆蛋白、標準飲食 + 大豆蛋白，攝食量及體重測量方法同上。於第九週進行口服葡萄糖耐受試驗，第十週收集糞便樣本，實驗末犧牲動物，採血並取出肝臟與體脂肪組織進行分析。

三、樣品收集

血液 第九週進行口服葡萄糖耐受試驗，經口投予葡萄糖溶液 ($1 \text{ g glucose/kg-BW}$)，分別於第 0、30、60、90、120 及 180 分鐘由實驗動物尾靜脈採血，血液收集於含有 EDTA 的試管中，充分混合均勻後，以 $1,700 \times \text{g}$ 、 4°C 離心 15 分鐘後，將血漿保存於 -70°C 之冷凍櫃，以待分析血糖和胰島素濃度。實驗末則將動物以巴比妥鈉鹽 (50 mg/kg-BW) 麻醉後犧牲，開腹腔由腹腔動脈採血，血液收集於含肝素的試管中充份混合後，以上述相同條件離心，將血漿保存於 -70°C 之冷凍櫃，留待日後分析。

肝臟 動物犧牲後，以 0.9% 生理食鹽水由門靜脈灌流後將肝臟摘除，以生理食鹽水清洗，剝除多餘的結締組織，再以濾紙拭淨、秤重後，剪取最大葉肝臟，置於 19% 福馬林中固定處理，經脫水製成蠟塊，薄切為組織切片，以蘇木紫-伊紅進行染色 (haematoxylin & eosin stain; H & E stain)，置於光學顯微鏡下觀察。肝臟標本由病理

醫師判讀，依據 Teramoto 等 (1993) 的方法，評估大白鼠肝臟細胞內脂肪顆粒堆積的程度。剩餘肝臟以鋁箔紙包住，以夾鏈袋密封，儲存於-70°C，留待日後分析。

體脂肪組織 動物犧牲後，取其副睪兩側與腎臟周圍的體脂肪，以生理食鹽水清洗，再以濾紙拭淨後秤重。

糞便 於第十週收集動物糞便，將收集之糞便冷凍乾燥後，以研鉢研磨，置入夾鏈袋密封，儲存於-20°C，留待日後分析。

四、分析項目

血液 血漿總膽固醇、三酸甘油酯、高密度脂蛋白膽固醇、低密度脂蛋白膽固醇濃度之測定皆以全自動分析儀 (HITACHI 7170 Autoanalyzer, Tokyo, Japan) 分析。血漿游離脂肪酸濃度、肝功能指數 ALT 與 AST、葡萄糖濃度皆以市售試劑組 (Randox FA115、AS407、GL1611; Antrim, U.K.) 進行分析。血漿胰島素濃度之測定使用市售試劑組 (Rat Insulin Mercodia 10-1124-01; Uppsala, Sweden) 以酵素免疫分析法 (ELISA)，在 450 nm 波長下，與標準溶液之吸光度對照，而得胰島素濃度。

肝臟 將冷凍的肝臟取出解凍，依 Folch 等 (1957) 方法，剪取 1 g 肝臟組織，加入萃取溶劑 (chloroform:methanol = 2:1, v/v)，在冰浴中以均質機磨碎後，過濾至有蓋試管，以萃取液定量至 10 mL，加入 2 mL 之 0.05% CaCl₂ (w/v)，脫氣 15 分鐘，離心 (3500 xg, 4°C) 3 分鐘後，去除上清液，再以 chloroform:methanol:water = 3:48:47 (v/v/v) 定量至 12 mL，脫氣 15 分鐘，離心 (3500 xg, 4°C) 3 分鐘後，去除上清液，先加入甲醇定量至 10 mL，再以萃取溶劑定量至 25 mL，收集於褐色塑膠離心管中，儲存於-20°C 備用。取肝臟萃取液 10 μL，先以減壓濃縮機抽乾後，以市售試劑組 (Randox CH201; Antrim, U.K.) 進行分析。加入反應劑 1000 μL 混勻，37°C 下水浴 5 分鐘，以分光光度計在 500 nm 波長下測量吸光值，與標準液吸光值對照而得肝臟膽固醇濃度。另取肝臟萃取液 10 μL，先以減壓濃縮機抽乾後，以市售試劑組 (Randox TR213; Antrim, U.K.) 進行分析。加入反應劑 1000 μL 混勻，37°C 下水浴 5 分鐘，以分光光度計在 500 nm 波長下測量吸光值，與標準液吸光值對照而得肝臟三酸甘油酯濃度。在肝臟抗氧化酵素與過氧化物質方面，剪取 0.5 g 肝臟組織，與 4°C 之緩衝液 (0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl) 混合，經均質化後，離心 10 分鐘 (4500 xg, 4°C)，分離肝臟細胞質部分，儲存於-80°C 下待分析。Catalase 的分析依據 Hugo Aebi (1947) 的方法測定，以 50 mM phosphate buffer 將肝臟均質液稀釋至適當稀釋倍率後，取 400 μL 的待測肝臟均質稀釋液加入 30 mM H₂O₂ 200 μL，於 240 nm 波長下測一分鐘之吸光值變化，得 H₂O₂ 減少之速率，代

入公式推算活性，並以 Lowery method 來測定肝臟均值稀釋液的蛋白質含量來進行蛋白質含量的校正。在肝臟 superoxidase dismutase (SOD) 活性之測定方面，則以市售試劑組 (Rondox SD125; Antrim, U.K.) 分析。在肝臟過氧化物濃度之測定方面，使用市售試劑組 (Lipid peroxidation assay kit, CALBIOCHEM®; San Diego, CA) 以分光光度計在 586 nm 波長下測量吸光值，與標準液吸光值對照而得 malondialdehyde (MDA) + 4-hydroxyalkenals (4-HNE) 濃度。並以 Lowery method 來測定肝臟均質液的蛋白質含量來進行蛋白質含量的校正。

