

東海大學食品科學系碩士班

Master of Food Science

Tunghai University

食品科技組

Food Technology Section

乳酸菌對高血脂症倉鼠之降血脂活性

Hypolipidemic Activities of *Lactobacillus* sp.

in Hyperlipidemic Hamsters

黃思瀚

Si-Han Huang

指導教授：盧錫祺 博士

Advisor: Hsi-Chi Lu, Ph.D.

中華民國一〇七年七月

July, 2018

目錄

摘要.....	1
Abstract.....	2
一、前言.....	3
二、文獻回顧.....	4
2-1 乳酸菌.....	4
2-1-1 乳酸菌的發現.....	4
2-1-2 乳酸菌定義.....	4
2-1-3 乳酸菌分類.....	4
2-1-4 乳酸菌改善腸道菌叢.....	5
2-1-5 乳酸菌調節免疫機能.....	5
2-1-6 乳酸菌降血脂功能.....	6
2-1-6.1 乳酸菌產生膽鹽水解酶.....	6
2-1-6.2 乳酸菌同化膽固醇.....	6
2-1-6.3 乳酸菌產生短鏈脂肪酸抑制 HMG-CoA reductase.....	7
2-1-7 乳酸菌 16S rRNA 基因與菌種鑑別.....	7
2-2 代謝症候群.....	8
2-2-1 代謝症候群定義.....	8
2-2-2 國人十大死因.....	8
2-2-3 心血管疾病.....	8
2-2-4 高血脂症.....	9
2-2-4.1 總膽固醇.....	10
2-2-4.2 三酸甘油酯.....	10
2-2-4.3 低密度脂蛋白膽固醇.....	10
2-2-4.4 高密度脂蛋白膽固醇.....	11

2-2-4.5 游離脂肪酸.....	11
2-3 非酒精性脂肪肝.....	11
2-3-1 非酒精性脂肪肝定義.....	11
2-3-2 天門冬胺酸轉胺酶(AST).....	12
2-3-3 丙胺酸轉胺酶(ALT).....	12
2-4 糞便脂質及膽酸.....	12
2-4-1 糞便脂質.....	12
2-4-2 糞便膽酸.....	12
2-5 肝臟脂肪代謝相關基因.....	13
2-5-1 肝臟脂質代謝路徑.....	13
2-5-2 過氧化酶體增殖物激活受體 α 型(PPAR α).....	14
2-5-3 肝 X 受體 α 型(LXR α).....	14
2-5-4 膽固醇 7 α -羥化酶(CYP7A1).....	14
2-5-5 低密度脂蛋白受體(LDL-R).....	15
2-5-6 固醇調節元件結合蛋白 2 型(SREBP2).....	15
2-5-7 羥甲基戊二酸單醯輔酶 A 還原酶(HMGR).....	15
2-5-8 羥甲基戊二酸單醯輔酶 A 合成酶(HMGS).....	15
2-5-9 固醇調節元件結合蛋白 1c 型(SREBP1c).....	16
2-5-10 脂肪酸合成酶(FAS).....	16
三、研究目的及實驗架構.....	17
3-1 研究目的.....	17
3-2 實驗架構.....	18
四、材料與方法.....	19
4-1 實驗材料.....	19
4-1-1 乳酸菌實驗.....	19
4-1-1.1 試驗菌株.....	19

4-1-1.2 乳酸菌培養及保存相關藥品.....	19
4-1-1.3 乳酸菌 DNA 抽取.....	19
4-1-1.4 鑑定乳酸菌相關 PCR 藥品.....	19
4-1-2 動物實驗.....	20
4-1-2.1 實驗動物模型.....	20
4-1-2.2 飼養動物之相關用品.....	20
4-1-3 動物組織病理分析相關用品.....	20
4-1-4 脂質及膽酸萃取分析相關藥品.....	20
4-1-4.1 糞便膽酸.....	20
4-1-4.2 肝臟及糞便脂質.....	21
4-1-5 肝臟基因表現分析.....	21
4-1-6 主要儀器及設備.....	21
4-2 實驗方法.....	23
4-2-1 乳酸菌培養.....	23
4-2-1.1 培養基配製.....	23
4-2-1.2 菌種活化.....	23
4-2-1.3 菌種保存.....	23
4-2-1.4 乳酸菌計數.....	23
4-2-2 乳酸菌鑑定.....	24
4-2-2.1 乳酸菌 DNA 抽取.....	24
4-2-2.2 乳酸菌 16S rRNA 之聚合酶鏈鎖反應.....	24
4-2-2.3 膽鹽水解酶(Bshpl)之聚合酶鏈鎖反應.....	25
4-2-2.4 乳酸菌定序.....	25
4-2-3 動物實驗及其相關分析測定.....	25
4-2-3.1 實驗動物飼養與分組.....	25
4-2-3.2 誘導倉鼠產生高血脂.....	26

4-2-3.3 實驗動物檢體收集.....	26
4-2-3.4 肝臟及脂肪組織病理分析.....	27
4-2-3.5 糞便膽酸.....	28
4-2-3.6 糞便脂質.....	28
4-2-3.7 肝臟脂質.....	29
4-2-3.8 肝臟基因表現分析.....	30
4-2-4 統計分析.....	32
五、結果.....	33
5-1 乳酸菌相關基因鑑定測試.....	33
5-1-1 16S rRNA gene.....	33
5-1-2 膽鹽水解酶(Bshpl) gene.....	33
5-2 乳酸菌於高膽固醇飲食誘導高血脂症倉鼠之降血脂功效測試.....	33
5-2-1 誘導高血脂症前之倉鼠血清生化數值.....	33
5-2-2 誘導高血脂症後之倉鼠血清生化數值.....	34
5-2-3 乳酸菌對高血脂症倉鼠體重之影響.....	34
5-2-4 乳酸菌對高血脂症倉鼠攝食及攝水量之影響.....	34
5-2-5 乳酸菌對高血脂症倉鼠臟器重量之影響.....	35
5-2-6 乳酸菌對高血脂症倉鼠血液中總膽固醇濃度之影響.....	35
5-2-7 乳酸菌對高血脂症倉鼠血液中三酸甘油酯濃度之影響.....	35
5-2-8 乳酸菌對高血脂症倉鼠血中低密度脂蛋白膽固醇濃度之影響.....	36
5-2-9 乳酸菌對高血脂症倉鼠血中高密度脂蛋白膽固醇濃度之影響.....	36
5-2-10 乳酸菌對高血脂症倉鼠動脈粥狀硬化指數之影響.....	37
5-2-11 乳酸菌對高血脂症倉鼠高密度脂蛋白比率之影響.....	37
5-2-12 乳酸菌對高血脂症倉鼠血中游離脂肪酸濃度之影響.....	37
5-2-13 乳酸菌對高血脂症倉鼠血中天門冬胺酸轉胺酶濃度之影響.....	38
5-2-14 乳酸菌對高血脂症倉鼠血中丙胺酸轉胺酶濃度之影響.....	38

5-2-15 乳酸菌對高血脂症倉鼠肝臟中總膽固醇濃度之影響.....	38
5-2-16 乳酸菌對高血脂症倉鼠肝臟中三酸甘油酯濃度之影響.....	39
5-2-17 乳酸菌對高血脂症倉鼠糞便中總膽固醇濃度之影響.....	39
5-2-18 乳酸菌對高血脂症倉鼠糞便中三酸甘油酯濃度之影響.....	39
5-2-19 乳酸菌對高血脂症倉鼠糞便中膽酸含量之影響.....	40
5-3 肝臟及脂肪組織病理切片	40
5-3-1 乳酸菌對高血脂症倉鼠肝臟外觀病理型態之影響.....	40
5-3-2 乳酸菌對高血脂症倉鼠肝臟組織蘇木紫與伊紅染色之影響.....	41
5-3-3 乳酸菌對高血脂症倉鼠肝臟組織油紅染色之影響.....	41
5-3-4 乳酸菌對高血脂症倉鼠脂肪組織蘇木紫與伊紅染色之影響.....	41
5-4 肝臟脂肪代謝相關基因	42
5-4-1 肝臟中 PPAR α mRNA 相對表現量.....	42
5-4-2 肝臟中 LXR α mRNA 相對表現量	42
5-4-3 肝臟中 CYP7A1 mRNA 相對表現量.....	43
5-4-4 肝臟中 LDL-R mRNA 相對表現量.....	43
5-4-5 肝臟中 SREBP2 mRNA 相對表現量	44
5-4-6 肝臟中 HMGR mRNA 相對表現量	44
5-4-7 肝臟中 HMGS mRNA 相對表現量.....	45
5-4-8 肝臟中 SREBP1c mRNA 相對表現量	45
5-4-9 肝臟中 FAS mRNA 相對表現量	45
六、討論.....	84
6-1 乳酸菌 16S rRNA gene 及 Bshpl 基因.....	84
6-2 乳酸菌對高血脂症倉鼠體重及攝食攝水量之影響.....	85
6-3 乳酸菌對高血脂症倉鼠臟器重量之影響.....	85
6-4 乳酸菌對高血脂症倉鼠血液中脂質之影響.....	86
6-5 乳酸菌對高血脂症倉鼠肝臟中脂質及肝損傷之影響.....	88

6-6 乳酸菌對高血脂症倉鼠糞便中脂質及膽酸之影響	90
6-7 乳酸菌對高血脂症倉鼠肝臟及脂肪組織病理切片分析	91
6-8 乳酸菌對高血脂症倉鼠肝臟脂質代謝路徑之影響	92
七、結論.....	95
參考文獻.....	102



圖目錄

圖一、乳酸菌相關基因分析電泳圖.....	50
圖二、高膽固飲食誘導前倉鼠之血清生化數值.....	51
圖三、高膽固飲食誘導後倉鼠之血清生化數值.....	52
圖四、倉鼠體重變化趨勢.....	53
圖五、乳酸菌對高血脂症倉鼠血液中總膽固醇(TC)濃度之影響.....	54
圖六、乳酸菌對高血脂症倉鼠血液中三酸甘油酯(TG)濃度之影響.....	55
圖七、乳酸菌對高血脂症倉鼠血液中低密度脂蛋白膽固醇(LDL-C)濃度之影響.....	56
圖八、乳酸菌對高血脂症倉鼠血液中高密度脂蛋白膽固醇(HDL-C)濃度之影響.....	57
圖九、乳酸菌對高血脂症倉鼠動脈粥狀硬化指數(AI)之影響.....	58
圖十、乳酸菌對高血脂症倉鼠高密度脂蛋白膽固醇比率(HTR)之影響.....	59
圖十一、乳酸菌對高血脂症倉鼠血液中游離脂肪酸(FFA)濃度之影響.....	60
圖十二、乳酸菌對高血脂症倉鼠血液中天門冬胺酸轉胺酶(AST)濃度之影響.....	61
圖十三、乳酸菌對高血脂症倉鼠血液中丙胺酸轉胺酶(ALT)濃度之影響.....	62
圖十四、乳酸菌對高血脂症倉鼠肝臟中總膽固醇(TC)濃度之影響.....	63
圖十五、乳酸菌對高血脂症倉鼠肝臟中三酸甘油酯(TG)濃度之影響.....	64
圖十六、乳酸菌對高血脂症倉鼠糞便中總膽固醇(TC)濃度之影響.....	65
圖十七、乳酸菌對高血脂症倉鼠糞便中三酸甘油酯(TG)濃度之影響.....	66
圖十八、乳酸菌對高血脂症倉鼠糞便中膽酸(Bile acid)含量之影響.....	67
圖十九、乳酸菌對高血脂症倉鼠肝臟外觀病理型態之影響.....	68
圖二十、乳酸菌對高血脂症倉鼠肝臟組織蘇木紫與伊紅染色(100×)之影響.....	69
圖二十一、乳酸菌對高血脂症倉鼠肝臟組織蘇木紫與伊紅染色(400×)之影響.....	

.....	70
圖二十二、乳酸菌對高血脂症倉鼠肝臟組織油紅染色(100×)之影響	71
圖二十三、乳酸菌對高血脂症倉鼠肝臟組織油紅染色(400×)之影響	72
圖二十四、乳酸菌對高血脂症倉鼠脂肪組織蘇木紫與伊紅染色(100×)之影響	73
圖二十五、乳酸菌對高血脂症倉鼠脂肪組織蘇木紫與伊紅染色(400×)之影響	74
圖二十六、肝臟中過氧化物酶體增植物激活受體 α 型(PPAR α) mRNA 相對表現量	75
圖二十七、肝臟中肝 X 受體 α 型(LXR α) mRNA 相對表現量	76
圖二十八、肝臟中膽固醇 7 α -羥化酶(CYP7A1) mRNA 相對表現量	77
圖二十九、肝臟中低密度脂蛋白受體(LDL-R) mRNA 相對表現量	78
圖三十、肝臟中固醇調節元件結合蛋白 2 型(SREBP2) mRNA 相對表現量	79
圖三十一、肝臟中羥甲基戊二酸單醯輔酶 A 還原酶(HMGR) mRNA 相對表現量	80
圖三十二、肝臟中羥甲基戊二酸單醯輔酶 A 合成酶(HMGS) mRNA 相對表現量	81
圖三十三、肝臟中固醇調節元件結合蛋白 1c 型(SREBP1c) mRNA 相對表現量	82
圖三十四、肝臟中脂肪酸合成酶(FAS) mRNA 相對表現量	83

表目錄

表一、乳酸菌對高血脂症倉鼠體重之影響.....	47
表二、乳酸菌對高血脂症倉鼠攝食及攝水量之影響.....	48
表三、乳酸菌對高血脂症倉鼠臟器重量之影響.....	49



附圖目錄

附圖一、乳酸菌菌體同化膽固醇機制，改自(Tomaro-Duchesneau <i>et al.</i> , 2014)	7
附圖二、肝臟脂質代謝相關基因路徑圖	13
附圖三、本研究傳訊基因路徑圖	96
附圖四、乳酸菌對高血脂症倉鼠餵樣滿 4 週、8 週及 10 週後血液中總膽固醇之影響	97
附圖五、乳酸菌對高血脂症倉鼠餵樣滿 4 週、8 週及 10 週後血液中三酸甘油酯之影響	97
附圖六、乳酸菌對高血脂症倉鼠餵樣滿 4 週、8 週及 10 週後血液中低密度脂蛋白膽固醇之影響	98
附圖七、乳酸菌對高血脂症倉鼠餵樣滿 4 週、8 週及 10 週後血液中高密度脂蛋白膽固醇之影響	98

附表目錄

附表一、高血脂症相關指標數值.....	9
附表二、飼料配方表.....	99
附表三、脂質代謝相關基因引子.....	100
附表四、肝臟脂質代謝相關基因 mRNA 相對表現量整理.....	101



摘要

高血脂為心血管疾病的主要風險因子，當血管中膽固醇過多堆積在管壁，易造成動脈粥狀硬化。乳酸菌被認為是對人體有益之益生菌，可提升免疫力、改善腸道菌叢、降血糖、降血壓及降血脂等。現有研究多未就益生菌改善高血脂之機制來做探討，亦未提及菌體與培養液可能之不同效應。為了探討乳酸菌調降血脂之機制，本研究將敘利亞倉鼠分成正常組(N)、高脂誘導組(HFC)、乳酸菌產品對照組(GM)、純菌體組(C)、純培養液組(L)及菌液組(C+L)等六組。研究結果顯示，餵食 F7-4 乳酸菌後，能降低血液中總膽固醇(TC)、低密度脂蛋白膽固醇(LDL-C)濃度，並提升高密度脂蛋白膽固醇(HDL-C)濃度。肝臟中 TC 及 TG 含量降低，透過 H&E 及油紅染色切片可觀察到肝臟脂質及油滴減少。而糞便中 TC、TG 及膽酸含量提升，表示能將體內多餘的脂質藉由糞便的形式排出體外，進而達到降血脂功效。在脂質代謝基因上，藉由提升 PPAR α 、LXR α 、CYP7A1 及 LDL-R 表現量，可促進肝臟脂質代謝，並清除血液中膽固醇。另外，抑制 SREBP2、HMGR、HMGS、SREBP1c 及 FAS 表現量，可減少肝臟膽固醇及脂肪酸的生成。

Abstract

Hyperlipidemia is a major risk factor for cardiovascular disease. When excess cholesterol is accumulated in the blood vessel, it will easily cause atherosclerosis. Lactic acid bacteria (LAB) are considered beneficial probiotics to the human body, which can enhance immunity, improve the intestinal microbial balance, lower blood sugar, blood lipids and blood pressure. Most of present studies did not address the underlying mechanisms how probiotics improve hyperlipidemia, nor did they mention different effects that many be inherited by microbial cell and their culture media. In this study, Syrian hamsters were divided into six groups to look into the mechanism of hypolipidemic activity: Naïve group (N), high-fat diet control group (HFC), LAB product control group (GM), F7-4 LAB cell group (C), F7-4 LAB supernatant culture liquid (L), F7-4 LAB cell and supernatant culture liquid group (C+L). Our results showed that after feeding with F7-4 LAB, the serum concentration of total cholesterol (TC) and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in hamsters decreased, and the concentration of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) increased. Furthermore, the hepatic contents of TC and TG were reduced, which could also be manifested by H&E and Oil-Red O staining. The fecal TC, TG and bile acid content increased, indicating that excess lipids in the body can be excreted of feces, and in part contributed to the hypolipidemic effect. As for the expression levels of genes related to lipid metabolism, we found that the expression of PPAR α , LXR α , CYP7A1, and LDL-R were upregulated, while of SREBP2, HMGR, HMGS, SREBP1c, and FAS were downregulated, thereby reduce hepatic cholesterol and fatty acid production.

一、前言

近年來隨著科技發達及醫療進步，人口老化的比例逐漸提高，再加上國民普遍缺乏運動習慣，並攝取過量的高糖高脂食物，導致肥胖等文明病產生。代謝症候群為心血管疾病風險因子的統稱，而冠狀動脈發生粥狀硬化是導致心血管疾病的主因，在世界各地皆為主要的發病及死亡原因，平均每年因動脈粥狀硬化死亡的人數超過 37 萬人(Mozaffarian *et al.*, 2015; Salami *et al.*, 2017)。造成動脈粥狀硬化發生的主要風險因子之一為高血脂症，亦即血中脂質濃度過多。當攝入過多的高糖高脂食物後，會導致體內膽固醇及三酸甘油酯增加，腸道吸收後藉由血液循環送至身體各處形成脂肪堆積，而血中的膽固醇濃度過多，便會堆積形成團塊，導致動脈粥狀硬化發生(Wang *et al.*, 2013; Mitchell *et al.*, 2016; Jesch and Carr, 2017)。

乳酸菌為常見的益生菌，其在食品應用已有數千年時間，而乳酸菌的保健功效也廣為人知，有研究指出乳酸菌有利於改善腸道菌叢、調節免疫機能、改善糖尿病及高血脂症(Szajewska *et al.*, 2006; Wells, 2011; Di Cerbo *et al.*, 2016)。許多文獻對乳酸菌的降血脂機制進行探討，大部份是探討以乳酸菌培養發酵後之菌液對血脂的調節，但針對乳酸菌菌體及其上清培養液的個別功效研究則不多。

本研究以動物實驗模擬高脂飲食造成血脂異常，藉由含 0.5% 膽固醇之高脂飼料誘導倉鼠形成高血脂症，再分別餵食乳酸菌純菌體、上清培養液及兩者合併之菌液後，觀察三者各別對倉鼠血脂的調節，並探討肝臟脂質生成代謝機制之調控。

二、文獻回顧

2-1 乳酸菌

2-1-1 乳酸菌的發現

乳酸菌早在數千年前就廣為人類使用於食品或飲品中，如：乳酪、泡菜、酸乳等。約在 20 世紀初期，俄羅斯科學家 Élie Metchnikoff 又稱「乳酸菌之父」，在保加利亞旅遊時，發現當地有許多活超過百歲的長者，因此研究探討當地人長壽的原因，從他們的飲食習慣中發現當地人習慣飲用酸乳，而酸乳之中富含乳酸菌，之後經研究證實，乳酸菌具有改善腸道功能，清除腸道有害菌，因此對人體有很好的益處(Omar *et al.*, 2013; Ranadheera *et al.*, 2014)。

2-1-2 乳酸菌定義

乳酸菌(Lactic Acid Bacteria, LAB)是指能夠代謝醣類來產生 50% 以上乳酸之細菌，為兼性厭氧之革蘭氏陽性菌，無氧環境下生長狀態更佳，主要形態為桿狀或球形。最適生長溫度為 30~37°C，且能存在於 pH 值 5.5~6.5 的環境，主要生長於動物的腸道、糞便，以及植物的樹液等。常見的雙歧桿菌其乳酸產量雖不足 50%，但在保健營養效益上，雙歧桿菌同樣具有安全、健康等乳酸菌所具有之特點。乳酸菌為公認的安全菌種，為益生菌的代表菌種之一 (Leroy and De Vuyst, 2004; Mills *et al.*, 2011; Azizi *et al.*, 2017)。

2-1-3 乳酸菌分類

乳酸菌主要分為乳酸桿菌科(*Lactobacillaceae*)及鏈球菌科(*Streptococcaceae*)兩種。常見乳酸菌屬為(1)乳酸桿菌屬(*Lactobacillus*)、(2)

乳酸球菌屬(*Lactococcus* sp.)、(3)鏈球菌屬(*Streptococcus* sp.)、(4) 雙歧桿菌屬(*Bifidobacterium* sp.)、(5) 徘徊球菌屬(*Vagococcus* sp.)、(6)腸球菌屬(*Enterococcus* sp.)、(7)明串球菌屬(*Leuconostoc* sp.)、(8)肉品桿菌屬(*Carnobacterium* sp.)、(9)有孢子乳酸菌(*Sporolactobacillus* sp.)、(10)四體球菌屬(*Tetragenococcus* sp.)、(11) 足球菌屬(*Pediococcus* sp.)、(12)*Atopobium* 屬、(13)*Weissella*屬、(14)*Abiotrophia*屬、(15)*Granulicatella*屬、(16)*Oenococcus*屬及(17)*Paralactobacillus*屬，其中乳酸桿菌屬占最大宗(Panesar *et al.*, 2007; Salminen and Von Wright, 2004)。

2-1-4 乳酸菌改善腸道菌叢

益生菌的定義為「某一種或數種微生物當餵食予人類或動物時可增進其腸道菌叢之品質」(FAO/WHO, 2001)。乳酸菌能改善腸道菌叢品質可能原因是(1)代謝產生有機酸，導致腸道 pH 值降低，(2)競爭腸道有害菌生長代謝所需養分，(3)附著於腸粘膜上皮，減少有害菌附著、生長，(4)產生抗菌物質等。其中 Dunne 等人的研究證實乳酸菌改善腸道菌叢效果與其附著於腸道能力有關(Dunne *et al.*, 2001)。有許多的發酵產品和乳酸菌相關製劑使用由人體腸道內之分離出乳酸菌，其目的為求增加乳酸菌在人類腸道中的定著性。有研究也證實乳酸菌確實有不錯的整腸效果，也能有效降低腸內不好的菌類，進而改善腸道菌叢分佈(Szajewska *et al.*, 2006)。

2-1-5 乳酸菌調節免疫機能

乳酸菌的免疫調節機能一般認為與其菌體表面的多醣成份有關，有研究顯示乳酸桿菌之菌體能通過腸壁上的淋巴結而進入血液或淋巴系統。另一方面，發現腸道在接觸到某細菌菌體時，即會增加蛋白質基因之表現，而這些物質能活化巨噬細胞，近而調節、增進免疫機能(Wells, 2011)。

2-1-6 乳酸菌降血脂功能

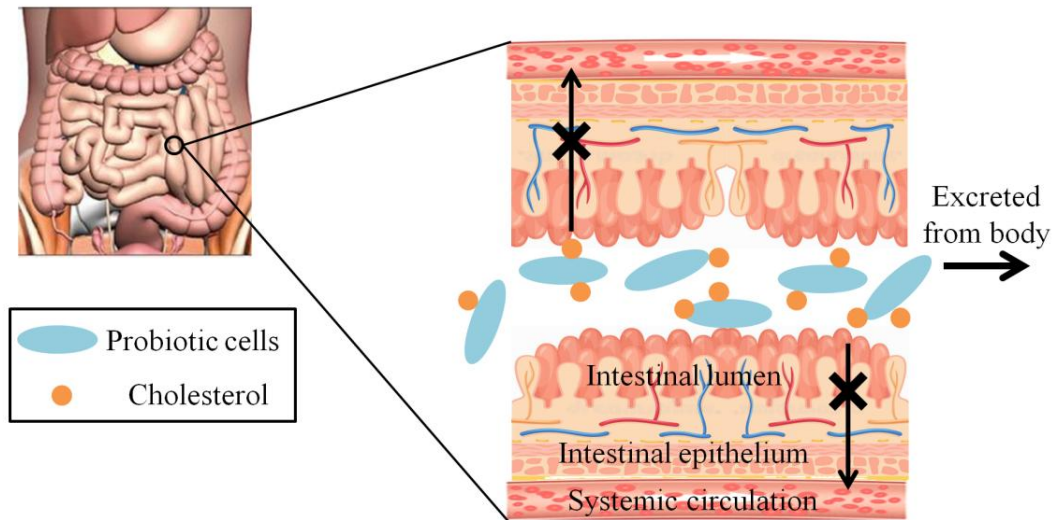
乳酸菌能改善人體健康，如降血糖、降血脂及降血壓等。有研究顯示，乳酸菌調降血脂機制為(1)產生膽鹽水解酶，降低膽酸回收，(2)菌體同化膽固醇，(3)代謝產生有機酸抑制 HMG-CoA reductase 之活性(Di Cerbo *et al.*, 2016)。

2-1-6.1 乳酸菌產生膽鹽水解酶

部分乳酸菌會產生膽鹽水解酶(Bile Salt Hydrolase, BSH)，其功能為將膽鹽分解成游離性膽鹽。因游離性膽鹽親水性較低，所以腸道無法將膽鹽回收利用，進而與糞便結合排出體外。此外，膽固醇微溶於水，人體吸收必需仰賴膽酸結合增加吸收率，膽鹽水解後降低膽固醇之吸收，而膽鹽的合成也需利用膽固醇做為原料，可降低體內膽固醇堆積(Liong MT and Shah NP, 2005; Kumar *et al.*, 2012)。

2-1-6.2 乳酸菌同化膽固醇

乳酸菌菌體具有吸附膽固醇的能力，可將膽固醇吸附在本身細胞膜上形成同化作用(附圖一)，藉由分解代謝成細胞所需養分，進而減少人體腸道膽固醇之吸收(Pereira and Gibson, 2002; Ooi and Liang, 2010)。



附圖一、乳酸菌菌體同化膽固醇機制，改自 (Tomaro-Duchesneau *et al.*, 2014)

2-1-6.3 乳酸菌產生短鏈脂肪酸抑制 HMG-CoA reductase

乳酸菌會代謝產生短鏈脂肪酸 (Short-chain fatty acids, SCFAs)，主要生成的 SCFAs 為醋酸 (Acetate)、丙酸 (Propionate) 及丁酸 (Butyrate) 等。有研究顯示，丁酸可抑制膽固醇產生及提供腸道上皮細胞能量，丙酸會抑制膽固醇、脂肪酸的合成及增加膽酸的排放 (Demigné *et al.*, 1995; Trautwein *et al.*, 1998; den Besten *et al.*, 2013)。羥甲基戊二酸單醯輔酶 A 還原酶 (HMG-CoA reductase) 為膽固醇生成關鍵酵素，有研究顯示，乳酸菌代謝產生之 SCFAs 可抑制 HMG-CoA reductase 之活性，進而減少膽固醇之生成 (Kumar *et al.*, 2012; den Besten *et al.*, 2013; Tsai *et al.*, 2014)。

2-1-7 乳酸菌 16S rRNA 基因與菌種鑑別

微生物在演化過程中 16S rRNA 基因的改變程度較低，利用其結構中 V1~V9 之高度變異區，經 PCR 放大再進行定序，可鑑定乳酸菌之種類 (Rinttila T *et al.*, 2004; Moreira *et al.*, 2005; Foschi *et al.*, 2017)。

2-2 代謝症候群

2-2-1 代謝症候群定義

近年來醫療發達與人口老化，國民運動習慣缺乏、高糖高脂飲食不當，導致肥胖等文明病的產生。代謝症候群為心血管疾病風險因子之總稱，衛生福利部國民健康署公告其標準為(1)腹部肥胖：男性腰圍 $\geq 90\text{cm}$ ，女性腰圍 $\geq 80\text{cm}$)。(2)高血壓：收縮血壓(SBP) $\geq 130\text{mmHg}$ ，舒張血壓(DBP) $\geq 85\text{mmHg}$ 。(3)高血糖：空腹血糖值 $\geq 100\text{mg/dL}$ 。(4)缺少高密度脂蛋白膽固醇(HDL-C)：男性 $< 40\text{mg/dL}$ ，女性 $< 50\text{mg/dL}$ 。(5)高三酸甘油酯(TG) $\geq 150\text{mg/dL}$ 。符合以上項目 3 項或以上，即為代謝症候群(衛生福利部國民健康署, 2016)。

2-2-2 國人十大死因

衛生福利部公佈 2016 年國人十大死因依序為(1)惡性腫瘤(癌症)，(2)心臟疾病，(3)肺炎，(4)腦血管疾病，(5)糖尿病，(6)事故傷害，(7)慢性下呼吸道疾病，(8)高血壓性疾病，(9)腎炎、腎病症候群及腎病變，(10)慢性肝病及肝硬化。代謝症候群相關死因就佔了六項，其中心臟疾病、腦血管疾病和高血壓性疾病為心血管疾病(衛生福利部, 2016)。

2-2-3 心血管疾病

心血管疾病(Cardiovascular Disease, CVD)是冠狀動脈發生粥狀硬化所導致，現在仍是全球發病率和死亡率的主要原因(Mozaffarian *et al.*, 2015)。平均每年因動脈粥狀硬化死亡的人口數超過 37 萬人(Salami *et al.*, 2017)，而動脈粥狀硬化的危險因子包括年齡(男性大於 45 歲，女性大於 55 歲)、家族病史、抽菸、高血糖、高血壓、肥胖、血脂異常等，其中高血脂症為主要影響因素(Gordon *et al.*, 1989; DeFronzo and Ferrannini, 1991; Nelson,

2013b)。

2-2-4 高血脂症

高血脂症為血中脂質濃度異常，會導致心臟疾病、腦中風、高血壓、及糖尿病等慢性疾病，血脂包含膽固醇(Cholesterol)及三酸甘油酯(Triglyceride)，當其中之一或兩者皆超過正常值時，即稱為高血脂症(Mitchell *et al.*, 2016)。表一為高血脂症相關指標數值。

附表一、高血脂症相關指標數值

Total Cholesterol (mg/dL)		Triglycerides (mg/dL)		LDL Cholesterol (mg/dL)		HDL Cholesterol (mg/dL)	
< 200	正常	< 150	正常	< 100	正常	< 40	較少
200 – 239	邊際 危險	150 – 199	邊際 危險	100 – 129	較正 常	≥ 60	正常
≥ 240	高危 險	200 – 499	高危 險	130 – 159	邊際 危險		
		≥ 500	極高 危險	160 – 189	高危 險		

改自(Nelson, 2013b)

2-2-4.1 總膽固醇

總膽固醇(Total Cholesterol, TC)主要包含低密度脂蛋白膽固醇(LDL-C)及高密度脂蛋白膽固醇(HDL-C)，血液中膽固醇來源分兩部份(1)細胞自行合成，為內生性膽固醇。(2)藉由飲食攝取動物性食物，如動物的腦、肝、腎及蛋黃等外生性膽固醇。食物中的膽固醇及三酸甘油酯經小腸吸收後，小腸黏膜可製造乳糜微粒，將脂肪帶入淋巴系統，再經由胸管進入血液循環中(Jesch and Carr, 2017)。而體內膽固醇濃度過高會造成膽固醇堆積於肝臟形成脂肪肝，或是血管膽固醇堆積形成動脈粥狀硬化，併發心血管疾病(Wang *et al.*, 2013)。

2-2-4.2 三酸甘油酯

三酸甘油酯(Triglycerides, TG)為中性脂肪，血液中三酸甘油酯來源分兩部份(1)細胞於肝臟自行合成，再釋放入血液。(2)腸道吸收食物中的脂肪，經過消化吸收後，三酸甘油酯以乳糜微粒的形式進入淋巴系統，再帶入血液循環。而三酸甘油酯過高及高密度脂蛋白膽固醇降低，會造成血液過於粘稠，使膽固醇堆積於血管內，會增加罹患心血管疾病的危險，也容易造成急性胰臟發炎(Goldberg *et al.*, 2011; Joseph *et al.*, 2014)。

2-2-4.3 低密度脂蛋白膽固醇

低密度脂蛋白膽固醇(Low-Density Lipoprotein Cholesterol, LDL-C)，其功用為與膽固醇及三酸甘油酯結合後，從肝臟與小腸利用血液循環運送至各細胞組織，運送過程中過多的 LDL-C 累積於血管中易造成動脈粥狀硬化，所以 LDL-C 常稱做「壞的膽固醇」(Mitchell *et al.*, 2016; Lawler *et al.*, 2017)。

2-2-4.4 高密度脂蛋白膽固醇

高密度脂蛋白膽固醇(High-Density Lipoprotein Cholesterol, HDL-C)，其主要功能為運送膽固醇，人體約 30%之膽固醇是利用 HDL-C 運送。HDL-C 能將血液中的動脈硬化塊及膽固醇送回肝臟進行代謝排除。有研究表示其濃度增加，有助於減少動脈粥狀硬化的發生，因此常稱做「好的膽固醇」(Besler *et al.*, 2012; Salazar *et al.*, 2015)。

2-2-4.5 游離脂肪酸

游離脂肪酸(Free Fatty Acid, FFA)，脂肪組織增加時會釋放大量的 FFA，在肝臟中 FFA 會造成葡萄糖和三酸甘油酯增加，進而減少 HDL-C 濃度及增加 LDL-C。過多的 FFA 會增加三酸甘油酯之累積，增加罹患心血管疾病及產生脂肪肝之風險(Gambino *et al.*, 2016)。

2-3 非酒精性脂肪肝

2-3-1 非酒精性脂肪肝定義

非酒精性脂肪肝(Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD)，為常見的肝功能異常原因之一，成因為肥胖、糖尿病及高血脂症等引起。正常的肝臟約有 3~5%的脂肪，當肝臟脂肪累積超過正常範圍，即會形成脂肪肝，而肝功能指數天門冬胺酸轉胺酶(Aspartate Aminotransferase, AST)及丙胺酸轉胺酶(Alanine Aminotransferase, ALT)則會異常的升高。脂肪肝為可逆性反應，控制飲食且保持正常生活習慣就有機會改善，但若持續累積肝臟脂肪堆積，則會引起更嚴重的病變，如肝硬化及肝癌(Machado and Cortez-Pinto, 2014; Temple *et al.*, 2016)。

2-3-2 天門冬胺酸轉胺酶(AST)

天門冬胺酸轉胺酶(Aspartate Aminotransferase, AST)，其主要存在於心臟、肝臟、腎臟等。當這些臟器受損時 AST 會釋放至血液中，但其較不具專一性，但仍能輔助肝功能異常的檢測(Weng *et al.*, 2015; McGill, 2016)。

2-3-3 丙胺酸轉胺酶(ALT)

丙胺酸轉胺酶(Alanine Aminotransferase, ALT)，其主要存在於肝臟細胞中，當肝臟損傷時，會將 ALT 釋放至血液中，使 ALT 濃度提升。而 ALT 其專一性較高，因此當作主要肝功能異常判斷之數值(Weng *et al.*, 2015; McGill, 2016)。

2-4 糞便脂質及膽酸

2-4-1 糞便脂質

排泄作用是生物將代謝廢物排出體外的一個重要過程，而糞便則是其中途徑之一。體內多餘的脂質可以藉由腸道微生物吸收後吸附在糞便上排出體外，因此糞便脂質濃度增加能間接減少體內脂質累積(Sugimoto-Kawabata *et al.*, 2013; Jesch and Carr, 2017)。

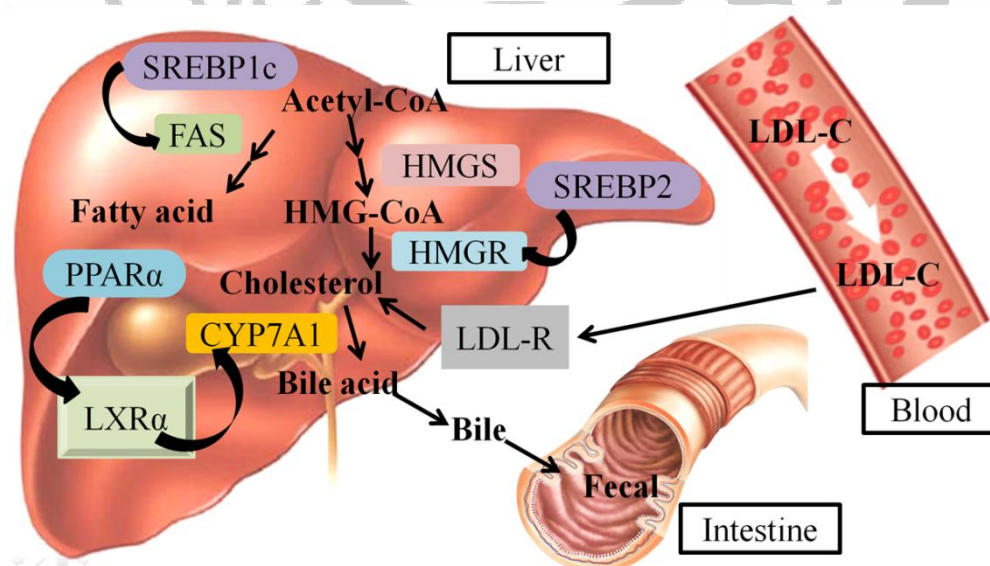
2-4-2 糞便膽酸

膽酸(Bile Acid)為膽汁的主要成份，腸道內脂肪的吸收需藉由膽酸乳化脂肪後才可以進行吸收，膽酸存在於肝臟中，其主要的原料為肝臟中的膽固醇。而膽鹽水解酶(BSH)可將膽酸水解成游離性膽鹽，造成膽酸無法被回收至肝臟。因此在糞便中觀察到膽酸含量較高，則表示膽酸回收量減少，腸道膽固醇吸收下降，且增加膽酸製造加速肝臟膽固醇消耗(Kumar *et al.*, 2012; Jesch and Carr, 2017)。

