

東海大學畜產與生物科技學系

Department of Animal Science and Biotechnology

Tunghai University

碩士論文

Master Thesis

指導教授：謝長奇 博士

Advisor: Chang-Chi Hsieh, Ph. D.

乳鐵蛋白對高果糖誘導小鼠非酒精性脂肪肝的調節作用

The Regulatory Effect of Lactoferrin on High-Fructose Induced
Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Murine Model

研究生：李宜潔

Graduate student : Yi-Chieh Li

中華民國一〇二年七月

July 2013

東海大學碩士班研究生

論文口試委員審定書

畜產與生物科技學系 李宜潔(學號 G10061001)

君所提之論文：

乳鐵蛋白對高果糖誘導小鼠非酒精性脂肪肝的調節作用，經本委員會審議，認為符合碩士資格標準。

論文指導教授 謝長奇 (簽章)

畜產與生物科技學系主任 羅致文 (簽章)

考試委員 謝長奇 (簽章)

江又德

陳全木

吳勇初

陳小玲

中華民國 102 年 7 月 22 日

致謝

兩年的碩士修業時間似乎真的過得很快，快地讓我來不及將心中無盡的感激一一傳達給每一位一路上扶持我、給我鼓勵的人。回想過去的日子裡，許多人事物點點滴滴在心頭，讓我成長不少，懂得獨立並更加堅強：能夠完成這份學業，對我來說真的是很開心，不管在學業或是生活上，許多人給我很多的鼓勵和幫助，使我受益良多。在此，我衷心的致上最深的感激之意。

誠摯感謝恩師謝長奇博士之殷切指導與黽勉，於在學期間悉心的教導使我得以一窺研究領域的深奧，並不時的討論指點我正確的方向，使之得以順利完成碩士論文，於此謹呈最虔摯的謝忱。並於論文口試時，承蒙東海大學吳勇初博士、江文德博士，中興大學陳全木博士與大葉大學陳小玲博士對論文之撥冗審查，惠予寶貴意見與指正，促使本論文得以更完整而嚴謹，僅此敬致最誠摯之謝意。

受業期間亦蒙中興大學廖俊旺老師給予組織切片分析方面之指導與協助，及系所內諸位師長之關懷指導，睿與新知，受益恩情永銘於心。

感謝實驗室夥伴，助理依陵小姐、新雅學姊、婕妤學姊、佑軒學長、羽萱學妹、慧禎學妹、玉庭學妹、羿欣學妹、至涵學妹、芷好學妹、定邦學弟、宇琦學弟、維儒學弟、則立學弟、明駿學弟、宴宏學弟、迪鈞學弟、育佑學弟，食科系同學巧玲，兩年的日子裡，實驗室共同的生活點滴，因為有您們的陪伴並相互砥礪，實驗才得以順利進行，在此致上最深的謝意。

感謝同窗好友勝博、笙合、祺峰、成瑞、凱婷，於研究所學習生涯的相互砥礪扶持與一同伴隨過的光陰歲月，使得人生旅途上增添許多繽紛色彩，然於此，心中縱有不捨之情，僅銘於心。

最後，感謝最摯愛的家人，由於您們的支持和鼓勵，使我有鼓起勇氣持續踏步向前，使得學業得以順利完成，僅以這微小成果獻予諸位，並敬上感恩之意。

目錄

壹、摘要	1
貳、前言	4
參、文獻回顧	6
一、肝臟之構造與功能	6
(一) 肝臟結構	6
(二) 肝臟細胞的組成與生理功能	6
(三) 果糖在肝臟中的代謝	9
(四) 非酒精性脂肪肝形成之原因	10
(五) 腸肝軸系 (Gut-liver axis)	12
(六) 脂肪細胞激素與發炎反應	12
(七) 肝功能指標	16
二、乳鐵蛋白之特性	18
(一)、乳鐵蛋白之定義	18
(二)、乳鐵蛋白之來源與分布	18
(三)、乳鐵蛋白之結構與特性	19
(四)、乳鐵蛋白受體 (Lactoferrin receptors)	20
(五)、乳鐵蛋白之代謝	21
(六)、乳鐵蛋白之功能	21
肆、研究動機與目的	25
伍、材料與方法	26
一、藥品材料	26
(一)、藥品、試劑	26
(二)、設備、器材	27

二、 實驗方法	29
(一)、動物飼養與試驗分組	29
(二)、非酒精性脂肪肝造型模式	29
(三)、實驗動物樣本採集	30
(四)、實驗動物樣本分析項目	31
三、 統計分析	36
(一)、單因子變異數分析 (One-way analysis of variance, One-Way ANOVA)	36
(二)、無母數分析(Non-parametric statistics)	36
陸、 結果	37
一、 乳鐵蛋白對非酒精性脂肪肝的調節作用	37
(一)、糞便大腸桿菌的含量	37
(二)、小鼠之體重、脾臟與肝臟重量	37
(三)、肝臟、血液之內毒素含量	37
(四)、血清肝功能指標測定	38
(五)、肝臟病理型態圖	38
(六)、肝臟病理切片分析	38
(七)、肝臟之三酸甘油酯含量	39
(八)、口服葡萄糖耐受性試驗	39
(九)、胰島素敏感性	40
二、 脂多醣對肝臟發炎的可能途徑	40
(一)、4-HNE 之免疫組織化學染色	40
(二)、胸線基質淋巴細胞生成素之免疫組織化學染色	40
(三)、類鐸受體-4 之免疫組織化學染色	41
(四)、脂肪細胞激素	41

柒、討論	42
捌、結論	48
玖、參考文獻	49

表次

表一、乳鐵蛋白對高果糖將誘導小鼠非酒精性脂肪肝中總增重、肝重及脾臟重量之影響-----	62
表二、乳鐵蛋白對預防高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝組織切片評分-----	71
表三、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝中肝臟細胞激素 IL-33 與 TSLP 分泌之影響-----	80
表四、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝中肝臟第二型細胞激素 IL-4 與 IL-13 分泌之影響-----	81
表五、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝中肝臟促發炎細胞激素 IL-1 β , IL-6, TNF- α 與 MCP-1 分泌之影響-----	82
表六、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝中肝臟抗發炎脂肪細胞激素 adiponectin 分泌的影響-----	83

圖目錄

圖一、高果糖漿誘導對小鼠之糞便中大腸桿菌群含量變化。-----	61
圖二、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝中內毒素(脂多醣)含 之影響。-----	63
圖三、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝中血清內毒素(脂多 體)之影響。-----	64
圖四、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝中血清丙胺酸轉胺酶 之影響。-----	65
圖五、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝中血清總膽固醇之影 響。-----	66
圖六、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝中血清中三酸甘油酯 之影響。-----	67
圖七、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝中肝臟之影響。-	68
圖八、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝蘇木紫與伊紅染色 (100x)。-----	69
圖九、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝蘇木紫與伊紅染色 (400x)。-----	70
圖十、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝油紅 O (Oil-Red O)染 色。-----	72
圖十一、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝中肝臟三酸甘油之 影響。-----	73
圖十二、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝之口服耐糖試驗。 -----	74
圖十三、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝中耐糖試驗之影 響。-----	75

圖十四、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝中胰島素抗性之影響。	76
圖十五、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝切片中 4-羥基壬烯醛(4-hydroxynonenal, 4-HNE)免疫化學染色之影響(100×)。	77
圖十六、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝切片中胸腺基質淋巴生成素(thymic stromal lymphopietin, TSLP)免疫化學染色之影響(100×)。	78
圖十七、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝切片中類鐸受體-4(Toll-like receptor, TLR-4)免疫化學染色之影響(100×)。	79
圖十八、高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝的機制。	84
圖十九、庫氏細胞活化對肝臟發炎的影響。	85
圖二十、乳鐵蛋白調節高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝之機制。	86

壹、摘要

果糖攝取量的增加與肥胖、高血脂、糖尿病及脂肪肝等代謝綜合症有關。近年來研究指出，慢性發炎被認為是脂肪肝發展的重要病程，其中高血糖亦被認為增加體內氧化壓力因而導致炎症反應；另一方面，高果糖飲食調控腸道微生物菌群的分佈，同時也增加了格蘭氏陰性菌的生長，更進一步造成脂多醣釋出增加而導致慢性發炎。乳鐵蛋白是一種能與鐵結合之糖蛋白，具有廣泛調節生理作用之功效，對腸道格蘭氏陰性菌具抗菌作用，研究指出，乳鐵蛋白可降低大鼠血液中的三酸甘油脂的含量並具抗發炎之效。本研究主要目的為探討乳鐵蛋白在高果糖飲食的動物模式中如何降低非酒精性脂肪肝的形成。結果顯示，高果糖飲食刺激腸道微生物菌群過度生長及腸道通透性的增加，因而導致腸道微生物細胞壁中的脂多醣隨著血液循環進入肝臟，進一步啟動肝臟發炎機制，而類鐸受體-4 的免疫組織染色也指出乳鐵蛋白可降低內毒素介導之炎症反應，及其下游之脂肪細胞激素的分泌，包括 IL-1 β 、IL-6、IL-33、TNF- α 、MCP-1、TSLP 與 adiponectin，可調控發炎反應並降低脂肪細胞分化與肝組織之脂肪堆積，進而降低肝細胞受損並減少血清丙胺酸轉胺酶含量；最後，乳鐵蛋白可降低血清及肝臟三酸甘油脂含量以及脂質在肝臟中的堆積，進而達到降低脂肪肝的形成。綜上所述，乳鐵蛋白透過降低脂多醣對肝臟所產生的發炎反應，導致降低三酸甘油酯及總膽固醇於肝中累積，進而減少肝細胞脂肪的變性。

(關鍵字：脂肪細胞激素、內毒素、高果糖飲食、發炎、乳鐵蛋白、非酒精性脂肪肝)

Abstract

The increase in fructose consumption is paralleled by a higher incidence of obesity and associate to metabolic syndrome including hypertriglyceridemia, fatty liver, hypertension, insulin resistance and diabetes mellitus. In recent years, several studies had been published that implicate subclinical chronic inflammation as an important pathogenic factor in the development of fatty liver. The most important reasons will be the hyperglycemia, high blood glucose, causes oxidative stress and leading inflammation. High fructose diet modulated the distribution of gut microbes and increased Gram negative bacteria proliferation further increased lipopolysaccharide (LPS) releasing. Lactoferrin, an iron-binding glycoprotein, regulated several physiological functions such as antimicrobial activity, especially in Gram negative bacteria. Previous studies indicated lactoferrin reduced serum triglyceride and down-regulated inflammation in rat. The purpose of this study was to investigate that lactoferrin protects against the onset of non-alcoholic fatty liver disease via anti-inflammation in high-fructose administered murine model. Our results indicated high-fructose diet stimulated intestinal bacterial overgrowth and increased intestinal permeability, subsequently leading to endotoxin in blood circulation and liver. Immunohistochemical staining of Toll-like receptor-4 (TLR-4) indicated lactoferrin could modulate LPS mediated inflammatory cascade. These inflammatory response in adipokines include interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-33, tumor necrosis factor- α (TNF- α), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), thymic stromal lymphopietin (TSLP) and adiponectin. Furthermore, lactoferrin could reduce serum and hepatic triglycerides, and lipid accumulation in liver, finally reduced hepatic damage and decreased serum alanine aminotransferase (ALT) release. These beneficial effects of lactoferrin were related to the decreased LPS induced

inflammatory cascade in liver and also significantly lowered liver weight that ameliorated fatty liver by decrease of triglyceride and cholesterol syntheses in activating hepatic steatosis. These findings suggest that lactoferrin had the potential to improve nonalcoholic fatty liver disease in murine model.

Keywords: Adipokines, Endotoxin, High-fructose diet, Inflammation, Lactoferrin, Nonalcoholic fatty liver disease

貳、前言

肝臟是人體代謝功能的主要器官，對於蛋白質、脂肪和碳水化合物的代謝、儲存以及營養素的分佈上扮演著重要的角色。因此，一旦肝臟機能受損，對健康的影響既深且廣，不但影響上述正常生理功能，並且也導致慢性肝病、肝硬化、甚至肝癌。肝臟疾病為國人常見的疾病，根據行政院衛生署的統計，台灣地區2012年十大死因中，慢性肝病和肝硬化位居十大死因第九位。肝臟疾病的類型和發生原因很多，其中，非酒精性脂肪肝 (Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 為肝臟疾病中常見的一種 (Bacon *et al.*, 1994)，通常發生於沒有酗酒習慣的患者，為過多的三酸甘油酯堆積於肝臟所致，當肝臟因脂肪累積，並使總重增加5%，便稱之為脂肪肝，且大多數脂肪肝伴隨著肝代謝綜合症，包括肥胖、糖尿病和高血脂症，在肥胖以及糖尿病患者的身上，盛行率更可達70~90% (Castro *et al.*, 2011)。以廣義來看，脂肪肝可分為單純的肝臟脂肪變性 (hepatic steatosis)，或是合併有非酒精性肝細胞發炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH)，也就是同時有發炎與肝細胞受損的現象，此時可能發展為肝纖維化，進展到肝硬化，甚至肝癌的形成。脂肪肝組織學變化在非酒精性脂肪肝與酒精性脂肪肝相似，主要是肝小葉發生病變，並且以肝細胞脂肪變性和脂肪堆積為病理特徵的臨床綜合徵狀 (Saito *et al.*, 2007)。由於非酒精性脂肪肝疾病的日漸普遍，同時與代謝症候群、糖尿病、高血脂等疾病有高度的相關性，因此是近年來醫界重視的研究主題。

近年來，已開發國家的肥胖率和糖尿病率增加非常迅速；這些國家對於糖的使用量，也同時以驚人的速度增加，部分原因歸罪於含糖飲料的普及，尤其是因為高果糖玉米糖漿 (high-fructose corn syrup, HFCS) 被大量利用在可樂、汽水、人造果汁和其他飲料中。在此同時，非酒精性脂肪肝的發病率也急速上升 (Nseir *et al.*, 2010)。根據台灣研究調查統計，目前非酒精性脂肪肝之盛行率在西方國家為20%~40%，在東方國家為5%~40%，而在台灣之盛行率為11.4%~41%左右。在上述病患中，轉變為非酒精性脂肪肝炎之盛行率為6%~13%。在肝炎患

者中，十年之內轉變為肝硬化之盛行率為 10%~29%。在肝硬化患者中，轉變為肝癌之盛行率為 4%~27%，所以非酒精性脂肪肝危害國人健康影響甚大。此外，非酒精性脂肪肝也隨著肥胖症、糖尿病、代謝症候群的大幅上昇而明顯增加 (Hsu *et al.*, 2012)。

乳鐵蛋白分子量為 76~80kD，約由 700 個胺基酸殘基所組成的單鏈糖蛋白。乳鐵蛋白具有多種生理功效，如抗菌、抗病毒、抗發炎之功效 (Brock, 2002)。研究發現，乳鐵蛋白可顯著降低大鼠血液中的三酸甘油酯與周邊脂肪重量 (Morishita *et al.*, 2013)。因此本論文利用高果糖玉米糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝過程中，同時給予乳鐵蛋白，藉此探討乳鐵蛋白對高果糖玉米糖漿誘導之脂肪肝是否有改善作用，並探討其分子調節機制。

參、文獻回顧

一、肝臟之構造與功能

(一)、肝臟的形態與位置

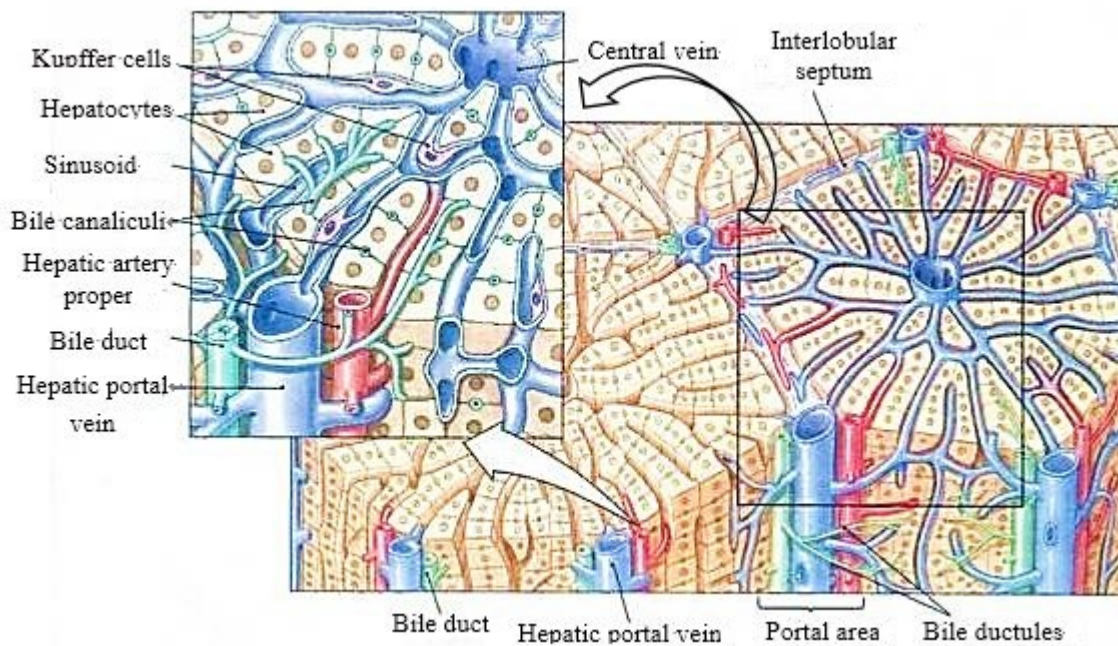
肝臟是人體最大的實質腺體器官，也是體內新陳代謝最重要的場所；其位於右側橫膈膜下之腹腔位置，重量約在 1,200~1,500 公克左右；表面呈紅褐色、光滑而質地脆弱。在解剖學上，肝臟主要分為四葉，其中右葉最大，約占整個肝臟的五分之四，以鑷狀韌帶與左葉分隔；左葉約占肝臟的五分之一；其餘肝葉較小，包括有尾葉，位在肝的背腹面，以及方葉，位於肝的前下緣。

(二)、肝臟細胞的組成及功能

肝臟由實質細胞 (parenchymal cell) 和非實質細胞 (nonparenchymal cell) 所組成，實質細胞為肝細胞 (hepatocyte)，而非實質細胞總類繁多，如星狀細胞 (stellate cell)、庫氏細胞 (Kupffer cell)、竇細胞 (sinusoidal endothelium cell) 和上皮細胞 (epithelial cell) 等。

1. 肝細胞 (hepatocyte)

肝細胞約佔肝臟細胞組成的百分之八十，顯微鏡下觀察呈橢圓狀，許多的肝細胞聚集成肝小葉。肝臟約有八萬個肝小葉，肝小葉為微六角形柱狀結構，如附圖一所示，每個小葉中間都有肝靜脈的分枝穿過，稱為中央靜脈，肝細胞即沿著中央靜脈以放射狀排列，在每個肝小葉周邊皆可見到數套管線結構，含有三種管線，包括肝動脈的分枝，肝門靜脈於小葉間的分枝，以及肝管，用以分泌膽汁，產生膽酸幫助消化作用和調控體內代謝作用 (Eugene *et al.*, 2003)。



附圖一、肝臟之肝小葉結構 (李, 1991)

2. 庫氏細胞 (Kupffer cell)

庫氏細胞為體內含量最多且分佈於肝靜脈竇中的組織間巨噬細胞(tissue macrophages)，其主要功能為清除從腸胃道而來的細菌及其衍生物 (Bouwens *et al.*, 1986)。當肝臟受到來自細菌細胞壁外膜之脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS)或稱內毒素 (endotoxin)刺激時，可活化肝臟內的庫氏細胞，活化的庫氏細胞會分泌一些細胞激素(cytokines)及趨化因子 (chemokines)等，進而活化更多的細胞產生發炎反應。(Holt *et al.*, 2008; Seki *et al.*, 2007)

3. 內皮細胞 (endothelial cells)

為肝臟內所佔比例最高的非實質細胞，位於肝竇腔肝細胞之間，單層的內皮細胞圍成靜脈竇，管腔比微血管較寬，由肝門靜脈及肝動脈分之流入，並流進肝靜脈。內皮細胞因具不連續性及齒狀的排列及有高度通透性，因此能讓血漿通過，因而進入肝細胞，也讓肝細胞產生的物質得以分泌到血液中。肝細胞與靜脈竇之間的空間則構成竇旁腔 (perisinusoidal space)或迪氏腔 (space of Disse)，此為血液與肝細胞物質交換的主要場所。

4. 肝臟星狀細胞 (hepatic stellate cells, HSC)

主要位於肝實質細胞板(parenchymal cell plates)和內細胞襯裡(endothelial lining)之間，屬於非實質細胞的一員，富含維生素 A 油滴。早期被稱為儲脂細胞 (fat-storing cell) (Suematsu and Aiso, 2001)，對體內維生素 A 的平衡扮演重要的角色。近年來在國際間，以肝臟星狀細胞作為此類細胞命名 (Ahern, *et al.*, 1996)。在發炎過程中，庫氏細胞和星狀細胞扮演重要的角色。當肝臟受到病毒、藥物、內毒素及酒精與非酒精等傷害時，肝細胞會因受損而分泌細胞激素與活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS)，活化庫氏細胞與星狀細胞，此時，星狀細胞受到上游庫氏細胞與發炎細胞的 ROS 及細胞激素的刺激後，由原本靜止態的 HSCs 活化轉型為類似肌纖維母細胞 (myofibroblast-like) 的型態。而這種活化態的 HSCs 特徵，使得 α -smooth muscle actin (α -SMA) 大量表現細胞骨架蛋白，而讓 HSCs 具有收縮爬行 (migration) 的能力。此外，活化態的 HSCs 除了具有收縮、爬行能力之外，還具有分泌多種促發炎細胞激素 (pro-inflammatory cytokines)、纖維化的媒介物 (fibrogenic mediators) 等，使 HSCs 具有修補組織與調控細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 蛋白堆積的能力 (Marra, *et al.*, 1999)。HSCs 被活化後，促使膠原蛋白 (collagen) 基因製造大量 collagen，進而造成大量 ECM 蛋白堆積，同時減少如第一型組織型基質金屬蛋白酶抑制因子 (tissue inhibitor of metalloproteinase type 1, TIMP-1) 的表現，而使得基質金屬蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 表現及活性增加，特別是 MMP-1/13 的蛋白分解作用 (Arthur, *et al.*, 2000)。因此，當這些因子去除或改善時，肝臟則可以進入回復期，此時因 HSCs 與 collagen 的表現量減少，而使肝細胞得以重新再生與分裂。反之，若持續惡化下去，則肝細胞不再進行再生與修復，造成大量的纖維堆積於肝臟，因而慢慢造成肝硬化現象，使肝臟失去功能。

5. 上皮細胞 (epithelial cell)

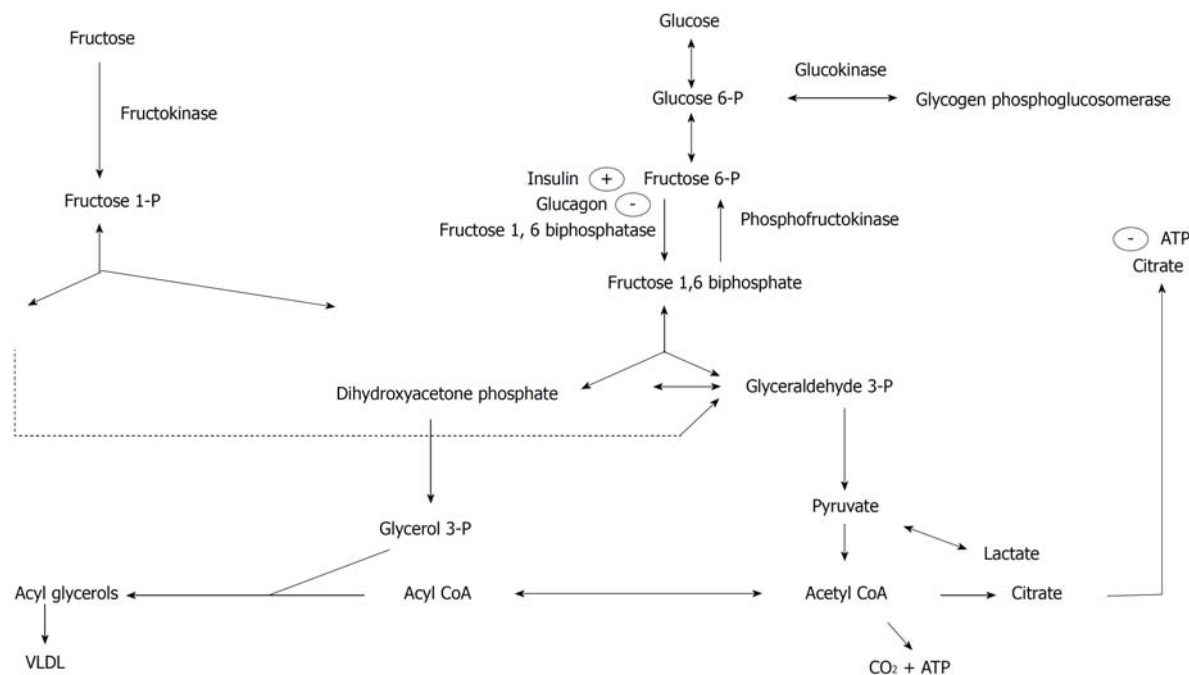
內皮細胞與上皮細胞屏障 (endothelial/epithelial barrier) 的損傷和上皮細胞的凋亡會導致發炎，且活化 Toll-like receptor (TLR) 的訊息傳遞，並於受傷的組織

中釋放出造成纖維化細胞激素。細胞凋亡是一個正常組織中維持恆定和修補的過程，而當此過程出現異常時，將可能導致慢性發炎和纖維化現象發生。而凋亡的上皮細胞會釋出細胞激素，如 Interleukin-33 (IL-33) 與 thymic stromal lymphopoietin (TSLP)，進一步的活化庫氏細胞分泌促發炎細胞激素 (pro-inflammation)，如 tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)、IL-6，因而造成肝臟持續發炎，進一步參與 NASH 一系列的發炎與免疫反應 (Wigg, *et al.*, 2001)。