肝臟 CYP2E1 蛋白質之表現量 剪取 0.5 g 肝臟組織，加入 2.5 mL 的均質緩衝液 (0.25 M sucrose, 10 mM Tris-HCl, 0.25 mM Phenyl-methyl-sulfonyl fluoride)，經均質化後，離心 20 分鐘 (10000 ×g, 4°C)，取出上層液分裝至超高速離心機專用離心管 (Beckman 362305, 13 × 56 mm, 3.2 mL)，離心 1 小時後 (105,000 ×g, 4°C)，去除上層液，將下層沉澱物懸浮於 50 mM potassium phosphate buffer 中，即得微粒體懸浮液。微粒體懸浮液蛋白質定量後，將蛋白質濃度調整為 10 mg/mL，取 10 μL 樣品加入等體積 Protein dye 混合均勻，於 100°C 條件下加熱 5 分鐘，之後移至 4% acrylamide gels 樣品槽中，以 100 伏特電壓進行電泳分析。將所得之電泳膠片，利用濕式轉印槽，於固定電流 80 mA 下轉印 18 小時，將膠片上的蛋白質轉印至轉印膜 (polyvinylidene difluoride membrane, PVDF)。將含有蛋白質的 PVDF 放入含 5% 脫脂牛奶的 blocking buffer，4°C 下隔夜。取出 PVDF 以 PBS-Tbuffer 沖洗三次，每次 5 分鐘，接著加入以 PBS-Tbuffer 稀釋 100 倍的 CYP2E1 一級單株抗體 (monoclonal anti-rat CYP2E1 antibody, Oxford PM32)，置於室溫下作用 2 小時；之後取出 PVDF，同樣以 PBS-Tbuffer 沖洗三次，每次 5 分鐘，再加入以 PBS-Tbuffer 稀釋 5,000 倍的二級抗體 (goat anti-mouse IgG (H & L) peroxidase conjugated antibody, Chemicon AP124P)，置於室溫下作用 2 小時；後取出 PVDF，以 PBS-Tbuffer 沖洗三次，每次 5 分鐘；最後加入 1 mL 的冷光劑 (chemiluminescence reagent, Western lighting™, PerkinElmer)，作用 1 分鐘後，用保鮮膜包覆後固定於壓片匣內，於暗房中將 Fuji medical x-ray film 放入壓片匣進行壓片，經適當時間反應後將其取出放入沖片機 (Konica, RX-1300, Japan) 沖洗底片，底片經掃描後由 Image-ProPlus 軟體分析其蛋白質表現量，並以 internal control 校正。

肝臟 TNF-α 濃度之測定 將冷凍的肝臟取出解凍，依 Das 等 (2005) 方法，剪取 0.5 g 肝臟組織，加入 1.5 mL 均質液 (50 mM Tris-base, 150 mM NaCl,

1% Triton-X100) 混合，經均質化後，於 4°C 下震盪 90 分鐘，後離心 15 分鐘 (3000 ×g, 4°C)，取出上層液，儲存於 -80°C 下待分析。使用市售試劑組 (Rat TNF-α/TNF SF1A, DuoSet® ELISA Development System; Abingdon, U.K.) 以酵素免疫分析法 (ELISA)，在 450 nm 波長下，與標準溶液之吸光度對照，而得 TNF-α 濃度。

糞便 依據 Folch 等 (1957) 方法，精秤 0.5 g 糞便粉末，加入 15 mL 萃取溶劑 (chloroform : methanol = 2:1, v/v)，振盪後以濾紙過濾，於濾液中加入 0.05% CaCl₂ 混勻，脫氣 15 分鐘，離心 (3500 ×g, 4°C) 5 分鐘後，去除上清液，再以萃取溶劑定量至 25 mL，收集於褐色塑膠離心管中，儲存於 -20°C 備用。取糞便中性固醇萃取液 10 μL，先以減壓濃縮機抽乾後，以市售試劑組 (Randox CH201; Antrim, U.K.) 進行分析。加入反應劑 1000 μL 混勻，37°C 下水浴 5 分鐘，以分光光度計在 500 nm 波長下測量吸光值，與標準液吸光值對照換算而得糞便中性固醇濃度。另外，依據 Grundy 等法 (1965)，精秤 0.1 g 糞便粉末至 2 mL 塑膠離心管中，加入 1 mL 無水酒精混勻，脫氣 15 分鐘，離心 (3500 ×g, 20°C) 15 分鐘後，取上清液以減壓濃縮機抽乾，重複操作兩次；於無水酒精已蒸乾之試管內再加入 1 mL 石油醚混勻，脫氣 15 分鐘，離心 (3500 ×g, 20°C) 15 分鐘後，去除上清液，重複操作兩次，將沉澱物以減壓濃縮機抽乾後，以甲醇溶解定量至 2 mL，離心 (3500 ×g, 20°C) 15 分鐘後，取上清液收集於褐色塑膠離心管中，儲存於 -20°C 備用。取糞便膽酸萃取液 200 μL，以市售試劑組 (Randox BI1605; Antrim, U.K.) 進行分析，利用 3α-hydroxysteroid dehydrogenase 及 diaphorase 與 bile acids 作用，產生紫藍色 formazan 衍生物，在 540 nm 波長下測量吸光值，對照標準曲線求得濃度。

五、統計方法

實驗結果以 SAS (the Statistical Analysis System, version 8.2) 統計軟體進行分析，所有數據均以 Mean ± SEM 表示，不同組間之差異採用變異數分析 (Analysis of variance, ANOVA) 中之 One-way ANOVA 進行分析，並以 least significant difference (LSD) 進行組間比較，以 *p* 值小於 0.05 表示統計上有意義。

結果

不同飼料對於大白鼠每日攝食量的影響如表二中所示。結果顯示：各組間並無統計上的差異 ($p > 0.05$)。不同飼料對於大白鼠體重的影響如表二中所示。結果顯示：各組實驗末體重並無統計上的差異 ($p > 0.05$)。

不同飼料對於血漿葡萄糖濃度變化的影響如圖一中所示。結果顯示：各組血漿葡萄糖濃度皆於投予葡萄糖溶液後 30 分鐘達到最大值。而各組間無顯著差異 ($p > 0.05$)。不同飼料對於血漿胰島素濃度變化的影響如圖二中所示。結果顯示：各組血漿胰島素濃度皆於投予葡萄糖溶液後 30 分鐘達到最大值。而 N 組血漿胰島素濃度於第 30 與 60 分鐘顯著高於其他三組 ($p < 0.05$)。

不同飼料對於血漿三酸甘油酯濃度的影響如表二中所示。結果顯示：N 組與 NS 組間並無顯著差異 ($p > 0.05$)。不同飼料對於血漿總膽固醇濃度的影響如表二中所示。結果顯示：N 組在實驗末血漿總膽固醇濃度顯著高於 S 組 ($p < 0.05$)，而 NS 組與 S 組間並無顯著差異 ($p > 0.05$)。不同飼料對於血漿高密度脂蛋白膽固醇濃度的影響如表二中所示。結果顯示：各組間皆無顯著差異 ($p > 0.05$)。不同飼料對於血漿低密度脂蛋白膽固醇濃度的影響如表二中所示。結果顯示：S 組顯示低於其他三組 ($p < 0.05$)。相較於 N 組，NS 組與 SS 組之血漿低密度脂蛋白膽固醇則有下降的趨勢 ($p > 0.05$)。不同飼料對於 HDL-C/LDL-C 比值的影響如表二中所示。結果顯示：NASH 飲食中大豆蛋白的部分取代可顯著提高 HDL-C/LDL-C 比值 ($p < 0.05$)。不同飼料對於大白鼠血漿游離脂肪酸濃度的影響如表二中所示。結果顯示：無論是在 NASH 飲食或是標準飲食中添加大豆蛋白，皆顯著降低血漿游離脂肪酸濃度 ($p < 0.05$)。不同飼料對於大白鼠肝功能指數 (ALT、AST) 的影響如表二所示。結果顯示：N 組不論在血漿 ALT 或 AST 活性，皆顯著高於其他三組 ($p < 0.05$)。