2-5 肝臟脂肪代謝相關基因

2-5-1 肝臟脂質代謝路徑

肝臟為人體代謝重要器官，而脂質代謝主要也在此臟器進行。肝臟內含有許多脂質代謝相關基因路徑，如附圖二顯示。其中 PPAR α 為肝臟脂質代謝主要的調節因子，PPAR α 經過活化後會增加 LXR α 的活性(Li and Glass, 2004)，使得下游因子 CYP7A1 受到調控活化，進而增加膽酸生成，幫助加速消耗肝中累積的膽固醇(Zhang *et al.*, 2012)。而肝臟表面的 LDL-R 會將血液中的 LDL-C 帶入肝臟中形成膽固醇，減少血液中膽固醇之累積(Zhang *et al.*, 2016)。而轉錄因子 SREBP2 活化會使其下游 HMGR 基因表現量，進而使更多 HMG-CoA 轉換成膽固醇。另外，HMGS 表現量降低則會抑制 Acetyl-CoA 及 AcAc-CoA 轉換成 HMG-CoA，間接抑制膽固醇合成。肝臟中脂肪酸由 FAS 進行調控，其上游轉錄因子 SREBP1c 活化，造成 FAS 表現量提升，進而增加肝臟脂肪酸之生成(Jensen-Urstad and Semenkovich, 2012; Kolehmainen *et al.*, 2012)。



附圖二、肝臟脂質代謝相關基因路徑圖

2-5-2 過氧化酶體增植物激活受體 α 型(PPAR α)

過氧化酶體增植物活化受體(Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha, PPAR)為核受體超級家族成員，具有轉錄因子功能，可以調控基因表現，與脂質代謝有密切關係(Michalik *et al.*, 2006)，PPAR 有 PPAR- α 、PPAR- β 和 PPAR- γ 三種亞型。PPAR- β 遍佈於全身，在骨骼肌及棕色脂肪中可控制脂肪酸代謝；PPAR- γ 主要存在脂肪細胞中，為脂肪細胞主要調控因子，與脂肪帶入與生成有關；PPAR- α 主要存在於肝臟中，負責調控脂質的代謝，PPAR- α 活化後可增加 HDL-C 及減少 TG 累積，降低動脈粥狀硬化的發生，PPAR- α 調控下游 LXR α 的基因表現，幫助脂質代謝相關基因活化(Staels *et al.*, 1998; More *et al.*, 2017)。

2-5-3 肝 X 受體 α 型(LXR α)

肝 X 受體(Liver X Receptor, LXR)為核受體超家族轉錄因子的一員，是膽固醇與脂質調節的重要因子，有 LXR α 及 LXR β 兩個亞型。LXR β 存在於全身各細胞中；LXR α 主要存在於肝臟，有研究指出，LXR α 活化能減少腸道膽固醇吸收及增加肝中膽固醇的排出，LXR α 也調控下游 CYP7A1 基因表現，幫助調控膽鹽生成(Calkin and Tontonoz, 2010)。

2-5-4 膽固醇 7 α -羥化酶(CYP7A1)

膽固醇 7 α -羥化酶(Cholesterol 7 alpha-hydroxylase, CYP7A1)為調控膽酸合成之限速酶，其表現量提升能促使肝臟中的膽固醇作為原料，合成膽酸釋放到腸道中，可幫助消耗肝臟中累積的膽固醇，減少脂肪肝的發生(Li *et al.*, 2013; Qi *et al.*, 2015; Ferrell *et al.*, 2016)。

2-5-5 低密度脂蛋白受體(LDL-R)

低密度脂蛋白受體(Low-Density Lipoprotein Receptor, LDL-R)分布於肝臟、動脈壁平滑肌細胞、血管內皮細胞、淋巴細胞等。LDL-R 能將 LDL-C 吞入細胞內，使細胞從而獲取膽固醇，此代謝過程稱為 LDL 受體途徑。肝臟表面的 LDL-R 會將血液中的 LDL-C 帶入到肝臟內形成膽固醇代謝，進而減少血液中膽固醇的堆積(Orekhov *et al.*, 2014; Paththinige *et al.*, 2017)。

2-5-6 固醇調節元件結合蛋白 2 型(SREBP2)

固醇調節元件結合蛋白(Sterol Regulatory Element-Binding Protein, SREBP)為 basic helix-loop-helix-leucine zipper (bHLH-Zip) 家族的轉錄因子，SREBP 主要有 SREBP1a、SREBP1c 及 SREBP2 三種亞型。SREBP2 為調控膽固醇合成的主要因子，當 SREBP2 的活性降低，其下游基因 HMGR 也會受到抑制，進而減少肝臟膽固醇之生成(Haskins *et al.*, 2015)。

2-5-7 羧甲基戊二酸單醯輔酶 A 還原酶(HMGR)

羧甲基戊二酸單醯輔酶 A 還原酶(HMG-CoA Reductase, HMGR)為產生膽固醇等類異戊二烯化合物的甲羧戊酸代謝途徑中的限速酶，會使 HMG-CoA 進行還原反應，使其最終形成膽固醇累積於肝臟中。HMGR 會受到 LDL-C 抑制，進而激活 LDL-R 的表現，幫助將血中 LDL 帶入到肝臟中代謝，減少動脈粥狀硬化發生(DeBose-Boyd, 2008; Xu *et al.*, 2016)。

2-5-8 羧甲基戊二酸單醯輔酶 A 合成酶(HMGS)

羧甲基戊二酸單醯輔酶 A 合成酶(HMG-CoA Synthase, HMGS)為一種粒線體酶，其使 Acetyl-CoA 及 AcAc-CoA 合成為 HMG-CoA，HMGS 雖然未直接參與脂質代謝調控，但其表現量抑制能使 HMG-CoA 表現減少，降

低轉換成膽固醇之可能(Cotter *et al.*, 2013; Mazein *et al.*, 2013)。

2-5-9 固醇調節元件結合蛋白 1c 型(SREBP1c)

固醇調節元件結合蛋白(Sterol Regulatory Element-Binding Protein, SREBP)為 basic helix-loop-helix-leucine zipper (bHLH-Zip)家族的轉錄因子，SREBP 主要有 SREBP1a、SREBP1c 及 SREBP2 三種亞型。SREBP1a 可調控膽固醇及脂質的合成；SREBP1c 主要是調控脂肪酸的合成，其活化後會使下游基因 FAS 表現量提生，進而造成肝臟內三酸甘油酯過多形成脂肪肝及增加內臟脂肪量(Knebel *et al.*, 2012; Miyata *et al.*, 2015)。

2-5-10 脂肪酸合成酶(FAS)

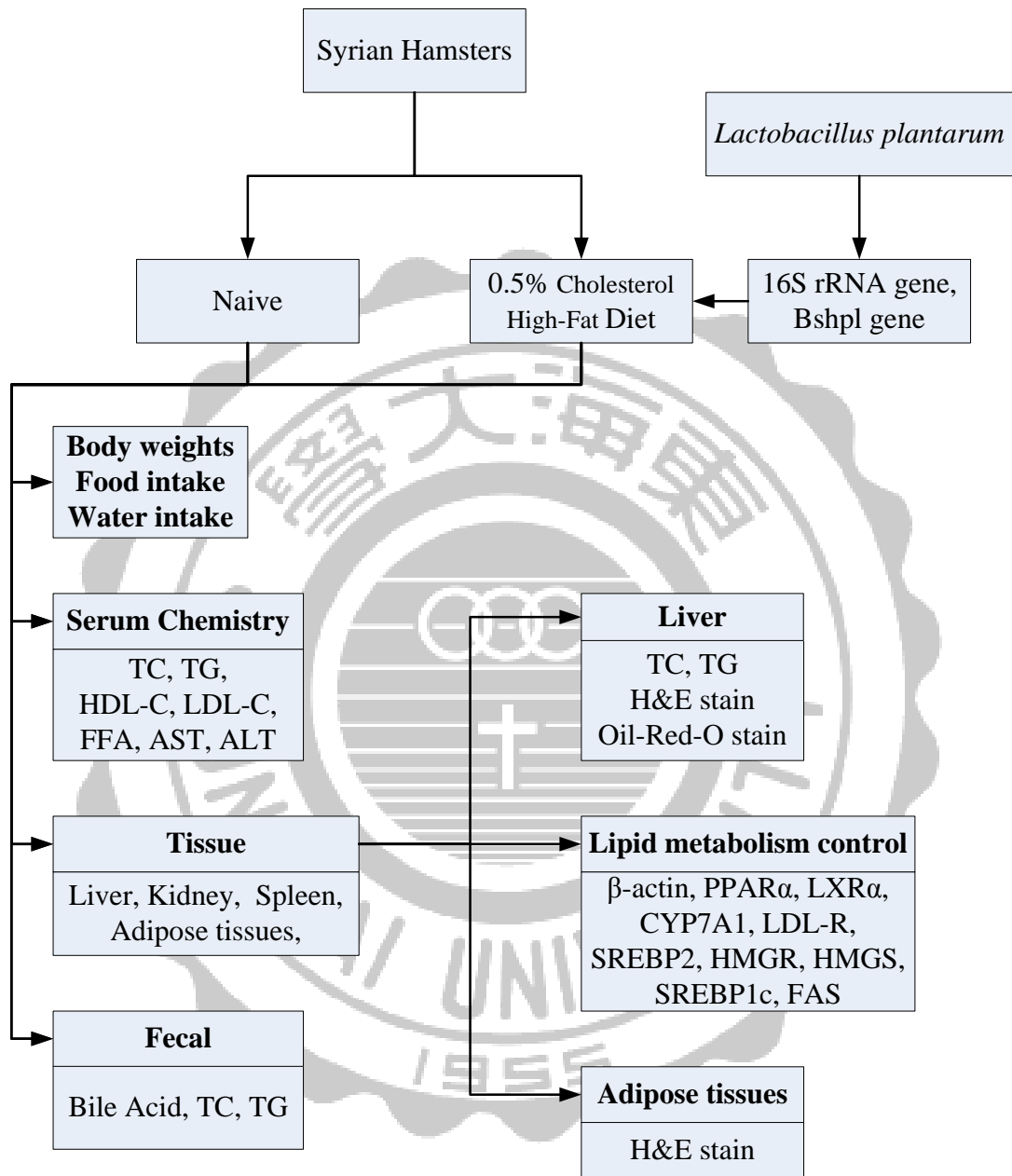
脂肪酸合成酶(Fatty Acid Synthase, FAS)可調控 Acetyl-CoA 及 Malonyl-CoA 形成脂肪酸，FAS 受上游 SREBP1c 基因調控，FAS 表現量上升會使肝臟中脂肪酸增加，並且提高肥胖和高血脂症的發生(Jensen-Urstad and Semenkovich, 2012)。

三、研究目的及實驗架構

3-1 研究目的

為了探討乳酸菌調節血脂之功效，本研究將 4 週齡雄性敘利亞倉鼠隨機分為 6 組，分別為正常組(N)，攝食正常對照飼料；高脂誘導組(HFC)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料；乳酸菌產品對照組(GM)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵景岳樂亦纖乳酸菌產品；純菌體組(C)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 F7-4 乳酸菌純菌體；純培養液組(L)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 F7-4 乳酸菌純上清培養液；菌液組(C+L)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 F7-4 乳酸菌菌液。將檢測乳酸菌 16S rRNA 確定其分類，並檢測其是否含有膽鹽水解酶基因。利用血清測定血中 TC、TG、LDL-C 濃度，判斷血脂異常指標；檢測肝臟脂質濃度搭配組織切片染色，觀察肝臟脂質累積及其對組織影響；糞便脂質及膽酸濃度測定，判斷脂質排出體外狀況；藉由同步定量聚合酶鏈鎖反應，測定肝臟基因 PPAR α , LXR α , LDLR, CYP7A1, SREBP2, HMGR, HMGS, SREBP1c, FAS，判斷肝臟脂質代謝變化。

3-2 實驗架構



四、材料與方法

4-1 實驗材料

4-1-1 乳酸菌實驗

4-1-1.1 試驗菌株

由姚佳伶、滕逸林學姊於先前自泡菜發酵食品分離之乳酸菌中篩選出代號 F7-4 菌株為本研究樣品，經 16S rRNA 定序後鑑定為 *Lactobacillus plantarum*。

4-1-1.2 乳酸菌培養及保存相關藥品

Lactobaccilli MRS Broth 購自 Difco (MD, USA)。L-cysteine 購自 Sigma (MO, USA)。Agar 購自 Difco (MI, USA)。Glycerol 購自 Panreac (Barcelona, Spain)。

4-1-1.3 乳酸菌 DNA 抽取

ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ kit 購自 ZYMO RESEARCH (USA)。

4-1-1.4 鑑定乳酸菌相關 PCR 藥品

Primer 合成自生工有限公司 (Taipei, Taiwan)。AmpliTaq Gold® PCR Master Mix 購自 Roche (Basel, Switzerland)。菌種核酸定序委託源資國際生物科技股份有限公司。

4-1-2 動物實驗

4-1-2.1 實驗動物模型

4 週齡雄性敘利亞倉鼠(Syrian hamster)，購自國家實驗動物中心(National Laboratory Animal Center, Taipei, Taiwan)。

4-1-2.2 飼養動物之相關用品

Research Diets, Inc 實驗動物飼料之正常對照飼料(D12106C)和含 0.5% (w/w)膽固醇高脂飼料(D12107C)購自鴻洺科技有限公司(Taichung, Taiwan)。景岳樂亦纖® 乳酸菌膠囊購自景岳生物科技股份有限公司(Tainan, Taiwan)。餵食管購自捷陞科技股份有限公司(Taichung, Taiwan)。3 mL 針筒購自 TERUMO (Yangzhou, China)。

4-1-3 動物組織病理分析相關用品

Formaldehyde 購自 Sigma (USA)。Sucrose 購自波仕特生物科技股份有限公司(Taichung, Taiwan)。Optimum Cutting Temperature (O.C.T.) Compound 購自 SAKURA (USA)。載玻片購自 MENZEL-GLASER (Germany)。蓋玻片購自 Deckglaser (Germany)。Oil Red O 購自 Sigma (USA)。Isopropanol 購自景明化工(Miaoli, Taiwan)。

4-1-4 脂質及膽酸萃取分析相關藥品

4-1-4.1 糞便膽酸

99.9%絕對酒精、Petroleum Ether 及 Methanol 購自景明化工(Miaoli, Taiwan)。RANDOX 膽酸套組(BI 2672)購自醫誠有限公司(Taipei, Taiwan)。

4-1-4.2 肝臟及糞便脂質

Hexane 購自 TEDIA (USA)。0.9%生理食鹽水購自信東生技股份有限公司(Taoyuan, Taiwan)。RANDOX 膽固醇套組(CH 201)及 RANDOX 三酸甘油酯套組(TR 213)購自醫誠有限公司(Taipei, Taiwan)。第三丁醇(*tert*-butyl alcohol)、Octyl Phenol Ethoxylate (Triton X-100)及 Chloroform 購自友和貿易股份有限公司(New Taipei City, Taiwan)。Methanol 購自景明化工(Miaoli, Taiwan)。

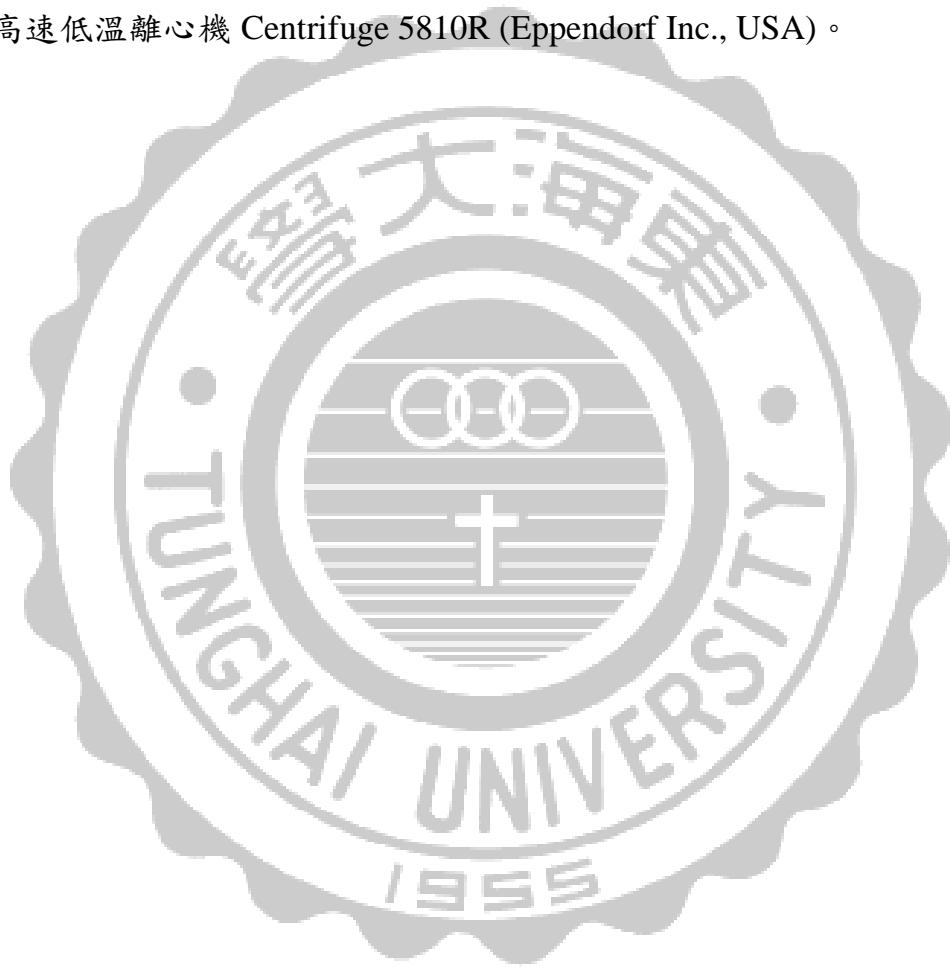
4-1-5 肝臟基因表現分析

肝臟 mRNA 抽取利用 Total RNA Miniprep Purification kit，購自捷恩麥克生物科技(Taichung, Taiwan)。70% Ethanol 購自景明化工(Miaoli, Taiwan)。研磨棒購自勤研科技有限公司。將 mRNA 反轉錄成 cDNA 利用 iScript™ cDNA Synthesis Kit，購自 Bio-Rad (USA)。同步定量聚合酶鏈鎖反應 (Real-time qPCR)之 Primer 合成自正茂生物科技有限公司(Taichung, Taiwan)。反應試劑 iTaq™ SYBR® Green Supermix 購自 Bio-Rad (USA)。

4-1-6 主要儀器及設備

1. 震盪機 Vortex (型號 Vortex-2 genie)(Scientific Industries, USA)。
2. Real-time PCR (型號 ABI PRISM StepOne)(Applied Biosystem, USA)。
3. 桌上行離心機(型號 5415D)(Eppendorf, Germany)。
4. 照膠器(型號 ChampGel 5000)(SAGECREATION, China)。
5. 簡易離心機(型號 UFO-2100)(汎泰儀器有限公司, Taiwan)。
6. 無菌操作台(Bellco, USA)。
7. 電源供應器(型號 MP-250N)(Major Science, Taiwan)。
8. Peltier Thermal Cycler (型號 PTC-200)(MJ Research, USA)。

9. 正立式顯微鏡 Nikon E-200/D70 (國祥貿易股份有限公司, Taiwan)。
10. 顯微鏡/傳輸器 Nikon TS-100/DS-U2 (國祥貿易股份有限公司, Taiwan)。
11. 冷凍切片機 LEICA CM3050S (友聯光學有限公司, Taiwan)。
12. 酵素免疫分析儀 ELISA reader (Thermo, USA)。
13. 乾浴槽 MC-01S (Major Science, Taiwan)。
14. 高速低溫離心機 Centrifuge 5810R (Eppendorf Inc., USA)。



4-2 實驗方法

4-2-1 乳酸菌培養

4-2-1.1 培養基配製

以 5.5g MRS 粉末、0.05g 0.05%~0.1% Cysteine 與 100mL 滅菌二次水混合滅菌後得培養液，即為液態培養基。

4-2-1.2 菌種活化

本研究之乳酸菌為姚佳伶、滕逸林學姊於先前自泡菜發酵食品分離之乳酸菌。將凍存之乳酸菌 F7-4 接種約 100 μL 至含 10 mL 液態 MRS 培養基之 15 mL 離心管中，並置於 37°C 培養箱培養 24 小時進行第一次活化菌株。將完成第一次活化之乳酸菌菌液取約 100 μL 至含 10 mL 液態 MRS 培養基之 15 mL 離心管中，並置於 37°C 培養箱培養 16~18 小時進行第二次活化菌株。待第二次活化完成後，即可得到濃度 10^9 CFU/mL 之乳酸菌樣品。

4-2-1.3 菌種保存

取 700 μL 的菌液及 300 μL 的甘油，震盪使其混合均勻，再置於 -80°C 凍箱保存備用。

4-2-1.4 乳酸菌計數

將培養好之乳酸菌，利用 PBS 進行序列稀釋，取 100 μL 於培養盤中，再倒入 MRS agar 混合均勻，待其凝固完全後，置於 37°C 培養 48 小時觀察其菌落。

4-2-2 乳酸菌鑑定

4-2-2.1 乳酸菌 DNA 抽取

使用 ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ kit，取 1 mL 乳酸菌菌液，於 25°C 下以 12000 rpm 離心 2 分鐘，去除上清液。將沉澱物以 200 μL PBS 復溶後，取至 2R BashingBead™ Lysis tube 中，並加入 750 μL Lysis Solution 至 Lysis tube 中震盪 5 分鐘後，於 25°C 下以 10000 rpm 離心 1 分鐘。取上清液 400 μL 至 Zymo - spin™ IV Spin Filter，於 25°C 下以 7000 rpm 離心 1 分鐘。將 1200 μL Fungal/Bacterial DNA Binding buffer 加入含有濾液之 collection tube，分兩次各取 800 μL 混合液至 Zymo - spin™ II 管柱，於 25°C 下以 10000 rpm 離心 1 分鐘，去除濾液。加入 200 μL DNA pre wash buffer 至管柱中，於 25°C 下以 10000 rpm 離心 1 分鐘，去除濾液。再加入 fungal/Bacterial DNA wash buffer 至管柱中，於 25°C 下以 10000 rpm 離心 1 分鐘，去除濾液。將管柱放至新 tube 中，加入 25~100 μL DNA Elution buffer，在室溫靜置 2 分鐘後，於 25°C 下以 10000 rpm 離心 30 秒，即可取得乳酸菌之 DNA，置於 -80°C 凍箱備用。

4-2-2.2 乳酸菌 16S rRNA 之聚合酶鏈鎖反應

在 0.2 mL 微量離心管先加入配製好的 PCR 反應液 19 μL，其組成份內含 0.5 μL 之 200 μM dNTP，2.5 μL 之 10× PCR buffer，0.5 μL 之 Lac16s primers，0.5 μL 之 MgCl₂，0.1 μL 之 Taq DNA polymerase 及無菌去離子水，再加入 1 μL 之目標菌體 genomic DNA。而後置入 PCR thermocycler 進行反應，反應條件為活化循環 94°C、1 分鐘，黏合溫度 52°C、30 秒，延長反應溫度 72°C、30 秒，重複 30 個循環。分析時取 5 μL PCR 反應產物及 1 μL Safe Dye 混合，以 1.5% agarose 於 0.5× TAE buffer 中進行電泳分析，以藍光觀察後拍照，可得目標產物大小約為 341 bp。

4-2-2.3 膽鹽水解酶(Bshpl)之聚合酶鏈鎖反應

在 0.2 mL 微量離心管先加入配製好的 PCR 反應液 19 μL ，其組成份內含 0.5 μL 之 200 μM dNTP，2.5 μL 之 10 \times PCR buffer，0.5 μL 之 Bshpl primers，0.5 μL 之 MgCl_2 ，0.1 μL 之 Taq DNA polymerase 及無菌去離子水，再加入 1 μL 之目標菌體 genomic DNA。而後置入 PCR thermocycler 進行反應，反應條件為活化循環 94 $^{\circ}\text{C}$ 、20 秒，黏合溫度 60 $^{\circ}\text{C}$ 、30 秒，延長反應溫度 72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 分鐘，重複 35 個循環。分析時取 5 μL PCR 反應產物及 1 μL Safe Dye 混合，以 1.5% agarose 於 0.5 \times TAE buffer 中進行電泳分析，以藍光觀察後拍照，可得目標產物大小約為 975 bp。

4-2-2.4 乳酸菌定序

將擴增後 Lac16S 之 PCR 產物，交由源資國際生物科技股份有限公司進行核酸定序，將序列結果與基因庫(Genbank)進行比對，可判定本研究之菌株為 *Lactobacillus plantarum*。

4-2-3 動物實驗及其相關分析測定

4-2-3.1 實驗動物飼養與分組

經彰化基督教醫院實驗動物照護及使用委員會審定後，核可編號為 CCH-AE-106-001。自國家實驗動物中心購入 38 隻 4 週齡雄性敘利亞倉鼠 (Syrian hamster)，予充足的飲水和 D12106C 正常對照飼料進入適應期一週。適應期後每隻倉鼠體重 74.1g 至 106.2g，平均 91.94g，採 S 型分配法每 2~3 隻分配於一籠架，共 14 籠，共分為 6 組，每組 6~7 隻。各組皆提供充足飲用 RO 水，正常組(N, n=7)，攝食正常對照飼料(D12106C)；高脂誘導組(HFC, n=7)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料(D12107C)；乳酸菌產品對照組(GM, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵飼食 1 mL 含 10⁹

CFU/mL 之景岳樂亦纖乳酸菌產品；純菌體組(C, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵飼食 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌純菌體；純培養液組(L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵飼食 1 mL 之 F7-4 乳酸菌純上清培養液；菌液組(C+L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵飼食 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌菌液。給予小鼠光照循環 12 小時光、12 小時暗，飼料及飲水均自由採食，定時記錄倉鼠體重、攝食量及飲水量。犧牲時以 Isoflurane 麻醉，當其昏睡後以指尖測試其四肢反應，確定無反應時進行肝門靜脈採血收集血液，之後採集必要之組織臟器。

4-2-3.2 誘導倉鼠產生高血脂

將實驗動物預養至 5 週齡，除了 N 組攝食 D12106C 正常對照組飼料以外，其餘 HFC、GM、C、L、C+L 組皆攝食 D12107C 含 0.5% 膽固醇之高脂飼料，誘導 14 天後，進行眼窩採血測定其血清生化數值(TC、TG、HDL、LDL)。

4-2-3.3 實驗動物檢體收集

(1) 血液：

將倉鼠禁食 16~18 小時，以 Isoflurane 麻醉後，使用肝門靜脈採血收集血液，將收集好之血液於室溫靜置 30 分鐘待其凝血，再於 4°C 下，以 3000~3500 rpm 離心 10~15 分鐘，取其血清送至彰化市大華醫事檢驗所，測定血液中 AST、ALT、TC、TG、HDL、LDL、FFA。

(2) 肝臟：

倉鼠犧牲後，取其完整肝臟以 PBS 清洗乾淨後秤重並拍照紀錄，另外，將肝臟分切，將對半之肝臟心形葉分別泡入福馬林和 15% 蔗糖水溶液待切片分析，其餘置於-80°C 凍箱備用。

(3) 脾臟、腎臟：

倉鼠犧牲後，取其脾臟及腎臟以 PBS 清洗乾淨後秤重後，於-80°C 凍箱備用。

(4) 脂肪組織：

倉鼠犧牲後，取腹部脂肪、副睪脂肪及腎周脂肪秤重，分析內臟脂肪含量，並取部分脂肪泡入福馬林待切片分析，其餘置於-80°C 凍箱備用。

4-2-3.4 肝臟及脂肪組織病理分析

(1) HE 染色(H&E stain)：

倉鼠犧牲後，取一半肝臟心形葉及部分腹部脂肪泡入 10% 福馬林中 48 小時後，待其組織固定，經龐德生技有限公司將組織製做成蠟塊後，薄切製成組織切片，再以 H&E (hematoxylin and eosin stain) 進行組織染色，以顯微鏡觀察脂肪空泡堆積狀況。

(2) 油紅染色(Oil Red O Stain)：

倉鼠犧牲後，取一半肝臟心形葉泡入 15% 蔗糖水溶液中 24 小時後，再置換至 30% 蔗糖水溶液中 24 小時，最後以冷凍包埋劑將組織包埋，置於-20°C 凍箱內保存。待其成形後，以冷凍切片機切成薄片，固定於載玻片上，以 50% Isopropanol 浸泡約 10 分鐘，去除多餘之冷凍包埋劑，再浸泡於油

紅染劑內搖晃染色約 30 分鐘，染色完畢後再以 50% Isopropanol 清洗約 10 分鐘，將多餘染劑去除，最後以 60% glycerol 水溶性封片膠和蓋上蓋玻片進行封片，以顯微鏡觀察肝臟脂肪之分佈狀況。

4-2-3.5 糞便膽酸

(1) 糞便膽酸萃取

取約 0.5 g 之倉鼠糞便粉末至 15 mL 離心管，加入 5 mL 絕對酒精混合，於 25°C 下以 1800 × g 離心 15 分鐘，再取出上清液進行真空濃縮乾燥，重複操作三次，再於乾燥後的試管內加入 10 mL 石油醚後，1800 × g 離心 15 分鐘，去除上清液，重複操作兩次，沉澱物以甲醇溶解定量至 10 mL，將樣品置於 -20°C 凍箱備用。

(2) 糞便膽酸分析

將樣品與 RANDOX (BI 2672) 試劑 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase 及 Diaphorase 作用，會產生藍紫色 Formazan 衍生物，在波長 546 nm 下可測得吸光值，對照標準曲線可測得濃度 (concentration = ΔA sample / ΔA calibrator × concentration of calibrator)。

4-2-3.6 糞便脂質

(1) 糞便膽固醇、三酸甘油酯萃取

取約 0.1 g 之倉鼠糞便粉末至 15 mL 離心管，加入 1.5 mL 的 methanol 均質約 10 秒(重複 3 次)。均質完畢後，於離心管中加入 3 mL 的 hexane，震盪使溶液混合均勻，再加入 1.5 mL 的 NaCl 溶液(濃度約 0.9%)，震盪使溶液混合均勻。於 25°C 下以 500 rpm 離心約 7 min 後，吸取上清液至新的 15 mL 離心管，接著進行 55°C 乾浴加熱，並用氮氣吹乾樣品，最後加入 1.0

mL 的 hexane 並以低速震盪，將粗脂肪回溶，將樣品以石蠟膜密封後置於 -20°C 凍箱備用。

(2) 糞便膽固醇分析

將樣品與 RANDOX (CH 201) 試劑作用，在波長 500 nm 下可測得吸光值，對照標準曲線可測得濃度 (concentration = ΔA sample / ΔA standard \times concentration of standard)。

(3) 糞便三酸甘油酯分析

將樣品與 RANDOX (TR 213) 試劑作用，在波長 500 nm 下可測得吸光值，對照標準曲線可測得濃度 (concentration = ΔA sample / ΔA standard \times concentration of standard)。

4-2-3.7 肝臟脂質

(1) 肝臟膽固醇、三酸甘油酯萃取

取約 0.1 g 之倉鼠肝臟組織，加入 2 mL chloroform/methanol (2:1, v/v) 於玻璃研磨器中進行研磨，在室溫下靜置一小時，吸取上層有機層至 Eppendorf tube，於 25°C 下以 5000 rpm 離心 10 分鐘後，吸取上層液體，加入 0.2 倍體積之 0.9% 生理食鹽水混合均勻，於 25°C 下以 5000 rpm 離心 5 分鐘，再取下層至新的 Eppendorf tube 進行 55°C 乾浴加熱，並用氮氣吹乾樣品，最後加入 1 mL *tert*-butyl alcohol/Triton X-100/methanol (2:1:1, v/v)，將樣品置於 -20°C 凍箱備用。

(2) 肝臟膽固醇分析

將樣品與 RANDOX (CH 201) 試劑作用，在波長 500 nm 下可測得吸光值，對照標準曲線可測得濃度($\text{concentration} = \Delta A \text{ sample} / \Delta A \text{ standard} \times \text{concentration of standard}$)。

(3) 肝臟糞便三酸甘油酯分析

將樣品與 RANDOX (TR 213) 試劑作用，在波長 500 nm 下可測得吸光值，對照標準曲線可測得濃度($\text{concentration} = \Delta A \text{ sample} / \Delta A \text{ standard} \times \text{concentration of standard}$)。

4-2-3.8 肝臟基因表現分析

(1) 抽取倉鼠肝臟之 mRNA

進行樣品前處理，將冰凍於 -80°C 之倉鼠肝臟取出，秤 20~30 mg 肝臟組織至 eppendorf tube 中，加入 600 μL 的 RNA Lysis / 2-ME Solution，利用均質棒將肝臟組織震盪均質約 20 秒，將均質的裂解液於 25°C 下以 13200 rpm 離心 3 分鐘，將上清液小心吸取至新的 eppendorf tube 中，加入等體積 (大約 700 μL) 的 70% ETOH 至裂解液中，震盪混合均勻，再於 25°C 下以 13200 rpm 離心 1 分鐘。接著進行 mRNA 的分離，使用 Total RNA Miniprep Purification kit，吸取約 700 μL 澄清的 lysate / ethanol 混合物至 RNA Spin Column (離心管)，並置於 Collection Tube 上，於 25°C 下以 13200 rpm 離心 1 分鐘，去除濾液。放回 Collection Tube 上，加入 500 μL RNA Wash Solution I，於 25°C 下以 13200 rpm 離心 1 分鐘，去除濾液。於離心時配製 DNase I 預混液，2 μL DNase I + 80 μL DNase I Incubation Buffer，將此加入 RNA Spin Column 的膜中間，置於室溫下靜置 15 分鐘。15 分鐘過後，加入 500 μL 的 RNA wash solution I 至 RNA Spin Column，於 25°C 下以 13200 rpm 離心

1 分鐘，去除濾液。將去除濾液的 RNA Spin Column 置於新的 Collection tube 上，再加入 600 μ L 的 RNA wash solution II，於 25 $^{\circ}$ C 下以 13200 rpm 離心 1 分鐘，去除濾液。再次加入 600 μ L 的 RNA wash solution II 於 13200 rpm 離心 1 分鐘，去除濾液，接著於 25 $^{\circ}$ C 下以 13200 rpm 空離 3 分鐘，去除剩餘酒精。空離 3 分鐘後，將 column 置於新的 Eppendorf tube 中，加入 30 μ L Nuclease - free water 至 RNA Spin Column 的膜中間，室溫下靜置 1 分鐘，再於 25 $^{\circ}$ C 下以 13200 rpm 離心 1 分鐘，收取其濾液，即為所需之 Total RNA，並置於 -80 $^{\circ}$ C 凍箱備用。

(2) 將抽取出之 mRNA 轉 cDNA

反轉錄時，將 2 μ L 的 Total RNA、iScript reverse transcriptase 1 μ L、iScript reaction mix (5x) 4 μ L、13 μ L Nuclease - free water 置於 PCR tube 中混合，再利用 DNA Engine Thermal Cycler 於 25 $^{\circ}$ C 反應 5 分鐘後，加熱至 42 $^{\circ}$ C 使酵素反應 30 分鐘，最後加熱至 85 $^{\circ}$ C 反應 5 分鐘後終止反應，所得的產物即為 cDNA，存放於 -20 $^{\circ}$ C 凍箱備用。

(3) 同步定量聚合酶連鎖反應

同步定量聚合酶連鎖反應使用 iQTM SYBR[®] Green Supermix Kit 於 ABI PRISM 7000 Sequence Detection System 進行 PCR 擴增及偵測。將 2 μ L cDNA、5 μ L iQTM SYBR[®] Green Supermix (2x) 及 0.2 μ L 正反股引子與 2.6 μ L ddH₂O，置於管內均勻混合，其總體積為 10 μ L。反應擴增循環為活化加熱 95 $^{\circ}$ C、3 分鐘；95 $^{\circ}$ C、10 秒，黏合溫度 59 $^{\circ}$ C、10 秒。反應之最適條件均以聚合酶連鎖反應測試。於 72 $^{\circ}$ C、30 秒擴增步驟偵測 SYBR Green 螢光量，重複 40 循環後進行解離步驟，PCR 產物以解離曲線與 1.8% 洋菜瓊脂膠電泳來確認是否為專一性產物。聚合酶連鎖反應的擴增過程中，反應溶液中

的 SYBR Green 會嵌入擴增中的雙股 DNA 內。因此擴增期間所偵測到的螢光亮與擴增中產物的量成正比，可對應反應起始的基因表現量。而基因的表現量將以通過閾值的循環數(Ct)推定。此實驗中使用 β actin 基因表現量作為內部對照，將測定脂質代謝相關基因 PPAR α , LXR α , LDLR, CYP7A1, SREBP2, HMGR, HMGS, SREBP1c, FAS 等(Li *et al.*, 2009)，其引子序列如附表三顯示，目標基因的相對表現量以公式 $2^{-\Delta Ct}$ 計算而得(Livak and Schmittgen, 2001)。

4-2-4 統計分析

研究數據皆以平均值 \pm 標準偏差(Means \pm SD)表示，利用 SAS 9.4 統計軟體(Statistics Analysis System)進行 one-way ANOVA 及鄧氏新多變域測驗法(Duncan's new multiple range test)分析，當機率值小於 0.05 ($p < 0.05$)時顯示各組統計上有顯著差異，並使用 SigmaPlot 10.0 軟體進行作圖分析。

五、結果

5-1 乳酸菌相關基因鑑定測試

5-1-1 16S rRNA gene

為確認菌株，抽取 F7-4 乳酸菌 DNA，並利用 Lac 16S 引子(Rinttila T *et al.*, 2004)進行 PCR 擴增及定序，再以洋菜瓊脂膠進行電泳。結果如圖一(A)顯示，跑道(1)、(2)為 F7-4 擴增產物與(5) 100 bp DNA Marker 對照後，推定產物為 300-400 bp 間之單一色帶，與目標產物大小 341 bp 位置吻合，確定為 *Lactobacillus* 菌屬。將此擴增後之 Lac16S 產物，交由源資國際生物科技股份有限公司進行核酸定序，將測定之序列結果與基因庫(Genbank)進行比對，可判定本研究之菌株 *Lactobacillus plantarum*。