(三)、果糖在肝臟中的代謝

長期高果糖飲食的攝取被認為是非酒精性脂肪肝形成之因，不同於葡萄糖，果糖更容易促使脂質的生成，加速三酸甘油脂的生成，進一步的造成發炎反應 (Thorburn *et al.*, 1989)。口服葡萄糖耐受性試驗(75 mg glucose)中，血糖值介於 140~199 mg/dL，為介於正常人與糖尿病患者的血糖值，稱為葡萄糖耐受障礙 (impaired glucose tolerance, IGT)；另外，當空腹血糖介於 100~125 mg/dL 之間，稱為空腹葡萄糖障礙(impaired fast glucose, IFG)，上述狀況均屬於糖尿病前期，診斷為 IGT 或 IFG 都是糖尿病之高危險群，目前葡萄糖耐受障礙與胰島素敏感度降低也可以在動物模式中被觀察出 (Elliott *et al.*, 2002)。而果糖的代謝有別於葡萄糖 (附圖二)，在肝細胞中，被吸收的果糖經由肝門靜脈送入肝臟，可由葡萄糖轉運蛋白-5 (glucose transporter-5, GLUT-5)將果糖轉運到肝細胞中；在肝細胞中被 fructokinase 磷酸化形成 fructose-1-phosphate。接著經由酵素作用又被分解成 glyceraldehyde 與 dihydroxyacetone phosphate 以及 glyceraldehyde-3-phosphate。因此，果糖可以跳過葡萄糖糖解作用中 6-phosphofructokinase 之限制速率步驟，而直接形成糖解作用下 dihydroxyacetone phosphate 與 glyceraldehyde-3-phosphate 的兩個三碳糖磷酸產物。然而在一般狀況下，當葡萄糖被消化吸收時，經由周邊代謝，會產生 citrate 與 ATP，當此兩種產物濃度過高時便會回饋抑制 6-phosphofructokinase，使得葡萄糖不再走向糖解作用(glycolysis)，進而轉向肝糖合成(glycogenesis)的路徑貯存。由於果糖代謝路徑並不在此酵素速率限制步驟，

因此過多的果糖被攝取後，不但會形成過多的乳酸堆積，相對的 acetyl-CoA 的產生也會增加，進而提高脂質的生成速率，加速三酸甘油脂的形成。所以果糖比葡萄糖更具脂肪新生之能力，也因此過量的果糖攝取被認為是容易產生代謝異常的原因 (Thorburn *et al.*, 1989; Holst and Grimaldi, 2002; Nseir *et al.*, 2010)。



附圖二、果糖與葡萄糖在肝臟中的代謝 (Nseir *et al.*, 2010)。

(四)、非酒精性脂肪肝 (Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)

從小腸吸收的葡萄糖、脂質等營養成分會經血液輸送至肝臟，以合成身體所需營養分，接著在經血液送至各組織器官，而部分多餘的營養則會儲存於肝臟，除了能將醣類以肝醣形式儲存外，還能將醣類合成脂肪，以三酸甘油脂形式貯存於肝臟 (Maher, 1997)，根據病理學研究，正常人每 100 克肝約含 4~5 克脂類，當肝細胞內脂質(尤其是指三酸甘油脂)蓄積超過肝重量的 5%，或肝組織學上出現脂肪變性時，就可稱為脂肪肝 (Saito *et al.*, 2007)。脂肪肝病因可分為酒精性與非酒精性，可分別由六大因素所引起，包括肥胖、高血脂症、糖尿病控制不良、長期飲酒、急慢性肝炎與藥物如 Amiodarone、Diltiazem、Tamoxifen、類固醇、抗病毒藥物 Indinavi 等，前三者皆與肥胖有關。此外，第二型糖尿病 (type 2

diabetes)，也就是後天肥胖所造成的糖尿病，會因胰島素阻抗造成葡萄糖耐受異常，對於葡萄糖代謝異常而導致脂肪肝及肝纖維化，因此，脂肪肝也被認為是代謝症候群(metabolic syndrome)的一種 (Angulo, 2002)。非酒精性脂肪性肝病，是一種肝組織學變化與酒精性肝病相類似，但無過量飲酒史的臨床病理綜合症 (Castro *et al.*, 2011)。NAFLD 是一群因脂肪囤積而引起廣泛性肝臟細胞破壞引起疾病的統稱，包括單純性脂肪肝 (simple steatosis)、非酒精性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH)、肝硬化 (liver cirrhosis)三種主要類型，此外非酒精性脂肪肝病可經由脂肪肝炎、肝硬化最後導致肝癌 (Saito, *et al.*, 2007)。

非酒精性脂肪肝疾病的致病機轉仍未完全明瞭，在 1998 年有 Day and Jams 提出“雙撞擊”的假說 (two hit hypothesis)，“第一次撞擊(first hit)”是指肝臟內脂質的異常堆積，此類脂質大多屬於脂肪酸和三酸甘油脂，由於肝臟脂質的動態平衡被破壞，使游離脂肪酸 (free fatty acid, FFA)不斷被運送至肝臟內，造成肝臟對脂肪的 β 氧化能力下降 (β -oxidation)，同時伴隨合成或分泌極低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL)的能力下降，此外，多數學者認為非酒精性脂肪肝的形成與胰島素阻抗有密切關係 (Day *et al.*, 1998; Varman *et al.*, 2004)。研究顯示，胰島素阻抗性會導致脂蛋白脂肪酶 (lipoprotein lipase, LPL)基因過度表現，進而使游離脂肪酸在肝臟不斷產生 (Kaplan, 1998)，因而造成非酒精性脂肪肝的發展。大部份的病人可能只有單純脂肪肝而沒有伴隨發炎反應，這種疾病的病程是通常比較良性。

但是若合併發炎反應，即進入“第二次撞擊(second hit)”，它所引發的發炎反應就變得很複雜，牽涉到很多不正常細胞激素產生及氧化壓力反應的作用 (James *et al.*, 1998)。脂肪酸進入粒線體，或在細胞質內形成過氧化氫酶，在肝細胞內形成活性氧反應氧化類體 (reactive oxygen species, ROS)。而 ROS 激活氧化還原反應敏感性激酶，進而激活 IkappaB kinase beta (IKK β)並誘導 Nuclear factor- κ B (NF- κ B) 的產生，因而提高 tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)等細胞發炎激素的表現量增加，進而導致肝臟發炎 (Petit *et al.*, 2001; Rubbia-Brandt *et al.*,

2001)，最後因肝細胞壞死增加、炎症細胞進入和肝細胞再生的減少而走向脂肪肝炎。此外，脂肪肝的病程也與粒線體的表現有關，門靜脈周圍 (periportal)的脂肪細胞所含異常粒線體較多，三酸甘油脂不易在此堆積；但肝小葉中心附近的細胞所含正常粒線體比例較高，三酸甘油脂易在中央靜脈 (肝小靜脈)周圍明顯堆積 (Petersen, 1997)。因此當血液循環中有過多的三酸甘油脂，脂肪油滴累積於肝組織則是以中央靜脈 (central vein)為由滴累積中心，而逐漸朝門靜脈 (portal vein) 周圍方向擴展。

(五)、腸肝軸系 (Gut-liver axis)

腸道除了消化與吸收功能之外，更為人體重要之防禦屏障，而肝臟作為第二道防禦線，通過門脈系統與腸道屏障相互關聯。1998年，Marshall提出“腸-肝軸”的概念 (Marshall, *et al.*, 1998)，為腸道受到感染、損傷，使得腸屏障功能受損，腸道內細菌和內毒素大量進入門靜脈循環，此時，肝臟的庫氏細胞因受內毒素激活，而釋出一系列發炎細胞激素；另一方面肝臟受損後，庫氏細胞的吞噬能力下降及免疫球蛋白合成減少，也會造成腸黏膜屏障受損，進而造成腸道細菌發生移位，導致菌血症與內毒素血症，並進一步加重肝損傷。

(六)、細胞激素與發炎反應

脂肪分佈異常，尤其是內臟脂肪的增加，會釋出免疫細胞調節肝臟的脂肪。當攝取過多的能量時，脂肪細胞會產生細胞肥大 (hypertrophy)和細胞增殖 (hyperplasia)等現象。過多脂肪的累積使脂肪細胞變大且數目變多，誘導脂肪細胞分泌發炎的細胞激素，使脂肪細胞、肌肉細胞及肝臟產生慢性發炎反應，同時抑制胰島素訊息傳遞路徑中的生化反應，進而使胰島素無法活化該路徑以降低血糖。因此，當脂肪組織擴張增加時，會形成巨噬細胞的浸潤與發炎細胞激素釋放過多，因而造成胰島素敏感性下降等代謝症候的現象發生。研究發現，在肥胖症的病人其脂肪組織會分泌及釋出大量的促發炎細胞激素 (pro-inflammatory

cytokines)，例如 TNF- α 及 IL-6 (Interleukin-6)與一些趨化素等(Fabiola, *et al.*, 2010)，其中 IL-6 會抑制脂聯素的分泌，因此脂肪細胞激素分泌的失衡，被認為是肥胖症與脂肪肝的一種相關聯結之表現 (Xirouchakis *et al.*, 2009; Kern *et al.*, 2001)。

1. 促發炎細胞激素(Pro-inflammation cytokines)

在正常況下，肝臟中脂肪的合成與代謝會維持一定的平衡，然而當肥胖、糖尿病等代謝異常的情況發生時，將會影響肝臟脂質的代謝，進而提高脂肪酸的合成，同時造成脂肪酸 β -oxidation 受阻 (Saito *et al.*, 2007)，導致大量脂肪酸以三酸甘油酯的形式堆積於肝臟中。此外，大量的脂肪酸也會誘發 cytochrome P450 family 的表現，特別是 CYP2E1 (cytochrome P450 2E1)，此與過氧化氫酶 (hydrogen peroxidase)的活化與活性氧的生成有密切關係。而這些過氧化物會破壞細胞膜上的多元不飽和脂肪酸，並形成脂質過氧化，產生大量的丙二醛 (malodialdehyde, MDA)與 4-hydroxynoneal 等醛類產物 (Robertson *et al.*, 2001)，進而活化肝臟星狀細胞，此時，星狀細胞可藉由活化 NF- κ B，促進發炎反應發生 (Letteron, *et al.*, 1996; James and Dat, 1998; Browning and Horton, 2004)。而在發炎過程中，細胞激素 (cytokines)扮演著傳遞訊息的角色，其主要功能與發炎細胞的增生、生長抑制以及細胞凋亡 (apoptosis)與化學趨性等有關。當肝細胞受損時，會刺激趨化因子生成及活化庫氏細胞分泌細胞激素，造成細胞死亡與促使肝臟發炎，而肥胖造成肝臟損傷的主要原因，則是來自脂肪細胞的病變，產生如單核細胞趨化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1), IL-1、IL-6、TNF- α 等與發炎有關的蛋白質(Maher *et al.*, 2008)。

(1) IL-1 β

IL-1 由許多不同的細胞，包含單核白血球與巨噬細胞所分泌，為一個多肽的細胞激素，有兩種不同的形式，分別是表現在細胞膜上的 IL-1 alpha (IL-1 α)及分泌性的 IL-1 beta (IL-1 β)，此兩種形式具相同功能，但卻是不同蛋白質之產

物 (Bessler, *et al.*, 1999)。主要功能包括誘導 C-反應蛋白 (C-reactive protein, CRP) 的生合成、刺激 T 細胞與 B 細胞之活化，以及誘導 Th1 細胞 (T-helper 1 cell) 分化。

(2) IL-6

IL-6 為促發炎細胞激素之一，與肥胖所引起的胰島素阻抗有關。臨床研究發現，肥胖患者血中 IL-6 基因表現(mRNA)與 IL-6 濃度與肥胖、葡萄糖耐受異常及胰島素阻抗有正相關。IL-6 基因表現與血中濃度隨體重減輕而降低。此外，IL-6 血中濃度能預測第二型糖尿病的發生。在脂肪組織內，IL-6 表現在脂肪細胞和脂肪組織基質，不同於 TNF- α ，IL-6 在血中有高濃度，約有 1/3 來自身體脂肪組織。因此，推測 IL-6 的分泌增加可能是造成代謝功能障礙原因之一 (Esposito *et al.*, 2003; Fried *et al.*, 1998; Pradhan *et al.*, 2001; Ziccardi *et al.*, 2002)。

(3) TNF- α

TNF- α 是一種促發炎細胞激素，主要是由單核細胞與巨噬細胞所分泌，並與體免疫病有關聯。在脂肪組織內，TNF- α 由脂肪細胞和基質血管細胞製造。TNF- α 被認為與肥胖和胰島素阻抗的病理機轉有關。在肝臟，TNF- α 抑制葡萄糖吸收、代謝、脂肪酸氧化作用和增加膽固醇與脂肪酸的合成。近年來動物研究發現，肥胖與第二型糖尿病與 TNF- α 有關。由於 TNF- α 衰減胰島素刺激肌肉與脂肪組織中的胰島素受體與 IRS-1 (insulin receptor substrate-1) 的酪胺酸磷酸化，進而造成胰島素阻抗性現象。因此，在肥胖動物研究發現，透過調節 TNF- α 的訊號，將可改善影響肌肉與脂肪組織的胰島素敏感性的訊息傳遞 (Hotamisligil *et al.*, 1993; Uysal *et al.*, 1997)。

(4) MCP-1

MCP-1 是屬於 β (C-C) chemokine 家族的成員，許多細胞遭受內毒素

(lipopolysaccharide)或 TNF- α 、IL-1 等的刺激時會分泌 MCP-1，MCP-1 的作用是活化及趨化單核球、巨噬細胞和 T 淋巴球 (Taub, *et al.*, 1995)，造成巨噬細胞對組織的浸潤而產生發炎反應(Leonard, *et al.*, 1990)。研究發現，在肥胖基因小鼠 (ob/ob)與高脂飼料餵飼的肥胖小鼠，其 MCP-1 在其白色脂肪組織上有高表現量，並且引起巨噬細胞浸潤在脂肪組織中而產生炎症反應，以及促使葡萄糖耐受性與胰島素阻抗性現象發生(Kanda, *et al.*, 2006; Sartipy *et al.*, 2003)。

此外，LPS 為一種存在於格蘭氏陰性細菌細胞壁的內毒素 (endotoxin)，其本身亦是一種致病介質，當人體受到細菌入侵、感染後，單核細胞或巨噬細胞會透過細胞表面類鐸受體 Toll-like receptor (TLR) 家族中的 TLR-4 受體結合，活化庫氏細胞產生如 TNF- α 、IL-6 與 IL-1 等促發炎細胞激素的產生，並進一步參與 NASH 一系列的發炎與免疫反應 (Wigg, *et al.*, 2001)，參與雙衝擊理論中的第二衝擊的發展。

2. 上皮細胞關聯細胞激素(epithelial relative cytokines)

(1) IL-33

IL-33 為屬於 IL-1 家族的細胞激素，參與 Th2 細胞 (T-helper 2 cell)的免疫反應。此外，研究指出 IL-33 在與 receptor ST2 結合後，其下游的細胞訊息可以負向調控 TLR 的訊息傳遞 (Espinassous, *et al.*, 2009)

(2) TSLP

TSLP 為動物體內 Th2 細胞 (T-helper 2 cell)發炎反應的前驅物質，可活化樹突細胞，刺激 T 細胞。TSLP 藉由所誘發的 Th2 發炎反應，進而分泌 TNF- α 與 IL-6 等促發炎細胞激素。

3. 脂聯素 (adiponectin)

由脂肪組織所分泌出來的一種在人體內含量很豐富的蛋白質。在脂肪細胞

分化的過程中，adiponectin 的訊息核糖核酸(messenger RNA, mRNA)的含量，會被誘導合成約 100 倍以上。adiponectin 分子量大約是 30 kDa 左右，在成年人類的血漿濃度約為 2-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Berg *et al.*, 2002)。雖然它是由脂肪組織所分泌，直覺上會以為脂肪組織愈多的人，體內濃度應該愈高，但事實上卻剛好相反。在肥胖的健康人體內的 adiponectin 濃度，遠比非肥胖者為低 (Arita *et al.*, 1999)。國內外研究發現，adiponectin 與代謝症候群參數，包括空腹血糖葡萄糖濃度 (pre-prandial plasma glucose)、血清胰島素、三酸甘油脂等，有密切的關聯 (Arita *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2002; Hotta *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2003; Matsuawa *et al.*, 2003)。研究指出，將合成的重組 adiponectin 蛋白 (recombinant adiponectin) 打入老鼠體內，不僅可以增加胰島素的敏感度，進一步改善胰島素所引起的血漿葡萄糖與脂肪酸濃度降低 (Fruebis *et al.*, 2001)。更進一步地改善實驗動物的脂肪肝嚴重程度 (Xu *et al.*, 2003)。

(七)、肝功能之指標

肝臟是人體含酶最豐富的臟器，酶蛋白含量約占肝臟總蛋白含量的 2/3，其中最多的就是天門冬胺酸轉胺酶 (aspartate aminotransferase, AST) 與丙胺酸轉胺酶 (alanine aminotransferase, ALT)。因此，當肝臟受損時，分佈在胞漿的酶，例如 ALT、AST 會釋出，使得血清中酵素活性增高。

1. 天門冬胺酸轉胺酶 (aspartate aminotransferase, AST)

為胺基酸代謝相關並且大量存於肝臟、心臟、腎臟、肌肉和腦的酵素。此酶在心臟含量最高，其次為肝臟。在肝臟中 AST 大部分存在於肝細胞粒線體中。血清中正常值一般介於 40~50 U/L。由於新陳代謝的關係，在正常狀態下，人體的細胞會不斷製造及破壞。當肝組織細胞受損時，粒線體中的 AST 會被釋放出來，使血清中的 AST 值明顯升高。而 AST 並不具專一性，因此 AST 數值可作為肝損傷的輔助診斷依據 (Sorbi, *et al.*, 1999; Williams, *et al.*, 1988)。

2. 丙胺酸轉胺酶 (alanine aminotransferase, ALT)

同為胺基酸代謝相關且主要存於肝細胞內之酵素。不同於 AST，肝臟中 ALT 絕大數存在於細胞質中，僅少量在粒線體中。血清中正常值一般介於 30~40 U/L。當肝細胞受損時，使 ALT 釋出於血液中，使得血液中 ALT 濃度上升。而 ALT 具專一性，且在肝臟的總活力為血清中的千百倍以上，只要有 1% 的肝細胞受損，就可使血中 ALT 值明顯升高，對肝損傷的反應極為靈敏，因此可作為評斷肝損傷的依據指標 (Sorbi, *et al.*, 1999; Williams, *et al.*, 1988)。

二、乳鐵蛋白(Lactoferrin)之特性

(一) 乳鐵蛋白之簡介

乳鐵蛋白(lactoferrin, LF)為一種醣蛋白(glycoprotein)，因能結合與轉移 Fe^{3+} 離子，為運鐵蛋白(transferrin)的一員(Metz-Boutique *et al.*, 1984)。乳鐵蛋白最早在 1939 年於牛乳中被發現 (Sorensen and Sorensen, 1939)。接著在 1960 年乳鐵蛋白由乳中被分離純化出來 (Groves, 1960., Johansson, 1960)，同時發現此蛋白質與鐵的結合特性有關，又因其結構及化學特性與血清運鐵蛋白 (serum transferrin) 有 60%相似，故將其命名為乳鐵蛋白 (Blanc and Isliker, 1961)。

(二) 乳鐵蛋白之來源與分布

乳鐵蛋白普遍存在各種外分泌腺的分泌物中，特別是在哺乳動物的初乳及牛乳中其含量最多(附表 1)，是一種分泌性的醣蛋白，屬於運鐵蛋白家族(transferrin family)成員(Conneely, 2001)。此外，研究發現在一些炎症反應中，乳鐵蛋白會藉由嗜中性白血球進行脫顆粒後被釋放進入血液，(Iyer and Lonnerdal, 1993)。而除乳汁外，如唾液、膽汁、胰液、胃液、淚液、支氣管分泌液等中均可發現乳鐵蛋白的存在 (附表 2) (Levay and Viljoen, 1995)。

附表 1. 不同動物乳汁中乳鐵蛋白之含量

	Amounts reported
Colostrals breast milk	> 7 mg/mL
Mature breast milk	> 1-2 mg/mL
Cow's colostrals milk	> 2-5 mg/mL
Cow's milk	> 20-200 μ g/mL
Swine's colostrals milk	>100-200 μ g/mL
Swine's milk	>30 μ g/mL

(Steijns and Hooijdonk, 2000)

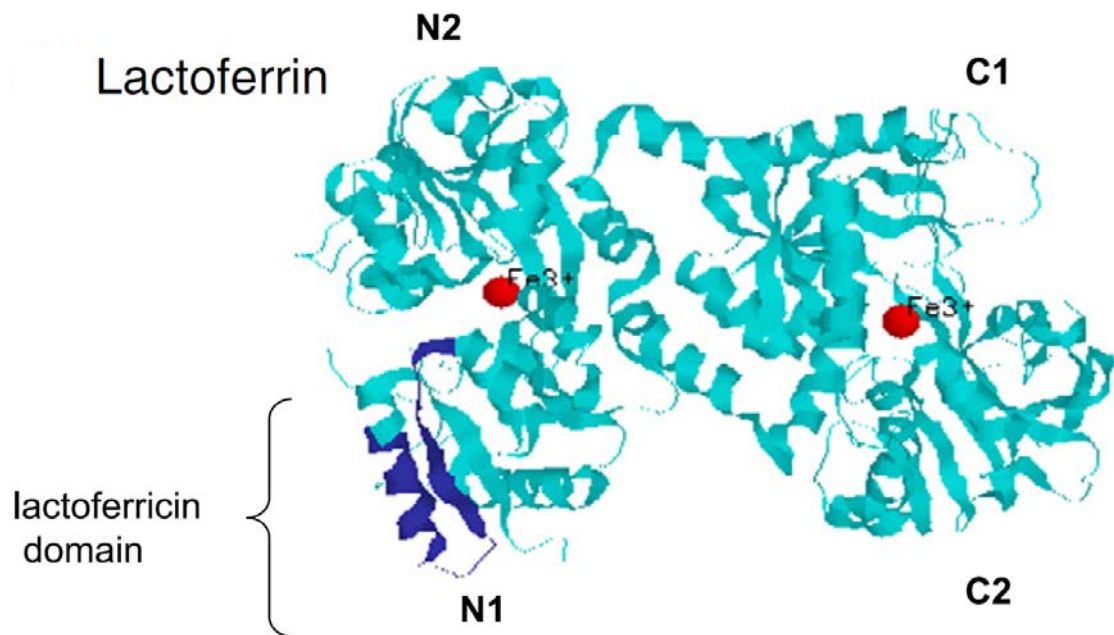
附表 2. 乳鐵蛋白在人體內含量

Biological fluids	Amounts reported
Tear fluids	> 2.2 mg/mL
Seminal fluid	> 0.4-1.9 mg/mL
Synovial fluid	> 10-80 µg/mL
Saliva	> 7-10 µg/mL

(Levay and Viljoen, 1995)

(三) 乳鐵蛋白之結構與特性

人乳或牛乳中乳鐵蛋白分子量為 76~80 kD，約由 700 個胺基酸殘基所組成的單鏈醣蛋白。乳鐵蛋白結構主要分為 C 小葉 (C-lobe)及 N 小葉 (N-lobe)兩大部分(附圖三)，每小葉再各自分成 C1、C2 與 N1、N2 次小葉。C 小葉與 N 小葉可各自結合一個鐵離子，而結合的鐵離子位置則位於兩個次小葉之間 (Drago-Serrano *et al.*, 2012)。乳鐵蛋白與鐵離子的結合可分為三種結構：未結合鐵離子(iron-free，又稱 apo-lactoferrin)，結合一個鐵離子 (one ferric ion，又稱 monoferric form)及完全結合鐵離子 (diferric form，又稱 holo-form) (Jameson *et al.*, 1998)。而乳鐵蛋白除了能與鐵離子結合外還可結合其他大量化合物質，例如肝素，內毒素及 DNA 等，以及 Al^{3+} , Ga^{3+} , Mn^{3+} , Co^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} 等其他金屬離子結合，而其中以鐵離子的結合能力為最強 (Harrington, 1992)，乳鐵蛋白除了與 CO_3^{2-} 結合外，亦與其他陰離子，如草酸鹽、碳水化合物等結合，進而影響乳鐵蛋白在不同個體的代謝與分布 (Baker, 1994)。此外，乳鐵蛋白與運鐵蛋白結構上雖相當相似，但在發生感染的酸性環境下，乳鐵蛋白與鐵離子的親和力遠高於運鐵蛋白 (Naidu and Arnold, 1997)。當環境 pH 值小於 4，時，乳鐵蛋白仍與鐵離子結合，然而當 pH 值小於 6 時，運鐵蛋白便會釋放所結合的離子 (Mazurier and Spik, 1980；Peterson *et al.*, 2000)。



附圖三、乳鐵蛋白之結構 (Drago-Serrano *et al.*, 2012)

(四)乳鐵蛋白受體 (Lactoferrin receptor, LfR)

乳鐵蛋白的多種生物功能依賴其作用的標的細胞和細胞表面存在的乳鐵蛋白受體含量，而這些受體在不同類型的細胞，如黏膜上皮細胞、肝細胞、單核細胞、巨噬細胞、淋巴細胞、血小板、纖維母細胞以及在一些細菌上例如 *Staphylococcus aureus* 或 *Pseudomonas hydrophila* 都可被發現(Levay and Viljoen, 1995; Suzuki and Lonnerdal, 2004; Suzuki *et al.*, 2005)。1979年Cox等研究發現人類腸道細胞中存在LfR (Cox, *et al.*, 1979)，他們將成人小腸組織切片與人乳鐵蛋白 (human lactoferrin, hLf)、血清轉鐵蛋白 (transferrin, Tf)和雞卵轉鐵蛋白 (OVO-Tf)一起培養，發現僅有hLf可將鐵離子轉移至十二指腸黏膜細胞中，而血清Tf、OVO-Tf則無此功能。而目前研究已發現人及許多動物的小腸黏膜上皆有與Lf結合的受體 (small intestinal lactoferrin receptor, SI-LfR)。