不同飼料對於大白鼠脂肪組織重量的影響如表三中所示。結果顯示：N 組脂肪組織重量顯著高於 S 組 ($p < 0.05$)，而 NS 組與 S 組間並無顯著差異 ($p > 0.05$)。

不同飼料對於大白鼠肝臟重量的影響如表三中所示。結果顯示：N 組肝臟重量顯著高於 S 組 ($p < 0.05$)，而 NS 組與 S 組間並無顯著差異 ($p > 0.05$)。不同飼料對於大白鼠相對肝重的影響如表三中所示。結果顯示：N 組之相對肝重顯著高於 S 組 ($p < 0.05$)，而 NS 組與 S 組間並無顯著差異 ($p > 0.05$)。不同飼料對於肝臟脂質濃度的影響如表三中所示。結果顯示：無論是攝取 NASH 飲食或是標準飲食，大豆蛋白的部分取代皆顯著降低肝中膽固醇與三酸甘油酯濃度 ($p < 0.05$)。不同飼料對於肝臟脂質過氧化物濃度的影響如表三中所示。結果顯示：N 組肝中脂質過氧化物

濃度顯著高於 NS 組與 SS 組 ($p < 0.05$)。不同飼料對於肝臟抗氧化酵素活性的影響如表三中所示。結果顯示：NS 組與 SS 組之抗氧化酵素 SOD、catalase 活性皆顯著高於 N 組 ($p < 0.05$)。不同飼料對於肝臟 CYP2E1 蛋白質含量的影響如圖三中所示。結果顯示：N 組肝中 CYP2E1 蛋白質含量顯著高於 NS 組與 SS 組 ($p < 0.05$)。不同飼料對於肝中 TNF- α 濃度的影響如圖四中所示。結果顯示：N 組肝中 TNF- α 濃度顯著高於 S 組 ($p < 0.05$)，而 NS 組與 S 組間並無顯著差異 ($p > 0.05$)。

不同飼料對於肝臟脂肪空泡堆積與發炎情形的影響如圖五中所示。病理判讀結果，N 組之肝臟脂肪空泡堆積程度顯著高於其他三組。同樣是持續攝取 NASH 飲食，大豆蛋白部分取代的 NS 組，其肝臟脂質空泡堆積情況則有改善的現象。

不同飼料對於糞便中性固醇濃度的影響如圖六中所示。結果顯示：無論是在 NASH 飲食或是標準飲食中添加大豆蛋白，皆有增加糞便中性固醇含量的趨勢 ($p > 0.05$)。不同飼料對於糞便膽酸濃度的影響如圖七中所示。結果顯示：NS 組糞便膽酸含量顯著高於 N 組 ($p < 0.05$)。

討論

由結果得知，實驗末各組在體重和攝食量方面無統計差異，顯示本研究中不論是 NASH 飲食或是以大豆蛋白取代部分酪蛋白作為蛋白質來源，皆不會影響實驗動物之生長情形。

大豆蛋白的攝取會直接影響體內荷爾蒙的分泌，包括提高昇糖激素濃度與降低胰島素濃度 (Forsythe, 1990; Sanchez and Hubbard, 1991)；另外，飲食中大豆蛋白取代動物性蛋白時，可降低餐後血糖、胰島素濃度的上升，並提高組織對於胰島素的敏感性，有助改善因肥胖所引起之胰島素抗性 (Lavigne et al., 2000)。除了大豆蛋白本身的作用外，2003 年的研究指出大豆異黃酮素可藉由活化 PPAR α 、PPAR γ ，加以促進脂質的代謝及胰島素的活化，進而改善胰島素抗性 (Mezei et al., 2003)。

胰島素抗性所引起之脂質代謝異常，會使肝臟中脂質大量堆積，導致肝細胞發炎和壞死。在本次口服葡萄糖耐受試驗的結果中指出，飲食攝取大豆蛋白雖然不會影響餐後血糖濃度，可顯著降低胰島素上升的情況，因此認為大豆蛋白可改善因 NASH 所造成之胰島素抗性，推測可藉此改善並延緩疾病的進程。

由本次血脂質分析結果顯示，雖然以部分大豆蛋白取代酪蛋白給予時，不會顯著影響血漿三酸甘油酯濃度，然而攝取大豆蛋白可以顯著降低血漿總膽固醇濃度。不論是在人體或是動物實驗結果皆發現，飲食中攝取大豆蛋白，或以大豆蛋白取代動物蛋白時，可降低高膽固醇血症病患或高脂血症病鼠之血脂質濃度，並可預防動脈粥瘤的形成 (Yashiro et al., 1985; Anderson et al., 1995)。研究推論，大豆蛋白降低血漿膽固醇濃度的可能機制之一是由於大豆蛋白在腸道中扮演膳食纖維的角色，與膽酸結合、促進糞便中膽酸的排出，加速肝臟中膽固醇再合成膽酸的速率，進而降低血漿膽固醇濃度 (Chen et al., 2003)。而由本次的研究結果指出，各組間在糞便中性固醇排出量上並無顯著差異，然而部份蛋白質來源以大豆蛋白取代時，卻有增加的趨勢。此外，飲食攝取大豆蛋白可顯著提高糞便膽酸的排出量，因此推論，大豆蛋白可藉由增加糞便中性固醇與膽酸的排出量，加速膽固醇的代謝，達到降低脂質的作用，以改善因 NASH 所造成之體內脂質異常的情況。

Potter (1996) 指出大豆蛋白的攝取可降低血中低密度脂蛋白膽固醇濃度；雖然在本次實驗結果發現，攝取大豆蛋白對於低密度脂蛋白膽固醇濃度並無顯著影響，然而可明顯改善血漿中高密度脂蛋白膽固醇和低密度脂蛋白膽固醇的比例，因此有助於減少併發心血管疾病的危因。

大豆蛋白降低血脂效果的成分，除了其中蛋白質部分外，大豆異黃酮素也是廣為

研究的成分之一。Anderson 等 (1999) 認為，大豆異黃酮素降血膽固醇的效果呈現劑量反應，且可用以預防心血管疾病。然而由本次研究的結果，並無法釐清大豆蛋白影響 NASH 模式動物血脂質的主要成份為何，因此，需要進一步的研究再作論斷。