5-1-2 膽鹽水解酶(Bshpl) gene

進一步確認 F7-4 菌株具膽鹽水解酶基因，同樣抽取 F7-4 乳酸菌 DNA，並利用 Bshpl 引子(Öner *et al.*, 2014)進行 PCR 擴增及定序，再以洋菜瓊脂膠進行電泳。結果如圖一(B)顯示，跑道(2)、(3)為目標基因 Bshpl 與跑道(1) 100 bp DNA Marker 對照後，推定產物為 900-1000 bp 間之單一色帶，與目標產物大小 975 bp 位置吻合，可確定 F7-4 乳酸菌含有 Bshpl 基因。

5-2 乳酸菌於高膽固醇飲食誘導高血脂症倉鼠之降血脂功效測試

5-2-1 誘導高血脂症前之倉鼠血清生化數值

每隻倉鼠在高膽固醇誘導前皆攝食正常對照飼料(D12106)進行預養一週，並在誘導前以眼窩採血取其血清測定血中 TC、TG、LDL-C 及 HDL-C 濃度。結果如圖二顯示，在高膽固醇誘導前，血中 TC、TG、LDL-C、HDL-C 四項數值，正常組(N)與高脂誘導組(HFC)皆無顯著差異($p>0.05$)，且均為

正常範圍內。

5-2-2 誘導高血脂症後之倉鼠血清生化數值

誘導期間正常組(N)繼續攝食正常對照飼料(D12106C);高脂誘導組(HFC)則攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料(D12107C)，在誘導 2 週後以眼窩採血取其血清測定血中 TC、TG、LDL-C 及 HDL-C 濃度。結果如圖三顯示，在高膽固醇誘導後，血中 TC、TG、LDL-C 三項數值，高脂誘導組均顯著高於正常組($p < 0.05$)，分別提高 110%、136.21% 及 85.4%，表示血中脂質濃度異常，可判別誘導成高血脂症；血中 HDL-C 濃度則是正常組與高脂誘導組間無顯著差異($p > 0.05$)。

5-2-3 乳酸菌對高血脂症倉鼠體重之影響

試驗動物於每週最後一天禁食 14~16 小時後秤量其體重。體重變化趨勢如圖四，各組皆穩定增加體重，第 0 週為初始體重；第 0~2 週為高脂誘導週期；第 2~12 週為乳酸菌餵食試驗週期，並於第 12 週犧牲前秤量各組倉鼠之最終體重。結果如表一顯示，在試驗前各組初始體重皆無顯著差異($p > 0.05$)，表示起始體重相同；犧牲前各組體重皆無顯著性差異($p > 0.05$)；各組體重增加量及增加百分比也皆無顯著差異($p > 0.05$)。表示本研究對於體重方面無具體影響。

5-2-4 乳酸菌對高血脂症倉鼠攝食及攝水量之影響

於動物試驗期間 90 天，定時定量更換各組倉鼠之飼料及飲水，記錄統計出每天每隻倉鼠之攝食量、攝水量及食物利用率。結果如表二顯示，攝水量、攝食量及食物利用率各組皆無顯著差異($p > 0.05$)。表示攝食量及攝水量對於倉鼠體重變化無具體影響。

5-2-5 乳酸菌對高血脂症倉鼠臟器重量之影響

倉鼠經誘導高血脂症後餵食乳酸菌樣品 10 週，於犧牲後秤量各組倉鼠臟器之體重，包含肝臟、脾臟、腎臟及脂肪組織。結果如表三顯示，肝臟及脾臟重量部分，高脂誘導組顯著高於正常組($p < 0.05$)，推測經高脂誘導後肝臟及脾臟因發炎與脂肪堆積，造成重量增加。乳酸菌產品對照組及三組乳酸菌試驗組與高脂誘導組相比皆無顯著性差異($p > 0.05$)；腎臟重量部分，高脂誘導組與正常組相比無顯著差異($p > 0.05$)，乳酸菌產品對照組及三組乳酸菌試驗組與高脂誘導組相比皆無顯著性差異($p > 0.05$)；內臟脂肪重量部分，高脂誘導組與正常組相比無顯著差異($p > 0.05$)，乳酸菌產品對照組及三組乳酸菌試驗組與高脂誘導組相比皆無顯著性差異($p > 0.05$)，表示本研究對於體脂方面無具體影響。

5-2-6 乳酸菌對高血脂症倉鼠血液中總膽固醇濃度之影響

倉鼠經誘導高血脂症後餵食乳酸菌樣品 10 週，犧牲時於肝門靜脈採取其血液，測定血液中 TC 濃度。結果如圖五顯示，高脂誘導組顯著高於正常組 3 倍($p < 0.05$)，表示高膽固醇飲食誘導倉鼠仍為高血脂症模式。乳酸菌產品對照組及純菌體組皆顯著低於高脂誘導組($p < 0.05$)，分別降低 11.4% 及 11.56%，表示血液中 TC 濃度因餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌純菌體而有調降的作用。純培養液組及菌液組與高脂誘導組相比則無顯著差異($p > 0.05$)，但仍有調降之趨勢。

5-2-7 乳酸菌對高血脂症倉鼠血液中三酸甘油酯濃度之影響

倉鼠經誘導高血脂症後餵食乳酸菌樣品 10 週，犧牲時於肝門靜脈採取其血液，測定血液中 TG 濃度。結果如圖六顯示，高脂誘導組顯著高於正常組 1.6 倍($p < 0.05$)，表示高膽固醇飲食誘導倉鼠仍為高血脂症模式。乳酸

菌產品對照組及三組乳酸菌試驗組與高脂誘導組相比無顯著差異($p>0.05$)，表示血液中 TG 濃度，並未能經餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌而有調降的作用。

5-2-8 乳酸菌對高血脂症倉鼠血中低密度脂蛋白膽固醇濃度之影響

倉鼠經誘導高血脂症後餵食乳酸菌樣品 10 週，犧牲時於肝門靜脈採取其血液，測定血液中低密度脂蛋白膽固醇(LDL-C)濃度。結果如圖七顯示，高脂誘導組顯著高於正常組 2.3 倍($p<0.05$)，表示高膽固醇飲食誘導倉鼠仍為高血脂症模式。乳酸菌產品對照組、純菌體組及純培養液組皆顯著低於高脂誘導組($p<0.05$)，分別降低 15.77%、21.12% 及 13.84%，表示血液中 LDL-C 濃度，並經餵食乳酸菌產品、F7-4 乳酸菌菌體及培養液而有調降的作用，其中以純菌體組效果最佳。乳酸菌菌液組與高脂誘導組相比則無顯著差異($p>0.05$)，但仍有調降之趨勢。

5-2-9 乳酸菌對高血脂症倉鼠血中高密度脂蛋白膽固醇濃度之影響

倉鼠經誘導高血脂症後餵食乳酸菌樣品 10 週，犧牲時於肝門靜脈採取其血液，測定血液中高密度脂蛋白膽固醇(HDL-C)濃度。結果如圖八顯示，高脂誘導組顯著高於正常組 88.09% ($p<0.05$)，表示高膽固醇飲食誘導倉鼠因總膽固醇濃度較高，所以 HDL-C 濃度會比正常組多，後續可藉由高密度脂蛋白比率(HTR)判別差異性。乳酸菌產品對照組、純菌體組及菌液組皆顯著高於高脂誘導組 ($p<0.05$)，分別提高 14.88%、20.89% 及 19.39%，表示血液中 HDL-C 濃度，並經餵食乳酸菌產品、F7-4 乳酸菌菌體及菌液而有提升的作用。純培養液組與高脂誘導組相比則無顯著差異($p>0.05$)，但仍有提升之趨勢。

5-2-10 乳酸菌對高血脂症倉鼠動脈粥狀硬化指數之影響

倉鼠經誘導高血脂症後餵食乳酸菌樣品 10 週，犧牲時於肝門靜脈採取其血液，並利用血液中總膽固醇(TC)及高密度脂蛋白膽固醇(HDL-C)之濃度，計算出動脈粥狀硬化指數(AI)， $AI = (TC - HDL-C) \div HDL-C$ 。結果如圖九顯示，高脂誘導組顯著高於正常組 1.6 倍($p < 0.05$)，表示高膽固醇飲食誘導倉鼠因 AI 值較高，發生動脈症狀硬化之風險較高。乳酸菌產品對照組及三組乳酸菌試驗組皆顯著低於高脂誘導組($p < 0.05$)，分別降低 15.67%、19.67%、14.67% 及 18%，表示經餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌後，能降低動脈粥狀硬化發生之風險。

5-2-11 乳酸菌對高血脂症倉鼠高密度脂蛋白比率之影響

倉鼠經誘導高血脂症後餵食乳酸菌樣品 10 週，犧牲時於肝門靜脈採取其血液，並利用血液中膽固醇(TC)及高密度脂蛋白膽固醇(HDL-C)之濃度，計算出高密度脂蛋白膽固醇比率(HTR)， $HTR = HDL-C \div TC \times 100\%$ 。結果如圖十顯示，高脂誘導組顯著低於正常組 26.11% ($p < 0.05$)，表示高膽固醇飲食誘導倉鼠因 TC 中 LDL-C 濃度較高，造成高密度脂蛋白佔比率較低。乳酸菌產品對照組及三組乳酸菌試驗組顯著高於高脂誘導組($p < 0.05$)，分別提高 3.94%、6.42%、3.61% 及 4.56%，表示經餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌後，能提升高密度脂蛋白比率。

5-2-12 乳酸菌對高血脂症倉鼠血中游離脂肪酸濃度之影響

倉鼠經誘導高血脂症後餵食乳酸菌樣品 10 週，犧牲時於肝門靜脈採取其血液，並測定血中游離脂肪酸(FFA)濃度。結果如圖十一顯示，高脂誘導組顯著高於正常組 1.9 倍($p < 0.05$)，表示高膽固醇飲食誘導倉鼠仍為高血脂症模式。乳酸菌產品對照組及三組乳酸菌試驗組與高脂誘導組相比無顯

著差異($p>0.05$)，表示血液中 FFA 濃度，並未能經餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌而有調降的作用。

5-2-13 乳酸菌對高血脂症倉鼠血中天門冬胺酸轉胺酶濃度之影響

倉鼠經誘導高血脂症後餵食乳酸菌樣品 10 週，犧牲時於肝門靜脈採取其血液，並測定血液中天門冬胺酸轉胺酶(AST)濃度。結果如圖十二顯示，高脂誘導組顯著高於正常組 7 倍($p<0.05$)，表示高膽固醇飲食誘導倉鼠肝臟受到損傷。乳酸菌產品對照組及三組乳酸菌試驗組顯著低於高脂誘導組($p<0.05$)，分別降低 20.73%、14.35%、14.99%及 25.45%，表示經餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌能降低肝臟損傷。

5-2-14 乳酸菌對高血脂症倉鼠血中丙胺酸轉胺酶濃度之影響

倉鼠經誘導高血脂症後餵食乳酸菌樣品 10 週，犧牲時於肝門靜脈採取其血液，並測定血液中的丙胺酸轉胺酶(ALT)濃度。結果如圖十三顯示，高脂誘導組顯著高於正常組 17 倍($p<0.05$)，表示高膽固醇飲食誘導倉鼠肝臟受到損傷。乳酸菌產品對照組及三組乳酸菌試驗組顯著低於高脂誘導組($p<0.05$)，分別降低 19.32%、12.57%、11.58%及 13.03%，表示經餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌能降低肝臟損傷。

5-2-15 乳酸菌對高血脂症倉鼠肝臟中總膽固醇濃度之影響

倉鼠經誘導高血脂症後餵食乳酸菌樣品 10 週，犧牲後將肝臟脂質萃取，並測定肝臟中總膽固醇(TC)之濃度。結果如圖十四顯示，高脂誘導組顯著高於正常組 17 倍($p<0.05$)，表示高膽固醇飲食誘導倉鼠肝臟累積大量膽固醇，進而導致形成脂肪肝。乳酸菌產品對照組及三組乳酸菌試驗組顯著低於高脂誘導組($p<0.05$)，分別降低 8.83%、11.15%、18.25%及 17.59%，表

示經餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌能降低肝臟膽固醇濃度。

5-2-16 乳酸菌對高血脂症倉鼠肝臟中三酸甘油酯濃度之影響

倉鼠經誘導高血脂症後餵食乳酸菌樣品 10 週，犧牲後將肝臟脂質萃取，並測定肝臟中三酸甘油酯(TG)之濃度。結果如圖十五顯示，高脂誘導組顯著高於正常組 2 倍($p<0.05$)，表示高膽固醇飲食誘導倉鼠肝臟累積大量三酸甘油酯，進而導致形成脂肪肝。乳酸菌產品對照組及三組乳酸菌試驗組顯著低於高脂誘導組($p<0.05$)，分別降低 11.74%、12.8%、23.91% 及 20.57%，表示經餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌能降低肝臟三酸甘油酯濃度。

5-2-17 乳酸菌對高血脂症倉鼠糞便中總膽固醇濃度之影響

倉鼠經誘導高血脂症後餵食乳酸菌樣品 10 週，犧牲後將糞便脂質萃取，並測定糞便中總膽固醇(TC)之濃度。結果如圖十六顯示，高脂誘導組顯著高於正常組 84.91% ($p<0.05$)，表示高膽固醇飲食誘導倉鼠因攝取較多脂質，多餘無法吸收的 TC 會附著在糞便上排出體外。純菌體組顯著高於高脂誘導組 29.55% ($p<0.05$)，表示經餵食 F7-4 乳酸菌菌體能增加膽固醇附著於糞便後排出體外。乳酸菌產品對照組、純培養液及菌液組與高脂誘導組相比則無顯著差異($p>0.05$)，但乳酸菌產品組及菌液組有增加糞便膽固醇排放的趨勢。

5-2-18 乳酸菌對高血脂症倉鼠糞便中三酸甘油酯濃度之影響

倉鼠經誘導高血脂症後餵食乳酸菌樣品 10 週，犧牲後將糞便脂質萃取，並測定糞便中三酸甘油酯(TG)之濃度。結果如圖十七顯示，高脂誘導組顯著高於正常組 10.13% ($p<0.05$)，表示高膽固醇飲食誘導倉鼠因攝取較多脂質，多餘無法吸收的 TG 會附著在糞便上排出體外。純菌體組及菌液組顯

著高於高脂誘導組($p < 0.05$)，分別提高 20.27% 及 14.73%，表示經餵食 F7-4 乳酸菌菌體及菌液後能使多餘之三酸甘油酯附著於糞便後排出體外。乳酸菌產品對照組及純培養液與高脂誘導組相比則無顯著差異($p > 0.05$)，代表乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌純培養液無法有效增加糞便三酸甘油酯的濃度。

5-2-19 乳酸菌對高血脂症倉鼠糞便中膽酸含量之影響

倉鼠經誘導高血脂症後餵食乳酸菌樣品 10 週，犧牲後將糞便脂質萃取，並測定糞便中膽酸(Bile acid)之含量。結果如圖十八顯示，高脂誘導組與正常組相比無顯著差異($p > 0.05$)，表示高膽固醇飲食誘導倉鼠之膽酸排放量仍為正常值。乳酸菌產品對照組及三組乳酸菌試驗組顯著高於高脂誘導組($p < 0.05$)，分別提高 29.79%、44.75%、49.34% 及 67.43%，表示經餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌後能使膽酸排放量增加，而剩餘之膽酸將附著於糞便排出體外。

5-3 肝臟及脂肪組織病理切片

5-3-1 乳酸菌對高血脂症倉鼠肝臟外觀病理型態之影響

倉鼠經誘導高血脂症後餵食乳酸菌樣品 10 週，於犧牲時採取其肝臟，並以照相機拍下完整肝臟，判斷其大小及外觀。結果如圖十九顯示，高脂誘導組與正常組相比，可觀察到高脂誘導組之肝臟大小較大，且顏色呈現明顯乳白色，表示已有脂肪肝狀況，正常組則呈現健康之鮮潤紅色。乳酸菌產品對照組及三組乳酸菌試驗組也皆為乳白色之肝臟，表示高膽固醇飲食造成脂肪肝狀況，餵食乳酸菌後無法依肝臟外觀判別是否有改善肝臟脂質累積，將由蘇木紫與伊紅染色及油紅染色，觀察更精細的肝臟組織病理形態。

5-3-2 乳酸菌對高血脂症倉鼠肝臟組織蘇木紫與伊紅染色之影響

倉鼠經誘導高血脂症後餵食乳酸菌樣品 10 週，於犧牲時採取其肝臟，再以蘇木紫與伊紅染色(H&E stain)，觀察肝臟組織排列分佈。結果如圖二十及二十一顯示，分別為肝臟組織 H&E stain 後以正立式顯微鏡觀拍下其放大 100×及 400×下之切片形態。高脂誘導組之肝臟細胞排列較為鬆散，且有取多空泡產生，在此推斷可能是脂肪空泡；正常組之肝臟細胞排列較為緊密，且無空泡存在；乳酸菌產品對照組及三組乳酸菌試驗組肝臟細胞排列雖無法像正常組一樣緊密，但相對於高脂誘導組已有改善的狀況，且空泡的產生已大幅減少。

5-3-3 乳酸菌對高血脂症倉鼠肝臟組織油紅染色之影響

倉鼠經誘導高血脂症後餵食乳酸菌樣品 10 週，於犧牲時採取其肝臟，再以油紅染色(Oil-Red O stain)，觀察肝臟組織脂肪分佈。結果如圖二十二及二十三顯示，分別為肝臟組織 Oil-Red O stain 後以正立式顯微鏡觀拍下其放大 100×及 400×下之切片形態。高脂誘導組之肝臟脂質累積很明顯，表示經高膽固醇飲食後，倉鼠肝臟油滴累積的確增加，進而造成脂肪肝的狀況；正常組之肝臟脂質分佈明顯較少，油滴無明顯分佈在肝臟組織；乳酸菌產品對照組及三組乳酸菌試驗組肝臟組織也有油滴的累積，但與高脂誘導組相比則有所改善。

5-3-4 乳酸菌對高血脂症倉鼠脂肪組織蘇木紫與伊紅染色之影響

倉鼠經誘導高血脂症後餵食乳酸菌樣品 10 週，於犧牲時採取其肝臟，再以蘇木紫與伊紅染色(H&E stain)，觀察肝臟組織排列分佈。結果如圖二十四及二十五顯示，分別為脂肪組織 H&E stain 後以正立式顯微鏡觀拍下其放大 100×及 400×下之切片形態。高脂誘導組之脂肪細胞排列較為鬆散，

且細胞大小較大；正常組之脂肪細胞排列較為緊密，且細胞大小較小；乳酸菌產品對照組及三組乳酸菌試驗組脂肪細胞排列相對於高脂誘導組較為緊密，且細胞大小也較小，表示經餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌能改善脂肪組織排列及大小。

5-4 肝臟脂肪代謝相關基因

5-4-1 肝臟中 PPAR α mRNA 相對表現量

倉鼠經誘導高血脂症後餵食乳酸菌樣品 10 週，於犧牲時採取其肝臟，再萃取肝臟 RNA 後進行反轉錄，利用同步定量聚合酶鏈鎖反應儀測定肝臟中 PPAR α 表現量，並以 β -actin 做為內部對照基因。結果如圖二十六顯示，高脂誘導組顯著低於正常組 90% ($p < 0.05$)，表示高膽固醇飲食誘導倉鼠肝臟脂質代謝能力下降，進而增加肝臟脂質的累積。純菌體組與高脂誘導組相比無顯著差異 ($p > 0.05$)，但仍有提高的趨勢。乳酸菌產品對照組、純培養液組及菌液組則顯著高於高脂誘導組 ($p < 0.05$)，分別提高 5.8 倍、6.1 倍及 6.4 倍，且表現量提高到與正常組無顯著性差異 ($p > 0.05$)，表示經餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌後能增加肝臟 PPAR α 表現量，幫助提高肝臟脂質代謝能力。

5-4-2 肝臟中 LXR α mRNA 相對表現量

倉鼠經誘導高血脂症後餵食乳酸菌樣品 10 週，於犧牲時採取其肝臟，再萃取肝臟 RNA 後進行反轉錄，利用同步定量聚合酶鏈鎖反應儀測定肝臟中 LXR α 表現量，並以 β -actin 做為內部對照基因。結果如圖二十七顯示，高脂誘導組顯著低於正常組 77% ($p < 0.05$)，表示高膽固醇飲食誘導倉鼠肝臟膽固醇代謝能力下降，進而增加肝臟膽固醇的累積。乳酸菌產品對照組及三組乳酸菌試驗組顯著高於高脂誘導組 ($p < 0.05$)，分別提高 2.26 倍、3.13

倍、3.74 倍及 3.26 倍，且表現量提高到與正常組無顯著性差異($p>0.05$)，表示經餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌後能增加肝臟 LXR α 表現量，幫助提高肝臟膽固醇排出及減少腸道膽固醇吸收。

5-4-3 肝臟中 CYP7A1 mRNA 相對表現量

倉鼠經誘導高血脂症後餵食乳酸菌樣品 10 週，於犧牲時採取其肝臟，再萃取肝臟 RNA 後進行反轉錄，利用同步定量聚合酶鏈鎖反應儀測定肝臟中 CYP7A1 表現量，並以 β -actin 做為內部對照基因。結果如圖二十八顯示，高脂誘導組顯著低於正常組 90% ($p<0.05$)，表示高膽固醇飲食誘導倉鼠肝臟製造膽酸能力下降，進而減少肝臟膽固醇消耗。乳酸菌產品對照組及三組乳酸菌試驗組顯著高於高脂誘導組($p<0.05$)，分別提高 6.6 倍、7.9 倍、9.7 倍及 9.1 倍，且表現量提高到與正常組無顯著性差異($p>0.05$)，表示經餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌後能增加肝臟 CYP7A1 表現量，幫助肝臟膽固醇消耗及提高膽酸生成。

5-4-4 肝臟中 LDL-R mRNA 相對表現量

倉鼠經誘導高血脂症後餵食乳酸菌樣品 10 週，於犧牲時採取其肝臟，再萃取肝臟 RNA 後進行反轉錄，利用同步定量聚合酶鏈鎖反應儀測定肝臟中 LDL-R 表現量，並以 β -actin 做為內部對照基因。結果如圖二十九顯示，高脂誘導組顯著低於正常組 76% ($p<0.05$)，表示高膽固醇飲食誘導倉鼠降低將血液中 LDL-C 帶入到肝臟中代謝的能力，進而造成血中膽固醇濃度過多。乳酸菌產品對照組與高脂誘導組相比無顯著差異($p>0.05$)，但仍有提高的趨勢。三組乳酸菌試驗組則顯著高於高脂誘導組($p<0.05$)，分別提高 4.13 倍、4.33 倍及 4.79 倍，且表現量提高到與正常組無顯著性差異($p>0.05$)，表示經餵食 F7-4 乳酸菌後能增加肝臟 LDL-R 表現量，幫助將

血中 LDL-C 帶入到肝臟中代謝，減少血中膽固醇堆積。

5-4-5 肝臟中 SREBP2 mRNA 相對表現量

倉鼠經誘導高血脂症後餵食乳酸菌樣品 10 週，於犧牲時採取其肝臟，再萃取肝臟 RNA 後進行反轉錄，利用同步定量聚合酶鏈鎖反應儀測定肝臟中 SREBP2 表現量，並以 β -actin 做為內部對照基因。結果如圖三十顯示，高脂誘導組顯著高於正常組 57% ($p < 0.05$)，表示高膽固醇飲食誘導倉鼠提升肝臟膽固醇的生成，造成肝臟脂質的堆積。乳酸菌產品對照組及三組乳酸菌試驗組則顯著低於高脂誘導組 ($p < 0.05$)，分別降低 82.8%、57.96%、59.24 及 59.24%，且表現量降低到與正常組無顯著性差異 ($p > 0.05$)，表示經餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌後能降低肝臟 SREBP2 表現量，幫助減少肝臟膽固醇生成。

5-4-6 肝臟中 HMGR mRNA 相對表現量

倉鼠經誘導高血脂症後餵食乳酸菌樣品 10 週，於犧牲時採取其肝臟，再萃取肝臟 RNA 後進行反轉錄，利用同步定量聚合酶鏈鎖反應儀測定肝臟中 HMGR 表現量，並以 β -actin 做為內部對照基因。結果如圖三十一顯示，高脂誘導組顯著高於正常組 52% ($p < 0.05$)，表示高膽固醇飲食誘導倉鼠提升肝臟膽固醇的生成，造成肝臟脂質的堆積。乳酸菌產品對照組及三組乳酸菌試驗組則顯著低於高脂誘導組 ($p < 0.05$)，分別降低 69.08%、46.71%、42.11% 及 40.79%，且表現量降低到與正常組無顯著性差異 ($p > 0.05$)，表示經餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌後能降低肝臟 HMGR 表現量，幫助減少肝臟膽固醇生成。

5-4-7 肝臟中 HMGS mRNA 相對表現量

倉鼠經誘導高血脂症後餵食乳酸菌樣品 10 週，於犧牲時採取其肝臟，再萃取肝臟 RNA 後進行反轉錄，利用同步定量聚合酶鏈鎖反應儀測定肝臟中 HMGS 表現量，並以 β -actin 做為內部對照基因。結果如圖三十二顯示，高脂誘導組顯著高於正常組 14.13 倍 ($p < 0.05$)，表示高膽固醇飲食誘導倉鼠提升肝臟膽固醇的生成，造成肝臟脂質的堆積。乳酸菌產品對照組及三組乳酸菌試驗組則顯著低於高脂誘導組 ($p < 0.05$)，分別降低 61.2%、55.12%、50.03% 及 48.38%，表示經餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌後能降低肝臟 HMGS 表現量，幫助減少肝臟膽固醇生成。

5-4-8 肝臟中 SREBP1c mRNA 相對表現量

倉鼠經誘導高血脂症後餵食乳酸菌樣品 10 週，於犧牲時採取其肝臟，再萃取肝臟 RNA 後進行反轉錄，利用同步定量聚合酶鏈鎖反應儀測定肝臟中 SREBP1c 表現量，並以 β -actin 做為內部對照基因。結果如圖三十三顯示，高脂誘導組顯著高於正常組 3.89 倍 ($p < 0.05$)，表示高膽固醇飲食誘導倉鼠提升肝臟脂肪酸的生成。乳酸菌產品對照組及三組乳酸菌試驗組則顯著低於高脂誘導組 ($p < 0.05$)，分別降低 30.47%、86.09%、81.93% 及 84.46%，其中三組乳酸菌試驗組降低到與正常組無顯著差異 ($p > 0.05$)，表示經餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌後能降低肝臟 SREBP1c 表現量，幫助減少肝臟脂肪酸生成。

5-4-9 肝臟中 FAS mRNA 相對表現量

倉鼠經誘導高血脂症後餵食乳酸菌樣品 10 週，於犧牲時採取其肝臟，再萃取肝臟 RNA 後進行反轉錄，利用同步定量聚合酶鏈鎖反應儀測定肝臟中 FAS 表現量，並以 β -actin 做為內部對照基因。結果如圖三十四顯示，

高脂誘導組顯著高於正常組 1.72 倍($p<0.05$)，表示高膽固醇飲食誘導倉鼠提升肝臟脂肪酸的生成。乳酸菌產品對照組及三組乳酸菌試驗組則顯著低於高脂誘導組($p<0.05$)，分別降低 77.21%、94.49%、94.49% 及 91.91%，其中三組乳酸菌試驗組更顯著低於正常組($p<0.05$)，表示經餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌後能降低肝臟 FAS 表現量，幫助減少肝臟脂肪酸生成。



表一、乳酸菌對高血脂症倉鼠體重之影響

Diet groups	Body weight (g)		Weight gain (g)	Weight change rate (%)
	Initial	Final		
N	89.38±11.26 ^a	120.30±11.69 ^a	30.92±6.28 ^a	34.59
HFC	90.58±3.36 ^a	121.23±5.32 ^a	30.65±3.44 ^a	33.84
GM	90.24±8.17 ^a	121.33±3.58 ^a	30.60±7.15 ^a	33.91
C	90.93±7.34 ^a	119.73±6.92 ^a	28.80±13.87 ^a	31.67
L	90.34±5.24 ^a	126.42±8.87 ^a	36.08±12.44 ^a	39.94
C+L	89.57±3.77 ^a	126.27±9.77 ^a	36.70±6.62 ^a	40.98

經誘導後餵食乳酸菌樣品 10 週，於犧牲前秤量各組倉鼠之體重，並計算體重增加率 (Weight change rate = Weight gain ÷ Initial weight × 100%)。數據以平均±標準差表示，並以 SAS 9.4 統計軟體進行 one-way ANOVA 及鄧肯新多變域分析檢定，所標示小寫字母不同則表示各組間具有顯著性差異 ($P < 0.05$)。(1) 正常組 (N, n=7)，攝食正常對照飼料 (D12106C)；(2) 高脂誘導組 (HFC, n=7)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料 (D12107C)；(3) 乳酸菌產品對照組 (GM, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之景岳樂亦纖乳酸菌產品；(4) 純菌體組 (C, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌純菌體；(5) 純培養液組 (L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 之 F7-4 乳酸菌純上清培養液；(6) 菌液組 (C+L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌菌液。

表二、乳酸菌對高血脂症倉鼠攝食及攝水量之影響

Diet groups	Weight gain (g)	Water intake (mL/day)	Food intake (g/day)	Feed efficiency (%)
N	30.92±6.28 ^a	7.95±2.93 ^a	6.06±0.42 ^a	5.67
HFC	30.65±3.44 ^a	7.63±3.21 ^a	5.85±0.54 ^a	5.82
GM	30.60±7.15 ^a	5.45±0.24 ^a	5.90±0.05 ^a	5.76
C	28.80±13.87 ^a	7.36±2.39 ^a	6.15±0.91 ^a	5.20
L	36.08±12.44 ^a	9.32±1.72 ^a	5.97±0.18 ^a	6.71
C+L	36.70±6.62 ^a	8.44±0.11 ^a	6.43±0.06 ^a	6.35

於動物試驗期間 90 天，定時定量更換各組倉鼠之飼料及飲水，記錄統計出每天每隻倉鼠之攝食及攝水量，並計算食物利用率[Feed efficiency = Weight gain ÷ (Food intake × 90 days) × 100%]。數據以平均±標準差表示，並以 SAS 9.4 統計軟體進行 one-way ANOVA 及鄧肯新多變域分析檢定，所標示小寫字母不同則表示各組間具有顯著性差異($P < 0.05$)。

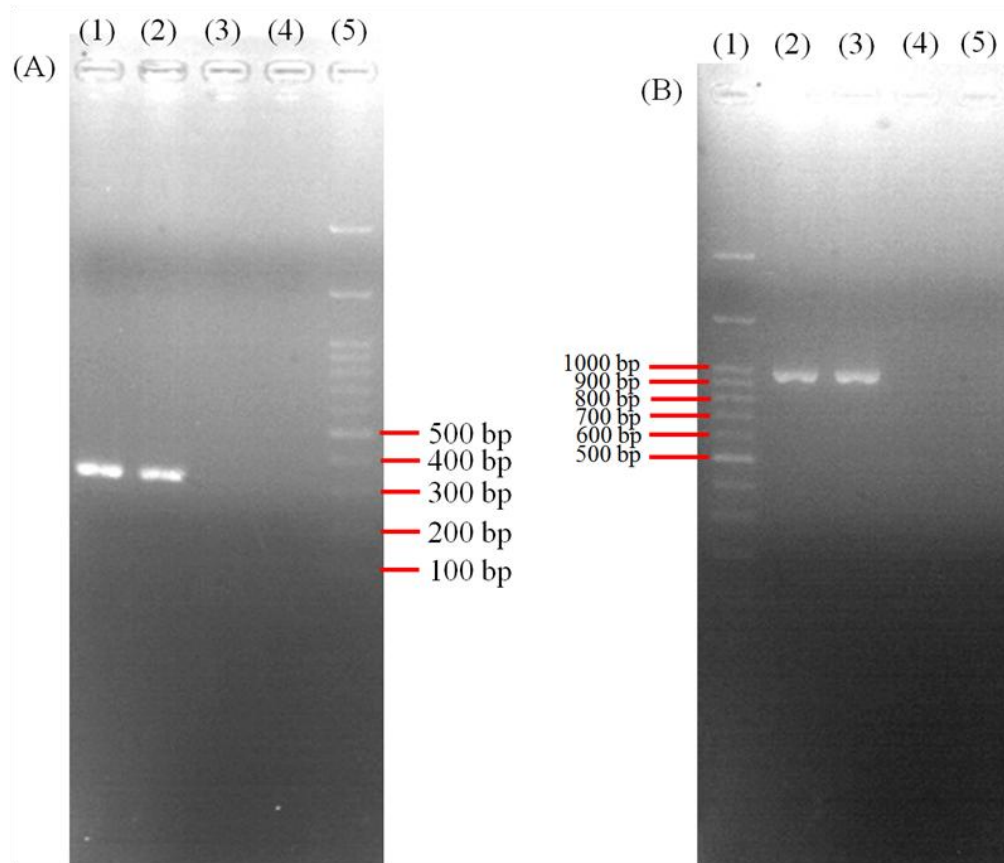
(1)正常組(N, n=7)，攝食正常對照飼料(D12106C)；(2)高脂誘導組(HFC, n=7)，攝食含 0.5%膽固醇之高脂飼料(D12107C)；(3)乳酸菌產品對照組(GM, n=6)，攝食含 0.5%膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之景岳樂亦纖乳酸菌產品；(4)純菌體組(C, n=6)，攝食含 0.5%膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌純菌體；(5)純培養液組(L, n=6)，攝食含 0.5%膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 之 F7-4 乳酸菌純上清培養液；(6)菌液組(C+L, n=6)，攝食含 0.5%膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌菌液。

表三、乳酸菌對高血脂症倉鼠臟器重量之影響

Diet groups	Liver (g)	Spleen (g)	Kidney (g)	Adipose tissues (g)
N	4.26±0.93 ^b	0.12±0.03 ^b	0.91±0.11 ^a	2.96±0.40 ^a
HFC	9.22±0.40 ^a	0.17±0.01 ^a	1.00±0.10 ^a	3.15±0.21 ^a
GM	8.96±0.29 ^a	0.16±0.01 ^a	0.97±0.05 ^a	2.67±0.40 ^a
C	8.71±0.56 ^a	0.16±0.02 ^a	0.94±0.08 ^a	2.81±0.65 ^a
L	8.77±0.44 ^a	0.16±0.01 ^a	0.99±0.11 ^a	2.94±0.26 ^a
C+L	9.37±0.35 ^a	0.16±0.01 ^a	1.04±0.11 ^a	3.54±0.91 ^a

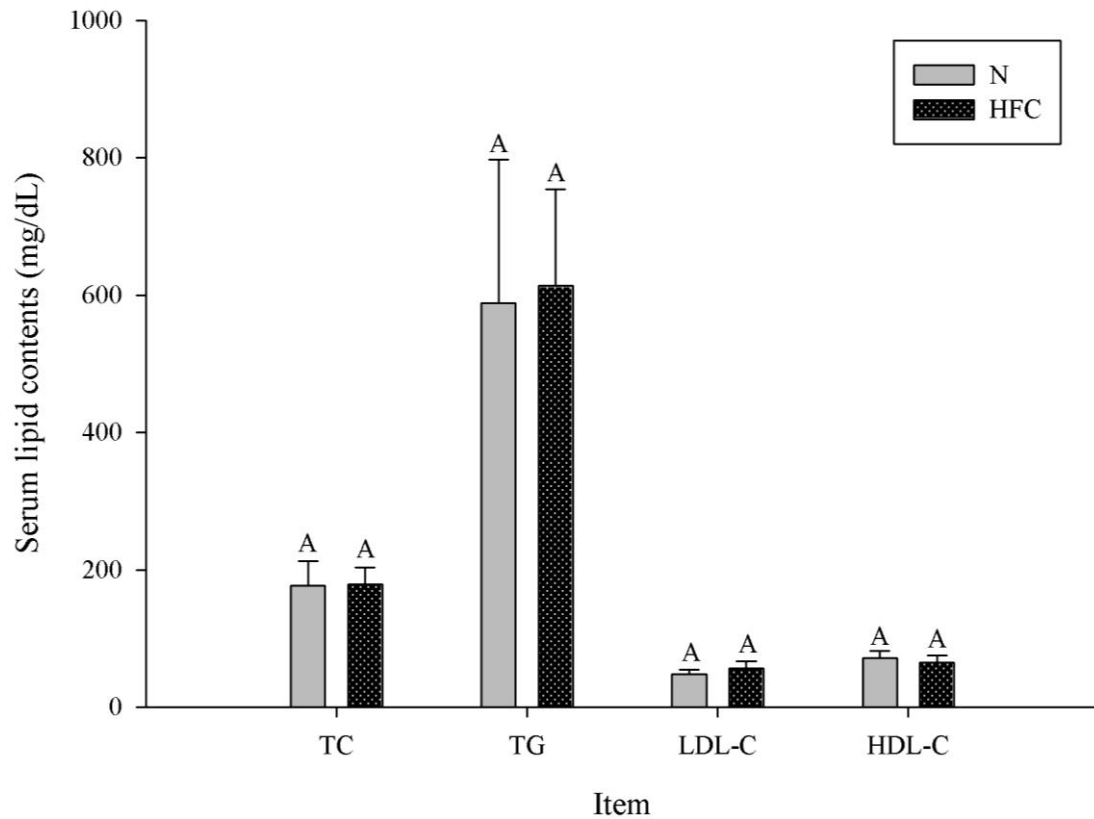
經誘導後餵食乳酸菌樣品 10 週，於犧牲後秤量各組倉鼠臟器之體重，包含肝臟、脾臟、腎臟及脂肪組織。數據以平均±標準差表示，並以 SAS 9.4 統計軟體進行 one-way ANOVA 及鄧肯新多變域分析檢定，所標示小寫字母不同則表示各組間具有顯著性差異 ($P < 0.05$)。

(1) 正常組 (N, n=7)，攝食正常對照飼料 (D12106C)；(2) 高脂誘導組 (HFC, n=7)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料 (D12107C)；(3) 乳酸菌產品對照組 (GM, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之景岳樂亦纖乳酸菌產品；(4) 純菌體組 (C, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌純菌體；(5) 純培養液組 (L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 之 F7-4 乳酸菌純上清培養液；(6) 菌液組 (C+L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌菌液。