(五) 乳鐵蛋白之代謝

乳鐵蛋白具有兩種代謝之路徑：一是通過吞噬細胞（巨噬細胞、單核細胞與其它網狀內皮系統的細胞），也就是經由受體調節的胞飲作用而將其排出體外，例如受到巨噬細胞吞噬或是單核球的分解，抑或是其他類似的內皮網狀細胞的吞噬後而被代謝排除。另一種代謝路徑則是直接由肝臟的 Kupffer cell 或是肝細胞直接吸收而將其排出體外 (Hutchens, *et al.*, 1991)

(六) 乳鐵蛋白之功能(附圖四)

1. 促進鐵的吸收

乳鐵蛋白可提高腸絨毛細胞對鐵的生物利用性，當乳鐵蛋白通過腸道時，即和腸表面的乳鐵蛋白受體結合，接著乳鐵蛋白進入細胞內，釋出 Fe^{3+} 。細胞對鐵的吸收有負調節機制，當細胞缺鐵時細胞表面的 LfR 增多，增加 Lf 與其受體的結合，相反，如果細胞內鐵的含量較多時，腸絨毛細胞表面的 LfR 則減少，從而降低了對腸道中鐵的攝取。(Talukder *et al.*, 2003)

2. 乳鐵蛋白的抗菌功能

乳鐵蛋白能與游離鐵離子結合，使一些依賴鐵生長的細菌，如 *E. coli* 無法生長，因而被認為具有抗菌之效 (Brock, 2002)。然而相反的，乳鐵蛋白可以作為鐵的供體，來提供某些有益菌生長，例如乳酸桿菌及雙歧桿菌 (Petschow *et al.*, 1999; Sherman *et al.*, 2004)。在炎症或於感染期間，吞噬細胞因受刺激而開始合成並釋放細胞激素，隨細胞激素的釋放後，免疫球蛋白或巨噬細胞隨即被活化並釋放出 IL-1 或是 TNF- α ，因此在相當短的時間內即會發生發炎反應，此外也對導致細胞激素濃度再度增加，使得血液中的嗜中性白血球增加，並開始大量侵入受傷的組織，因此動物體中的負回饋機制便會釋放出大量的乳鐵蛋白使嗜中性白血球開始被裂解。另有研 LPS 是刺激發炎的一重要因子，由於乳鐵蛋白會破壞格蘭氏陰性菌外膜，導致細胞外膜 LPS 的釋放，使得原本該由 LPS 結合蛋白

(lipopolysaccharide-binding protein, LBP) 將 LPS 帶至巨嗜細胞或是單核球細胞細胞膜上的 CD14 分子，又因乳鐵蛋白具有與 LPS 結合蛋白的結合蛋白抗原區，從而降低 LPS 所引起的發炎反應 (Valenti and Antonini, 2005)。此外，研究發現牛乳鐵蛋白經胰蛋白酶水解後所得到的活性多肽，稱作乳鐵蛋白素 (lactoferricin)，其抗菌活性比未水解的乳鐵蛋白更高。目前已知具抗菌活性肽之乳鐵蛋白素有兩種形式：乳鐵蛋白素 H (lactoferricin H, 來自人乳鐵蛋白) 及乳鐵蛋白素 B (lactoferricin B, 來自牛乳鐵蛋白)。(Bellamy *et al.*, 1992)。

3. 乳鐵蛋白的抗病毒作用

乳鐵蛋白在宿主體內對抵抗病毒感染有很大的作用，研究證實乳鐵蛋白對 DNA 及 RNA 病毒具抗病毒之活性(Yi *et al.*, 1997)，乳鐵蛋白的抗病毒機制可能是透過與病毒或宿主細胞結合到細胞膜葡萄糖胺多體 (glycosaminoglycans)，從而阻斷病毒和宿主細胞的結合，而這樣的機制已被證明對單純皰疹病毒 (Herpes simplex virus)、細胞巨化病毒 (Cytomegaloviruses) 及人類免疫缺陷病毒 (Human immunodeficiency virus) 是有效的 (Andersen *et al.*, 2001)。

4. 乳鐵蛋白在免疫反應中的調節作用

乳鐵蛋白會與細胞表面酸性分子結合，因此可以調節巨噬細胞活性和刺激淋巴細胞的蛋白質合成與分泌之功能，以避免其受到自由基的傷害並增加自然殺手細胞 (natural killer cells, NK -cells) 之活性(Brock, 1995)。而在白血球中屬嗜中性白血球含乳鐵蛋白為最多的細胞，有研究報告顯示，當受到感染時，嗜中性白血球會藉由釋出乳鐵蛋白與游離的鐵離子結合，抑制由 Haber-Wesis 反應所產生的氫氧自由基 (hydroxyl free radical)，因而具有抑制發炎的功能 (Naidu, 2000)。此外，乳鐵蛋白還具有促進嗜中性白血球細胞對受傷部位的吸附和聚集、增加細胞黏性並調節免疫球蛋白分泌等。另外，研究顯示乳鐵蛋白對抗體生成及 T 細胞

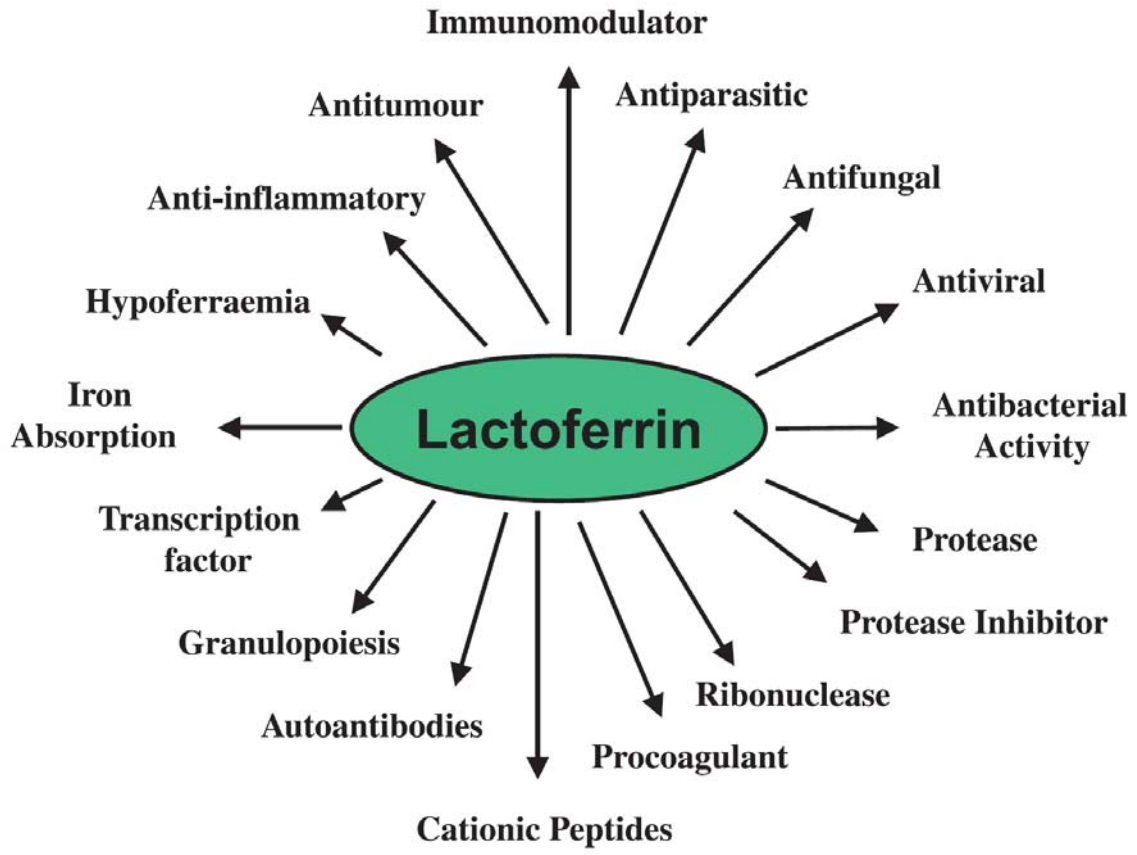
成熟與淋巴細胞中不同類型細胞的比例皆具有調節作用。

5. 乳鐵蛋白與腫瘤生長

在許多體外 (*in vitro*) 與體內 (*in vivo*) 研究證實乳鐵蛋白對腫瘤細胞之發生有抑制及減少轉移之效 (Bezault *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2000; Wolf *et al.*, 2003)。研究發現，以小鼠實施皮下注射纖維原腫瘤細胞株進行誘導固態瘤生長之試驗，發現藉由腹膜下單獨注射乳鐵蛋白可達到抑制腫瘤生長之效果 (Bezault, *et al.*, 1994)。此外，另有研究指出牛的乳鐵蛋白抑菌片段可誘導人類單核白血病細胞 (THR-1 細胞) 進行細胞凋亡 (apoptosis)，推測可能與細胞內產生反應氧 (reactive oxygen species) 及活化鈣/鎂依賴性內切酵素有關 (Yoo, *et al.*, 1997)

6. 乳鐵蛋白與骨骼

研究證實，乳鐵蛋白是影響成骨細胞之活化因子。乳鐵蛋白可刺激成骨細胞的增殖、提高胸腺嘧啶核苷進入成骨細胞、並降低 50-70% 成骨細胞的凋亡。相同的功能同樣也在軟骨細胞中發現 (Cornish *et al.*, 2004)。此外，乳鐵蛋白影響骨細胞之因素可能是透過蝕骨細胞激素，如 TNF- α 和 IL-1 β ，在炎症反應時乳鐵蛋白表現量上升。因此，乳鐵蛋白可促進骨組織的重塑 (Cornish *et al.*, 2004)。



附圖四、乳鐵蛋白之生理功能 (Brock, 2002)

肆、研究目地與動機

近年來果糖攝取量的增加與肥胖、高血脂、糖尿病及脂肪肝等代謝綜合症的現象有關。而慢性發炎則被認為是脂肪肝發展的重要病程 (Xirouchakis, *et al.*, 2009)。由於乳鐵蛋白可降低大鼠血液中的三酸甘油脂的含量以及具抗發炎之效 (Guillen, *et al.*, 2000; Morishita *et al.*, 2013)。因此，在此篇研究，我們將探討乳鐵蛋白在高果糖飲食的動物模式中，如何以乳鐵蛋白具抗發炎與調節三酸甘油脂之代謝，透過改善肝臟雙衝擊機制，進而改善非酒精性脂肪肝的形成。

伍、材料與方法

一、藥品材料

(一)、藥品、試劑

藥品名稱	廠牌
Lactoferrin (>94%)	New Bellus Enterprise Co.,LTD., Tainan, Taiwan
Anti-TSLP antibody	LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA, USA
Anti-4-HNE antibody	LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA, USA
Anti-TLR-4 antibody	LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA, USA
Oil-Red-O	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Fonen fructose corn syrup	Fonen and FonHer Ent. Co.,LTD., Tainan, Taiwan
ALT (ALAT/GPT) 11876805	F. Hoffmann-La Roche LTD., Basel, Switzerland
Cholesterol	F. Hoffmann-La Roche LTD., Basel, Switzerland
Triglycerides	F. Hoffmann-La Roche LTD., Basel, Switzerland
Total protein kit	F. Hoffmann-La Roche LTD., Basel, Switzerland
Hydrogen peroxide, H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
10% formalin	Hold Trade Co. LTD., New-Taipei, Taiwan
Xylene	Union Chenical Works LTD., Hsin-Chu, Taiwan
Ethanol (99%)	Merck & Co., Inc., Darmstadt, Germany

ELISA Kit TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-33, MCP-1, TSLP, IL-4, IL-13	eBiosciences Inc., San Diego, CA, USA
ELISA Kit adiponectin	R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA
IHC kit	LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA, USA
Chloroform	Amresco LLC., Solon, OH, USA
Ethyl ether	Union Chemical Works LTD., Hsin-Chu, Taiwan
Isopropanol	Merck & Co., Inc., Darmstadt, Germany
Endotoxin kit	GenScript USA Inc., Piscataway, NJ, USA
Insulin kit	Mercodia Inc., Uppsala, Sweden
Coliform-Agar	Merck & Co., Inc., Darmstadt, Germany

(二)、設備、器材

設備、器材、耗材	廠牌、代理商
1.5 ml eppendorf	Axygen, Union City, CA, USA
ELISA reader (Multiskan specerum)	Thermo Labsystem, Waltham, MA, USA 岑祥股份有限公司, 台北市, 台灣
1 ml、5 ml 針筒	Top Surgical Taiwan Co. LTD., Kaohsiung, Taiwan
小鼠餵食管	捷陞科技股份有限公司, 台中市, 台灣
手術器械	捷陞科技股份有限公司, 台中市, 台灣
顯微鏡/傳輸器	國祥貿易股份有限公司, 台北市, 台灣

Nikon TS-100/DS-U2

顯微鏡

Nicon E-200/D70

國祥貿易股份有限公司, 台北市, 台灣

桌上型離心機

HERMLE、HSIANGTAI

保富生物科技股份有限公司, 台中市, 台灣

落地式離心機

KUBOTA 6200

雙鷹企業有限公司, 新北市, 台灣

血清生化全自動分析儀

CoBAS MIRA PLUS

F. Hoffmann-La Roche LTD., Basel, Switzerland

二、實驗方法

(一)、動物飼養與試驗分組

本研究之實驗動物為五週齡公鼠，採無特定病源之雄性 C57BL/6 (B6) 品系的小鼠，購自財團法人國家實驗動物中心 (National Laboratory Animal Center, NLAC, Taipei, Taiwan)，待適應三週後為八週齡公鼠即開始進行實驗，體重為 22-25 克，依體重隨機分組，致組間平均體重無顯著差異。第一次試驗，將小鼠分為兩組，一組為對照組(Control 組，n=6)；另一組為高果糖漿餵食組(HFS 組，n=10)，主要目的為瞭解試驗動物對高果糖漿餵食過程中是否會造成腸道菌相之改變，試驗將分析糞便中腸菌群(coliform)的變化。第二次試驗依體重隨機分成五組，組間平均體重無顯著差異：1. 空白組 (Naïve 組，n=10)，為不經任何處理之組別；2. 對照組(Control 組，n=10)，為 30%糖水誘導組並餵食管口服給予滅菌蒸餾水 10 ml/kg/day 之組別；3. 及乳鐵蛋白試驗組：包含低劑量 Lf 組 (LFL, n=10)，30%糖水誘導及餵食管口服給予 50 mg/kg/day 之 Lf；4. 中劑量 Lf 組(LFM, n=10)，30%糖水誘導及餵食管口服給予 100 mg/kg/day 之 Lf；5. 高劑量 Lf 組(LFH, n=10)，30%糖水誘導及餵食管口服給予 200 mg/kg/day 之 Lf。飲水與飼料滅菌後任飼，每週紀錄其體重與攝食量及飲水量，給予小鼠光照循環為 12 小時亮、12 小時暗。

(二)、非酒精性脂肪肝造型模式

將實驗動物在投與 30% (v/v) 果糖水溶液或一般飲用水連續飲用八週，誘導非酒精性脂肪肝之發生。在第七週時禁食 16 小時後，開始進行口服葡萄糖耐受性試驗 (oral glucose tolerance test, OGTT) 及其評估胰島素阻抗產生情況，並於第八週進行犧牲採血，將收集所得之血液進行離心，離心後收集血清，測定 ALT、三酸甘油脂及總膽固醇之濃度來評估肝功能之情形。另一方面取出試驗動物肝臟、脾臟秤重後保存於-80°C，以進行後續分析。

(三)、樣本採集

1. 血液與血清分離

試驗動物犧牲時以 isofluene 麻醉，以剪刀剪開小鼠腋下皮膚及下腋動脈或頸動脈，使用 1 ml 針筒收集血液，待血液凝固後，以 $8,000 \times g$ 離心 10 分鐘，將血清保存於 -80°C 冷凍櫃保存，留待日後分析。

2. 肝臟

肝臟病理分析：動物犧牲後，以 0.9% 生理食鹽水由門脈靜脈灌流後將肝臟摘除，再以生理食鹽水清洗，以濾紙拭淨、秤重，剪取最大葉肝臟，置於 10% 福馬林固定處理，經脫水製成蠟塊，薄切為組織切片，以蘇木紫-伊紅進行染色 (Hematoxylin & eosin stain; H&E stain)、Oil-Red-O stain 與免疫組織染色法 (immunohistochemistry stain)，置於光學顯微鏡下觀察。肝臟標本依據 Kleiner 等 (2005) 的方法，評估肝臟組織脂肪空泡的程度。將剩餘肝臟以鋁箔紙包住，以夾鏈袋密封，儲存於 -80°C ，留待日後分析。

附表三、脂肪肝組織病變評分標準 (Kleiner *et al.*, 2005)

Item	Definition	Score	Code
Steatosis	Grade Low- to medium-power evaluation of parenchymal involvement by steatosis		
	<5%	0	—
	5%-33%	1	+
	>33-66%	2	++
>66%	3	+++	

肝臟脂質分析：取小鼠之肝臟組織約 0.1 g，加入 2 ml chloroform/methanol (2:1, v/v) 研磨，室溫下靜置 1 小時，取出上層脂質層，以 $5,000 \times g$ 離心 10 分鐘，進一步抽取上層脂質層，加入 0.2 體積 0.9% 生理食鹽水混合，待液體呈現乳白混合液後，以 $5,000 \times g$ 離心 5 分鐘後，將上層吸掉，用 N_2 將液體吹乾，並置於

乾熱器上 55°C，加入 1 mL *tert*-butyl alcohol / Triton X-100 / methanol (2:1:1, v/v)，收集於樣品中，儲存於 -20°C。

(四)、樣本分析項目

1. 血清中肝功能指數之測定

以血清生化全自動分析儀 (CoBAS MIRA PLUS, Basel, Switzerland)分析，分析原理如下：L-丙胺酸和 α -酮戊二酸在 ALT 作用下，生成丙酮酸與 L-麩胺酸，丙酮酸在乳酸脫氫酶 (lactic dehydrogenase, LDH)作用下生成 L-乳酸，同時 NADH 被氧化為 NAD^+ ，可在吸光值 340 nm 連續監測吸光度下降速度，從而進算出 ALT 活性濃度。

2. 血清總膽固醇濃度之測定

以血清生化全自動分析儀 (CoBAS MIRA PLUS, Basel, Switzerland)分析，分析原理如下：以 cholesterol esterase 將血清中 cholesterol ester 分解成膽固醇和脂肪酸，此膽固醇和原本存在的膽固醇一起受 cholesterol oxidase 作用，產生 H_2O_2 。此 H_2O_2 在 peroxidase 存在下和 4-aminoantipyrin 及 DAOS (3,5-dimethoxy-N-ether-N-(2-hydroxy-3-sulfo-propyl)-aniline) 作用，氧化縮合產生青紫色色素，測其吸光值 500nm 變化換算成膽固醇濃度。

3. 血漿三酸甘油酯濃度之測定

以血清生化全自動分析儀 (CoBAS MIRA PLUS, Basel, Switzerland)分析，分析原理如下：採用 free glycerol blanking method，即三酸甘油酯受 lipoprotein lipase 作用，產生 glycerol 後加入 glycerokinase 與 glycerol-3-phosphate oxidase，產生 H_2O_2 。測 H_2O_2 與 peroxidase、4-aminoantipyrin 及 DAOS 作用，氧化縮合產生青紫色色素，測其吸光值 500nm 變化換算成三酸甘油酯濃度。

4. 血漿胰島素濃度之測定

使用市售試劑組(Mouse Insulin Mercodia, Uppsala, Sweden)，利用捕捉 insulin 抗體 (capture antibody) 以被覆液稀釋後，被覆在 ELISA 培養盤上，4°C 培養隔夜後。隔日以清洗液 PBST (0.05% Tween 20 in Dulbecco's phosphate buffer saline, DPBS) 清洗三次，之後再以稀釋溶液培養一小時，再加入樣本及 insulin 標準液，培養二小時後，清洗溶液洗五次，以清除未鍵結樣品，加入偵測胰島素的抗體 (biotin labeled detection antibodies)，在室溫下反應一小時，倒掉後再以清洗溶液洗五次去除未鍵結抗體。在以 avidin-HRP 室溫下反應 30 分鐘，之後再以清洗溶液洗七次去除未鍵結酵素。最後加入受質 TMB，經酵素反應後呈色，以 2 M 硫酸終止反應後。以 450 nm 判讀吸光值，並以檢量線迴歸換算出樣本中的胰島素濃度。

5. 肝臟胰島素濃度之測定

取肝臟組織約 0.1 g，使用均漿液 (3 mL 1.15% KCl、2 mL Tris-EDTA pH 8.9、1.5 mL acetic acid) 將肝組織均質後，離心 10 分鐘，4500 ×g, 4°C，取上清液，利用上述方法檢測。

6. 肝臟內毒素濃度之測定

取肝臟組織約 0.1 g，使用均漿液 (3 mL 1.15% KCl、2 mL Tris-EDTA pH 8.9、1.5 mL acetic acid) 將肝組織均質後，離心 10 分鐘，4500 ×g, 4°C，取其上清液，使用市售試劑組以 LAL (Limulus amoebocyte lysate) 內毒素檢測方法中的呈色法，即以 LAL-endotoxin 反映為基礎，但在反應的最後加入無色的人工多肽基質，當此受質 p-nitroaniline (pNA) 被酵素裂解時呈現黃色。在 405 nm 波長下測定吸光值，與標準溶液之吸光值對照，而得內毒素濃度。

7. 肝臟脂肪細胞激素濃度之測定

將冷凍的肝臟取出解凍，剪取約 0.1 g 肝臟組織，使用均漿液(3 mL 1.15% KCl、2 mL Tris-EDTA pH 8.9、1.5 mL acetic acid)將肝組織均質後，離心 10 分鐘， $4500 \times g$, $4^{\circ}C$ ，取其上清液，取出上清液，儲存於 $-80^{\circ}C$ 下待分析。使用市售 ELISA 試劑組(TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-13, IL-33, MCP-1, TSLP 與 adiponectin)，利用捕捉 TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-13, IL-33, MCP-1, TSLP 與 adiponectin 抗體 (capture antibody)以被覆液稀釋後，被覆在 ELISA 培養盤上， $4^{\circ}C$ 隔夜後。隔日以清洗液 PBST (0.05% Tween 20 in Dulbecco's phosphate buffer saline, DPBS)清洗三次，之後再以稀釋溶液培養一小時，再加入樣本及 TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-13, IL-33, MCP-1, TSLP 與 adiponectin 標準液，培養二小時，清洗溶液洗五次，加入偵測 TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-13, IL-33, MCP-1, TSLP 與 adiponectin 的抗體 (biotin conjugated detection antibodies)，在室溫下作用一小時，倒掉後再以清洗溶液洗五次去除未鍵結抗體。在以 avidin-HRP 室溫下反應 30 分鐘，以結合 biotin，之後再以清洗溶液洗七次去除未鍵結 avidin-HRP。最後以 TMB 為受質，經 avidin-HRP 酵素反應後呈色，以 2 M 硫酸終止反應。酵素反應呈色吸光值以 450 nm 判讀，並以檢量線迴歸換算出樣本中的 TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-13, IL-33, MCP-1, TSLP 與 adiponectin 濃度。

8. 口服葡萄糖耐受性試驗

在誘導第七週後，進食 16 小時，給予小鼠口服葡萄糖 (2.0 g/kg)進行試驗，並在給糖前與之後的第 0, 30, 60, 90 及 120 分鐘由小鼠尾靜脈採取約 0.5 μL 的血液，以取得空腹與耐糖試驗中各採血點的血糖，以市售血糖機 (I-SENS, Inc, Korea)，利用血液中葡萄糖受試紙上的葡萄糖氧化酶氧化後產生過氧化氫，使試紙中的過氧化酶將其分解為水和新生氧，而新生氧再使得附著在試紙上的染料氧化後變色。最後再以光線感應的方式，辨識變色物質的量，計算出數據而得到空腹與耐糖試驗中各採血點的血糖值。

9. HOMA-IR

根據 1985 年 Matthews 等人提出以 HOMA-IR (Homeostasis model assessment for insulin resistance) 評估胰島素阻抗的方法，以空腹胰島素值($\mu\text{U}/\text{mL}$)乘以空腹血糖值(mg/dL)，再除以 22.5 (mmol/L) (Matthews *et al.*, 1985)。HOMA-IR 值越高，代表胰島素阻抗程度也越高。HOMA-IR 法應用在糖尿病或非糖尿病族群皆呈現與胰島素阻抗正相關 (Bonora, *et al.*, 2000; Katsuki, *et al.*, 2003; Meigs, *et al.*, 2003)。

10. Oil-Red-O 染色

首先配置 Oil-Red-O 染劑染色，取 Oil-Red-O (Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA) 0.015 g，加入 50 ml 的 isopropanol 充分溶解隔夜，並使用濾紙過濾三次，配置成 stock solution，之後再加入 isopropanol 配置成 working solution (stock Oil-Red-O : isopropanol 為 3 : 2)，過濾多次後以清除 working solution 內未溶解的 Oil-Red-O 顆粒。將肝組織冷凍切片自 -80°C 取出後，靜置於室溫 20 分鐘使切片回溫，放入 50% isopropanol 潤洗兩次，用以洗去樣本組織外的 O.C.T. 冷凍胞埋液後，再先以拭鏡紙把組織旁及 O.C.T. 冷凍胞埋液擦乾，接著滴上 0.18% Oil-Red-O working solution，染 30 分鐘後，放入 50% isopropanol 潤洗兩次，直到多餘的 Oil-Red-O working solution 被移除，最後使用 60% glycerol 封片，於顯微鏡下觀察。量化的方式是以光學顯微鏡照相後，利用 ImagePro plus 影像分析軟體計算肝組織脂肪油滴堆積分布的情況。

11. 免疫組織化學染色 (immunohistochemistry stain)