血漿中游離脂肪酸增加是引起 NASH 致病機轉的主要因子之一(Kumar and Malet, 2000)，高濃度的游離脂肪酸會進一步誘發 CYP2E1 的表現，產生活性過氧化物以及細胞膜上磷脂質的過氧化反應，直接使細胞受損或引起發炎反應。由本次研究結果發現，飲食的修正可有效改善血漿游離脂肪酸濃度，然而持續攝取 NASH 飲食，大豆蛋白的部分取代也具有同樣的效果，若是能夠加以修正飲食內容，並配合大豆蛋白的攝取，其改善血漿游離脂肪酸濃度的效果則更為顯著。因此我們認為，可藉由攝取大豆蛋白，降低血漿游離脂肪酸濃度，以減少 NASH 所造成之氧化損傷及發炎反應。

體內游離脂肪酸濃度增加，除了造成氧化損傷之外，提高血漿非酯化脂肪酸濃度，會增加週邊組織及肝臟的胰島素抗性 (Wuesten et al., 2005)。胰島素抗性是造成 NASH 的主因之一，因此推測藉由攝取大豆蛋白而降低血漿游離脂肪酸濃度的作用，除了直接影響而改善氧化壓力與脂質過氧化作用，同時可減輕因為游離脂肪酸濃度增加所造成胰島素抗性加重的情況。

攝取 NASH 誘發飲食除了會導致血脂異常，也會顯著造成肝臟中脂質的堆積，由本次研究結果指出，飲食中攝取大豆蛋白可以有效降低肝臟中膽固醇濃度。此外，由於攝取 NASH 飲食所造成之肝臟三酸甘油酯堆積的情形，也可藉由攝取大豆蛋白獲得改善。研究指出，大豆蛋白影響肝臟脂質濃度可分為減少肝臟中脂肪酸合成作用與促進肝臟中脂肪酸氧化作用兩部分；在減少脂肪酸合成方面，Iritani 等 (1988) 指出大豆蛋白可抑制 Wistar 大白鼠肝中脂質合成酵素活性，減少肝臟中脂肪酸的合成；而在促進脂肪酸氧化方面，Banz 等 (2004) 說明大豆蛋白可藉由提高 PPAR α 的表現，以促進肝臟中脂肪酸的氧化。因此認為飲食中攝取大豆蛋白可藉由降低肝臟內脂肪酸的合成，以及提高脂肪酸的氧化，來達到降低肝臟脂質濃度，並改善因 NASH 所造成之肝臟脂肪堆積的現象。

另一方面，大豆蛋白對於胰島素抗性的改善效果，也可用以說明大豆蛋白降低肝臟脂質濃度的可能機轉，Ascencio 等 (2004) 的研究發現，飲食攝取大豆蛋白，可藉由維持血清胰島素濃度，減少轉錄因子 SREBP 的表現，間接降低與脂質合成相關酵素基因的表現量，達到改善脂肪肝的發生率。而由本次研究結果指出，飲食中大豆蛋白的部分取代，可顯著降低餐後胰島素濃度的上升情況。因此推測，大豆蛋白可

藉由維持血中胰島素濃度，以降低因為 NASH 所造成之肝臟脂質堆積。

NASH 主要會造成肝臟的損傷，使血液中肝功能指數異常，而其所造成的肝損傷是由於脂質的堆積及氧化壓力的增加 (Sheth et al., 1997)。在本次研究結果發現，NS 組之 AST、ALT 顯著低於 N 組，顯示攝取大豆蛋白可藉由改善肝臟脂質堆積的情形，減少因 NASH 所引起的肝臟傷害。

由本次研究結果指出，飲食中攝取大豆蛋白可顯著降低肝臟中脂質過氧化物濃度與提高抗氧化酵素活性，顯示大豆蛋白可依其所具有的抗氧化能力，來降低因 NASH 所造成氧化壓力增加的情形。有關大豆蛋白的抗氧化能力，主要可以分為大豆蛋白質本身的作用與大豆異黃酮素兩部分。研究指出，大豆蛋白以其特殊的胜肽片段或胺基酸組成，來降低化學藥物所引起大白鼠體內的氧化壓力 (Takenaka et al., 2003)；而在大豆異黃酮素方面，研究結果發現飲食中大豆異黃酮素的添加，可避免 LDL 氧化，並降低血中過氧化物 MDA 的濃度 (Kerry and Abbey, 1998)。

Kumar 和 Malet (2000) 的研究指出血中高濃度游離脂肪酸會進一步誘發肝臟中 CYP2E1 蛋白質的表現量，繼而產生活性氧屬，以及細胞膜上磷脂質的過氧化反應。由本次研究結果發現，飲食攝取大豆蛋白可顯著降低肝臟中 CYP2E1 蛋白質的表現，因此認為可藉此降低因 NASH 所造成之肝中氧化壓力增加的情況。然而大豆蛋白對於 CYP2E1 蛋白質表現量的影響，是直接藉由大豆蛋白的生理活性加以改善，或是由於降低了游離脂肪酸濃度，進而間接減少 CYP2E1 蛋白質表現量，則需待進一步研究。脂質過氧化作用所產生之脂質過氧化物，除了會提高氧化壓力、造成細胞死亡，也會藉由活化星狀細胞，促使前發炎細胞激素與 collagen 合成，導致細胞纖維化 (Browning and Horton, 2004)；此外，也會使 TNF- α 大量表現，而體內 TNF- α 濃度增加時，會刺激發炎相關細胞激素的表現，並認為與 NASH 疾病進程和肝硬化的致病機轉相關。而在本次研究結果指出飲食攝取大豆蛋白，可顯著降低肝臟中 TNF- α 的濃度。

由先前的研究認為，大豆蛋白降低 TNF- α 的可能機制之一為：大豆蛋白中的大豆異黃酮素對於抑制發炎反應的直接影響；Akiyama 等 (1989) 的研究指出，大豆異黃酮素具有抗發炎反應與改善免疫功能的作用。Duan 等 (2003) 的研究則進一步說明大豆異黃酮素可藉由抑制 tyrosinekinase 的作用，來改善因過敏原所引起的支氣管緊縮與發炎反應。除了大豆異黃酮素的作用外，另一個影響肝臟 TNF- α 濃度的機轉則是由於大豆蛋白降低肝中脂質堆積、減少氧化壓力，進而間接改善因 NASH 所引起的肝細胞傷害，因此可降低 TNF- α 濃度、減輕肝細胞發炎的現象。