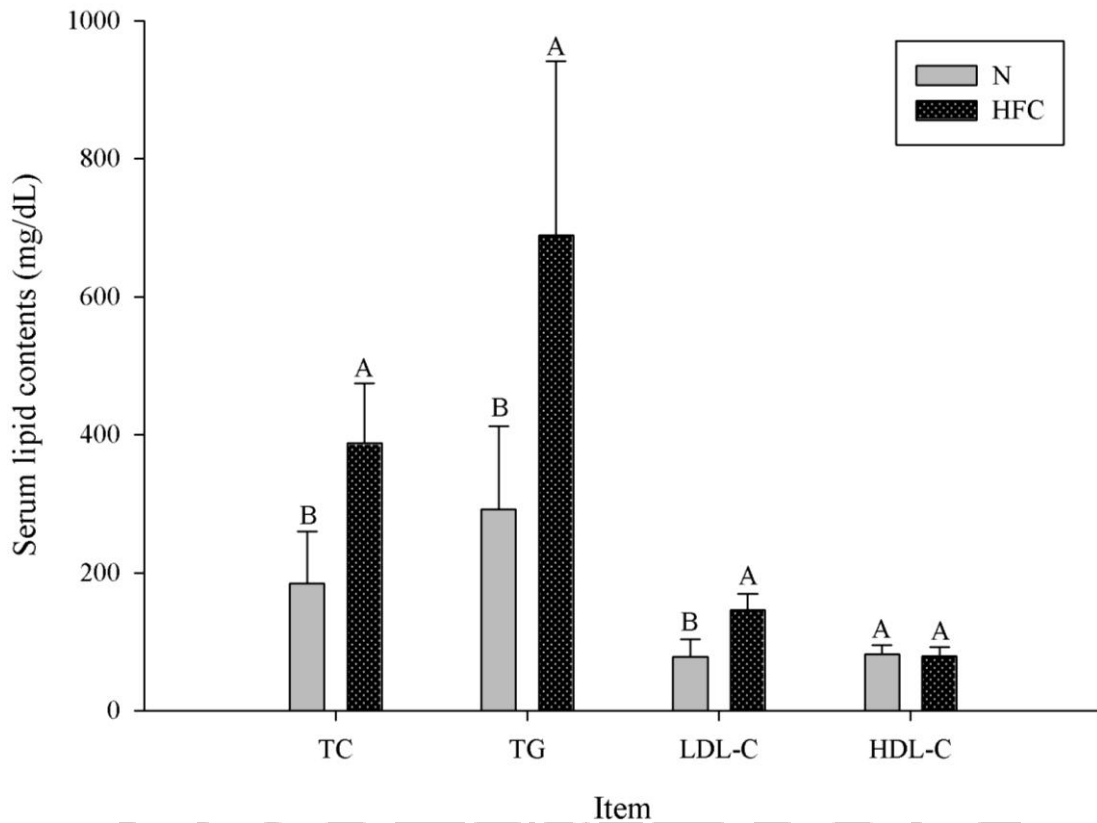
圖一、乳酸菌相關基因分析電泳圖

此圖為抽取乳酸菌之DNA後，利用聚合酶鏈鎖反應擴大目標片段，再以1.8%洋菜瓊脂膠、0.5x TAE Buffer 進行電泳，測定目標基因產物專一性及大小。圖(A)為 Lac 16S rRNA gene 電泳結果，(1)及(2)為乳酸菌 F7-4，(3)及(4)為空白對照組，(5)為 100 bp DNA Marker，目標產物大小為 341 bp；圖(B)為 Bshpl gene 電泳結果，(1)為 100 bp DNA Marker，(2)及(3)為乳酸菌 F7-4，(4)及(5)為空白對照組，目標產物大小為 975 bp。



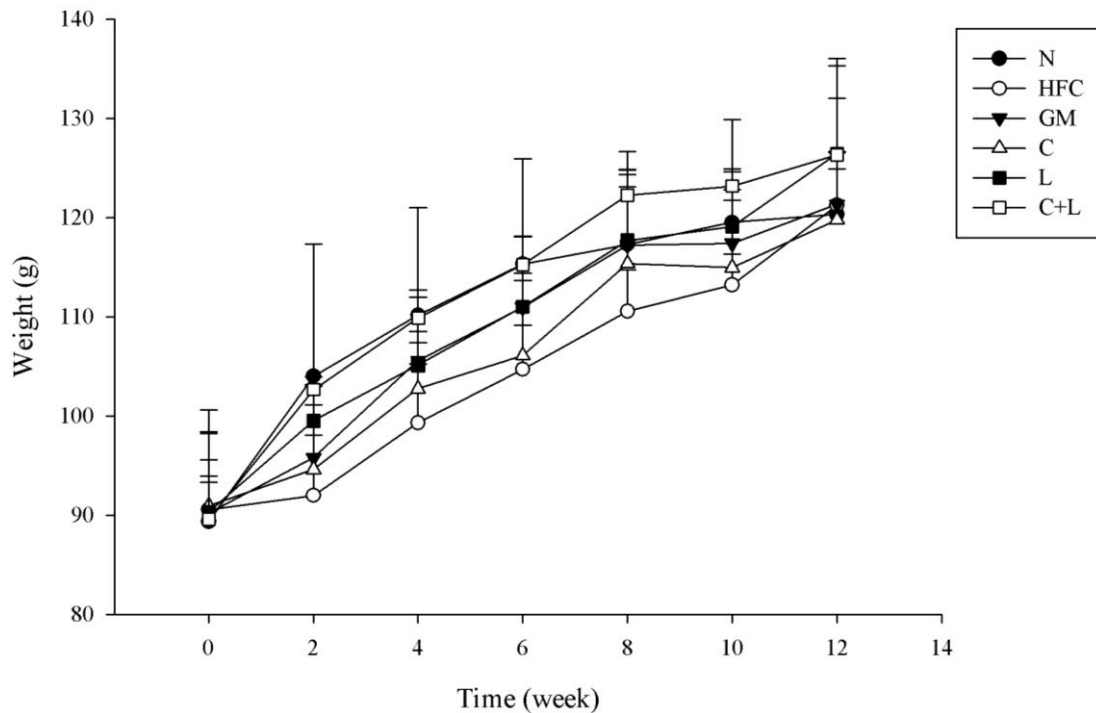
圖二、高膽固醇飲食誘導前倉鼠之血清生化數值

在高膽固醇飲食誘導前皆攝食正常對照飼料(D12106C)，並以眼窩採血取其血清測定血中 TC、TG、LDL-C 及 HDL-C 濃度。數據以平均±標準差表示，並以 SAS 9.4 統計軟體進行 one-way ANOVA 及鄧肯新多變域分析檢定，所標示大寫字母不同則表示彼此間具有顯著性差異($P<0.05$)。(1)正常組(N, n=7)；(2)高脂誘導組(HFC, n=31)，包含乳酸菌產品對照組及三組乳酸菌試驗組。



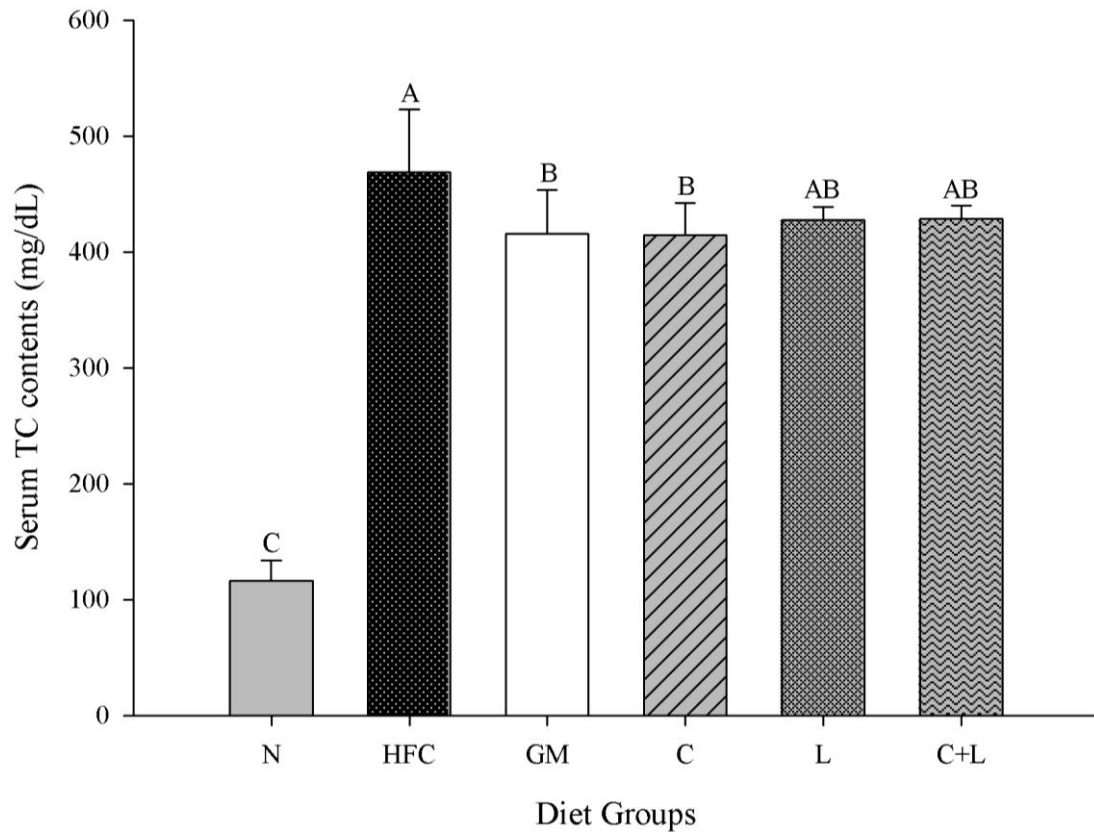
圖三、高膽固醇飲食誘導後倉鼠之血清生化數值

在高膽固醇飲食誘導後以眼窩採血取其血清測定血中 TC、TG、LDL-C 及 HDL-C 濃度。數據以平均±標準差表示，並以 SAS 9.4 統計軟體進行 one-way ANOVA 及鄧肯新多變域分析檢定，所標示大寫字母不同則表示彼此間具有顯著性差異 ($P < 0.05$)。(1) 正常組 (N, $n=7$)，攝食正常對照飼料 (D12106C)；(2) 高脂誘導組 (HFC, $n=31$)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料 (D12107C)，包含乳酸菌產品對照組及三組乳酸菌試驗組。



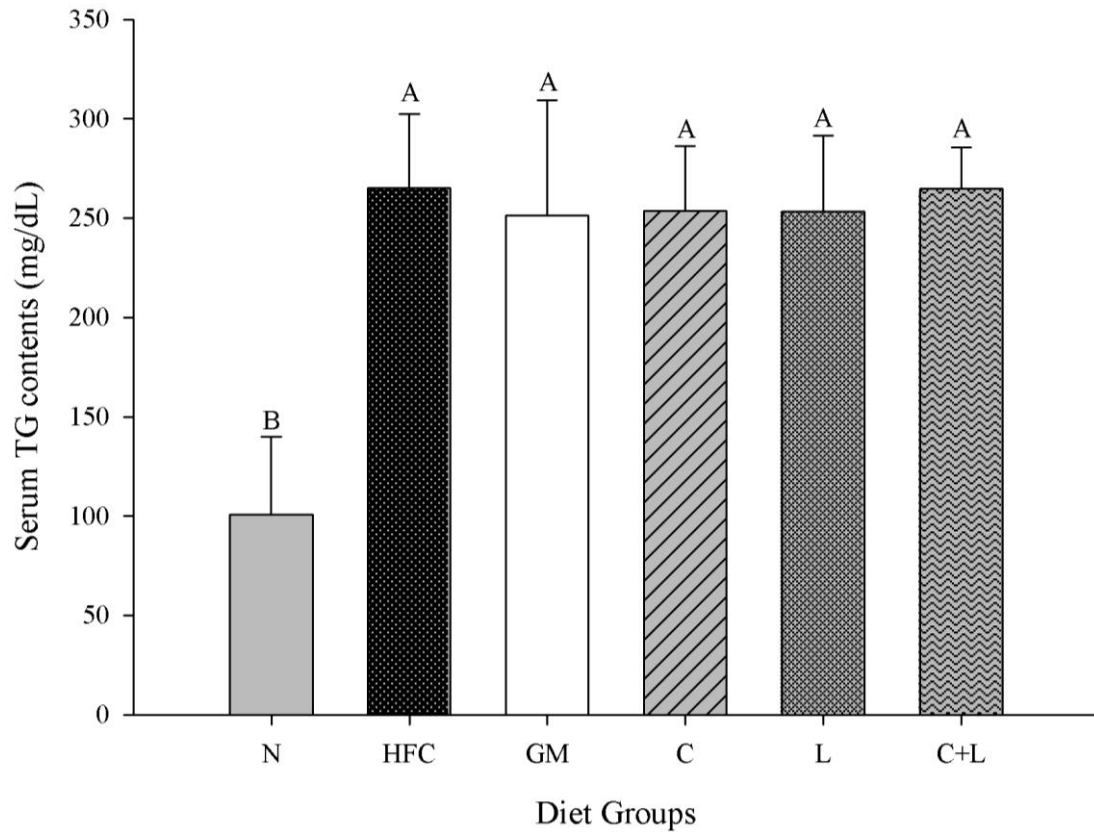
圖四、倉鼠體重變化趨勢

試驗動物於每週最後一天禁食 14~16 小時後秤量其體重。第 0 週為初始體重；第 0~2 週為高脂誘導週期；第 2~12 週為乳酸菌餵食試驗週期。數據以平均±標準差表示，並以 SAS 9.4 統計軟體進行 one-way ANOVA 及鄧肯新多變域分析檢定，所標示大寫字母不同則表示各組間具有顯著性差異 ($P < 0.05$)。(1) 正常組 (N, n=7)，攝食正常對照飼料 (D12106C)；(2) 高脂誘導組 (HFC, n=7)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料 (D12107C)；(3) 乳酸菌產品對照組 (GM, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之景岳樂亦纖乳酸菌產品；(4) 純菌體組 (C, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌純菌體；(5) 純培養液組 (L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 之 F7-4 乳酸菌純上清培養液；(6) 菌液組 (C+L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌菌液。



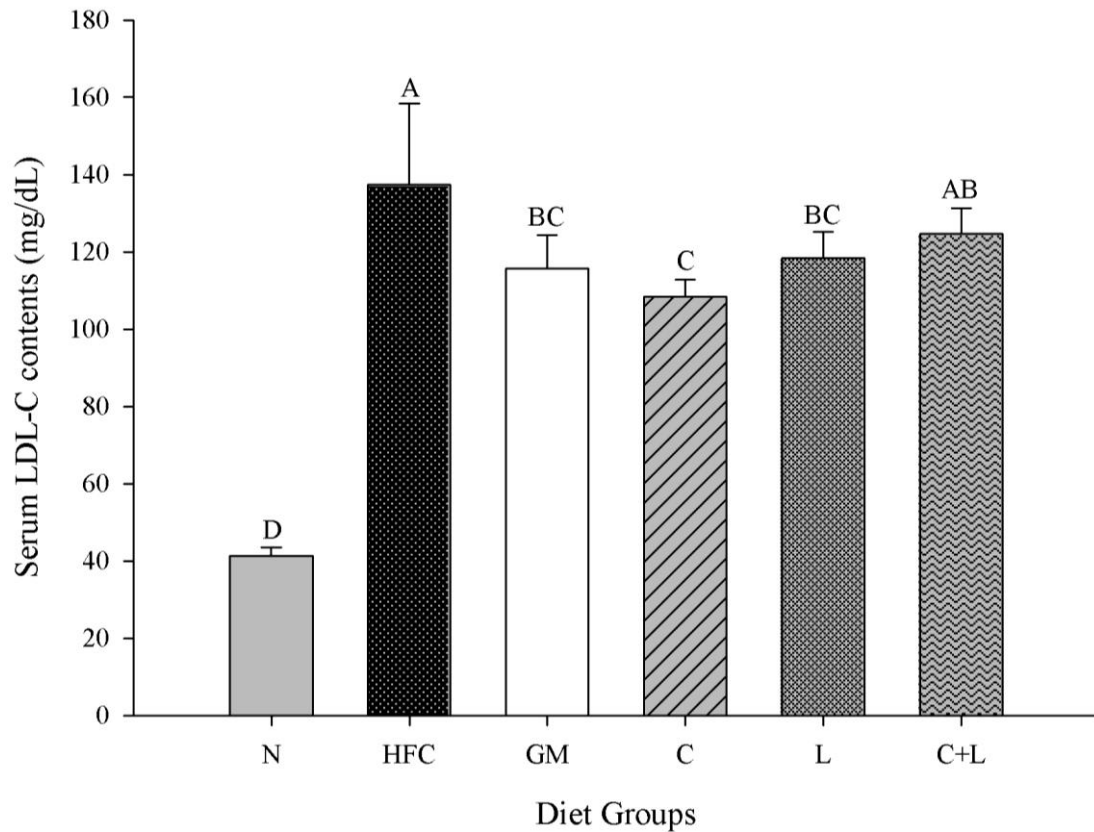
圖五、乳酸菌對高血脂症倉鼠血液中總膽固醇(TC)濃度之影響

研究數據為高膽固醇飲食誘導高血脂症倉鼠經餵食乳酸菌 10 週後犧牲，於肝門靜脈採取其血液，並測定血液中總膽固醇之濃度。數據以平均±標準差表示，並以 SAS 9.4 統計軟體進行 one-way ANOVA 及鄧肯新多變域分析檢定，所標示大寫字母不同則表示各組間具有顯著性差異($P < 0.05$)。(1)正常組(N, n=7)，攝食正常對照飼料(D12106C)；(2)高脂誘導組(HFC, n=7)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料(D12107C)；(3)乳酸菌產品對照組(GM, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之景岳樂亦纖乳酸菌產品；(4)純菌體組(C, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌純菌體；(5)純培養液組(L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 之 F7-4 乳酸菌純上清培養液；(6)菌液組(C+L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌菌液。



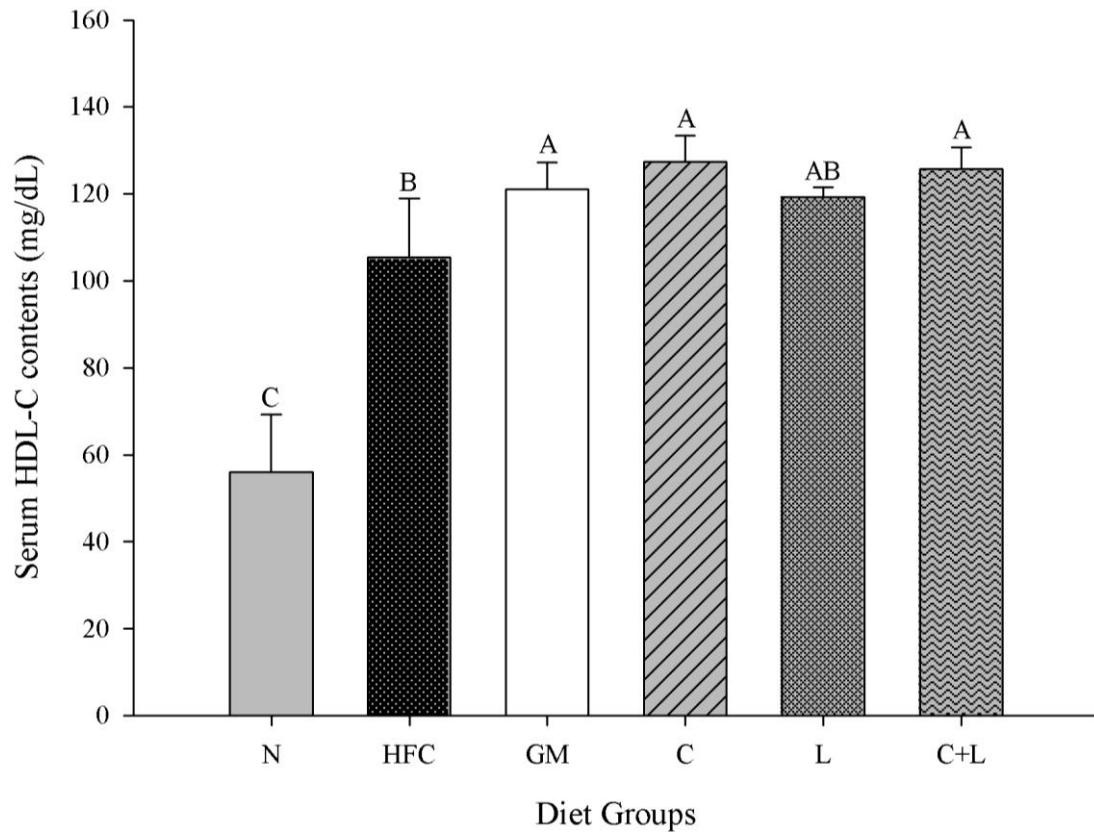
圖六、乳酸菌對高血脂症倉鼠血液中三酸甘油酯(TG)濃度之影響

研究數據為高膽固醇飲食誘導高血脂症倉鼠經餵食乳酸菌 10 週後犧牲，於肝門靜脈採取其血液，並測定血液中三酸甘油酯之濃度。數據以平均±標準差表示，並以 SAS 9.4 統計軟體進行 one-way ANOVA 及鄧肯新多變域分析檢定，所標示大寫字母不同則表示各組間具有顯著性差異 ($P < 0.05$)。(1) 正常組(N, n=7)，攝食正常對照飼料(D12106C)；(2) 高脂誘導組(HFC, n=7)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料(D12107C)；(3) 乳酸菌產品對照組(GM, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之景岳樂亦纖乳酸菌產品；(4) 純菌體組(C, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌純菌體；(5) 純培養液組(L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 之 F7-4 乳酸菌純上清培養液；(6) 菌液組(C+L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌菌液。



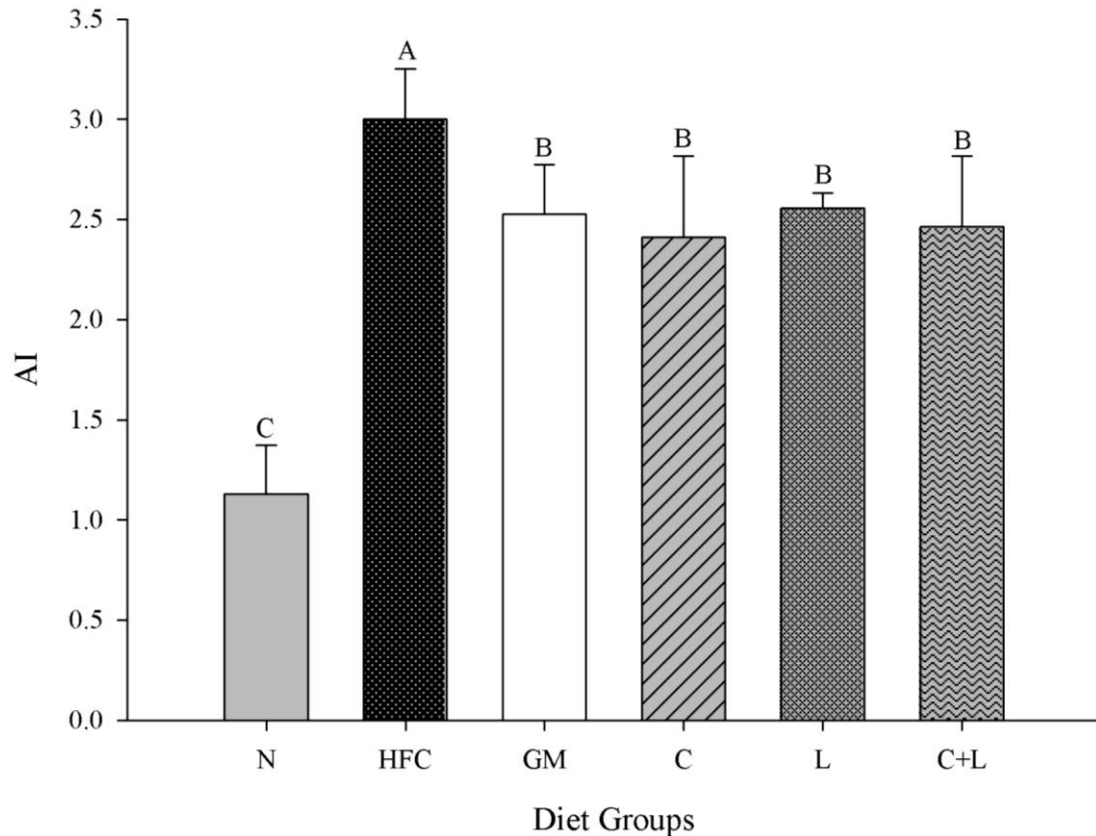
圖七、乳酸菌對高血脂症倉鼠血液中低密度脂蛋白膽固醇(LDL-C)濃度之影響

研究數據為高膽固醇飲食誘導高血脂症倉鼠經餵食乳酸菌 10 週後犧牲，於肝門靜脈採取其血液，並測定血液中低密度脂蛋白膽固醇之濃度。數據以平均±標準差表示，並以 SAS 9.4 統計軟體進行 one-way ANOVA 及鄧肯新多變域分析檢定，所標示大寫字母不同則表示各組間具有顯著性差異 ($P < 0.05$)。(1) 正常組 (N, n=7)，攝食正常對照飼料 (D12106C)；(2) 高脂誘導組 (HFC, n=7)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料 (D12107C)；(3) 乳酸菌產品對照組 (GM, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之景岳樂亦纖乳酸菌產品；(4) 純菌體組 (C, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌純菌體；(5) 純培養液組 (L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 之 F7-4 乳酸菌純上清培養液；(6) 菌液組 (C+L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌菌液。



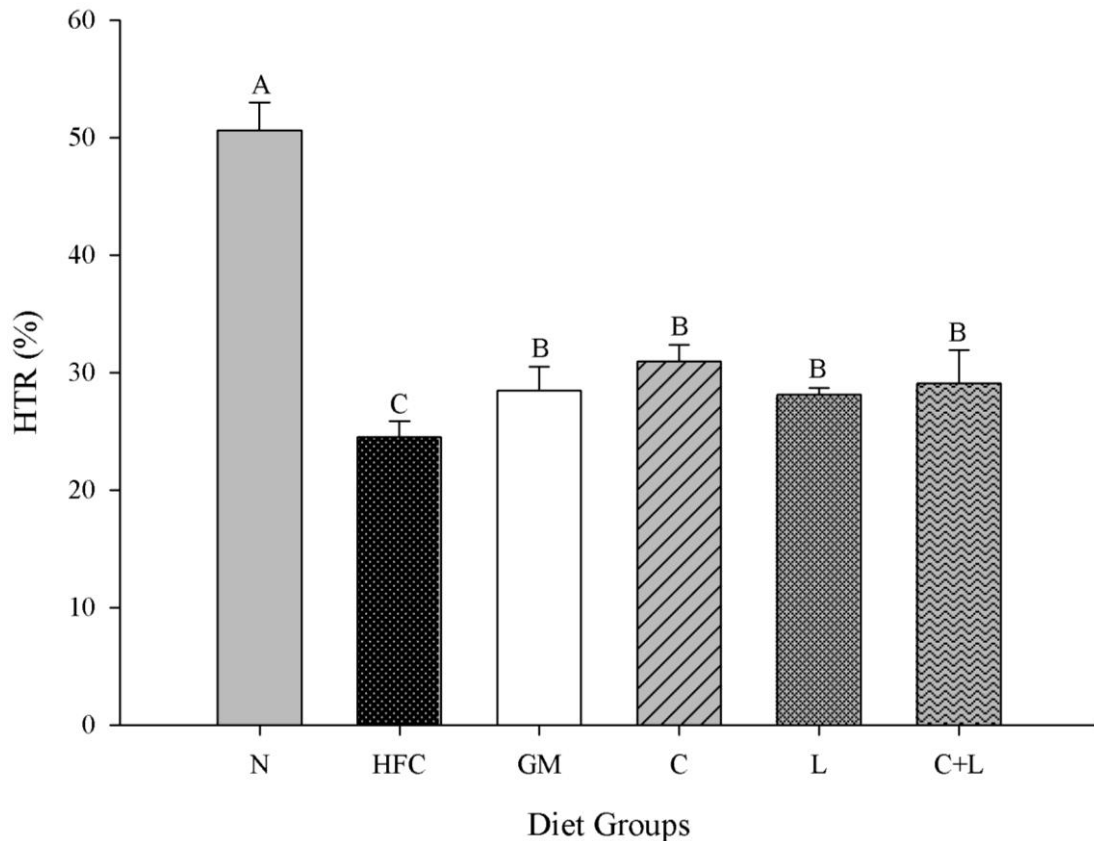
圖八、乳酸菌對高血脂症倉鼠血液中高密度脂蛋白膽固醇(HDL-C)濃度之影響

研究數據為高膽固醇飲食誘導高血脂症倉鼠經餵食乳酸菌 10 週後犧牲，於肝門靜脈採取其血液，並測定血液中高密度脂蛋白膽固醇之濃度。數據以平均±標準差表示，並以 SAS 9.4 統計軟體進行 one-way ANOVA 及鄧肯新多變域分析檢定，所標示大寫字母不同則表示各組間具有顯著性差異($P < 0.05$)。(1)正常組(N, n=7)，攝食正常對照飼料(D12106C)；(2)高脂誘導組(HFC, n=7)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料(D12107C)；(3)乳酸菌產品對照組(GM, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之景岳樂亦纖乳酸菌產品；(4)純菌體組(C, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌純菌體；(5)純培養液組(L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 之 F7-4 乳酸菌純上清培養液；(6)菌液組(C+L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌菌液。



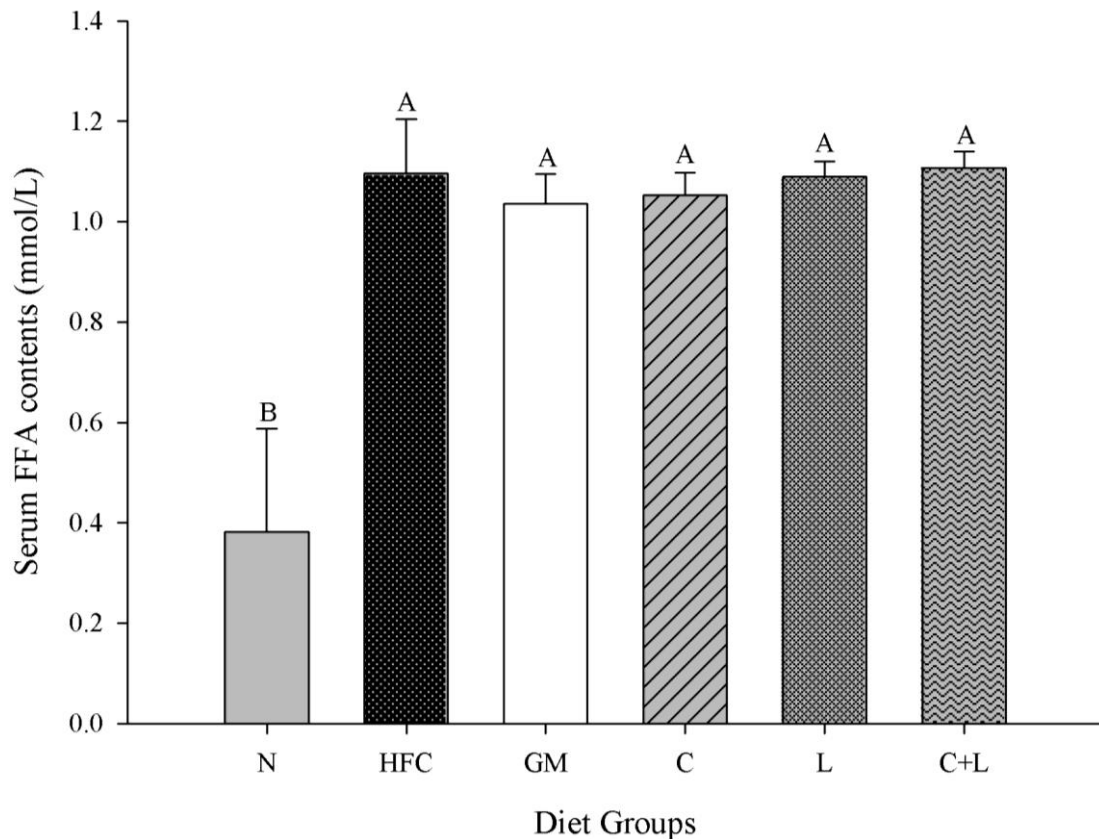
圖九、乳酸菌對高脂血症倉鼠動脈粥狀硬化指數(AI)之影響

研究數據為高膽固醇飲食誘導高脂血症倉鼠經餵食乳酸菌 10 週後犧牲，於肝門靜脈採取其血液，並利用血液中總膽固醇(TC)及高密度脂蛋白膽固醇(HDL-C)之濃度，計算出動脈粥狀硬化指數(AI)， $AI = (TC - HDL-C) \div HDL-C$ 。數據以平均±標準差表示，並以 SAS 9.4 統計軟體進行 one-way ANOVA 及鄧肯新多變域分析檢定，所標示大寫字母不同則表示各組間具有顯著性差異($P < 0.05$)。(1)正常組(N, n=7)，攝食正常對照飼料(D12106C)；(2)高脂誘導組(HFC, n=7)，攝食含 0.5%膽固醇之高脂飼料(D12107C)；(3)乳酸菌產品對照組(GM, n=6)，攝食含 0.5%膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之景岳樂亦纖乳酸菌產品；(4)純菌體組(C, n=6)，攝食含 0.5%膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌純菌體；(5)純培養液組(L, n=6)，攝食含 0.5%膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 之 F7-4 乳酸菌純上清培養液；(6)菌液組(C+L, n=6)，攝食含 0.5%膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌菌液。

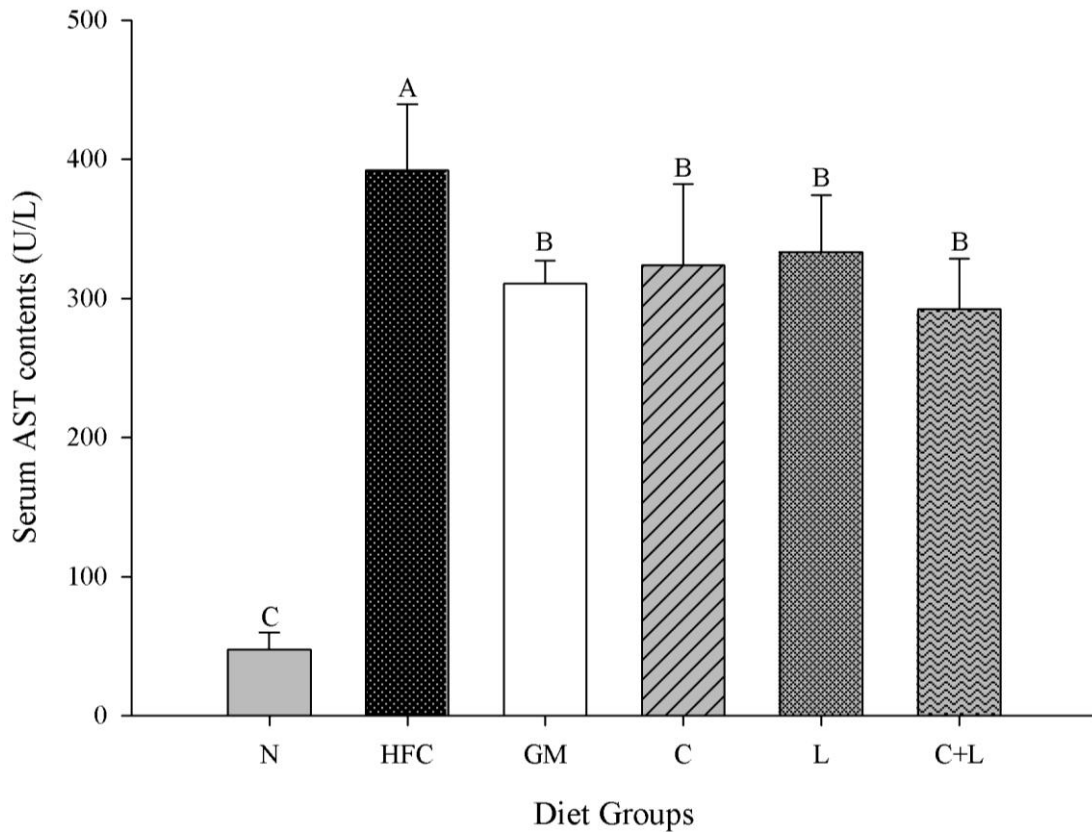


圖十、乳酸菌對高血脂症倉鼠高密度脂蛋白膽固醇比率(HTR)之影響

研究數據為高膽固醇飲食誘導高血脂症倉鼠經餵食乳酸菌 10 週後犧牲，於肝門靜脈採取其血液，並利用血液中膽固醇(TC)及高密度脂蛋白膽固醇(HDL-C)之濃度，計算出高密度脂蛋白膽固醇比率(HTR)， $HTR = HDL-C \div TC \times 100\%$ 。數據以平均 \pm 標準差表示，並以 SAS 9.4 統計軟體進行 one-way ANOVA 及鄧肯新多變域分析檢定，所標示大寫字母不同則表示各組間具有顯著性差異($P < 0.05$)。(1)正常組(N, n=7)，攝食正常對照飼料(D12106C)；(2)高脂誘導組(HFC, n=7)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料(D12107C)；(3)乳酸菌產品對照組(GM, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之景岳樂亦纖乳酸菌產品；(4)純菌體組(C, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌純菌體；(5)純培養液組(L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 之 F7-4 乳酸菌純上清培養液；(6)菌液組(C+L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌菌液。

