

東海大學畜產與生物科技學系

Department of Animal Science and Biotechnology

Tunghai University

碩士論文
Master Thesis

指導教授：謝長奇 博士
Advisor: Chang-Chi Hsieh, Ph. D.

富含共軛亞麻油酸之優酪乳對卵白蛋白誘導之
呼吸道過度反應的調節作用

The modulatory effects of CLA-enriched yoghurt in
OVA-induced airway hyperresponsiveness

研究生：謝漢儀
Graduate student: Han-Yi Hsieh

中華民國九十九年六月

June, 2010

東海大學碩士班研究生

論文口試委員審定書

畜產與生物科技學系 謝漢儀(學號 G96610015) 君
所提之論文：

富含共軛亞麻油酸之優酪乳對卵白蛋白誘導之呼
吸道過度反應的調節作用，經本委員會審議，認為符
合碩士資格標準。

論文指導教授 謝長奇 (簽章)

畜產與生物科技學系主任 楊錫坤 (簽章)

考試委員 林文川 (簽章)

詹明修

謝長奇

吳勇初

中華民國 九十九年 六月 四 日

致謝

本論文承蒙指導教授謝長奇博士之殷切指導與黽勉，使之得以順利完成，於此謹呈最虔摯之謝忱。並於論文口試時，承蒙東海大學吳勇初博士、中國醫學大學林文川博士、中山醫學大學詹明修博士對本論文之撥冗審查，惠與寶貴意見與指正，促使本論文得以更臻完善，僅此敬致最誠摯之謝意。

受業期間亦蒙中興大學廖俊旺博士與竹南動物科技研究所給予組織切片分析方面之指導與協助，及系所內諸位師長之關懷指導，睿與新知，受益恩情永銘於心。

感謝東海乳品加工廠給予東海優酪乳作為實驗材料，在此敬致由衷之謝語。

此外，感謝實驗室的夥伴們，宜綸學姐、文瑜、助理依陵與如玉、佑軒學弟、彥文學弟、品欣學妹、軒妙學妹、怡姬學妹、晉文學妹、治暄學弟、瑋仁學弟、炯呈學弟、景聰學弟、秀芳學妹、新雅學妹、柏翰學弟、嘉瑋學弟、怡婷學妹於實驗和生活上的協助與關心。

感謝中國醫藥大學宏柏學長、麗嬋學姐與中興大學晉東學長於實驗上之協助。

感謝同窗好友上瑋、冠廷、韋綱、玫僑於研究所生涯的相互砥礪扶持與一同伴隨過的光陰歲月，使得人生旅途上增添許多繽紛色彩，然於此，心中縱有不捨之情，僅銘於心。

最後，則要感謝最摯愛的家人，由於他們的支持和鼓勵，使得學業得以順利完成，僅以這微小成果獻予諸位，並獻上感恩之意。

目次

壹、摘要	1
貳、前言	4
參、文獻回顧	5
一、共軛亞麻油酸文獻探討	5
(一)、共軛亞麻油酸之結構	5
二、共軛亞麻油酸之來源與影響因子	5
(一)、CLA 的來源	5
(二)、影響乳肉製品中 CLA 含量之因子	6
(三)、共軛亞麻油酸之代謝與免疫調節	8
二、益生菌文獻探討	11
(一)、益生菌定義	11
(二)、益生菌特性	11
(三)、乳酸菌的生理	12
(四)、乳酸菌的生理功能	13
三、氣喘文獻探討	17
(一)、氣喘定義	17
(二)、氣喘病理學	17
(三)、氣喘流行病學	17
(四)、氣喘危險因子	18
(五)、氣喘的致病機轉	18
(六)、影響氣喘之過敏性介質	19
(七)、影響過敏性氣喘的白血球	22
肆、材料與方法	24
一、實驗材料	24
(一)、藥品試劑	24
(二)、設備、器材	25
二、實驗方法	26
(一)、動物飼養與試驗分組	26
(二)、富含共軛亞麻油酸之優酪乳的製備	26

(三)、試驗動物之致敏模式-----	27
(四)、實驗動物之樣本採集與分析-----	28
(五)、優酪乳之菌種分析-----	30
(六)、腸內菌相之檢測-----	31
伍、統計分析-----	33
一、單因子變異數分析 (One-way analysis of variance)-----	33
二、無母數分析 (Non-parametric statistics)-----	33
陸、結果-----	34
一、腸道菌相的變化-----	34
(一)、優酪乳之菌種鑑定-----	34
(二)、小鼠於餵食不同處理一個月後之腸道菌相變化-----	34
二、呼吸道過度反應之免疫調節-----	34
(一)、小鼠之體重、脾臟與肺臟重量的變化-----	34
(二)、呼吸道過度反應中脾臟淋巴細胞次族群的變化-----	35
(三)、呼吸道過度反應中肺部沖洗液淋巴細胞次族群的變化-----	35
(四)、呼吸道過度反應中呼吸道周邊淋巴細胞次族群的變化-----	36
(五)、呼吸道過度反應中腸繫膜淋巴細胞次族群的變化-----	36
(六)、呼吸道過度反應中肺部沖洗液細胞激素的變化-----	37
(七)、呼吸道過度反應中對血清與肺部沖洗液抗體的變化-----	37
(八)、呼吸道過度反應的變化-----	38
(九)、肺組織病理切片的變化-----	38
柒、討論-----	40
一、呼吸道過度反應前期之 T 細胞分化的調節作用-----	41
二、呼吸道過度反應中期 IgE 的產生與 Th2 細胞之免疫調節-----	42
三、呼吸道過度反應後期之免疫調節-----	44
捌、結論-----	45
玖、參考文獻-----	46
拾、附錄-----	59

拾壹、附表-----	95
拾貳、附圖-----	101
拾參、附件-----	105

表次

表 一、比較對照組與優酪乳及不同濃度之共軛亞麻油酸優酪乳對於糞便中益生菌的影響.....	71
表 二、比較對照組與優酪乳及不同濃度之共軛亞麻油酸優酪乳對於脾臟及肺臟濕重之影響 ..	72
表 三、給予富含共軛亞麻油酸之優酪乳對於肺部沖洗液細胞中抗原所誘導之細胞激素(IFN- γ , IL-4 and IL-5)所造成之改變.....	73
表 四、給予富含共軛亞麻油酸之優酪乳對於肺部沖洗液細胞中抗原所誘導之細胞激素(IL-6 and TNF- α)所造成之改變.....	74
表 五、給予富含共軛亞麻油酸之優酪乳對於肺部沖洗液細胞中抗原所誘導之細胞激素 (IL-17 and IL-10)所造成之改變.....	75
表 六、比較對照組與優酪乳及不同濃度之共軛亞麻油酸優酪乳對於血清中特異性 OVA 抗體(IgE, IgG, IgG1)之影響.....	76
表 七、比較對照組與優酪乳及不同濃度之共軛亞麻油酸優酪乳對於肺部沖洗液中特異性 OVA 抗體(IgE, IgG, IgG1)之影響.....	77
表 八、比較對照組與優酪乳及不同濃度之共軛亞麻油酸優酪乳對於組織切片 H&E 染色之影響	78

圖次

圖 一、比較對照組與優酪乳及不同濃度之共軛亞麻油酸優酪乳對於每週體重變化之影響。	79
圖 二、脾臟中活化的 T 淋巴細胞亞族群。	80
圖 三、脾臟中淋巴細胞亞族群。	81
圖 四、脾臟中 T 輔助細胞第一型與第二型亞族群。	82
圖 五、肺部沖洗液中活化的 T 淋巴細胞亞族群。	83
圖 六、肺部沖洗液中淋巴細胞亞族群。	84
圖 七、肺部沖洗液中 T 輔助細胞第一型與第二型亞族群。	85
圖 八、呼吸道淋巴結中活化的 T 淋巴細胞亞族群。	86
圖 九、呼吸道淋巴結中的淋巴細胞亞族群。	87
圖 十、呼吸道淋巴結中 T 輔助細胞第一型與第二型亞族群.....	88
圖 十一、腸繫膜淋巴結中活化的 T 淋巴細胞亞族群.....	89
圖 十二、腸繫膜淋巴結中淋巴細胞亞族群.....	90
圖 十三、腸繫膜淋巴結中 T 輔助細胞第一型與第二型亞族群.....	91
圖 十四、測量呼吸道阻力.....	92
圖 十五、蘇木紫與伊紅染色.....	93
圖 十六、胺甲苯藍染色.....	94

壹、摘要

共軛亞麻油酸在花生四烯酸的脂質代謝上扮演著重要角色，可調節發炎反應，在飲食中藉由提升共軛亞麻油酸含量的方法可緩解過敏原所誘導之過敏性氣喘，而富含共軛亞麻油酸之牛乳可降低小鼠之呼吸道過敏，但其作用機制不明，利用乳酸菌調節過敏性氣喘之作用有限。本實驗探討優酪乳或富含共軛亞麻油酸之優酪乳對卵白蛋白(OVA)誘發 BALB/c 小鼠之呼吸道過度反應之免疫調節機轉，透過分析脾臟組織與肺沖液中白血球之表面抗原(包括 CD3、CD4、CD8、CD19、CD25、CD45、CD69、CD278、Tim-3 與 PanNK)以瞭解 T4、T8、T、B、T 調節、T 毒殺、NKT、Th1、Th2、Tr1 與 Tr2 等細胞之分化；另一方面利用身體積偵測器量測呼吸道過度反應；由血液與肺沖液中過敏原特異性抗體的含量及肺沖液中細胞激素的變化來評估免疫調節的交互作用；最後以蘇木紫與伊紅(hematoxylin & eosin)及甲苯胺藍(toluidine blue)染色進行組織病理判讀，評估肺部發炎及肥大細胞浸潤程度。結果顯示優酪乳與富含共軛亞麻油酸之優酪乳可以恢復 T 調節型細胞，它的意義在於增加抑制型 T 細胞，負調節 Th2 (CD278⁺, CD4⁺) 與提升 Th1 (Tim-3⁺, CD4⁺)的表現量。另一方面，共軛亞麻油酸可以顯著性地抑制過敏性抗體 IgE 與發炎細胞激素 IL-6 的產生及肥大細胞的脫顆粒現象，進一步降低呼吸道過度反應。綜上所述，添加共軛亞麻油酸的優酪乳可顯著性地透過調節 T 調節細胞與 Th1/Th2 細胞的分化，進一步降低過敏性 IgE 抗體分泌與發炎現象並緩和呼吸道過度反應。

關鍵詞：過敏、抗發炎、氣喘、共軛亞麻油酸、優酪乳

ABSTRACT

Conjugated linoleic acid (CLA) plays an important role in regulation of arachidonic acid metabolism. The way to raise the CLA content in the diet can reduce the allergen induced atopic asthma. CLA and lactic acid bacteria can modulate inflammation in bronchiolar hyperresponsiveness. The previous studies indicated that CLA-enriched milk can attenuate allergic airway disease in mice, but the mechanism is unclear. In this study, we administered yoghurt with or without various concentrations of CLA to determine their effects on OVA-induced airway hyperresponsiveness in BALB/c mice. Leukocytes harvest from bronchoalveolar lavage fluid (BALF), spleen, airway-draining and mesenteric lymph node were measurement. Cluster of differentiation markers including CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD45, CD69, CD278, Tim-3 and PanNK, were used to distinguish the cells differentiation. The enhanced pause (Penh) was measured with whole body plethysmography to monitor the airway hyperresponsiveness. Specific antibodies including anti-OVA antibodies and cytokines in serum and BALF were measured with ELISA. The H&E and toluidine blue stain of lung inflammation and mast cell infiltration were determined by microscopy. The results indicated that yoghurt and CLA enrichment restore the regulatory T cells (Treg) that increased the suppressor T cells in modulated immune response. Yoghurt and CLA could reduce the Th2 (CD278⁺, CD4⁺) and increase the Th1 (Tim-3⁺, CD4⁺) to modulate T helper cell differentiation. Another results indicated that CLA-enriched yoghurt significantly inhibited allergen-specific IgE production and reduced IL-6 in BALF. Mast cell infiltration was also reduced and decrease airway hyperresponsiveness in allergic BALB/c mice. In conclusion, CLA-enriched yoghurt is an idea healthy daily supplement for airway hypersensitivity *via* modulating Treg, Th1/Th2 differentiation and allergic IgE.

Keyword : Allergy, Anti-inflammation, Asthma, Conjugated linoleic acid, Yoghurt

略字表

AA	Arachidonic acid
AHR	Airwy hyperresponsiveness
APCs	Antigen-presenting cells
BALF	Bronchoalveolar lavage fluid
CLA	Conjugated linoleic acid
COX	Cyclooxygenase
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	Fetal bovine serum
FcεRI	High-affinity IgE receptor I
GRAS	Generally Recognized As Safe
HBSS	Hank's balanced salt solution
H&E stain	Hematoxylin & eosin stain
IgE	Immunoglobulin E
IFN-γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
LAB	Lactic acid bacteria
OVA	Ovalbumin
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
PBMC	Primary biliary cirrhosis
SAR	Seasonal allergic rhinitis
Tr1	Treg-1
TNF-α	Tumor necrosis factor-α

貳、前言

共軛亞麻油酸(Conjugated linoleic acids, CLA)為亞麻油酸(linoleic acid, LA)異構化所形成之一群天然存在具有十八個碳，含共軛雙鍵之亞麻油酸異構物(Wahle. *et al.*, 2004)，主要存在於乳製品和以反芻動物為來源者紅肉中，如牛、羊等。在動物實驗模式中，CLA在抗發炎之研究上早已被廣為研究探討。在發炎反應中扮演的角色為與花生四烯酸產生競爭，在脂肪酸代謝路徑中會轉變成共軛的花生四烯酸減少PGE2的生成(Bassaganya-Riera *et al.*, 2002)。Kanwar等(2007)之研究中顯示，攝取富含CLA的牛奶可有效地藉由減少嗜酸性白血球(eosinophils)及淋巴球(lymphocytes)之增生而改善呼吸道發炎的症狀，但其效果有限且著重於後期發炎反應的調節。由於乳酸菌在許多文獻中指出具有抗過敏的功效，而東海優酪乳除了瓶身所標示之A、B、E菌種外，經鑑別發現另外含有*Lactobacillus reuteri*與*Lactobacillus johnsonii*等菌元，這些乳酸菌在文獻中提到具有免疫調節的功用(Paul *et al.*, 2007; Ryo *et al.*, 2007; Gackowska *et al.*, 2006)，因此本研究想藉由添加CLA於優酪乳內探討兩者之結合是否具有加乘作用及其對氣喘調控機轉。

參、文獻回顧

一、共軛亞麻油酸文獻探討

(一)、共軛亞麻油酸之結構

共軛亞麻油酸為亞麻油酸異構化後，具有十八個碳含共軛雙鍵的脂肪酸(附圖一)(Wahle *et al.*, 2004)。CLA 之兩組雙鍵可為順式(*cis*)或反式(*trans*)，而其位置則可位於第 7、9 碳，第 8、10 碳，第 9、11 碳，第 10、12 碳，第 11、13 碳或第 13、14 碳，而 *cis*-9, *trans*-11 與 *trans*-10, *cis*-12 為主要的兩種結構式(Bessa *et al.*, 2000)。而 CLA 與 LA 之區別在於 LA 的雙鍵位在 *cis*-9, *cis*-10 及 *cis*-12, *cis*-13，即在雙鍵之間有 methylene group，CLA 是天然存在的脂肪酸，其在食物中的分佈並不是很平均，主要存在於反芻動物為主的乳製品和紅肉中，如牛、羊等。因為在反芻動物的瘤胃裡存在著一種丁酸弧菌(*Butyrivibrio fibrisolvens*)，能產生 linoleic isomerase (LA-I)，可以將 LA 轉化為 CLA，其主要的異構物類型為 *cis*-9, *trans*-11 CLA (Fududa *et al.*, 2005; 2006)。

二、共軛亞麻油酸之來源與影響因子

(一)、CLA 的來源

膳食中 CLA 主要來源包括動物性及植物性產品，其中以反芻動物之乳、肉及油脂產品含量最豐富(附表一)(Parodi, 2003; Shingfield *et al.* 2003)，其次為非反芻動物肉品，植物油脂與水產品之 CLA 含量最低，(附表二、附表三)(Khanal and Olson, 2004)。而反芻動物之 CLA 的來源有兩種，一種為瘤胃中 *B. fibrisolvens* 將 LA 氫化成 CLA，另一種則是組織利用不飽和脂肪酸時，將氫化作用的中間產物 *trans*-11 C_{18:1} 去飽和化轉成 CLA (Griinari and Bauman, 1999)。

在反芻動物的產品中主要的兩種同分異構物，其中之一為 *cis-9, trans-11* CLA，占全部 CLA 含量的 80-90%，而另一種為 *trans-10, cis-12* CLA 則占 3-5% (Parodi, 2003)。而 total CLA 含量在反芻類動物的肉品中為(2.7-5.6 mg/g fat)，乳製品為(2.9-7.1 mg/g fat)。在美國，食品用量中提到，CLA 的建議攝取量為 500 mg/d (Ritzenthaler *et al.*, 2001)。

(二)、影響乳肉製品中 CLA 含量之因子

1. 動物品種與年齡

泌乳牛其乳汁中 CLA 含量比較可發現，四個以上泌乳期比二到四個泌乳期之乳汁中 CLA 含量較高，顯示於乳汁中的 CLA 含量會隨年齡增長而增加 (Stanton *et al.*, 1997)。單胃動物相較於反芻動物，消化道中之微生物含量較少，因此消化道內容物通過消化道之速度較反芻動物快，使脂肪酸藉由微生物氫化成 CLA 的機會變小，因此豬肉中 CLA 含量少(0.1-0.2 mg/g fatty acids)。由於單胃動物由飼糧中獲得之 CLA 在吸收前無法進一步地被飽和，可使得在組織中 CLA 的蓄積量提高，因此飼主可藉由給予富含 CLA 的飼糧以生產高 CLA 的豬肉(Dugan *et al.*, 2004)。

2. 產品儲藏時間與加熱條件

CLA 添加於脫脂乳中藉由巴斯德殺菌法和均質化來觀察儲藏條件對 CLA 含量上的變化，經由巴斯德殺菌對於 *cis-9, trans-11* 和佔較微量異構形式的 CLA 具有顯著性的下降，而在冷凍儲藏兩星期內其 *cis-9, trans-11* 的含量比較穩定，但經過三星期的儲藏後 *cis-9, trans-11* 和 *cis-10, trans-12* 則有明顯之下降 (Rodriguez-Alcala and Fontecha, 2007)。此外，巴斯德殺菌在 $63.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 加熱 30 min 和以微波方式 $95.8 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 加熱 5 min 可顯著增加反式脂肪酸(trans fatty acid)

的含量($P < 0.05$) (Herzallah *et al.*, 2005)，根據這些報告顯示，兩週內的儲藏時間對 CLA 影響不大，但加熱的方式與時間可能會造成反式脂肪酸上升。

3. 微生物作用

以 *L. acidophilus* L1、*L. acidophilus* O16、*L. casei* E5 與 *L. casei* E10，分別接種於 MRS broth 與 skim milk，將此四株乳酸菌經過 37°C 培養 24 小時，發現 *L. acidophilus* L1 以 MRS 培養的 CLA 產量 131.6 mg/ml，高於 skim milk 培養之 116.5mg/ml，顯示培養基的成分會影響乳酸菌的生長進而影響了菌醃將 LA 異構化成 CLA 的產量(Alonso *et al.*, 2003)。

B. fibrisolvens 具有高亞麻油酸異構酶(LA-I)及共軛亞麻油酸還原酶(CLA-R)等活性，可將亞麻油酸(LA)氫化成十八碳烯酸(VA)，而可被做為動物的益生菌，研究指出 LA-I 與 CLA-R 對 CLA 產量的累積有顯著性地影響(Fukuda *et al.*, 2005)。此外，生物氫化作用的抑制劑對於 *B. fibrisolvens* A38 分離株在反芻動物瘤胃中的 CLA 產量具累積效果。另一方面具有較小 CLA-R 的活性的分離株 *B. fibrisolvens* MDT-5 在長時間穩定培養的條件下還能造成 CLA 的累積，在老鼠口服 MDT-5 及高 LA 飼糧的動物試驗中，可進一步增加盲腸與結腸消化物及糞便中 CLA 與 VA 含量。根據這些研究指出，在亞麻油酸氫化作用中異構化與還原作用為一連鎖反應，而具有氫化作用的 *B. fibrisolvens* 分離株其還原作用的正向與負向調節可能是判定 CLA 累積多寡的重要條件(Fukuda *et al.*, 2006)。

(三)、共軛亞麻油酸之代謝與免疫調節

1. CLA 對脂肪代謝的調節

許多研究指出，*cis-9, trans-11* 及 *trans-10, cis-12* CLA 在動物體內會造成不同之影響。於飼糧中添加 0.5% CLA 可以顯著地減少小鼠之體脂肪，並增加瘦肉量而影響其體組成(Park *et al.*, 1997)，餵飼大鼠 CLA 能降低白色脂肪中三酸甘油酯的含量(Yamasaki *et al.*, 1999)，於肥育豬的飼糧中添加 CLA，可降低其屠體脂肪(Thiel-Cooper *et al.*, 2001)，及增加豬之腰眼大理石紋分數(lion marbling score) (Dugan *et al.*, 2004)。於體外試驗中發現，*trans-10, cis-12* CLA 能顯著地抑制人類初代培養之前脂肪細胞(human primary preadipocytes) (Brown *et al.*, 2003)。而不同的 CLA 異構物對於前脂肪細胞增生及分化也會有不同之影響，研究顯示 *trans-10, cis-12* CLA 可顯著地降低豬隻前脂肪細胞之增生與分化，而 *cis-9, trans-11* 則其作用有相反的效果(Brandebourg and Hu, 2005)。此外，給予患有代謝症候群的肥胖男子(BMI>32.7)，進行 4 週以上的隨機、雙盲及對照組試驗，結果顯示服用 CLA 者，腹圍可減少 0.6 公分，腰圍可減少 1.4 公分，但是體重並未下降，因此服用 CLA 可減少因代謝症候群而屯積的腹部脂肪(Riserus *et al.*, 2001)。

2. CLA 與癌症

Park 等人(2001)的研究指出 CLA 具有抗癌的功效，他的研究指出持續三十天以 1% CLA 飼糧餵食 Sprague Dawley 大鼠，發現可以減少 1,2-dimethylhydrazine (DMH) 透過細胞凋亡路徑所誘發的結腸腫瘤發生率。而細胞試驗中發現，CLA 可以抑制 HT-29 結腸癌細胞之增殖，藉由向下調節 ErbB3 的訊息傳遞和 PI3-kinase/Akt 的訊息路徑而誘導細胞產生凋亡現象(Cho *et al.*, 2003)。在乳癌相關研究中顯示在細胞培養中 CLA 可抑制 MCF-7 乳癌細胞的生長(Shultz *et al.*,

1992)。飲食給予CLA不但可抑制methyl nitrosurea (MNU) 所誘發之大鼠乳腺癌，亦可減少間接致癌原2,4-dimethyl benzoic acid (DMBA)所誘發之乳癌發生率及腫瘤細胞之數目(Ip *et al.*, 1991, 1994, 1995)。在Ip等人的研究中發現，CLA抑制乳腺腫瘤的機轉並非透過調節解毒酵素影響DMBA活化所造成，而可能是降低抑制細胞凋亡之傳遞蛋白Bcl-2有關(Ip *et al.*, 1999)。對於抑制腫瘤細胞與抗癌作用中，CLA被認為與抗氧化機制(Ha *et al.*, 1990)、抑制核苷酸與蛋白質合成(Shultz *et al.*, 1992)、抑制細胞增殖能力(Ip *et al.*, 1994)與抑制致癌物之活化有關(Liew *et al.*, 1995)。

3. CLA 與發炎反應

發炎反應(Inflammation)為組織受傷或受微生物侵入時，所產生之局部保護的炎症反應，一般具有紅、腫、熱、痛之典型特徵，主要可引起微血管擴張、血流加速、血管通透性增加及白血球遷移(migrate)至發炎部位，進而吞噬病原體及受傷組織。在發炎(Inflammation)的這段期間，有許多局部的化學調節物質會被製造出來。這些物質通常是在他們所生成部位的附近對某些細胞產生專一性的影響，因此，這些物質也被稱為局部荷爾蒙或細胞激素(cytokines)，通常細胞激素的半衰期都很短，也因此他們還來不及影響到身體其他組織前就被分解掉了。在發炎產生的初期階段，具有高度活性的不飽和脂肪酸(eicosanoids)，通常都是帶有20個碳數以上的脂肪酸被產生出來，包含發炎前驅物質如前列腺素(prostaglandin E2, PGE2)以及的白三烯素(leukotrienes B4, LTB4)等。LTB4會吸引白血球細胞到受感染的細胞或組織處，並增加血管的通透性(permeability)。前列腺素的來源主要是由omega-6 脂肪酸(omega-6 fatty acid)及花生四烯酸(arachidonic acid, AA)經由環氧化酶(cyclooxygenase, COX)進行環內過氧化反應(cyclic endoperoxides)催化而得來。近年來的研究指出，過度或持續性的發炎反應與許多疾病的形成有密切關係，例如風濕性關節炎(rheumatoid arthritis, RA)、氣喘 (asthma)、異位性皮膚

炎(atopic dermatitis)、糖尿病(diabetes)、動脈粥狀硬化(atherosclerosis)或癌症等。

CLA在脂肪酸代謝過程中會與花生四烯酸產生競爭，在脂肪酸代謝路徑中會轉變成共軛花生四烯酸(conjugated AA, CAA)，並減少PGE₂的生成(附圖二)(Bassaganya-Riera *et al.*, 2002)。文獻指出，CLA可減少抗原誘發呼吸道過敏天竺鼠之組織胺及前列腺素的分泌(Whigham *et al.*, 2001)。而攝取富含CLA的牛奶與攝食一般牛奶及一般飼糧比起來，可有效地藉由減少嗜酸性白血球及淋巴球之增生而改善呼吸道發炎反應的症狀(Kanwar *et al.*, 2007)。另一文獻亦指出 *cis*-9, *trans*-11 CLA可調節發炎細胞激素(TNF- α 、IL-5與IL-13)的分泌，顯著性的減少嗜酸性白血球活化態表面抗原CD69與CD13的表現，另外，由於 *cis*-9, *trans*-11 CLA亦調節氣管上皮細胞，經由PPAR γ 路徑而調節IL-8的表現(Jaudszus *et al.*, 2005)。由以上文獻推論，CLA可有效地透過調節嗜酸性白血球表面抗原的活化，影響發炎細胞激素的分泌，而改善氣喘之呼吸道發炎症狀。