肝組織石蠟包埋切片後，利用二甲苯與酒精將組織進行脫蠟與復水，透過 Max Polymer Detection System kit 進行染色，將脫蠟後的玻片置於緩衝液 ($\text{pH}=6.0$, 10mM Citrate buffer) 中，在滅菌釜中隔水加熱至 121°C ，3 分鐘後斷熱自然降溫，玻片持續放置 15 分鐘後，取出玻片於室溫下冷卻，以復性蛋白質結構，滴上

peroxidase blocking solution，放置 5 分鐘去除過氧化物干擾，使用 wash buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4、0.05% Tween 20, 1×TTBS)洗淨三次，滴上一級抗體 (anti-TSLP、anti-4-HNE、anti-TLR-4)，反應 30 分鐘，使用 wash buffer 洗淨三次，滴上二級抗體 (anti-IgG)反應 10 分鐘，使用 wash buffer 洗淨三次後滴上蘇木紫染劑染色 10 分鐘，最後以 3,3-diaminobenzidine (DAB)呈色，使免疫反應部分呈現咖啡色，以蘇木紫為背景色以便觀察。在 10×40 倍的光學顯微鏡視野下照相紀錄。

12. 蘇木紫與伊紅染色 (hematoxylin & eosin stain, H&E stain)

小鼠犧牲後取肝臟最大葉之 1/3，浸泡於 10%福馬林液中固定一週後將其分組編號，並委託中興大學獸醫學病理所廖俊旺教授協助，將組織石蠟包埋切片，並黏附在已塗佈 poly-L-lysine 的載玻片上，經過二甲苯與酒精將組織進行脫蠟與復水步驟即可以蘇木紫與伊紅染劑進行染色。玻片樣本使用光學顯微鏡觀察肝細胞脂肪變性與發炎細胞浸潤程度 (Hsieh, *et al.*, 2009)。

13. *E.coli* 培養基

秤取 10.6 g Chromocult Coliform Agar 以去離子水定量到 400 mL，煮沸後降至 50°C 以下，於無菌操作台倒入培養皿分盤。Chromocult coliform agar 培養基中含有兩種特殊的酵素基質，其中一種基質 (salmon-gal) 會與大腸菌類特有的半乳糖苷酶 (galactosidase) 酵素反應使菌落生成紅色；另一種特殊基質 (x-gluc) 則會與大腸菌類生成的葡萄糖苷酶 (glucuronidase) 酵素反應形成深藍色 (或紫色) 的菌落；至於其它腸內菌則因沒有這些特殊的酵素，於此培養基中呈現白或無色菌落。培養基之生長菌落顏色情形：沙門氏菌，紅色；大腸桿菌，紫色；大腸桿菌群，粉紅色；腸內菌，粉紅色；金黃色葡萄球菌，黑色；總生菌數，計算其菌落數。

三、統計分析

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

第一次試驗中，糞便大腸桿菌之試驗數據則採 GLM (general linear model) 分析評估其統計差異，並以鄧肯多變域檢定 (Duncan's multiple-range test) 進行事後檢定，*, **, † 顯示組間具顯著性差異 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。第二次試驗中，試驗數據以 One-Way ANOVA 方法分析後，並以鄧肯多變域檢定 (Duncan's multiple-range test) 進行事後檢定，組間比較以不同小寫上標字母顯著差異顯著性 ($P < 0.05$) (Duncan, 1955)。

(二)、無母數分析 (Non-parametric statistics)

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

陸、 結果

一、乳鐵蛋白對非酒精性脂肪肝的調節作用

(一)、小鼠之體重、脾臟與肝臟重量

如表一中顯示，在八週的實驗期間各組小鼠的體重變化，經 30% (v/v) 高果糖飲水誘導非酒精性脂肪肝造型後對照組之體重與正常組小鼠相比有顯著差異 ($P < 0.05$)，而與實驗組 (50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg) 也有顯著差異。另外，在各組小鼠的肝臟與脾臟重量變化上，對照組小鼠的肝臟與脾臟重量皆顯著的高於正常組，和與乳鐵蛋白組相比，對照組的肝臟重量也顯著的高於三種劑量組 ($P < 0.05$)。在對照組中，於第八週將小鼠犧牲後，稱得小鼠的肝臟重與體重之比值，顯著的高於正常組 ($P < 0.05$)，證實長期攝取含 30% 果糖飲水會對小鼠肝臟造成腫大的現象，代表存在嚴重的發炎的情況。然而在同一樣 30% 果糖飲水處理下，分別給予乳鐵蛋白 (50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg) 處理後，發現對照組與中、高劑量組並達到顯著差異，表示無顯著性腫脹。

(二)、糞便大腸桿菌群的含量

圖一則是比較經 30% (v/v) 高果糖飲水誘導非酒精性脂肪肝造型後對照組與正常組小鼠，其糞便中大腸桿菌群菌落的差異。結果顯示，在 30% 果糖飲水下的鼠腸道中大腸桿菌群的含量明顯高於正常組，且菌落顏色皆為紫色，及為大腸桿菌群。

(三)、肝臟、血液之內毒素含量

內毒素在肝臟與血液中的含量如圖二與圖三所示，經 30% (v/v) 高果糖飲水誘導非酒精性脂肪肝造型後對照組之小鼠肝臟中內毒素的表現量與正常組相比有顯著性差異 ($P < 0.05$)，而在餵飼小鼠乳鐵蛋白 (50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg) 後發現小鼠肝臟內毒素與對照組相比也達到顯著差異。

(四)、血清肝功能指標測定

肝臟肝功能指標為判斷肝損傷的首要標的。於 30% (v/v) 高果糖飲水誘導非酒精性脂肪肝八週後取得血清中的 ALT 作為肝功能初步觀察指標。如圖四所示，對照組小鼠的 ALT 明顯比正常組來的高 ($P < 0.05$)。同時血清中總膽固醇濃度圖五及三酸甘油脂濃度圖六以也顯著高於正常組 ($P < 0.05$)。而在分別給予乳鐵蛋白 (50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg)處理後，發現與對照組相比有顯著的降低 ($P < 0.05$)，表示對照組的肝損傷程度較其餘組別嚴重，且口服投與乳鐵蛋白可降低肝損傷，並減少總膽固醇與三酸甘油脂於肝臟中累積。

(五)、肝臟病理型態圖

圖七為動物犧牲後，將肝臟取出來並拍照觀察肝臟病理型態圖。結果如圖七所示，在 30% (v/v) 高果糖飲水誘導非酒精性脂肪肝下，對照組的小鼠與正常組相比肝臟明顯由於脂肪過多累積，而出現乳黃色的現象。而在給予乳鐵蛋白 (50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg)處理後，肝臟顏色則明顯較為粉紅色。

(六)、肝臟病理切片分析

如圖八與圖九分別放大 100×與 400×所示，肝臟的病理切片分析能顯示肝臟脂肪空泡堆積之嚴重程度。在化學染色上使用蘇木紫與伊紅染色來觀察細胞的型態，並如圖十所示，藉由 Oil-Red-O 染色來觀察肝臟脂肪油滴堆積的情形。

1. 蘇木紫與伊紅染色

H&E 染色可以觀察組織病理情況，以及發炎細胞浸潤的情形。如圖八所示，觀察到在正常組的肝組織，細胞組織排列整齊，且沒有發炎細胞浸潤的情況。在對照組中可以看到很多大型空泡存在，且因空泡關係細胞組織排列混亂，細胞核大部分被擠到細胞周邊，且血管附近有大量發炎細胞浸潤。而在圖九可以看到給予乳鐵蛋白 (50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg)處理後，則空泡與發炎細胞浸

潤的情形則有不同程度的改善。此外，將染色結果之評分數據以無母數分析評估進行統計，如表二所示，評分項目為脂肪肝的程度，「+」字越多表示脂肪肝程度越嚴重。對照組與正常組相比，肝臟有顯著的脂肪空泡累積 ($P < 0.05$)，而在給予乳鐵蛋白 (50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg)處理後，脂肪空泡的程度則有顯著性的改善 ($P < 0.05$)。

2. Oil-Red-O 染色

如圖十所示，在 30% (v/v) 高果糖飲水誘導非酒精性脂肪肝後各組小鼠肝臟以 Oil-Red-O 染色，紅色為脂肪油滴的堆積。在正常組中無明顯油滴堆積現象出現，而在對照組中則觀察到大量的脂肪油滴堆積現象，且脂肪油滴累積於肝組織則是以中央靜脈 (central vein) 為油滴累積中心，而逐漸朝門脈靜脈 (portal vein) 周圍方向擴展。而在給予乳鐵蛋白 (50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg)處理後，可觀察到肝臟組織中油滴堆積的情況明顯減少。將染色結果使用 Image-pro Plus 軟體量化，量化的結果依序為正常組、對照組和乳鐵蛋白 (50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg)分別為 9.41%、62.47%、36.86%、42.54%與 38.23%，結果顯示，所有組別與對照組相比其脂肪油滴堆積情形均有顯著下降的情形 ($P < 0.05$)。

(七)、肝臟之三酸甘油酯含量

三酸甘油酯過高於飲食及代謝有關，而過多的三酸甘油酯則會累積在肝細胞內，造成肝發炎甚至肝衰竭。因此測定肝臟三酸甘油酯含量可用來評估脂質的代謝狀態。如圖十一所示，給予 30% 高果糖飲水誘導八週下，對照組肝臟三酸甘油酯的含量顯著高於正常組 ($P < 0.05$)，乳鐵蛋白處理組(50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg) 之肝臟三酸甘油酯含量顯著低於對照組 ($P < 0.05$)。

(八)、口服葡萄糖耐受性試驗

圖十二與圖十三在進食 16 小時後，給予小鼠口服葡萄糖 2 g/kg/mouse 進行

試驗，並在口服葡萄糖前與後的 0, 30, 60, 90 及 120 分鐘由小鼠尾靜脈採取 0.5 μ L 的血液後，進行葡萄糖耐性測試。可觀察對照組與其他組別在葡萄糖經吸收後，於 30 分鐘有一峰值，接著血糖濃度皆隨時間增加而有下降趨勢 (圖十二)，然而，對照組下降的程度較為平緩，此外，對照組各採血點的血糖值較餵飼小鼠乳鐵蛋白處理組來的高，並達到統計上的差異 ($P < 0.05$)，也就是說對照組所投予的葡萄糖經小腸吸收後，血液中血糖進入細胞能力較差，而有較高血糖值，而具葡萄糖耐性。圖十三為比較血糖之曲下面積 (AUC of OGTT)，此為給予小鼠口服葡萄糖 2 g/kg/mouse 進行耐糖試驗後，個別計算出曲線下的面積。結果如圖十三所示，給予 30% 高果糖飲水誘導八週下，對照組高於正常組，以及乳鐵蛋白處理組(50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg)，並達到統計上的差異 ($P < 0.05$)。

(九)、胰島素敏感性

此為周邊胰島素對周邊葡萄糖代謝反應之敏感度的間接性指標 (HOMA-IR)，為葡萄糖胰島素指標，葡萄糖胰島素指標越高，表示胰島素敏感度越差。圖十四結果顯示，給予 30% 高果糖飲水誘導下，的確可以誘導出胰島素敏感度下降，胰島素分泌增加，合併耐糖障礙之胰島素阻抗性現象出現。餵飼小鼠乳鐵蛋白後則可增加胰島素敏感度進而降低血糖。

二、脂多醣對肝臟炎症反應之分析

(一)、4-hydroxynonenal adducts (4-HNE)之免疫組織染色

肝臟的 4-HNE (4-hydroxynonenal adducts)累積程度可代表肝臟過氧化傷害的程度。圖十五為 30%高果糖飲水誘導八週後各組小鼠肝臟之 4-HNE 免疫染色結果，經 DAB 呈色後，與抗體呈陽性反應之區塊會呈現咖啡色。在對照組可觀察到 4-HNE 有較大量的表現，而在正常組則無任何表現，經乳鐵蛋白 (50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg)處理後，可發現 4-HNE 脂質過氧化程度有明顯減少。

(二)、胸腺基質淋巴細胞生成素之免疫組織染色

圖十六為 30%高果糖飲水誘導八週後各組小鼠肝臟之胸腺基質淋巴細胞生成素 (thymic stromal lymphopoietin, TSLP)免疫染色的結果，經 DAB 呈色後與抗體呈陽性反應之區塊會呈現咖啡色。在對照組可觀察到 TSLP 有較大量的表現，而在正常組則無任何表現，經乳鐵蛋白(50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg)處理後，可發現 TSLP 有明顯減少。

(三)、類鐸受體-4 之免疫組織染色

圖十七為 30%高果糖飲水誘導八週後各組小鼠肝臟 TLR-4)免疫染色的結果，經 DAB 呈色後與抗體呈陽性反應之區塊會呈現咖啡色。在對照組可觀察到 TLR-4 有較大量的表現，而在正常組則無任何表現，經乳鐵蛋白 (50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg)處理後，可發現 TLR-4 有明顯減少。

(四)、細胞激素 (IL-1 β 、IL-4、IL-6、IL-13、IL-33、TNF- α 、MCP-1、TSLP 與 adiponectin)之測定

表三為 30%高果糖飲水誘導八週後各組小鼠肝臟中上皮細胞相關聯細胞激素 IL-33 與 TSLP，表四為 30%高果糖飲水誘導八週後各組小鼠肝臟中第二型細胞激素 IL-4 與 IL-13，表五為 30%高果糖飲水誘導八週後各組小鼠肝臟中促發炎細胞激素 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 與 MCP-1 之結果。在對照組中可發現小鼠肝臟中上皮細胞相關聯細胞激素，包括 IL-33, TSLP, 及肝臟第二型細胞激素 (IL-4, IL-13) 與促發炎細胞激素，包括 TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1 之表現量明顯高於正常組($P < 0.05$)，相反的，adiponectin 抗發炎細胞激素在肝臟的濃度則明顯低於正常組，經乳鐵蛋白(50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg)處理後，小鼠肝臟中上皮細胞相關聯細胞激素 (IL-33, TSLP)及肝臟第二型細胞激素 (IL-4, IL-13)與促發炎細胞激素 (TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1)與表現量則明顯降低($P < 0.05$)，而 adiponectin 抗發炎細胞激素的表現量則是高於對照組($P < 0.05$)。

柒、 討論

由於先前研究分別以 15%~54% (Blakely *et al.*, 1981; Beck-Nielsen *et al.*, 1980) 的果糖水溶液長時間給予大白鼠皆可觀察到空腹血糖濃度增加，並伴隨胰島素濃度敏感度下降的現象。因此本篇研究誘導小鼠非酒精性脂肪肝之方法則是以 30% (v/v) 果糖飲水，配合餵食管口服投與乳鐵蛋白(0, 50, 100, 200 mg/kg/day)，並在經八週後餵飼後犧牲，測定個體重、肝重和脾臟重，收集血液測定 ALT、三酸甘油酯、總膽固醇與內毒素。收集肝組織均漿液，測定肝臟三酸甘油酯、內毒素、脂肪細胞激素；並將其石蠟包埋肝臟切片進行 H&E 染色觀察空泡情形，與 Oil-Red-O 染色觀察脂肪油滴堆積之情形，以及進行 4-HNE、TSLP、TLR-4 免疫組織染色來觀察肝臟發炎的反應。

表一為在 30% (v/v) 果糖飲水誘導八週下，觀察小鼠體重、肝臟與脾臟重的變化。原本質地柔軟、表面勻稱的肝臟，在長期發炎情形下，使得肝細胞容易受損，此時，肝臟會啟動自我修復的作用 (Yamada and Fausto, 1998)，企圖回復先前柔軟的狀態，而這個動作所形成的纖維化物質會使肝臟重量增加，當肝臟受損持續增加此時肝臟發炎的情況，超過肝臟本身的修復能力，肝臟的纖維化組織就會愈來愈多，甚至惡化而最終形成肝硬化，這時的肝臟可以觀察到萎縮的情形發生 (Perez-Tamayo, 1983)。肝臟重量反而會減輕，因此可藉由肝臟重量來判斷肝損傷的程度。本研究以 30% (v/v) 果糖水溶液誘導非酒精性脂肪肝後小鼠在體重增重、肝臟重量方面也有顯著增重。三酸甘油脂的來源主要為碳水化合物，當長期處於高三酸甘油脂的狀態下，其可囤積在皮下組織形成皮下脂肪，進而使身體肥胖，體重增加。結果如表一所示，在 30% (v/v) 果糖水溶液誘導八週下，對照組小鼠體增重顯著高於正常組，然而在分別給予乳鐵蛋白處理後，小鼠體增重與對照組相比則有顯著性的降低。根據這樣的結果我們推測，乳鐵蛋白藉由減少周邊脂肪的重量，進而降低體重 ((Morishita *et al.*, 2013)。研究指出由於肝臟組織壞死及發炎現象，會導致門脈高血壓的情形出現，使血液會逆流到脾臟，造成脾臟

腫大，因此在對照組脾臟重量也發現顯著高於其他處理組。而由於每隻小鼠個體重量差異，容易造成結果的誤差，因此將每隻小鼠個體重和肝臟重相除，來比較小鼠肝臟重與體重比，可以得知肝臟發炎初步的情況，比值越大代表發炎腫大情形越嚴重 (Huszar, *et al.*, 1980)。在對照組中觀察到，於第八週將小鼠犧牲後，其肝臟重與體重之比值，顯著的高於正常組 ($P < 0.05$)，證實長期攝取含 30% 果糖飲水會對小鼠肝臟造成腫大的現象，代表存在嚴重的發炎的情況。然而在同樣 30% (v/v) 果糖飲水處理下，分別給予乳鐵蛋白處理後，對照組與中、高劑量組無達到顯著差異，表示腫脹情況相類似。

高果糖刺激腸道微生物菌群過度生長及腸道通透性的增加 (Spruss, *et al.*, 2009)，因而導致腸道中的脂多醣隨著血液循環進入肝臟活化了庫氏細胞進而啟動發炎機制。在圖一結果顯示，小鼠在 30% (v/v) 果糖飲水誘導下，糞便中的大腸桿菌內毒素的確明顯多於正常組。因此在圖二結果發現，30% (v/v) 果糖飲水誘導下的小鼠肝臟中脂多醣的含量顯著高於正常組，而在餵飼小鼠乳鐵蛋白處理後發現小鼠肝臟脂多醣與對照組相比達到顯著性的差異。進一步我們想知道，既然脂多醣會隨著血液循環進入肝臟，那脂多醣是否也存在於全身血液中。因此在圖三分析了全血中脂多醣的殘留量，結果證明，30% (v/v) 果糖飲水小鼠全血液中脂多醣的殘留量高於正常組，而在給予小鼠乳鐵蛋白處理後則全血中脂多醣的殘留量與對照組相比則明顯有下降之趨勢。

當肝細胞受損時，儲存於細胞內的酵素會被釋放到血清中，血清中的 ALT 與 AST 為普遍被用來判斷肝功能之指標。其中又以 ALT 較具專一性，因此 ALT 是臨床上最常被用來評估肝臟發炎的檢查項目之一 (Sturgill and Lambert, 1997; Pratt, *et al.*, 2000)。此外，ALT 的上升可能是內臟脂肪沉積於肝臟 (the deposition of visceral fat in liver) 所產生的一個指標，因此與中央型肥胖、胰島素抗性、代謝症候群有相關性，而這些狀態也常導致葡萄糖及脂肪代謝異常 (Ardigo, *et al.*, 2005; Farrel, *et al.*, 2006; Utzschneider *et al.*, 2006)。根據國家實驗動物中心針對 C57BL/6JNarl 公鼠品系之血液生化及血液學參考值，ALT 平均正常值為

30.80±4.34。結果如圖四所示，ALT 肝損傷指標在 30% (v/v) 果糖水溶液誘導下顯著的高於正常組，然而餵飼小鼠乳鐵蛋白處理後與對照組相比則顯著的降低血清中 ALT 濃度，根據這樣的結果我們推測，由於乳鐵蛋白降低了脂多醣對肝臟的影響因而降低了肝細胞受損與發炎的程度。乳鐵蛋白可顯著降低大鼠血液中的三酸甘油酯與周邊脂肪重量 (Morishita, *et al.*, 2013)，因此本研究利用 30% (v/v) 果糖飲水誘導小鼠非酒精性脂肪模式探討血液中的三酸甘油酯 (圖五) 與總膽固醇 (圖六)，此外也探討肝臟中的三酸甘油酯的濃度 (圖十一)，結果顯示，小鼠在 30% (v/v) 果糖飲水處理中，其血液中與肝臟的三酸甘油酯及總膽固醇皆顯著高於對照組，而在餵飼小鼠乳鐵蛋白處理後與對照組相比則明顯的降低，表示在 30% (v/v) 果糖飲水誘導小鼠非酒精性脂肪模式下，乳鐵蛋白可改善脂質在肝臟中的代謝。

根據病理生理學的研究，正常人每 100 克肝約含 4~5 克脂類，當肝細胞內脂質 (尤其是三酸甘油酯) 蓄積超過肝重量的 5%，或肝組織學上出現脂肪變性時，則在臨床上可稱為「脂肪肝」(Farrell, *et al.*, 2006)。將小鼠犧牲後 (圖七)，我們也觀察到肝臟在 30% (v/v) 果糖飲水誘導下，從肉眼看去有偏乳黃腫大現象，並伴隨許多白色結節與脂肪球等，有嚴重的發炎特徵，和正常組的鮮紅色肝臟有明顯差異。從組織切片來看，如圖八與圖九所示，將肝組織切片進行 H&E 染色，結果顯示，在正常組的肝組織，細胞組織排列整齊，且沒有發炎細胞浸潤的情況。而在對照組中可以看到很多大型空泡存在，且因空泡增加而使細胞組織排列混亂，細胞核大部分被擠到細胞周邊，且血管附近有大量發炎細胞浸潤。而在給予乳鐵蛋白處理後，空泡與浸潤的情況與對照處相比，則有明顯的改善。此外透過 Oil-Red-O 染色可以觀察肝細胞脂質油滴堆積的現象。結果如圖十所示，在 30% (v/v) 誘導非酒精性脂肪肝後各組小鼠肝臟以 Oil-Red-O 染色，紅色為脂肪油滴的堆積。在正常組中無明顯油滴堆積現象出現，而在對照組中則觀察到大量的脂肪油滴堆積現象，經乳鐵蛋白處理後，可觀察到肝臟組織中油滴堆積的情況明顯減少。

胰島素抵抗最主要的促成因素就是過多的游離脂肪酸。經由血液運送到肝

臟與肌肉等組織。在肝臟，游離脂肪酸會造成葡萄糖、三酸甘油的製造增加，刺激胰臟分泌更多的胰島素而造成血中胰島素濃度升高(hyperinsulinemia)，當胰島素阻抗的情形持續惡化，隨之而來的是β細胞無法分泌足夠的胰島素以及造成葡萄糖耐受異常 (Utzshneider, *et al.*, 2006)。而根據國家實驗動物中心針對 C57BL/6JNarl 公鼠品系之血液生化及血液學參考值，平均正常血糖值為 129.27 ± 29.87 。圖十二與十三為小鼠進食 16 小時後，給予小鼠口服葡萄糖 2 g/kg/mouse 進行試驗，並在給糖前與之後的 0、30、60、90 及 120 分鐘由小鼠尾靜脈採取 $5 \mu\text{l}$ 的血液後，進行葡萄糖耐性測試。結果可看到對照組與正常組及乳鐵蛋白處理組，葡萄糖經吸收後，血糖濃度皆隨時間增加而有下降趨勢，其中，對照組下降的程度較為平緩，此外，對照組各採血點的血糖值較餵飼小鼠乳鐵蛋白處理後來的高 ($348.40.27 \pm 39.30$)，並達到統計上的差異，也就是說對照組所投予的葡萄糖吸收後，進入細胞代謝較差。此外，從結果也發現到，在 30% (v/v) 果糖溶液誘導八週下，相較於其他處理組別，對照組在第 0 分鐘之空腹血糖值 (153.0 ± 19.1) 已高於 126 mg/dL ，表示對照組在第 0 分鐘時已出現葡萄糖耐受不良 (Impaired glucose tolerance, IGT) 之症狀。在評估胰島素阻抗的計算方法則是 HOMA-IR，以空腹胰島素值 ($\mu\text{U/mL}$) 乘以空腹血糖值 (mg/dL)，再除以 22.5 (mmol/L) 。此為周邊胰島素對周邊葡萄糖代謝反應之敏感度的間接性指標，即為葡萄糖胰島素指標，葡萄糖胰島素指標越高，表示胰島素敏感度越差 (Bonora, *et al.*, 2000; DeFronzo, *et al.*, 1979; Katsuki, *et al.*, 2001)。如圖十四結果所示，在 30% (v/v) 果糖飲水投與下，的確可以誘導出胰島素敏感度下降，反應出胰島素分泌減少合併耐糖障礙之胰島素阻抗性現象出現。而餵飼小鼠乳鐵蛋白後則可增加胰島素敏感度進而降低血糖。

當庫氏細胞受到刺激後會產生過氧化物，細胞膜上的磷脂質會受到過氧化物物質上未配對電子的影響產生變性，最終形成丙二醛 (malodialdehyde, MDA) 與 4-HNE 等醛類產物，而這些過氧化物產物會造成肝細胞脂質過氧化，進而造成肝損傷與氧化壓力 (Halliwell, 2000)。為了觀察肝臟脂質過氧化的程度，將肝臟

切片進行 4-HNE 的免疫染色，結果如圖十五所示，在 30% (v/v)果糖溶液誘導下，小鼠肝臟 4-HNE 會產生較大量的表現，而在正常組則無任何表現，經乳鐵蛋白處理後，可發現 4-HNE 脂質過氧化程度有明顯減少。TSLP 與 IL-33 為上皮細胞相關聯之細胞激素。當庫氏細胞受到刺激活化時，會釋放轉型生長因子 β (transforming growthfactor, TGF- β)，進而活化更多細胞產生發炎反應 (Holt, *et al.*, 200)。研究指出，TGF- β 的釋出會誘導上皮細胞的轉移能力增加，此過程稱為上皮間質轉化 (epithelial to Mesenchymal Transition, EMT)，使上皮細胞能因藉由 EMT 產生纖維母細胞，誘發細胞激素的失調並大量釋放出發炎細胞激素，如 TSLP 與 IL-33，並促使纖維化產生 (Long, *et al.*, 2011)。因此，TSLP 與 IL-33 為動物體內發炎反應的前驅物質，會調節樹突細胞與單核球的活化 (Ramalingam *et al.*, 2009)。為了觀察肝臟的發炎情形，將肝臟切片進行 TSLP 的免疫染色及利用 ELISA 測定其含量，結果如圖十六結果所示 發現在 30% (v/v)果糖溶液誘導下，小鼠肝臟的 TSLP 會產生較大量表現，而在正常組則無任何表現，經乳鐵蛋白處理後表現量明顯減少。