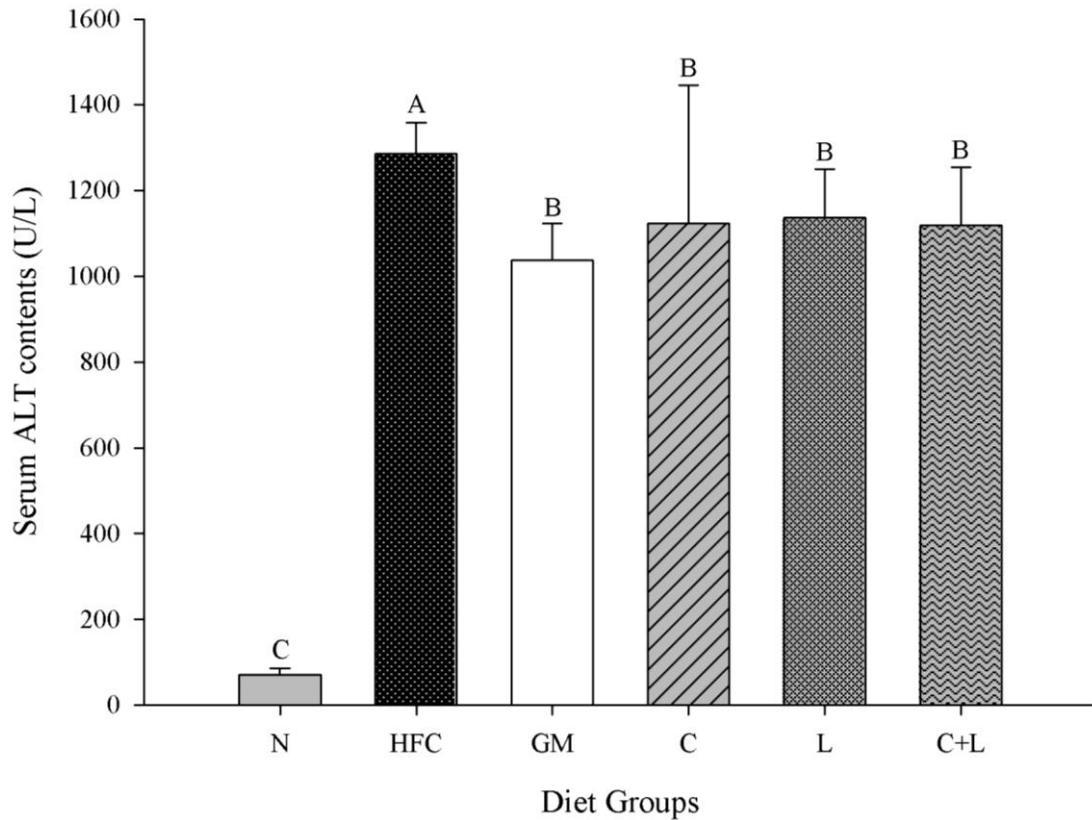


圖十一、乳酸菌對高血脂症倉鼠血液中游離脂肪酸(FFA)濃度之影響
 研究數據為高膽固醇飲食誘導高血脂症倉鼠經餵食乳酸菌 10 週後犧牲，於肝門靜脈採取其血液，並測定血液中游離脂肪酸之濃度。數據以平均±標準差表示，並以 SAS 9.4 統計軟體 one-way ANOVA 及進行鄧肯新多變域分析檢定，所標示大寫字母不同則表示各組間具有顯著性差異($P < 0.05$)。(1)正常組(N, n=7)，攝食正常對照飼料(D12106C)；(2)高脂誘導組(HFC, n=7)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料(D12107C)；(3)乳酸菌產品對照組(GM, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之景岳樂亦纖乳酸菌產品；(4)純菌體組(C, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌純菌體；(5)純培養液組(L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 之 F7-4 乳酸菌純上清培養液；(6)菌液組(C+L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌菌液。

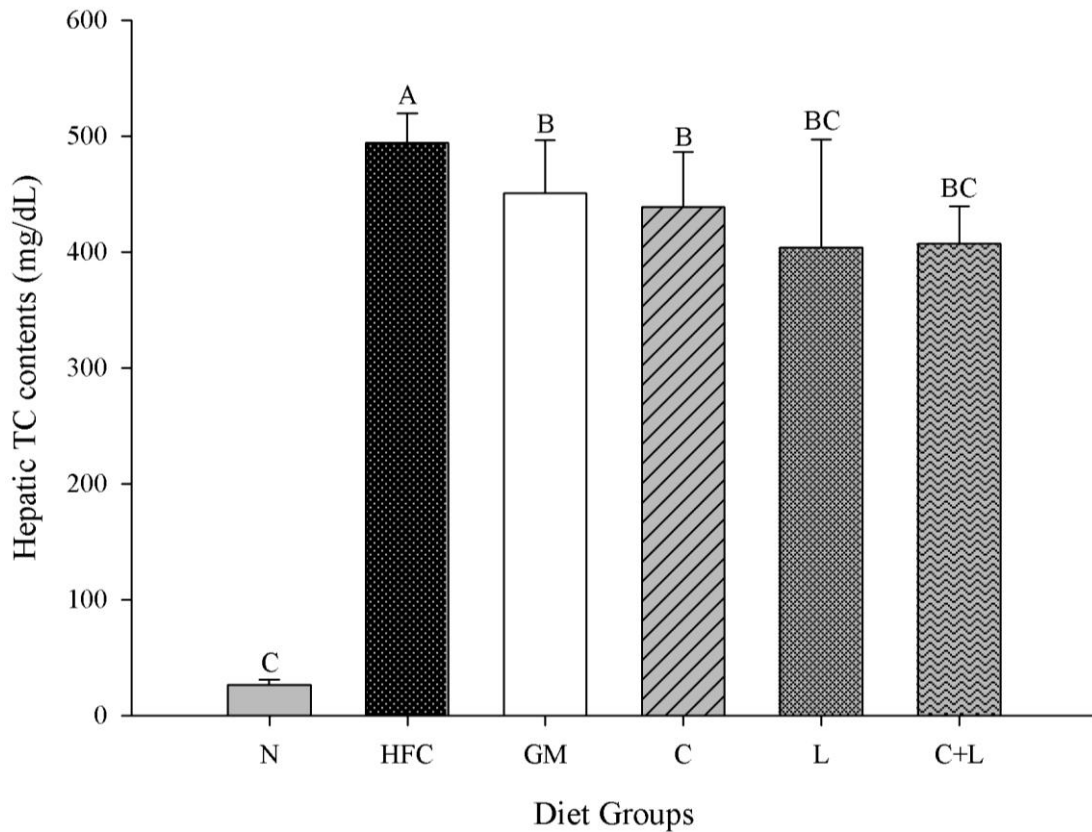


圖十二、乳酸菌對高脂血症倉鼠血液中天門冬胺酸轉胺酶(AST)濃度之影響

研究數據為高膽固醇飲食誘導高脂血症倉鼠經餵食乳酸菌 10 週後犧牲，於肝門靜脈採取其血液，並測定血液中天門冬胺酸轉胺酶之濃度。數據以平均±標準差表示，並以 SAS 9.4 統計軟體進行 one-way ANOVA 及鄧肯新多變域分析檢定，所標示大寫字母不同則表示各組間具有顯著性差異($P < 0.05$)。(1)正常組(N, n=7)，攝食正常對照飼料(D12106C)；(2)高脂誘導組(HFC, n=7)，攝食含 0.5%膽固醇之高脂飼料(D12107C)；(3)乳酸菌產品對照組(GM, n=6)，攝食含 0.5%膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之景岳樂亦纖乳酸菌產品；(4)純菌體組(C, n=6)，攝食含 0.5%膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌純菌體；(5)純培養液組(L, n=6)，攝食含 0.5%膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 之 F7-4 乳酸菌純上清培養液；(6)菌液組(C+L, n=6)，攝食含 0.5%膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌菌液。

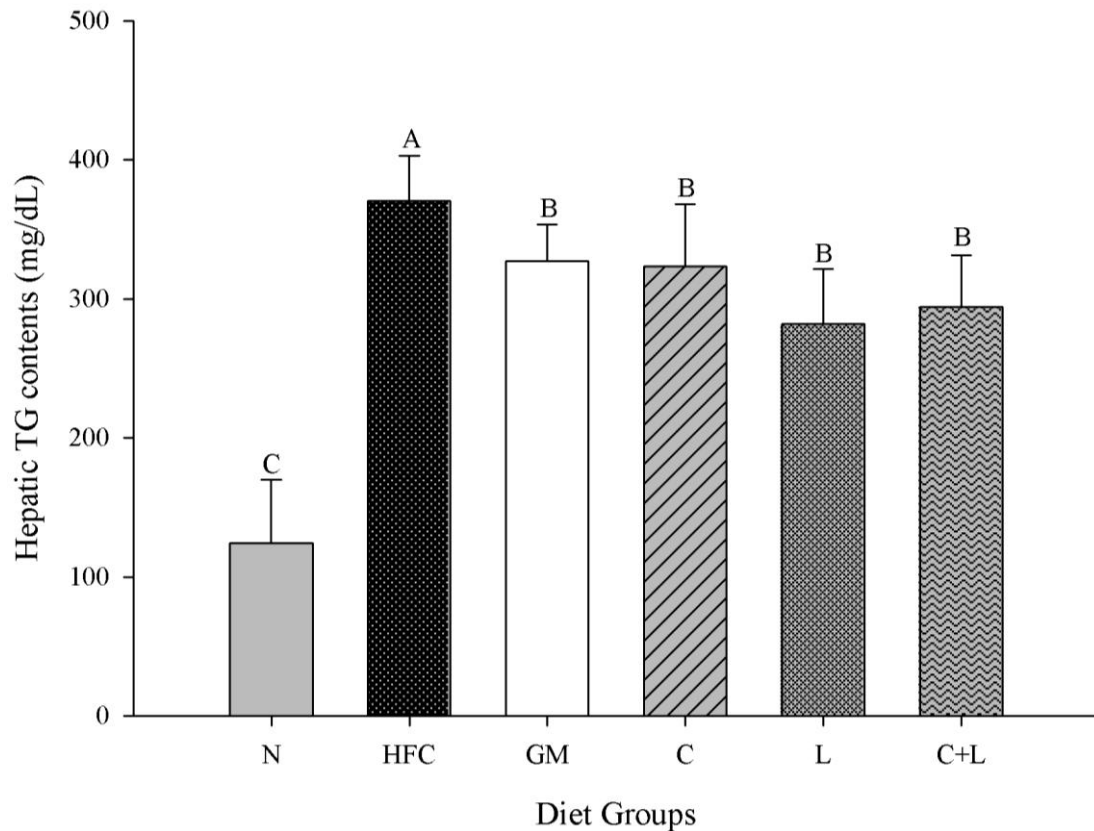


圖十三、乳酸菌對高血脂症倉鼠血液中丙胺酸轉胺酶(ALT)濃度之影響
 研究數據為高膽固醇飲食誘導高血脂症倉鼠經餵食乳酸菌 10 週後犧牲，於肝門靜脈採取其血液，並測定血液中丙胺酸轉胺酶之濃度。數據以平均±標準差表示，並以 SAS 9.4 統計軟體進行 one-way ANOVA 及鄧肯新多變域分析檢定，所標示大寫字母不同則表示各組間具有顯著性差異($P < 0.05$)。(1)正常組(N, n=7)，攝食正常對照飼料(D12106C)；(2)高脂誘導組(HFC, n=7)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料(D12107C)；(3)乳酸菌產品對照組(GM, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之景岳樂亦纖乳酸菌產品；(4)純菌體組(C, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌純菌體；(5)純培養液組(L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 之 F7-4 乳酸菌純上清培養液；(6)菌液組(C+L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌菌液。



圖十四、乳酸菌對高血脂症倉鼠肝臟中總膽固醇(TC)濃度之影響

研究數據為高膽固醇飲食誘導高血脂症倉鼠經餵食乳酸菌後犧牲，將肝臟脂質萃取，並測定肝臟中總膽固醇之濃度。數據以平均±標準差表示，並以 SAS 9.4 統計軟體進行 one-way ANOVA 及鄧肯新多變域分析檢定，所標示大寫字母不同則表示各組間具有顯著性差異($P < 0.05$)。(1)正常組(N, n=7)，攝食正常對照飼料(D12106C)；(2)高脂誘導組(HFC, n=7)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料(D12107C)；(3)乳酸菌產品對照組(GM, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之景岳樂亦纖乳酸菌產品；(4)純菌體組(C, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌純菌體；(5)純培養液組(L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 之 F7-4 乳酸菌純上清培養液；(6)菌液組(C+L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌菌液。



圖十五、乳酸菌對高血脂症倉鼠肝臟中三酸甘油酯(TG)濃度之影響

研究數據為高膽固醇飲食誘導高血脂症倉鼠經餵食乳酸菌後犧牲，將肝臟脂質萃取，並測定肝臟中三酸甘油酯之濃度。數據以平均±標準差表示，並以 SAS 9.4 統計軟體進行 one-way ANOVA 及鄧肯新多變域分析檢定，所標示大寫字母不同則表示各組間具有顯著性差異($P < 0.05$)。(1)正常組(N, n=7)，攝食正常對照飼料(D12106C)；(2)高脂誘導組(HFC, n=7)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料(D12107C)；(3)乳酸菌產品對照組(GM, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之景岳樂亦纖乳酸菌產品；(4)純菌體組(C, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌純菌體；(5)純培養液組(L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 之 F7-4 乳酸菌純上清培養液；(6)菌液組(C+L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌菌液。

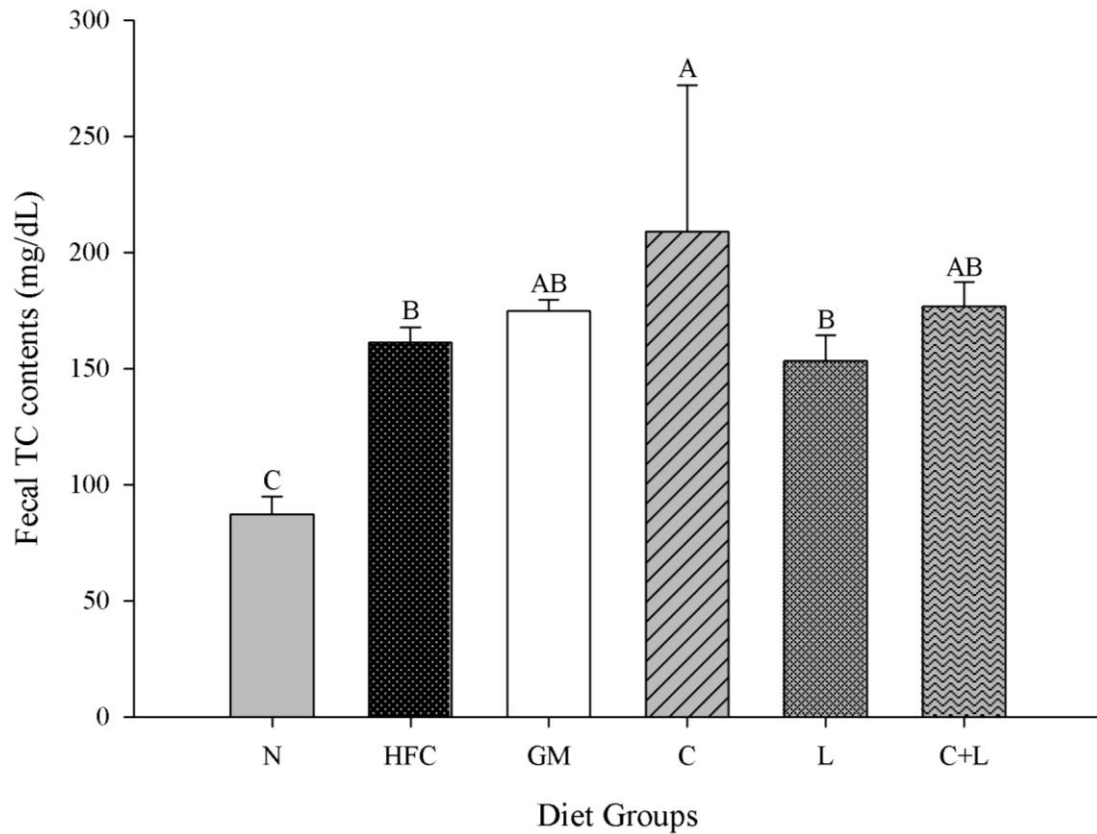
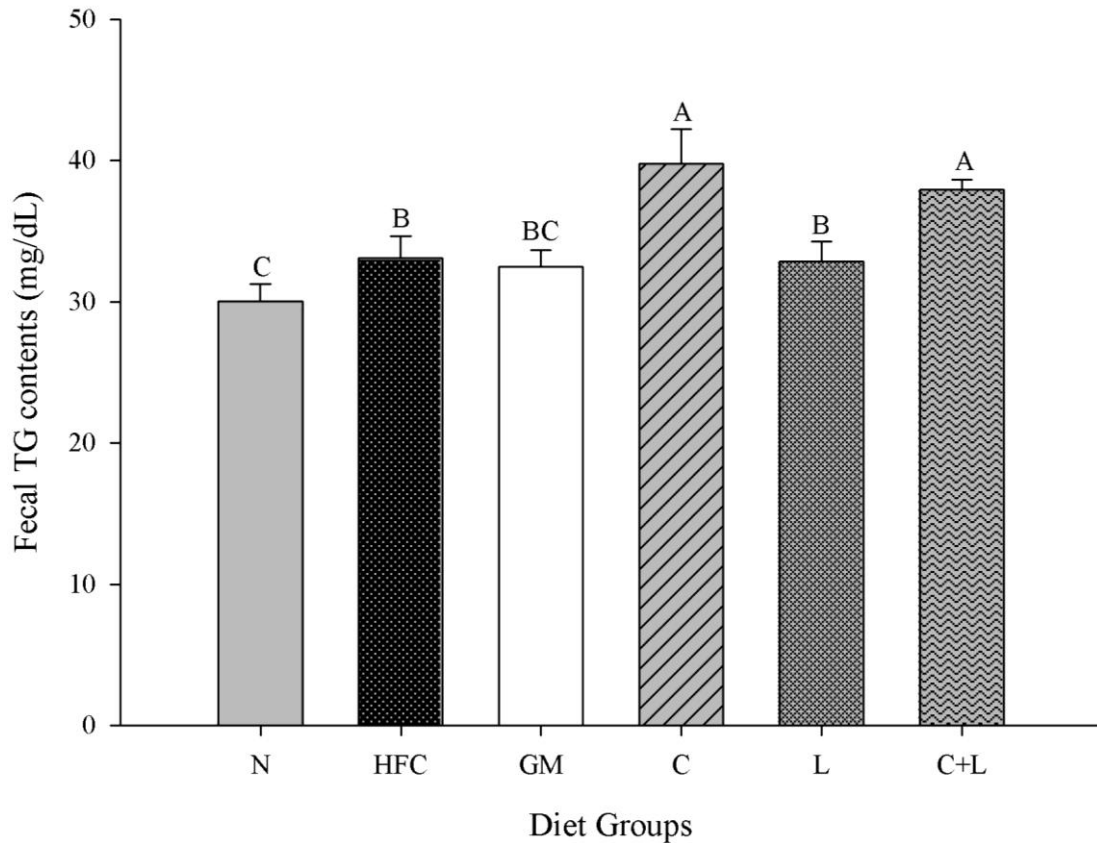


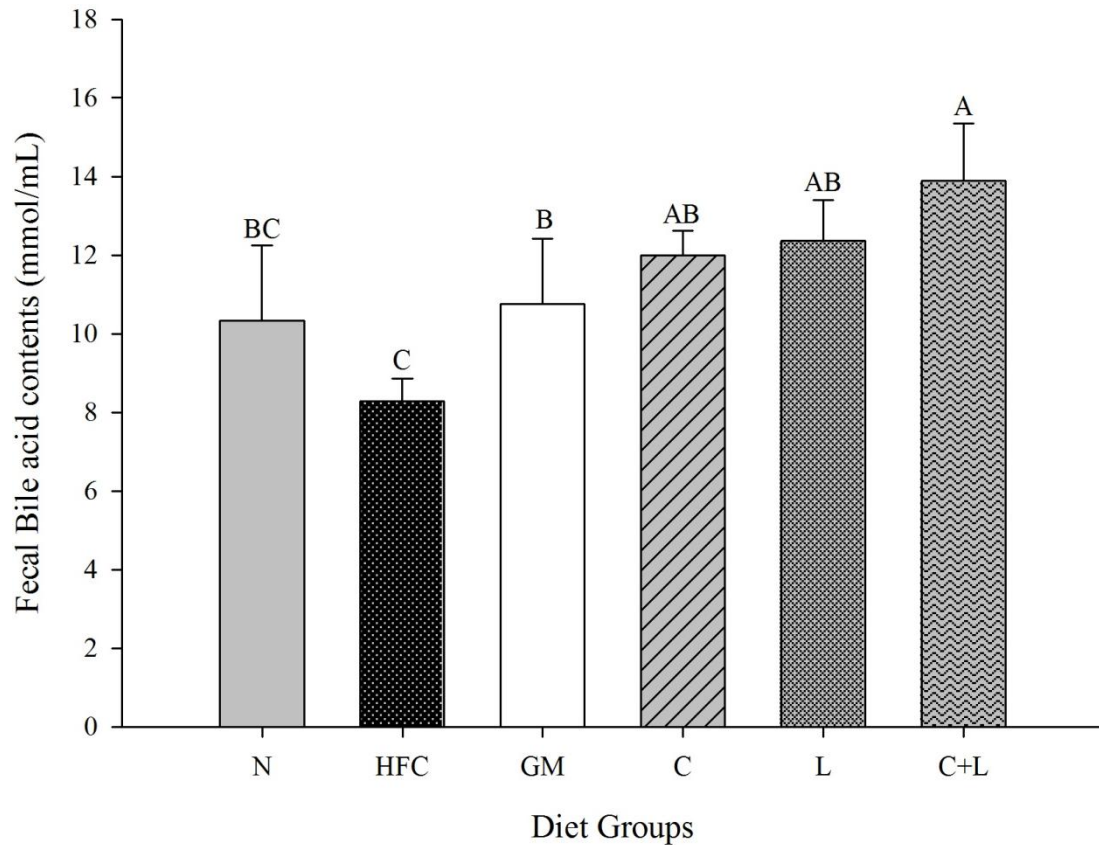
圖 十六、乳酸菌對高血脂症倉鼠糞便中總膽固醇(TC)濃度之影響

研究數據為高膽固醇飲食誘導高血脂症倉鼠經餵食乳酸菌後犧牲，將糞便脂質萃取，並測定糞便中總膽固醇之濃度。數據以平均±標準差表示，並以 SAS 9.4 統計軟體進行 one-way ANOVA 及鄧肯新多變域分析檢定，所標示大寫字母不同則表示各組間具有顯著性差異($P < 0.05$)。(1)正常組(N, n=7)，攝食正常對照飼料(D12106C)；(2)高脂誘導組(HFC, n=7)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料(D12107C)；(3)乳酸菌產品對照組(GM, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之景岳樂亦纖乳酸菌產品；(4)純菌體組(C, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌純菌體；(5)純培養液組(L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 之 F7-4 乳酸菌純上清培養液；(6)菌液組(C+L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌菌液。



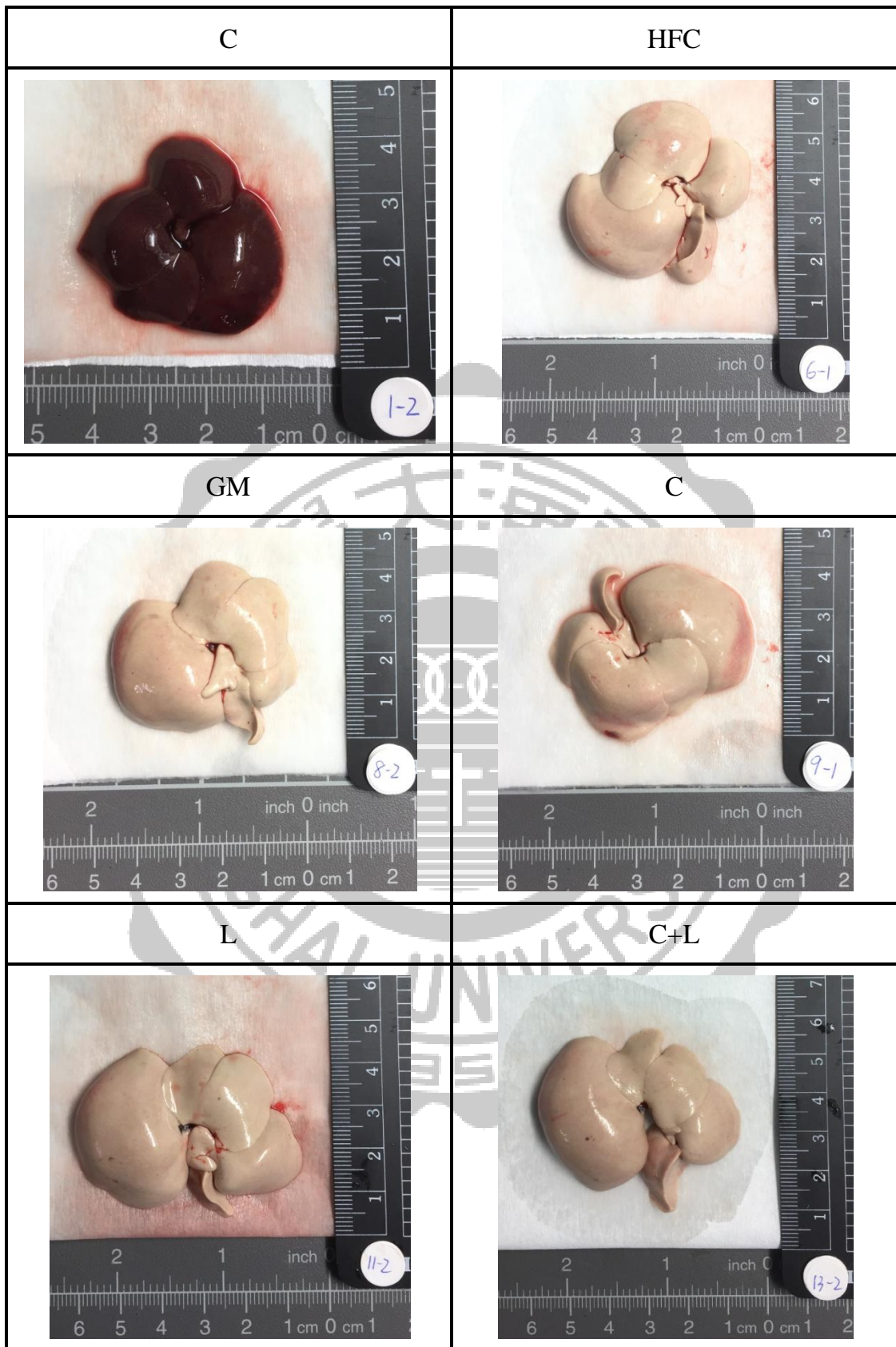
圖十七、乳酸菌對高血脂症倉鼠糞便中三酸甘油酯(TG)濃度之影響

研究數據為高膽固醇飲食誘導高血脂症倉鼠經餵食乳酸菌後犧牲，將糞便脂質萃取，並測定糞便中三酸甘油酯之濃度。數據以平均±標準差表示，並以 SAS 9.4 統計軟體進行 one-way ANOVA 及鄧肯新多變域分析檢定，所標示大寫字母不同則表示各組間具有顯著性差異($P < 0.05$)。(1)正常組(N, n=7)，攝食正常對照飼料(D12106C)；(2)高脂誘導組(HFC, n=7)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料(D12107C)；(3)乳酸菌產品對照組(GM, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之景岳樂亦纖乳酸菌產品；(4)純菌體組(C, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌純菌體；(5)純培養液組(L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 之 F7-4 乳酸菌純上清培養液；(6)菌液組(C+L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌菌液。

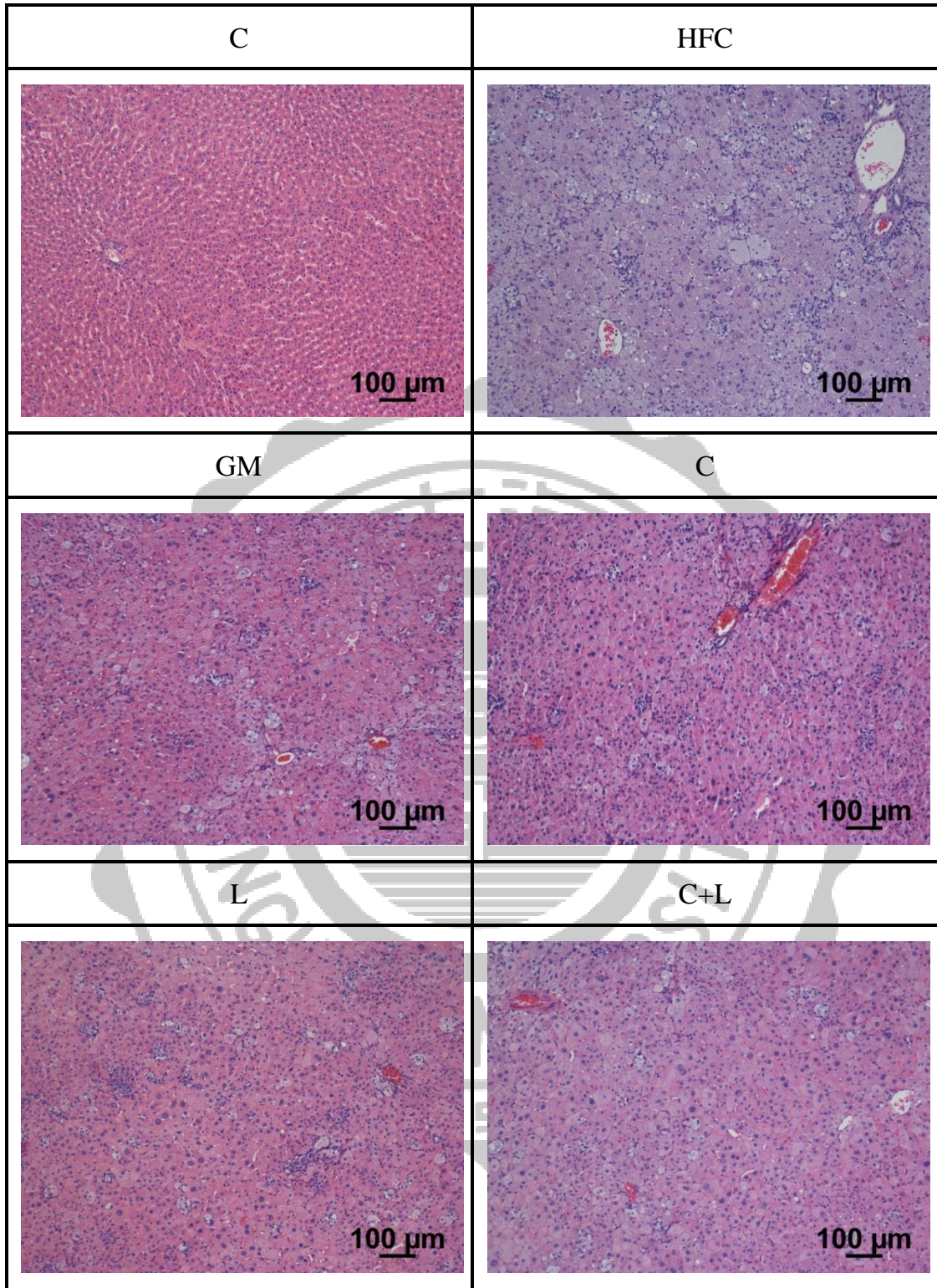


圖十八、乳酸菌對高血脂症倉鼠糞便中膽酸(Bile acid)含量之影響

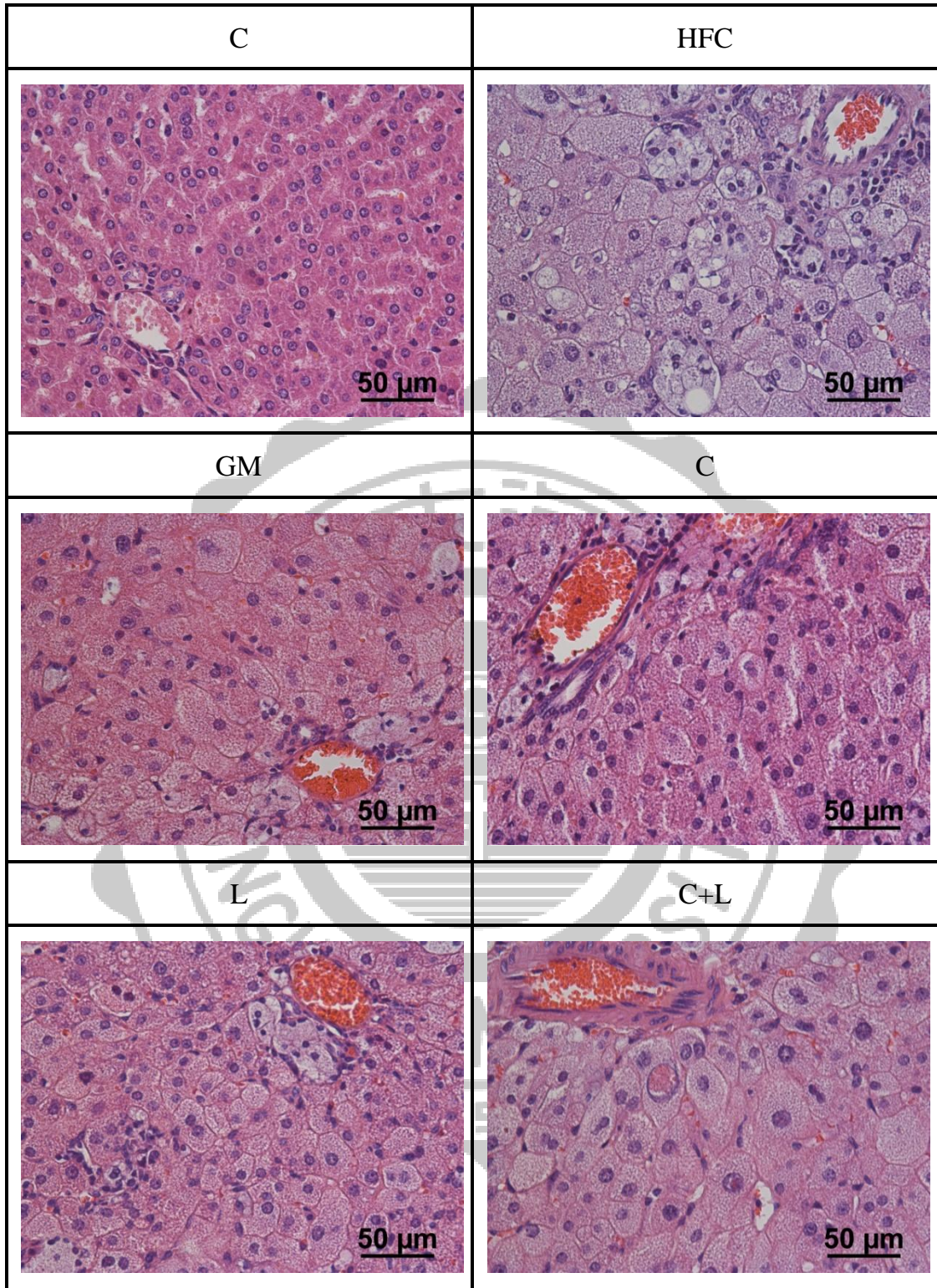
研究數據為高膽固醇飲食誘導高血脂症倉鼠經餵食乳酸菌後犧牲，將糞便脂質萃取，並測定糞便中膽酸之含量。數據以平均±標準差表示，並以 SAS 9.4 統計軟體進行 one-way ANOVA 及鄧肯新多變域分析檢定，所標示大寫字母不同則表示各組間具有顯著性差異 ($P < 0.05$)。(1)正常組(N, n=7)，攝食正常對照飼料(D12106C)；(2)高脂誘導組(HFC, n=7)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料(D12107C)；(3)乳酸菌產品對照組(GM, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之景岳樂亦纖乳酸菌產品；(4)純菌體組(C, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌純菌體；(5)純培養液組(L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 之 F7-4 乳酸菌純上清培養液；(6)菌液組(C+L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌菌液。