二、益生菌文獻探討

(一)、益生菌定義

二十世紀初 Elie Metchnikoff 博士提出之長壽說 (Metchnikoff, 1908; 2004)，據他觀察東歐部分地區人們因經常飲用發酵乳，其中乳酸菌定著於腸道能抑制或取代有害菌生長，而使人們延緩老化及長壽，經廣泛研究及宣傳，逐漸注重乳酸菌之益生功能，遂有「Probiotic」(益生菌)一詞產生，Pro-按希臘字意為(for live)意指與生命有關之物質。隨後，許多學者對益生菌的定義有不少說明與闡述，如 Lilly 與 Stillwell (1965)指出：益生菌系指經由攝取適當量有助於宿主健康之微生物稱之。Fuller (1989)將益生菌定義為藉改善腸內宿主腸內菌相平衡，而對宿主有益之活菌補充物。Havenaar 等人(1992)認為：益生菌系指可改善宿主體內內源性微生物菌相平衡，而有益宿主的單一或混合菌株。Guarner 與 Schaafsma, 1998)指出，當投以適量活的微生物，能賦予宿主動物健康。由於之後許多研究者陸續投入此領域，因此益生菌之益生形象建立。廖(1998)對益生菌的組成與應用中認為，益生菌主要所指的即是乳酸菌和部分酵母菌，為人類來源、具有吸附宿主的腸道上皮細胞之特性、耐酸及膽鹽、具有安全性、臨床證實有效（例如抗病原菌、降血脂、提升免疫力等功效）、具加工穩定性(黃, 2002)。目前醫藥保健市場上不管是益生菌 (probiotics) 或者是益生質 (prebiotics)，對於改進人體腸道健康或者是治療腸道之相關疾病上均佔有重要之地位(陳和林, 2004)

(二)、益生菌特性

益生菌必須經科學合理證實其健康功能，且其活菌於宿主動物體內能持續表現其益生特性，因此益生菌必須是一般公認安全 (Generally Recognized As Safe, GRAS) 菌株外，尚須(1)具備基因穩定性，因部分益生菌質體具有抗藥性基

因，必須確認其穩定性，以避免基因水平移轉；(2)對宿主體內嚴苛生理環境如胃酸及膽鹽具耐受性；(3)具有膽汁代謝 (4)能定著宿主動物腸道上皮細胞，並能生長

繁殖及增強免疫能力；(5)可產生抗菌物質；(6)對於致癌及致病菌具拮抗性；(7)人體攝取後具安全性(Tuomola *et al.*, 2001)。但益生菌並不一定能同時具備以上特色，部分學者建議益生菌除需具備改善健康功能任一項外，同時要具備安全性 (Salminen *et al.*, 1998)。

(三)、乳酸菌的生理

乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)為一群發酵過程中能利用碳水化合物產生大量乳酸之細菌總稱。乳酸菌的應用，最早出現於西元前 5000 年，舊約聖經馬太福音第 13 章，第 33 節提到有關乳製品的發酵應用(巴克萊著，方大林、馬明初譯，1991)。而中國史記上也有提及乳酸菌的應用，史記匈奴列傳中：「得漢食物皆去之，以示不如湏酪之便美也。」，「酪」，是用乳汁做成的半凝固食品，將脫脂後的乳汁，在乳酸菌的作用下自然酸化，極酸時，酪蛋白凝結成塊，過濾乾燥後所得稱之為「乾酪」，而「濕酪」相當於優格 (司馬遷著，楊鍾賢、郝志達譯，1995)。Metchnikoff 認為保加利亞當地人長壽的原因與飲用「酸乳」的習慣有關，並經研究證實，飲用酸乳有助延年益壽，長保青春，其關鍵便在於酸乳中所含的乳酸菌(Metchnikoff, 1908)。而目前被研究討論出的乳酸菌定義通常具有下列性狀：(1)革蘭氏陽性菌(無運動性，不產孢)，營養需求複雜(2)通常缺乏過氧化氫酶(觸酶)活性以及細胞色素(3)為厭氧、微好氧、耐氧厭氧性或兼性厭氧菌，一般可於有氧環境下生長，但以無氧狀態下生長較佳，亦有絕對厭氧者。(4)需有碳水化合物、胺基酸、核酸衍生物、維生素以及多種營養成分方可生長(5)對於所代謝之葡萄糖，能產生 50% 乳酸(6)藉由基質磷酸化獲得能量(方等, 1999)。目前常應用於優酪乳發酵商品的乳酸菌菌種以 *L. bulgaricus* 和

Streptococcus thermophilus 二屬居多，其特點為抗低 pH 值、膽酸及附著於腸道之存活力等(Meydani and Ha, 2000)。其它於宿主之腸道發現可常駐型之乳酸菌現也廣泛運用於發酵乳之製造例如：*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. lactis*, *B. longum* 等(Duboc and Mollet, 2001)。

(四)、乳酸菌的生理功能

1. 維持正常腸道菌相

淋巴組織主要分布於腸胃道、呼吸道和泌尿生殖道等處，主要集中在淋巴結與脾臟之間，經由血液循環全身。約有75%免疫組織集中在腸胃道附近，強化腸道中益生菌與病原菌(pathogenic bacteria)維持在平衡的狀態，可以減低過敏疾病的發生。當宿主遭受傷害或精神壓力大時，體內菌相失衡，使得潛伏的病原菌大量增殖，導致下痢、胃腸炎或腦膜炎等病症(Mitsuoka, 1990)。益生菌可抑制腸內病原菌的活性，所代謝產生的有機酸如乳酸及醋酸可降低腸內的pH值，抑制病原菌與腐敗菌(septic bacteria)的生長。同時有機酸能促進腸道蠕動，移除害菌(harmful bacteria)及減少有害物質，如內毒素(endotoxin)與腸毒素(enterotoxin)等與腸道上皮細胞接觸的時間(Doores *et al.*, 1993)。而經臨床試驗證實，於日常生活中補充益生菌能預防腸胃疾病之感染。除了預防功能外，還可將其運用於腸胃疾病的治療。

2. 免疫調節

近年來，在許多乳酸菌的研究文獻中發現，乳酸菌具有促進與免疫調節的作用。乳酸菌屬於革蘭氏陽性菌(Gram-positive bacteria)，其免疫刺激作用被認為和細胞壁的成分有關，例如：peptidoglycan，其 binding site 可被淋巴細胞(lymphocytes)及巨噬細胞(macrophages)所辨識。peptidoglycan 的主要成分 muramyl dipeptide (MAD)，經由 Toll-like receptor 刺激單核球(monocytes)分泌

IL-1、IL-6 及 TNF- α ，並刺激淋巴細胞分泌 IFN- γ 及 IL-4 (Aattouri and Lemonnier, 1997); 某些乳酸菌之細胞壁成分 teichoic acids，會刺激單核球分泌 IL-1、IL-6 及 TNF- α (Meydani and Ha, 2000)。另外，也有研究指出，*L. acidophilus*, *B. longum* 細胞質的成分，也有刺激免疫反應的作用(Hatcher and Lambrecht, 1993)。乳酸菌調節免疫系統的機轉至今仍未非常明確，大多數學者推論：乳酸菌主要為經由腸道，刺激分泌性與系統性免疫反應(secretory and systemic immune response)來促進免疫力，而其中因乳酸菌主為經由腸道黏膜途徑，來刺激免疫反應發生，因此又以分泌性免疫反應為主，臨床與動物實驗均顯示，乳酸菌與優酪乳具有調節免疫反應的作用，包括細胞激素的分泌、調節 Th1 與 Th2 免疫反應的平衡、自然殺手細胞和巨噬細胞的活性與抗體的產生等(Bengmark, 2002)。藉由免疫的調節可預防腸道疾病、過敏性疾​​病與癌症等，也可防止呼吸道、肺部與泌尿道病原菌的感染(Cross, 2002)，因此攝食乳酸菌被認為具有預防疾病的效果。不同的乳酸菌經由不同的機制調節免疫反應，但是其作用機制尚未完全清楚，可能是以恢復正常的免疫平衡為主；對於一些具有刺激腸道黏膜組織，影響黏膜免疫系統並調節免疫機制的乳酸菌，又有"immunobiotics"之稱(Clancy, 2003)。在此，我們將針對乳酸菌對免疫功能的調節做了以下分類：

(1) 吞噬活性(phagocytic activity)

病原菌的清除主要是由具有能補抓(capture)、攝入(engulfment)與破壞微生物(lysis)的細胞來擔任，這些細胞統稱為吞噬細胞(phagocytes)，主要有兩種，其一為組織中的巨噬細胞以及在感染時會由血液循環進入組織的中性白血球。巨噬細胞和中性白血球在它們的細胞表面都有受體，可以結合細菌表面的醣類成分，這種辨認分子是先天性免疫(innate immunity)的特質。而透過巨噬細胞和中性白血球的表面受體與細菌結合，進而引發細胞攝入、殺死及細菌分解。當細菌入侵會使得吞噬細胞產生分泌性蛋白質，稱之為細胞激素，也會促使血管擴張及血管通

透性的增加造成紅、腫、熱、痛與誘發區域性的發炎反應 (黎, 2002)。在動物模式的研究中發現，給予*L. rhamnosus*, *L. acidophilus*與*B. lactis*可顯著提高週邊血液白血球及腹腔巨噬細胞的吞噬能力(Gill *et al.*, 2000)。在人體試驗中發現，給予受試者攝取以*S. thermophilus* 和 *L. johnsonii* La1 發酵的乳製品3 週後，發現可明顯增加週邊血液細胞的吞噬能力，並促進respiratory burst activity (Donnet-Hughes *et al.*,1999)。

(2)淋巴細胞增殖(lymphocyte proliferation)

淋巴細胞與專一性抗原結合後會被活化產生增殖反應，而增殖反應可作為檢測淋巴功能好壞的指標。在文獻研究中發現，給予*L. rhamnosus* GG (ATCC 53103)或*B. lactis* Bb-12可減少利用OVA誘發過敏之特異性淋巴球的增殖(Feleszko *et al.*, 2006)。從人體周邊血分離出來的CD4⁺ cell給予*L. paracasei* subsp. *paracasei* B21060可抑制T淋巴球的增生(Peluso *et al.*, 2007)。

(3)細胞激素的分泌(cytokines production)

細胞激素是體內白血球與細胞間相互傳遞訊息的一種蛋白質，主要具有自泌素(autocrine)與旁泌素(paracrine)的作用，在正常情況下，人體之細胞激素會適量分泌。反之，當宿主遭遇細菌感染時，體內會大量活化巨噬細胞、單核球與其他細胞，分泌前發炎性細胞激素與抗發炎細胞激素，使體內形成回饋機制達到免疫恆定。與氣喘相關之細胞激素包括：Th1 所分泌的細胞激素，主要為IFN- γ 、IL-12 與 IL-2 等，主要清除細胞內的致病原(intracellular pathogen)；Th2 產生的細胞激素為 IL-4、IL-13、IL-5 等，這些細胞激素都有利於清除一些細胞外的致病原 (extracellular pathogen)。Th1/Th2 的免疫反應在體內所呈現的是一個蹺蹺板的動態平衡，依據個體所處的環境，與其所造成的免疫反應，若

Th1/Th2 呈現出一個不平衡的狀態則會對人體造成傷害，當 Th1 表現過量則會出現自體免疫疾病 (autoimmune disease)，其中包括了紅斑性狼瘡 (systemic lupus erythematosus, SLE)，而 Th2 過高的免疫反應，則易造成過敏性疾病 (atopic disease)，像是氣喘。在乳酸菌的研究中發現，OVA 致敏化的氣喘小鼠餵食 *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103) 可有效降低 Th2 所主導的 IL-4 與 IL-5 分泌 (Feleszko *et al.*, 2006)。患有季節性過敏性鼻炎 (seasonal allergic rhinitis, SAR) 患者給予 *L. casei* 的處理，有顯著性地減少過敏原所誘導的細胞激素 IL-5 與 IL-6 及提升 IFN- γ 的產量 (Ivory *et al.*, 2008)。從健康人體中分離週邊血液淋巴球 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 給予單一菌醃與混合菌醃刺激細胞激素的分泌會有不同的結果，單獨給予 *L. acidophilus* 與混合菌醃組 (*L. acidophilus* La-5R, *L. delbrueckii* sub. *bulgaricus* LbY-27, and *B. bifidum* BB-12R) 比較可顯著性地提高 IFN- γ 的分泌量，單獨給予 *L. acidophilus* 或混合 *L. acidophilus* La-5R 與 *L. delbrueckii* sub. *bulgaricus* LbY-27 跟三種混合菌元組比起可顯著地刺激 IL-12 的分泌 (Gackowska *et al.*, 2006)。

三、氣喘文獻探討

(一)、氣喘定義

美國國家心臟、肺臟、血液學院(National Heart, Lung, and Blood Institute, NHLBI)於一九九七年頒訂氣喘診療指引(Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma, NAEPP)，定義氣喘為一種慢性呼吸道發炎性疾病，許多細胞或細胞分泌介質浸潤其間，其中以肥大細胞(mast cell)、嗜酸性白血球、T淋巴球、巨噬細胞、嗜中性白血球(neutrophils)與上皮細胞(epithelial cell)等為主；細胞分泌介質包括細胞激素、化學趨化素(chemokines)、其他分泌蛋白與黏液等。這種發炎性反應引發呼吸道的黏液分泌與氣道的不平滑而造成喘鳴聲，呼吸困難，胸悶及咳嗽等症狀，特別好發於夜間或清晨，且合併有不同程度之呼吸道氣流阻塞，喘息症狀可自發性緩解或經治療而改善，而此發炎反應亦可增加呼吸道對不同刺激之過度反應(hyperresponsiveness) (NHLBI, 1997)。

(二)、氣喘病理學

因氣喘而過世的患者在解剖中會發現肺部充氣過度，大小氣道都充滿由黏液、血清蛋白，發炎細胞和細胞碎片等混合而成的栓塞。而在顯微鏡下可觀察到氣道管腔四周有嗜酸性白血球及單核球等的浸潤，伴隨著血管舒張、微血管性滲出及上皮破壞。局部的變化包括平滑肌肥厚、心血管生成、表皮杯狀細胞(goblet cell)的數目增加、表皮下間質膠原的沉積以及氣道壁變形(施惠珠，2000)。

(三)、氣喘流行病學

氣喘是過敏疾病的一種，產生過敏疾病的兩大要素為遺傳體質及接觸到外在環境中的過敏原(allergen)，目前過敏疾病的發生率在全世界都是逐年上升，台灣也不例外。以台北市學童氣喘病發生率為例：1974年為 1.30%，1985年為

5.08%，1991年為 5.80%，1994年則增為 10.79% (謝貴雄，1995)。由於工業化進步與飲食習慣的改變，促使孩童罹患氣喘的症狀快速增加。台灣花費在氣喘病的藥費，每年以百分之十五的速度快速攀升，加上健檢費用，及改善氣喘病童居住環境的開銷，每年耗費至少五十億元以上。近年來，氣喘病童不論是住院率或嚴重程度都在增加，長庚兒童醫院對氣喘兒童的調查報告顯示出住院率有上升的趨勢，從1992 的2.6%增加到1996 年3.58%，且每年發作十次以上的嚴重性氣喘病童也由8%增加到20% (Huang, 1999)。

(四)、氣喘危險因子

由於呼吸道長期發炎引起上層黏膜腫脹、呼吸道變窄，造成呼吸困難，且氣喘病人呼吸道會變成異常敏感，對許多過敏物質都會有強烈反應，出現的症狀有咳嗽、胸悶，重度的症狀如嚴重水腫，而所造成的過敏物質可分為食物、植物、黴菌、動物四種，食物中有蛋白、牛奶、魚類、螃蟹、蝦子、洋蔥、芒果、花生；植物中有狗牙根、豬草、相思樹、日本松、黃花香草；黴菌中有煙色麴菌、交錯黴菌、青黴菌、芽枝黴菌、白色念珠菌；動物中有狗毛、貓毛、塵蟎、蟑螂等。這些物質會使得呼吸道分泌大量黏液，肌肉收縮使呼吸道變窄空氣不易通過，此時會有哮鳴聲、咳嗽不停及呼吸困難的症狀(施, 2000)。

(五)、氣喘的致病機轉

目前對於氣喘的治病機轉仍有許多研究正在進行中，在以往的觀念中，總認為過敏性氣喘的致病機轉是：當過敏原或刺激物進入已致敏的氣喘病患體內後，過敏原特異性IgE會與肥大細胞或嗜鹼性白血球上的IgE 接受器結合，使肥大細胞或嗜鹼性白血球釋放組織胺及過敏性物質，引起呼吸道平滑肌的收縮，造成氣喘的發作。但是經近年來各國學者之研究，已了解過敏性氣喘的產生除上述機轉外可能包括個體基因因子(genetic factor)和外環境刺激的相互作用，或者是Th1

細胞性免疫和Th2體液性免疫的不平衡(Kay, 1991)。當個體接觸到過敏原，可藉由下列機制步驟來引發氣喘；(1).首先，抗原呈現細胞如巨噬細胞、單核球或樹突細胞與過敏原作用，藉由第二型主要組織相容複合物(MHC class II molecule)來把抗原呈現給T細胞(Bousquet *et al.*, 1992; Cockcroft and Davis, 1993)。(2).其次，被活化的CD4⁺ Th2型細胞產生IL-4，造成B細胞抗體基因之重鏈固定區域(heavy chain constant region)經由型別轉換(class switch)而大量合成IgE (Robinson *et al.*, 1993)。(3). 在已受抗原刺激活化之B淋巴球之CD40和特異性抗原T淋巴球之CD40 ligand結合，可使B淋巴球分泌合成特異性IgE。(4).當組織再接觸到相同的抗原時，就會產生大量的IgE，結合到肥大細胞(mast cell)、嗜鹼性白血球、嗜酸性白血球、巨噬細胞和血小板。IgE會引起先前合成之顆粒和新合成的介質之釋放，因而發生後續發炎反應，此時這些介質會增加，造成支氣管收縮、黏液增加，造起氣喘的惡化(Del Prete, 1992; Holgate, 1993)。(5).而非IgE 依賴型但是T淋巴球依賴型，一旦生物體已被致敏化，再度暴露於相同的抗原後，可引起Th2 淋巴球的活化。活化的Th2淋巴球會釋放細胞激素(IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13)，促使白血球的活化與聚集，尤其是嗜酸性白血球，藉此可直接引起一連串的發炎反應，最後造成氣喘病人急性發作的病理過程(Kay, 1991)。

(六)、影響氣喘之過敏性介質

1. 免疫球蛋白E (immunoglobulin E, IgE)

免疫球蛋白E (IgE)為一種抗體同素異型體，它含有ε重鏈，藉著結合至肥大細胞表面的ε重鏈特異性Fcε接受器(FcεR)而將肥大細胞致敏，發生急發性過敏反應。IgE，在血清蛋白中含量極微，大多存在於結膜、鼻腔及氣管的黏膜表面細胞上。患有過敏性疾病的人，其血清中的總IgE的量會增加。當黏膜最初接觸到過敏原後，會產生前述一系列的反應而導致IgE的產生。IgE 的反應是局部的，

IgE的產生首先藉由抗體呈獻細胞(antigen-presenting cells, APCs)將過敏原呈獻給B細胞，B細胞與Th2細胞交互作用後，促使B細胞產生IgE。當產生大量的IgE，結合到肥大細胞、嗜鹼性球、嗜酸性球、巨噬細胞和血小板上的IgE 受器。這些細胞與IgE 結合後會產生去顆粒作用而釋放一些介質(mediators)，進而發生一連串的發炎反應(Del Prete, 1992; Holgate, 1993)。

2. 細胞激素(Cytokines)

(1) IL-4

Interleukin-4 (IL-4, 介白素4)是一種基因多效性的細胞激素，會促使T淋巴球轉變成antigen-specific CD4+淋巴球(即Th2淋巴球)(Fernandez-Botran *et al.*, 1986)

(2) IL-5

Interleukin-5 (IL-5, 介白素5)由Th2細胞與肥大細胞所分泌，可調節嗜酸性白血球生長與分化，促進氣喘患者於肺部的浸潤與誘導發炎。(Dubucquoi *et al.*, 1994)

(3) IL-6

Interleukin-6 (IL-6, 介白素6)為促發炎細胞激素(pro-inflammatory cytokines)，由巨噬細胞及支氣管上皮細胞所分泌，可促使B細胞的分化及破骨細胞之形成(Smolén and Maini, 2006)。

(4) IL-10

Interleukin-10 (IL-10, 介白素10)一開始定義為細胞激素合成抑制因子(cytokine synthesis inhibitory factor) (Fiorentino *et al.*, 1991)，其可由T細胞、肥大

細胞、巨噬細胞和樹突細胞所分泌，早期定義IL-10 是屬於Th2 的細胞激素，但目前發現IL-10可以抑制Th2 增生和Th2 所產生的細胞激素(Moore *et al.*, 2001)。由T調節型細胞1 (T regulatory cell 1, Tr1)細胞所分泌之IL-10 具有免疫抑制的能力，可抑制Th1與Th2細胞所分泌的細胞激素(Eyad, 2006)。

(5) IL-12

Interleukin-12 (IL-12, 介白素 12)由樹突細胞與巨噬細胞所分泌，與 naïve T 細胞分化成 Th1 與 Th2 細胞有關，可刺激 T 細胞分泌 IFN- γ (Kaliński P. *et al.*, 1997)。

(6) IL-17

Interleukin-17 (IL-17, 介白素17)一般指IL-17A，常與許多的發炎疾病相關，例如類風濕性關節炎、氣喘、狼瘡、異體移植等。目前有許多體外實驗的研究認為IL-17具有前發炎反應(proinflammatory)的功能，有研究發現IL-17可以調節組織細胞的chemokine表現，且在肺中大量表現IL-17會導致呼吸道的發炎現象(Kolls and Linden, 2004)。

(7) IFN- γ

Interferon-gamma (IFN- γ , gamma型干擾素)由Th1細胞、樹突細胞、自然殺手細胞(natural killer cell, NK細胞)所分泌，可抑制Th2細胞激素之表現(Durham and Till, 1998)。

(8) TNF- α

Tumor necrosis factor (TNF- α , 腫瘤壞死因子)是一種前發炎細胞激素，參與發炎免疫反應(Rink and Kirchner, 1996; Hakonarson *et al.*, 1996; Kiozumi *et al.*, 1995)文獻中指出TNF- α 與早期的支氣管縮小與平滑肌收所及晚期發炎細胞的聚

集與活化有很大關係。由此可知TNF- α 為呼吸道過度反應的調節者之一。

(七)、影響過敏性氣喘的白血球

肥大細胞與嗜鹼性白血球會表現高親和力的 IgE 接受器 (Fc ϵ RI)，當 B 細胞再次遇到過敏原，B 細胞會產生專一性的過敏原抗體 IgE 進而與肥大細胞結合後，促使肥大細胞活化，釋出發炎物質，如組織胺、trypase、蛋白質分解酵素 (chymase or proteolytic enzymes)、碳廿酸 (eicosanoids)、白三烯素 (leukotrienes)和自由基 (free radicals) (Busse and Lemanske, 2001)，進而引發急性過敏症狀 (acute asthmatic symptoms)，如呼吸道平滑肌的收縮，黏液的分泌和血管通透性增加，進而造成支氣管內腔縮小，這些反應所需的時間僅需一小時左右，因此這些急性發炎現象可以稱為早期反應 (early phase reaction)。

大量的發炎細胞，如淋巴球、嗜酸性白血球、嗜中性白血球、單核球和巨噬細胞會因受到白三烯素的吸引會陸續浸潤到組織間隙，造成細胞釋放大量的過氧化物及蛋白酵素造成上皮的嚴重傷害，其中淋巴球大多是 CD4⁺ Th2 型的細胞，而這些細胞都會釋放大量 Th2 型的細胞激素(IL-3、IL-4、IL-5、IL-13) (Barnes, 2001)，促使了嗜酸性白血球、肥大細胞、嗜中性白血球和 B 細胞的活化，進而更加強過敏現象的反應，其中嗜酸性白血球會受到 Th2 型的細胞大量分泌 IL-5 活化，活化的嗜酸性白血球會釋放出許多不同的的毒性蛋白質，包括嗜酸性白血球陽離子蛋白 (eosinophil cationic protein)、嗜酸性白血球神經毒素 (eosinophil-derived neurotoxin)與嗜酸性白血球過氧化酶 (eosinophil peroxidase)等。這些蛋白質不僅會

直接傷害呼吸道的上皮細胞使細胞剝落，還會促使發炎介質 (mediators) 直接刺激呼吸道中的感覺神經，造成平滑肌的收縮。另外，嗜酸性白血球活化的過程中會釋放出許多發炎介質，如白三烯素和血小板活化因子 (platelet activating factor, PAF) 等，這些介質會使呼吸道平滑肌收縮、黏液分泌增加及微血管滲漏 (leakage)，最後導致呼吸道痙攣及發炎反應的持續進行。細胞浸潤現象需要 24-48 小時，因此這些現象可以稱為晚期反應 (late phase reaction) (Kips, 2000)。

肆、材料與方法

一、實驗材料

(一)、藥品試劑

1. Con A (Concanavalin A, C-2631), LPS (Lipopolysaccharide, L-9143 ; L-8274), Bovine Serum Albumin (BSA , A-5503), OVA (Chicken egg albumin, Grade V) 、Aluminum hydroxide Gell (A-8222), Gelatin, Resazurin, NaCl (S-6191), MgSO₄ · 7H₂O (M-5921), FeSO₄ · 7H₂O (F-863), MnSO₄ · 5H₂O, Toluidine Blue O (T-3260), Cycloheximide以上購自Sigma藥廠 (友和公司代理)。
2. RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute, ALM51319A), DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium, ANE18791A), FBS (Fetal bovin serum, 092k83011), L-glutamine以上購自HyClone (岑祥公司代理)。
3. Bovine Serum Albumin (BSA, 10857)以上購自USB (季勗公司代理)。
4. Gentamicine (15710-064)以上購自GIBICO (量子公司代理)。
5. IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ cytokine ELISA kit 以上購自eBioscience (鉅生公司代理)。
6. Mouse IgE , IgG1, IgG2a ELISA kit以上購自Bethyl (賀浚公司代理)。
7. Ethyl ether (9112302)以上購自聯工化學公司。
8. Saline solution (4AK1677)以上購自信東公司。
9. Brain heart infusion agar (6194909)購自Betcton Dickinson (啟新公司代理)。
10. Lactobacilli MRS agar (8039069)以上購自Difco (啟新公司代理)。
11. Cycloheximid, Coliformen-Agar (1.10426.0500)以上購自Merck (台灣默克

公司)。

12. DNA Primer購自源資公司

LA1f(5' AGT CAC GGC TAA CTA CGT GCC AGC AGC 3')

LA1r(5' TAA CAA GGG TTG CGC TCG TTG CGG GAC 3')

LA2f(5' ACA GGA TTA GAT ACC CTG GTA GTC CAT GCC 3')

LA2r(5' ATG GTG TGA CGG GCG GTG TGT ACA AGG 3')

13. Klen Tag 10× reaction buffer, Klen Tag, dNTP, DNA Ladder (Bio-100p)以上購置波士特公司。

14. 東海大學液態原味優酪乳購自東海大學乳品小棧。

15. Conjugated linoleic acid, 80%購自麗豐公司。

(二)、設備、器材

1. IVC system (Individually ventilated cage system)購自 BioLASCO (樂斯科公司)。

2. 小鼠呼吸道阻抗儀 BUXCO MAX II (三典公司代理)。

3. 1 ml、5 ml 針筒、小鼠餵食管購自 Top (捷陞公司代理)。

4. 手術器械、200 目鋼篩購自捷陞公司。

5. 24、96 孔洞培養盤孔洞培養盤 6、10 cm 培養皿購自 TPP (騰達行代理)