格蘭氏陰性菌內毒素 (endotoxin)本身亦是一種致病介質，可透過與 TLR-4 (Toll-like receptor-4)受體結合，活化庫氏細胞產生如 TNF- α 、IL-6 與 IL-1 等促發炎細胞激素的產生，並進一步參與 NASH 一系列的發炎與免疫反應 (Wigg, *et al.*, 2001)。為了觀察肝臟發炎情形，將肝組織切片進行 TLR-4 免疫染色，結果如圖十七所示，在 30% (v/v)果糖溶液誘導下，小鼠肝臟的 TLR-4 會產生較大量表現，而在正常組則無任何表現，經乳鐵蛋白處理後表現量明顯減少。證實了乳鐵蛋白可降低脂多醣所導致的發炎反應。

脂肪酸的吸收與合成之間的失衡，導致游離脂肪酸增加及從脂肪組織進入肝臟，這可能使肝細胞的粒線體氧化系統因過度負荷，而造成脂肪酸囤積於肝臟 (Ardigo, *et al.*, 2004; Farrell, *et al.*, 2006; Utzshneiser, *et al.*, 2006)。而脂肪酸囤積於肝臟會引起脂肪變性，產生如 MCP-1, IL-1、IL-6、TNF- α (圖十九)等與發炎有關的蛋白質並與調節脂肪肝的形成有關聯 (Maher, *et al.*, 2008)。造成肝細胞受損、

細胞死亡以及肝臟發炎。研究發現將小鼠靜脈注射入乳鐵蛋白後，透過與庫氏細胞結合，因而抑制 TNF- α 的分泌，進而降低肝炎的危害。此外，血液中由脂肪細胞與巨噬細胞等所分泌的 IL-6 及 TNF- α 的增加，會促使肝臟三酸甘油產生，進而因肝臟無法代謝而造成走向脂肪肝炎 (Morishita, *et al.*, 2013; Drago-Serrano *et al.*, 2011; Guillen, *et al.*, 1960)。為了觀察肝臟發炎情形，利用肝組織均漿液來測定肝臟中上皮關聯細胞激 (IL-33, TSLP)、第二型細胞激素 (IL-4, IL-13) 及促發炎細胞激素 (IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MCP-1) 與抗發炎細胞激素 adiponectin。由於 IL-33、TSLP 為動物體內 Th2 細胞發炎反應的前驅物質，可活化樹突細胞，刺激 T 細胞。IL-33 與 TSLP 藉由所誘發的 Th2 發炎反應，進而分泌 TNF- α 與 IL-6 等促發炎細胞激素。結果如表三與表四及表五所示，在 30% (v/v) 果糖溶液誘導下，小鼠肝臟中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-4, IL-13、IL-33、TSLP、MCP-1 的濃度比正常組明顯來的高，經乳鐵蛋白處理後細胞激素在肝臟的濃度則明顯減少。脂聯素可使肝臟及肌肉的三酸甘油酯下降，刺激肝臟組織脂肪酸的氧化，調節發炎反應。脂聯素會抑制血管內皮細胞上黏著分子的表現，使巨噬細胞無法附著。除此之外，脂聯素會負調控巨噬細胞的 TNF- α 的生成，進而抑制發炎反應的進行 (Emmanuel, *et al.*, 2009; Noriyuki, *et al.*, 2011)。如表六所示，在 30% (v/v) 果糖溶液誘導下，小鼠肝臟中脂聯素濃度顯著性低於正常組，而經乳鐵蛋白處理後脂聯素在肝臟中的濃度則明顯上升。

捌、 結論

綜合上述結果，高果糖飲食刺激腸道大腸桿菌菌體量之增長，尤其是格蘭氏陰性菌群，造成脂多醣分泌增加並與受體 TLR-4 結合而活化庫氏細胞。當庫氏細胞受到刺激時，會經由類鐸受體作用，產生多種細胞激素與發炎物質，進一步造成脂肪肝炎。而乳鐵蛋白透過降低脂多醣對肝臟所產生的發炎反應，導致降低三酸甘油酯及總膽固醇於肝中累積，進而減少肝細胞脂肪的變性。

玖、參考文獻

衛生署統計系列 (一) 死因統計 - 歷年癌症死因統計

http://www.doh.gov.tw/CHT2006/DM/DM2_2.aspx?now_fod_list_no=12939&class_no=440&level_no=4 , 2013 年 6 月。

李文森。1991。解剖生理學。華杏出版社。台北。

Anstee, Q. M., and R. D. Goldin. 2006. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int. J. Exp. Pathol.* 87: 1-16.

Andersen, J. H., S.A. Osbakk, L. H. Vorland, T. Traavik, and T. J. Gutteberg 2001. Lactoferrin and cyclic lactoferricin inhibit the entry of human fibroblasts. *Antiviral Res.* 51: 141-149.

Angulo, P., and L. Keith D, 2002. Non-alcoholic fatty liver disease. *J. Gastroenterol.* 17: S186-S190.

Ardigo, D., F. Numeroso, and S. Valtuena. 2005. Hyperinsulinemia predicts hepatic fat content in healthy individuals with normal transaminase concentrations. *Metabolism.* 54: 1566-70

Arita, Y., S. Kohara, N. Ouchi, M. Takahashi, K. Maeda, J. Miyagawa, K. Hotta, I. Shimomura, T. Nakamura, K., and Muyaoka. 1999. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257: 79-83.

Arthur, M. J. Fibrogenesis II Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. 2000. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279: G245-249.

Bacon, B. R., M. J. Farahvash, C. G. Janney, W. Neusch, and B. A. Tetri. 1994. Non-alcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology* 107:1103-9.

Baffy G. 2009. Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: the emerging view. *J.*

- Hepatology. 51:212-223.
- Basaranoglu, M., G. Basaranoglu, T. Sabuncu, and H. Senturk. 2013. Fructose as a key player in the development of fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* 19: 1162-1172.
- Baker, E. N., B. F. Anderson, H. M. Baker, C. L. Day, M. Haridas, G. E. Norris, S. V. Rumball, C. A. Smith and D. H. Thomas. 1994. Three-dimensional structure of lactoferrin in various functional status. *Adv. Exp. Med. Biol.* 357: 1-12.
- Bezault, J., R. Bhimani, J. Wiprovnick, and P. Furmanski. 1994. Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice. *Cancer Res.* 54: 2310–2312.
- Bechmann, L. P., R. A. Hannivoort, G. Gerken, G. S. Hotamisligil, M. Trauner, and A. Canbay. 2012. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases: *J. Hepatology.* 56: 952-964.
- Beck-Nielsen, H., O. Pedersen, and H. O. Lindskow. 1980. Impaired cellular insulin binding and insulin sensitivity induced by high-fructose feeding in normal subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 33: 273-278.
- Bellamy, W., M. Takase, H. Wakabayashi, K. Kawase, and M. Tomita. 1992. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the Nterminal region of bovine lactoferrin. *J. Appl. Bacteriol.* 73: 472-479.
- Berg, A.H., T. P. Combs and P. E. Scherer. 2002. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends. Endocrinol. Metab.* 13: 84-89.
- Bessler, H., R. Djaldetti, H. Salman, M. Bergman, and M. Djaldetti. 1999. IL-1 beta, IL-2, IL-6 and TNF-alpha production by peripheral blood mononuclear cell from patients with Parkinson's disease. *Biomed. Pharmacother.* 53:141-145.
- Blakely, S. R., J. Hallfrisch, S. Reiser, and E. S. Prather. 1981. Long-term effects of moderate fructose feeding on glucose tolerance parameters in rats. *J. Nutr.* 111:

307-314.

- Blanc, B. and H. C. Isliker. 1961. Isolement Et caracterisation de la protein rouge siderophile dulait maternel: la lactoferrin. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta.* 19: C13-C14.
- Bonora, E., G. Targher, and M. Alberiche. 2000. Homeostasis model assessment closely morrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care.* 23: 57-63.
- Bouwens, L., M. Baekeland, R. De Zanger, and E. Wisse. 1986. Quantitation, tissue distribution and proliferation kinetics of Kupffer cells in normal rat liver. *Hepatology.* 6: 718-22.
- Brock. J. H. 2002. The physiology of lactoferrin. *Biochem. Cell. Biol.* 80: 1-6.
- Canbay, A., S. Friedman, and G. J. Gores. 2004. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology.* 39: 273-278.
- Castro, G. S., J. F. Cardoso, H. Vannucchi, S. Zucoloto, and AA. Jordão. 2011. Fructose and NAFLD: metabolic implications and models of induction in rats. *Acta. Cir. Bras.* 2:45-50.
- Connely, O. M. 2001. Antoinflammatory activities of lactoferrin, *J, Am. Coll. Nutr.* 20: 389S-395S.
- Cornish, J., K. E. Callon, D. Naot, K. P. Palmano, T. Banovic, U. Bava, M. Watson, J. M. Lin, P. C. Tong, Q. Chen, V. A. Chan, H. E. Reid, N. Fazzalari, H. M. Baker, E. N. Baker, N. W. Haggarty, and A. B. Grey. 2004. Lactoferrin is a potent regulator of bone cell activity and increases bone formation *in vivo*. *Endocrinology.* 145:4366-4374.
- Cox, T.M., J. Mazurier, G. Spike, J. Montreuil, and T.J. Peter. 1979. Iron binding protein and influx of iron across the duodenal brush border. Evidence for specific

- lactotransferrin receptors in the human intestine. *Biochem. Biophys. Acta.* 588:120-128.
- Day, C., and O. James. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? 1998. *Gastroenterology.* 114:842-845.
- DeFronzo, R. A., J. D. Tobin, and R. Andres. 1970. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am. J. Physiol.* 237: E214-E223.
- Diehl, A.M. 2002. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis IV. Nonalcoholic fatty liver disease abnormalities in macrophage function and cytokines. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* 282:G1-G5.
- Drago-Serrano, M. E., M. de la Garza-Amaya, J. S. Luna, R. Campos-Rodriguez. 2011. Lactoferrin-lipopolysaccharide (LPS) binding as key to antibacterial and antiendotoxic effects. *Int. Immunopharmacol.* 12: 1-9.
- Esposito, K., et al. 2003. Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. *JAMA.* 289:1799–1804.
- Espinassous, Q., E. Garcia-de-Paco, I. Garcia-Verdugo, M. Synguelakis, J. M. Sallenave, A. N. McKenzie, and J. Kanellopoulos. 2009. IL-33 enhances lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine production from mouse macrophage by regulating lipopolysaccharide receptor complex. *J. Immunol.* 183: 1446-1455.
- Elliott, SS., NL. Keim. JS. Stern, and PJ. Havel. 2002. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am. J. Clin, Nutr.* 76: 911-922.
- Fasshauer, M. and R. Paschke R. 2003. Regulation of adipocytokines and insulin resistance. *Diabetologia.* 46:1594-1603
- Farrell, C. G. and C. Z. Larter. 2006. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to

- cirrhosis. *Hepatology*. 43: S99-S112.
- Fruebis, J., T. S. Tsao, S. Javorshi, D. Ebbets-Reed, M. R. Erickson, F. T. Yen, B. E. Bihain, and H. F. 2001. Lodish. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98: 2005-2010.
- Fried, S. K., D.A. Bunkin, and A. S. Greenberg. 1999. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83:847–850
- Fujita, K., E. Matsuda, K. Sekine, M. Iigo, and H. Tsuda. 2004. Lactoferrin enhances Fas expression and apoptosis in the colon mucosa of azoxymethane-treated rats. *Carcinogenesis*. 25: 1961–1966.
- Gratz, S. W., H. Mykkanen, and H. S. El-Nezami. 2010. Probiotics and gut health: A special focus on liver diseases. *World J. Gastroenterol.* 16:403-410.
- Groves, M. L. 1960. The isolation of red protein from milk. *J. Am Chem. Soc.* 82: 3345-3350.
- Guillen, C., I. B. McInnes, D. Vaughan, A. B. Speekenbrink, and J. H. Brock. 1960. The effects of local administration of lactoferrin on inflammation in murine autoimmune and infection arthritis. *Arthritis Rheum.* 43: 2073-2080.
- Harrington, J. P. 1992. Spectroscopic analysis of the unfolding of transition metal-ion complexes of human lactoferrin and transferrin. *Int. J. Biochen.* 24: 275-280.
- Holt, A. P., M. Salmon, C. D. Buckley, and D. H. Adams. 2008. Immune interactions in hepatic fibrosis. *Clin. Liver. Dis.* 12: 861-882.
- Holst, D., and PA. Grimaldi. 2002. New factors in the regulation of adipose differentiation and metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 13: 241-245.
- Hotamisligil, G. S., N. S. Shargill, and B. M. Spiegelman. 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance.

- Science. 259:87-91
- Hotamisligil, G. S., A. Budavari, D. Murray, and B. M. Spiegelman. 1994. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor- α . *J. Clin. Invest.* 94:1543-1549.
- Hsu, C. S. and J. H. Kao. 2012. Non-alcoholic fatty liver disease: an emerging liver disease in Taiwan. *J. Formos. Med. Assoc.* 111: 527-535.
- Huang, K.C., C. L. Chen, L. M. Chung, S.R. Ho, T. Y. Tai, and W. S. Yang. 2003. Plasma adiponectin levels and blood pressures in nondiabetic adolescent females. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88: 4130-4134.
- Huszuar, G., J. Maiocco, and F. Naftolin. 1980. Monitoring of collagen and collagen fragments in chromatography of protein mixtures. *Anal. Biochem.* 105: 424-429.
- Iyer, S. and B. Lonnerdal. 1993. Lactoferrin, lactoferrin receptors and iron metabolism. *Eur. J. Clin. Nutr.* 47: 232-241.
- Jameson, G. B., B. F. Anderson, G. E. Norriss, D. H. Thomas, and E. N. Baker. 1998. Structure of human apolactoferrin at 2.0 Å resolution. Refinement and analysis of ligand-induced conformational change. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 54: 1319-1335.
- Kanda, H., et al. 2006. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Invest.* 116: 1494-1505.
- Kaplan, L. M. Leptin, obesity, and liver disease.1998. *Gastroenterology.* 115: 997-1001.
- Katsuki, A., Y. Sumida, and E. C. Gabazza. 2001. Homeostasis model assessment is a reliable indicator of insulin resistance during follow-up of patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 24: 362-365.
- Kern, P. A., S. Ranganathan, C. Li, L. Wood, and G. Ranganathan. 2001. Adipose

- tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280:E745-E751.
- Kleiner, D. E., E. M. Brunt, M. Van-Natta, C. Behling, M. J. Contos, O. W. Cummings, Y. C. Liu, M. S. Torbensen, and A. J. Sanyal. 2005. Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 41: 1313-1321.
- Leonard, E. J. et al. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). 1990. *Immunol. Today.* 11: 97-101
- Levy, P. F. and M. Viljoen. 1995. Lactoferrin: a general review. *Haematologica.* 80: 252-267.
- Liang, H., S.E. Hussey, A. Sanchez-Avila, P. Tantiwong and N. Musi. 2013. Effects of lipopolysaccharide on inflammation and insulin action in human muscle. *PLoS One.* 8:1-8.
- Lim, J.S., M. Mietus-Snyder, A. Valente, J.M. Schwarz, and R.H. Lustig. 2010. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7:251-264.
- Li, Z., S. Yang, H. Lin, J. Hung, P. A. Watkins, A. B. Moser, and C. DeSimone. 2003. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* 37:343-350.
- Matsuzawa, Y., T. Funahashi, S. Kihara, and I. Shimomura. 2004. Adiponectin and Metabolic Syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24: 29-33.
- Marra, F. Hepatic stellate cells and the regulation of liver inflammation. 1999. *J. Hepatol.* 31: 1120-1130.
- Marshall, J. C. 1998. The gut as a potential trigger of exercise-induced inflammatory responses. *J. Physiol. Pharmacol.* 76: 479-484.
- Masher, J. J. 1997. Exploring alcohol's effects on liver function. *Alcohol Health Res.*

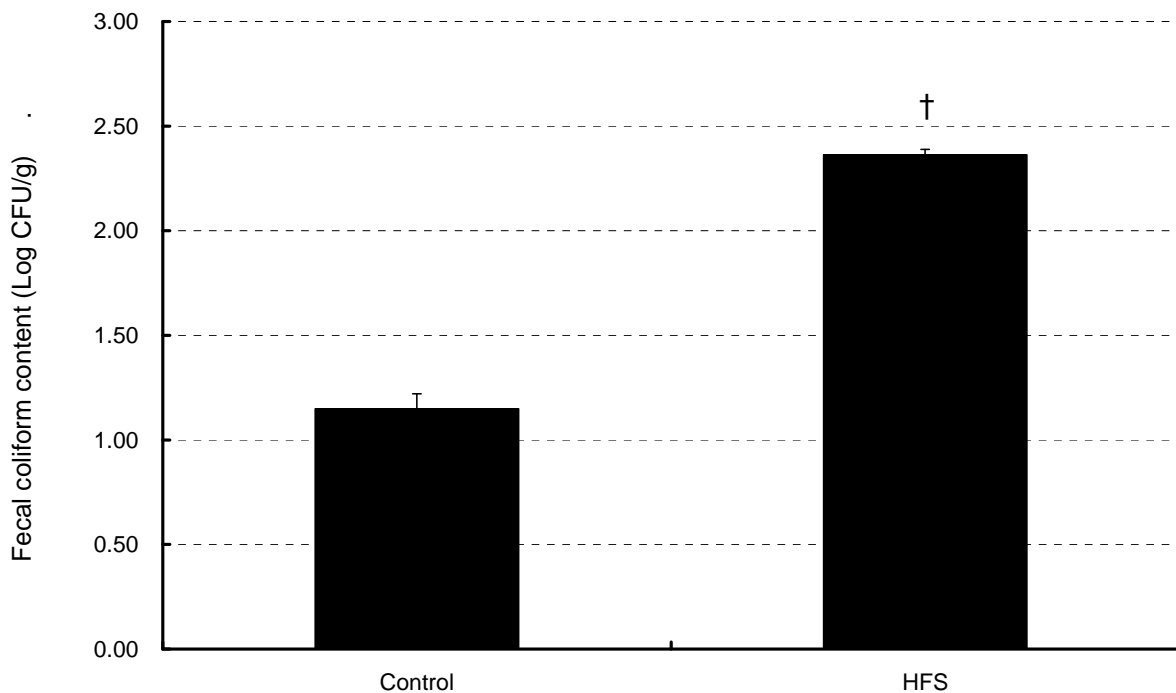
- World. 21: 5-12.
- Mazurier, J. and G. Spik. 1980. Comparative study of the iron-binding properties of human transferrins. I. Complete and sequential iron saturation and desaturation of the lactoferrin. *Biochim, Biophys. Acta.* 629: 399-408.
- Metz-Boutique M.H., J. Jolles, J. Mazurier, F. Schoentgen, D. Legrand, G. Spik, J. Montreuil and P. Jolles. 1984. Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *Eur. J. Biochem.* 145:659-676.
- Morishita, S., T. Ono, C. Fujisaki, Y. Ishihara, M. Murakoshi, H. Kato, and M. Hosokawa. 2013. Bovine lactoferrin reduces visceral fat and liver triglycerides in ICR mice. *J. Oleo. Sci.* 62:97-103.
- Naidu, A. S. 2000. Lactoferrin-natural, multifunctional, antimicrobial. pp. 33-35.
- Naidu, A. S. 2002. Activated lactoferrin-a new approach to meat safety. *Food Tech.* 56: 40-45.
- Nonogaki, K., G. M. Fuller, and N. L. Fuentes. 1995. Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats. *Endocrinology.* 136:2143-2149.
- Nseir, W., F. Nassar and N. Assay. 2010. Soft drinks consumption and nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* 16:2579-2588.
- Ouyang, X., Cirillo, P., Sautin, Y., McCall, S., Bruchette, J. L., Diehl, A. M., Johnson, R. J., and Abdelmalek, M. F. 2008. Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease: *J. Hepatol.* 48: 993-999.
- Pradhan, A. D., J. E. Manson, N. Rifai, J. E. Buring, and P. M. Ridker. 2001. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA.* 286: 327-334.
- Pratt, D. S. and M. M. Kaplan. 2000. Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. *N.Eng. J. Med.* 342: 1266-1271.
- Peterson, N. A., B. F. Anerson, G. B. Jameson, J. W. Tweedie and E. N. Baker. 2000.

- Crystal structure and iron-binding properties of the R210K mutant of the N-lobe of human lactoferrin: implications for iron release from transferrins. *Biochemistry*. 39: 6625-6633.
- Petit, J. M., J. B. Bour, C. Galland-Jos, A. Minello, B. Verges, M. Guiguet, J. M. Brun, and P. Hillon. 2001. Risk factors for diabetes mellitus and early insulin resistance in chronic hepatitis C. *J. Hepatol*. 35:279-283.
- Perterson, P. 1997. Abnormal mitochondria in hepatocyte in human fatty liver. *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica Section a-pathology*. 85: 413-420.
- Perez-Tamayo, R. 1983. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄ and adequate model of human cirrhosis? *Hepatology*. 3: 112-120.
- Perschow. B. W., R. D. Talbott, and R. P. Bateria. 1999. Ability of lactoferrin to promote the growth of *Bifidobacterium* spp. *in vitro* is independent of receptor binding capacity and iron saturation level. *J. Med. Microbiol*. 48: 541-549.
- Ratziu, V., S. Bellentani, H. Cortez-Pinto, C. Day, and G. Marchesini. 2010. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *J. Hepatol*. 53:372-84.
- Rabelo, F., C. P. Oliveira, J. Faintuch, D. F. Mazo, V. M. Lima, J. T. Stefano, H. V. Barbeiro, F. G. Soriano, V. A. Alves, and F. J. Carrilho. 2010. Pro- and anti-inflammatory cytokines in steatosis and steatohepatitis. *Obes. Surg*. 20:906-12.
- Ramalingam, T., J. T. Pesce, M. M. Mentink-Kane, S. Madala, A. W. Cheever, M. R. Comeaus, S. F. Ziegler, and T. A. Wynn. 2009. Regulation of helminth-induced Th2 responses by thymic stromal lymphopoietin. *J. Immuno*. 182: 6452-6459.
- Roberts, E. A., 2007. Pediatric nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): a "growing" problem? *J. Hepatol*. 46:1132-1142.
- Rubbia-Brandt, L., E. Giostra, G. Mentha, R. Quadri R, and F. Negro. 2001.

- Expression of liver steatosis in hepatitis C virus infection and pattern of response to alpha-interferon. *J. Hepatol.* 35:307-309.
- Sartipy, P and D. J. Loskutoff. 2003. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 7265-7270.
- Seki, E., S. De-Minicis, C. H. Osterreicher, J. Kluwe, Y. Osawa, D. A. Brenner, and R. F. Schwabe. 2007. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat. Med.* Nov. 13: 1324-1332.
- Sherman, M. P., S, H, Bennett, F. F. Hwang, and C. Yu. 2004. Neonatal small bowel epithelia: enhancing anti-bacterial defense with lactoferrin and *Lactobacillus* GG. *Biometals.* 17: 285–289.
- Saito, T., K. Misawa, and S. Kawata. 2007. Fatty liver and non-alcoholic steatohepatitis. *Internal Medicine.* 46: 101-103.
- Sorbi, D., J. Boynton, and K. D. Limdor. 1999. The ratio of aspartate aminotransferase to alanine aminotransferase: potential value in differentiating nonalcoholic steatohepatitis from alcoholic liver disease. *Am. J. Gastroenterol.* 94: 1018-1022.
- Spruss, A., G. Kanuri, S. Wagnerberger, S. Haub, S.C. Bischoff, and I. Bergheim. 2009. Toll-like receptor-4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *J. Hepatol.* 50:1094-1104.
- Spruss, A., and I. Bergheim . 2009. Dietary fructose and intestinal barrier: potential risk factor in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *J. Nutr. Biochem.* 20: 657-662.
- Steijns, J. M. and A. C. M. Hooijdonk. 2000. Occurance, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *Br. J. Nutr.* 1: 11-17.
- Sturgill, M. G., and G. H. Lambert. 1997. Xenobiotic-induced hepatotoxicity: mechanisms of liver injury and methods of monitoring hepatic function. *Clin.*

- Chem. 43: 1512-1526.
- Suzuki, Y. A. and B. Lonnerdal. 2004. Baculovirus expression of mouse lactoferrin receptors and tissue distribution in the mouse. *BioMetals*. 17: 301-309.
- Suzuki, Y. A., V. Lopez and B. Lonnerdal. 2005. Mammalian lactoferrin receptors: structure and function. *Cell. Mol. Life Sci*. 62: 2560-2575.
- Takeuchi, T., H. Kitagawa and E. Harada. 2004. Evidence of lactoferrin transportation into blood circulation from intestine via lymphatic pathway in adult rats. *Exp. Physiol*. 89:263-270.
- Talukder, M. J., T. Takeuchi, and E. Harada. 2003. Characteristics of lactoferrin receptor in bovine intestine: higher binding activity to the epithelium overlying Peyer's patches. *J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med*. 50: 123-131.
- Teramoto, K., J. L. Powers, J. B. Kruskal, and M. E. Clouse. 1993. Hepatic microcirculatory changes after reperfusion in fatty and normal liver transplantation in the rat. *Transplantation*. 56:1076-82.
- Thorburn, A. W., L. H. Storlien. AB. Jenkins, and EW. Kraegen. 1989. Fructose-induced in vivo insulin resistance and elevated plasma triglyceride levels in rats. *Am. J. Clin. Nutr*. 49: 1155-1163.
- Utzschneider, K. M. and S. E. Kahn. 2006. The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 91: 4753-4761.
- Uysal, K. T., S. M. Wiesbrock, M. W. Marino, and G. S. Hotamisligil. 1997. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature*. 389: 610-614.
- Valenti, P., and G. Antonini. 2005. Lactoferrin: an important host defense against microbial and viral attack. *Cell. Mol. Life Sci*. 62: 2576-2587.
- Vos, M. B. and C. J. McClain. 2009. Fructose takes a tool. *J. Hepatol*. 50: 1004-1006.