總結

大豆蛋白以其特殊的生理活性，改善 NASH 模式動物的胰島素抗性、調節血脂、降低肝臟脂質堆積、提高抗氧化能力、減少 CYP2E1 蛋白質表現量以及降低發炎反應，進而減輕 NASH 所導致的肝細胞損害，延緩 NASH 進展至肝硬化的進程。若能同時予以飲食修正或以大豆蛋白取代，對於 NASH 飲食所造成之不良影響的改善效果，則會更為顯著。

參考文獻

- Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M and Fukami Y (1987) Genistein a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinase. *J Biol Chem* 262:5592-5595.
- Anderson JW, Johnstone BM and Cook Newell ME (1995) Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *New Engl J Med* 333:276-282.
- Anderson JJ, Anthony MS, Cline JM, Washburn SA and Garner SC (1999) Health potential of soy isoflavones for menopausal women. *Publ Health Nutr* 2:489-504.
- Ascencio C, Torres N, Isoard-Acosta, Gómez-Pérez FJ, Hernández-Pando R and Tovar AR (2004) Soy protein affects serum insulin and hepatic SREBP-1 mRNA and reduces fatty liver in rats. *J Nutr* 134:522-529.
- Bacon BR Farahvash MJ Janney CG Neusch W and Tetri BA (1994) Non-alcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology* 107:1103-1109.
- Bakhit RM, Klein BP and Essex-Sorlie D (1994) Intake of 25 g of soybean protein with or without soybean fiber alters plasma lipids in men with elevated cholesterol concentrations. *J Nutr* 124:213-222.
- Banz WJ, Davis J, Peterson R and Iqbal MJ (2004) Gene expression and adiposity are modified by soy protein in male Zucker diabetic fatty rat. *Obes. Res.* 12:1907-1913.
- Bartke A, Peluso MR, Moretz N, Wright C, Winters TA, Shanahan MF, Kopchick JJ and Banz WJ (2004) Effects of soy-derived diets on plasma and liver lipids, glucose tolerance, and longevity in normal, long-lived and short-lived mice. *Horm Metab Res* 36:550-558.
- Carroll KK and Kurowska EM (1995) Soy consumption and cholesterol reduction: Review of animal and human studies. *J Nutr* 125:594s-597s.
- Chen HM, Muramoto K, Yamachi F and Nokihara K (1996) Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *J. Agric Food Chem* 44:2619-2623.
- Chen JR, Chiou SF, Suetsuna K, Yang HY and Yang SC (2003) Lipid metabolism in hypercholesterolemic rats affected by feeding cholesterol-free diets containing different amounts of non-dialyzed soybean protein fraction. *Nutrition* 19:676-680.
- Davis JN, Singh B, Bhuiyan M and Sarkar FH (1998) Genistein-induced upregulation of p21WAF1, downregulation of cyclin B, and induction of apoptosis in prostate cancer cells. *Nutr Cancer* 32:123-131.
- Davis J, Steinle J, Higginbotham DA, Oitker J, Peterson RG and Banz WJ (2005) Soy protein influences insulin sensitivity and cardiovascular risk in male lean SHHF rats. *Horm Metab Res*

37:309-315.

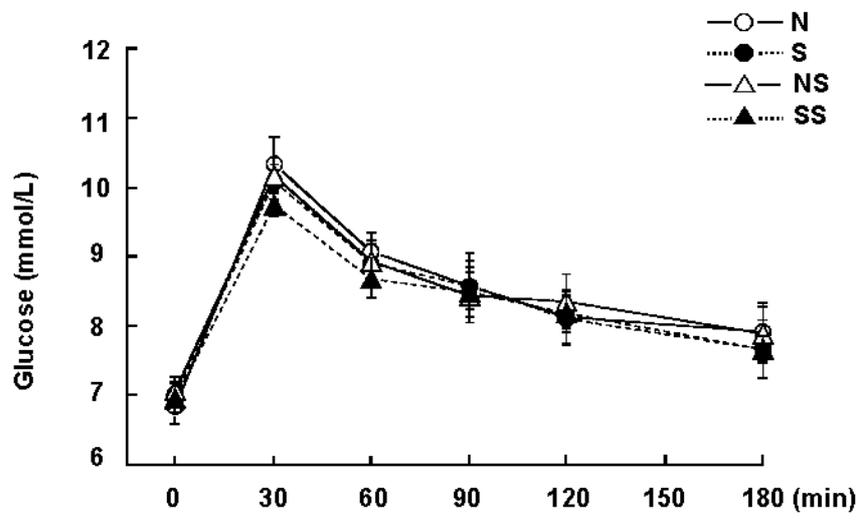
- Duan w, Kuo IC, Selvarajan S, Chua KY, Bay BH and Wong WSF (2003) Antiinflammatory effects of genistein, a tyrosine kinase inhibitor, on a guinea pig model of asthma. *Am J Respir Crit Med* 167:185-192.
- Erdman JW (2000) Soy protein and cardiovascular disease. *Circulation* 102:2555-2559.
- Folch J, Lees JM and Solane-Stanley GH (1957) A sample method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem* 226:497-509.
- Food and Drug Administration, (1999) Food labeling, health claims, soy protein, and coronary heart disease. *Fed Reg* 57:699-733.
- Forsythe III WA (1986) Comparison of dietary casein or soy protein effects on plasma lipids and hormone concentrations in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) *J Nutr* 116:1165-1171.
- Forsythe III WA (1990) Dietary proteins, cholesterol and thyroxine: A propose mechanism. *J Nutr Sci Vitaminal* 36:101-104.
- Greaves KA, Wilson MD, Rudel LL, Williams JK and Wagner JD (2000) Consumption of soy protein reduces cholesterol absorption compared to casein protein alone or supplemented with isoflavone extract or conjugated estrogen in ovariectomized cynomolgous monkeys. *J Nutr* 130: 820-826.
- Grundy SM, Ahrens EH and Miettinen TA (1965) Quantitative isolation and gas-liquid chromatographic analysis of total fecal bile acids. *J Lipid Res* 6:397-410.
- Honore EK, Williams JK, Anthony MS and Clarkson TB (1997) Soy isoflavones enhance coronary vascular reactivity in atherosclerotic female macaques. *Fertil Steril* 67: 148-64
- Hugo Aebi (1947) Catalase in vitro. *B Chance Acta Chem Scand* 236:121-125.
- Iritani N, Suga A, Fukuda H, Katsurada A and Tanaka T (1988) Effects of dietary casein ad soybean protein on triglyceride turnover in rat liver. *J Nutr Sci Vitaminol* 34:309-315.
- Iritani N, Suga A, Fukuda H, Katsurada A and Tanaka T (1997) Dietary soybean protein increase insulin receptor gene expression in Wistar fatty rats when dietary polyunsaturated fatty acid level is low. *J Nutr* 127:1077-1083.
- Kaplotis S, Hermann M, Held I, Seelos C, Ehringer and Gmeiner BNK (1997) Genistein, the dietary-derived angiogenesis inhibitor, prevents LDL oxidation and protects endothelial cells from damage by antherogenic LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:2868-2874
- Kerry N and Abbey M (1998) The isoflavone genistein ihibits copper and peroxy radical mediated low density lipoprotein oxidation in vitro. *Atherosclerosis* 140:341-347.
- Kritchewsky D (1995) Dietary protein, cholesterol and atherosclerosis: A review of the early history. *J Nutr* 125: 598s-593s.
- Kumar KS and Malet PF (2000) Nonalcoholic steatohepatitis. *Mayo Clin Proc* 75:733-739.
- Lavigne C, Marette A and Jacques H (2000) Cod and soy protein compared with casein improve glucose tolerance and insulin sensitivity in rats. *Am J Physiol Metab* 278:E491-E500.
- Lin Y, Meijer GW, Vermeer MA and Trautwein EA (2004) Soy protein enhances the cholesterol-lowering effect of plant sterol esters in cholesterol-fed hamsters. *J Nutr* 134:143-148.
- Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB,et al. (1980) Nonalcoholic steatohepatitis. *Mayco Clinical Proc* 55:434-438.
- Marchesini G, Brizi M, Marsell-Labate AM, et al. (1999) Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med* 107:450-455.

- Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Manes S, Martinez AC (2001) Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. *Annu Rev Immunol* 19:397-421.
- Mezei O, Banz WJ, Steger RW, Peluso MR, Winters TA and Shay N (2003) Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese Zucker rats and murine RAW264.7 cells. *J Nutr* 133:1238-1243.
- Mulhall BP, Ong JP and Youossi ZM (2002) Non-alcoholic fatty liver disease: An overview. *J of Gastroenterol Hepatol* 17:1136-1147.
- Nagata C, Tanaka K and Sugano M (1981) Further studies on the hypocholesterolemic effect of soybean protein in rats. *Br J Nutr.* 45:233-241.
- Ness GC, Pendleton LC, Li YC and Chiang JYL (1990) Effect of thyroid hormone on hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase, LDL receptor, HMG-CoA reductase, farnesyl pyrophosphate synthase and apolipoprotein A-I mRNA levels in hypophysectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 172:1150-1156.
- Nomura H, Kashiwagi S, Hayashi J, et al. (1988) Prevalence of fatty liver in a general population of Okinwa, Japan. *Jpn J Med* 27:142-149.
- Ogawara H, Akiyama T and Watanabe S (1989) Inhibition of tyrosine protein kinase activity by synthetic isoflavones and flavones. *J Antibiotic* 42:340-343.
- Potter SM (1995) Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effects of soy. *J Nutr* 125:606s-611s.
- Sanchez A and Hubbard RW (1991) Plasma amino acids and insulin/glucagons ratio as an explanation for the dietary protein modulation of atherosclerosis. *Med Hypotheses* 35:324-329.
- Sheth SG, Gordon FD and Chopra S (1997) Nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Intern Med* 126:137-145.
- Sirtori CR, Lovati MR, Manzoni C, Monetti M, Pazzucconi F and Gatti E (1995) Soy and cholesterol reduction: Clinical experience. *J Nutr* 125:598s-605s.
- Steinberg D (1997) Oxidative modification of lower density lipoprotein and atherosclerosis. *Circulation* 95:1062-1071
- Sugano M, Yamada Y, Yoshida K, Hashimoto Y, Matsuo T and Kimoto M (1988) The hypocholesterolemic action of the undigested fraction of soybean protein in rats. *Atherosclerosis* 72:115-122.
- Takenaka A, Annaka H, Kimura Y, Aoki H and Igarashi K (2003) Reduction of paraquat-induced oxidative stress in rats by dietary soy peptide. *Biosci Biotechnol Biochem* 67:278-283.
- Teramoto K, Bowers JL, Kruskal JB and Clouse ME (1993) Hepatic microcirculatory changes after reperfusion in fatty and normal liver transplantation in the rat. *Transplantation* 56:1076-1082.
- Wang W, Higuchi CM and Zhang R (1997) Individual and combinatory effects of soy isoflavones on the in vitro potentiation of lymphocyte activation. *Nutr Cancer* 29:29-34.
- Weihua N, Yasuyuki T, Masanobu S and Katsumi I (1998) Dietary soy protein isolate, compare with casein, reduces atherosclerotic lesion area in apolipoprotein E-deficient mice. *J Nutr* 128:1884-1889.
- Wuesten O, Balz CH, Bretzel RG, Kloer HU and Hardt PD (2005) Effects of oral fat load on insulin output and glucose tolerance in healthy control subjects and obese patients without diabetes. *Diabetes Care* 28:360-365.
- Yashiro A, Oda S and Sugano M (1985) Hypocholesterolemic effect of soya protein for humans. *J*

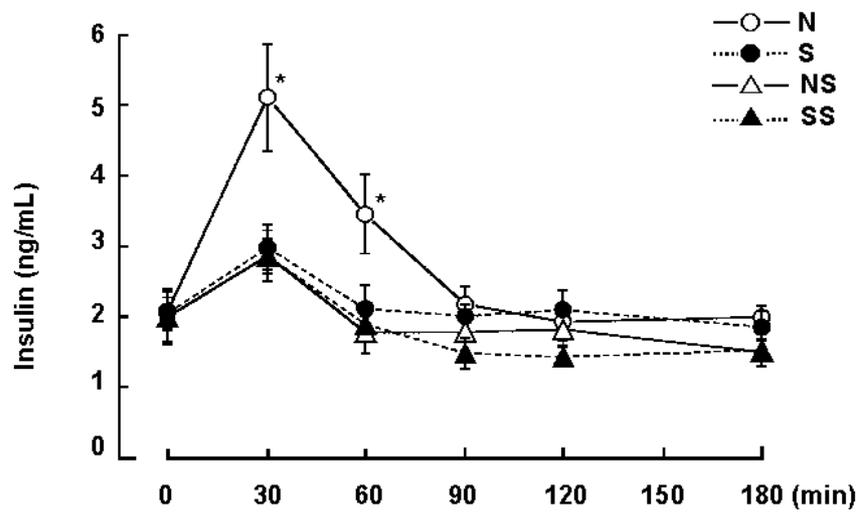
Am Oil Chem Soc 58: 400-406.

Young VR (1991) Soy protein in relation to human protein and amino acid nutrition. J Am Diet Assoc 91:828-835.