6. 1.5 ml eppendorf 購自 Axygen (PROTECH 代理)。

7. Polypropylene round-bottom tube with cap 12 × 75 mm, FACScan Flow cytometry 購自 Becton Dickinson (騰達行代理)。

8. 桌上型離心機 HERMLE、HSIANGTAI (保富公司代理)。

9. 落地式離心機 KUBOTA 6200 (東興儀器公司代理)。

10. ELISA reader (Enzyme-linked immunosorbent assay) 購自 Thermo Labsystem (岑祥公司代理)。

11. ELISA washer 購自 BioTek (岑祥公司代理)。
12. 顯微鏡傳輸器 Nikon DS-U2 (國祥公司代理)。
13. 顯微鏡 Nikon E-200、TS-100 (國祥公司代理)。
14. RT-CyclerTM436 購自岑祥公司。
15. PCR TE ThermoCycler 購自季勗公司。
16. 電泳膠影像照相儲存分析系統購自 VILBER LOURMAT (弘屹公司代理)。
17. 減壓濃縮機 BUCHI 購自 (上泰公司代理)。
18. 氣管插管 PE 50 tube 購自 Becton Dickinson (捷陞公司代理)。

二、實驗方法

(一)、動物飼養與試驗分組

實驗動物選用 6-8 週齡，無特定病原雌性 BALB/c 小白鼠 (購自國家實驗動物中心，台北)，將實驗鼠分成六組：Naïve 組(不經過任何處理之組別)，Control 組 (過敏原誘導及餵食管口服給予滅菌蒸餾水 10 ml/kg/day)、及試驗組：包括 Yoghurt 組，過敏原誘導及餵食管口服給予 10 ml/kg/day 之 yoghurt；YCL 組，yoghurt 添加低劑量 CLA，CLA 的餵食劑量為 30 mg/kg/day；YCH 組，yoghurt 添加低劑量 CLA，CLA 的餵食劑量為 180mg /kg/day；另以 prednisolone 10 mg/kg/day 做為呼吸道過度反應治療正對照組；每組皆為 8 隻，且皆在 IVC system 環境下以無菌飼養籠飼養，飲水與飼料均滅菌後任飼，光照循環為 12 小時亮、12 小時暗。

(二)、富含共軛亞麻油酸之優酪乳的製備

CLA 優酪乳採每星期新鮮現配 50 ml，優酪乳的來源來自東海大學生產之

優酪乳，依照不同組別之濃度給予不同 CLA 之含量後置於冰上，藉由均質器 (POLYTRON-PT2100) 給予充分混合(轉速 30, 10 分鐘)，達到無油滴懸浮於優酪乳表層。

(三)、試驗動物之致敏模式

1. 腹腔注射致敏：

以 OVA 與佐劑氫氧化鋁混合給予小鼠腹腔注射。所製備的免疫量為：0.5 mg OVA · 2 mg AHG /kg mice，每隻小鼠之免疫量為：0.1 ml/10 g of mouse。

2. 鼻腔滴注誘導呼吸道過度反應：

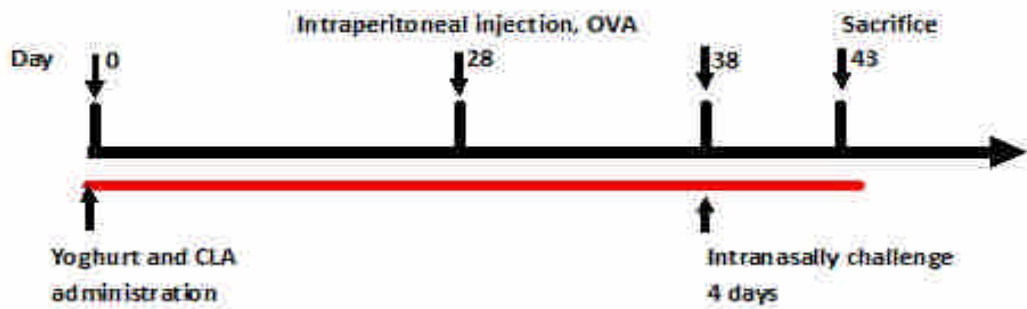
(1) 配製濃度 2 mg/ml 之 OVA 溶於 saline 中

(2) 於鼻腔內滴注 75 μ l 之 OVA 溶液

(3) 滴注完立刻使用尖嘴鑷子張開小鼠嘴巴五秒鐘，使 OVA 溶液流入 呼吸道

3. 呼吸道過度反應的測定：

每隻小鼠在最後一次鼻腔致敏的當天進行肺功能測定，分為 1 hr、6 hr 與 24 hr 使用無拘束式全體呼吸量測系統(unrestrained whole body plethysmography) MAX II 1320 Modular Unit (Buxco, Troy, NY, USA)，測量經由 OVA 致敏後的小鼠其呼吸道阻力的參數(Penh)值。全體呼吸量測系統是將受測小鼠關進到一個密閉的壓克力罐子內，當小鼠呼吸時，罐內裡的壓力會因此產生些微改變，經由對最高吸氣壓力與最高呼氣壓力之間的比較，相對於時間的變化而量測出呼吸道阻力(enhanced pause)。Penh 值公式為 $(Te-Tr)/Tr \times (PEP/PIP)$ ，Te 代表吐氣時間，Tr 代表吸氣肌肉鬆弛時間，PEP 代表最高吐氣壓力，PIP 代表最高吸氣壓力。



(四)、實驗動物之樣本採集與分析

1. 血清(serum)

小鼠以乙醚麻醉，在失去痛覺反射之後，以剪刀剪開腋下皮膚及血管，收集血液樣本，待血液凝固後，以 $10,000 \times g$ 離心 10 分鐘，吸取上清液後，於 -80°C 冰箱儲存。用 ELISA 測血中白蛋白特異性抗體的含量。

2. 支氣管肺泡沖洗液 (Bronchoalveolar lavage fluid, BALF)

小鼠經收集血清樣本後，然後將小鼠腹部朝上固定在解剖板上，用 95% 酒精消毒全身皮毛，將下顎至胸腔的皮膚剪開，把唾液腺及頸部肌肉層拉開暴露氣管，剪開氣管上的薄膜，之後在氣管上綁上縫線，在氣管靠近喉頭處切開一開口，插入套管(PE 50 tube)，深入約 0.5-1.0 公分 (末端接上 25G 的針頭)，綁緊縫線將套管固定在氣管上。將裝有 1 ml HBSS (Hank's balanced salt solution) 的針筒插上針頭，慢慢將 HBSS 打進肺部至整個肺部完全膨脹，再回抽，如此反覆三次後，將沖洗液保存於冰上，共收集 3 ml 沖洗液。將收集的沖洗液，以 $300 \times g$ ， 4°C ，離心 10 分鐘，收集上清液共 2.5 ml 於 -20°C 冰箱保存。以 ELISA 測 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-17、IFN- γ ，TNF- α 及特異性抗體的含量。

3. 測量血清中與肺沖液中之 OVA 特異性抗體含量

利用被覆溶液 (0.05 M sodium carbonate, pH 9.6) 將 OVA 過敏原稀釋至 2

µg/ml，被覆在 96 孔 ELISA 培養盤上，培養在 4°C 隔夜。隔日以清洗溶液 (50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0) 清洗三次，之後以阻斷溶液 (50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 1% BSA, pH 8.0) 阻斷 30 分鐘，再以清洗溶液清洗三次，加入樣本，於室溫培養一小時，再以清洗溶液清洗五次。再分別以抗小鼠 IgE-HRP、IgG1-HRP、IgG2a-HRP 室溫下作用一小時，倒掉後再以清洗溶液洗五次。最後以 TMB 呈色，以 2 M 硫酸終止反應，測量波長 450 nm 的吸光值。

4. 測定 BALF 與細胞培養上清液中細胞激素含量

利用補捉 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-17、IFN- γ 、TNF- α 抗體 (capture antibodies) 以被覆溶液稀釋後，被覆在 ELISA 培養盤上，4°C 隔夜。隔日以清洗溶液 PBST (0.05% Tween 20 in Dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS) 清洗 3 次，之後再以稀釋溶液培養一小時，再加入樣本及 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-17、IFN- γ 、TNF- α 標準液，培養二小時。清洗溶液洗五次，加入偵測 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-17、IFN- γ 、TNF- α 的抗體 (detection antibodies)，在室溫下作用一小時，倒掉後再以清洗溶液洗五次去除。再以 avidin-HRP 室溫下反應 30 分鐘，之後再以清洗溶液洗七次去除未反應溶液。最後以 TMB 呈色，以 2 M 硫酸終止反應。吸光值以 450 nm 判讀，並以檢量線迴歸換算出樣本中的 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-17、IFN- γ 、TNF- α 濃度。

5. 細胞表面分子分析細胞分化

收集脾臟細胞、頸部淋巴結細胞、腸繫膜淋巴結與肺泡沖洗液中單離細胞，分別取 50 µl 的定量細胞懸浮液，其中含有 5×10^5 個細胞數，與螢光抗體均勻混合，並放置冰上避光反應 30 分鐘，30 分鐘以後再用 3 ml 清洗液 (0.05% NaN₃ in DPBS) 清洗未鍵結抗體，再於 4°C 以 300 ×g 離心 10 分鐘，倒掉上清液打散細胞後，再加入 250 µl analysis buffer (0.05% NaN₃, 2% FBS in HBSS)，重新懸浮細胞，以流式

細胞儀分析。

6. 肺組織病理切片分析

將肺沖完成之肺部組織完整拆下後取其最大葉浸泡於10%中性福馬林中一個月，將其分組編號後，將組織以石蠟包埋並進行H&E染色(Hsieh *et al.*, 2010)。玻片樣本以顯微鏡 Nikon E-200、TS-100進行拍照存檔，並以病理評分表(附表六)(Jeffrey *et al.*, 1991) 做分析統計。

7. 甲苯胺藍染色法(Toluidine Blue stain)

組織切片之樣本經脫蠟後浸泡於toluidine blue染劑 (1% toluidine blue, 1% aluminium potassium sulfate)染色30秒，以清水沖洗染劑後，再置於蒸餾水中浸泡30秒，浸泡後取出，等玻片樣本完全乾燥之後進行封片保存，以顯微鏡 Nikon E-200、TS-100進行拍照存檔，並以(附表六) (Jeffrey *et al.*, 1991)之病理評分表做分析統計。

(五)、優酪乳之菌種分析

將新鮮買回的優酪乳序列稀釋培養後，依菌落大小、顏色挑出單一菌落，且不斷繼代培養挑出單一菌落並經由格蘭氏染色法確定其培養瓶中之菌體在型態上為同一種菌後，將其繼代培養 24 hr 抽 DNA 並委託源資公司代為定序，定序資料與 NCBI 之資料庫比對確認其菌種資料。

1. 乳酸菌 DNA 抽取方法

將菌培養至 5 ml 養菌瓶隔夜後，使其處於生長對數期階段。取培養好之菌液 1.5 ml 於微量離心管(ependorf)內，於 4°C 以 12,000 ×g 離心 2 min，倒掉上

清液，將沉澱菌團塊用手指輕彈底部拍散，加入 565 μ l TE buffer (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)充分混合懸浮，加入 30 μ l SDS (10%)與 3 μ l proteinase K (20 mg/ml)，使其最終濃度為 100 μ g/ml proteinase K 與 0.5% SDS，混合均勻後於 37°C 培養 1 hr，之後再添加 100 μ l NaCl (5 M)混合與 80 μ l CTAB (Hexadecyl trimethyl-ammonium bromide)/NaCl 混合培養於 65°C，經培養 10 分鐘後，再添加 750 μ l chloroform/isoamyl alcohol (24:1)，混合均勻後以 10,000 \times g 離心 5 min，將上清液移到新試管，再加入 500 μ l phenol/chloroform/isoamyl (25:24:1)混合以變性蛋白質，之後以 12,000 \times g 離心 5 min，吸上清液 450 μ l 至新試管加 270 μ l isopropanol，會有絲狀 DNA 析出，經 20,000 \times g 離心 15 min 後去上清液後，再以 450 μ l EtOH (70%)清洗 DNA，經 12,000 \times g 離心 5 min，待酒精揮發加入 100 μ l TE buffer 回溶，並以分光光度計(OD 260/280 nm)定量 DNA。

2. 乳酸菌染色體 DNA 以 PCR 擴增鑑別片段分析

將抽好的 DNA 樣品 1 μ l 加入 Klen Tag reaction buffer (1.0 μ M primer LA1f, 1.0 μ M primer LA1r, 0.2 mM dNTP, 2.5 U Klen Tag DNA polymerase)與之混合，放入 PCR machine (RT-CyclerTM 436)設定條件為第一循環為：94°C, 5 min; 57°C, 1.5 min; 72°C, 3 min；PCR 循環為：94°C, 1 min; 60°C, 1 min; 72°C, 1.5 min 共 25 循環，最後以 72°C, 10 min 終結所有聚合反應，於 4°C 保存。PCR 增值完的 DNA 片段經確認序列長度後委託源資公司代為定序，由於所使用的引子分為兩組，中間重疊區域得以整併為長片段，整合好的序列片段利用 BLAST 對 NCBI GenBank 資料庫進行比對。

(六)、腸內菌相之檢測

小鼠於食道餵管不同處理之飲食三周後採取新鮮糞便一顆將其放入厭氧稀釋液定量，經稀釋塗盤培養後，以每克糞便中其 *Lactobacillus* spp.、

Bifidobacterium spp.、*E.coli* 之 CFU (colony forming unit) 為單位評估腸道菌數，*Lactobacillus* spp.、*Bifidobacterium* spp. 於 37°C 厭氧環境下培養 48 hr，*E. coli* 於 37°C 有氧環境下培養 48 hr 並計算其菌落數。

1. 厭氧稀釋液

厭氧稀釋液為秤取 0.2 g Gelatin 加入 50 ml Salts solution (0.05% NaCl, 4% MgSO₄·7H₂O, 0.2% FeSO₄·7H₂O, 0.16% MnSO₄·5H₂O) 再加入 0.4 ml Resazurin solution (0.025% in H₂O) 將各成分充分混合，經煮沸冷卻後加入 0.05 g cysteine，高壓滅菌 (autoclave) 後以厭氧操作分裝入 eppendorf，如實驗過程中液體成粉紅色則無法繼續使用。

2. *Lactobacillus* spp. 培養基 (MRS agar)

秤取 Lactobacilli MRS Agar 28 g 加入孔雀石綠 0.016 mg，以去離子水定量到 400 ml 高壓滅菌，待溫度降至 45°C 時加入抗生素 cycloheximide 3.2 mg 於無菌操作台倒入 10 cm 培養皿 (Petri dish) 分盤。

3. *Bifidobacterium* spp. 培養基 (BIM-25)

秤取 37 g Brain heart infusion、5 g Yeast extract、0.5 g cysteine-HCl、15 g Agar 以去離子水定量到 400 ml，煮沸後降至 50°C 以下，於無菌操作台倒入培養皿分盤。

4. *E.coli* 培養基

秤取 10.6 g Coliform Agar 以去離子水定量到 400 ml，煮沸後降至 50°C 以下，於無菌操作台到入培養皿分盤。

伍、統計分析

一、單因子變異數分析 (one-way analysis of variance, One-Way ANOVA)

試驗數據除病理切片評分外均以 One-Way ANOVA 方法分析，並進行鄧肯氏多變域檢定(Duncan's multiple-range test)進行事後檢定($P < 0.05$)，(Duncan, 1955)。

二、無母數分析 (Non-parametric statistics)

病理切片之評分數據以無母數分析評估其統計差異，並以 Mann-Whitney U-test 進行檢定，處理組與對照組相比以 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ 標示差異顯著性，對照組與 naïve 組相比以 $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$, $^{\#\#\#}P < 0.001$ 標示差異顯著性。

陸、結果

一、腸道菌相的變化

(一)、優酪乳之菌醃鑑定

東海優酪乳之混合菌醃經 DNA 序列比對結果含有(1). *Lactobacillus reuteri* strain IMAU70067 (2). *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842 (3). *Lactobacillus acidophilus* (4). *Enterococcus faecium* LB4 (5). *Lactobacillus johnsonii* NCC2767，結果如附錄所示。

(二)、小鼠於餵食不同處理一個月後之腸道菌相變化

經過不同處理之餵食一個月後，測量其腸道益生菌包括 *Lactobacillus* spp., 與 *Bifidobacterium* spp., 另測定大腸桿菌 (*E. coli*)。結果如 Table 1 顯示，Yoghurt 與 YCL 組經一個月餵食與對照組相比具顯著性的提升 *Lactobacillus* spp ($P<0.05$)，顯示投與 Yoghurt 會顯著性的增加腸道益生菌。在降低腸道之 *E. coli* 方面，Yoghurt、YCL、YCH 組與對照組相比皆有顯著性地下降($P<0.05$)，顯示由於增加益生菌或使得益生菌成為腸道優勢菌叢，相對使 *E. coli* 的生長受到局限。

二、呼吸道過度反應之免疫調節

(一)、小鼠之體重、脾臟與肺臟重量的變化

如 Figure 1 中顯示在六週不同處理之餵食中其體重上無顯著性差異。在氣喘動物模式小鼠犧牲當天取其脾臟與肺沖過後之肺臟秤重，如 Table 2 顯示經

OVA 誘發氣喘後對照組 (Control) 與正常組 (Naive) 相比具有顯著性的增加脾臟、肺臟重量($P<0.05$)，顯示造型成功，試驗動物對抗原有免疫反應，其它試驗組(Yoghurt, YCL, YCH 與 Pred.組)與 Control 組相比則有顯著性的下降($P<0.01$)，顯示試驗組對過敏反應有免疫調節之作用，較不易產生過敏體質，或抑制過敏免疫反應。

(二)、呼吸道過度反應中脾臟淋巴細胞次族群的變化

全身性免疫細胞分化次族群分析可經由脾淋巴細胞的分化次族群來評估，如 Figure 2. 3. 4 所示，在脾臟細胞中各細胞族群中的表現，在已活化 T 調節細胞(Treg, $CD4^+$, $CD25^+$)，YCL、YCH 組與 Control 組相比有顯著性的降低($P<0.05$)，顯示 CLA 優酪乳可有效降低 Treg 細胞，有降低免疫抑制作用之能力。在活化中 T 輔助細胞($CD4^+$, $CD69^+$)、NKT 淋巴細胞(PanNK $^+$, $CD3^+$)、T 輔助型細胞($CD4^+$, $CD3^+$)、B 細胞($CD19^+$, $CD45^+$)、T 細胞($CD3^+$, $CD45^+$)，在 Control 組與試驗組之間無統計上之差異。T 毒殺細胞($CD8^+$, $CD3^+$)的分化中，Yoghurt、YCL、YCH 組與 Control 組相比顯著性地降低($P<0.05$)。

Treg-1 細胞(Tim-3 $^+$, $CD25^+$) Control 組與空白組及處理組無統計上之差異。Treg-1 細胞(Tim-3 $^+$, $CD25^+$)，正對照組與對照組相比有顯著性地提升($P<0.05$)，Th2 細胞($CD278^+$, $CD4^+$)，Yoghurt、YCL、YCH 組與 Control 組相比有顯著性下降($P<0.05$)。Treg-2 細胞($CD278^+$, $CD25^+$)，Control 組與 YCL、YCH、YCM ($P<0.05$)、相比有顯著性降低。

(三)、呼吸道過度反應中肺部沖洗液淋巴細胞次族群的變化

在肺沖液細胞中各細胞族群中的表現，顯示對 OVA 肺部過敏反應的結果，如 Figure 5. 6. 7 所示，在已活化 T 調節細胞(Treg, $CD4^+$, $CD25^+$)，Control 組與 Yoghurt 組和 YCL 相比有顯著性的下降($P<0.05$)。在活化中 T 輔助細胞($CD4^+$,

CD69⁺), Control 組與空白組及處理組無統計上之差異。T 輔助型細胞(CD4⁺, CD3⁺), Control 組與空白組相比有顯著性的下降($P<0.05$)。T 毒殺細胞(CD8⁺, CD3⁺) Control 組與空白組相比有顯著性的下降($P<0.05$)。T 細胞(CD3⁺, CD45⁺), Control 組與空白組相比有顯著性的下降($P<0.05$)。B 細胞(CD19⁺, CD45⁺), Control 組與空白組相比有顯著性的下降($P<0.05$)與 YCH 組($P<0.05$)。Th1 細胞(Tim-3⁺, CD4⁺), Control 組與 YCL 組相比有顯著性地上升($P<0.05$)。Th2 細胞(CD278⁺, CD4⁺), Control 組與空白組 Naïve、Yoghurt、YCL 組和 YCH 組相比($P<0.05$) 有顯著性地下降。

(四)、呼吸道過度反應中呼吸道周邊淋巴細胞次族群的變化

在頸部呼吸道周邊淋巴細胞(ALN)所顯示的局部型免疫反應,如 Figure 8. 9. 10 所示。在已活化 T 調節細胞(Treg, CD4⁺, CD25⁺), Yoghurt、YCH 組與 Control 組相比有顯著性的提升($P<0.05$), YCL 組與 Control 組相比有顯著性的提升($P<0.05$)。在活化中 T 輔助細胞(CD4⁺, CD69⁺)、T 輔助型細胞(CD4⁺, CD3⁺)、T 毒殺細胞(CD8⁺, CD3⁺)、T 細胞(CD3, CD45⁺)、B 細胞(CD19⁺, CD45⁺), Control 組與空白組及處理組無統計上之差異。在已活化 Th1 細胞(Tim-3⁺, CD4⁺), Yoghurt、YCH 組與 Control 組相比有顯著性的提升($P<0.05$)。在已活化 Th2 細胞(CD278⁺, CD4⁺), Yoghurt、YCL、YCH($P<0.05$)組與 Control 組相比有顯著性的下降。

(五)、呼吸道過度反應中腸繫膜淋巴細胞次族群的變化

在腸繫膜淋巴細胞中各細胞族群中的表現,顯示經由口服途徑所影響的腸道免疫反應,其結果如 Figure 10. 11. 12 所示,在已活化 T 輔助細胞(CD4⁺, CD25⁺), Yoghurt、YCH 組與 Control 組相比有顯著性的提升($P<0.05$), YCL 組與 Control 組相比有顯著性的提升($P<0.05$)。在活化中 T 輔助細胞(CD4⁺, CD69⁺)、

T 輔助型細胞(CD4⁺, CD3⁺)、T 毒殺細胞(CD8⁺, CD3⁺)、T 細胞(CD3⁺/CD45⁺)、B 細胞(CD19⁺, CD45⁺)，Control 組與空白組及處理組無統計上之差異。在已活化 Th2 細胞(CD278⁺, CD4⁺)，Control 組與 Naïve 組相比顯著性地提升($P<0.05$)，Yoghurt、YCM ($P<0.01$)、YCL、YCH ($P<0.05$)組與 Control 組相比有顯著性的下降。在活化中 Th1 細胞(Tim-3, CD4⁺)，Yoghurt、YCL、YCH 組與 Control 組相比有顯著性的提升($P<0.05$)。

(六)、呼吸道過度反應中肺部沖洗液細胞激素的變化

如 Table 3 顯示測量肺部沖洗液(BALF)中代表 Th1 (mainly producing IFN- γ) 之分泌量發現，Control 組與 Naïve 組相比其表現量顯著地上升($P<0.05$)，Yoghurt 組與 Control 組相比表現量顯著地上升($P<0.05$)。代表 Th2 (secreting IL-4, IL-5) Control 組與 Naïve 組相比顯著性地提高 IL-4 與 IL-5 的分泌量($P<0.05$)，Yoghurt、YCH ($P<0.05$)與 Control 組相比具有顯著性地下降 IL-4 分泌量。Yoghurt、YCL、YCH($P<0.05$)與 Control 組相比具有顯著性地下降 IL-5 分泌量。如 Table 4 代表發炎性細胞激素(TNF- α 、IL-6)顯示，Control 組與 Naïve 組相比其 IL-6 表現量顯著地上升($P<0.05$)，Yoghurt、YCL、YCH ($P<0.01$)與 Control 組相比具有顯著性地減少 IL-6 分泌量。如 Table 5 代表 T 調節型細胞激素(IL-17、IL-10)顯示，Control 組與 Naïve 組相比其 IL-17 表現量顯著地上升($P<0.05$)，Yoghurt、YCL、YCH ($P<0.05$)與 Control 組相比具有顯著性地減少 IL-17 分泌量。Yoghurt、YCL 組與 Control 組相比具有顯著性地提升 IL-10 ($P<0.05$) 的分泌量。

(七)、呼吸道過度反應中對血清與肺部沖洗液抗體的變化

小鼠於犧牲當天採其全血之血清與肺部沖洗液測量其特異性 OVA 抗體(anti-OVA) IgE、IgG1、IgG2a，如 Table 6 顯示血清中 anti-OVA-IgE 與

anti-OVA-IgG1 Control 組與 Naïve 組相比其表現量顯著地上升($P<0.05$)，其他處理組與 Control 組相比其 anti-OVA-IgE 表現量顯著性地下降($P<0.05$)，在 anti-OVA-IgG1 方面 Yoghurt、YCL 與 YCH($P<0.05$) 組與 Control 組相比顯著性地下降。anti-OVA-IgG2a，YCL 組與 Control 組相比顯著性地提升其表現量($P<0.05$)。如 Table 7 顯示肺部沖洗液中 anti-OVA-IgE Control 組與 naïve 組相比其表現量顯著地上升($P<0.05$)，Yoghurt 組與 Control 組相比顯著性地下降($P<0.05$)。anti-OVA-IgG1 Control 組與 Naïve 組相比其表現量顯著地上升($P<0.05$)。

(八)、呼吸道過度反應的變化

小鼠於連續四天 OVA 鼻腔滴定後測量其呼吸道過度反應以 enhanced pause (Penh)表示，0 hr、6 hr、24 hr。如圖 Figure14 顯示 0 hr Control 組與 Naïve 組相比呼吸道過度反應顯著性地上升($P<0.001$)，Yoghurt、YCL、YCH 與 Control 組相比顯著性地減少降低($P<0.001$)。6 hr Control 組與 Naïve 組相比呼吸道過度反應顯著性地上升($P<0.001$)，Yoghurt、YCL、YCH 組與 Control 組相比顯著性地減少降低($P<0.001$)。24 hr Control 組與 Naïve 組相比呼吸道過度反應顯著性地上升($P<0.001$)，Control 組與其它處理組相比無顯著性差異。

(九)、肺組織病理切片的變化

H&E 染色切片結果經由(Jeffrey *et al.*, 1991)之病理評分表做分析統計如 Figure 15與Table 8顯示，在肺泡壁發炎反應(Alveolar wall inflammation)中Control 組與Naïve組相比肺泡壁之發炎情形顯著性地增加($P<0.001$)。靜脈周邊區域中(Perivenous regions)中Control組與Naïve組相比靜脈周邊之發炎細胞浸潤顯著性地增加($P<0.001$)，Yoghurt、YCL、YCH ($P<0.001$)組與Control組相比顯著性地減少。動脈周邊與支氣管周邊區域(Periarterial & Peribronchial regions)中Control組