- Wang, W. P., M. Ligo, J. Sato, K. Sekine, I. Adachi, and H. Tsuda. 2000. Activation of mucosal intestinal immunity in tumor-bearing mice by lactoferrin. *J. Cancer Res.* 91: 1022-1027.
- Williams, A. L. and J. H. Hoofnagle. 1999. Ratio of serum aspartate to alanineaminotransferase in chronic hepatitis. Relationship to cirrhosis. *Gastroenterology.* 95: 734-739.
- Wigg, A. J., I. C. Roberts-Thomson, and R. B. Dymock. 2001. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut.* 8: 48-149.
- Wolf, J. S., D. Li, R. J. Taylor, and B.W. O'malley. 2003. Lactoferrin inhibits growth of malignant tumors of the head and neck. *ORL. J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.* 65: 245–249.
- Xirouchakis, E., P. Manousor, L. Tsartsali, S. Georgopoulos and A.K. Buroughs. 2009. Insights into the pathogenesis of NAFLD: The role of metabolic and pro-inflammatory mediators. *Gastroenterology.* 22: 24-33.
- Xu, A., Y. Wang, H. Keshaw. L. Y. Xu, K. S. Lam, and G. J. Cooper. 2003. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J. Clin. Invest.* 112:91-100.
- Yi, M., S. Kaneko, D. Y. Yu, and S. Murakami. 1997. Hepatitis C virus envelope proteins bind lactoferrin. *J. Virol.* 71: 5997-6002.
- Yang, W. S., W. J. Lee, T. Funahashi, S. Tanaka, Y. Matsuzawa, and L. M. Chuang. 2002. Plasma adiponectin levels in overweight and obese asians. *Obes. Res.* 10: 1104-1110.
- Yamada, Y., N. Fausto. 1998. Deficient liver regeneration after carbon tetrachloride in mice lacking type 1 but not type 2 tumor necrosis factor receptor. *Am. J. Pathol.* 152: 1577-1589.



圖一、高果糖漿誘導對小鼠之糞便中大腸桿菌群含量之影響

Figure 1. Effect of fecal coliform content in high fructose syrup administration for mice.

在 30% 高果糖飲水下的老鼠腸道中大腸桿菌群的含量明顯高於對照組。數據以平均值 ± 標準差表示，並以一般線性模式進行兩組間之比較。Control: 不進行高果糖漿誘導的對照組 (n=6)；HFS: 以 30%高果糖漿飲水餵食四週 (n=10)，† 顯示組間具顯著性差異 ($P < 0.001$)。

In the four weeks administration of 30% (v/v) high-fructose syrup (HFS), HFS group was significantly higher than control group in Log CFU of coliform ($P=0.014$). Data present as mean±SD (n=10) and analyzed with GLM. Control: untreated group; HFS: high fructose corn syrup (30%) in daily drink for four weeks. † : Different letters indicate significant difference ($P < 0.001$).

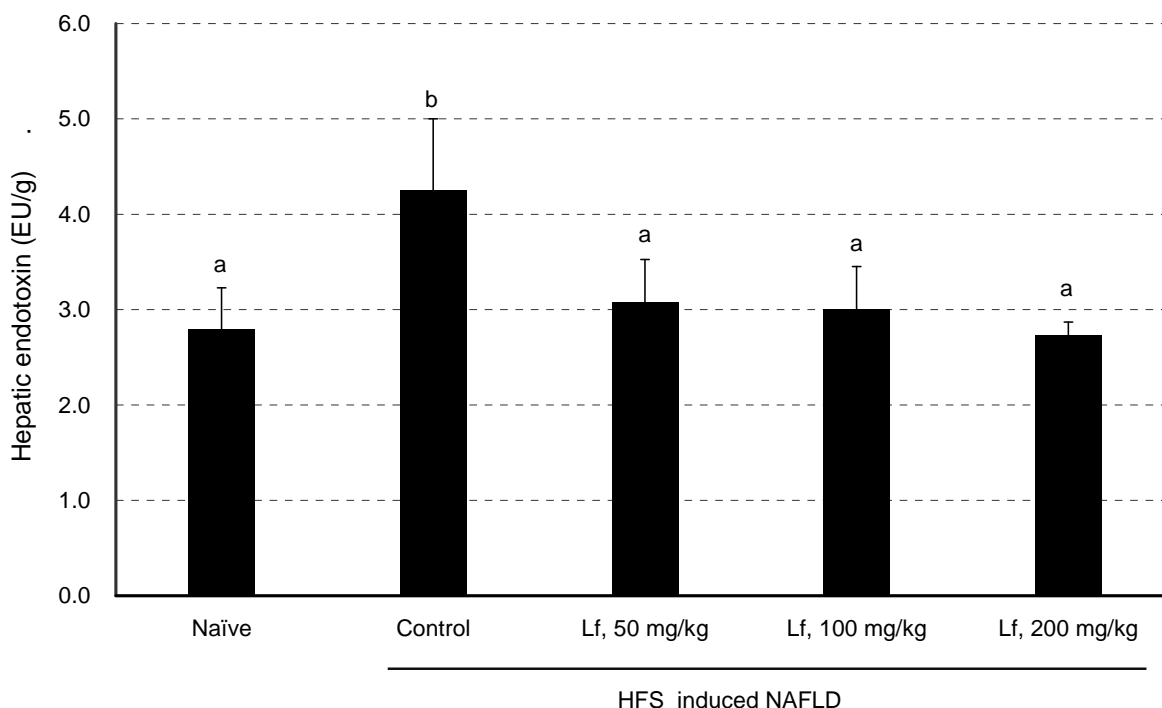
表一、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝中總增重、肝重及脾臟重量之影響

Table 1. Effects of lactoferrin (Lf) on the weight gain, liver weight and spleen weight in high fructose syrup induced murine NAFLD

Groups	Weight gain, g	Liver weight, g	Spleen weight, mg
Naïve	1.66 ± 0.35 ^a	0.94 ± 0.08 ^a	62.83 ± 5.47 ^a
High fructose syrup induced NAFLD			
Control	8.60 ± 1.75 ^d	1.37 ± 0.12 ^b	94.01 ± 8.84 ^d
Lf, 50 mg/kg	3.36 ± 0.84 ^{bc}	1.08 ± 0.06 ^a	77.21 ± 9.76 ^{bc}
Lf, 100 mg/kg	4.04 ± 0.87 ^c	0.96 ± 0.31 ^a	80.34 ± 11.34 ^c
Lf, 200 mg/kg	2.78 ± 1.34 ^b	1.00 ± 0.16 ^a	70.75 ± 10.43 ^{ab}

在八週的試驗後，對照組在總增重、肝臟重量、脾臟重量經 30% (v/v)高果糖漿誘導後顯著高於空白組($P < 0.05$)；乳鐵蛋白實驗組 (50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg)在總增重、肝臟重量、脾臟重量與對照組相比有顯著性降低($P < 0.05$)。數據以平均值±標準差表示，並以單因子變異數分析後再以 Duncan 多變域分析進行事後檢定。Naïve: 空白組，不進行高果糖漿誘導的對照組；Control: 對照組，以高果糖漿誘導非酒精性脂肪肝，每日口服投與 10 ml/kg 蒸餾水對照組；Lf, 50 mg/kg: 乳鐵蛋白低劑量組，以高果糖漿誘導非酒精性脂肪肝，每日口服投與 50 mg/kg 乳鐵蛋白；Lf, 100 mg/kg: 乳鐵蛋白中劑量組，以高果糖漿誘導非酒精性脂肪肝，每日口服投與 100 mg/kg 乳鐵蛋白；Lf, 200 mg/kg: 乳鐵蛋白高劑量組，以高果糖漿誘導非酒精性脂肪肝，每日口服投與 200 mg/kg 乳鐵蛋白。^{a-d} 上標相異字母表示同行中不同字母有顯著差異($P < 0.05$)。

In the eight weeks administration of lactoferrin (0, 50, 100, 200 mg/kg), control group was significantly higher than naïve group in weight gain, liver weight, and spleen weight ($P < 0.05$). Lactoferrin treatment groups were significantly lower than control group in weight gain, liver weight, and spleen weight ($P < 0.05$). Data present as mean±SD (n=10) and was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. Naïve: untreated group; Control: high fructose corn syrup induced murine NAFLD and administered distilled water; Lf, 50 mg/kg: high fructose corn syrup induced murine NAFLD and administered 50 mg/kg lactoferrin; Lf, 100 mg/kg: high fructose corn syrup induced murine NAFLD and administered 100 mg/kg lactoferrin; Lf, 200 mg/kg: high fructose corn syrup induced murine NAFLD and administered 200 mg/kg lactoferrin. ^{a-d}: Different letters in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$).

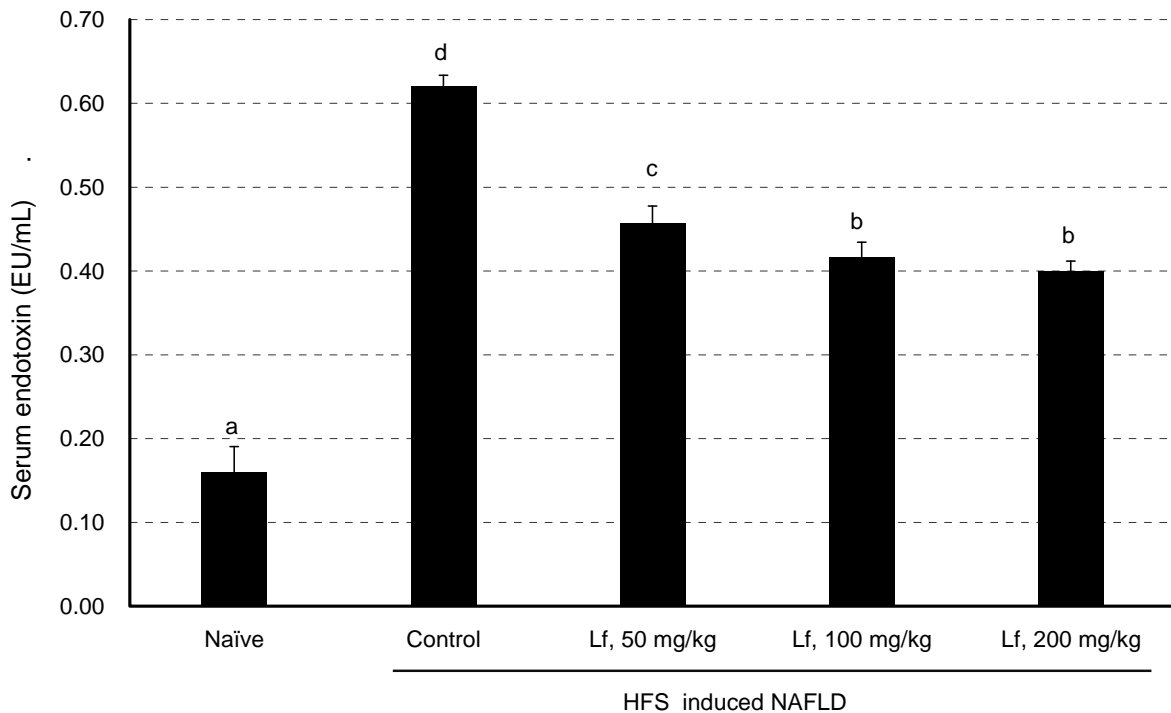


圖二、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝中內毒素(脂多醣)之影響。

Figure 2. Effect of lactoferrin on hepatic endotoxin (lipopolysaccharide) level in high fructose syrup induced murine NAFLD.

在八週的試驗後，經 30% (v/v) 高果糖飲水誘導非酒精性脂肪肝造型後對照組之小鼠肝臟中內毒素的含量與正常組相比有顯著性增加 ($P < 0.05$)，而在餵飼小鼠乳鐵蛋白 (50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg) 後發現可顯著性降低小鼠肝臟內毒素($P < 0.05$)。數據以平均值±標準差表示，並以單因子變異數分析後再以 Duncan 多變域分析進行事後檢定。^{a-b} 上標相異字母表示同行中不同字母有顯著差異($P < 0.05$)。組別說明如表一所示。

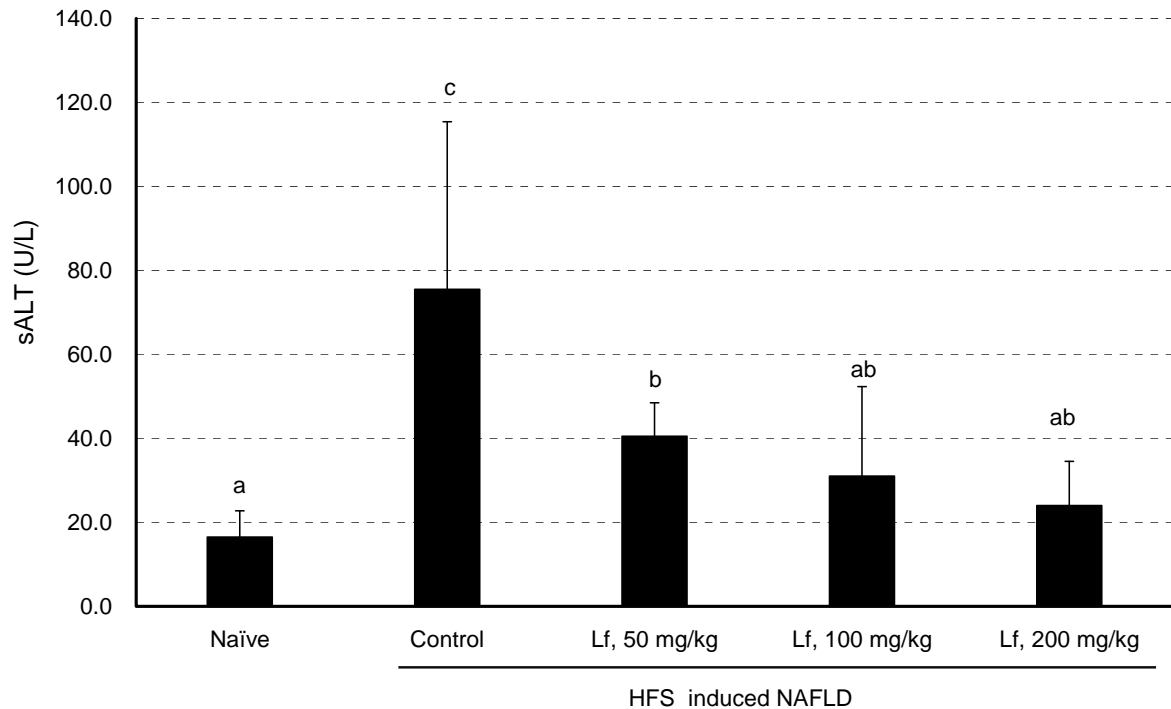
In the eight weeks administration of lactoferrin (0, 50, 100, 200 mg/kg), control group was significantly higher than naïve group in hepatic endotoxin ($P < 0.05$). Lactoferrin treatment groups were significantly lower than control group in hepatic endotoxin ($P < 0.05$). Data present as mean±SD (n=10) and was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. ^{a-b}: Different letters in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$). Groups description was shown as Table 1.



圖三、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝中血清內毒素(脂多醣)之影響。
 Figure 3. Effect of lactoferrin on serum endotoxin (lipopolysaccharide) level in high fructose syrup induced murine NAFLD.

在八週的試驗後，經 30% (v/v) 高果糖飲水誘導非酒精性脂肪肝造型後對照組之小鼠血清中內毒素的含量與正常組相比有顯著性增加 ($P < 0.05$)，而在餵飼小鼠乳鐵蛋白 (50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg) 後發現可顯著性降低小鼠血清中內毒素($P < 0.05$)。數據以平均值±標準差表示，並以單因子變異數分析後再以 Duncan 多變域分析進行事後檢定。^{a-d} 上標相異字母表示同行中不同字母有顯著差異($P < 0.05$)。組別說明如表一所示。

In the eight weeks administration of lactoferrin (0, 50, 100, 200 mg/kg), control group was significantly higher than naïve group in serum endotoxin ($P < 0.05$). Lactoferrin treatment groups were significantly lower than control group in serum endotoxin ($P < 0.05$). Data present as mean±SD (n=10) and was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. ^{a-d}: Different letters in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$). Groups description was shown as Table 1.

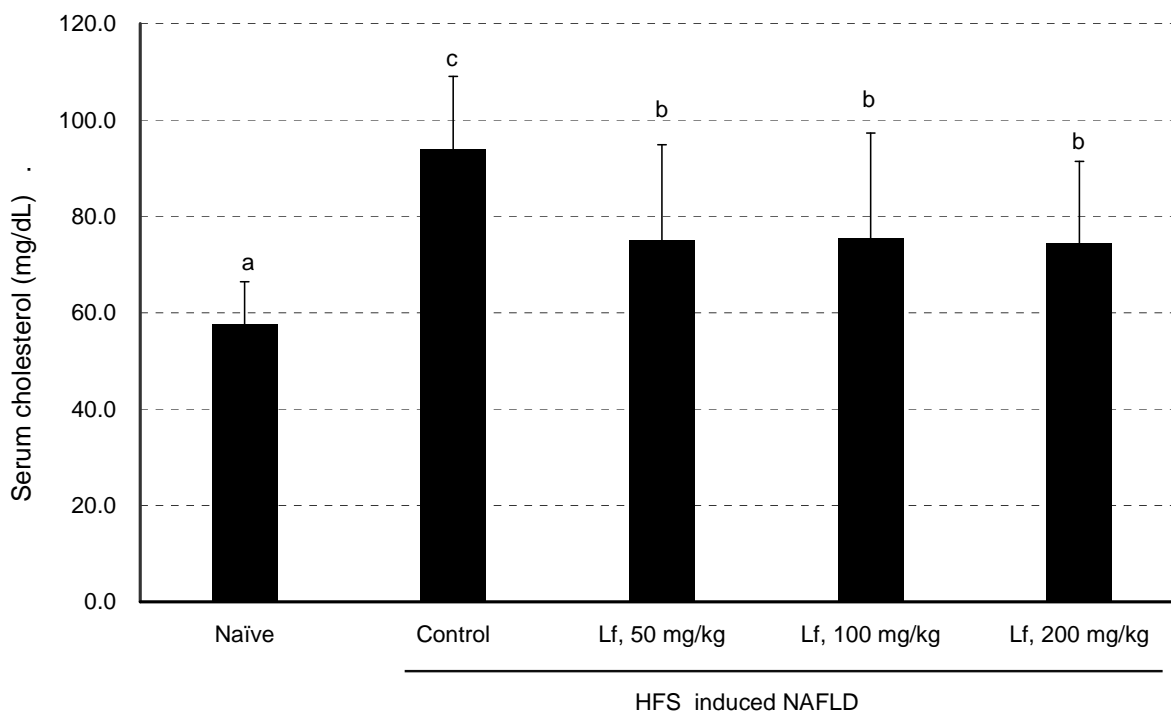


圖四、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝中血清丙胺酸轉胺酶之影響。

Figure 4. Effect of lactoferrin on serum ALT in high fructose syrup induced murine NAFLD.

在八週的試驗後，經 30% (v/v) 高果糖飲水誘導非酒精性脂肪肝造型後對照組之小鼠血清中丙胺酸轉胺酶的含量與正常組相比有顯著性增加 ($P < 0.05$)，而在餵飼小鼠乳鐵蛋白 (50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg) 後發現可顯著性降低小鼠血清中麩丙酮酸轉胺酶 ($P < 0.05$)。數據以平均值±標準差表示，並以單因子變異數分析後再以 Duncan 多變域分析進行事後檢定。^{a-c} 上標相異字母表示同行中不同字母有顯著差異 ($P < 0.05$)。組別說明如表一所示。

In the eight weeks administration of lactoferrin (0, 50, 100, 200 mg/kg), control group was significantly higher than naïve group in serum ALT ($P < 0.05$). Lactoferrin treatment groups were significantly lower than control group in serum ALT ($P < 0.05$). Data present as mean±SD (n=10) and was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. ^{a-c}: Different letters in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$). Groups description was shown as Table 1.

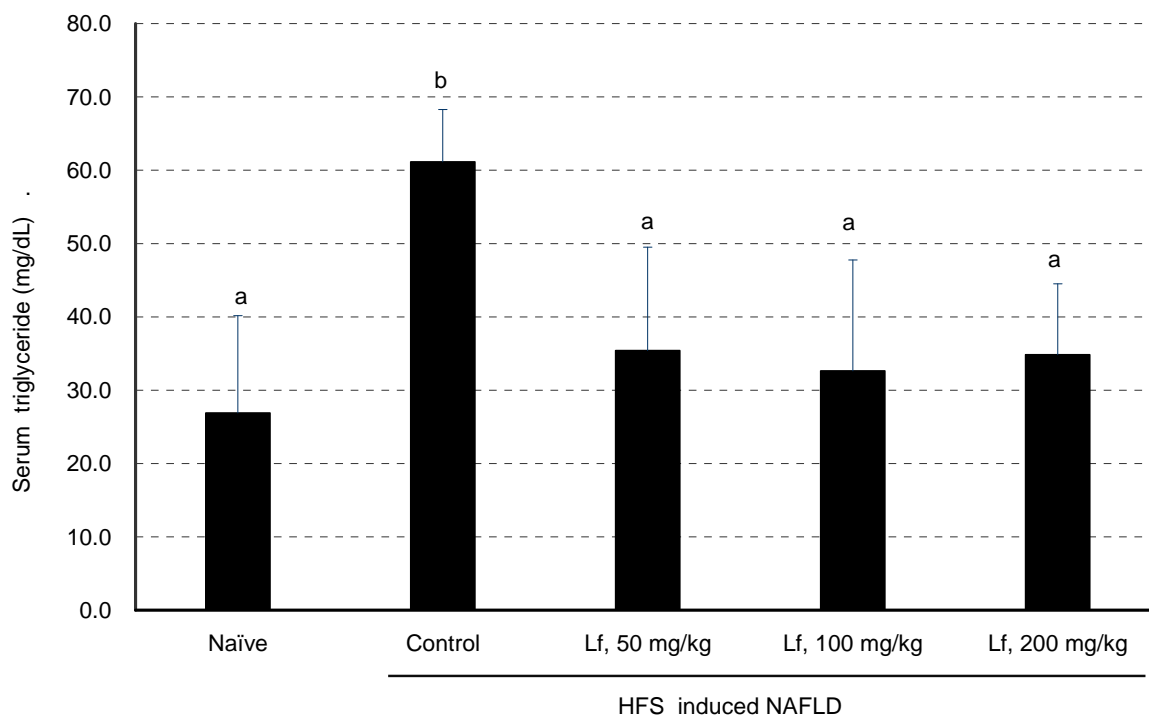


圖五、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝中血清總膽固醇之影響。

Figure 5. Effect of lactoferrin on total serum cholesterol in high fructose syrup induced murine NAFLD.

在八週的試驗後，經 30% (v/v) 高果糖飲水誘導非酒精性脂肪肝造型後對照組之小鼠血清中總膽固醇的含量與正常組相比有顯著性增加 ($P < 0.05$)，而在餵飼小鼠乳鐵蛋白 (50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg) 後發現可顯著性降低小鼠血清中總膽固醇 ($P < 0.05$)。數據以平均值±標準差表示，並以單因子變異數分析後再以 Duncan 多變域分析進行事後檢定。^{a-c} 上標相異字母表示同行中不同字母有顯著差異 ($P < 0.05$)。組別說明如表一所示。

In the eight weeks administration of lactoferrin (0, 50, 100, 200 mg/kg), control group was significantly higher than naïve group in total serum cholesterol ($P < 0.05$). Lactoferrin treatment groups were significantly lower than control group in serum cholesterol ($P < 0.05$). Data present as mean±SD (n=10) and was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. ^{a-c}: Different letters in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$). Groups description was shown as Table 1.



圖六、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝中血清三酸甘油酯之影響。

Figure 6. Effect of lactoferrin on serum triglyceride in high fructose syrup induced murine NAFLD.

在八週的試驗後，經 30% (v/v) 高果糖飲水誘導非酒精性脂肪肝造型後對照組之小鼠血清中三酸甘油脂的含量與正常組相比有顯著性增加 ($P < 0.05$)，而在餵飼小鼠乳鐵蛋白 (50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg) 後發現可顯著性降低小鼠血清中三酸甘油脂 ($P < 0.05$)。數據以平均值±標準差表示，並以單因子變異數分析後再以 Duncan 多變域分析進行事後檢定。^{a-c} 上標相異字母表示同行中不同字母有顯著差異 ($P < 0.05$)。組別說明如表一所示。

In the eight weeks administration of lactoferrin (0, 50, 100, 200 mg/kg), control group was significantly higher than naïve group in serum triglyceride ($P < 0.05$). Lactoferrin treatment groups were significantly lower than control group in serum triglyceride ($P < 0.05$). Data present as mean±SD (n=10) and was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. ^{a-c}: Different letters in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$). Groups description was shown as Table 1.

Naïve



Control



Lf, 50 mg/kg



Lf, 100 mg/kg



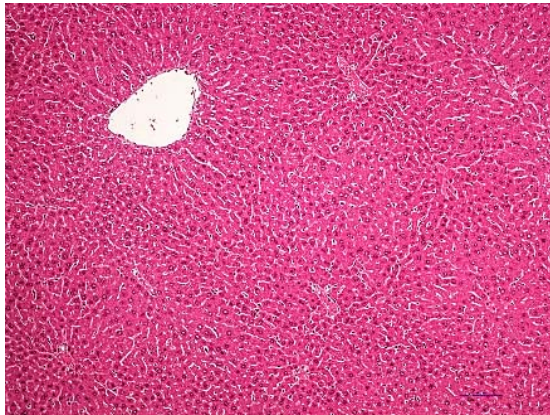
Lf, 200 mg/kg



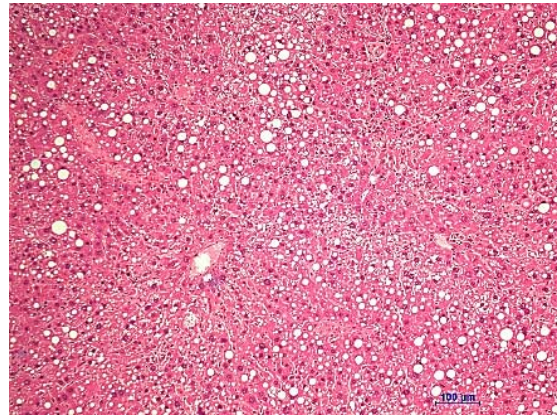
圖七、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝中肝臟之影響。

Figure 7. Effect of lactoferrin on liver gross in high fructose syrup induced murine NAFLD.