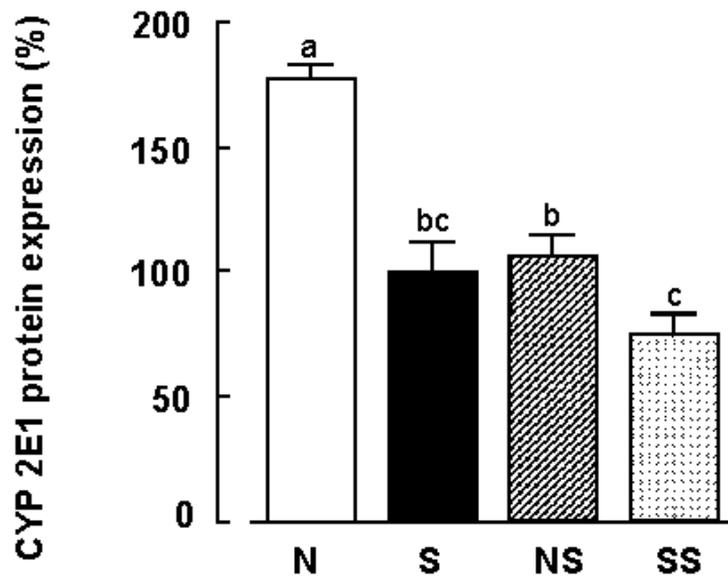
Zezulka AY and Calloway DH (1976) Nitrogen retention in men fed varying levels of amino acids from soy protein with or without added L-methionine. J Nutr 106:212-221.