與Naïve組相比肺支氣管之發炎細胞浸潤顯著性地增加($P<0.001$)；YCH ($P<0.01$) 與Control組相比顯著性地減少。在總評分(total score) 方面Control組與Naïve組相比靜脈周邊之發炎細胞浸潤顯著性地增加($P<0.001$)；Yoghurt、YCL、YCH ($P<0.001$)與Control組相比顯著性地減少。

Toluidine blue 染色結果如Figure 16顯示，當肺組織產生脫顆粒現象會有紫紅色顆粒的產生，Control組與Naïve組相比有明顯增加，Yoghurt、YCL、YCH組與Control組相比明顯地減少。

柒、討論

共軛亞麻油酸在花生四烯酸脂質代謝上扮演著重要角色，可調節氣喘造成之之呼吸道過度反應。Kanwar *et al.*, (2007)的研究顯示富含共軛亞麻油酸之牛乳可降低小鼠之呼吸道過敏反應，但其作用機制不明，而文獻所陳述之數據偏向後期發炎之調節。而東海優酪乳經過菌醃鑑別發現含有(A菌-*L. acidophilus*，B菌-*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*，E菌-*Enterococcus faecium*，*L. reuteri*與*Lactobacillus johnsonii*)，Neumann (2009)的研究中指出*L. delbrueckii* UFV-H2b20可刺激Th1型細胞激素(IL-12 and IFN- γ)之分泌，Ryo *et al.*, (2007)指出，過敏性皮膚炎的小鼠模式下給予*L. johnsonii* NCC533 可降低發炎前驅物 (IL-8, IL-12, IL-23)。Paul *et al.*, (2007)指出，口服給予OVA致敏之小鼠活菌*L. reuteri*無法經由提升Th1細胞激素(IL-12 and IFN- γ)及抗發炎細胞激素IL-10，但可降低肺部沖洗液之發炎性細胞激素(MCP-1, TNF, IL-5 and IL-13)進而舒緩呼吸道過度反應(AHR)。因此本研究將利用共軛亞麻油酸(含有80%的*cis*-9, *trans*-11)添加於東海優酪乳以評估富含共軛亞麻油酸之優酪乳對於小鼠氣喘路徑上調節的影響，探討CLA與優酪乳的結合是否具有加乘的作用達到全面性地舒緩呼吸道之過度反應。

小鼠經口服餵食一個月後，我們分析給予OVA致敏前其腸道菌相是否會因為給予優酪乳而達到益菌的提升，結果如Table 1 顯示，Yoghurt與YCL組($P<0.05$)經一個月餵食與對照組相比具顯著性的提升*Lactobacillus* spp.與*Bifidobacterium* spp.之菌相，在降低腸道之壞菌*E. coli* 方面，Yoghurt、YCL、YCH 組與對照組相比皆有顯著性地下降($P<0.05$)。我們發現給予優酪乳確實可以具有改善腸道菌相提升益菌的功用，而隨著CLA劑量的提升似乎其效果有減少的情形，我們研判可能是因為當劑量上升時，所需均質混合的時間也提長，導致活菌可能在均質的過程中被破壞。

在本次研究中如圖Figure14顯示Yoghurt、YCL、YCH與Control組相比Penh

顯著性地減少($P<0.001$)，因此論證了餵食富含CLA之優酪乳可顯著地下降呼吸道過度反應。針對此結果我們將分三階段探討：(1)氣喘前期之T細胞分化；(2)中期IgE的產生、Th2細胞所釋放之細胞激素；(3)後期對於呼吸道過度反應之調節及病理切片結果。

一、 呼吸道過度反應前期之T細胞分化的調節作用

氣喘的發生是屬於一種過敏性的免疫反應，當免疫系統第一次接觸到過敏原時，抗原呈獻細胞(antigen presenting cell, APC)會捕獲此過敏原片段並轉送至附近淋巴結再呈獻給naïve-T細胞(Th0)。Secrist (1993)的研究指出，過敏性體質其Th0細胞會偏向發展為過敏原特異性之Th2細胞，進而抑制了Th1細胞的分化。Th1免疫反應是指抗原特異性之T細胞在抗原刺激下主要分泌IFN- γ ，會浸潤於富含IFN- γ 之細胞激素，這些免疫調節之環境可促使抗原特異性之B細胞分化為分泌IgG2a抗體之漿細胞；而Th2反應則是在抗原刺激之下，Th2細胞分泌的細胞激素以IL-4、IL-5為主，或浸潤在IL-4、IL-5之細胞激素之環境中，可促使B細胞分化為分泌IgE抗體之漿細胞。由脾臟細胞的分析可顯示出對全身性免疫反應的變化，於實驗結果Figure 2顯示，於餵食Yoghurt、YCL與YCH ($P<0.05$)後，其CD4⁺，CD25⁺之Treg (T調節性細胞)可顯著性地下降，代表我們所給予的處理不會造成像類固醇一樣的造成全身性免疫抑制，而prednisolone組所代表的免疫抑制顯示Treg (包括CD4⁺，CD25⁺，與PanNK⁺，CD3⁺之NKT)顯著性升高($P<0.05$)。而Figure 8中顯示，肺部沖洗液(BALF)顯示肺局部的免疫反應，於Yoghurt組與YCL組 ($P<0.01$)的處理下其CD4⁺，CD25⁺之Treg顯著性地上升，如同prednisolone一般，顯示在肺局部之免疫顯示出將過敏之免疫過度反應予以降低；呼吸道周邊淋巴結(ALN)也代表肺周邊局部的免疫反應，於餵食Yoghurt，YCH ($P<0.05$)與YCL組 ($P<0.05$)的處理下BALF結果相同皆是CD4⁺，CD25⁺之Treg顯著性地上升，這邊的結果顯示出，口服餵食Yoghurt富含CLA之Yoghurt可調節過敏原刺激周邊的淋

巴系統，以提高Treg來達到抑制過敏原刺激的免疫反應；於Figure 11顯示，腸繫膜淋巴結(MLN)代表腸道免疫反應，於餵食Yoghurt、YCH($P<0.05$)與YCL組($P<0.05$)的處理下 $CD4^+$ 、 $CD25^+$ 之Treg顯著性地上升，代表我們給予的處理可透過增加T調節細胞來抑制T細胞的活化，達到抑制發炎的效果，尤其是以YCL組的效過最好，且於Table 5的結果顯示，優酪乳組與低劑量CLA的優酪乳組可提升IL-10的表現，Eyad (2006)文獻中指出，這種Tr1 (Treg-1)調節細胞所分泌的IL-10具有抑制Th1與Th2細胞的分化，顯示優酪乳可以藉由提升T調節細胞及促使其分泌IL-10，來影響T細胞分化。此外Figure 4, 7, 10的結果顯示，在脾臟細胞與BALF中可以發現餵食YCL這組具有顯著性地促進naïve-Th細胞分化趨向Th1 ($Tim-3^+$ 、 $CD4^+$)細胞($P<0.05$)。在抑制Th2型T細胞的表現上如Figure 4, 7, 10, 13顯示，無論餵食優酪乳或添加不同劑量之CLA的優酪乳皆顯著性地調降Th2細胞($CD278^+$ 、 $CD4^+$)的分化。此外，於Figure 4顯示，YCL、YCH組在脾臟細胞中可顯著性地調降 $CD278^+$ 、 $CD25^+$ 細胞的分化；Figure 13也顯示，在腸繫膜淋巴結中可顯著地提升 $Tim-3^+$ 、 $CD25^+$ 細胞的分化，在過去文獻中尚未明確指出 $Tim-3^+$ 、 $CD25^+$ 與 $CD278^+$ 、 $CD25^+$ 所代表的意義，但我們認為 $Tim-3^+$ 、 $CD25^+$ 可能是代表Th2免疫抑制型，藉由分泌IFN- γ 來抑制Th2；而 $CD278^+$ 、 $CD25^+$ 細胞可能是代表Th1免疫抑制型，藉由分泌IL-4來抑制Th1，這結果或許可做為日後研究上的深入探討。由以上結果顯示我們可以發現CLA優酪乳當在外來抗原進入藉由APC細胞呈獻給naïve-Th細胞時，首先可促進T調節細胞生長來抑制T細胞的表現或透過影響T細胞分化成第一型T輔助細胞或第二型T輔助細胞達到影響中期Th2細胞所分泌之發炎性細胞激素或者是促使B細胞產生IgE抗體。

二、 呼吸道過度反應中期IgE的產生與Th2細胞之免疫調節

在naïve-Th細胞分化成Th2細胞後，會促使B細胞分泌抗體IgE，所生成的抗原特异性IgE會與肥大細胞上之IgE接受體(Fc ϵ RI)結合，形成第一次的過敏反應其

半衰期可由原本的2-3天延長為數週之久。當病人再次接受過敏原時，過敏原會與在肥大細胞和嗜鹼性白血球上之IgE結合，促使肥大細胞活化，進行去顆粒化(degranulation)，釋出細胞中含有之發炎介質(Busse, et al.,2001)。大量的發炎細胞，如淋巴球、嗜酸性白血球、嗜中性白血球、單核球和巨噬細胞會造成細胞釋放大量的過氧化物及蛋白酵素造成上皮的嚴重傷害，其中淋巴球大多是Th2型的細胞，而這些細胞都會釋放大量Th2型的細胞激素，包括IL-3、IL-4、IL-5及IL-13等(Barnes, 2001)，促進了嗜酸性白血球和B細胞的活化，進而更加強過敏現象的反應，其中嗜酸性白血球會受到IL-5活化，活化的嗜酸性白血球會釋放出許多不同的毒性蛋白質，包括嗜酸性白血球陽離子蛋白 (eosinophil cationic protein)、嗜酸性白血球神經毒素 (eosinophil-derived neurotoxin)與嗜酸性白血球過氧化酶 (eosinophil peroxidase)等。這些蛋白質不僅會直接傷害呼吸道的上皮細胞使細胞剝落，還會促使發炎介質 (mediators)直接刺激呼吸道平滑肌中的感覺神經，造成平滑肌的收縮。於 Table 3顯示，餵食Yoghurt可上升IFN- γ 的分泌量，而添加CLA的優酪乳跟單純優酪乳組相比更能顯著地降低IL-4與IL-5的分泌，影響T細胞分化成Th2細胞，可進一步降低B細胞與嗜酸性白血球的活化。IL-17為早期發炎反應的前驅物且會影響IL-6的表現，IL-6為前發炎細胞激素(pro-inflammatory cytokines)的一員，由巨噬細胞及支氣管上皮細胞所分泌，可促使B細胞的分化及破骨細胞之形成(Smolén *et al.*, 2006)。在Table 5指出，無論是優酪乳組或添加CLA的優酪乳組均能顯著地降低IL-17的分泌量，而Table 4的數據也論證IL-6的確與IL-17有關，當IL-17分泌量降低也會影響IL-6的表現且隨著CLA的濃度增加抑制IL-6的表現更顯著。在調節IgE抗體的生成上，如Table 6顯示，無論是餵食Yoghurt或不同劑量之CLA優酪乳均可顯著地下降血清中OVA特異性IgE抗體及Th2型OVA特異性抗體IgG1的分泌($P<0.05$)，此外在肺泡沖洗液當中我們可以發現Yoghurt組對於下降OVA特異型抗體IgE的效果最好。從以上結果顯示我們可以發現優酪乳可以提升Th1型細胞激素IFN- γ 與降低IL-17來調節促發炎細胞激素IL-6，而共軛亞麻油酸可增強調節Th2型細胞激素的分泌，達到良好的抗發炎效

果。

三、 呼吸道過度反應後期之免疫調節

當過敏原與在肥大細胞上之IgE結合，促使肥大細胞活化，進行脫顆粒現象 (degranulation)，釋出細胞中含有之發炎介質像是PGE₂及leukotriene，會造上支氣管痙攣及呼吸道的過度反應。另一方面，被IL-5活化的嗜酸性白血球會分泌發炎介質刺激呼吸道平滑肌中的感覺神經，造成平滑肌的收縮。因此，從Table 5 的IL-5的變化與 Figure 15, 16 中H&E與toluidine blue染色的結果可發現，Yoghurt 與富含CLA的優酪乳組其組織病理評分方面(Table 8)，可顯著減少白血球的浸潤、支氣管的破損及肥大細胞的脫顆粒現象，而YCH組在減少血管周邊及支氣管週邊的浸潤情形更為顯著($P<0.001$)，這些結果在由Figure 14 的呼吸道過度反應中可發現，在0與6 hr時無論是優酪乳組與富含CLA的優酪乳都能顯著地降低Penh值，此外於24 hr 時 YCH組與其它組相比更能顯著地減緩。這些結果顯示共軛亞麻油酸的確對於後期發炎的調節扮演著重要的腳色，且更能紓緩呼吸道的過度反應。

捌、結論

Kanwar (2007)在文獻中指出富含共軛亞麻油酸之牛乳可降低小鼠之呼吸道過敏反應，Paul (2007)指出口服給予 OVA 致敏之小鼠活菌 *L. reuteri* 無法經由提升 Th1 細胞激素(IL-12 and IFN- γ)及抗發炎細胞激素 IL-10，但可降低肺部沖洗液之發炎性細胞激素(MCP-1, TNF, IL-5 and IL-13)進而舒緩呼吸道過度反應(AHR)，在氣喘上調節的效果都有限，在本實驗中顯示優酪乳可藉由提升 T 調節細胞及促使其分泌 IL-10，來影響氣喘早期 T 細胞分化。此外口服投與 CLA 優酪乳的小鼠在外來抗原藉由 APC 細胞呈獻給 Naïve T 細胞時，首先可增加 Treg (CD25⁺, CD4⁺)細胞分化，來抑制 T 細胞的表現或透過影響 T 細胞分化成第一型 T 輔助細胞或第二型 T 輔助細胞達到影響中期 Th2 細胞所分泌之發炎性細胞激素與抑制 B 細胞分化而產生 IgE 抗體。針對中期可以發現優酪乳可以提升 Th1 型細胞激素 IFN- γ 及 OVA 特異性抗體 IgG2a，並降低 IL-17 來調節促發炎細胞激素 IL-6，而共軛亞麻油酸扮演的腳色可能與增強調節 Th2 型細胞激素的分泌。在後期發現富含共軛亞麻油酸的優酪乳在病理切片方面可顯著地減少白血球的浸潤、減少支氣管的破損及肥大細胞的脫顆粒現象，最後降低呼吸道的過度反應，經由實驗論證，可以得知共軛亞麻油酸與東海優酪乳的結合可以達到互補作用，從早期的細胞分化到中期的影響發炎性細胞激素分泌與 IgE 抗體的生成及後期的降低呼吸道過度反應，都顯示了富含共軛亞麻油酸的優酪乳可作為一個預防過敏性氣喘的保健食品。

玖、參考文獻

- 司馬遷著，楊鍾賢、郝志達譯，1995。史記卷一百一十 匈奴列傳，史記，第五冊，建宏出版社，v.5 p.146。
- 方繼、李根永、李清福、林建谷、林順富、范晉嘉、陳惠英、虞積凱、蔡國珍，1999。現代食品微生物學。偉民圖書有限公司。第七章：pp.150-165。
- 謝貴雄，1995。小兒氣喘病的預防和處理。中華民國小兒科醫學會雜誌，36:9-20。
- 施惠珠，2000。腫瘤壞死因子、介白質-4 受器及 IgE 抗體受器之基因多型性與台灣氣喘病童和過敏性疾病患者之關係。碩士論文。中山醫學院毒理學研究所。
- 陳慶源、林富美，2004。益生菌之保健功效。食品工業。36:1-3。
- 黃莉芳，2002。具抑制幽門桿菌之乳酸菌的篩選及應用。國立中興大學食品科學系碩士論文。
- 黎煥耀，2002。免疫系統。偉民圖書有限公司。第一章:p.16。
- 廖啟成，1998。乳酸菌之分類及應用。食品工業。30:1-9。
- 巴克萊(Barclay W.)著，方大林、馬明初譯，1991，馬太福音注釋 下冊，馬太福音第十三章第三十三節，基督教文藝出版社，pp 87-93。
- Aattouri N., and D. Lemonnier. 1997. Production of interferon induced by *Streptococcus thermophilus*: role of CD4+ and CD8+ lymphocytes. Nutr. Biochem. 8:25-31.
- Alonso, L., E. P. Cuesta, and S. E. Gilliland. 2003. Production of free conjugated linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human

intestinal origin. J. Dairy Sci. 86:1941-1946.

Arunachalam K., H. S. Gill, and R. K. Chandra. 2000. Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* (HN019). Eur. J. Clin. Nutr. 54:263-267.

Asthma pathway , <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>

Banni S, E. Angioni, V. Casu, M. P. Melis, G. Carta, F. P. Corongiu, H. Thompson and C. Ip. 1999. Decrease in linoleic acid metabolites as a potential mechanism in cancer risk reduction by conjugated linoleic acid. Carcinogenesis. 20:1019-1024.

Barnes, P. J. 2001. Th2 cytokines and asthma: an introduction. Respir Res. 2:64-65.

Bassaganya-Riera, J., R. Hontecillas, and D. C. Beitz. 2002. Colonic anti-inflammatory mechanisms of conjugated linoleic acid. Clin. Nutr. 21:451-459.

Belury MA and A. Kempa-Steczko. 1997. Conjugated linoleic acid modulates hepatic lipid composition in mice. Lipids. 32:199-204.

Bengmark, S., 2002. Gut microbial ecology in critical illness: is there a role for prebiotics, probiotics, and synbiotics. Curr. Opin. Crit. Care. 8:145-151.

Bessa, R. J. B., J. Santos-Silva, J. M. R. Ribeiro, and A. V. Portugal. 2000. Reticulo-rumen biohydrogenation and the enrichment of ruminant edible products with linoleic acid conjugated isomers. Livest Prod. Sci. 63:201-211.

Bousquet J., P. Chanez, J. Y. Lacoste, R. White, P. Vic, P. Godard, and F. B. Michel. 1992. Asthma: a disease remodeling the airways. Allergy. 37:3-11.

Bousquet J, P. K. Jeffery, W. W. Busse, M. Johnson, and A.M. Vignola. 2000.

- Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161:1720-1745.
- Brandebourg, T. D., and C. Y. Hu. 2005. Isomer-specific regulation of differentiating pig preadipocytes by conjugated linoleic acids. *J. Anim. Sci.* 83:2096-2015.
- Brown, J. M., M.S. Boysen, S. S. Jensen, R. F. Morrison, J. Strokson, R. L. Currie, M. Pariza, S. Mandrup, and M. K. McIntosh. 2003. Isomer-specific regulation of metabolism and PPAR γ signaling by CLA in human preadipocytes. *J. Lipid. Res.* 44:1287-1300.
- Busse, W.W. and R.F. Lemanske, Jr. 2001. Asthma. *N. Engl. J. Med.* 344:350-62.
- Cho, H. J., W.K. Kim, E. J. Kim, K. C. Jung, S. Park, H. S. Lee, A. L. Tyner, and J. H. Park. 2003 Conjugated linoleic acid inhibits cell proliferation and ErbB3 signaling in HT-29 human colon cell line. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 284:G996-1005.
- Cockcroft D. W. and B. E. Davis. 1993. Mechanisms of airway hyperresponsiveness, in Weiss EB, Stein M (eds), *Bronchial Asthma. Mechanism and Therapeutics*, 3rd ed. Boston, Little, Brown.
- Cross, M. L., L. M. Stevenson, and H. S. Gill. 2001. Anti-allergy properties of fermented foods: An important immunoregulatory mechanism of lactic acid bacteria? *Int. Immunopharmacol.* 1:891-901.
- Cross, M.L., 2002. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 34: 245-253.
- Del Prete, G. 1992. Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology

- of atopy. *Allergy*. 47: 450-455.
- Donnet-Hughes, A., F. Rochat., P. Serrant, J. M. Aeschlimann, and E. J. Schiffrin. 1999. Modulation of nonspecific mechanisms of defense by lactic acid bacteria: effective dose. *J. Dairy Sci.* 82:863-869.
- Duboc, P., and B Mollet. 2001. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *Int. Dairy J.* 11:759-768.
- Dubucquoi, S., P. Desreumaux, A. Janin, O. Klein, M. Goldman, J. Tavernier, and M. Capron. 1994. Interleukin 5 synthesis by eosinophils: association with granules and immunoglobulin-dependent secretion. *J. Exp. Med.* 179:703-708.
- Duncan D.B. 1955. Multiple range and multiple F test. *Biometrics* 11:1-42
- Dugan, M. E., J. L. Axlhus, and J. K. Kramer. 2004. Conjugated linoleic acid pork research. *Am. J. Clin. Nutr.* 79:1212S-1216S.
- Durham, S. R., and S. J. Till. 1998. Immunologic changes associated with allergen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 102:157-164.
- Eyad, E. 2006. Role of Regulatory T Cells in Allergy: Implications for Therapeutic Strategy. *Inflamm. .Allergy Drug Targets.* 5:211-217.
- Feleszko, W., J. Jaworska, R. D. Rha, S. Steinhausen, A. Avagyan, A. Jaudszus, B. Ahrens, D. A. Groneberg, U. Wahn, and E. Hamelmann. 2006. Probiotic-induced suppression of allergic sensitization and airway inflammation is associated with an increase of T regulatory-dependent mechanisms in a murine model of asthma. *Clin. Exp. Allergy.* 37:498-505.
- Fernandez-Botran, R., V. M. Sanders, K. G. Oliver, Y. W. Chen, P. H. Krammer, J. W. Uhr, and E. S. Viteeta. 1986. Interleukin-4 mediates autocrine growth of helper

- T cells after antigenic stimulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:9689-9693.
- Fiorentino, D. F., A. Zlotnik, T. R. Mosmann, M. Howard, and A. O'Garra. 1991. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. J. Immunol. 147:3815-3822.
- Fukuda, S., H. Furuya, Y. Suzuki, N. Asanuma, and T. Hino. 2005. A new strain of *Butyrivibrio fibrisolvens* that has high ability to isomerize linoleic acid to conjugated linoleic acid. J. Gen. Appl. Microbiol. 51:105-113.
- Fukuda, S., Y. Suzuki, M. Murai, N. Asanuma, and T. Hino. 2006. Isolation of a novel strain of *Butyrivibrio fibrisolvens* that isomerizes linoleic acid to conjugated linoleic acid without hydrogenation, and its utilization as a probiotic for animals. J. Gen. Appl. Microbiol. 100:787-794.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. 66:365-378.
- Gackowska, L., J. Michalkiewicz, M. Krotkiewski, A. Helmin-Basa, I. Kubiszewska, and D. Dzierzanowska. 2006. Combined effect of different lactic acid bacteria strains on the mode of cytokines pattern expression in human peripheral blood mononuclear cells. J. Physiol. Pharmacol. 57:13-21.
- Gill, H. S., K. J. Rutherford, J.G. Prasad. 2000. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacteriumlactis* (HN019). Br. J. Nutr. 83:167-176.
- Griinari, J. M., and D. E. Bauman. 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In M.P. Yurawecz, M.M. Mossoba, J.K.G. Kramer, M.W. Pariza, and G.J. Nelson (ed) Advances in Conjugated Linoleic Acid Research. Vol. I., pp:180-200. AOCS Press,

Champaign, IL.

Guarner, F., and G. J. Schaafsma. 1998. Probiotics. *Int J Food Microbiol.* 17:237-238.

Ha, Y. L., J. Storkson, and M. W. Pariza. 1990. Inhibition of benzo (a) pyrene induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res.* 50:1097-1101.

Hakonarson, H., D. J. Herrick, P. G. Serrano, and M. M Grunstein. 1996. Mechanism of cytokine-induced modulation of beta-adrenoceptor responsiveness in airway smooth muscle. *J. Clin. Invest.* 97:2593-2600.

Hatcher, G. E. and Lambrecht, R. S. 1993. Augmentation of macrophage phagocytic activity by cell-free extracts of selected lactic acid-producing bacteria. *J. Dairy Sci.* 76:2485-2492.

Havennar, R. and J. H. J. Husis. 1992. *The lactic acid bacteria.* B.J.B. Wood. Elsevier press, London pp. 151–170.

Hatcher, G. E. and R. S. Lambrecht. 1993. Augmentation of macrophagephagocytic activity by cell-free extracts of selected lactic acid-producing bacteria. *J. Dairy Sci.* 76:2485-2492.

Herzallah, S. M., M. A. Humeid, and K. M. Al-Ismael. 2005. Effect of heating and processing methods of milk and dairy products on conjugated linoleic acid and *trans* fatty acid isomer content. *J. Dairy Sci.* 88:1301-1310.

Holgate N. U. 1993. Mediator and cytokine mechanisms in asthma. *Horax* 48:103-109.

Huang, J. L. 1999. Asthma health education in Taiwan: past, present and future. *Chung-Gung Medicine Report.* 20:18-19.

- Inoue R, M. Otsuka, A. Nishio, and K. Ushida. 2007. Primary administration of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 in weaning period suppresses the elevation of proinflammatory cytokines and CD86 gene expressions in skin lesions in NC/Nga mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 50:67-76.
- Ip, C., S. Banni, E. Angioni, G. Carta, J. McGinley, H. J. Thompson, D. Barbano, and D. Bauman. 1999. Alterations in rat mammary gland leading to a reduction in cancer risk by conjugated linoleic acid (CLA)-enriched butter fat. *J. Nutr.* 129:2135-2142.
- Ip, C., D. J. Lisk, and J. A. Scimeca. 1994. Potential of food modification in cancer prevention. *Cancer Res.* 54:1957s-1959s.
- Ip, C., J. A. Scimeca, and H. J. Thompson. 1995. Effect of timing and duration of dietary conjugated linoleic acid on mammary cancer prevention. *Nutr. Cancer.* 24:241-247.
- Ip, C., S. F. Chin, J. A. Scimeca, and M. W. Pariza. 1991. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res.* 51:6118-6124.
- Ivory, K., S. J. Chambers, C. Pin, E. Prieto, J. L. Arqués and C. Nicoletti. 2008. Oral delivery of *Lactobacillus casei* Shirota modifies allergen-induced immune responses in allergic rhinitis. *Clin. Exp. Allergy.* 38:1282-1289.
- Jaudszus, A., M. Foerster, C. Kroegel, I. Wolf, and G. Jahreis. 2005. Cis-9, trans-11-CLA exerts anti-inflammatory effects in human bronchial epithelial cells and eosinophils: comparison to trans-10, cis-12-CLA and to linoleic acid. *Biochim. Biophys. Acta.* 1737:111-118.
- Jeffrey L. Curties, Byrd K. Patricia, Wamock L. Martha and H. Berfer Kaltreider.