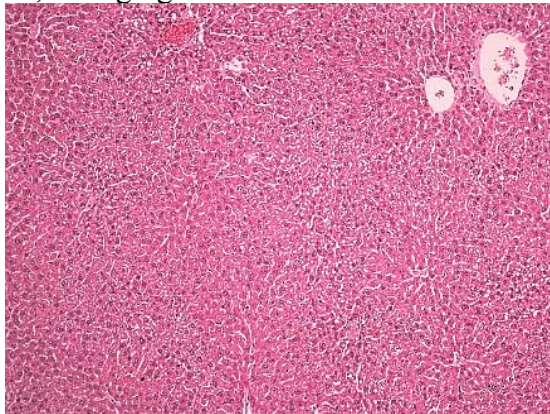
Naïve



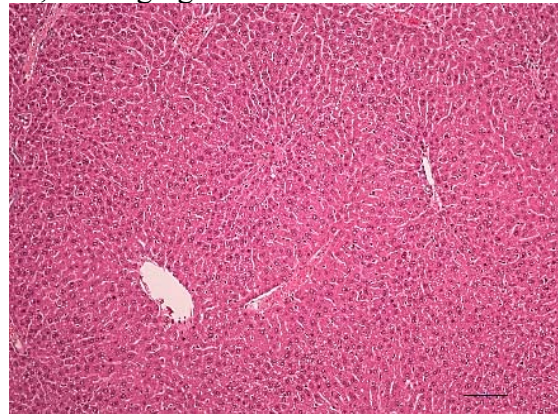
Control



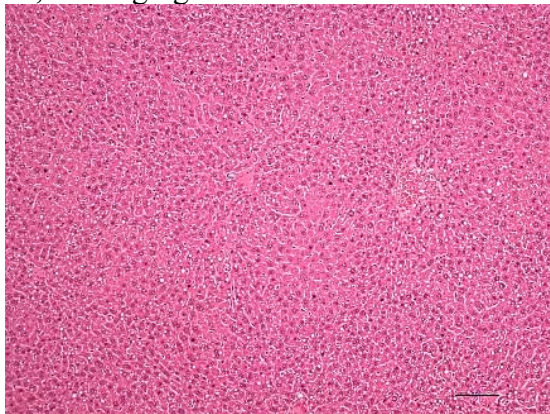
Lf, 50 mg/kg



Lf, 100 mg/kg



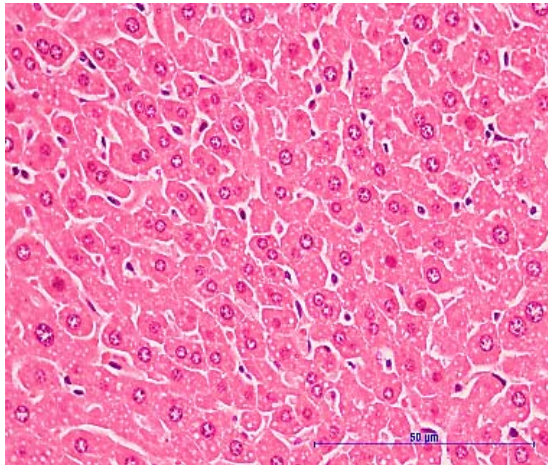
Lf, 200 mg/kg



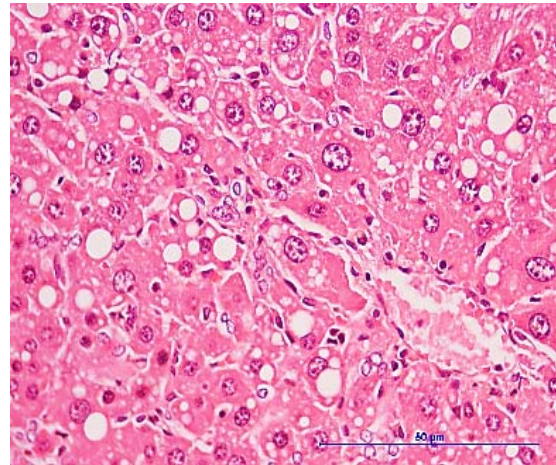
圖八、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝蘇木紫與伊紅染色 (100×)。

Figure 8. Effect of lactoferrin in high fructose syrup induced murine NAFLD on hepatic lipid accumulation. Representative photomicrograph of the hematoxylin and eosin staining (100× respectively) in liver sections.

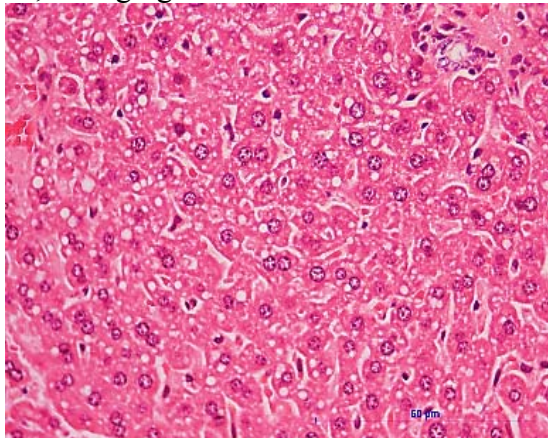
Naïve



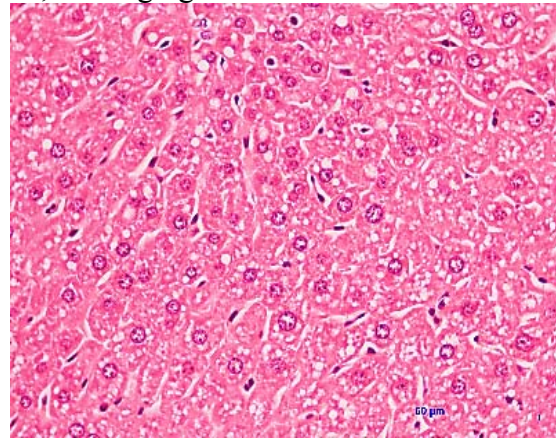
Control



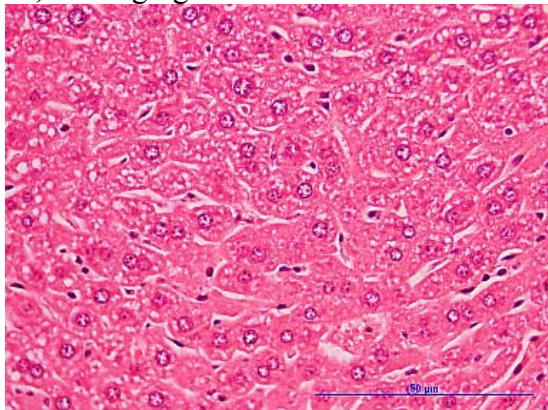
Lf, 50 mg/kg



Lf, 100 mg/kg



Lf, 200 mg/kg



圖九、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝蘇木紫與伊紅染色 (400×)。

Figure 9. Effect of lactoferrin in high fructose syrup induced murine NAFLD on hepatic lipid accumulation. Representative photomicrograph of the hematoxylin and eosin staining (400× respectively) in liver sections.

表二、乳鐵蛋白對預防高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝中組織切片評分

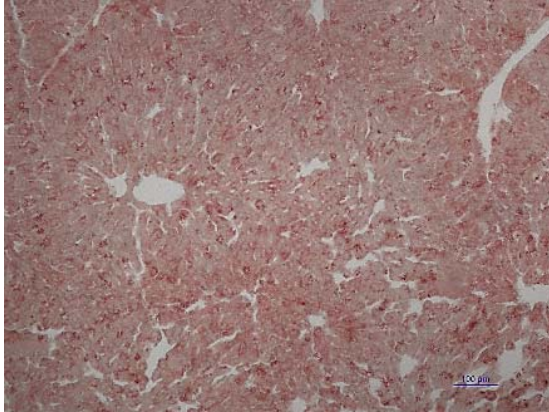
Table 2. The steatosis score of lactoferrin prevent high fructose corn syrup induced NAFLD

Group	Steatosis				Mean	P
	—	+	++	+++		
Naïve	10	0	0	0	0	
High fructose corn syrup induced NAFLD						
Control	0	0	2	8	2.8 ^{###}	0.000
Lf, 50 mg/kg	0	2	6	2	2.0 ^{**}	0.007
Lf, 100 mg/kg	0	3	7	0	1.7 ^{***}	0.000
Lf, 200 mg/kg	0	6	4	0	1.4 ^{***}	0.000

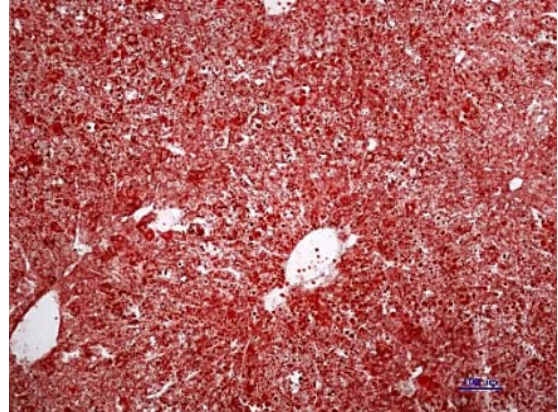
在八週的試驗後，經 30% (v/v) 高果糖飲水誘導非酒精性脂肪肝造型後對照組之小鼠肝臟組織病理評分與正常組相比有顯著性增加 ($P < 0.05$)，而在餵飼小鼠乳鐵蛋白 (50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg) 後，在小鼠肝臟組織病理評分與對照組相比可顯著性降低 ($P < 0.05$)。數據以平均值表示，病理切片之評分數據以無母數分析評估其統計差異，並以 Kolmogorov-Smirnov 進行檢定，處理組與對照組相比以^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ ，^{***} $P < 0.001$ 標示差異顯著性，對照組與空白組相比則以[#] $P < 0.05$ ，^{##} $P < 0.01$ ，^{###} $P < 0.001$ 標示差異顯著性。病理等級區分為正常(—, 0)；輕微(+, 1)；中度(++ , 2)；嚴重(+++ , 3)；

In the eight weeks administration of lactoferrin (0, 50, 100, 200 mg/kg), control group was significantly higher than naïve group in histopathological score of steatosis ($P < 0.05$). Lactoferrin treatment groups were significantly lower than control group in histopathological score of steatosis ($P < 0.05$). Data present as mean and was analyzed with Non-parametric statistics follow by Kolmogorov-Smirnov test to compare groups difference. Control vs Naïve group: [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$; Lactoferrin treatment vs Control group: ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$. Grade designation of the histological findings; (—, 0) normal, (+, 1) slight, (++, 2) moderate, (+++, 3) severe. Each value is the number of animals with grading changes.

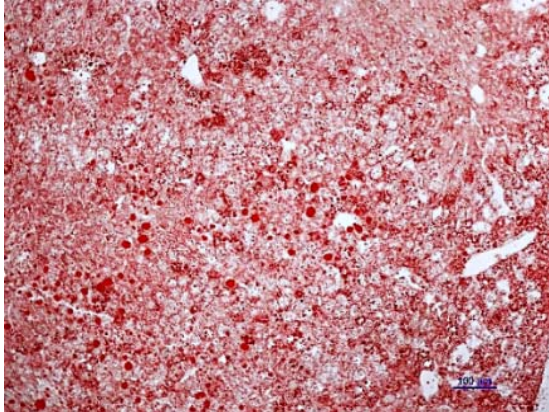
Naïve



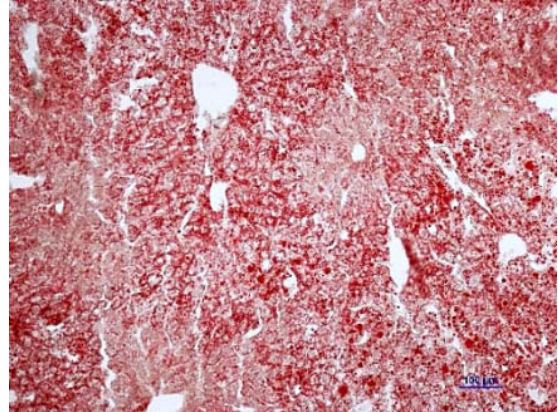
Control



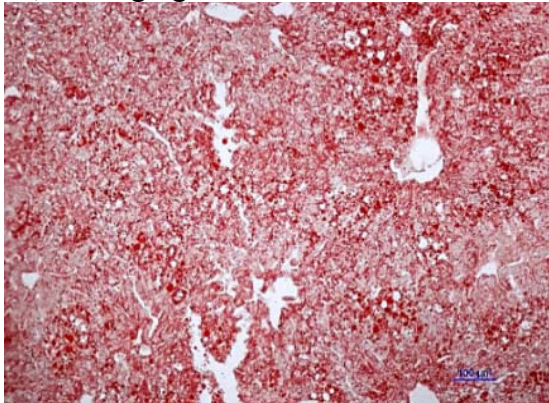
Lf, 50 mg/kg



Lf, 100 mg/kg

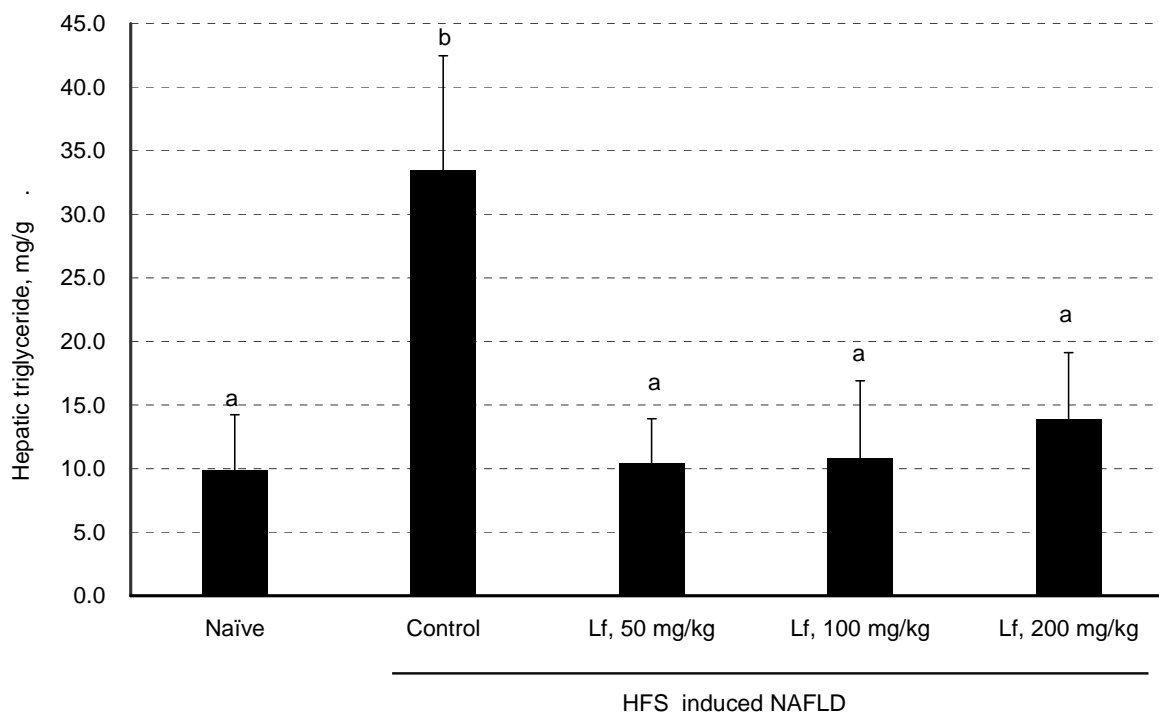


Lf, 200 mg/kg



圖十、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝油紅 O (Oil-Red O) 染色之影響。

Figure 10. Effect of lactoferrin in high fructose syrup induced murine NAFLD on hepatic lipid accumulation. Representative photomicrograph of Oil-Red O staining (100×) in liver sections.

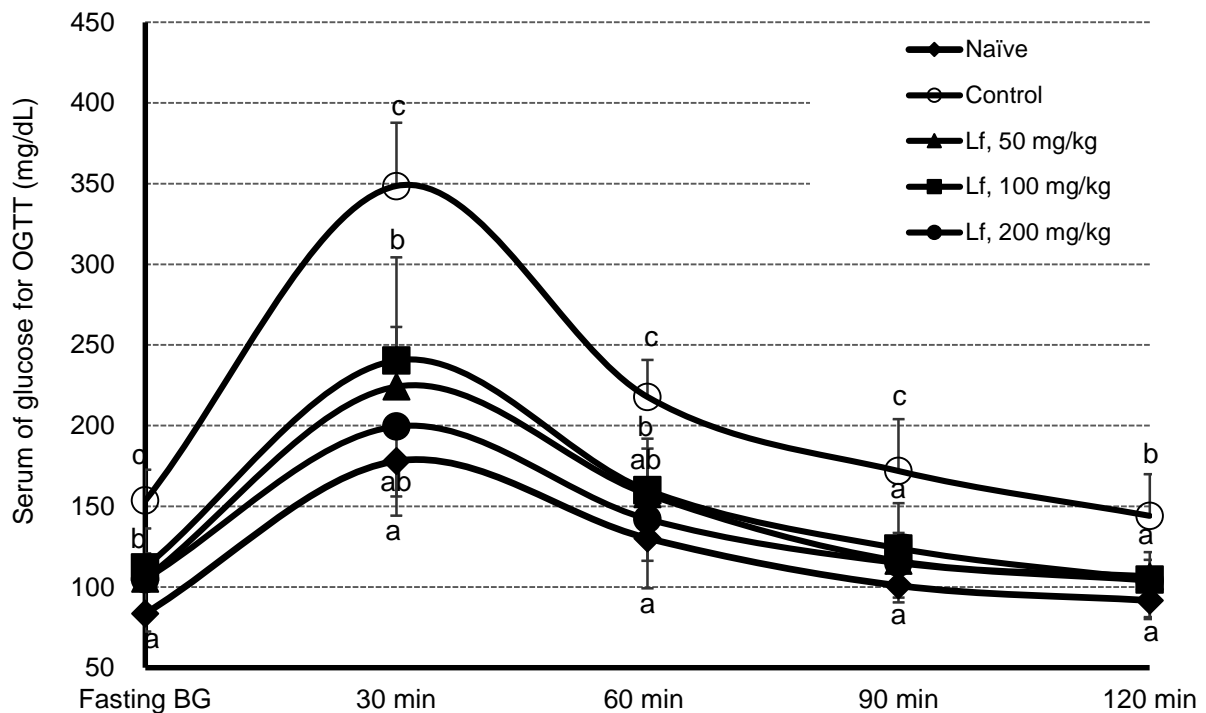


圖十一、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝中肝臟三酸甘油酯之影響。

Figure 11. Effect of lactoferrin on hepatic triglyceride (TG) in high fructose syrup induced murine NAFLD.

在八週的試驗後，經 30% (v/v) 高果糖飲水誘導非酒精性脂肪肝造型後對照組之小鼠肝臟中三酸甘油脂的含量與正常組相比有顯著性增加 ($P < 0.05$)，而在餵飼小鼠乳鐵蛋白 (50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg) 後發現可顯著性降低小鼠肝臟中三酸甘油脂 ($P < 0.05$)。數據以平均值±標準差表示，並以單因子變異數分析後再以 Duncan 多變域分析進行事後檢定。^{a-b} 上標相異字母表示同行中不同字母有顯著差異 ($P < 0.05$)。組別說明如表一所示。

In the eight weeks administration of lactoferrin (0, 50, 100, 200 mg/kg), control group was significantly higher than naïve group in hepatic triglyceride ($P < 0.05$). Lactoferrin treatment groups were significantly lower than control group in hepatic triglyceride ($P < 0.05$). Data present as mean±SD (n=10) and was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. ^{a-b}: Different letters in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$). Groups description was shown as Table 1.

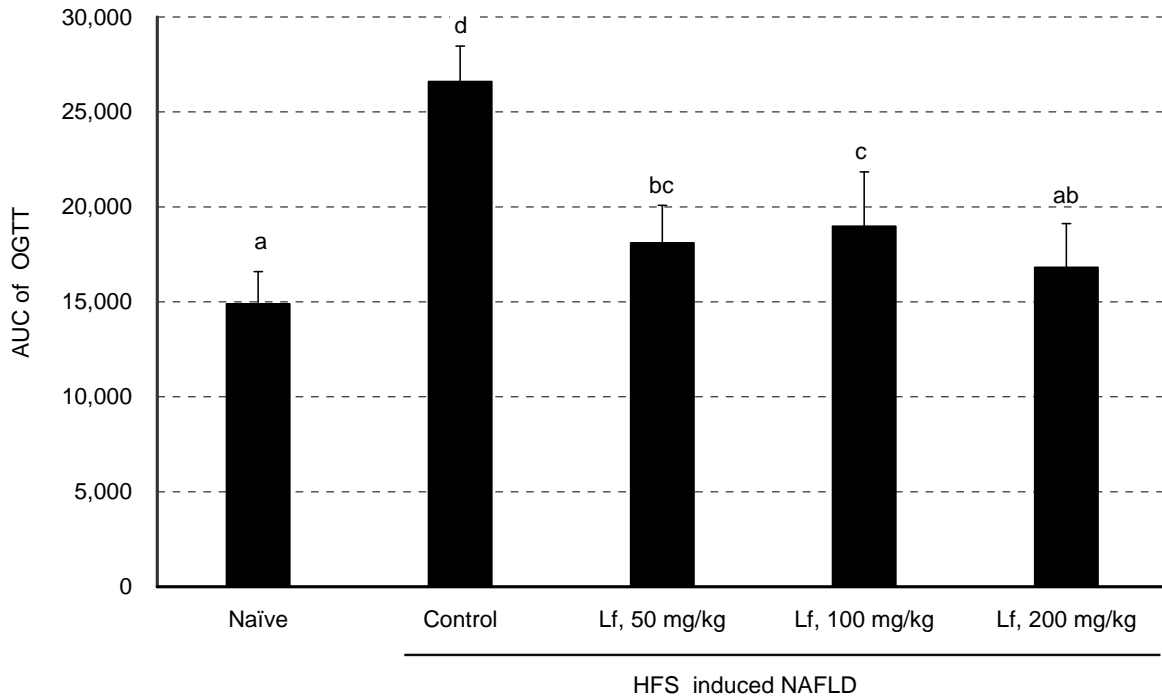


圖十二、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝中口服耐糖試驗。

Figure 12. Effect of lactoferrin on the blood glucose during an oral glucose tolerance test (OGTT) graph in high fructose syrup induced murine NAFLD.

在八週的試驗後，經 30% (v/v) 高果糖飲水誘導非酒精性脂肪肝造型後對照組之小鼠口服耐糖試驗的血糖含量與正常組相比在各時間點有顯著性增加 ($P < 0.05$)，而在餵飼小鼠乳鐵蛋白 (50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg) 後，在小鼠口服耐糖試驗的血糖含量於每個時間點發現可顯著性降低小鼠血糖 ($P < 0.05$)，Fasting BG：為與口服葡萄糖前之空腹血糖。數據以平均值±標準差表示，並以單因子變異數分析後再以 Duncan 多變域分析進行事後檢定。^{a-c} 上標相異字母表示同行中不同字母有顯著差異 ($P < 0.05$)。組別說明如表一所示。

In the eight weeks administration of lactoferrin (0, 50, 100, 200 mg/kg), control group was significantly higher than naïve group in OGTT ($P < 0.05$). Lactoferrin treatment groups were significantly lower than control group in OGTT ($P < 0.05$). Fasting BG means fasting blood glucose before oral administered glucose (2 mg/kg). Data present as mean±SD (n=10) and was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. ^{a-c}: Different letters in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$). Groups description was shown as Table 1.

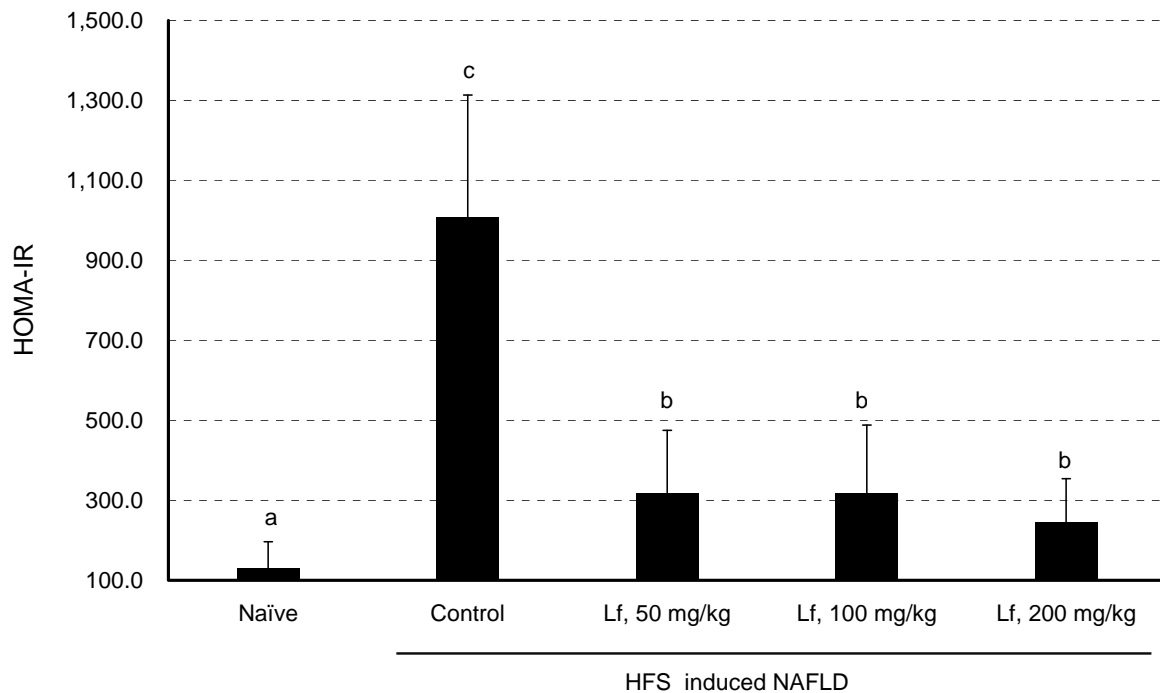


圖十三、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝之耐糖試驗的影響。

Figure 13. Effect of lactoferrin on the blood glucose during an oral glucose tolerance test (OGTT) in high fructose syrup induced murine NAFLD.