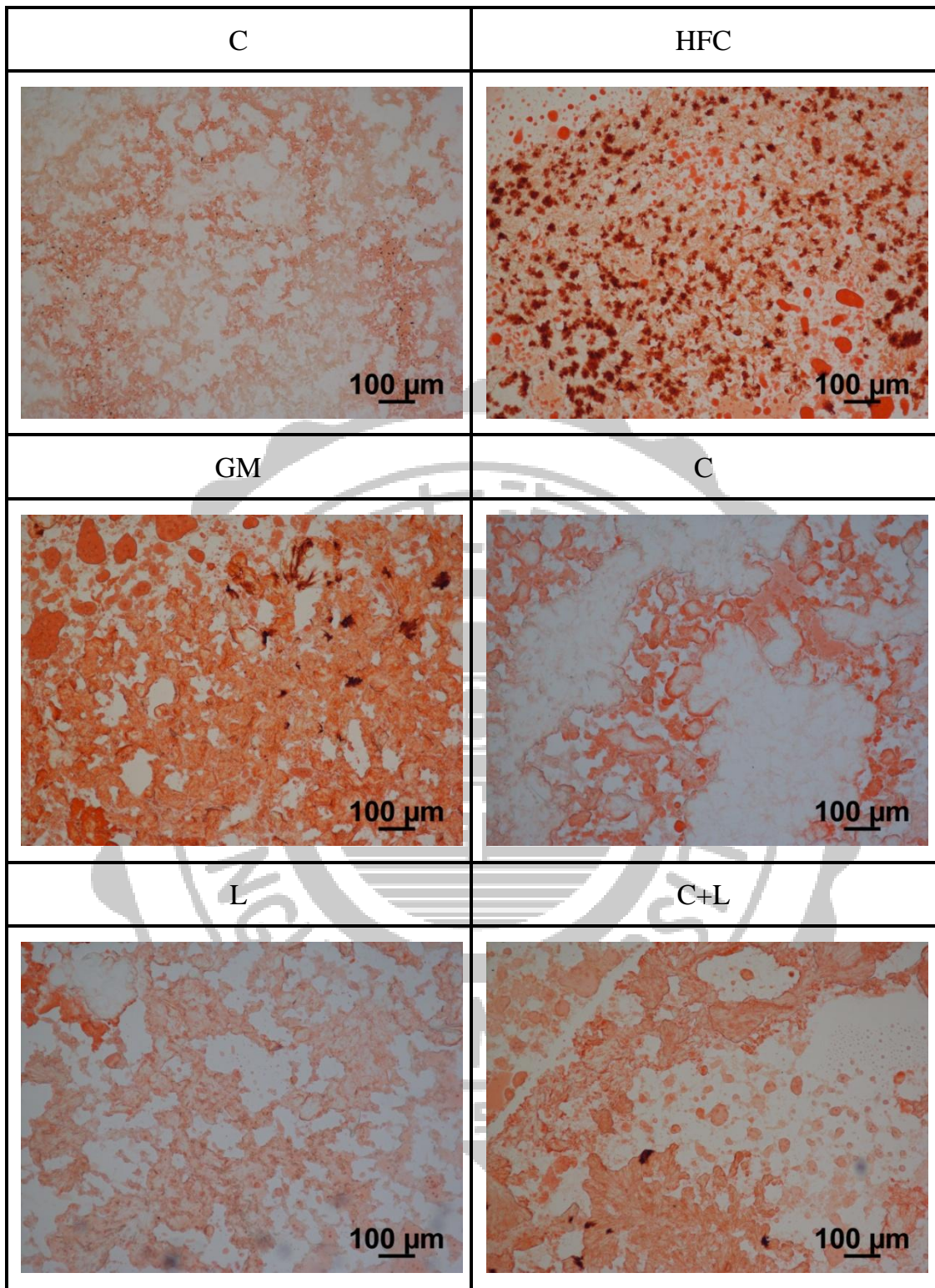
圖十九、乳酸菌對高血脂症倉鼠肝臟外觀病理型態之影響



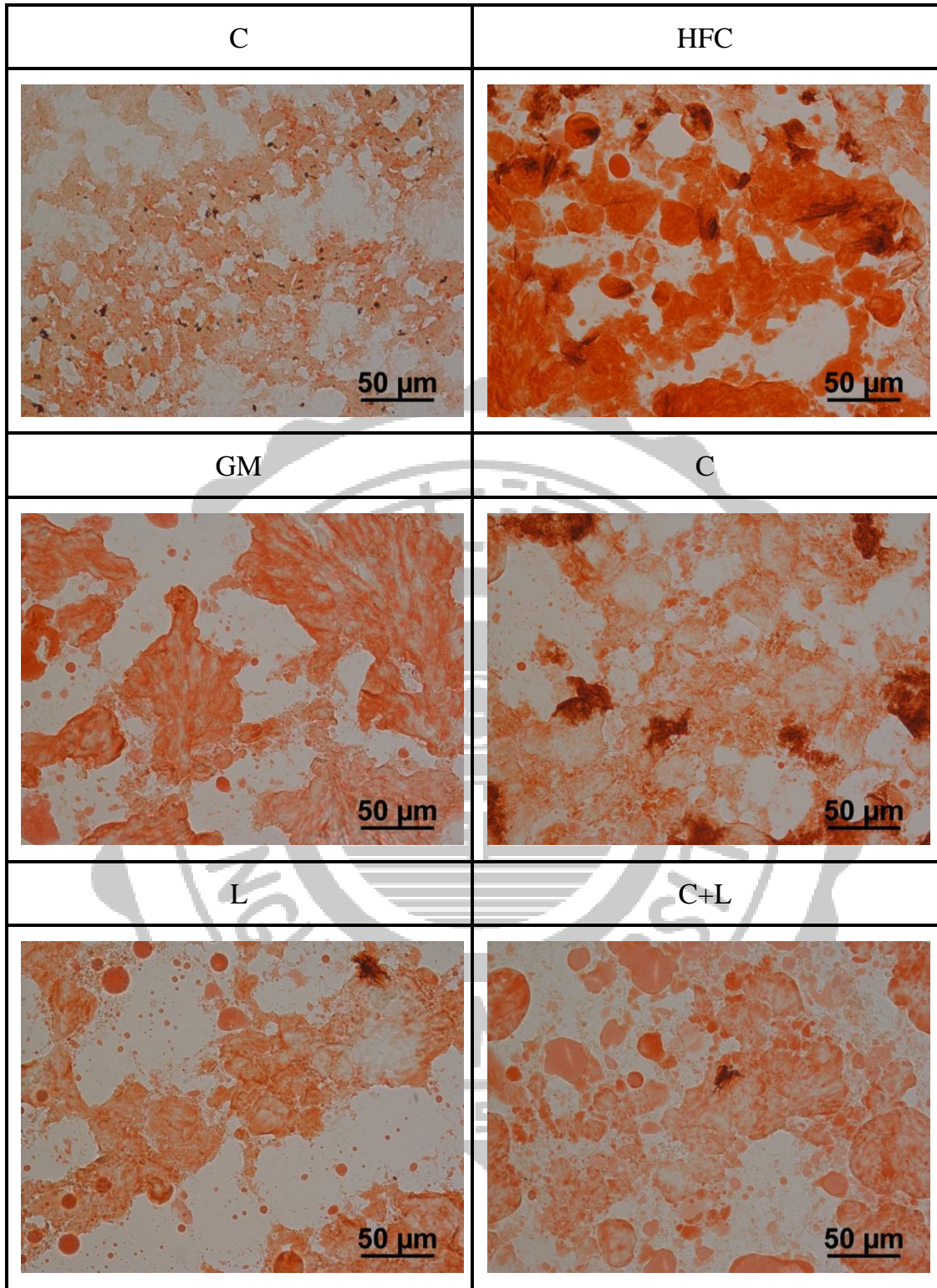
圖二十、乳酸菌對高血脂症倉鼠肝臟組織蘇木紫與伊紅染色(100×)之影響



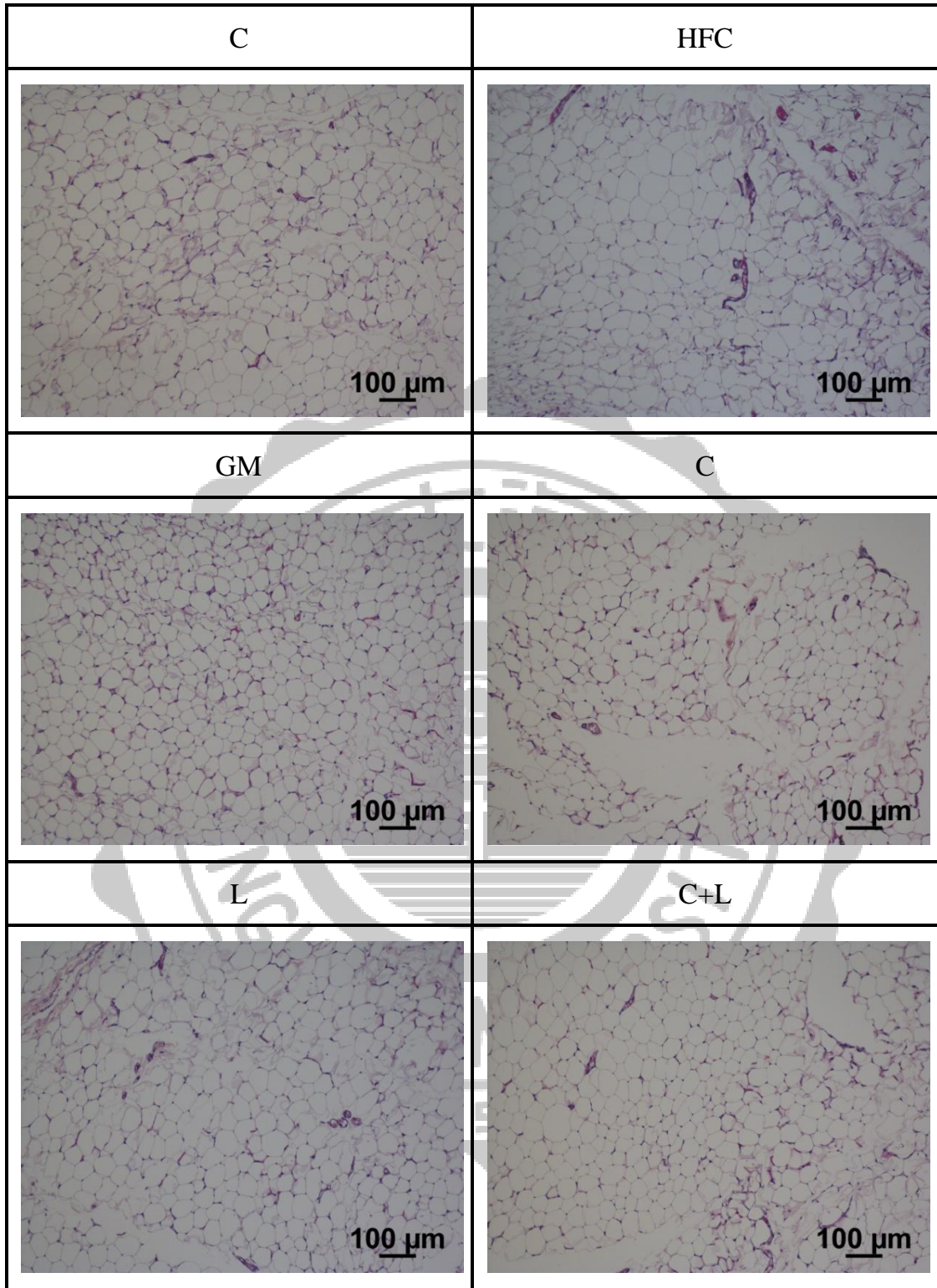
圖二十一、乳酸菌對高血脂症倉鼠肝臟組織蘇木紫與伊紅染色(400×)之影響



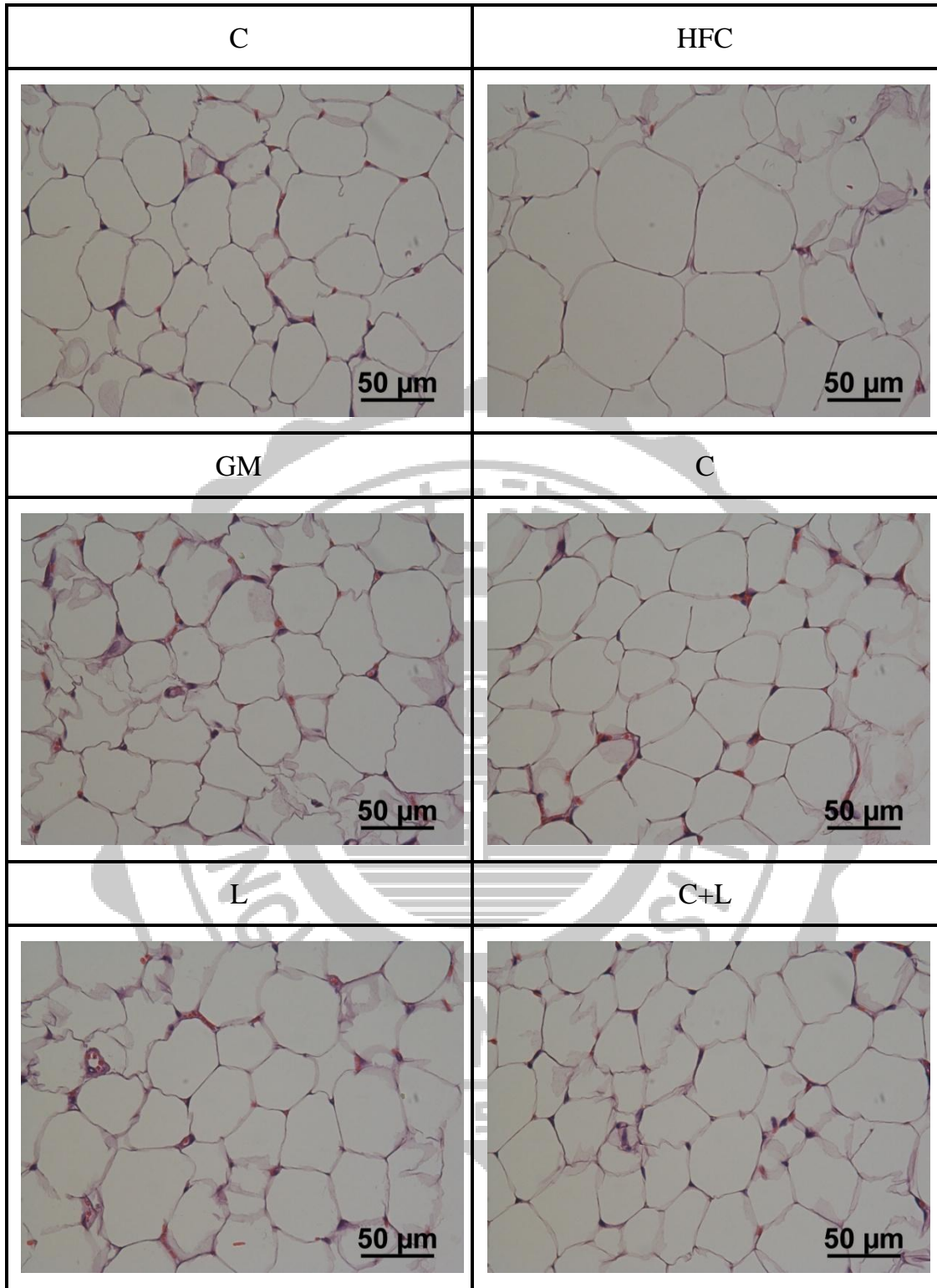
圖二十二、乳酸菌對高血脂症倉鼠肝臟組織油紅染色(100×)之影響



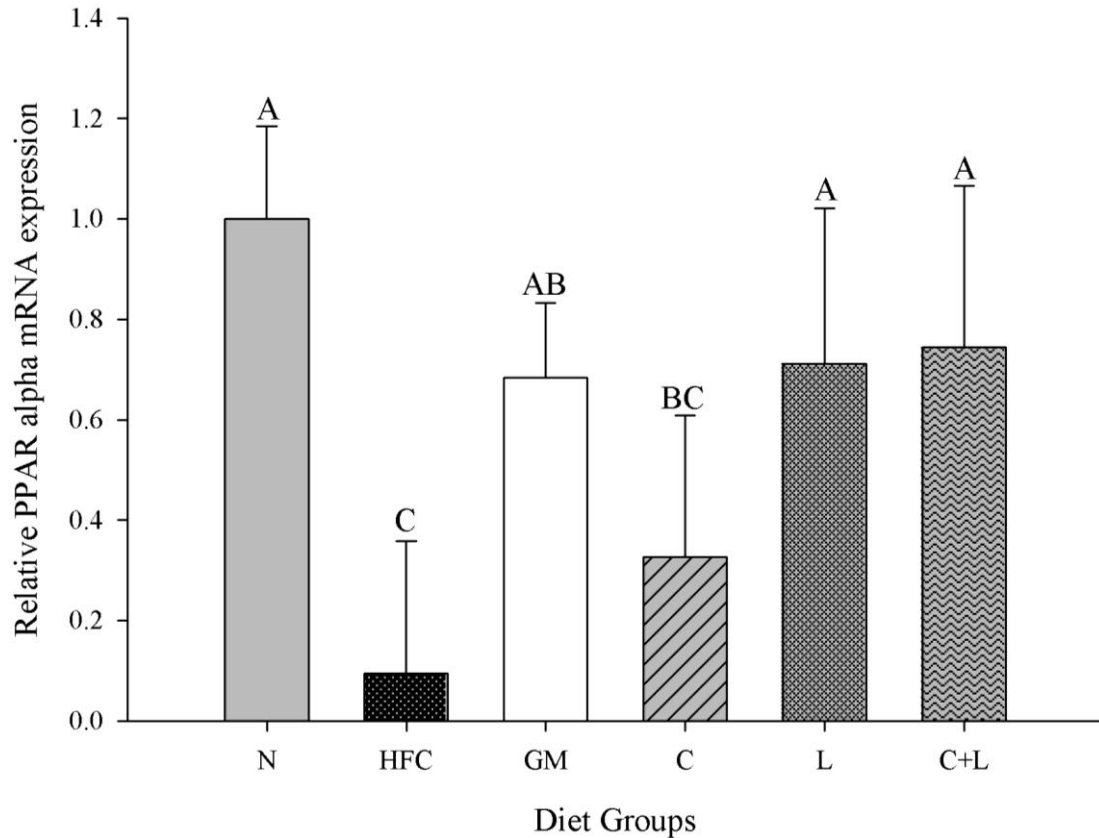
圖二十三、乳酸菌對高血脂症倉鼠肝臟組織油紅染色(400×)之影響



圖二十四、乳酸菌對高血脂症倉鼠脂肪組織蘇木紫與伊紅染色(100×)之影響

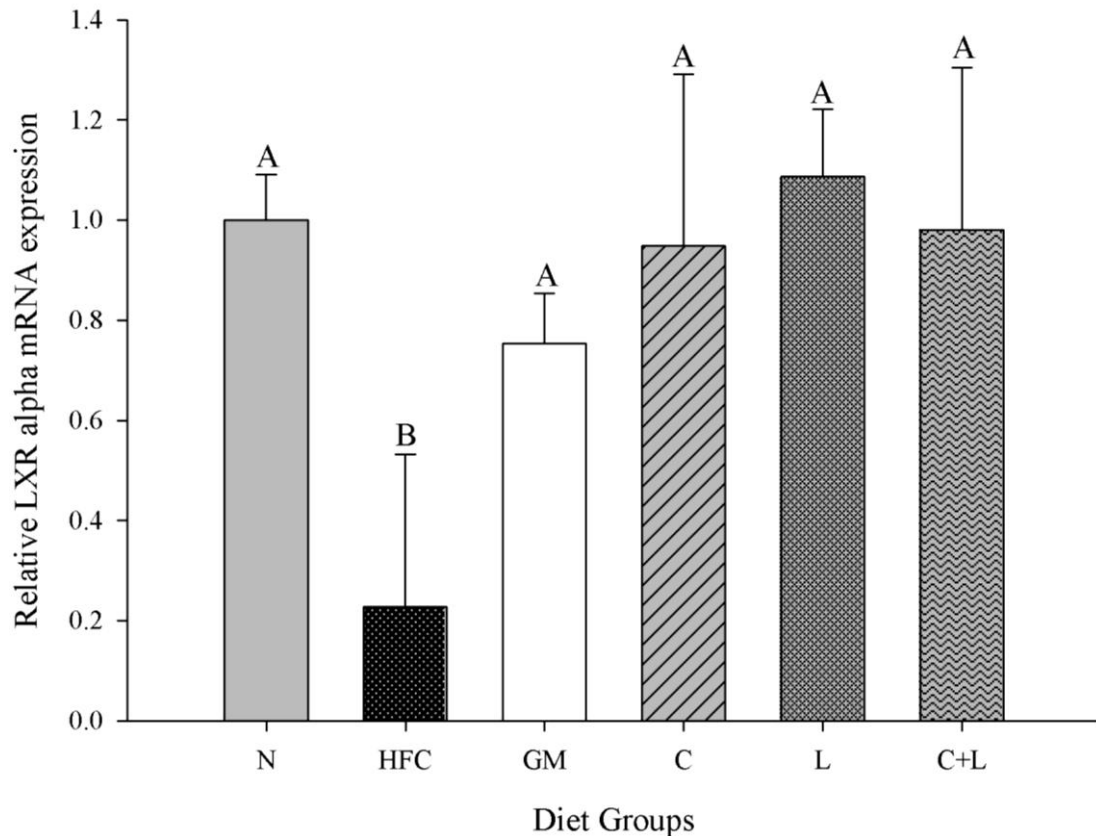


圖二十五、乳酸菌對高血脂症倉鼠脂肪組織蘇木紫與伊紅染色(400×)之影響



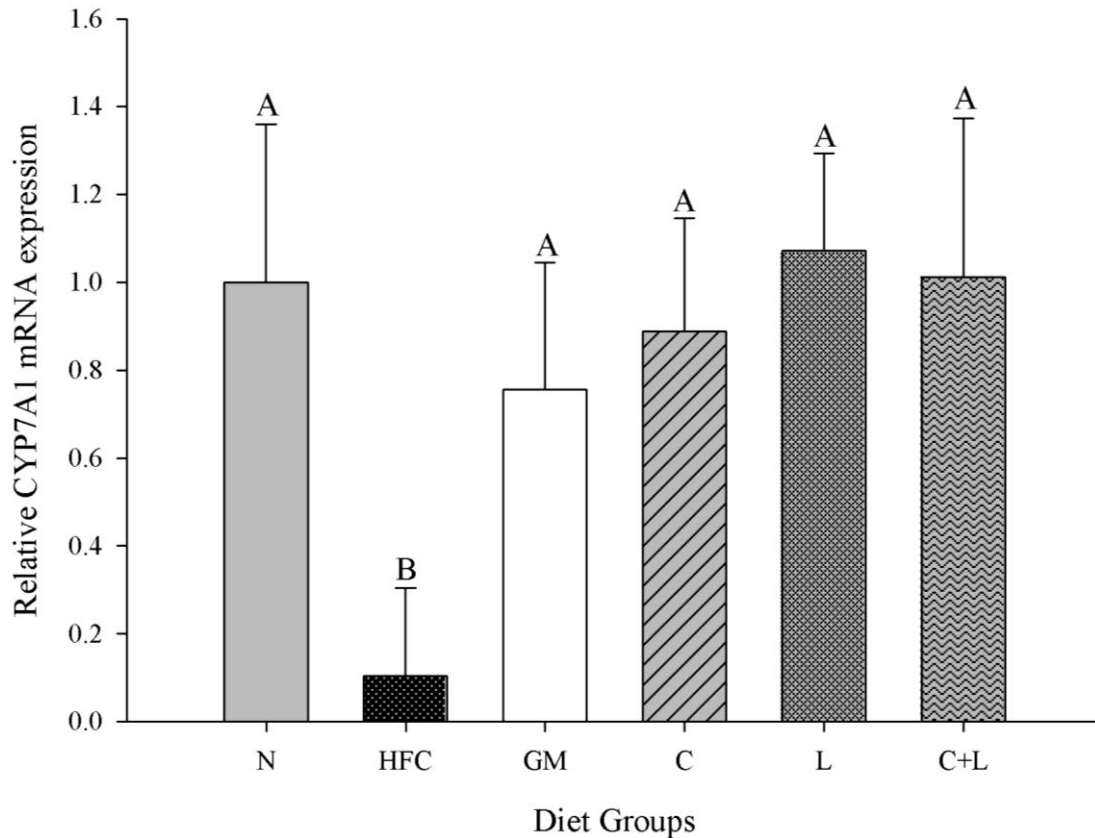
圖二十六、肝臟中過氧化物酶體增殖物激活受體 α 型(PPAR α) mRNA 相對表現量

研究數據為高膽固醇飲食誘導高血脂症倉鼠經餵食乳酸菌後犧牲，萃取其肝臟 RNA 後進行反轉錄，利用同步定量聚合酶鏈鎖反應儀測定肝臟中 PPAR α 表現量，並以 β -actin 做為內部對照基因。數據以平均 \pm 標準差表示，並以 SAS 9.4 統計軟體進行 one-way ANOVA 及鄧肯新多變域分析檢定，所標示大寫字母不同則表示各組間具有顯著性差異 ($P < 0.05$)。(1)正常組(N, n=7)，攝食正常對照飼料(D12106C)；(2)高脂誘導組(HFC, n=7)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料(D12107C)；(3)乳酸菌產品對照組(GM, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之景岳樂亦纖乳酸菌產品；(4)純菌體組(C, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌純菌體；(5)純培養液組(L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 之 F7-4 乳酸菌純上清培養液；(6)菌液組(C+L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌菌液。



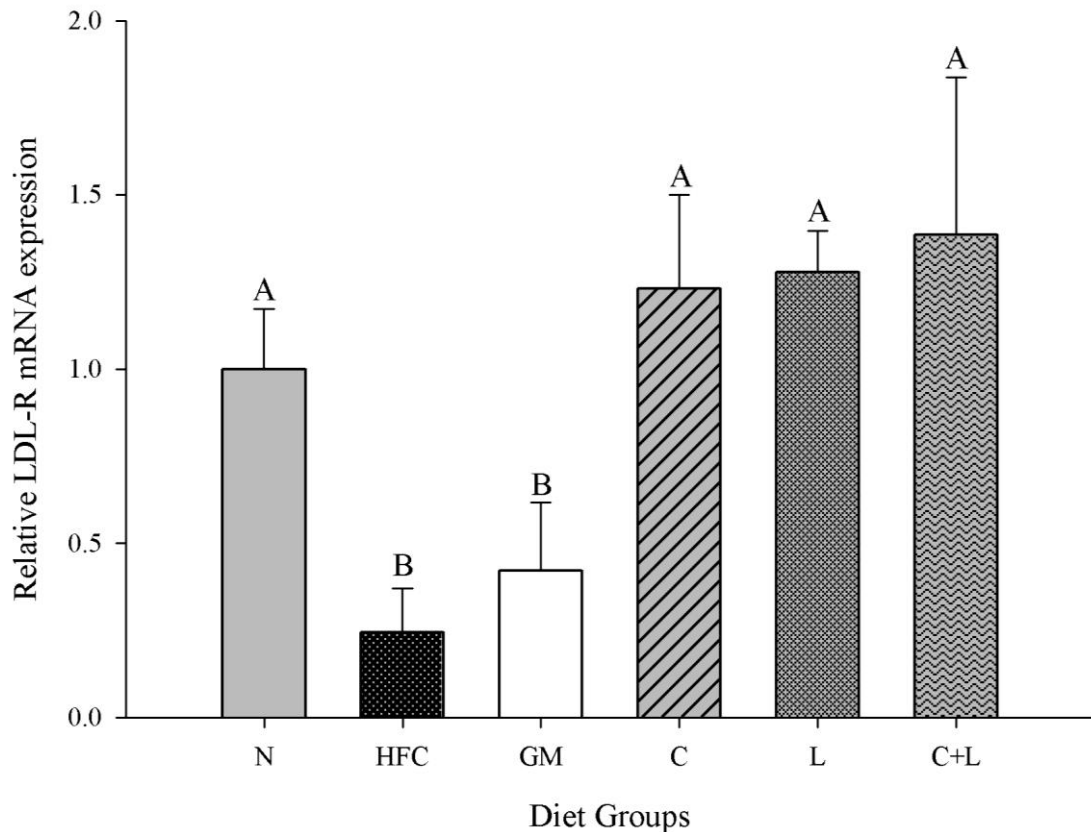
圖二十七、肝臟中肝 X 受體 α 型(LXR α) mRNA 相對表現量

研究數據為高膽固醇飲食誘導高血脂症倉鼠經餵食乳酸菌後犧牲，萃取其肝臟 RNA 後進行反轉錄，利用同步定量聚合酶鏈鎖反應儀測定肝臟中 LXR α 表現量，並以 β -actin 做為內部對照基因。數據以平均 \pm 標準差表示，並以 SAS 9.4 統計軟體進行 one-way ANOVA 及鄧肯新多變域分析檢定，所標示大寫字母不同則表示各組間具有顯著性差異 ($P < 0.05$)。(1)正常組(N, n=7)，攝食正常對照飼料(D12106C)；(2)高脂誘導組(HFC, n=7)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料(D12107C)；(3)乳酸菌產品對照組(GM, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之景岳樂亦纖乳酸菌產品；(4)純菌體組(C, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌純菌體；(5)純培養液組(L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 之 F7-4 乳酸菌純上清培養液；(6)菌液組(C+L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌菌液。



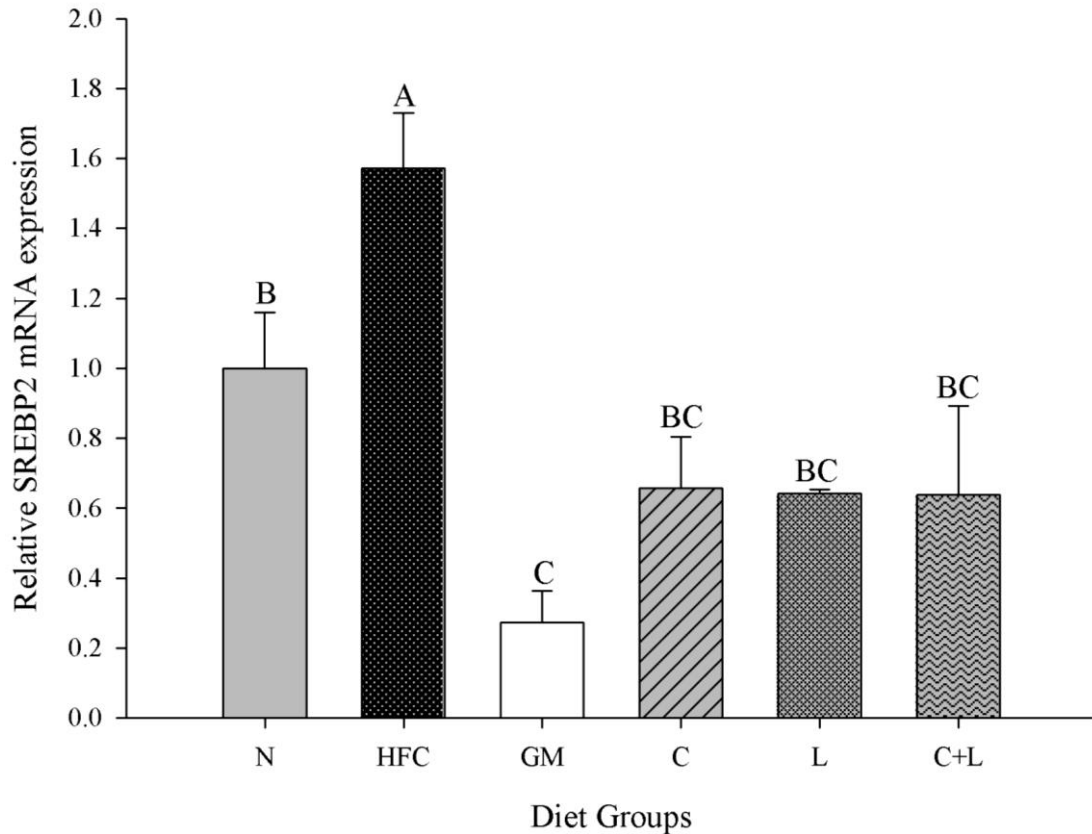
圖二十八、肝臟中膽固醇 7 α -羥化酶(CYP7A1) mRNA 相對表現量

研究數據為高膽固醇飲食誘導高血脂症倉鼠經餵食乳酸菌後犧牲，萃取其肝臟 RNA 後進行反轉錄，利用同步定量聚合酶鏈鎖反應儀測定肝臟中 CYP7A1 表現量，並以 β -actin 做為內部對照基因。數據以平均 \pm 標準差表示，並以 SAS 9.4 統計軟體進行 one-way ANOVA 及鄧肯新多變域分析檢定，所標示大寫字母不同則表示各組間具有顯著性差異 ($P < 0.05$)。(1)正常組(N, n=7)，攝食正常對照飼料(D12106C)；(2)高脂誘導組(HFC, n=7)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料(D12107C)；(3)乳酸菌產品對照組(GM, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之景岳樂亦纖乳酸菌產品；(4)純菌體組(C, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌純菌體；(5)純培養液組(L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 之 F7-4 乳酸菌純上清培養液；(6)菌液組(C+L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌菌液。

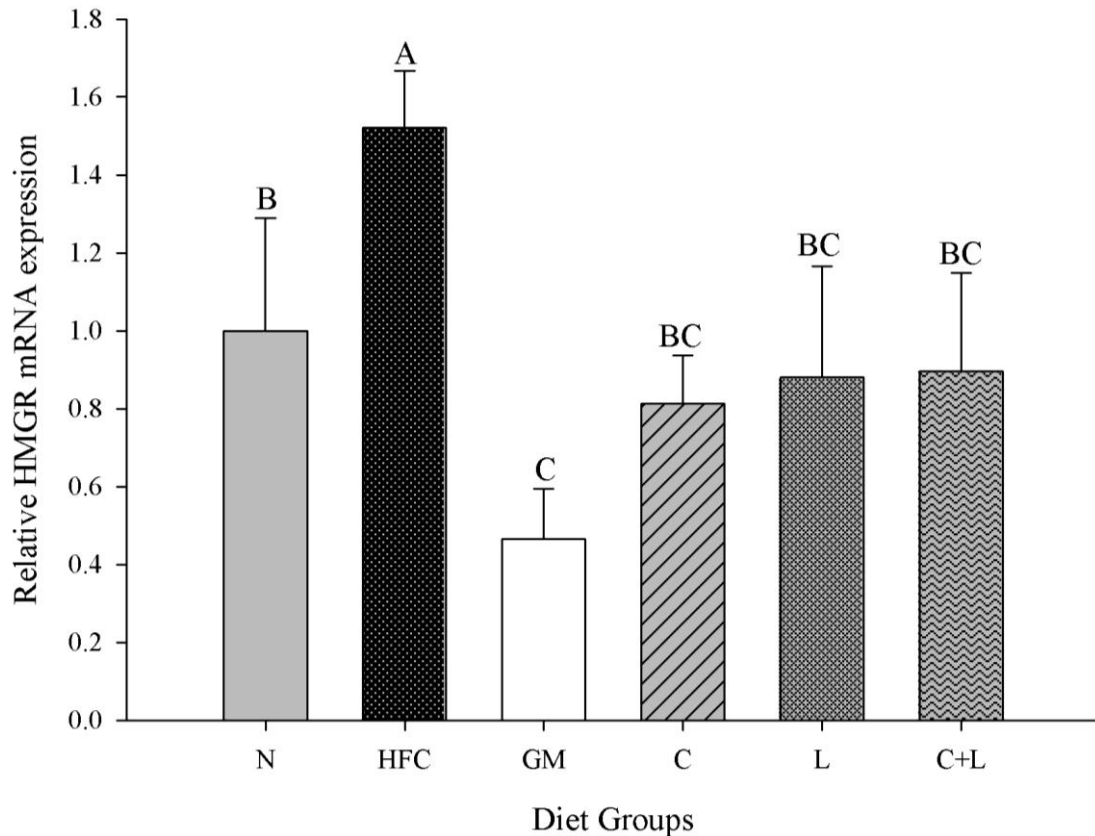


圖二十九、肝臟中低密度脂蛋白受體(LDL-R) mRNA 相對表現量

研究數據為高膽固醇飲食誘導高血脂症倉鼠經餵食乳酸菌後犧牲，萃取其肝臟 RNA 後進行反轉錄，利用同步定量聚合酶鏈鎖反應儀測定肝臟中 LDL-R 表現量，並以 β -actin 做為內部對照基因。數據以平均 \pm 標準差表示，並以 SAS 9.4 統計軟體進行 one-way ANOVA 及鄧肯新多變域分析檢定，所標示大寫字母不同則表示各組間具有顯著性差異 ($P < 0.05$)。(1)正常組(N, n=7)，攝食正常對照飼料(D12106C)；(2)高脂誘導組(HFC, n=7)，攝食含 0.5%膽固醇之高脂飼料(D12107C)；(3)乳酸菌產品對照組(GM, n=6)，攝食含 0.5%膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之景岳樂亦纖乳酸菌產品；(4)純菌體組(C, n=6)，攝食含 0.5%膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌純菌體；(5)純培養液組(L, n=6)，攝食含 0.5%膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 之 F7-4 乳酸菌純上清培養液；(6)菌液組(C+L, n=6)，攝食含 0.5%膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌菌液。

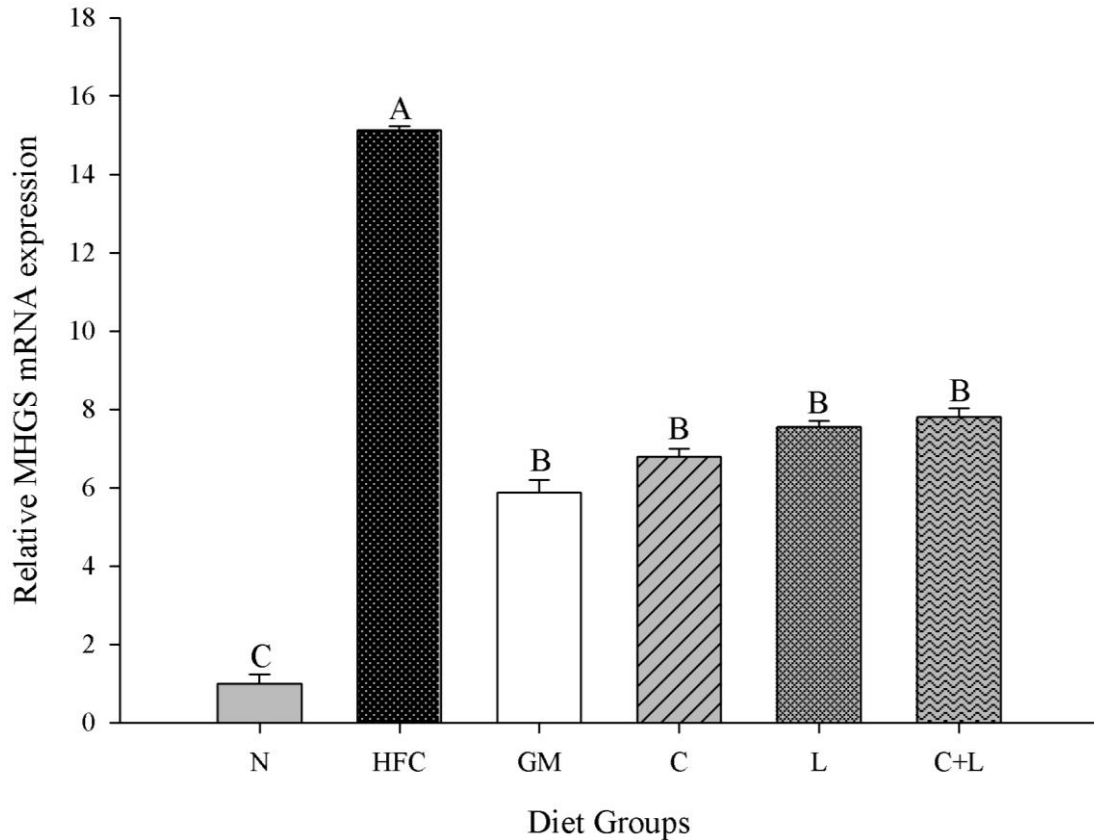


圖三十、肝臟中固醇調節元件結合蛋白 2 型(SREBP2) mRNA 相對表現量研究數據為高膽固醇飲食誘導高血脂症倉鼠經餵食乳酸菌後犧牲，萃取其肝臟 RNA 後進行反轉錄，利用同步定量聚合酶鏈鎖反應儀測定肝臟中 SREBP2 表現量，並以 β -actin 做為內部對照基因。數據以平均 \pm 標準差表示，並以 SAS 9.4 統計軟體進行 one-way ANOVA 及鄧肯新多變域分析檢定，所標示大寫字母不同則表示各組間具有顯著性差異 ($P < 0.05$)。(1)正常組(N, n=7)，攝食正常對照飼料(D12106C)；(2)高脂誘導組(HFC, n=7)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料(D12107C)；(3)乳酸菌產品對照組(GM, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之景岳樂亦纖乳酸菌產品；(4)純菌體組(C, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌純菌體；(5)純培養液組(L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 之 F7-4 乳酸菌純上清培養液；(6)菌液組(C+L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌菌液。