1991. Requirement of CD4-positive T Cells for Cellular Recruitment to the Lungs of Mice in Response to a Particulate Intratracheal Antigen. *J. Clin. Invest.* 88:1244-1254.
- Kanwar, R. K., A. K. MacGibbonw, P. N. Black, J. R. Kanwar, A. Rowanw, M. Vale, and G. W. Krissansen. 2007. Bovine milk fat enriched in conjugated linoleic and vaccenic acids attenuates allergic airway disease in mice. *Clin. Exp. Allergy.* 38:208-218.
- Kaliński P., C. M. Hilkens, A. Snijders, F. G. Snijdewint, and M. L. Kapsenberg. 1997. IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *J. Immunol.* 159:28-35.
- Kay, A. B. 1991. Asthma and inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 87:893-910.
- Khanal, R. C., and K. C. Olson. 2004. Factors affecting conjugated linoleic acid (CLA) content in milk, meat, and egg: A review. *Pak. J. Nutr.* 3:82-98.
- Kiozumi, A., S. Hashimoto, T. Kobayashi, K. Imai, A. Yachi, T. Hori. 1995. Elevation of serum soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) levels in bronchial asthma. *Clin. Exp. Immunol.* 101:468-473.
- Kips, J. C. 2000. The role of inflammation in the modulation of bronchial hyperreactivity. Potential therapeutic applications. *Rev. Mal. Respir.* 17:555-558.
- Kolls, J.K., A. Linden. 2004. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21:467-476.
- Liew, C., H. A. J. Schut, M. W. Pariza, and R. H. Dashwood. 1995. Protection of

conjugated linoleic acids against 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline-induced colon carcinogenesis in the F344 rat: a study of inhibitory mechanisms. *Carcinogenesis* 16:3037-3043.

Lilly, D. M. and R. H. Stillwell. 1965. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganism. *Science* 47:747-748.

Maria, L. F., and W. A. Walker. 2005. The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. *British Journal of Nutrition*. 93:S41-S48.

Metchnikoff, E. 1908. Prolongation of life. Putnam. New York.

Metchnikoff, E. 2004. Prolongation of life: optimistic studies. pp 116-130. Springer. New York.

Meydani, S. N. and W. K. Ha. 2000. Immunologic effects of yogurt. *Am. J. Clin. Nutr.* 71:861-872.

Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, R. L. Coffman, and A. O'Garra. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19:683-765.

National Heart, Lung, and Blood Institute. National Asthma Education and Prevention Program. Expert panel report No. 2: Guidelines for the diagnosis and management of asthma: Bethesda, Md: National Heart, Lung, and Blood Institute; 1997. NIH publication 97-4501.

Neumann, E., M. G. Ramos, L. M. Santos, A. C. Rodrigues, E. C. Vieira, L. C. Afonso, J. R. Nicoli, L. Q. Vieira. 2009. *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 induces type 1 cytokine production by mouse cells *in vitro* and *in vivo*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 42:358-67.

- Novak, B. M., and J. T. Cafmeyer. 2001. Meta-stable enamines: synthesis of simple enamines via catalytic isomerization of allylic amine substrates and their polymerization behavior. *J. Am. Chem. Soc.* 123:11083-11084.
- Park, H. S., J. H. Ryu, Y. L. Ha, and J. H. Park. 2001. Dietary conjugated linoleic acid (CLA) induces apoptosis of colonic mucosa in 1,2-dimethylhydrazine- treated rats: a possible mechanism of the anticarcinogenic effect by CLA. *Br. J Nutr.* 86:549-555.
- Park, Y., K. J. Albright, W. Liu, J. M. Storkson, M. E. Cook, and M. W. Pariza. 1997. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids* 32:853-858.
- Parodi, P., 2003. Conjugated linoleic acid in food. In J. Sebedio, W.W. Christie, and R. Adolf (ed) *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, Vol. 2, pp:101-121. AOCS Press, Champaign, IL.
- Paul, Forsythe., Mark D. Inman, and John Bienenstock. 2007. Oral Treatment with Live *Lactobacillus reuteri* Inhibits the Allergic Airway Response in Mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 175:561–569.
- Peluso, I., D. Fina, R. Caruso, C. Stolfi, F. Caprioli, M.C. Fantini, G. Caspani, E. Grossi, L. Di Iorio, F.M. Paone, F. Pallone, and G. Monteleone. 2007. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* B21060 suppresses human T-cell proliferation. Infect Immun. proliferation and ErbB3 signaling in HT-29 human colon cell line. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 284:G996-G1005.
- Rink, L., and H. Kirchner. 1996. Recent progress in the tumor necrosis factor alpha field. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 111:199-209.

- Riserus, U., L. Berglund, and B. Vessby. 2001. Conjugated linoleic acid (CLA) reduced abdominal adipose tissue in obese middle-aged men with signs of the metabolic syndrome: a randomised controlled trial. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 25:1129-1135.
- Ritzenthaler, K. L., M. K. McGuire, R. Falen, T. D. Shultz, N. Dasgupta, and M. A. McGuire. 2001. Estimation of conjugated linoleic acid intake by written dietary assessment methodologies underestimates actual intake evaluated by food duplicate methodology. *J. Nutr.* 131:1548-1554.
- Robinson, D., Q. Hamid., A. Bentley, A. Ying, A. B. Kay, and S. R. Durham. 1993. activation of CD4+ T cells and recruitment in bronchoalveolar lavage after allergic allergen in in halation challenge in patients with atopic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 92:313-324.
- Rodri'guez-Alcala, L. M., and J. Fontecha. 2007. *Hot Topic: Fatty acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomer composition of commercial CLA-fortified dairy products: evaluation after processing and storage.* *J. Dairy Sci.* 90:2083-2090.
- Salminen S., C. Bouley, M. C. Boutron-Ruault, J. H. Cummings, A. Franck, G. R. Gibson, E. Isolauri, M. C. Moreau, M. Roberfroid, and I. Rowland. 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br. J. Nutr.* 80:S147-S171.
- Schley, P. D. and C. J. Field. 2002. The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics. *Br. J. Nutr.* 87:S221-S230.
- Secrist, H., C. J. Chelen, Y. Wen, J. D. Marshall, and D. T. Umetsu. 1993. Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4+ T cells from

allergic individuals. *J. Exp. Med.* 178:2123-2130.

Shingfield, K.J., S. Ahvenjärvi, V. Toivonen, A. Ärölä, K.V.V. Nurmela, P. Huhtanen and J.M. Griinari. 2003. Effect of dietary fish oil on biohydrogenation of fatty acid and milk fatty acid content in cows. *Anim. Sci.* 165-179.

Shultz, T. D, B. P. Chew, and W.R. Seaman, 1992. Differential stimulatory and inhibitory responses of human MCF-7 breast cancer cells to linoleic acid and conjugated linoleic acid in culture. *Anticancer Res.* 12:2143-2145.

Smolen, J. S., and R. N. Maini. 2006. Interleukin-6: a new therapeutic target. *Arthritis Res. Ther.* 8:407.

Stanton, C., F. Lawless, G. Kjellmer, D. Harrington, R. Devery, J. F. Connolly, and J. Murphy. 1997. Dietary influences on bovine milk cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid content. *J. Food Sci.* 62:1083-1086.

Thiel-Cooper, R. L., F. C. Farrish, J. C. Sparks, B. R. Wiegand, and R. C. Ewan. 2001. Conjugated linoleic acid changes swine performance and carcass composition. *J. Anim. Sci.* 79:1821-1828.

Tuomola, E., R. Crittenden, M. Playne, E. Isolauri, and S. Salminen. 2001. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am J Clin Nutr.* 73:393S-398S.

Wahle, K. W. J., S. D. Heys, and D. Rotondo. 2004. Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health? *Prog. Lipid Res.* 43:553-87.

Whigham, L. D., E. B. Cook, J. L. Stahl, R. Saban, D. E. Bjorling, M. W. Pariza and M. E. Cook. 2001. CLA reduces antigen-induced histamine and PGE₂ release from sensitized guinea pig tracheae. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Com. Physiol.* 280:R908-912

Yamasaki, M., K. Mansho, H. Mishima, M. Kasai, M. Sugano, H.Tachibana, and K. Yamada. 1999. Dietary effect of conjugated linoleic acid on lipid levels in white adipose tissue of Sprague-Dawley rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63:1104-1106.

拾、附錄

一、東海優酪乳分離菌株-1 序列:

TGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACCGGGCGACTTGA
GTGCAGAAGAGGACAGTGGAAGTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGG
AAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTTTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAA
AGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAG
TGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAAGCACT
CCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGC
ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTC
TTGACATCTTGCGCTAACCTTAGAGATAAGGCGTTCCTTCGGGGACGCAATGACA
GGTGGTGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAA
CGAGCGCAACCCTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACT
GCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATG
ACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGCTCGCGAGA
GTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTA
CACGAAGTC

NCBI 比對結果:

NCBI 比對結果:

[gblGQ131183.11](#) Lactobacillus reuteri strain IMAU70067 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence

Length=1472

Score = 1356 bits (734), Expect = 0.0

Identities = 736/737 (99%), Gaps = 0/737 (0%)

Strand=Plus/Plus

Query	1	TGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACCGGGCGACTTGAGTGC	60
Sbjct	593	TGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACCGGGCGACTTGAGTGC	652
Query	61	AGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCCGTAGATATATGGAAGAACAC	120
Sbjct	653	AGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCCGTAGATATATGGAAGAACAC	712
Query	121	CAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTTTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGC	180
Sbjct	713	CAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGC	772
Query	181	GAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGG	240
Sbjct	773	GAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGG	832
Query	241	GTTTCGGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCG	300
Sbjct	833	GTTTCGGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCG	892
Query	301	CAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA	360
Sbjct	893	CAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA	952
Query	361	ATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTGGCGCTAACCTTAGAGATA	420
Sbjct	953	ATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTGGCGCTAACCTTAGAGATA	1012
Query	421	AGGCGTTCCTTCGGGGACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTTCGT	480
Sbjct	1013	AGGCGTTCCTTCGGGGACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTTCGT	1072
Query	481	GAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAAG	540
Sbjct	1073	GAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAAG	1132

Query 541 TTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGAT 600
 |||
 Sbjct 1133 TTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGAT 1192

Query 601 CATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGC 660
 |||
 Sbjct 1193 CATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGC 1252

Query 661 AAGCTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAA 720
 |||
 Sbjct 1253 AAGCTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAA 1312

Query 721 CTCGCCTACACGAAGTC 737
 |||
 Sbjct 1313 CTCGCCTACACGAAGTC 1329

二、東海優酪乳分離菌株-2 序列:

GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAT
TTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGAATGATAAGTTTGATGTGAAAGCCCACG
GCTCAACCGTGGAAGTGCATCGGAACTGTCATTCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGT
GGAATTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGA
AGGCGGCTCTTTGGTTTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACA
GGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGCGCTAGGTGTTGGGGAC
TTTCCGGTCCTCAGTGCCGCAGCAAACGCATTAAGCGCTCCGCCTGGGGAGTACGA
CCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATG
TGTTTTAATTTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTGTGCTAC
ACCTaGAGATAGGTGGTTCCTTCGGGGACGCAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTC
GTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTC
TTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGA
GGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGT
GCTACAATGGGCAGTACAACGAGAAGCGAACCCGCGAGGGTAAGCGGATCTCTTAA
AGCTGTTCTCA

NCBI 比對結果:

[gb|FJ915700.1|](#) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain IMAU40163
16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1469

Score = 1447 bits (783), Expect = 0.0
Identities = 791/795 (99%), Gaps = 0/795 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 541 ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAAC 600
 |||
 Sbj ct 1039 ACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAAC 1098

Query 601 GAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAAGAGACTGCCGG 660
 |||
 Sbj ct 1099 GAGCGCAACCCTTGTCTTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAAGAGACTGCCGG 1158

Query 661 TGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGACCTGGGCT 720
 |||
 Sbj ct 1159 TGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGACCTGGGCT 1218

Query 721 ACACACGTGCTACAATGGGCAGTACAACGAGAAGCGAACCCGCGAGGGTAAGCGGATCTC 780
 |||
 Sbj ct 1219 ACACACGTGCTACAATGGGCAGTACAACGAGAAGCGAACCCGCGAGGGTAAGCGGATCTC 1278

Query 781 TTAAAGCTGTTCTCA 795
 |||
 Sbj ct 1279 TTAAAGCTGTTCTCA 1293

三、東海優酪乳分離菌株-3 序列：

GCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGAT
GTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGC
AGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGA
ACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCG
TGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCT
AAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGC
CTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAA
GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGA
CATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGCAAAGTGACAGGTG
GTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAG
CGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCG
GTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCT
GGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCAAAGTCGCGAGGCTAA
GCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATG
AAGCCGGAATCGCTTGTAATCGCGGATCAGCACGC

NCBI 比對結果：

[gb|GU904671.11](#) Enterococcus faecium strain LB4 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence

Length=1422

Score = 1507 bits (816), Expect = 0.0

Identities = 818/819 (99%), Gaps = 0/819 (0%)

Strand=Plus/Plus

```
Query 1      GCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGA 60
              |||
Sbjct 521    GCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGA 580
```


Sbj ct 1121 TCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAAACGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC 1180

Query 661 CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCAAAGTCGC 720

|||||

Sbj ct 1181 CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCAAAGTCGC 1240

Query 721 GAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTA 780

|||||

Sbj ct 1241 GAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTA 1300

Query 781 CATGAAGCCGGAATCGCTTGTAATCGCGGATCAGCACGC 819

|||||

Sbj ct 1301 CATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGC 1339

四、東海優酪乳分離菌株-4 序列：

GTAGGTGGCAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAA
TAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGGAGAATTGCATCAGAACTGTTGA
ACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGAT
ATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGG
CTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAAC
GATGAGTGCTAAGTGTGGGAGGTTTCCGCCTCTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTA
AGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG
GCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC
CAGGTCTTGACATCCAGTGCAAACCTAAGAGATTAGGTGTTCCCTTCGGGGACGCT
GAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTC
CCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCAATTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAT
GAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCC
CTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGAAGCGAACCT
GCGAAGGCAAGCGGATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACT
CGCCTACACGAAGCTGGAATCGCTTGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGGAATAC
G

NCBI 比對結果：

[gb|FJ557013.11](#) Lactobacillus johnsonii strain NCC2767 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence
Length=1452

Score = 1539 bits (833), Expect = 0.0
Identities = 840/843 (99%), Gaps = 2/843 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 GTAGGTGGC-AGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAA 59

Query 600 AAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA 659
 |||
 Sbjct 1146 AAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA 1205

Query 660 AGTCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGA 719
 |||
 Sbjct 1206 AGTCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGA 1265

Query 720 AGCGAACCTGCGAAGGCAAGCGGATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCCGACTGTAGGCTG 779
 |||
 Sbjct 1266 AGCGAACCTGCGAAGGCAAGCGGATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCCGACTGTAGGCTG 1325

Query 780 CAACTCGCCTACACGAAGCTGGAATCGCTTGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGG-GAAT 838
 |||
 Sbjct 1326 CAACTCGCCTACACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAAT 1385

Query 839 ACG 841
 |||
 Sbjct 1386 ACG 1388

表一、比較對照組與優酪乳及不同濃度之共軛亞麻油酸優酪乳對於糞便中益生菌的影響

Table 1. Effect of yoghurt and yoghurt with various concentration of CLA compared with control group on probiotics in feces

Groups	<i>Lactobacillus</i> spp, $\times 10^8$	<i>Bifidobacterium</i> spp, $\times 10^8$	<i>E. coli</i> , $\times 10^2$
Naïve	2.58 \pm 1.31 ^a	220.50 \pm 82.39 ^a	5.33 \pm 7.33 ^a
OVA modeling			
Control	2.46 \pm 2.23 ^a	263.63 \pm 200.30 ^b	54.54 \pm 95.55 ^b
Yoghurt	136.38 \pm 93.95 ^{ab}	7,633.38 \pm 5,049.34 ^c	1.76 \pm 2.28 ^c
YCL, 30 mg/kg	31.97 \pm 27.32 ^a	3,375.13 \pm 2,704.41 ^c	2.34 \pm 3.47 ^c
YCH, 180 mg/kg	3.21 \pm 0.79 ^a	477.75 \pm 543.89 ^b	1.93 \pm 2.27 ^c
Pred., 10 mg/kg	1.76 \pm 0.46 ^a	351.88 \pm 392.45 ^b	41.85 \pm 58.59 ^c

^{a-c} : 同行中不同字母表示有顯著差異 (P < 0.05)。

^{a-c} : Different letters in the same column indicate significant difference (P < 0.05).

表 二、比較對照組與優酪乳及不同濃度之共軛亞麻油酸優酪乳對於脾臟及肺臟濕重之影響

Table 2. Effect of yoghurt and yoghurt with various concentration of CLA compared with control group on spleen weight and lung wet weight of mice

Groups	spleen weight, g		lung wet weight, g	
Naïve	0.107	± 0.016 ^b	0.230	± 0.027 ^{ab}
OVA modeling				
Control	0.180	± 0.019 ^d	0.348	± 0.052 ^c
Yoghurt	0.144	± 0.021 ^c	0.248	± 0.019 ^b
YCL, 30 mg/kg	0.149	± 0.009 ^c	0.262	± 0.036 ^b
YCH, 180 mg/kg	0.150	± 0.031 ^c	0.249	± 0.022 ^b
Pred., 10 mg/kg	0.057	± 0.007 ^a	0.202	± 0.053 ^a

^{a-c} : 同行中不同字母表示有顯著差異 (P < 0.01)。

^{a-c} : Different letters in the same column indicate significant difference (P < 0.01).

表 三、給予富含共軛亞麻油酸之優酪乳對於肺部沖洗液細胞中抗原所誘導之細胞激素(IFN- γ , IL-4 and IL-5)所造成之改變

Table 3. Allergen-induced cytokine secretion (IFN- γ , IL-4 and IL-5) by bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cells is markedly altered by the application of CLA-enriched yoghurt

Groups	IFN- γ , pg/ml	IL-4, pg/ml	IL-5, pg/ml
Naïve	151.16 \pm 85.60 ^a	6.71 \pm 4.99 ^a	2.77 \pm 4.99 ^a
OVA modeling			
Control	311.73 \pm 174.25 ^{ab}	15.13 \pm 6.70 ^b	11.48 \pm 6.70 ^b
Yoghurt	527.19 \pm 400.03 ^b	7.24 \pm 5.51 ^a	2.19 \pm 5.51 ^a
YCL, 30 mg/kg	453.89 \pm 258.58 ^{bc}	8.97 \pm 7.78 ^{ab}	4.42 \pm 7.78 ^a
YCH, 180 mg/kg	353.76 \pm 353.52 ^{ab}	2.89 \pm 3.16 ^a	0.70 \pm 3.16 ^a
Pred., 10 mg/kg	331.89 \pm 299.61 ^{ab}	9.19 \pm 7.60 ^{ab}	2.86 \pm 7.60 ^a

^{a-b} : 同行中不同字母表示有顯著差異 (P < 0.05)。

^{a-b} : Different letters in the same column indicate significant difference (P < 0.05).

表 四、給予富含共軛亞麻油酸之優酪乳對於肺部沖洗液細胞中抗原所誘導之細胞激素(IL-6 and TNF- α)所造成之改變

Table 4. Allergen-induced cytokine secretion (IL-6 and TNF- α) by bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cells is markedly altered by the application of CLA-enriched yoghurt

Groups	IL-6, pg/ml	TNF- α , pg/ml
Naïve	60.21 \pm 50.70 ^a	4.67 \pm 5.09
OVA modeling		
Control	179.79 \pm 108.24 ^b	6.62 \pm 3.29 ^{NS}
Yoghurt	65.25 \pm 35.69 ^a	4.82 \pm 3.41
YCL, 30 mg/kg	89.98 \pm 68.48 ^a	4.68 \pm 5.48
YCH, 180 mg/kg	56.99 \pm 36.58 ^a	2.72 \pm 3.82
Pred., 10 mg/kg	91.19 \pm 58.25 ^a	3.93 \pm 4.33

^{a-b} : 同行中不同字母表示有顯著差異 (P < 0.01)。

^{a-b} : Different letters in the same column indicate significant difference (P < 0.01).

^{NS} : Showed no significant difference.

表 五、給予富含共軛亞麻油酸之優酪乳對於肺部沖洗液細胞中抗原所誘導之細胞激素 (IL-17 and IL-10)所造成之改變

Table 5. Allergen-induced cytokine secretion(IL-17 and IL-10) by bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cells is markedly altered by the application of CLA-enriched yoghurt

Groups	IL-17, pg/ml	IL-10, pg/ml
Naïve	8.40 ± 2.78 ^a	803.02 ± 506.84 ^a
OVA modeling		
Control	33.38 ± 39.35 ^b	1180.64 ± 587.80 ^{ab}
Yoghurt	11.42 ± 4.04 ^a	3395.20 ± 2,777.65 ^c
YCL, 30 mg/kg	10.75 ± 3.42 ^a	3153.48 ± 1,375.34 ^c
YCH, 180 mg/kg	13.12 ± 3.60 ^a	2260.99 ± 1,759.07 ^{abc}
Pred., 10 mg/kg	14.19 ± 7.22 ^a	2282.82 ± 2,129.90 ^{bc}

^{a-c} : 同行中不同字母表示有顯著差異 (P < 0.05)。

^{a-c} : Different letters in the same column indicate significant difference (P < 0.05).

表六、比較對照組與優酪乳及不同濃度之共軛亞麻油酸優酪乳對於血清中特異性 OVA 抗體(IgE, IgG, IgG1)之影響

Table 6. Effect of yoghurt and yoghurt with various concentration of CLA compared with control group on anti-OVA IgE, anti-OVA IgG1, anti-OVA IgG2a in serum

Groups	anti-OVA IgE, EU	anti-OVA IgG1, EU	anti-OVA IgG2a, EU
Naïve	0.067 ± 0.014 ^a	0.171 ± 0.178 ^a	0.096 ± 0.026 ^a
OVA modeling			
Control	0.589 ± 0.241 ^d	0.692 ± 0.142 ^d	0.080 ± 0.025 ^a
Yoghurt	0.273 ± 0.321 ^{abc}	0.321 ± 0.231 ^{abc}	0.114 ± 0.061 ^a
YCL, 30 mg/kg	0.327 ± 0.274 ^{bc}	0.274 ± 0.197 ^{bc}	0.315 ± 0.371 ^b
YCH, 180 mg/kg	0.249 ± 0.143 ^c	0.468 ± 0.123 ^c	0.097 ± 0.029 ^a
Pred., 10 mg/kg	0.099 ± 0.149 ^a	0.149 ± 0.126 ^a	0.063 ± 0.022 ^a

^{a-d} : 同行中不同字母表示有顯著差異 (P < 0.05)。

^{a-d} : Different letters in the same column indicate significant difference (P < 0.05).

表 七、比較對照組與優酪乳及不同濃度之共軛亞麻油酸優酪乳對於肺部沖洗液中特異性 OVA 抗體(IgE, IgG, IgG1)之影響

Table 7. Effect of yoghurt and yoghurt with various concentration of CLA compared with control group on anti-OVA IgE, anti-OVA IgG1, anti-OVA IgG2a in BALF

Groups	anti-OVA IgE, EU	anti-OVA IgG1, EU	anti-OVA IgG2a, EU
Naïve	0.013 ± 0.008 ^a	0.003 ± 0.002 ^a	0.041 ± 0.020
OVA modeling			
Control	0.032 ± 0.014 ^b	0.252 ± 0.264 ^b	0.073 ± 0.042 ^{NS}
Yoghurt	0.011 ± 0.008 ^a	0.135 ± 0.118 ^{ab}	0.055 ± 0.028
YCL, 30 mg/kg	0.020 ± 0.012 ^{ab}	0.080 ± 0.062 ^{ab}	0.115 ± 0.192
YCH, 180 mg/kg	0.018 ± 0.012 ^{ab}	0.151 ± 0.151 ^{ab}	0.042 ± 0.020
Pred., 10 mg/kg	0.014 ± 0.009 ^a	0.039 ± 0.082 ^a	0.039 ± 0.022

^{a-b} : 同行中不同字母表示有顯著差異 (P < 0.05)。

^{a-b} : Different letters in the same column indicate significant difference (P < 0.05).

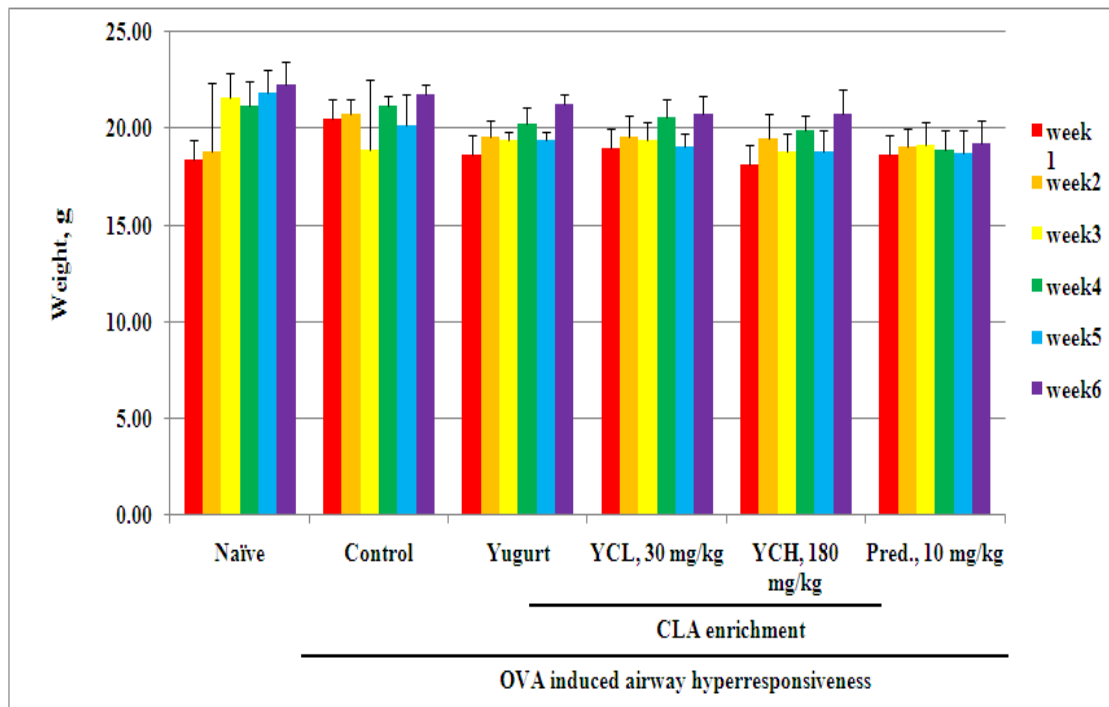
^{NS} : Showed no significant difference.