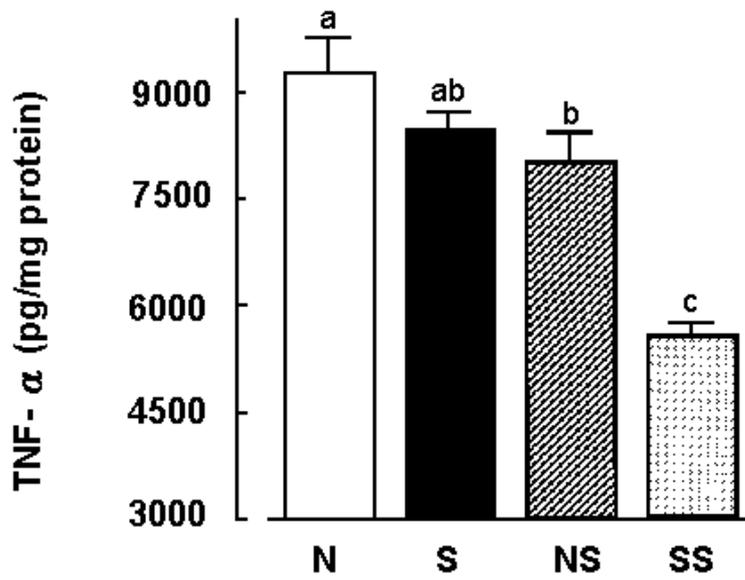
圖一、口服葡萄糖耐受試驗—葡萄糖濃度變化



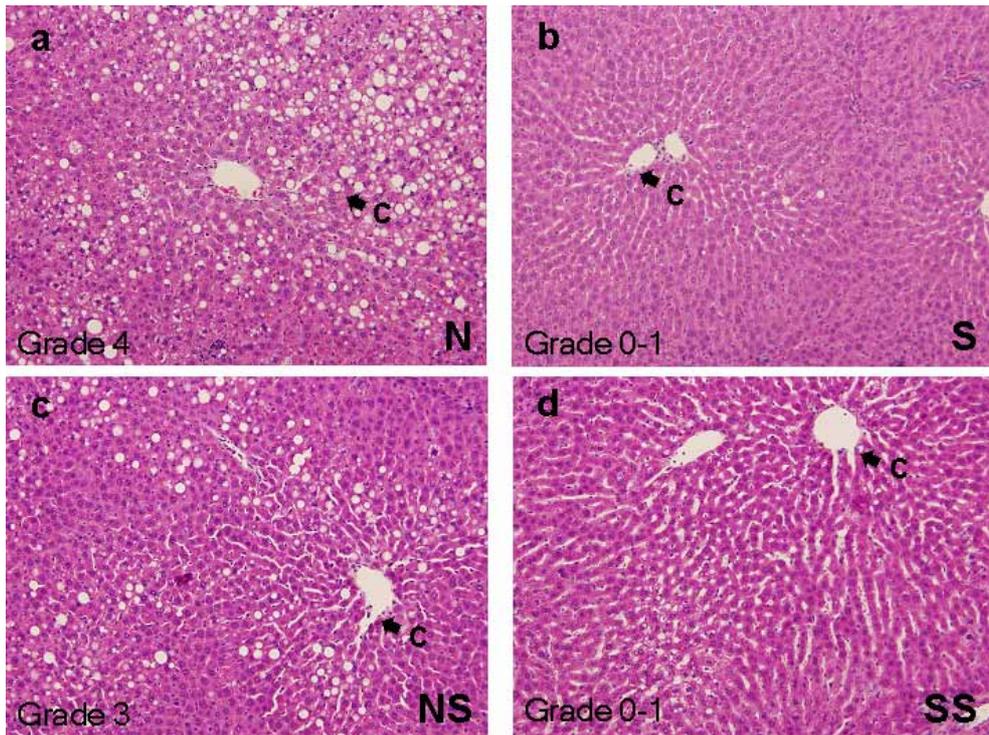
圖二、口服葡萄糖耐受試驗—胰島素濃度變化



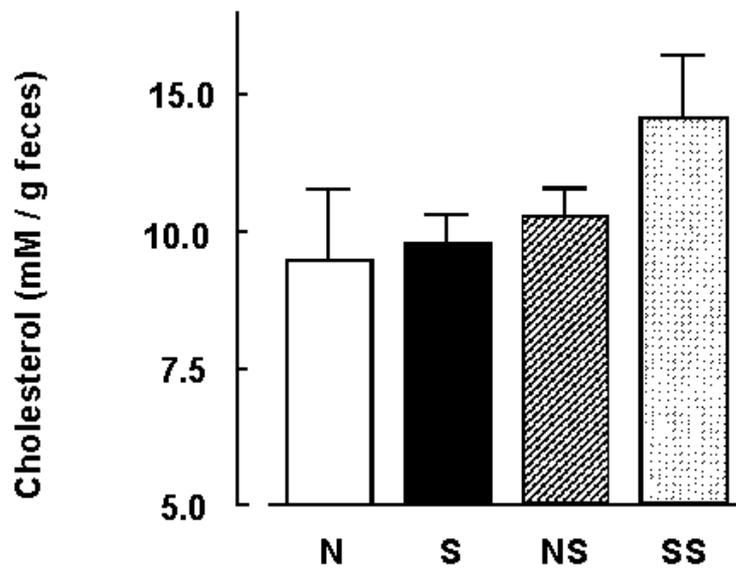
圖三、肝臟 CYP2E1 蛋白質的表現量



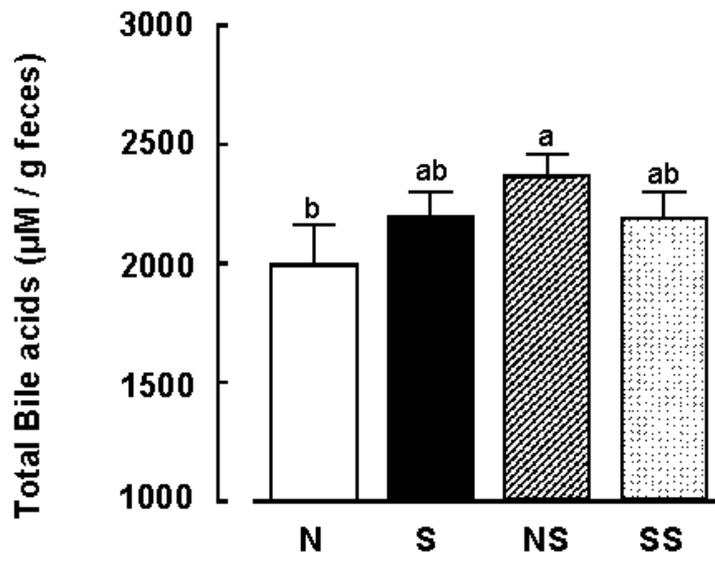
圖四、肝臟 TNF-α 濃度



圖五、各組肝臟組織切片圖



圖六、各組糞便中中性固醇的濃度



圖七、各組糞便中膽酸的濃度

表一、各組飼料組成

Ingredients/Group (g/L)	N	S	NS	SS
Casein	84	84	42	42
Soy protein	-	-	42	42
Methionine	0.6	0.6	0.6	0.6
Corn oil	97	17	97	17
Olive oil	56.8	56.8	56.8	56.8
Safflower oil	5.4	5.4	5.4	5.4
Dextrin	51.2	230.4	51.2	230.4
Choline	1.06	1.06	1.06	1.06
Fiber	20	20	20	20
Xanthan gum	6	6	6	6
Vitamins	10	10	10	10
Minerals	30	30	30	30

Casein, oils, dextrin, cellulose (non-nutritive bulk), AIN-93M vitamin/mineral mixture, and methionine were obtained from ICN Biochemicals (Aurora, OH). Soy protein was purchased from Fuji oil Co. (Fujipro®, Osaka, Japan). Xanthan and Choline bitartrate were obtained from Sigma (St. Louis, MO). Group S and SS were fed a standard liquid diet with 35% of the energy derived from fat, 18% from protein, and 46% from carbohydrates. Group N and NS were fed a high-fat liquid diet with 71% energy of the derived from fat, 18% from protein, and 11% from carbohydrates.

表二、各組實驗末體重、食物攝取及血液生化分析

	N	S	NA	SA
Weight (g)	535.88 ± 18.50	529.60 ± 10.00	530.26 ± 8.81	523.06 ± 8.95
Food Intake (g/d)	59.30 ± 3.16	59.97 ± 3.31	58.13 ± 3.15	58.10 ± 3.09
Plasma				
Triglyceride (mmol/L)	0.29 ± 0.02 ^{ab}	0.37 ± 0.02 ^a	0.21 ± 0.03 ^b	0.37 ± 0.04 ^a
Total cholesterol (mmol/L)	1.89 ± 0.07 ^a	1.56 ± 0.05 ^b	1.56 ± 0.07 ^b	1.60 ± 0.07 ^b
HDL-C (mmol/L)	1.48 ± 0.03	1.42 ± 0.04	1.44 ± 0.05	1.42 ± 0.06
LDL-C (mmol/L)	0.23 ± 0.03 ^a	0.06 ± 0.00 ^b	0.19 ± 0.03 ^a	0.14 ± 0.02 ^a
HDL-C/LDL-C	6.46 ± 0.92 ^c	19.09 ± 1.76 ^a	10.30 ± 1.33 ^b	17.64 ± 1.39 ^a
Free fatty acid (mmol/L)	1.43 ± 0.05 ^a	0.85 ± 0.13 ^b	0.46 ± 0.02 ^c	0.54 ± 0.06 ^c
GOT (IU/L)	171.80 ± 7.36 ^a	130.30 ± 4.72 ^b	130.00 ± 8.54 ^b	107.73 ± 2.56 ^b
GPT (IU/L)	38.40 ± 1.63 ^a	27.10 ± 0.81 ^b	26.30 ± 1.08 ^b	27.40 ± 0.60 ^b
Uric acid (mmol/L)	1.48 ± 0.08	1.25 ± 0.09	1.25 ± 0.05	1.42 ± 0.08

Values are presented as the mean ± SEM (n = 10).^{abc} Values in a row with different letters of superscript mean significant difference (p < 0.05).

表三、各組脂肪與肝臟重量、肝臟脂質及氧化狀態分析

	N	S	NA	SA
Fat weight (g)	30.24 ± 3.05 ^a	26.60 ± 1.13 ^b	22.50 ± 1.47 ^b	23.58 ± 0.83 ^b
Liver				
Liver Weight (g)	15.80 ± 0.53 ^a	13.06 ± 0.20 ^b	12.73 ± 0.24 ^b	12.02 ± 0.19 ^b
Hepatosomatic Index	0.03 ± 0.00 ^a	0.02 ± 0.00 ^b	0.02 ± 0.00 ^b	0.02 ± 0.00 ^b
Cholesterol (μmol/liver)	104.24 ± 4.76 ^a	91.02 ± 1.93 ^b	83.25 ± 3.51 ^b	60.29 ± 1.83 ^c
Triglyceride (μmol/liver)	171.82 ± 16.78 ^a	132.97 ± 6.52 ^{ab}	116.82 ± 8.19 ^{bc}	79.16 ± 5.65 ^c
MDA + 4-HNE (mmol/mg protein)	1313.48 ± 73.34 ^a	1148.70 ± 43.76 ^{ab}	1070.00 ± 58.38 ^b	1033.91 ± 29.90 ^b
SOD (U/mg protein)	343.02 ± 20.07 ^c	461.23 ± 24.92 ^b	530.08 ± 34.80 ^b	748.51 ± 31.17 ^a
Catalase (U/mg protein)	434.30 ± 45.94 ^b	499.18 ± 16.14 ^a	508.58 ± 17.35 ^a	509.62 ± 33.22 ^a

Values are presented as the mean ± SEM (n = 10).abc Values in a row with different letters of superscript mean significant difference (p < 0.05). HI: Hepatosomatic Index = Liver weight/Body weight x 100%.