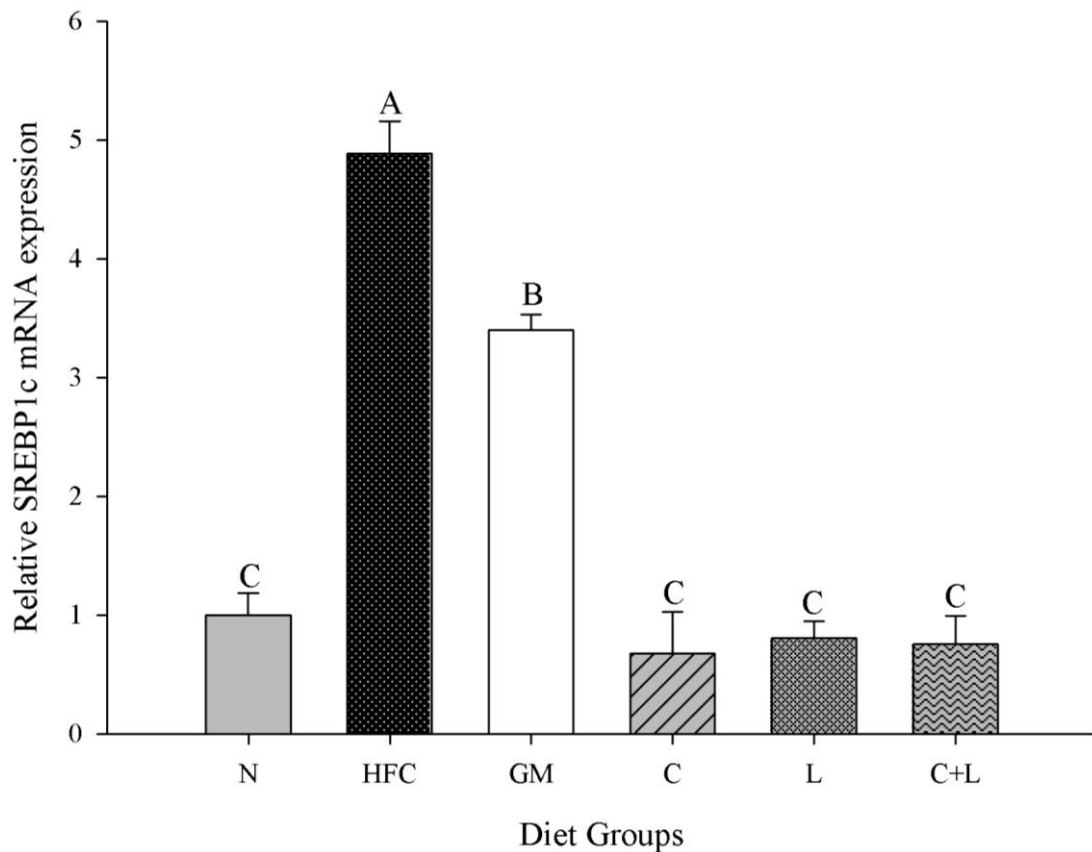
圖三十一、肝臟中羥甲基戊二酸單醯輔酶 A 還原酶(HMGR) mRNA 相對表現量

研究數據為高膽固醇飲食誘導高血脂症倉鼠經餵食乳酸菌後犧牲，萃取其肝臟 RNA 後進行反轉錄，利用同步定量聚合酶鏈鎖反應儀測定肝臟中 HMGR 表現量，並以 β -actin 做為內部對照基因。數據以平均 \pm 標準差表示，並以 SAS 9.4 統計軟體進行 one-way ANOVA 及鄧肯新多變域分析檢定，所標示大寫字母不同則表示各組間具有顯著性差異 ($P < 0.05$)。(1)正常組(N, n=7)，攝食正常對照飼料(D12106C)；(2)高脂誘導組(HFC, n=7)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料(D12107C)；(3)乳酸菌產品對照組(GM, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之景岳樂亦纖乳酸菌產品；(4)純菌體組(C, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌純菌體；(5)純培養液組(L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 之 F7-4 乳酸菌純上清培養液；(6)菌液組(C+L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌菌液。



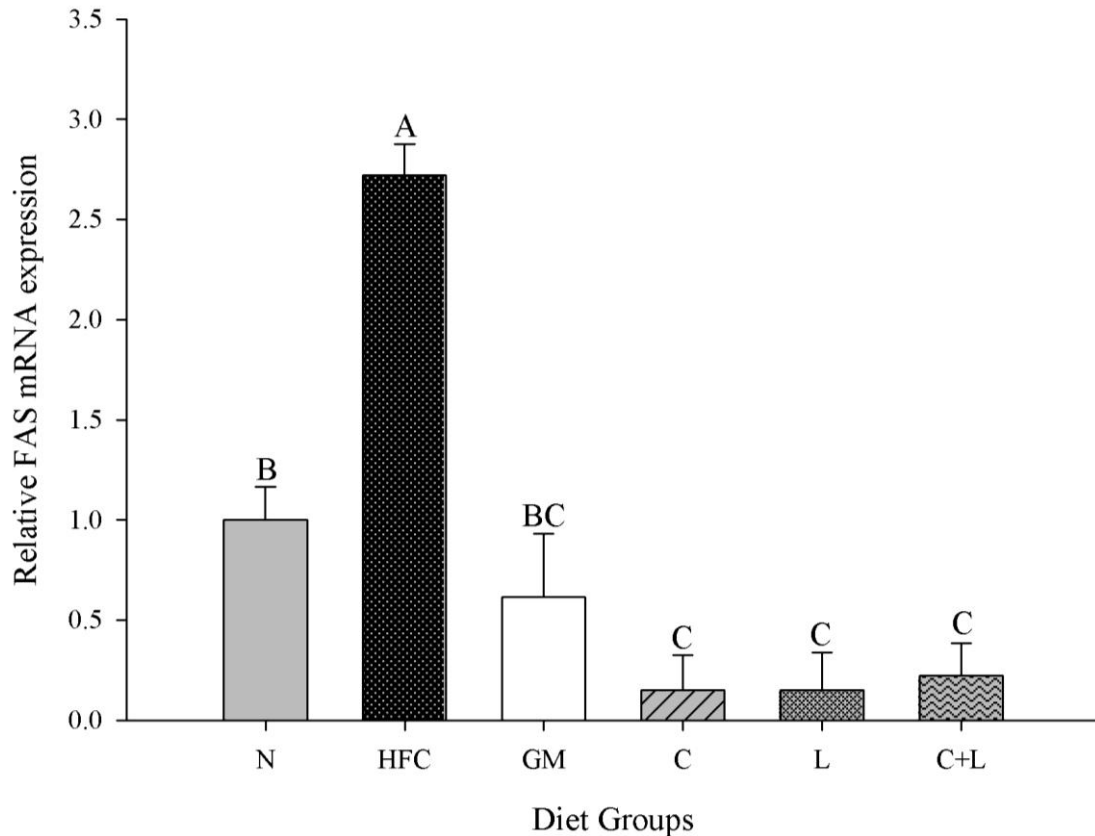
圖三十二、肝臟中羧甲基戊二酸單醯輔酶 A 合成酶(HMGS) mRNA 相對表現量

研究數據為高膽固醇飲食誘導高血脂症倉鼠經餵食乳酸菌後犧牲，萃取其肝臟 RNA 後進行反轉錄，利用同步定量聚合酶鏈鎖反應儀測定肝臟中 HMGS 表現量，並以 β -actin 做為內部對照基因。數據以平均 \pm 標準差表示，並以 SAS 9.4 統計軟體進行 one-way ANOVA 及鄧肯新多變域分析檢定，所標示大寫字母不同則表示各組間具有顯著性差異 ($P < 0.05$)。(1)正常組(N, n=7)，攝食正常對照飼料(D12106C)；(2)高脂誘導組(HFC, n=7)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料(D12107C)；(3)乳酸菌產品對照組(GM, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之景岳樂亦纖乳酸菌產品；(4)純菌體組(C, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌純菌體；(5)純培養液組(L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 之 F7-4 乳酸菌純上清培養液；(6)菌液組(C+L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌菌液。



圖三十三、肝臟中固醇調節元件結合蛋白 1c 型(SREBP1c) mRNA 相對表現量

研究數據為高膽固醇飲食誘導高血脂症倉鼠經餵食乳酸菌後犧牲，萃取其肝臟 RNA 後進行反轉錄，利用同步定量聚合酶鏈鎖反應儀測定肝臟中 SREBP1c 表現量，並以 β -actin 做為內部對照基因。數據以平均 \pm 標準差表示，並以 SAS 9.4 統計軟體進行 one-way ANOVA 及鄧肯新多變域分析檢定，所標示大寫字母不同則表示各組間具有顯著性差異 ($P < 0.05$)。(1)正常組(N, n=7)，攝食正常對照飼料(D12106C)；(2)高脂誘導組(HFC, n=7)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料(D12107C)；(3)乳酸菌產品對照組(GM, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之景岳樂亦纖乳酸菌產品；(4)純菌體組(C, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌純菌體；(5)純培養液組(L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 之 F7-4 乳酸菌純上清培養液；(6)菌液組(C+L, n=6)，攝食含 0.5% 膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌菌液。



圖三十四、肝臟中脂肪酸合成酶(FAS) mRNA 相對表現量

研究數據為高膽固醇飲食誘導高血脂症倉鼠經餵食乳酸菌後犧牲，萃取其肝臟 RNA 後進行反轉錄，利用同步定量聚合酶鏈鎖反應儀測定肝臟中 FAS 表現量，並以 β -actin 做為內部對照基因。數據以平均 \pm 標準差表示，並以 SAS 9.4 統計軟體進行 one-way ANOVA 及鄧肯新多變域分析檢定，所標示大寫字母不同則表示各組間具有顯著性差異($P < 0.05$)。

(1)正常組(N, n=7)，攝食正常對照飼料(D12106C)；(2)高脂誘導組(HFC, n=7)，攝食含 0.5%膽固醇之高脂飼料(D12107C)；(3)乳酸菌產品對照組(GM, n=6)，攝食含 0.5%膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之景岳樂亦纖乳酸菌產品；(4)純菌體組(C, n=6)，攝食含 0.5%膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌純菌體；(5)純培養液組(L, n=6)，攝食含 0.5%膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 之 F7-4 乳酸菌純上清培養液；(6)菌液組(C+L, n=6)，攝食含 0.5%膽固醇之高脂飼料及管餵 1 mL 含 10^9 CFU/mL 之 F7-4 乳酸菌菌液。

六、討論

本研究以含 0.5% 膽固醇之高脂飼料誘導倉鼠形成高血脂症模式，並餵食 F7-4 乳酸菌菌體、培養液及菌液探討對高血脂症倉鼠之調降血脂功效。經餵食 F7-4 乳酸菌滿 4 週及 8 週時，採取高血脂症倉鼠之血液，測定其血清中總膽固醇(TC)、三酸甘油酯(TG)、低密度脂蛋白膽固醇(LDL-C)及高密度脂蛋白膽固醇(HDL-C)。藉由餵食 F7-4 乳酸菌樣品期間，觀察血脂相關數值的變化及趨勢，結果如附圖四~七顯示，血液中 TC、TG 及 LDL-C 在餵食 F7-4 乳酸菌樣品滿 4 週及 8 週仍無法調降血脂至顯著性差異，但有調降的趨勢，而血液中 HDL-C 則有提升的趨勢。最後於餵食 F7-4 乳酸菌滿 10 週後進行犧牲，並採取其血液、肝臟、脾臟、腎臟及脂肪組織，並收集犧牲前之糞便，做後續分析實驗。血液部分，測定其血液中各項血脂相關數值變化；肝臟部分，測定肝臟脂質濃度，並利用 H&E 染色及油紅染色觀察其肝臟組織病理變化；脂肪組織部分，利用 H&E 染色觀察脂肪細胞的排列與大小；糞便部分，測定糞便中脂質及膽酸含量，判斷脂質經代謝後排出體外的狀況。最後測定肝臟中脂質代謝相關基因 mRNA 的表現量。

6-1 乳酸菌 16S rRNA gene 及 Bshpl 基因

本研究試驗 F7-4 菌株，抽取其 DNA 後，利用 Lac 16S 及 Bshpl 引子 (Rinttila T *et al.*, 2004; Öner, Aslim, and Aydaş, 2014) 進行聚合酶鏈鎖反應擴大目標片段，再以洋菜瓊脂膠進行電泳。結果如圖一顯示，F7-4 菌株經 16S rRNA 基因測試確定為乳酸菌菌株，並經過定序後比對為 *Lactobacillus plantarum*。此外，也確定 F7-4 乳酸菌含有膽鹽水解酶(Bshpl)基因，膽鹽水解酶是乳酸菌調降血脂的關鍵作用因子。其功能為將膽鹽分解成游離性

膽鹽，因游離性膽鹽親水性較低，所以腸道無法將膽鹽回收利用，進而與糞便結合排出體外。膽固醇微溶於水，人體吸收必需仰賴膽酸結合增加吸收率，膽鹽水解後可降低腸道對膽固醇之吸收，而膽鹽的合成也需利用膽固醇做為原料，可造成體內膽固醇堆積減少。

6-2 乳酸菌對高血脂症倉鼠體重及攝食攝水量之影響

結果如表一顯示，各組每隻倉鼠初始體重平均值為 90g 上下，經過誘導 2 週及餵食乳酸菌 10 週後，各組體重皆有所上升(圖四)，但最終體重及體重增加量是無明顯差異，代表餵食乳酸菌後無法對體重有具體的影響。推測是攝食量及飼料成份造成此現象，結果如表二顯示，各組倉鼠平均每天每隻攝食及攝水量皆相同，從攝食量的角度來看各組攝食量一致的情況下，根據飼料成份及熱量表(附表二)，正常對照飼料(D12106C)每克飼料約含有 4.58 千卡的熱量(4.58 kcal/g)，含 0.5% 膽固醇之高脂飼料(D12107C)每克飼料約含有 4.55 千卡的熱量(4.55 kcal/g)。所以在攝食量無差異的情況下，各組所獲取的總熱量是差不多的，因此可能造成各組體重上無太大差異，也代表本研究之 F7-4 乳酸菌無具體降低體重之影響。

6-3 乳酸菌對高血脂症倉鼠臟器重量之影響

倉鼠經過誘導 2 週及餵食乳酸菌 10 週後犧牲，並採取其肝臟、脾臟及脂肪組織等臟器。結果如表三顯示，肝臟為體內重要的代謝器官，經高膽固醇誘導高血脂症倉鼠的肝臟重量與正常組相比明顯增加，代表肝臟可能已經發炎，並有大量脂質堆積，因而造成肝臟重量增加。而乳酸菌產品對照組及三組乳酸菌試驗組的肝臟重量與高脂誘導組相比無明顯變化，表示經過高膽固醇之高脂誘導後，肝臟也產生發炎反應及脂質的堆積，進而使

肝臟重量增加，至於餵食乳酸菌後是否有改善肝臟脂質濃度，可藉由肝臟脂質濃度測定及病理組織切片染色做後續觀察；脾臟為體內最大的免疫器官，經高膽固醇誘導高血脂症倉鼠的脾臟重量與正常組相比明顯增重，代表可能因發炎反應造成脾臟腫脹。而乳酸菌產品對照組及三組乳酸菌試驗組的脾臟重量與高脂誘導組相比無明顯變化，表示經過高膽固醇之高脂誘導後，脾臟也產生發炎反應，造成重量增加；而脂肪組織的堆積會造成肥胖及心血管疾病，但在本研究顯示各組脂肪組織重量是無明顯差異，表示本研究之誘導模式主要是影響血脂異常，在體脂改善部分無具體影響。

6-4 乳酸菌對高血脂症倉鼠血液中脂質之影響

高血脂症的判斷依據為血液中脂質濃度異常升高，主要代表數值為總膽固醇(TC)、三酸甘油酯(TG)、低密度脂蛋白膽固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白膽固醇(HDL-C)及游離脂肪酸(FFA)，調降血中脂質濃度即能改善高血脂症的狀況(Nelson, 2013a; Mitchell *et al.*, 2016; Jesch and Carr, 2017)。倉鼠經過誘導 2 週及餵食乳酸菌 10 週後犧牲，採取其血液並測定血中脂質濃度。

TC 主要包含 LDL-C 及 HDL-C，當血中 TC 濃度過高會造成血管內膽固醇堆積，進而形成動脈粥狀硬化，導致心血管疾病發生(Huang *et al.*, 2015)。結果如圖五顯示，高脂誘導組血中 TC 有最高濃度 468.67 ± 54.00 mg/dL，比正常組血中 TC 濃度 116.57 ± 17.22 mg/dL 明顯高於 3 倍，代表含 0.5% 膽固醇之高脂飼料確實能誘導倉鼠成高血脂症模式。而經餵食乳酸菌產品組及三組乳酸菌試驗組後，能明顯改善血中 TC 的濃度，其中以純菌體組效果最佳，血中 TC 濃度為 414.50 ± 27.62 mg/dL 與高脂誘導組相比降低了 11.56%，雖然降低幅度未能達到正常值，但餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌仍能改善血中 TC 的濃度。

TG 為中性脂肪，當血中 TG 過高會使血液變得黏稠，導致膽固醇易堆積於血管中，增加罹患心血管疾病的風險(Kobayashi *et al.*, 2012)。結果如圖六顯示，高脂誘導組血中 TG 有最高濃度 265.00 ± 37.32 mg/dL，比正常組血中 TG 濃度 100.86 ± 39.06 mg/dL 明顯高於 1.6 倍。而經餵食乳酸菌產品組及三組乳酸菌試驗組後，無法改善血中 TG 的濃度，表示餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌對於血中 TG 濃度無具體影響。

脂肪組織會釋放大量的 FFA，會造成 TG 的濃度增加，進而減少 HDL-C 濃度及增加 LDL-C，增加罹患心血管疾病風險。結果如圖十一顯示，高脂誘導組血中 FFA 有最高濃度 1.10 ± 0.11 mmol/L，比正常組血中 FFA 濃度 0.38 ± 0.21 mmol/L 明顯高於 1.9 倍。而經餵食乳酸菌產品組及三組乳酸菌試驗組後，無法改善血中 FFA 的濃度，表示餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌對於血中 FFA 濃度無具體影響。

LDL-C 為不好的膽固醇，其血中濃度過高時，易使膽固醇堆積於血管中堵塞，進而引起動脈粥狀硬化(Ting, Yeh, *et al.*, 2015)。結果如圖七顯示，高脂誘導組血中 LDL-C 有最高濃度 137.33 ± 20.98 mg/dL，比正常組血中 LDL-C 濃度 41.29 ± 2.21 mg/dL 明顯高於 2.3 倍。而經餵食乳酸菌產品組及三組乳酸菌試驗組後，皆能明顯改善血中 LDL-C 的濃度，其中以純菌體組效果最佳，血中 LDL-C 濃度為 108.33 ± 4.51 mg/dL 與高脂誘導組相比降低了 21.12%，表示餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌能降低血中 LDL-C 濃度。

HDL-C 為好的膽固醇，能幫助清除血液中的動脈硬化塊及膽固醇送回肝臟進行代謝排除(Huang *et al.*, 2015)。結果如圖八顯示，高脂誘導組血中 HDL-C 濃度為 105.33 ± 13.58 mg/dL，比正常組血中 LDL-C 濃度 56.00 ± 13.30 mg/dL 明顯高於 88.09%。而經餵食乳酸菌產品組及三組乳酸菌試驗組後，皆能明顯提升血中 HDL-C 的濃度，其中以純菌體組效果最佳，血中 HDL-C 濃度為 127.33 ± 6.11 mg/dL 與高脂誘導組相比提升了 20.89%，表示餵食乳

酸菌產品及 F7-4 乳酸菌能降低血中 HDL-C 濃度。高密度脂蛋白膽固醇比率(HTR)能得知各組 HDL-C 佔比，結果如圖十顯示，高脂誘導組 HTR 比率為 $24.51 \pm 1.36\%$ 明顯低於正常組 $50.62 \pm 2.36\%$ ，表示經高膽固醇飲食誘導造成血中 TC 及 LDL-C 濃度增加，因此 HDL-C 的佔比就減少。而經餵食乳酸菌產品組及三組乳酸菌試驗組後，皆能明顯提升 HTR 值，其中以純菌體組效果最佳，HTR 值提升至 $30.93 \pm 1.43\%$ ，表示餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌能提升 HDL-C 的佔比率。

AI 值為動脈粥狀硬化指數，當其數值越高則代表罹患動脈粥狀硬化的風險越高(Nam *et al.*, 2014)。結果如圖九顯示，高脂誘導組為最高值 3.00 ± 0.25 ，表示有較大的機率罹患動脈粥狀硬化，而經餵食乳酸菌產品組及三組乳酸菌試驗組後，皆能明顯降低 AI 值，其中以純菌體組效果最佳，AI 值可下降至 2.41 ± 0.41 ，雖與正常組 1.13 ± 0.25 有段差距，但仍有降低罹患動脈粥狀硬化之風險。

綜上所述，經餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌後，能降低血液中 TC 及 LDL-C 的濃度，並提升 HDL-C 濃度及其佔比率，AI 值也有所下降，可降低動脈粥狀硬化的發生機率及改善高血脂症，而血液中 TG 及 FFA 在本研究則無具體改善及影響。

6-5 乳酸菌對高血脂症倉鼠肝臟中脂質及肝損傷之影響

非酒精性脂肪肝的成因與肥胖、糖尿病及高血脂症有關，正常的肝臟約含有 3~5% 的脂肪，當肝臟脂肪超過正常範圍，即會形成脂肪肝。而肝功能指數天門冬胺酸轉胺酶(AST)及丙胺酸轉胺酶(ALT)在肝臟損傷時亦會異常升高，脂肪肝為可逆反應，若能控制飲食即有可能回復。

肝臟為主要代謝體內脂質的臟器，當食物攝入體內後，脂質會在腸道中分解成乳糜微粒吸收，帶入置淋巴循環及血液循環，血液中總膽固醇(TC)

及三酸甘油酯(TG)會回收至肝臟中進行代謝(Huang *et al.*, 2015; Ting, Kuo, *et al.*, 2015)。倉鼠經過誘導 2 週及餵食乳酸菌 10 週後犧牲，萃取其肝臟脂質並測定肝臟中 TC、TG 濃度。結果如圖十四及十五顯示，高脂誘導組肝臟中 TC 有最高濃度 493.93 ± 25.30 mg/dL，比正常組肝臟中 TC 濃度 26.54 ± 4.51 mg/dL 明顯高於 17 倍，表示肝臟 TC 濃度已過高，有形成脂肪肝風險。而經餵食乳酸菌產品組及三組乳酸菌試驗組後，皆能明顯改善肝臟中 TC 的濃度，其中以純培養液組效果最佳，肝臟中 TC 濃度為 403.80 ± 93.06 mg/dL 與高脂誘導組相比降低了 18.25%，表示餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌能降低肝臟中 TC 濃度；高脂誘導組肝臟中 TG 有最高濃度 370.48 ± 32.15 mg/dL，比正常組肝臟中 TG 濃度 124.29 ± 45.43 mg/dL 明顯高於 2 倍，表示肝臟 TG 濃度已過高，有形成脂肪肝風險。而經餵食乳酸菌產品組及三組乳酸菌試驗組後，皆能明顯改善肝臟中 TG 的濃度，其中以純培養液組效果最佳，肝臟中 TG 濃度為 281.90 ± 39.41 mg/dL 與高脂誘導組相比降低了 23.91%，表示餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌能降低肝臟中 TG 濃度。

血液中天門冬胺酸轉胺酶(AST)及丙胺酸轉胺酶(ALT)為肝功能損傷之參考指標，當肝臟損傷時會釋放 AST 及 ALT 進入血液中，當在血液中含有過多 AST 及 ALT 濃度時，即代表肝臟功能有可有異常，其中又以 ALT 專一性最佳(Weng *et al.*, 2015; McGill, 2016)。倉鼠經過誘導 2 週及餵食乳酸菌 10 週後犧牲，採取其血液並測定血液中 AST、ALT 濃度。結果如圖十二及十三顯示，高脂誘導組血液中 AST 有最高濃度 392.00 ± 47.42 U/L，比正常組血液中 AST 濃度 47.43 ± 12.53 U/L 明顯高於 7 倍，表示血液中 AST 濃度已過高，已造成肝損傷。而經餵食乳酸菌產品組及三組乳酸菌試驗組後，皆能明顯改善血液中 AST 的濃度，其中以菌液組效果最佳，血液中 AST 濃度為 292.25 ± 36.23 U/L 與高脂誘導組相比降低了 25.45%，表示餵食

乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌能降低血液中 AST 濃度；高脂誘導組血液中 ALT 有最高濃度 1285.67 ± 73.00 U/L，比正常組血液中 ALT 濃度 71.00 ± 14.93 U/L 明顯高於 17 倍，表示血液中 ALT 濃度已過高，已造成肝損傷。而經餵食乳酸菌產品組及三組乳酸菌試驗組後，皆能明顯改善血液中 ALT 的濃度，其中以乳酸菌產品對照組效果最佳，血液中 ALT 濃度為 1037.33 ± 85.96 U/L 與高脂誘導組相比降低了 19.32%，表示餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌能降低血液中 ALT 濃度。

綜上所述，餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌後，能減少高膽固醇飲食誘導倉鼠之肝臟中 TC 及 TG 濃度，幫助調節血液中脂質帶入到肝臟中進行代謝。此外，因高脂飲食造成肝臟脂質堆積，使得肝臟受到損傷釋放 AST 及 ALT 至血液中，經餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌後，能幫助降低其肝臟發炎損傷程度。

6-6 乳酸菌對高血脂症倉鼠糞便中脂質及膽酸之影響

排泄作用是生物將代謝廢物排出體外的一個重要過程，而糞便則是其中途徑之一，腸道微生物能將腸道內脂質吸收後附著於糞便排出體外，因此糞便脂質濃度越高則能間接減少體內脂質累積。

乳酸菌在腸道中扮演重要角色，可以利用同化作用將膽固醇吸附，減少脂質被腸道吸收，並附著在糞便上將多餘的脂質排出體外(Pereira and Gibson, 2002; Ooi and Liang, 2010; Tomaro-Duchesneau *et al.*, 2014)。倉鼠經過誘導 2 週及餵食乳酸菌 10 週後，萃取其糞便脂質，並測定糞便中總膽固醇(TC)及三酸甘油酯(TG)濃度。結果如圖十六及十七顯示，經餵食乳酸菌產品組及三組乳酸菌試驗組後，能提高糞便中 TC 濃度，其中以純菌體組效果最好，其糞便中 TC 濃度 209.00 ± 63.00 mg/dL，比高脂誘導組糞便中 TC 濃度 161.33 ± 6.43 mg/dL 明顯高於 29.55%，表示經餵食乳酸菌產品

及 F7-4 乳酸菌能增加糞便中 TC 濃度；經餵食乳酸菌產品組及三組乳酸菌試驗組後，能提高糞便中 TG 濃度，其中以純菌體組效果最好，其糞便中 TG 濃度 39.76 ± 2.43 mg/dL，比高脂誘導組糞便中 TC 濃度 33.06 ± 1.57 mg/dL 明顯高於 20.27%，表示經餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌能增加糞便中 TG 濃度。

當食物進入腸道後，肝臟會利用膽固醇做為原料產生膽酸，而腸道脂質吸收需依賴膽酸乳化脂質，乳酸菌其代謝產物膽鹽水解酶可將膽酸水解成游離性膽酸，當膽酸經水解後無法與脂質作用，多餘的膽酸無法藉由腸道回收，會以附著在糞便的形式排出體外。倉鼠經過誘導 2 週及餵食乳酸菌 10 週後，萃取其糞便膽酸，並測定糞便中膽酸含量(Hsu *et al.*, 2013)。結果如圖十八顯示，經餵食乳酸菌產品組及三組乳酸菌試驗組後，其中以菌液組效果最佳，其糞便中膽酸含量為 13.88 mmol/mL，比高脂誘導組糞便中膽酸含量 8.29 mmol/mL 明顯高於 67.43%，表示經餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌能增加糞便中膽酸含量。

綜上所述，經餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌後能提升糞便中 TC、TG 及膽酸，乳酸菌會利用同化作用及膽鹽水解酶減少腸道吸收脂質，把多餘的脂質利用糞便及膽酸的形式排出體外，進而減少體內脂質的累積。

6-7 乳酸菌對高血脂症倉鼠肝臟及脂肪組織病理切片分析

當肝臟脂質累積過多時，即會形成脂肪肝，脂肪肝為可逆性反應，透過飲食調控及正常的身活作息可有所改善，但若持續嚴重惡化，可能會導致肝硬化及肝癌(Huang *et al.*, 2015)。透過肝臟外觀及其組織切片染色可觀察肝臟病理狀態，結果如圖十九~二十三，正常組的肝臟外觀較為紅潤，而高脂誘導組的肝臟外觀呈現乳白色，表示已有脂質堆積於肝臟中，造成脂肪肝的現象，經餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌後，其肝臟外觀仍為乳白

色脂肪肝外觀，須藉由切片染色做後續觀察；藉由蘇木紫與伊紅染色(H&E stain)可觀察到正常組的肝臟細胞排列較為緊密，細胞大小較小，而高脂誘導組與之相比則肝臟細胞排列較為鬆散，細胞大小也較大，且細胞間具有白色空泡存在，推測可能為脂肪空泡。經餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌後，能改善肝臟細胞的狀態，並減少空泡的大小及數量；藉由油紅染色(Oil-Red O stain)可觀察到正常組的肝臟脂質油滴量及分佈比較少，而高脂誘導組與之相比則脂質油滴大量累積於肝臟組織。經餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌後，能改善肝臟細胞的脂質油滴量，雖未能回復至與正常組相同，但仍有減少肝臟脂質的累積。

當體內脂質過多時，會藉由血液循環運送至體內各個臟器，並且會產生脂肪組織堆，造成肥胖問題。藉由內臟組織切片染色，可觀察脂肪細胞的增生狀況(Nam, Choe, and Shin, 2014)，結果如圖二十四及二十五顯示，脂肪細胞經 H&E 染色後，正常組的脂肪細胞大小較小且細胞排列較為緊密，而高脂誘導組與之相比則脂肪細胞大小較大，且排列較為鬆散，表示增生的狀態明顯。經餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌後，能改善脂肪細胞的大小與排列，且回復至與正常組相同。

6-8 乳酸菌對高血脂症倉鼠肝臟脂質代謝路徑之影響

肝臟為人體中要代謝器官，而脂質的代謝主要也要此臟器進行，藉由肝臟內脂質代謝相關基因表現量變化，影響脂質代謝路徑，進而探討肝臟中脂質消耗與生成狀況。

PPAR α 為肝臟脂質代謝主要的調節因子，PPAR α 經過活化後會增加 LXR α 的活性，LXR α 會調控抑制膽固醇生成，並使得下游因子 CYP7A1 受到調控活化，進而增加膽酸生成，幫助加速消耗肝中累積的膽固醇(Kim *et al.*, 2016; Hsu *et al.*, 2013)。其結果如圖二十六~二十八顯示，經餵食乳酸

菌產品及 F7-4 乳酸菌後，能提升 PPAR α 表現量，其中以菌液組效果最佳，與高脂誘導組相比提高了 6.4 倍；當 PPAR α 活性提升即會活化 LXR α ，經餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌後，能提升 LXR α 表現量，其中以純培養液組效果最佳，與高脂誘導組相比提高了 3.7 倍；而 LXR α 會提升 CYP7A1 表現量，經餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌後，其中以純培養液組效果最佳，CYP7A1 表現量與高脂誘導組相比提升了 9.7 倍，增加膽酸的排放，進而加速肝臟膽固醇消耗。

LDL-R 主要分佈於肝臟，肝臟表面的 LDL-R 會將血液中的 LDL-C 帶入肝臟中進行代謝，進而減少血液中膽固醇的堆積(Tsai *et al.*, 2014)。其結果如圖二十九顯示，經餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌後，能提升 LDL-R 表現量，其中以菌液組效果最佳，與高脂誘導組相比提高了 4.8 倍。

轉錄因子 SREBP2 活化會使其下游 HMGR 基因表現量提升，進而使更多 HMG-CoA 轉換成膽固醇。另外，HMGS 表現量增加則會使 Acetyl-CoA 及 AcAc-CoA 轉換成 HMG-CoA，間接增加膽固醇合成(Tsai *et al.*, 2014)。其結果如圖三十~三十二，經餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌後，SREBP2 的表現量降低，其中以乳酸菌產品組效果最佳，與高脂誘導組相比下降了 82.8%；而 SREBP2 表現量降低則會使 HMGR 表現量下降，經餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌後，HMGR 的表現量降低，其中以乳酸菌產品組效果最佳，與高脂誘導組相比下降了 69.08%，進而降低了 HMG-CoA 轉換成膽固醇，減少肝臟脂質的累積；此外，HMGS 表現量經餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌後也有所降低，其中以乳酸菌產品組效果最佳，與高脂誘導組相比下降了 61.21%，可減少 HMG-CoA 形成，間接減少肝臟膽固醇生成。

肝臟中脂肪酸由 FAS 進行調控，其上游轉錄因子 SREBP1c 活化，造成 FAS 表現量提升，進而增加肝臟脂肪酸之生成其(Kim *et al.*, 2016)。其結果如圖三十三及三十四顯示，經餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌後，

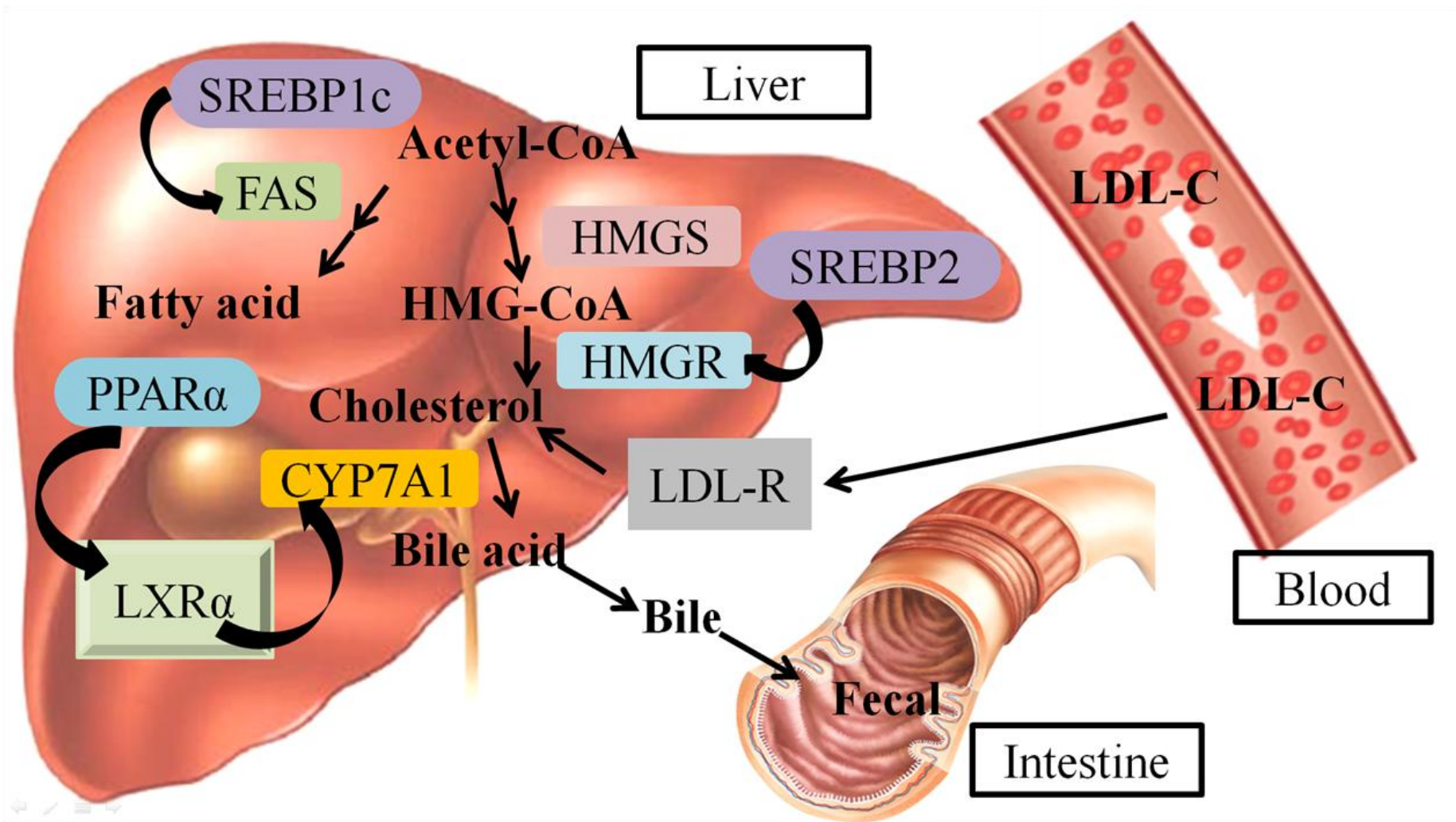
SREBP1c 的表現量降低，其中以純菌體組效果最佳，與高脂誘導組相比下降了 86.09%；而 SREBP1c 表現量降低則會使 FAS 表現量下降，經餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌後，FAS 的表現量降低，其中以純菌體組效果最佳，與高脂誘導組相比下降了 94.49%，進而降低 Acetyl-CoA 及 Malonyl-CoA 形成脂肪酸，減少肝臟脂肪酸濃度。

綜上所述，經餵食乳酸菌產品及 F7-4 乳酸菌後，可提升 PPAR α 及 LXR α ，表現量幫助肝臟脂質代謝及減少膽固醇生成，並使 CYP7A1 表現量提升，增加膽酸排放，加速肝臟中膽固醇消耗。LDL-R 表現量提升促使將血液中 LDL-C 帶入肝臟內進行代謝，減少血液中膽固醇濃度，降低動脈粥狀硬化發生風險。而 SREBP2 表現量降低使 HMGR 受到抑制，且 HMGS 表現量下降，減少 HMG-CoA 形成，進而減少肝臟膽固醇生成。此外，SREBP1c 表現量降低使 FAS 受到抑制，進而減少肝臟脂肪酸生成，降低脂肪肝風險。