表 八、比較對照組與優酪乳及不同濃度之共軛亞麻油酸優酪乳對於組織切片 H&E 染色之影響

Table 8. Effect of yoghurt and yoghurt with various concentration of CLA compared with control group on H&E stain

Groups	Alveolar wall inflammation	Perivenous regions	Periarterial and Peribronchial regions	total score
Naïve	0.40 ± 0.51	-	0.33 ± 0.49	0.73 ± 0.70
OVA modeling				
Control	1.40 ± 0.75 ^{###}	2.65 ± 0.59 ^{###}	1.79 ± 0.79 ^{###}	5.75 ± 1.48 ^{###}
Yoghurt	1.10 ± 0.45	1.55 ± 0.99 ^{***}	1.25 ± 0.64	3.90 ± 1.44 ^{***}
YCL, 30 mg/kg	1.05 ± 0.51	1.55 ± 0.83 ^{***}	1.45 ± 0.69	4.05 ± 1.43 ^{***}
YCH, 180 mg/kg	0.90 ± 0.55	1.25 ± 0.72 ^{***}	0.85 ± 0.67 ^{**}	3.00 ± 1.62 ^{***}
Pred., 10 mg/kg	1.10 ± 0.55	1.10 ± 0.89 ^{***}	1.15 ± 0.75 [*]	3.35 ± 1.69 ^{***}

Data present as mean ± SD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, compared with control group. ### $P < 0.001$, control compared with naïve group on H&E stain.

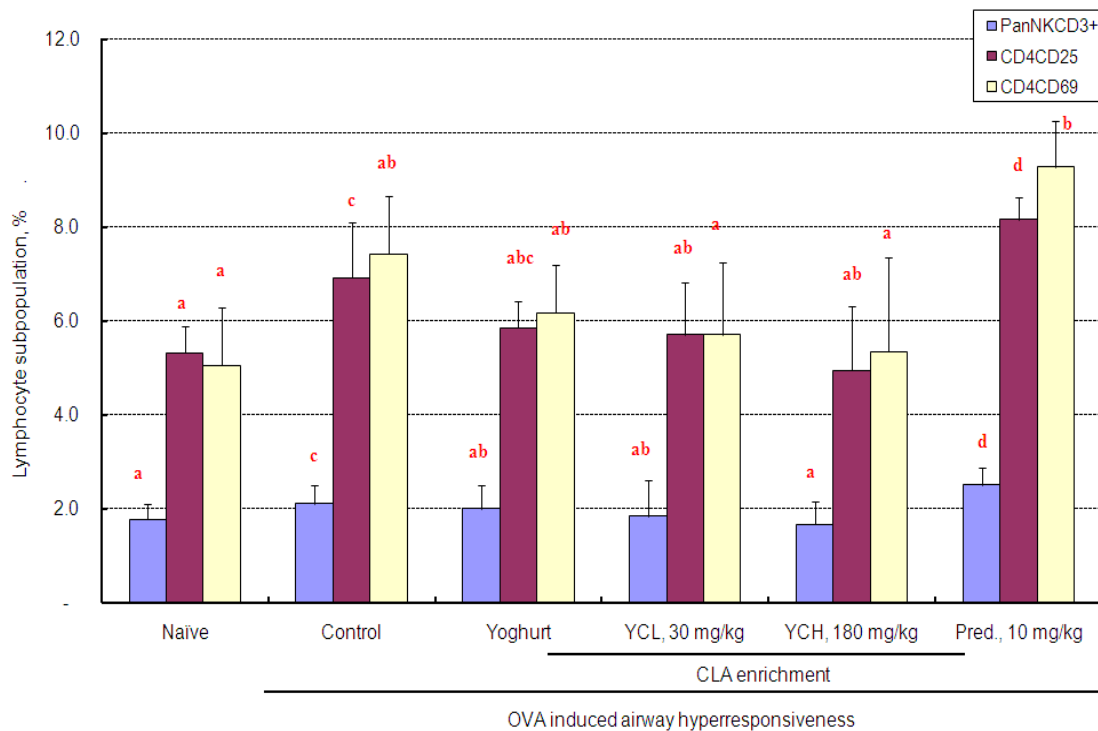


圖一、比較對照組與優酪乳及不同濃度之共軛亞麻油酸優酪乳對於每週體重變化之影響。

Figure 1. Effect of yoghurt and yoghurt with various concentration of CLA compared with control group on body weight in each week.

數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析後進行鄧肯氏多變域檢定，結果顯示各試驗組之體重無顯著性變化($P>0.05$)。

Bars are mean values and error bars represent as standard deviation. Mean data was analysis with One-way ANOVA and used Duncan's Multiple Range Test to compare significantly in each group. Means with a common letter are not significantly different at the 5% level.

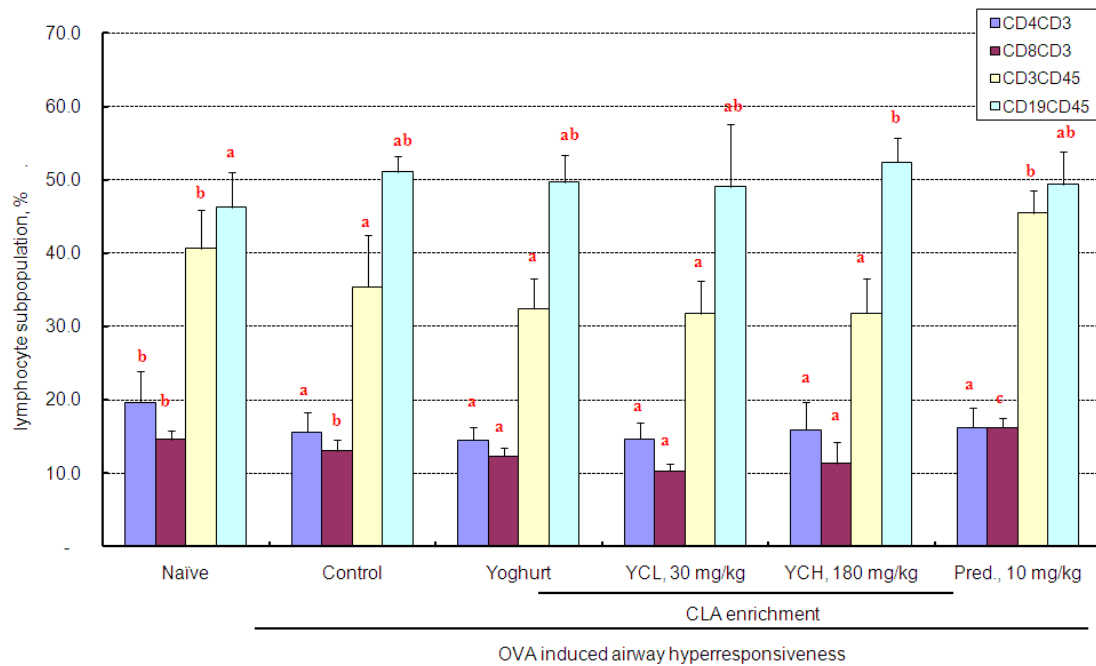


圖二、脾臟中活化的 T 淋巴細胞亞族群。

Figure 2. Spleen activated T lymphocytes subpopulation.

^{a-d}：數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析後進行鄧肯氏多變域檢定，同一亞族群比較中不同字母表示有顯著差異 ($P < 0.05$)。

^{a-d} : Bars are mean values and error bars represent as standard deviation. Mean data was analysis with One-way ANOVA and used Duncan's Multiple Range Test to compare significant in each group. Different letters in the same bar indicate significant difference ($P < 0.05$).



圖三、脾臟中淋巴細胞亞族群。

Figure 3. Spleen lymphocytes subpopulation.

^{a-b}: 數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析後進行鄧肯氏多變域檢定，同一亞族群比較中不同字母表示有顯著差異 ($P < 0.05$)。

^{a-b}: Bars are mean values and error bars represent as standard deviation. Mean data was analysis with One-way ANOVA and used Duncan's Multiple Range Test to compare significant in each group. Different letters in the same bar indicate significant difference ($P < 0.05$).

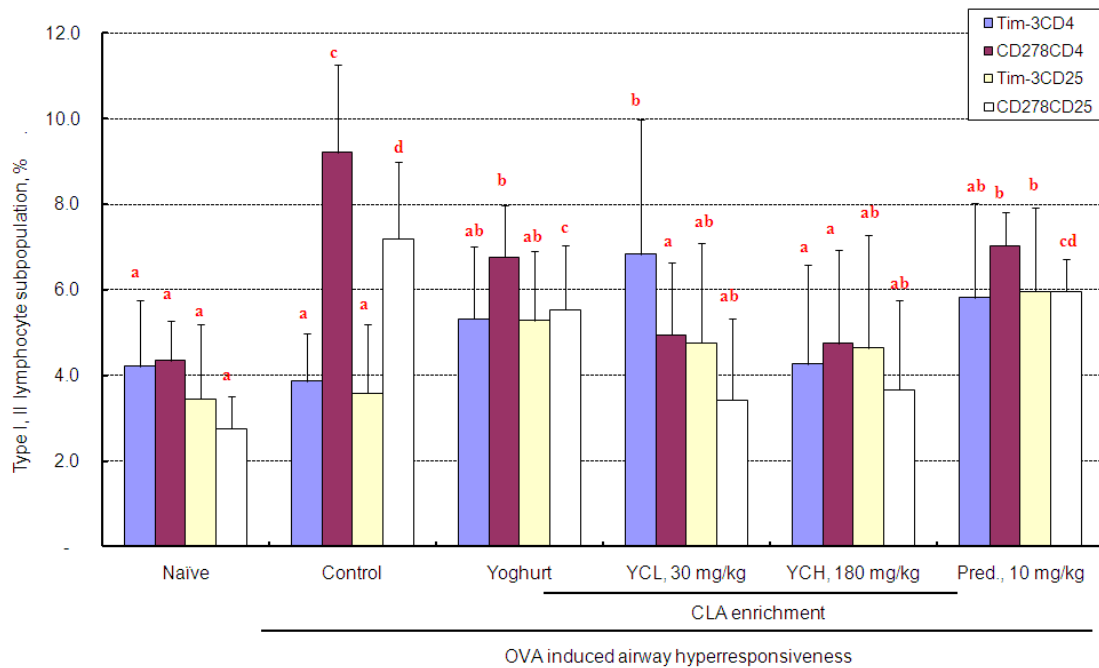


圖 四、脾臟中 T 輔助細胞第一型與第二型亞族群。

Figure 4. Spleen type -I, -II lymphocytes subpopulation.

^{a-d}：數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析後進行鄧肯氏多變域檢定，同一亞族群比較中不同字母表示有顯著差異 ($P < 0.05$)。

^{a-d} : Bars are mean values and error bars represent as standard deviation. Mean data was analysis with One-way ANOVA and used Duncan's Multiple Range Test to compare significant in each group. Different letters in the same bar indicate significant difference ($P < 0.05$).

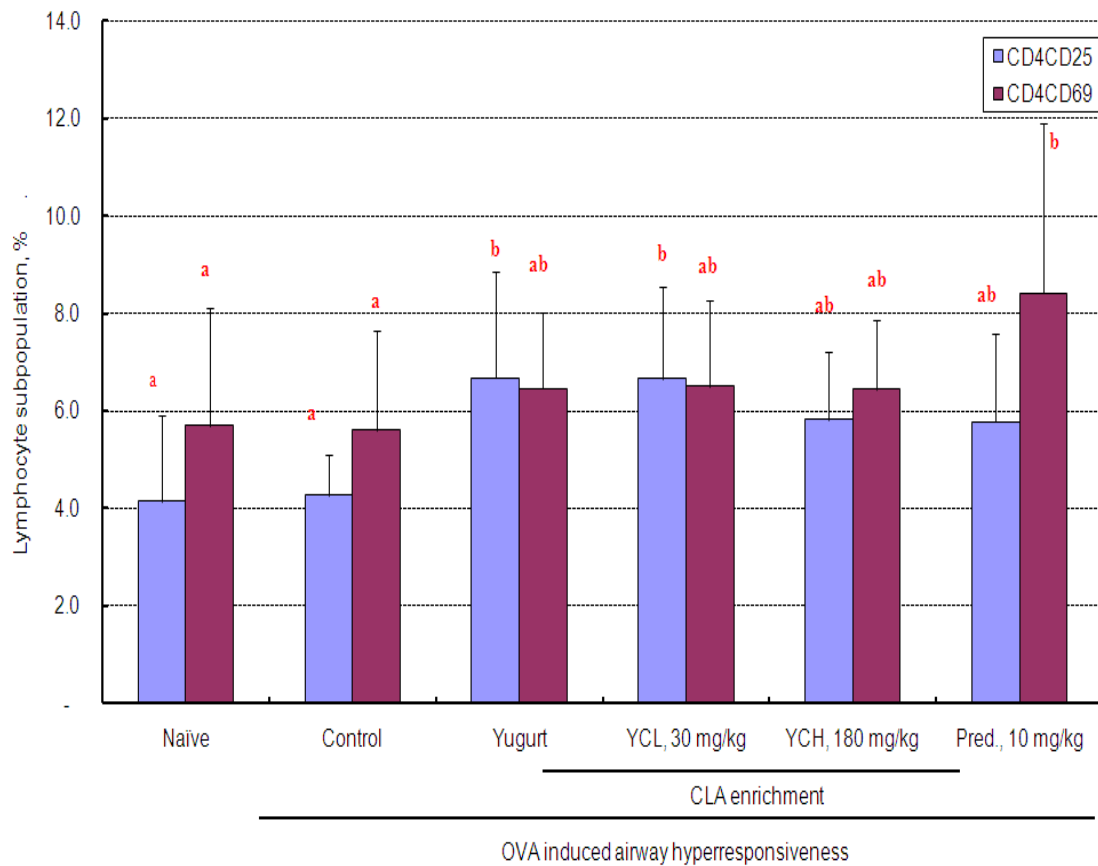


圖 五、肺部沖洗液中活化的 T 淋巴細胞亞族群。

Figure 5. BALF activated T lymphocytes subpopulation.

^{a-b}: 數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析後進行鄧肯氏多變域檢定，同一亞族群比較中不同字母表示有顯著差異 ($P < 0.05$)。

^{a-b}: Bars are mean values; error bars represent as standard deviation. Mean data was analysis with One-way ANOVA and used Duncan's Multiple Range Test to compare significant in each group. Different letters in the same bar indicate significant difference ($P < 0.05$).

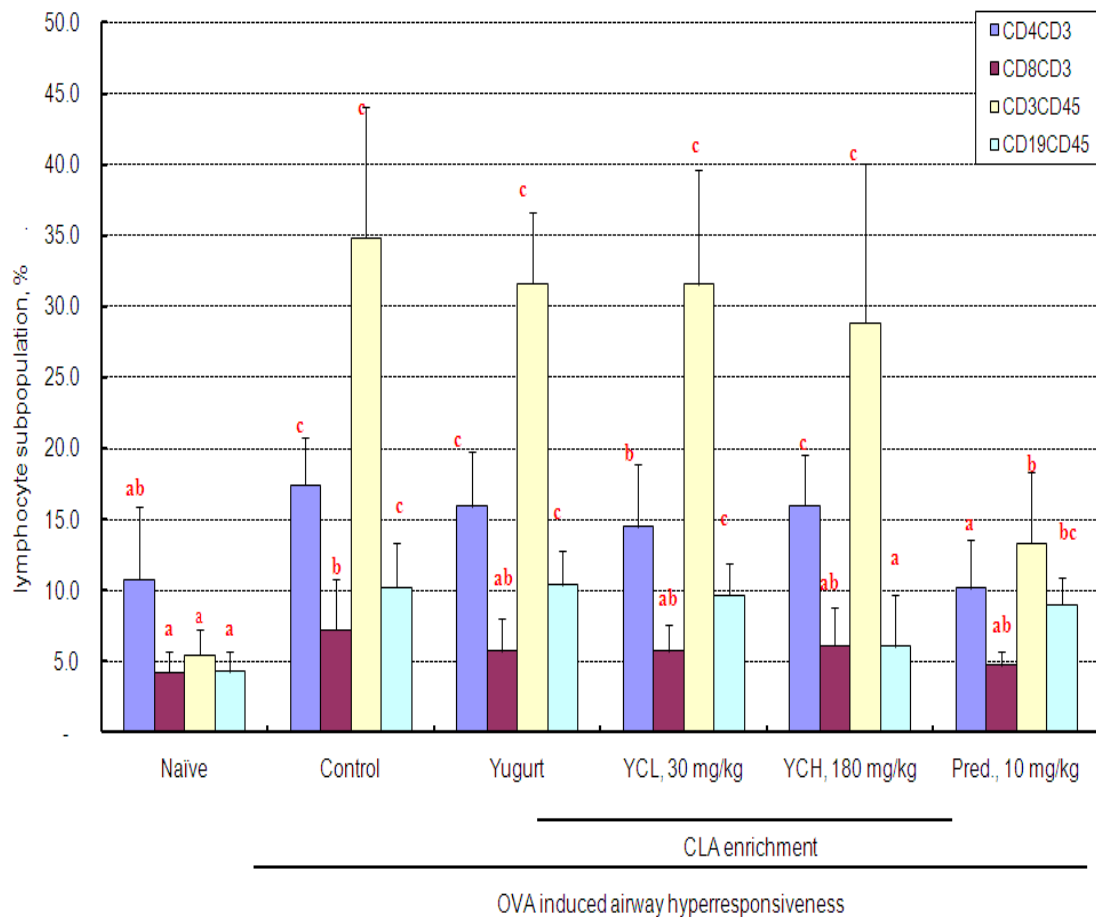


圖 六、肺部沖洗液中淋巴細胞亞族群。

Figure 6. BALF lymphocytes subpopulation.

^{a-c}: 數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析後進行鄧肯氏多變域檢定，同一亞族群比較中不同字母表示有顯著差異 ($P < 0.05$)。

^{a-c}: Bars are mean values and error bars represent as standard deviation. Mean data was analysis with One-way ANOVA and used Duncan's Multiple Range Test to compare significant in each group. Different letters in the same bar indicate significant difference ($P < 0.05$).

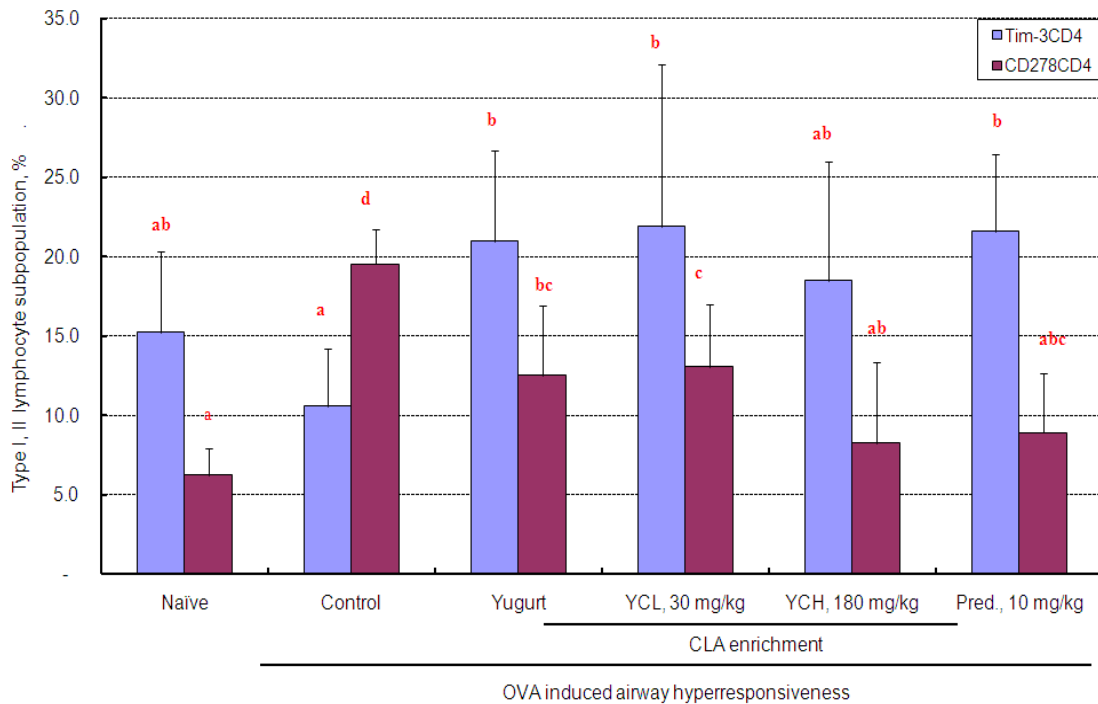


圖 七、肺部沖洗液中 T 輔助細胞第一型與第二型亞族群。

Figure 7. BALF type I, II lymphocytes subpopulation.

^{a-c}：數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析後進行鄧肯氏多變域檢定，同一亞族群比較中不同字母表示有顯著差異 ($P < 0.05$)。

^{a-c} : Bars are mean values and error bars represent as standard deviation. Mean data was analysis with One-way ANOVA and used Duncan's Multiple Range Test to compare significant in each group. Different letters in the same bar indicate significant difference ($P < 0.05$).

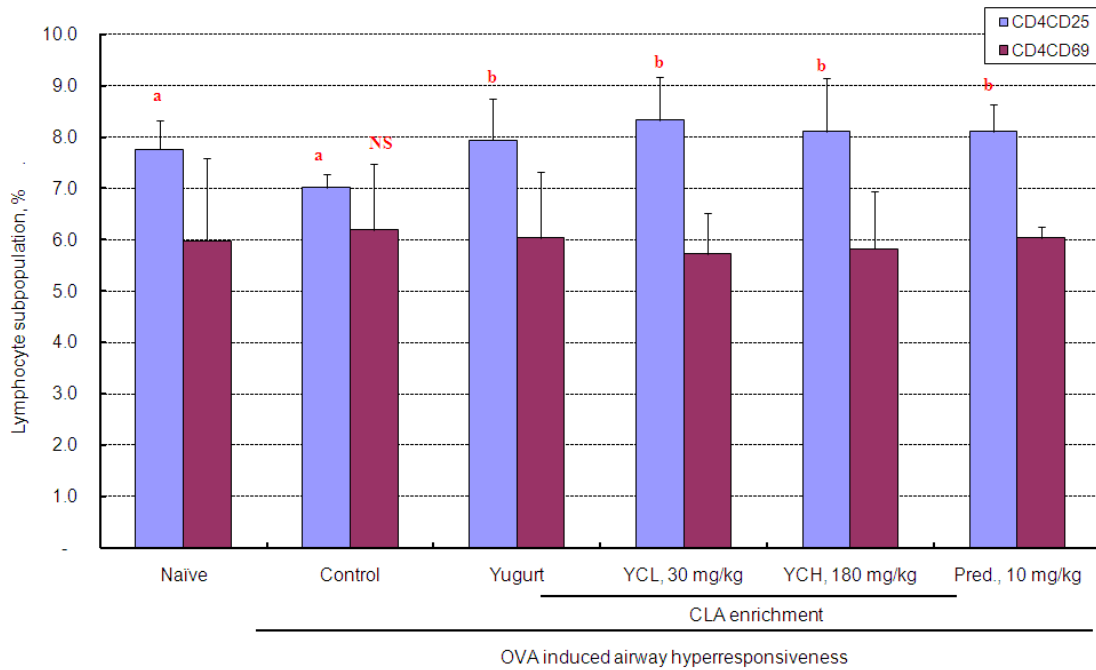


圖 八、呼吸道淋巴結中活化的 T 淋巴細胞亞族群。

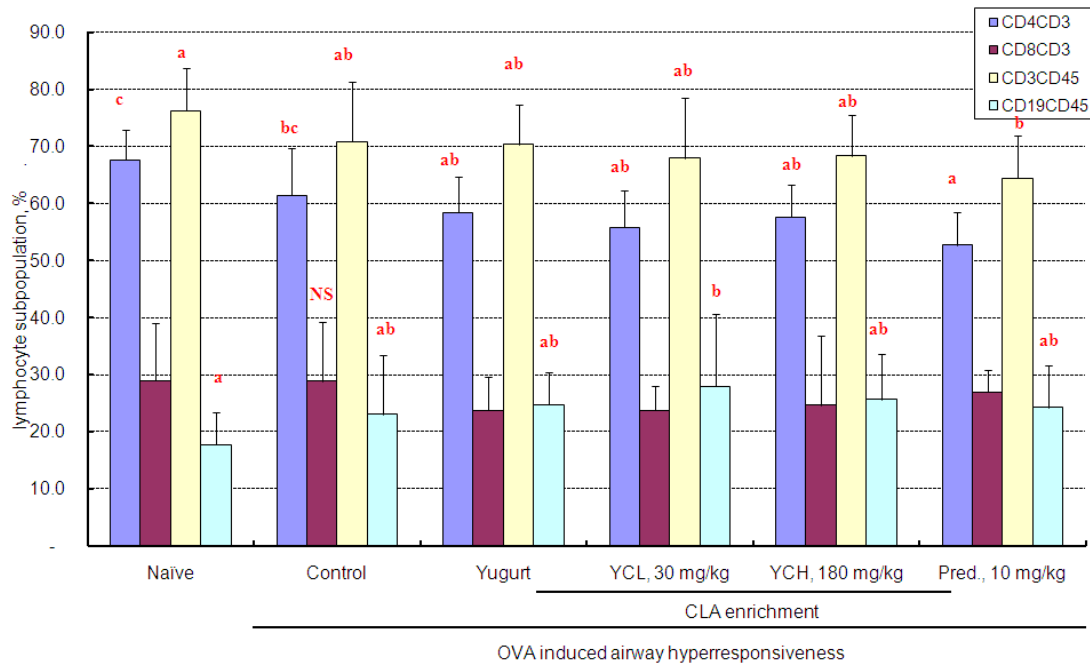
Figure8 . ALN activated T lymphocytes subpopulation.

^{a-b}：數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析後進行鄧肯氏多變域檢定，同一亞族群比較中不同字母表示有顯著差異 ($P < 0.05$)。

^{a-b} : Bars are mean values and error bars represent as standard deviation. Mean data was analysis with One-way ANOVA and used Duncan's Multiple Range Test to compare significant in each group. Different letters in the same bar indicate significant difference ($P < 0.05$).

NS : 顯示各組間無顯著性差異。

NS : Showed no significant difference.



圖九、呼吸道淋巴結中的淋巴細胞亞族群。

Figure 9. ALN lymphocytes subpopulation.

^{a-c}：數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析後進行鄧肯氏多變域檢定，同一亞族群比較中不同字母表示有顯著差異 ($P < 0.05$)。

^{a-c}：Bars are mean values and error bars represent as standard deviation. Mean data was analysis with One-way ANOVA and used Duncan's Multiple Range Test to compare significant in each group. Different letters in the same bar indicate significant difference ($P < 0.05$).

NS：顯示各組間無顯著性差異。

NS：Showed no significant difference.

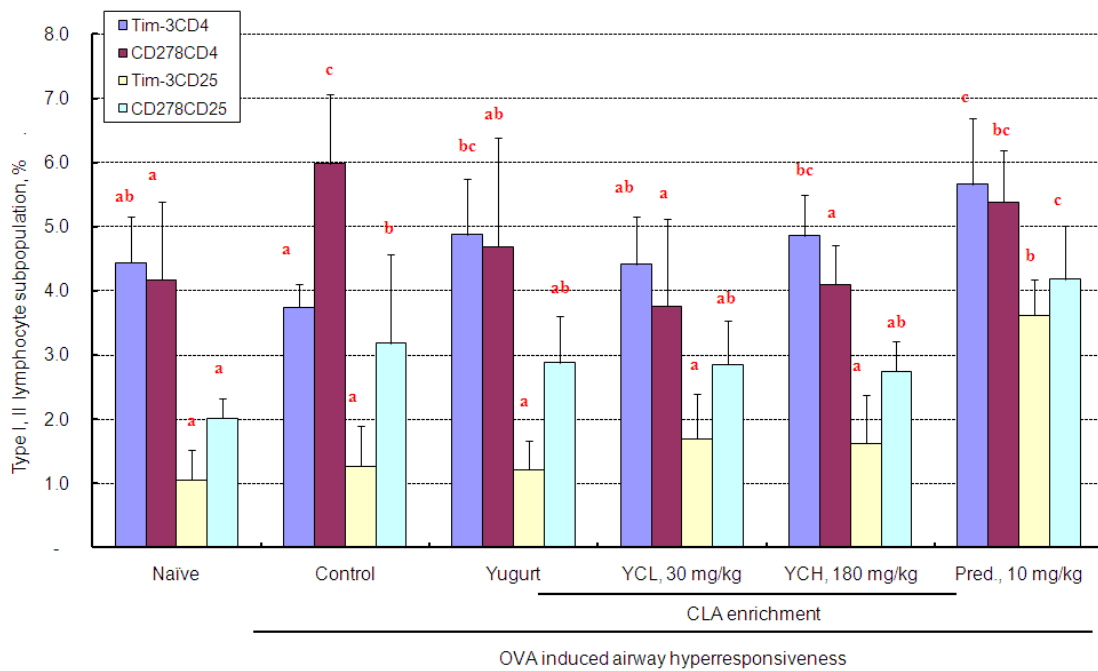


圖 十、呼吸道淋巴結中 T 輔助細胞第一型與第二型亞族群

Figure 10. ALN type I, II lymphocytes subpopulation

^{a-c}：數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析後進行鄧肯氏多變域檢定，同一亞族群比較中不同字母表示有顯著差異 ($P < 0.05$)。

^{a-c} : Bars are mean values and error bars represent as standard deviation. Mean data was analysis with One-way ANOVA and used Duncan's Multiple Range Test to compare significant in each group. Different letters in the same bar indicate significant difference ($P < 0.05$).

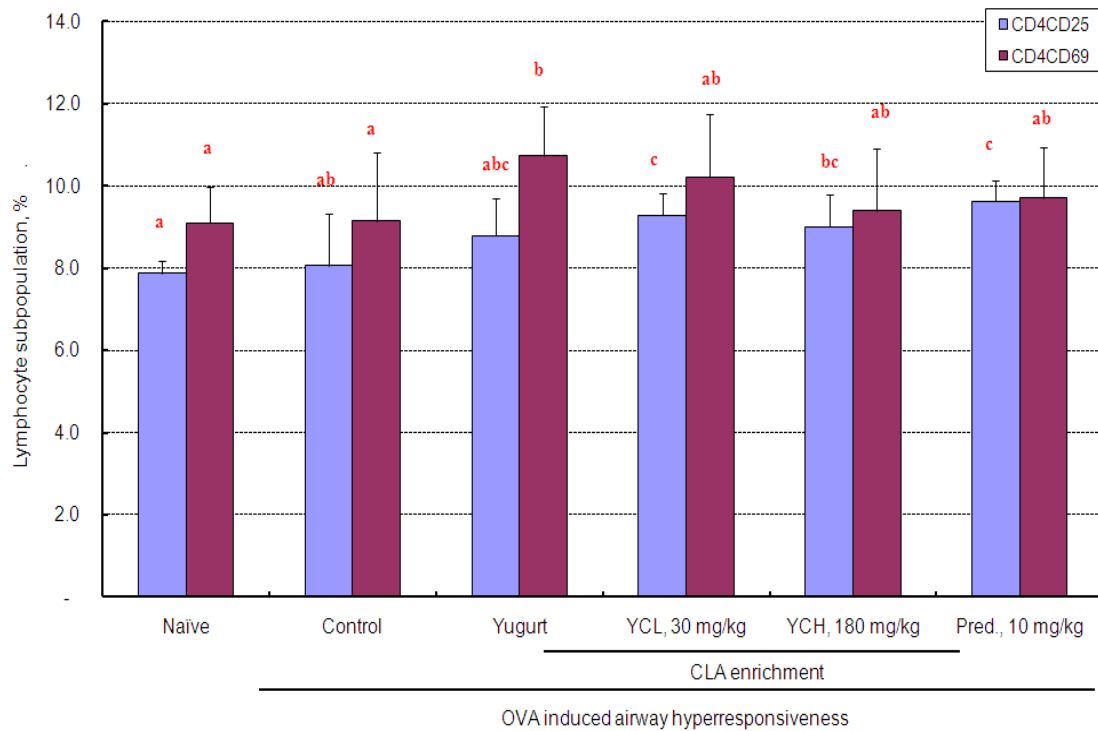


圖 十一、腸繫膜淋巴結中活化的 T 淋巴細胞亞族群

Figure11 . MLN activated T lymphocytes subpopulation

^{a-c}：數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析後進行鄧肯氏多變域檢定，同一亞族群比較中不同字母表示有顯著差異 ($P < 0.05$)。

^{a-c} : Bars are mean values and error bars represent as standard deviation. Mean data was analysis with One-way ANOVA and used Duncan's Multiple Range Test to compare significant in each group. Different letters in the same bar indicate significant difference ($P < 0.05$).

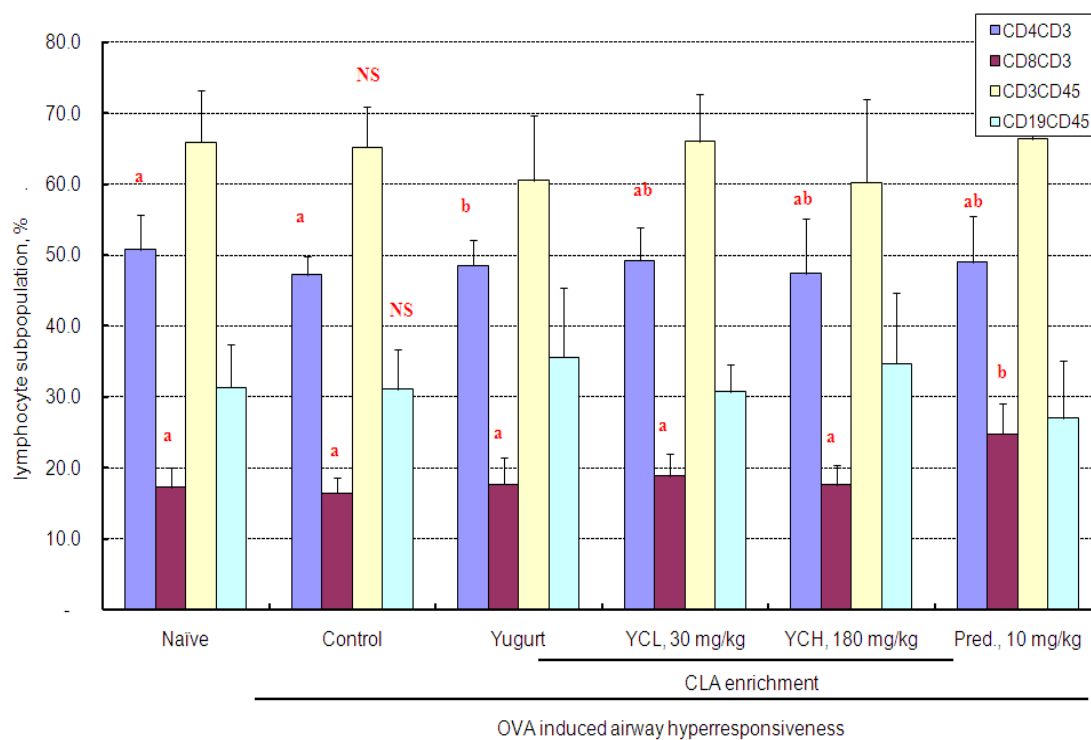


圖 十二、腸繫膜淋巴結中淋巴細胞亞族群

Figure 12. MLN lymphocytes subpopulation

^{a-b}：數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析後進行鄧肯氏多變域檢定，同一亞族群比較中不同字母表示有顯著差異 ($P < 0.05$)。

^{a-b}：Bars are mean values and error bars represent as standard deviation. Mean data was analysis with One-way ANOVA and used Duncan's Multiple Range Test to compare significant in each group. Different letters in the same bar indicate significant difference ($P < 0.05$).

NS：顯示各組間無顯著性差異。

NS：Showed no significant difference.

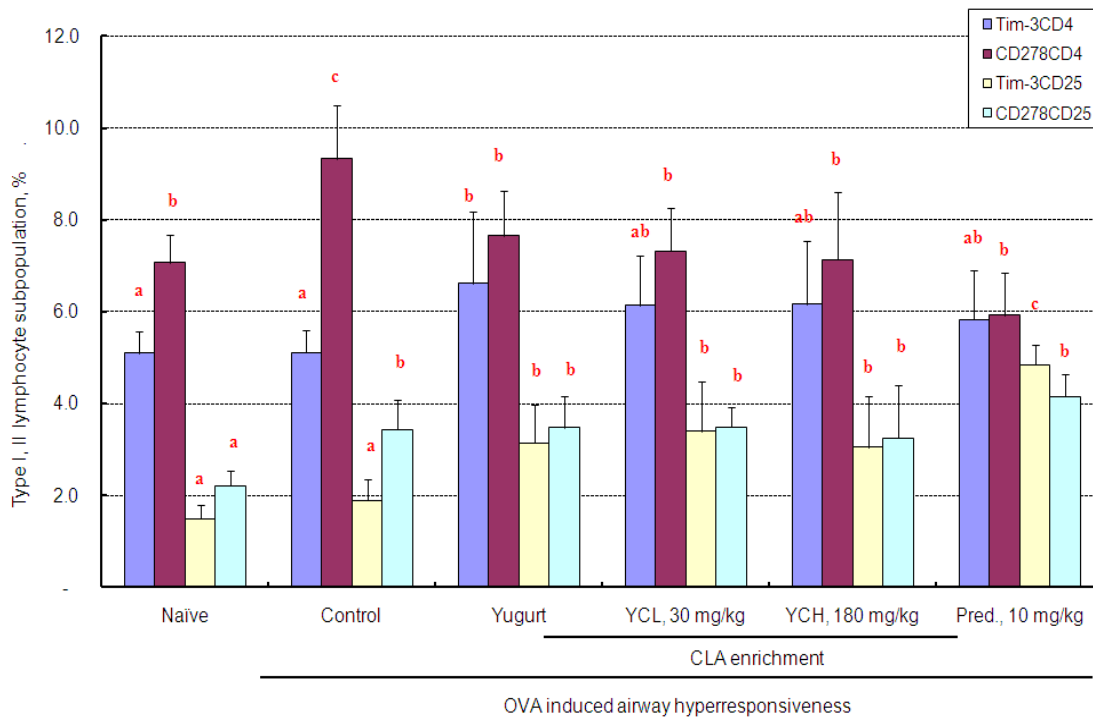


圖 十三、腸繫膜淋巴結中 T 輔助細胞第一型與第二型亞族群

Figure 13. MLN type I, II lymphocytes subpopulation

^{a-c}：數據以平均值與標準差表示，結果以單因子變異數分析後進行鄧肯氏多變域檢定，同一亞族群比較中不同字母表示有顯著差異 ($P < 0.05$)。

^{a-c} : Bars are mean values and error bars represent as standard deviation. Mean data was analysis with One-way ANOVA and used Duncan's Multiple Range Test to compare significant in each group. Different letters in the same bar indicate significant difference ($P < 0.05$).

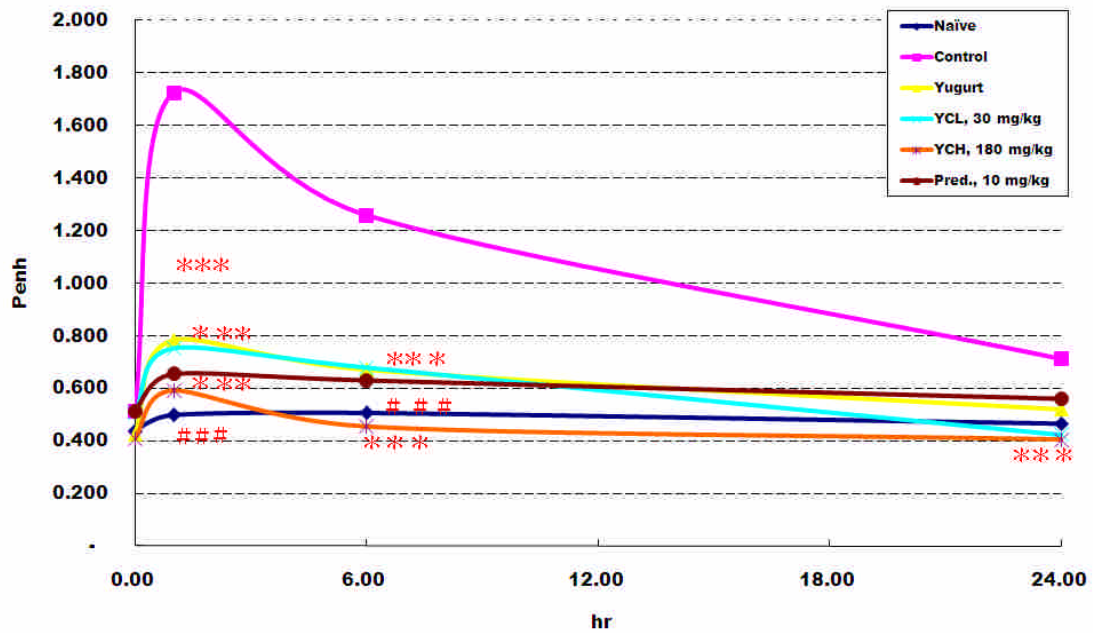


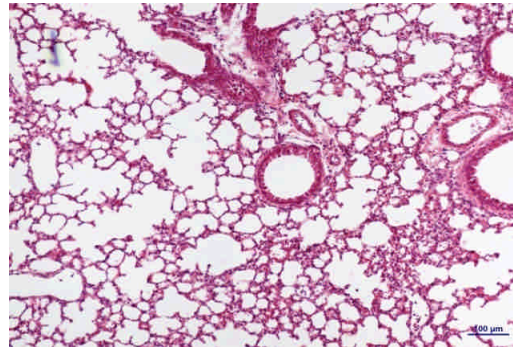
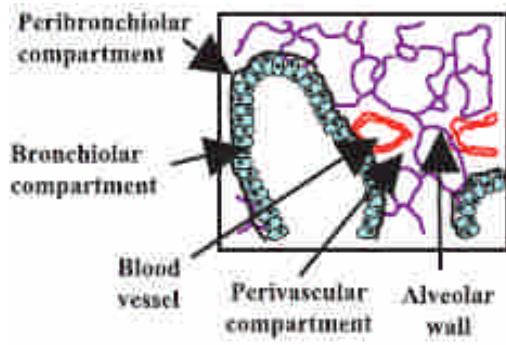
圖 十四、測量呼吸道阻力

Figure 14. Measurement of airway hyperresponsiveness (enhanced pause, Penh).

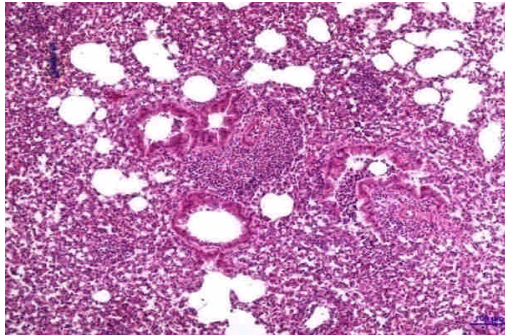
呼吸道阻力結果對照組與空白對照組比較有極顯著差異(###P<0.001)，試驗組與對照組比較有極顯著差異(***P<0.001)。

The level of enhance pause (Penh). ***P<0.001, treatment group compared with control group. ###P<0.001, naïve compared with control group.

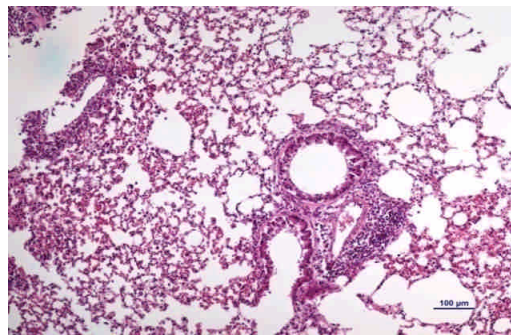
Naïve



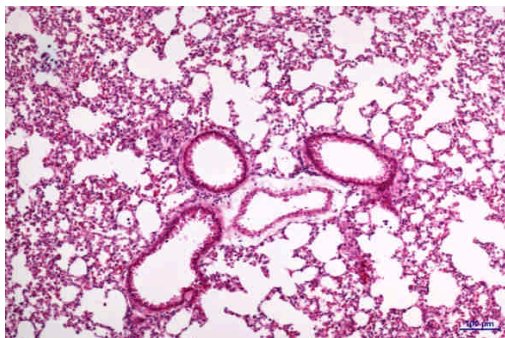
Control



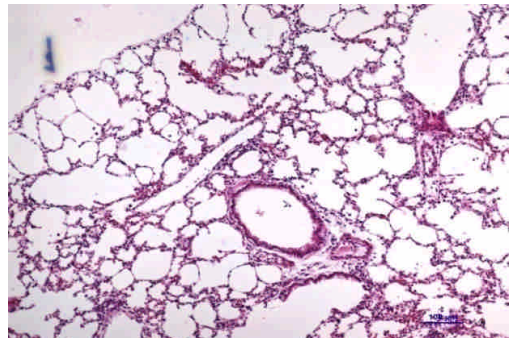
Yoghurt, 10 ml/kg



Yoghurt w/w CLA (YCL), 30 mg/kg



Yoghurt w/w CLA (YCH), 180 mg/kg



Prednisolone, 10 mg/kg

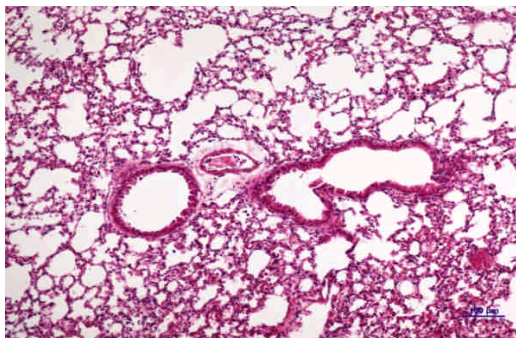
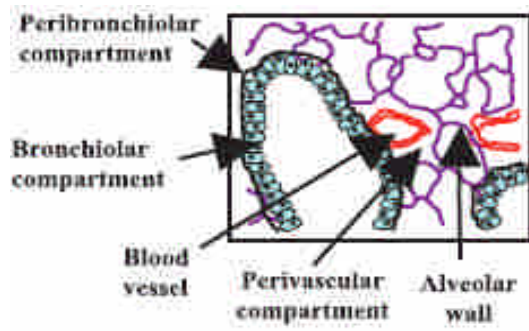
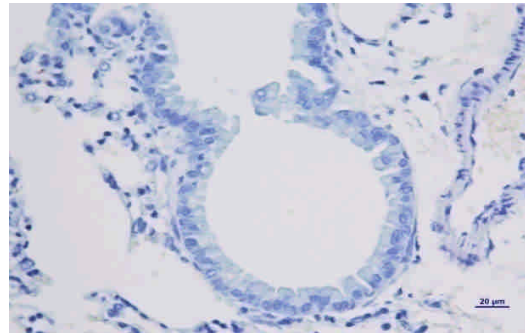


圖 十五、蘇木紫與伊紅染色

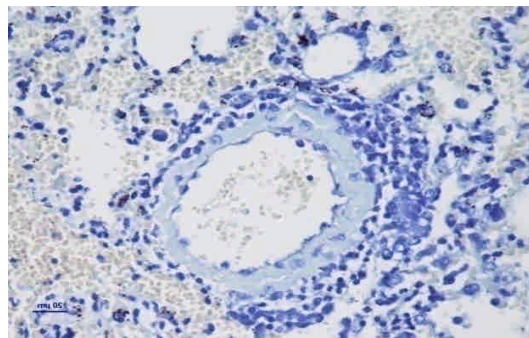
Figure 15. H&E stain



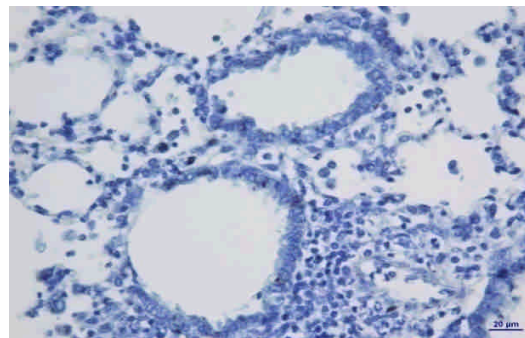
Naïve



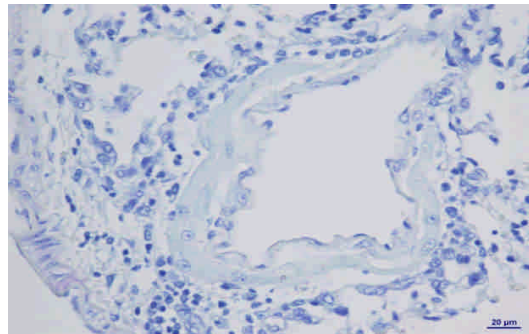
Control



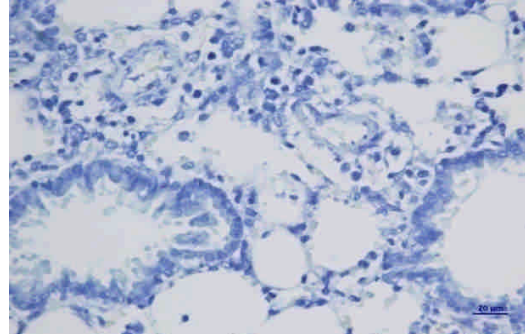
Yoghurt, 10 ml/kg



Yoghurt w/w CLA (YCL), 30 mg/kg



Yoghurt w/w CLA (YCH), 180 mg/kg



Prednisolone, 10 mg/kg

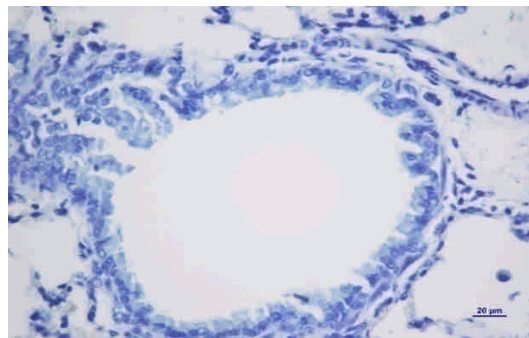


圖 十六、胺甲苯藍染色

Figure 16. Toluidine blue stain

拾壹、附表

附表一、不同結構型態及總CLA含量的組成在牛奶、奶油、起司及牛肉中所佔之比率

Appendix table 1: The mean positional and geometric isomer composition and the CLA content of samples of milk, butter, cheese, and beef fat

CLA isomer	Milk ²	Butter	Cheese	Beef
<i>cis, trans-isomers</i>				
7, 9	5.5	6.7	3.6	7.0
8, 10	1.5	0.3	1.0	2.6
9, 11	72.6	76.5	83.5	72.0
10, 12	0.4	1.1	-	2.6
11, 13	7.0	0.4	4.7	1.1
11, 13	-	-	-	2.2
12, 14	0.7	0.8	0.4	0.7
Total <i>cis,trans (trans,cis)</i>	87.7	85.8	93.2	88.2
<i>trans, trans isomers</i>				
6, 8	-	0.1	0.7	
7, 9	2.4	-	0.6	1.5
8, 10	0.4	-	0.3	0.7
9, 11	2.0	-	1.5	3.7
10, 12	0.6	-	0.5	1.9
11, 13	4.2	-	2.3	1.9
12, 14	2.8	-	0.9	1.9
13, 15	-	-	0.1	-
total <i>trans, trans</i>	12.3	9.4	6.3	12.3
<i>cis, cis isomers</i>				
8, 10	-	-	<0.1	-
9, 11	-	-	0.3	-
10, 12	-	-	<0.1	-
11, 13	-	-	0.3	-
total <i>cis, cis</i>	-	4.8	0.7	-
Total CLA (% of fat)		0.5	0.93	0.27

(Parodi, 2003; Shingfield *et al.* 2003)

附表二、CLA 在反芻動物之乳製品的含量

Appendix table 2: The CLA content (% of fat) in dairy products from ruminants

Products	Breed/Species	Diet	Content	Reference
Milk	Holstein	TMR	0.44	Kelsey <i>et al.</i> (2003)
Milk	Holstein	All pasture	2.5	Khanal <i>et al.</i> (2003a)
Milk	Holstein	All pasture	1.7	Khanal <i>et al.</i> (2002)
Milk	Holstein	Pasture + extruded soybean	1.7	Khanal <i>et al.</i> (2002)
Milk	Holstein	Pasture + extruded rapeseed	2.5	Lawless <i>et al.</i> (1998)
Milk	Holstein	TMR + canola seed	1.4	Ward <i>et al.</i> (2002)
Milk	Holstein	TMR + flax seed	1.2	Ward <i>et al.</i> (2002)
Milk	Holstein	Pasture + grain mix	0.72	White <i>et al.</i> (2001)
Milk	Holstein	TMR + 1% Fish oil	0.73	AbuGhazaleh <i>et al.</i> (2003)
Milk	Holstein	Pasture + 150 g fish oil	3.3	Kay <i>et al.</i> (2003)
Milk	Holstein	TMR + 3.6% soy oil	2.1	Dhiman <i>et al.</i> (2000)
Milk	Holstein	TMR + 5.3% linseed oil	1.67	Kelly <i>et al.</i> (1998a)
Milk	Holstein	TMR + 5.3% sunflower oil	2.44	Kelly <i>et al.</i> (1998a)
Milk	Jersey	TMR	0.32	White <i>et al.</i> (2001)
Milk	Jersey	Pasture + 5.5 kg concentrate	0.59	White <i>et al.</i> (2001)
Milk	Brown Swiss	TMR	0.41	Kelsey <i>et al.</i> (2003)
Milk	Normande	All pasture	1.7	Lawless <i>et al.</i> (1998)
Milk	Water buffalo	-	0.84	Lal and Narayanan (1984)
Milk	Goat	Various	0.58-1.1	Parodi (2003)
Milk	Sheep	Various	1.2-3.0	Parodi (2003)
Milk	Human	-	0.09-0.49	Park <i>et al.</i> (1999)
Cheese	Holstein	All pasture	1.5	Khanal <i>et al.</i> (2003a)
Cheese	Holstein	Pasture + extruded soybean	1.4	Khanal <i>et al.</i> (2002)
Cheese	Holstein	TMR	0.34	Dhiman <i>et al.</i> (1999b)
Cheese	Holstein	TMR + extruded soybean	0.73	Dhiman <i>et al.</i> (1999b)
Cheese	Holstein	TMR + extruded cottonseed	0.60	Dhiman <i>et al.</i> (1999b)
Cheese	Sheep	-	0.8-2.0	Prandini <i>et al.</i> (2001)
Cheese	Goat	-	0.27-0.69	Wolff (1995)
Cheese	Mozzarella	-	0.43	Lin <i>et al.</i> (1995)
Cheese	Cheddar	-	0.40-0.47	Lin <i>et al.</i> (1995)
Cheese	Swiss	-	0.55	Lin <i>et al.</i> (1995)
Yogurt	-	-	0.44	Ma <i>et al.</i> (1999)
Yogurt	-	-	0.38	Lin <i>et al.</i> (1995)
Butter	-	-	0.61	Chin <i>et al.</i> (1993)
Butter	-	-	0.47	Ma <i>et al.</i> (1999)
Ghee	Buffalo	TMR	0.50	Aneja and Murti (1990)
Ghee	Cattle	-	0.60	Aneja and Murti (1990)
Sour cream	Cattle	-	0.41	Lin <i>et al.</i> (1995)
Buttermilk	Cattle	-	0.47	Lin <i>et al.</i> (1995)
Evaporated milk	Cattle	-	0.34-0.64	Lin <i>et al.</i> (1995)