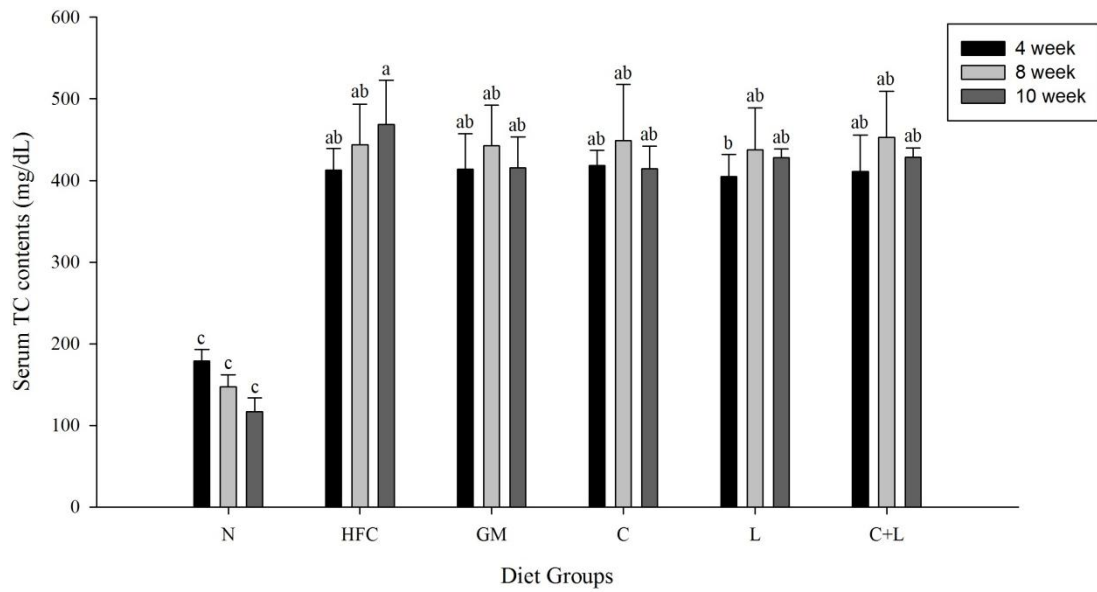
七、結論

整體而言，本研究之 F7-4 乳酸菌能幫助降低血液中 TC 及 LDL-C 濃度，並提升 HDL-C 濃度，幫助清除血液中多餘的膽固醇，減少動脈粥狀硬化發生。雖然其調降血脂的程度無法回復到正常範圍，推測是本研究以 0.5% 膽固醇飲食誘導高血脂症，造成血脂數值極高，若改以一般血脂實驗所使用 0.2% 膽固醇飲食進行誘導，可期望能看到更明顯的降血脂效果。肝臟中 TC 及 TG 濃度也有調降，並在肝臟組織 H&E 染色及油紅染色切片可觀察到，能減少肝臟脂質及油滴。乳酸菌在腸道中將膽固醇進行同化作用，並附著於糞便上，減少腸道吸收膽固醇，乳酸菌其代謝產物膽鹽水解酶將膽酸水解形成游離性膽酸，使膽酸無法將脂質乳化後由腸道吸收，而肝臟膽固醇為膽酸合成原料之一，無法回收的膽酸將附著於糞便排出體外，進而加速膽固醇的消耗。而肝臟脂質代謝基因，經乳酸菌為食後，藉由提升 PPAR α 、LXR α 、CYP7A1 及 LDL-R 表現量，幫助肝臟脂質代謝、減少膽固醇生成、增加膽酸排放及加速消耗肝臟膽固醇，以減少肝臟脂質累積，並協助將血液中多餘膽固醇帶入肝臟中進行代謝，進而減少動脈粥狀硬化發生。另外，藉由抑制 SREBP2、HMGR、HMGS、SREBP1c 及 FAS 表現量，降低肝臟中膽固醇及脂肪酸的生成，減少肝臟脂質累積，避免脂肪肝形成。

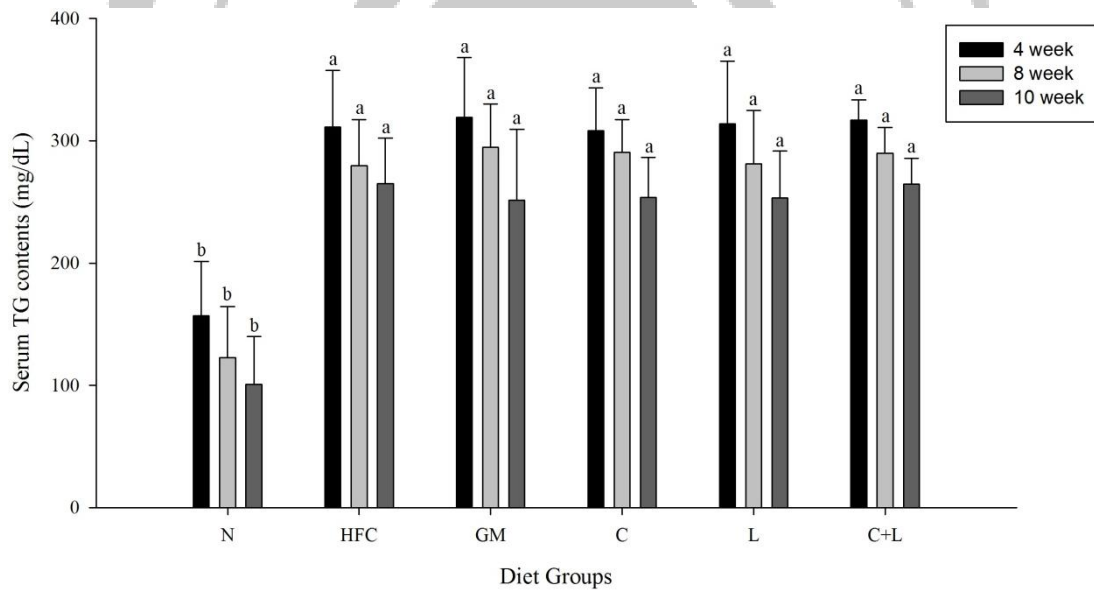
本研究之 F7-4 乳酸菌其菌體、培養液及菌液皆有降血脂效果，與市售乳酸菌降血脂產品無明顯差異，但在增加糞便脂質及膽酸排放則具有潛力，並於肝臟脂質代謝基因活性調控有較佳的效果。



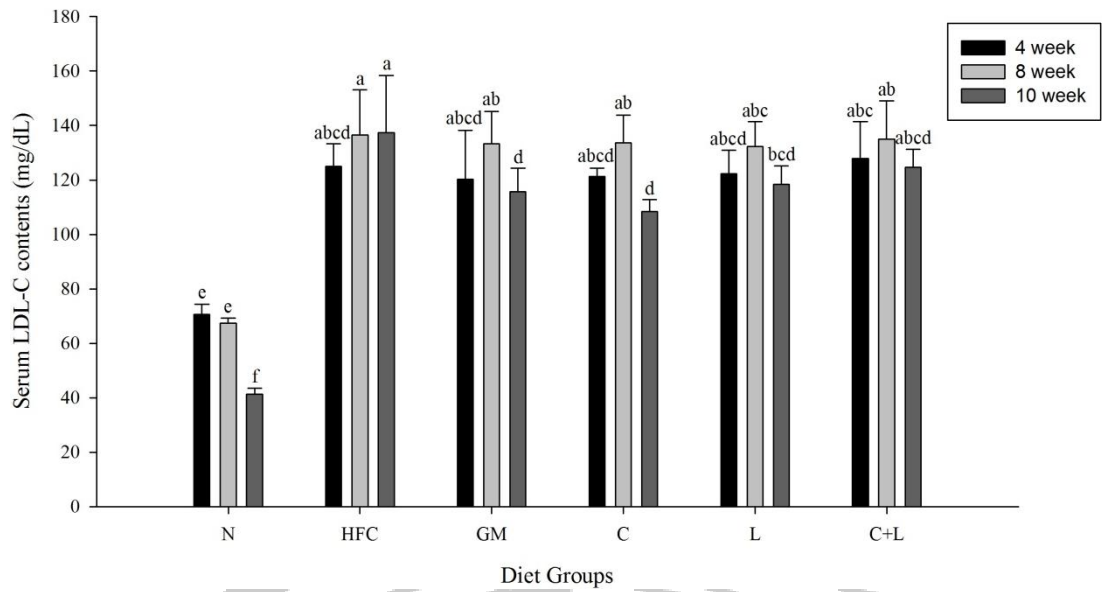
附圖三、本研究傳訊基因路徑圖



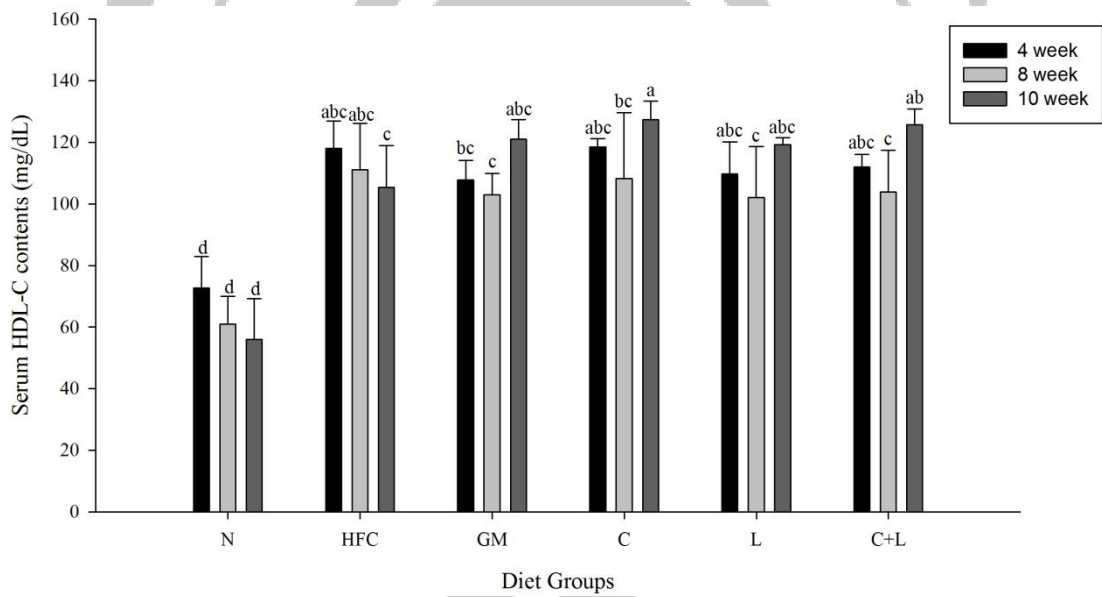
附圖四、乳酸菌對高血脂症倉鼠餵樣滿4週、8週及10週後血液中總膽固醇之影響



附圖五、乳酸菌對高血脂症倉鼠餵樣滿4週、8週及10週後血液中三酸甘油酯之影響



附圖六、乳酸菌對高血脂症倉鼠餵樣滿4週、8週及10週後血液中低密度脂蛋白膽固醇之影響



附圖七、乳酸菌對高血脂症倉鼠餵樣滿4週、8週及10週後血液中高密度脂蛋白膽固醇之影響

附表二、飼料配方表

Product #	D12106C		D12107C	
	gm	kcal	gm	kcal
%				
Protein	22.9	20.0	22.8	20.0
Carbohydrate	45.8	40.0	45.6	40.0
Fat	20.3	39.9	20.2	39.9
Total		100.0		100.0
kcal/gm	4.58		4.55	
Ingredient	gm	kcal	gm	kcal
Casein, Lactic	200	800	200	800
L-Cystine	3	12	3	12
Corn Starch	212	848	212	848
Maltodextrin 10	71	284	71	284
Sucrose	113	452	113	452
Cellulose, BW200	50	0	50	0
Soybean Oil	25	225	25	225
Cocoa Butter	155	1395	155	1395
Mineral Mix S10021	10	0	10	0
Dicalcium Phosphate	13	0	13	0
Calcium Carbonate	5.5	0	5.5	0
Potassium Citrate	16.5	0	16.5	0
Vitamin Mix V10001	10	40	10	40
Choline Bitartrate	2	0	2	0
Cholesterol	0	0	4.5	0
Sodium Cholate	0	0	0	0
Red Dye, FD&C #40	0	0	0.1	0
Blue Dye, FD&C #1	0.1	0	0	0
Yellow Dye, FD&C #5	0	0	0	0
Total	886.10	4056	890.60	4056

飼料購自鴻洺科技有限公司，D12106C 為正常對照的飼料，D12107C 為添加 0.5% Cholesterol 的高膽固醇誘導飼料。

附表三、脂質代謝相關基因引子

Name	Sequence (5' to 3')	長度	G+C	GC%	Tm1	Tm2	Accession
SREBP1c F	GCTGTTGGCATCCTGCTATC	20	11	55	59.4	62	NM_011480
SREBP1c R	TAGCTGGAAGTGACGGTGGT	20	11	55	59.4	62	NM_011480
SREBP2 F	AGCTGGCAAATCAGAAAAACAAG	23	9	39.1	57.1	64	U12329.1
SREBP2 R	GATTAAAGTCTTCAATCTTCAAGTCCAC	28	10	35.7	60.7	76	U12329.1
LXR α F	TCAGCATCTTCTCTGCAGACCGG	23	13	56.5	64.2	72	AJ132601.1
LXR α R	TCATTAGCATCCGTGGGAACA	21	10	47.6	57.9	62	AJ132601.1
PPAR α F	TGAGGAAGCCGTTCTGTGAC	20	11	55	59.4	62	NM_011144.6
PPAR α R	GGTGTCATCTGGATGGTTGC	20	11	55	59.4	62	NM_011144.6
HMG-CoA reductase F	AGATACTGGAGAGTGCCGAGAAA	23	11	47.8	60.6	68	X00494.1
HMG-CoA reductase R	TTTGTAGGCTGGGATGTGCTT	21	10	47.6	57.9	62	X00494.1
HMG CoA synthase F	CCTGGGTCACTTCCTTTGAATG	22	11	50	60.3	66	AH001829.2
HMG CoA synthase R	GATCTCAAGGGCAACGATTCC	21	11	52.4	59.8	64	AH001829.2
LDLR F	CCAACCTGAAGAATGTGGTG	20	10	50	57.3	60	NM_010700.3
LDLR R	CAGGTCCTCACTGATGATGG	20	11	55	59.4	62	NM_010700.3
CYP7A1 F	AGCAACTAAACAACCTGCCAGTACTA	26	11	42.3	61.6	74	NM_007824.2
CYP7A1 R	GTCCGGATATTCAAGGATGCA	21	10	47.6	57.9	62	NM_007824.2
FAS F	CACAGATGATGACAGGAGATGG	22	11	50	60.3	66	NM_007988.3
FAS R	TCGGAGTGAGGCTGGGTTGAT	21	12	57.1	61.8	66	NM_007988.3
β actin F	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	20	11	55	59.4	62	NM_007393.5
β actin R	CAATAGTGATGACCTGGCCGT	21	11	52.4	59.8	64	NM_007393.5

附表四、肝臟脂質代謝相關基因 mRNA 相對表現量整理

	GM	C	L	C+L
PPAR α	↑ +580%	- +230%	↑ +610%	↑ +640%
LXR α	↑ +230%	↑ +320%	↑ +380%	↑ +330%
CYP7A1	↑ +660%	↑ +790%	↑ +970%	↑ +910%
LDLR	- +75%	↑ +420%	↑ +440%	↑ +480%
SREBP2	↓ -83%	↓ -58%	↓ -60%	↓ -60%
HMGR	↓ -70%	↓ -47%	↓ -43%	↓ -41%
HMGS	↓ -62%	↓ -56%	↓ -51%	↓ -49%
SREBP1c	↓ -31%	↓ -87%	↓ -82%	↓ -85%
FAS	↓ -78%	↓ -95%	↓ -95%	↓ -92%

參考文獻

- 衛生福利部。2016。105 年死因統計結果分析。
- 衛生福利部國民健康署。2016。代謝症候群學習手冊。
- Azizi, F., M. B. Habibi Najafi, and M. R. Edalatian Dovom. 2017. 'The biodiversity of *Lactobacillus* spp. from Iranian raw milk Motal cheese and antibacterial evaluation based on bacteriocin-encoding genes', *AMB Express*, 7: 176.
- Besler, Christian, Thomas F. Lüscher, and Ulf Landmesser. 2012. 'Molecular mechanisms of vascular effects of High-density lipoprotein: alterations in cardiovascular disease', *EMBO Molecular Medicine*, 4: 251-68.
- Calkin, Anna, and Peter Tontonoz. 2010. 'LXR signaling pathways and atherosclerosis', *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 30: 10.1161/ATVBAHA.109.191197.
- Cotter, David G., Rebecca C. Schugar, and Peter A. Crawford. 2013. 'Ketone body metabolism and cardiovascular disease', *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 304: H1060-H76.
- DeBose-Boyd, Russell A. 2008. 'Feedback Regulation of Cholesterol Synthesis: Sterol-Accelerated Ubiquitination and Degradation of HMG CoA Reductase', *Cell research*, 18: 609-21.
- DeFronzo, Ralph A., and Eleuterio Ferrannini. 1991. 'Insulin Resistance: A Multifaceted Syndrome Responsible for NIDDM, Obesity, Hypertension, Dyslipidemia, and Atherosclerotic Cardiovascular Disease', *Diabetes Care*, 14: 173.
- Demigné, Christian, Christine Morand, Marie-Anne Levrat, Catherine Besson, Corinne Moundras, and Christian Rémésy. 1995. 'Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes', *British Journal of Nutrition*, 74: 209-19.
- den Besten, Gijs, Karen van Eunen, Albert K. Groen, Koen Venema, Dirk-Jan Reijngoud, and Barbara M. Bakker. 2013. 'The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism', *Journal of Lipid Research*, 54: 2325-40.
- Di Cerbo, Alessandro, Beniamino Palmieri, Maria Aponte, Julio Cesar Morales-Medina, and Tommaso Iannitti. 2016. 'Mechanisms and therapeutic effectiveness of lactobacilli', *Journal of Clinical Pathology*, 69: 187-203.
- Dunne, Colum, Liam O'Mahony, Lisa Murphy, Gerardine Thornton, Darrin Morrissey,

- Sile O'Halloran, Maria Feeney, Sarah Flynn, Gerald Fitzgerald, Charles Daly, Barry Kiely, Gerald C. O'Sullivan, Fergus Shanahan, and J. Kevin Collins. 2001. 'In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings', *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 386s-92s.
- FAO/WHO. 2001. *Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria: Report of a Joint FAO WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, American Córdoba Park Hotel, Córdoba, Argentina, 1 - 4 October 2001.*
- Ferrell, Jessica M., Shannon Boehme, Feng Li, and John Y. L. Chiang. 2016. 'Cholesterol 7 α -hydroxylase-deficient mice are protected from high-fat/high-cholesterol diet-induced metabolic disorders', *Journal of Lipid Research*, 57: 1144-54.
- Foschi, Claudio, Luca Laghi, Carola Parolin, Barbara Giordani, Monica Compri, Roberto Cevenini, Antonella Marangoni, and Beatrice Vitali. 2017. 'Novel approaches for the taxonomic and metabolic characterization of lactobacilli: Integration of 16S rRNA gene sequencing with MALDI-TOF MS and (1)H-NMR', *PLoS ONE*, 12: e0172483.
- Gambino, Roberto, Elisabetta Bugianesi, Chiara Rosso, Lavinia Mezzabotta, Silvia Pinach, Natalina Alemanno, Francesca Saba, and Maurizio Cassader. 2016. 'Different Serum Free Fatty Acid Profiles in NAFLD Subjects and Healthy Controls after Oral Fat Load', *International Journal of Molecular Sciences*, 17: 479.
- Goldberg, Ira J., Robert H. Eckel, and Ruth McPherson. 2011. 'Triglycerides and Heart Disease, Still a Hypothesis?', *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 31: 1716-25.
- Gordon, D. J., J. L. Probstfield, R. J. Garrison, J. D. Neaton, W. P. Castelli, J. D. Knoke, D. R. Jacobs, S. Bangdiwala, and H. A. Tyroler. 1989. 'High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies', *Circulation*, 79: 8.
- Haskins, Jonathan W., Shannon Zhang, Robert E. Means, Joanne K. Kelleher, Gary W. Cline, Alberto Canfrán-Duque, Yajaira Suárez, and David F. Stern. 2015. 'Neuregulin-activated ERBB4 induces the SREBP-2 cholesterol biosynthetic pathway and increases low-density lipoprotein uptake', *Science signaling*, 8: ra111-ra111.
- Hsu, Wei-Hsuan, Yu-Chun Huang, Bao-Hong Lee, Ya-Wen Hsu, and Tzu-Ming Pan.

2013. 'The improvements of ankaflavin isolated from *Monascus*-fermented products on dyslipidemia in high-fat diet-induced hamster', *Journal of Functional Foods*, 5: 434-43.
- Huang, Wen-Ching, Yi-Ming Chen, Nai-Wen Kan, Chun-Sheng Ho, Li Wei, Ching-Hung Chan, Hui-Yu Huang, and Chi-Chang Huang. 2015. 'Hypolipidemic Effects and Safety of *Lactobacillus Reuteri* 263 in a Hamster Model of Hyperlipidemia', *Nutrients*, 7: 3767-82.
- Jensen-Urstad, Anne P. L., and Clay F. Semenkovich. 2012. 'Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: housekeeper or messenger?', *Biochimica et biophysica acta*, 1821: 747-53.
- Jesch, Elliot D., and Timothy P. Carr. 2017. 'Food Ingredients That Inhibit Cholesterol Absorption', *Preventive Nutrition and Food Science*, 22: 67-80.
- Joseph, Jalaja, Robert D. Shamburek, Elaine K. Cochran, Phillip Gordon, and Rebecca J. Brown. 2014. 'Lipid Regulation in Lipodystrophy Versus the Obesity-Associated Metabolic Syndrome: The Dissociation of HDL-C and Triglycerides', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 99: E1676-E80.
- Kim, S., J. Hong, R. Jeon, and H. S. Kim. 2016. 'Adzuki bean ameliorates hepatic lipogenesis and proinflammatory mediator expression in mice fed a high-cholesterol and high-fat diet to induce nonalcoholic fatty liver disease', *Nutr Res*, 36: 90-100.
- Knebel, Birgit, Jutta Haas, Sonja Hartwig, Sylvia Jacob, Cornelia Köllmer, Ulrike Nitzgen, Dirk Müller-Wieland, and Jorg Kotzka. 2012. 'Liver-Specific Expression of Transcriptionally Active SREBP-1c Is Associated with Fatty Liver and Increased Visceral Fat Mass', *PLoS ONE*, 7: e31812.
- Kobayashi, M., R. Hirahata, S. Egusa, and M. Fukuda. 2012. 'Hypocholesterolemic effects of lactic acid-fermented soymilk on rats fed a high cholesterol diet', *Nutrients*, 4: 1304-16.
- Kolehmainen, Marjukka, Hubert Vidal, Esko Alhava, and I. J. Uusitupa Matti. 2012. 'Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c (SREBP-1c) Expression in Human Obesity', *Obesity Research*, 9: 706-12.
- Kumar, Manoj, Ravinder Nagpal, Rajesh Kumar, R. Hemalatha, Vinod Verma, Ashok Kumar, Chaitali Chakraborty, Birbal Singh, Francesco Marotta, Shalini Jain, and Hariom Yadav. 2012. 'Cholesterol-Lowering Probiotics as Potential Biotherapeutics for Metabolic Diseases', *Experimental Diabetes Research*, 2012: 902917.

- Lawler, Patrick R., Akintunde O. Akinkuolie, Audrey Y. Chu, Svati H. Shah, William E. Kraus, Damian Craig, Latha Padmanabhan, Robert J. Glynn, Paul M. Ridker, Daniel I. Chasman, and Samia Mora. 2017. 'Atherogenic Lipoprotein Determinants of Cardiovascular Disease and Residual Risk Among Individuals With Low Low-Density Lipoprotein Cholesterol', *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease*, 6: e005549.
- Leroy, Frédéric, and Luc De Vuyst. 2004. 'Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry', *Trends in Food Science & Technology*, 15: 67-78.
- Li, A. C., and C. K. Glass. 2004. 'PPAR- and LXR-dependent pathways controlling lipid metabolism and the development of atherosclerosis', *J Lipid Res*, 45: 2161-73.
- Li, G., X. Liu, H. Zhu, L. Huang, Y. Liu, C. Ma, and C. Qin. 2009. 'Insulin resistance in insulin-resistant and diabetic hamsters (*Mesocricetus auratus*) is associated with abnormal hepatic expression of genes involved in lipid and glucose metabolism', *Comp Med*, 59: 449-58.
- Li, Tiangang, Jessica M. Francl, Shannon Boehme, and John Y. L. Chiang. 2013. 'Regulation of cholesterol and bile acid homeostasis by the CYP7A1/SREBP2/miR-33a axis', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 58: 1111-21.
- Liong MT, and Shah NP. 2005. 'Production of organic acids from fermentation of mannitol, fructooligosaccharide and inulin by a cholesterol removing *Lactobacillus acidophilus* strain', *Journal of Applied Microbiology*, 99: 783-93.
- Livak, Kenneth J., and Thomas D. Schmittgen. 2001. 'Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method', *Methods*, 25: 402-08.
- Machado, Mariana Verdelho, and Helena Cortez-Pinto. 2014. 'Non-alcoholic fatty liver disease: What the clinician needs to know', *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 20: 12956-80.
- Mazein, Alexander, Steven Watterson, Wei-Yuan Hsieh, William J. Griffiths, and Peter Ghazal. 2013. 'A comprehensive machine-readable view of the mammalian cholesterol biosynthesis pathway', *Biochemical Pharmacology*, 86: 56-66.
- McGill, Mitchell R. 2016. 'The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers', *EXCLI Journal*, 15: 817-28.
- Michalik, Liliane, Johan Auwerx, Joel P. Berger, V. Krishna Chatterjee, Christopher K.

- Glass, Frank J. Gonzalez, Paul A. Grimaldi, Takashi Kadowaki, Mitchell A. Lazar, Stephen Rahilly, Colin N. A. Palmer, Jorge Plutzky, Janardan K. Reddy, Bruce M. Spiegelman, Bart Staels, and Walter Wahli. 2006. 'International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors', *Pharmacological Reviews*, 58: 726.
- Mills, S., L. M. Serrano, C. Griffin, P. M. O'Connor, G. Schaad, C. Bruining, C. Hill, R. P. Ross, and W. C. Meijer. 2011. 'Inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* LMG P-26358 against *Listeria innocua* when used as an adjunct starter in the manufacture of cheese', *Microb Cell Fact*, 10 Suppl 1: S7.
- Mitchell, S., S. Roso, M. Samuel, and M. Pladevall-Vila. 2016. 'Unmet need in the hyperlipidaemia population with high risk of cardiovascular disease: a targeted literature review of observational studies', *BMC Cardiovascular Disorders*, 16: 74.
- Miyata, Shingo, Jun Inoue, Makoto Shimizu, and Ryuichiro Sato. 2015. 'Xanthohumol Improves Diet-induced Obesity and Fatty Liver by Suppressing Sterol Regulatory Element-binding Protein (SREBP) Activation', *The Journal of Biological Chemistry*, 290: 20565-79.
- More, Vijay R., Christopher R. Campos, Rebecca A. Evans, Keith D. Oliver, Gary N. Y. Chan, David S. Miller, and Ronald E. Cannon. 2017. 'PPAR- α , a lipid-sensing transcription factor, regulates blood-brain barrier efflux transporter expression', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 37: 1199-212.
- Moreira, João Luiz S., Rodrigo M. Mota, Maria F. Horta, Santuza M. R. Teixeira, Elisabeth Neumann, Jacques R. Nicoli, and Álvaro C. Nunes. 2005. 'Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling', *BMC Microbiology*, 5: 15-15.
- Mozaffarian, Dariush, Emelia J. Benjamin, Alan S. Go, Donna K. Arnett, Michael J. Blaha, Mary Cushman, Sarah de Ferranti, Jean-Pierre Després, Heather J. Fullerton, Virginia J. Howard, Mark D. Huffman, Suzanne E. Judd, Brett M. Kissela, Daniel T. Lackland, Judith H. Lichtman, Lynda D. Lisabeth, Simin Liu, Rachel H. Mackey, David B. Matchar, Darren K. McGuire, Emile R. Mohler, Claudia S. Moy, Paul Muntner, Michael E. Mussolino, Khurram Nasir, Robert W. Neumar, Graham Nichol, Latha Palaniappan, Dilip K. Pandey, Mathew J. Reeves, Carlos J. Rodriguez, Paul D. Sorlie, Joel Stein, Amytis Towfighi, Tanya N. Turan, Salim S. Virani, Joshua Z. Willey, Daniel Woo, Robert W. Yeh, and Melanie B. Turner. 2015. 'Heart Disease and Stroke Statistics—2015 Update', *Circulation*, 131: e29.
- Nam, Kyunghwa, Deokyeong Choe, and Chul Soo Shin. 2014. 'Antiobesity effect of a

jelly food containing the L-tryptophan derivative of *Monascus* pigment in mice', *Journal of Functional Foods*, 9: 306-14.

- Nelson, Robert H. 2013a. 'Hyperlipidemia as a Risk Factor for Cardiovascular Disease', *Primary care*, 40: 195-211.
- . 2013b. 'Hyperlipidemia as a Risk Factor for Cardiovascular Disease', *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 40: 195-211.
- Omar, Jaclyn M., Yen-Ming Chan, Mitchell L. Jones, Satya Prakash, and Peter J. H. Jones. 2013. 'Lactobacillus fermentum and Lactobacillus amylovorus as probiotics alter body adiposity and gut microflora in healthy persons', *Journal of Functional Foods*, 5: 116-23.
- Öner, Ö. B. Aslim, and S. B. Aydaş. 2014. 'Mechanisms of Cholesterol-Lowering Effects of Lactobacilli and Bifidobacteria Strains as Potential Probiotics with Their bsh Gene Analysis', *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 24: 12-18.
- Ooi, Lay-Gaik, and Min-Tze Liong. 2010. 'Cholesterol-Lowering Effects of Probiotics and Prebiotics: A Review of in Vivo and in Vitro Findings', *International Journal of Molecular Sciences*, 11: 2499-522.
- Orekhov, Alexander N., Yuri V. Bobryshev, Igor A. Sobenin, Alexandra A. Melnichenko, and Dmitry A. Chistiakov. 2014. 'Modified Low Density Lipoprotein and Lipoprotein-Containing Circulating Immune Complexes as Diagnostic and Prognostic Biomarkers of Atherosclerosis and Type 1 Diabetes Macrovascular Disease', *International Journal of Molecular Sciences*, 15: 12807-41.
- Panesar, Parmjit S., John F. Kennedy, Dina N. Gandhi, and Katarzyna Bunko. 2007. 'Bioutilisation of whey for lactic acid production', *Food Chemistry*, 105: 1-14.
- Paththinige, C. S., N. D. Sirisena, and V. H. W. Dissanayake. 2017. 'Genetic determinants of inherited susceptibility to hypercholesterolemia – a comprehensive literature review', *Lipids in Health and Disease*, 16: 103.
- Pereira, Dora I. A., and Glenn R. Gibson. 2002. 'Cholesterol Assimilation by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria Isolated from the Human Gut', *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 4689-93.
- Qi, Yunpeng, Changtao Jiang, Jie Cheng, Kristopher W. Krausz, Tiangang Li, Jessica M. Ferrell, Frank J. Gonzalez, and John Y. L. Chiang. 2015. 'Bile acid signaling in lipid metabolism: Metabolomic and lipidomic analysis of lipid and bile acid markers linked to anti-obesity and anti-diabetes in mice',

Biochimica et biophysica acta, 1851: 19-29.

- Ranadheera, C. Senaka, Craig A. Evans, Michelle C. Adams, and Surinder K. Baines. 2014. 'Effect of dairy probiotic combinations on in vitro gastrointestinal tolerance, intestinal epithelial cell adhesion and cytokine secretion', *Journal of Functional Foods*, 8: 18-25.
- Rinttila T, Kassinen A, Malinen E, Krogius L, and Palva A. 2004. 'Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR', *J Appl Microbiol*, 97: 1166-77.
- Salami, Joseph A., Javier Valero-Elizondo, Oluseye Ogunmoroti, Erica S. Spatz, Jamal S. Rana, Salim S. Virani, Ron Blankstein, Adnan Younus, Alejandro Arrieta, Michael J. Blaha, Emir Veledar, and Khurram Nasir. 2017. 'Association Between Modifiable Risk Factors and Pharmaceutical Expenditures Among Adults With Atherosclerotic Cardiovascular Disease in the United States: 2012–2013 Medical Expenditures Panel Survey', *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease*, 6: e004996.
- Salazar, Juan, Luis Carlos Olivar, Eduardo Ramos, Mervin Chávez-Castillo, Joselyn Rojas, and Valmore Bermúdez. 2015. 'Dysfunctional High-Density Lipoprotein: An Innovative Target for Proteomics and Lipidomics', *Cholesterol*, 2015: 296417.
- Salminen, Seppo, and Atte Von Wright. 2004. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* (CRC Press).
- Staels, Bart, Jean Dallongeville, Johan Auwerx, Kristina Schoonjans, Eran Leitersdorf, and Jean-Charles Fruchart. 1998. 'Mechanism of Action of Fibrates on Lipid and Lipoprotein Metabolism', *Circulation*, 98: 2088.
- Sugimoto-Kawabata, Kanami, Hiroshi Shimada, Kaoru Sakai, Kazuo Suzuki, Thomas Kelder, Elsbet J. Pieterman, Louis H. Cohen, Louis M. Havekes, Hans M. Princen, and Anita M. van den Hoek. 2013. 'Colestilan decreases weight gain by enhanced NEFA incorporation in biliary lipids and fecal lipid excretion', *Journal of Lipid Research*, 54: 1255-64.
- Szajewska, Hania, Mala Setty, Jacek Mrukowicz, and Stefano Guandalini. 2006. 'Probiotics in Gastrointestinal Diseases in Children: Hard and Not-So-Hard Evidence of Efficacy', *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 42: 454-75.
- Temple, Jonathan L., Paul Cordero, Jiawei Li, Vi Nguyen, and Jude A. Oben. 2016. 'A

Guide to Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Childhood and Adolescence', *International Journal of Molecular Sciences*, 17: 947.

Ting, W. J., W. W. Kuo, D. J. Hsieh, Y. L. Yeh, C. H. Day, Y. H. Chen, R. J. Chen, V. V. Padma, Y. H. Chen, and C. Y. Huang. 2015. 'Heat Killed *Lactobacillus reuteri* GMNL-263 Reduces Fibrosis Effects on the Liver and Heart in High Fat Diet-Hamsters via TGF-beta Suppression', *Int J Mol Sci*, 16: 25881-96.

Ting, Wei-Jen, Yu-Lan Yeh, Chia-Yao Shen, Ya-Hui Chen, Tsung-Jung Ho, Vijaya Padma Viswanadha, Yi-Hsing Chen, Chih-Yang Huang, Wei-Wen Kuo, and Chia-Hua Kuo. 2015. 'Supplementary heat-killed *Lactobacillus reuteri* GMNL-263 ameliorates hyperlipidaemic and cardiac apoptosis in high-fat diet-fed hamsters to maintain cardiovascular function', *British Journal of Nutrition*, 114: 706-12.

Tomaro-Duchesneau, Catherine, Mitchell L. Jones, Divya Shah, Poonam Jain, Shyamali Saha, and Satya Prakash. 2014. 'Cholesterol Assimilation by *Lactobacillus* Probiotic Bacteria: An In Vitro Investigation', *BioMed Research International*, 2014: 380316.

Trautwein, Elke A., Dörte Rieckhoff, and Helmut F. Erbersdobler. 1998. 'Dietary Inulin Lowers Plasma Cholesterol and Triacylglycerol and Alters Biliary Bile Acid Profile in Hamsters', *The Journal of Nutrition*, 128: 1937-43.

Tsai, Cheng-Chih, Pei-Pei Lin, You-Miin Hsieh, Zi-yi Zhang, Hui-Ching Wu, and Chun-Chih Huang. 2014. 'Cholesterol-Lowering Potentials of Lactic Acid Bacteria Based on Bile-Salt Hydrolase Activity and Effect of Potent Strains on Cholesterol Metabolism In Vitro and In Vivo', *The Scientific World Journal*, 2014: 690752.

Wang, Helen H., Piero Portincasa, Ornella de Bari, Kristina J. Liu, Gabriella Garruti, Brent A. Neuschwander-Tetri, and David Q. H. Wang. 2013. 'Prevention of cholesterol gallstones by inhibiting hepatic biosynthesis and intestinal absorption of cholesterol', *European journal of clinical investigation*, 43: 413-26.

Wells, Jerry M. 2011. 'Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli', *Microbial Cell Factories*, 10: S17-S17.

Weng, Stephen F., Joe Kai, Indra Neil Guha, and Nadeem Qureshi. 2015. 'The value of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase in cardiovascular disease risk assessment', *Open Heart*, 2: e000272.

Xu, Fei, Hui Yu, Cai Lu, Jun Chen, and Wei Gu. 2016. 'The Cholesterol-Lowering Effect of Alisol Acetates Based on HMG-CoA Reductase and Its Molecular

Mechanism', *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*, 2016: 4753852.

Zhang, Yang, Kun Ling Ma, Xiong Zhong Ruan, and Bi Cheng Liu. 2016. 'Dysregulation of the Low-Density Lipoprotein Receptor Pathway Is Involved in Lipid Disorder-Mediated Organ Injury', *International Journal of Biological Sciences*, 12: 569-79.

Zhang, Yuan, Sarah R. Breevoort, Jerry Angdisen, Mingui Fu, Daniel R. Schmidt, Sam R. Holmstrom, Steven A. Kliewer, David J. Mangelsdorf, and Ira G. Schulman. 2012. 'Liver LXRA expression is crucial for whole body cholesterol homeostasis and reverse cholesterol transport in mice', *The Journal of Clinical Investigation*, 122: 1688-99.