(Khanal and Olson, 2004)

附表三、反芻或非反芻動物之肉品或加工肉品中 CLA 的含量

Appendix table 3. The CLA content (% of fat) in various meats and processed meats from ruminants and non-ruminants

Products	Species/breed	Diet	Content	Reference
Beef	Heifers	Concentrate + soy oil	0.34	Beaulieu <i>et al.</i> (2002)
Beef	Cattle	Concentrate + extruded soybean	0.73	Madron <i>et al.</i> (2002)
Beef	Cattle	All concentrate	0.12	Mir <i>et al.</i> (2000)
Beef	Cattle	All pasture finished	1.5	Poulson (2001)
Beef	Cattle	Grass based + concentrate	1.1	French <i>et al.</i> (2000)
Ground beef	Cattle	-	0.16	Ma <i>et al.</i> (1999)
Ground beef	cooked beef	-	0.18	Ma <i>et al.</i> (1999)
Rib roast	beef	-	0.30	Ma <i>et al.</i> (1999)
Rib roast	Cooked beef	-	0.29	Ma <i>et al.</i> (1999)
Sirloin	Beef	-	0.12	Ma <i>et al.</i> (1999)
Sirloin	Cooked beef	-	0.28	Ma <i>et al.</i> (1999)
Beef	Charolais	Concentrate based + linseed	0.80	Enser <i>et al.</i> (1999)
Beef	Charolais	Concentrate based + fish oil	0.57	Enser <i>et al.</i> (1999)
Beef	Angus × Hereford	Finishing diet + soy oil	0.28	Griswold <i>et al.</i> (2003)
Veal	Cattle	-	0.27	Chin <i>et al.</i> (1992)
Lamb	Sheep	-	0.35-0.90	Ivan <i>et al.</i> (2001)
Adipose tissue	Sheep	Browsed	1.7	Banni <i>et al.</i> (1996)
Lamb	Sheep	-	0.06-0.31	Mir <i>et al.</i> (2000)
Lamb	Sheep	Browsing	1.5	Fogerty <i>et al.</i> (1988)
Lamb	Sheep	Beet pulp + safflower	0.65-0.98	Bolte <i>et al.</i> (2002)
Lamb	Sheep	-	0.56	Chin <i>et al.</i> (1992)
Ground turkey	Turkey	-	0.25	Chin <i>et al.</i> (1993)
Chicken	Chicken	-	0.09-0.2	Chin <i>et al.</i> (1992)
Pork	Swine	-	0.12	Chin <i>et al.</i> (1993)
I/M1 fat	Swine	2.5% CLA in diet	1.0	Joo <i>et al.</i> (2002)
S/C2 fat	Swine	1.0% CLA in diet	2.16	Thiel-Cooper <i>et al.</i> (2001)
Lean tissue	Swine	1.0% CLA in diet	0.37	Thiel-Cooper <i>et al.</i> (2001)
S/C2 fat	Swine	1.0% CLA in diet	4.0	Ramsay <i>et al.</i> (2001)
Back fat tissue	Swine	2.0% CLA in diet	2.0	Bee (2000b)
Omental fat	Swine	2.0% CLA in diet	2.2	Bee (2000b)
<i>L. dorsi</i>	Swine	2.0% CLA in diet	0.98	Bee (2000b)
Breast muscle	Broiler	1.0% CLA in diet	5.2	Szymczyk <i>et al.</i> (2001)
Belly fat	Swine	1% CLA oil in diet	0.76	Eggart <i>et al.</i> (2001)
<i>L. muscle</i>	Swine	1% CLA oil in diet	0.28	Eggart <i>et al.</i> (2001)
Egg yolk	Chicken	1.0% CLA in diet	0.30	Jones <i>et al.</i> (2000)
Egg yolk	Chicken	1.0% CLA in diet	1.4-3.2	Raes <i>et al.</i> (2002)
Egg yolk	Chicken	Concentrate	ND ^a	Raes <i>et al.</i> (2002)
Egg yolk	Chicken	Concentrate	ND ^a	Yang <i>et al.</i> (2002)

(Khanal and Olson, 2004)

附表四、應用於發酵乳製品中之主要乳酸菌

Appendix table 4. Major lactic acid bacteria for production of fermented ,milks

Bacteria	Examples of fermented milks
Lactococci	
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Cultured buttermilk, kefir
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Cultured buttermilk, kefir, dahi
<i>L. lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	Cultured buttermilk, kefir, dahi
Streptococci	
<i>S. thermophilus</i>	Yoghurt, dahi, mozzarella
Leuconostoc	
<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	Kefir, cultured cream
<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	Kefir, cultured cream
<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	Kefir, cultured cream
Lactobacilli	
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	Fermented milk drinks, yoghurt
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	Fermented milk drinks
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Yoghurt, Bulgarian buttermilk, mozzarella
<i>L. helveticus</i>	Kefir, koumiss, mozzarella
<i>L. acidophilus</i>	Acidophilus milk, kefir
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	Fermented milk drinks
<i>L. johnsonii</i>	Probiotic yoghurt, fermented milk drinks
<i>L. casei</i>	Probiotic yoghurt
<i>L. paracasei</i>	Probiotic yoghurt
<i>L. reuteri</i>	Probiotic yoghurt
<i>L. rhamnosus</i>	Kefir
<i>L. plantarum</i>	Kefir
<i>L. kefir</i>	Kefir
<i>L. kefiranoferasciens</i>	Kefir
<i>L. brevis</i>	Kefir
<i>L. fermentum</i>	Kefir
Bifidobacteria	
<i>B. adolescentis</i>	Fermented milks
<i>B. bifidum</i>	Yoghurt-like products
<i>B. breve</i>	
<i>B. infantis</i>	
<i>B. longum</i>	

(Duboc and Mollet, 2001)

附表五、口服給予乳酸菌對免疫調節

Appendix table 5. Immunomodulatory effects of orally administered lactic acid

Immunomodulatory effects of orally administered lactic acid bacteria. PP, Peyer's patch; Ig, immunoglobulin; GALT, gut-associated lymphoid tissue; MLN, mesenteric lymph nodes; NK, natural killer; IFN, interferon; IL, interleukin; RES, reticuloendothelial system.*Primarily species of lactobacilli and bifidobacteria; †data insufficient to classify region of GALT.

(Schley *et al.*, 2002)

附表六、 病理組織評分準則

Appendix table 6. Histologic Grading Criteria

Alveolar wall inflammation

- 1+ Increased numbers of inflammatory cells in alveolar walls.
- 2+ As above, plus 1–3 foci per section showing cellular alveolar exudate and atelectasis.
- 3+ As above, plus more than 3 foci per section showing cellular alveolar exudate and atelectasis.

Perivenous regions

- 1+ Occasional veins cuffed by inflammatory cells.
- 2+ Most veins surrounded by a thin layer (1–5 cells thick) of inflammatory cells.
- 3+ Most veins surrounded by a thick layer (> 5 cells thick) of inflammatory cells.

Periarterial and peribronchial regions

Same scoring criteria as perivenous regions.

Venous endothelial changes

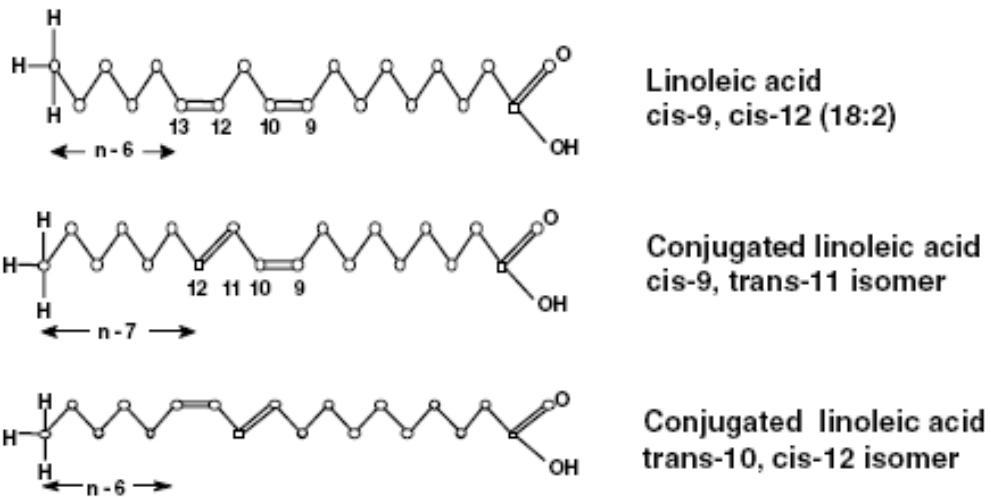
- 1+ Scattered inflammatory cells adherent to the endothelium; flat endothelial cells.
- 2+ Endothelial cells show hypertrophy; 1–3 veins per section show focal piling up of inflammatory cells along the endothelium.
- 3+ Endothelial cells show hypertrophy; > 3 veins per section show piling up of inflammatory cells, usually marked.

Arterial endothelial changes

Same scoring criteria as venous endothelial changes.

(Jeffrey *et al.*, 1991)

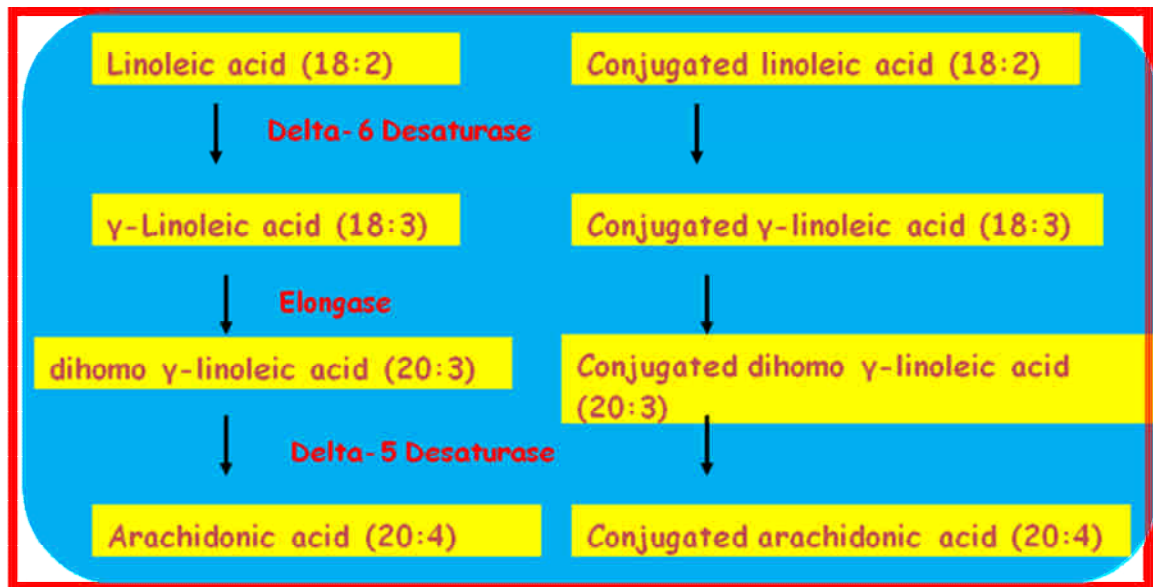
拾貳、附圖



附圖一、亞麻油酸與共軛亞麻油酸之主要兩種結構式。

Appendix figure 1. Linoleic acid and two main structure of Conjugated Linoleic acid.

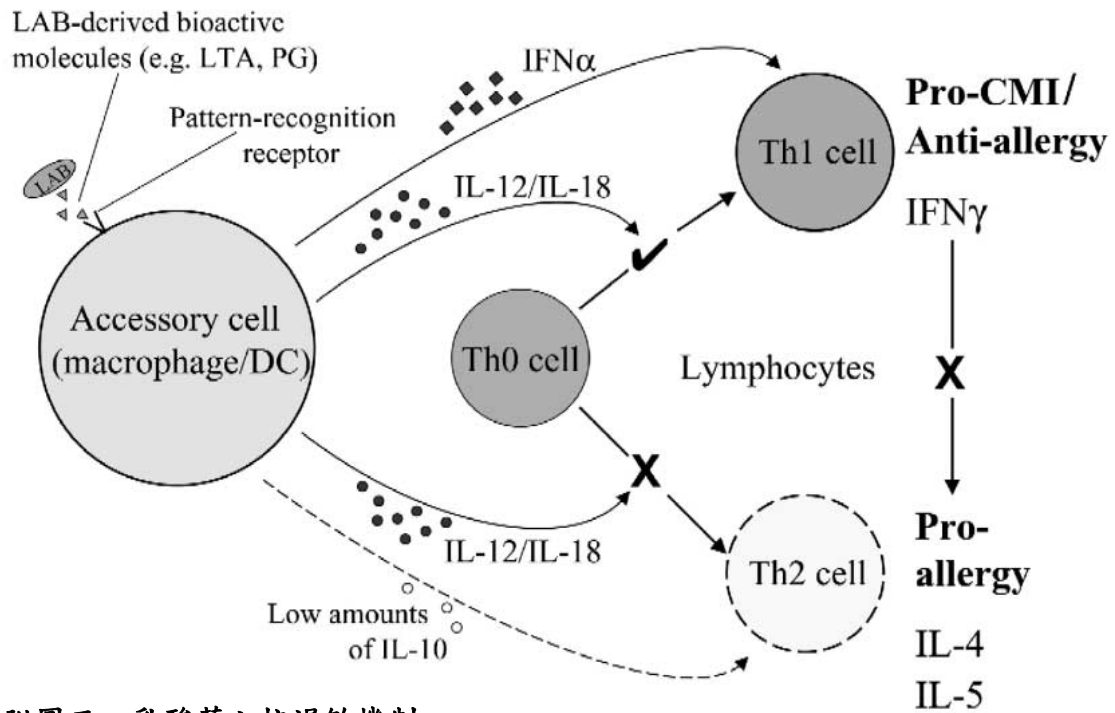
(Wahle *et al.*,2004)



附圖二、共軛亞麻油酸之代謝路徑。

Appendix figure 2. Conjugated linoleic acid pathway.

(Bassaganya-Riera *et al.*, 2002)

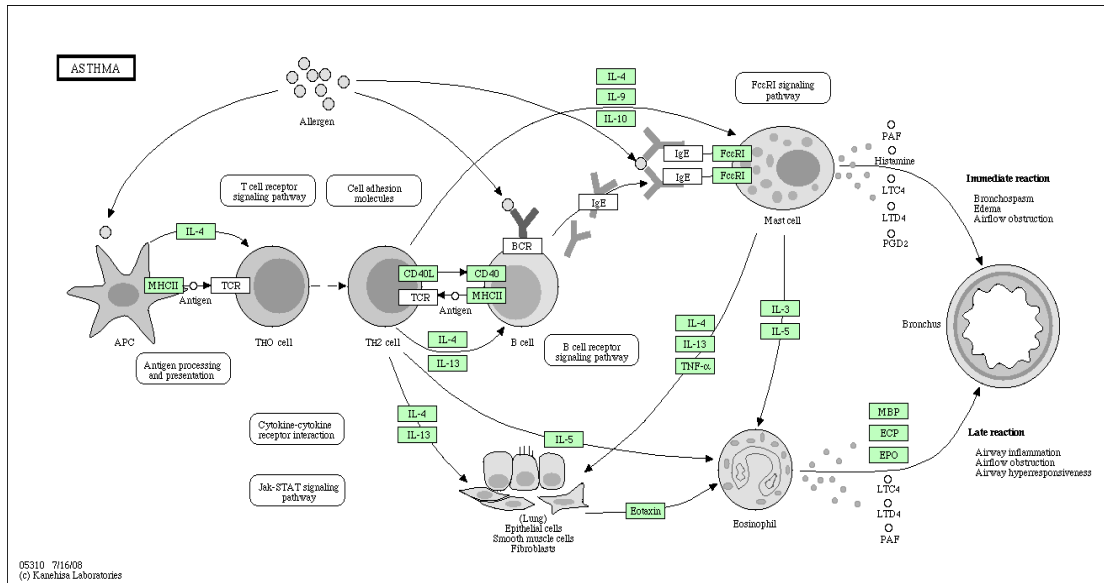


附圖三、乳酸菌之抗過敏機制。

乳酸菌抗過敏免疫調節機制的理論模型。

Appendix figure 3. Theoretical model of anti-allergy mechanisms of lactic acid bacteria.

Theoretical model for anti-allergy mechanisms of immunoregulating lactic acid bacteria (LAB). (Cross *et al.*, 2001)



附圖四、氣喘的細胞調節路徑圖

Appendix figure 4. Cellular pathway of asthma

<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>

拾參、附件

附件一

東海大學動物實驗管理小組審查同意書
Affidavit of Approval of Animal Use Protocol
Tunghai University

動物實驗申請表暨同意書： 98-03

計畫申請人：謝長奇 職稱：助理教授
單位：畜產與生物科技學系 飼養/應用地點：畜產系/實驗動物房
計畫名稱：CLA 免疫調節功能評估試驗

本計畫之「動物實驗計畫書」業經動物實驗管理小組 實質 形式
審查通過。本計畫預定飼養應用之動物如下：

動物種類	動物數量	飼養及應用期間
MICE/BALB/c	100 隻	97 年 09 月 01 日至 98 年 08 月 31 日

The animal use protocol listed below has been reviewed and approved by
the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)

Protocol Title : Immunomodulated effect of CLA in mice.
Protocol No : _____
Period of Protocol : Valid From : 09/01/2008 To : 08/31/2009 (mm/dd/yyyy)
Principle Investigator (PI) : Hsieh, Chang-Chi

動物實驗管理小組召集人：

日期：

IACUC Chairman :



Date : 11/11

P31

The lymphoid modulated effect of CLA-enrichment yogurt in mice with OVA induced airway hyperresponsiveness

Han-I Hsieh (謝漢儀), Chang-Chi Hsieh (謝長奇)*

**Department of Animal Science and Biotechnology, Tunghai University,
Taichung, Taiwan.**

No. 181, Sec. 3, Taichung-Harbor Road, Taichung, Tel: 886-4-23590121#37125, cchsieh@thu.edu.tw

Asthma is a chronic disease that affects bronchiolar airways. Conjugated linoleic acid (CLA) play an important role in regulated the lipid metabolism in arachidonic acid. The way to raise the CLA content in the diet without a radical change in eating habits seems to be the enrichment of commonly consumed food products with CLA supplements. In this study, we administered yoghurt with or without CLA and determined the effects of OVA induced airway hyperresponsiveness in BALB/c mice. Leukocytes harvest from lymphoid tissue including spleen, airway draining lymph nodes, mesenteric lymph nodes and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were measurement. Cluster of differentiation markers including CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD45, CD69, CD278, Tim-3, PanNK were used to distinguish the T4, T8, T, B, Treg, NKT, Th1, Th2, Tr1 and Tr2 cells. The results indicated yoghurt and CLA enrichment condition could restore the regulatory T cells (Treg and NKT) that increased the suppressor T cells in modulated immune response. Type 2 environment of the allergic effect was also monitor in this study by CD278 and Tim-3 markers in T4 and Treg cells. Yoghurt and CLA enrichment condition could down regulated the CD278 expression and enhanced the Tim-3 surface marker. It might be the cytokines regulation by IFN- γ , IL-4 and IL-5. Taking these results in conclusion, yoghurt and CLA supplementation might be an idea for modulated airway hypersensitivity.

Keywords: Airway hyperresponsiveness, Cluster of differentiation markers, Conjugated linoleic acid, Yoghurt

附件三 保健食品年會摘要

PA 041

有容金線連複方對氣喘模型小鼠調節過敏體質之研究

黃宜綸^{1,2}、謝長奇²、林秀芳²、陳新雅²、楊景聰²、趙蘭軒²、潘宗廷³、林文川^{4*}
¹朝陽科技大學、²東海大學畜產與生物科技學系、³有容農業生物技術有限公司、
⁴中國醫藥大學醫學系

氣喘是一種影響呼吸道之慢性疾病，依據統計，最近十年來，台北地區學童，氣喘發生率有逐年增加的情形。氣喘發病機制為氣管和支氣管對於特異性刺激，所產生的呼吸道發炎並造成氣管收縮產生過度的反應。金線連對具有調節小鼠的特異性與非特異性免疫反應，但本研究針對氣喘模型之過敏體質調節特別設計了金線連複方組成，希望在卵白蛋白誘發之小鼠過敏性氣喘體質之發生時，具備調節作用，本試驗評估不同濃度之金線連複方(350, 700, 1750 mg/kg)對過敏性氣喘之呼吸道阻力(*enhanced pause, Penh*)，卵白蛋白特異性抗體(anti-OVA Ig)的生成，脾臟與呼吸道週邊淋巴結的淋巴細胞分化與增生等之影響，並以prednisolone (10 mg/kg)為對照組。結果顯示，有容金線連複方可有效調節脾臟重量，降低過敏體質之發生，並有效降低呼吸道阻力，並不易生成卵白蛋白特異性 IgE，對過敏體質有調節作用，由細胞表面抗原分析得知，Th2 分化抗原(CD4+, CD278+)表現有顯著性的降低(P<0.05)。有容金線連複方具備降低 IgE、呼吸道阻力、Th2 分化，我們希望能進一步分析細胞激素的表現，並完整說明有容金線連複方之輔助調節過敏體質，並申請健康食品認證。

關鍵字：有容金線連複方、氣喘、過敏體質、免疫調節

PA 042

The Th1/Th2 modulated effect of CLA-enrichment yoghurt in OVA induced airway hyperresponsiveness

Han-I Hsieh (謝漢儀)、Chang-Chi Hsieh (謝長奇)*

Department of Animal Science and Biotechnology, Tunghai University, Taichung, Taiwan.

Asthma is a chronic disease that affects bronchiolar airways. Conjugated linoleic acid (CLA) play an important role in regulated the lipid metabolism in arachidonic acid. The way to raise the CLA content in the diet without a radical change in eating habits seems to be the enrichment of commonly consumed food products with CLA supplements. In this study, we administered yoghurt with or without CLA and determined the effects of OVA induced airway hyperresponsiveness in BALB/c mice. The *enhanced pause (Penh)* using whole body plethysmography, anti-OVA IgE, IgG1, IgG2a in serum sample, splenocytes proliferation and cytokine production were measured. On day 28, The CFU of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *E. coli* from feces were also measured. The data suggested yoghurt can increase the CFU of probiotics from feces, modulated innate and adapted immunity and regulated the asthmatics murine model in Th1 polarization by increased IFN- γ /IL-4 and Tim-3 cell surface marker. Another results indicated CLA can significant inhibition of allergen-specific IgE production and decrease bronchial contractions. These data suggested yoghurt with or without CLA can modulate Th1/Th2 balance and reduced airway hyperresponsiveness.

Keyword: *Airway* hyperresponsiveness, Anti-OVA IgE, Conjugated linoleic acid, Yoghurt.

附件四 全球華人保健食品大會摘要

potential health benefits of fungal polysaccharides that have implication in disease risk reduction have emerged which include prebiotics and antioxidants. This talk will summarize the above-mentioned health benefits of fungal polysaccharides with an emphasis on the application of fungal polysaccharides as a functional food ingredient.

O-23: CLA-enriched yoghurt down-regulate lung inflammatory cells infiltration in allergic mice

Han-i Hsieh, Yun-chu Wu, Chang-chi Hsieh

Department of Animal Science and Biotechnology, Tunghai University, Taiwan

Conjugated linoleic acid (CLA) plays an important role in regulation of arachidonic acid metabolism and regulates inflammation. In this study, we administered yoghurt with or without CLA, and determined anti-allergic inflammatory effect of OVA-induced airway hyperresponsiveness in BALB/c mice. Inflammatory infiltration of lung and cytokines in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was measurement. The level of H&E and toluidine blue staining of histopathology scores of lung inflammation and mast cell infiltration was determined by microscopy. The results indicated that yoghurt and CLA enrichment can down-regulate IL-6 and TNF-alpha in BALF and mast cell infiltration was also reduced. Yoghurt and CLA enrichment can down-regulate Th2 and enhanced Th1 to modulate T helper cell differentiation, significantly inhibited allergen-specific IgE production, finally decrease bronchial leukocyte infiltration of lung tissue. In conclusion, CLA enriched yoghurt is an idea healthy daily supplement for airway hypersensitivity.

O-24: Study on the stability of the antioxidant activity of high F ratio oligopeptide from egg white

Jing-bo Liu¹, Ying Wang², Song-yi Lin¹, Lin Zheng¹, Yong-guang Yin²

¹Laboratory of Nutrition and Functional Food, College of Quartermaster Technology, Jilin University, P.R. China

² College of Biological and Agricultural Engineering, Jilin University, P.R. China

This research focused on the stability of the antioxidant activity of high F value oligopeptide from egg white which was hydrolyzed both by alacalase and flavorenzyme at the pilot scale. The change of scavenging activity on DPPH of high F ratio oligopeptide from egg white was selected as the index to investigate the effects of temperature, pH, food ingredients and metal ions on it. The results showed that antioxidant activity of high F ratio oligopeptide from egg white was very strong and the IC50 of DPPH free radical reached to 1.07mg/ml. The scavenging activity got to 94.34% when its concentration was 5mg/ml. The high F ratio oligopeptide from egg white disposed for 1h to 3h has a strong heat-resistant ability at 25~100 °C. And It can keep high activity at pH 2~10. Sucrose had no effect on it (P>0.05). Glucose and NaCl changed the activity significantly (P <0.05), and NaCl concentration related to DPPH antioxidant activity positively. K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺, Zn²⁺ ions all improved the antioxidant activity of it in which Fe²⁺, K⁺, Zn²⁺ could enhance the activity significantly (P<0.01 or P<0.05), while Ca²⁺, Mg²⁺ had no significant effect on it.