在八週的試驗後，經 30% (v/v) 高果糖飲水誘導非酒精性脂肪肝造型後對照組之小鼠口服耐糖試驗的血糖含量曲線下面積與正常組相比在各時間點有顯著性增加 ($P < 0.05$)，而在餵飼小鼠乳鐵蛋白 (50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg) 後，在小鼠口服耐糖試驗的血糖含量曲線下面積於每個時間點發現可顯著性降低 ($P < 0.05$)。數據以平均值±標準差表示，並以單因子變異數分析後再以 Duncan 多變域分析進行事後檢定。^{a-d} 上標相異字母表示同行中不同字母有顯著差異 ($P < 0.05$)。組別說明如表一所示。

In the eight weeks administration of lactoferrin (0, 50, 100, 200 mg/kg), control group was significantly higher than naïve group in AUC of OGTT ($P < 0.05$). Lactoferrin treatment groups were significantly lower than control group in AUC of OGTT ($P < 0.05$). Data present as mean±SD (n=10) and was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. ^{a-d}. Different letters in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$). Groups description was shown as Table 1.



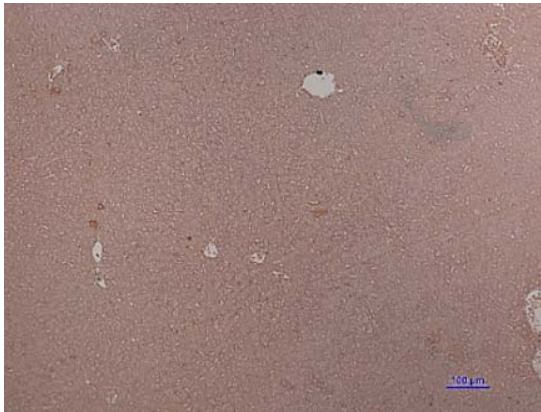
圖十四、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝中胰島素抗性之影響。

Figure 14. Effect of lactoferrin on the homeostasis model assessment for insulin resistance (HOMA-IR) in high fructose syrup induced murine NAFLD.

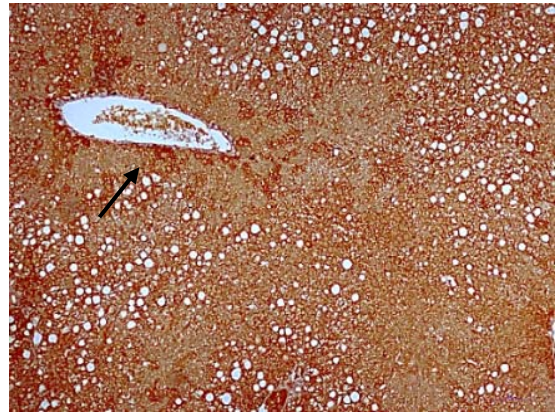
在八週的試驗後，經 30% (v/v) 高果糖飲水誘導非酒精性脂肪肝造型後對照組之小鼠胰島素抗性與正常組相比在各時間點有顯著性增加 ($P < 0.05$)，而在餵飼小鼠乳鐵蛋白 (50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg) 後，在小鼠胰島素抗性與對照組相比可顯著性降低 ($P < 0.05$)。數據以平均值±標準差表示，並以單因子變異數分析後再以 Duncan 多變域分析進行事後檢定。^{a-c} 上標相異字母表示同行中不同字母有顯著差異 ($P < 0.05$)。組別說明如表一所示。

In the eight weeks administration of lactoferrin (0, 50, 100, 200 mg/kg), control group was significantly higher than naïve group in insulin resistance (HOMA-IR) ($P < 0.05$). Lactoferrin treatment groups were significantly lower than control group in HOMA-IR ($P < 0.05$). Data present as mean±SD (n=10) and was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. ^{a-c}: Different letters in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$). Groups description was shown as Table 1.

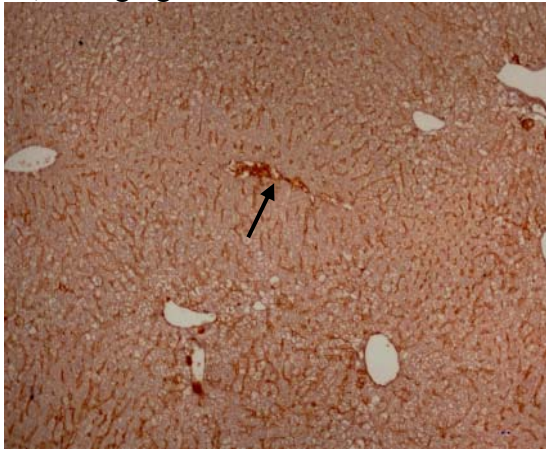
Naïve



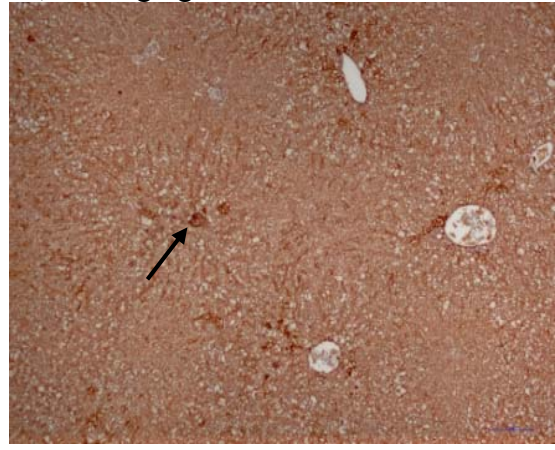
Control



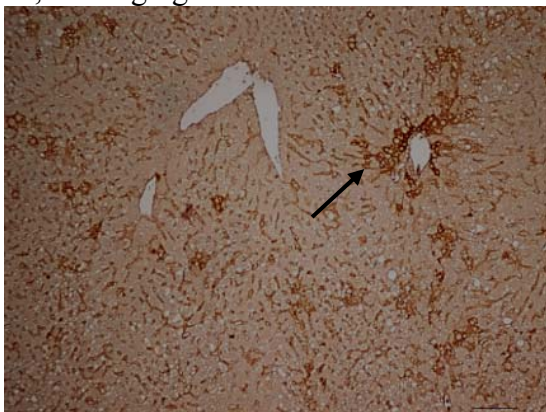
Lf, 50 mg/kg



Lf, 100 mg/kg



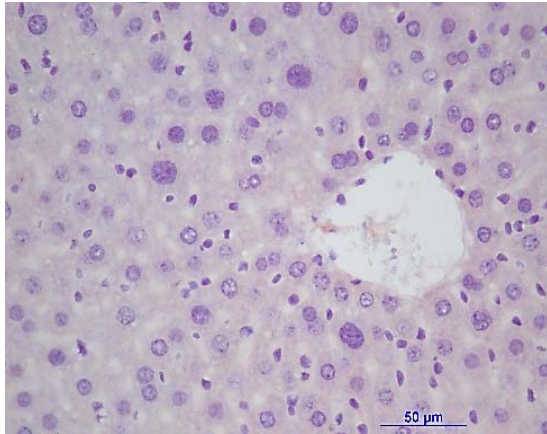
Lf, 200 mg/kg



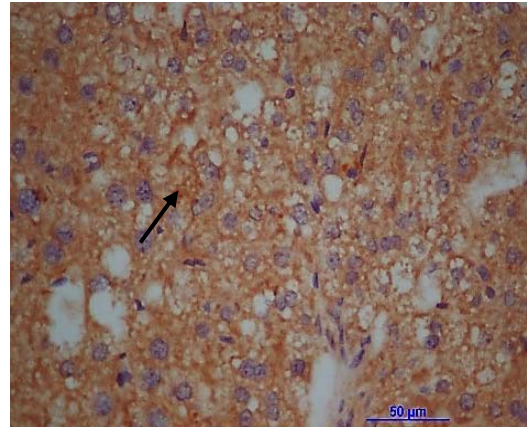
圖十五、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝切片中 4-羥基壬烯醛 (4-hydroxynonenal, 4-HNE) 免疫化學染色之影響(100×)。箭頭所指為 4-HNE 表現位置。

Figure 15. Effect of lactoferrin on the hepatic lipid peroxidation in high fructose syrup induced murine NAFLD. Photomicrograph present as immunohistochemical staining of 4-hydroxynonenal (4-HNE) adducts in liver section (100×). The arrows indicate that 4-HNE.

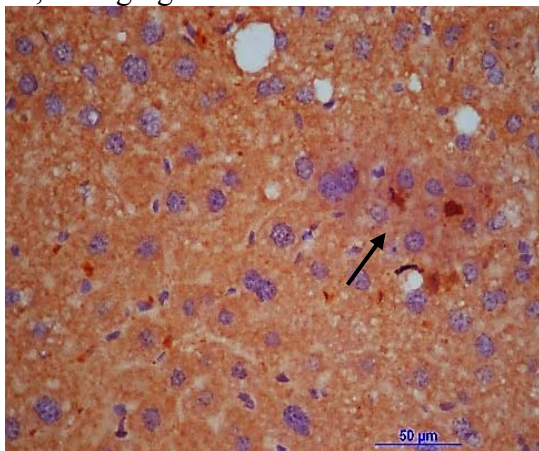
Naïve



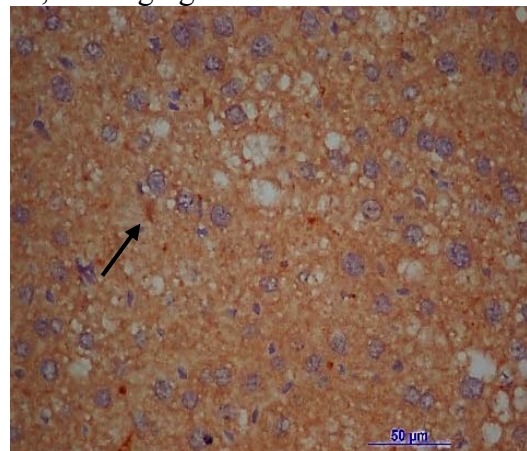
Control



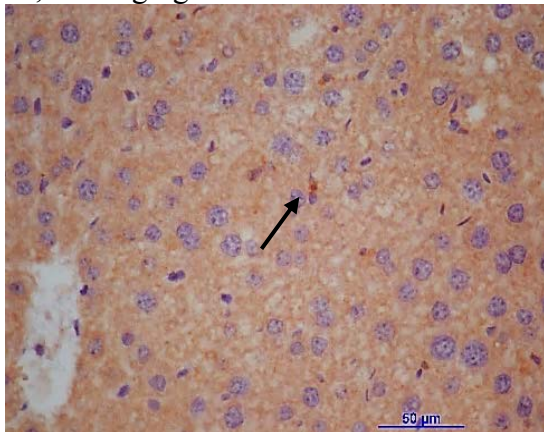
Lf, 50 mg/kg



Lf, 100 mg/kg



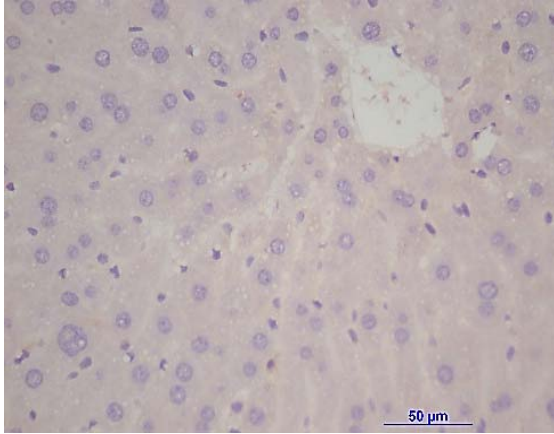
Lf, 200 mg/kg



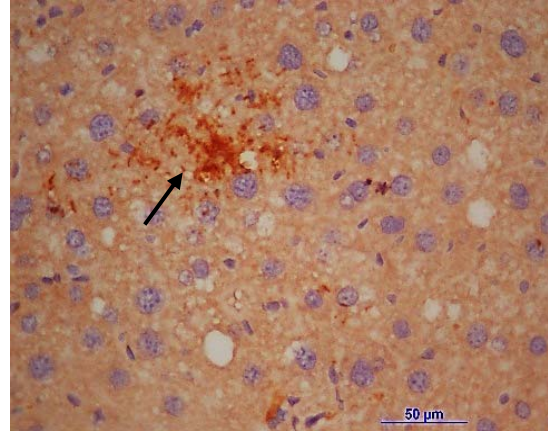
圖十六、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝切片中胸腺基質淋巴生成素 (thymic stromal lymphopoietin, TSLP) 免疫化學染色之影響(400×)。箭頭所指為 TSLP 表現位置。

Figure 16. Effect of lactoferrin on the hepatic thymic stromal lymphopoietin (TSLP) levels in high fructose syrup induced murine NAFLD. Photomicrograph present as immunohistochemical staining of TSLP in liver section (400×). The arrows indicate that TSLP.

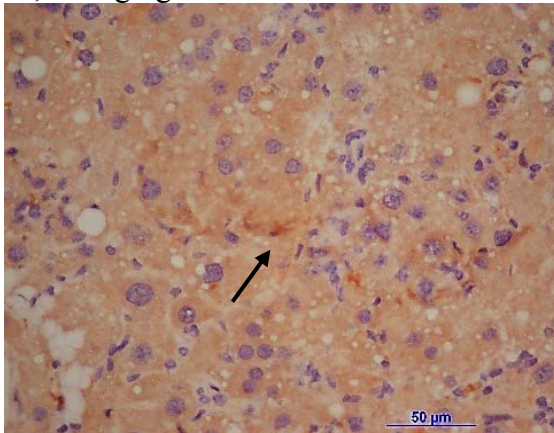
Naïve



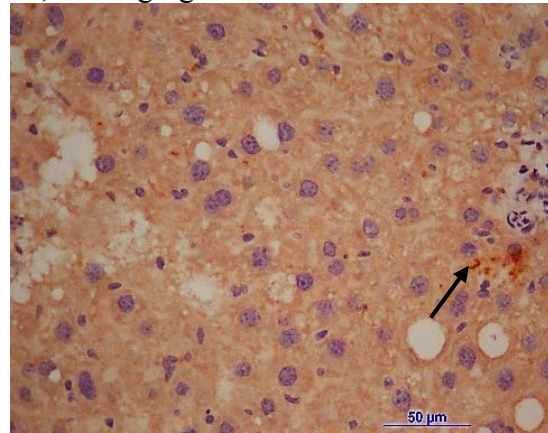
Control



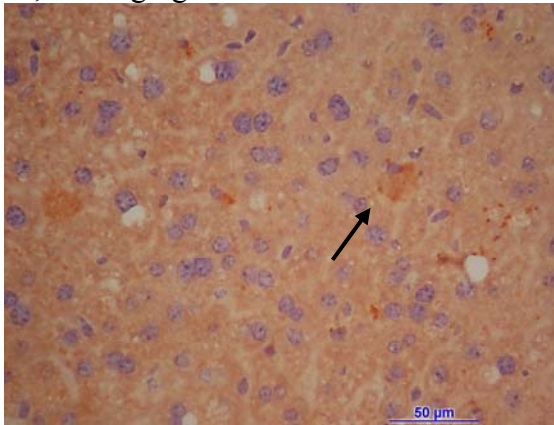
Lf, 50 mg/kg



Lf, 100 mg/kg



Lf, 200 mg/kg



圖十七、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝切片中類鐸受體-4 (Toll-like receptor, TLR-4)免疫化學染色之影響(400×)。箭頭所指為 TLR-4 表現位置。

Figure 17. Effect of Lactoferrin on the hepatic Toll-like receptor (TLR-4) levels in high fructose syrup induced murine NAFLD. Photomicrograph present as immunohistochemical staining of TLR-4 in liver section (400×). The arrows indicate that TLR-4.

表三、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝中肝臟細胞激素 IL-33 與 TSLP 分泌之影響

Table 3. Effect of lactoferrin in high fructose syrup induced murine NAFLD on the epithelial relative cytokines secretion (IL-33, TSLP)

Group	IL-33 (ng/g)	TSLP (ng/g)
Naïve	276.28 ± 124.14 ^a	81.85 ± 17.34 ^a
High fructose corn syrup induced NAFLD		
Control	431.81 ± 192.82 ^b	133.71 ± 36.57 ^b
Lf, 50 mg/kg	266.60 ± 72.96 ^a	100.76 ± 40.57 ^a
Lf, 100 mg/kg	233.24 ± 96.70 ^a	83.45 ± 42.95 ^a
Lf, 200 mg/kg	261.75 ± 100.83 ^a	92.97 ± 39.87 ^a

在八週的試驗後，經 30% (v/v) 高果糖飲水誘導非酒精性脂肪肝造型後對照組之小鼠肝臟上皮細胞關聯細胞激素 IL-33 與 TSLP 與正常組相比在各時間點有顯著性增加 ($P < 0.05$)，而在餵飼小鼠乳鐵蛋白 (50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg) 後，在小鼠肝臟上皮細胞關聯細胞激素 IL-33 與 TSLP 與對照組相比可顯著性降低 ($P < 0.05$)。數據以平均值±標準差表示，並以單因子變異數分析後再以 Duncan 多變域分析進行事後檢定。^{a-b} 上標相異字母表示同行中不同字母有顯著差異($P < 0.05$)。組別說明如表一所示。

In the eight weeks administration of lactoferrin (0, 50, 100, 200 mg/kg), control group was significantly higher than naïve group in epithelium derived cytokines (IL-33 and TSLP) ($P < 0.05$). Lactoferrin treatment groups were significantly lower than control group in IL-33 and TSLP ($P < 0.05$). Data present as mean±SD (n=10) and was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. ^{a-b}: Different letters in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$). Groups description was shown as Table 1.

表四、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝中肝臟第二型細胞激素 IL-4 與 IL-13 分泌之影響

Table 4. Effect of lactoferrin in high fructose syrup induced murine NAFLD on the type-2 cytokines secretion (IL-4, IL-13)

Group	IL-4 (ng/g)	IL-13 (μg/g)
Naïve	50.91 ± 26.89 ^a	14.57 ± 6.05 ^a

High fructose corn syrup induced NAFLD		
Control	117.50 ± 41.11 ^b	24.46 ± 7.90 ^b
Lf, 50 mg/kg	76.81 ± 16.67 ^a	16.47 ± 2.71 ^a
Lf, 100 mg/kg	66.93 ± 30.97 ^a	15.66 ± 5.65 ^a
Lf, 200 mg/kg	69.10 ± 23.25 ^a	15.33 ± 5.26 ^a

在八週的試驗後，經 30% (v/v) 高果糖飲水誘導非酒精性脂肪肝造型後對照組之小鼠肝臟第二型細胞激素 IL-4 與 IL-13 與正常組相比在各時間點有顯著性增加 ($P < 0.05$)，而在餵飼小鼠乳鐵蛋白 (50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg) 後，在小鼠肝臟第二型細胞激素 IL-4 與 IL-13 與對照組相比可顯著性降低 ($P < 0.05$)。數據以平均值±標準差表示，並以單因子變異數分析後再以 Duncan 多變域分析進行事後檢定。^{a-b} 上標相異字母表示同行中不同字母有顯著差異($P < 0.05$)。組別說明如表一所示。

In the eight weeks administration of lactoferrin (0, 50, 100, 200 mg/kg), control group was significantly higher than naïve group in type-2 cytokines (IL-4 and IL-13) ($P < 0.05$). Lactoferrin treatment groups were significantly lower than control group in IL-4 and IL-13 ($P < 0.05$). Data present as mean±SD (n=10) and was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. ^{a-b}: Different letters in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$). Groups description was shown as Table 1.

表五、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝中肝臟促發炎細胞激素 IL-1 β , IL-6, TNF- α 與 MCP-1 分泌之影響

Table 5. Effect of lactoferrin in high fructose syrup induced murine NAFLD on the hepatic pro-inflammatory cytokines secretion (IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1)

Group	IL-1 β (ng/g)	IL-6 (ng/g)	TNF- α (ng/g)	MCP-1 (ng/g)
Naïve	53.26 \pm 30.50 ^a	16.78 \pm 4.63 ^a	97.90 \pm 66.39 ^a	114.96 \pm 64.78 ^a
High fructose corn syrup induced NAFLD				
Control	132.39 \pm 63.95 ^b	23.76 \pm 6.21 ^b	175.22 \pm 63.86 ^b	223.73 \pm 55.21 ^b
Lf, 50 mg/kg	54.75 \pm 15.97 ^a	20.47 \pm 8.63 ^{ab}	109.81 \pm 41.66 ^a	133.85 \pm 26.48 ^a
Lf, 100 mg/kg	57.83 \pm 24.31 ^a	15.76 \pm 4.62 ^a	93.94 \pm 24.31 ^a	128.01 \pm 65.83 ^a
Lf, 200 mg/kg	40.58 \pm 18.96 ^a	18.79 \pm 3.64 ^{ab}	121.37 \pm 52.68 ^a	142.33 \pm 44.27 ^a

在八週的試驗後，經 30% (v/v) 高果糖飲水誘導非酒精性脂肪肝造型後對照組之小鼠肝臟促發炎細胞激素 IL-1 β , IL-6, TNF- α 與 MCP-1 與正常組相比在各時間點有顯著性增加 ($P < 0.05$)，而在餵飼小鼠乳鐵蛋白 (50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg) 後，在小鼠肝臟促發炎細胞激素 IL-1 β , TNF- α 與 MCP-1 與對照組相比可顯著性降低 ($P < 0.05$)，IL-6 僅在 LF (100 mg/kg) 餵飼組與對照組相比顯著性差異 ($P < 0.05$)。數據以平均值 \pm 標準差表示，並以單因子變異數分析後再以 Duncan 多變域分析進行事後檢定。^{a-b} 上標相異字母表示同行中不同字母有顯著差異 ($P < 0.05$)。組別說明如表一所示。

In the eight weeks administration of lactoferrin (0, 50, 100, 200 mg/kg), control group was significantly higher than naïve group in pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α and MCP-1) ($P < 0.05$). Lactoferrin treatment groups (50, 100, 200 mg/kg) were significantly lower than control group in IL-1 β , TNF- α and MCP-1 ($P < 0.05$). Lactoferrin treatment group (100 mg/kg) were significantly lower than control group in IL-6 ($P < 0.05$). Data present as mean \pm SD (n=10) and was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. ^{a-b}: Different letters in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$). Groups description was shown as Table 1.

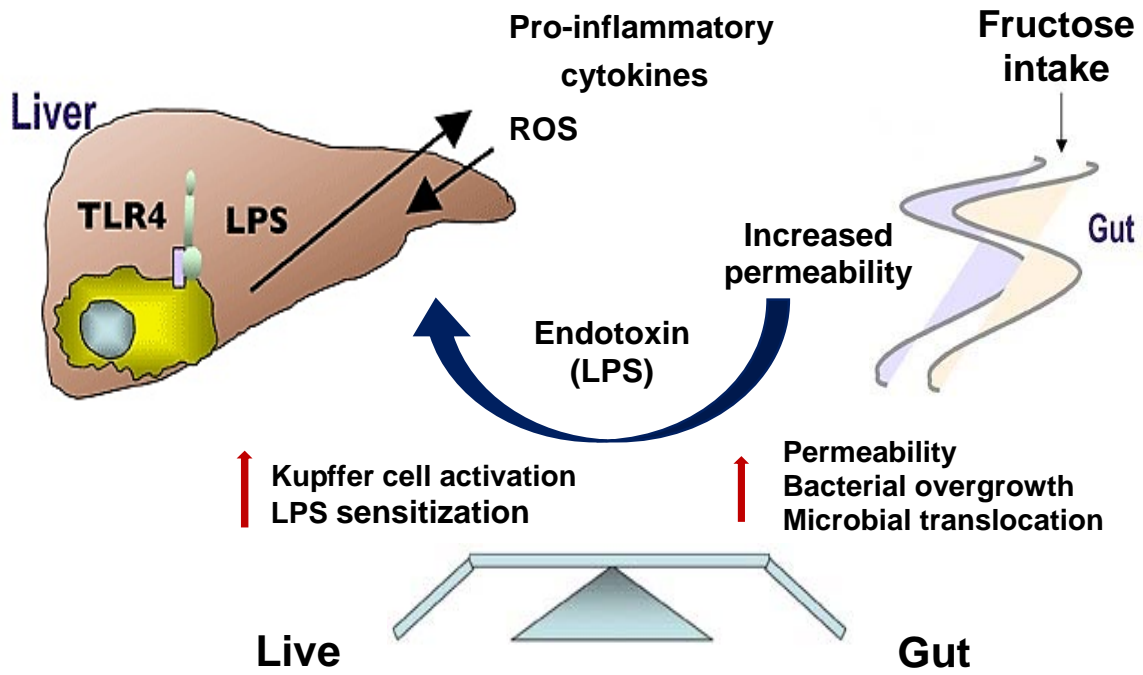
表六、乳鐵蛋白對高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝之肝臟中抗發炎脂肪細胞激素 (adiponectin) 分泌之影響

Table 6. Effect of lactoferrin in high fructose syrup induced murine NAFLD on the hepatic anti-inflammatory adipokines secretion (adiponectin)

Group	adiponectin (mg/g)
Naïve	5.18 ± 1.10 ^c
High fructose corn syrup induced NAFLD	
Control	3.75 ± 1.32 ^a
Lf, 50 mg/kg	4.28 ± 1.23 ^{ab}
Lf, 100 mg/kg	4.90 ± 0.69 ^{bc}
Lf, 200 mg/kg	5.67 ± 0.87 ^c

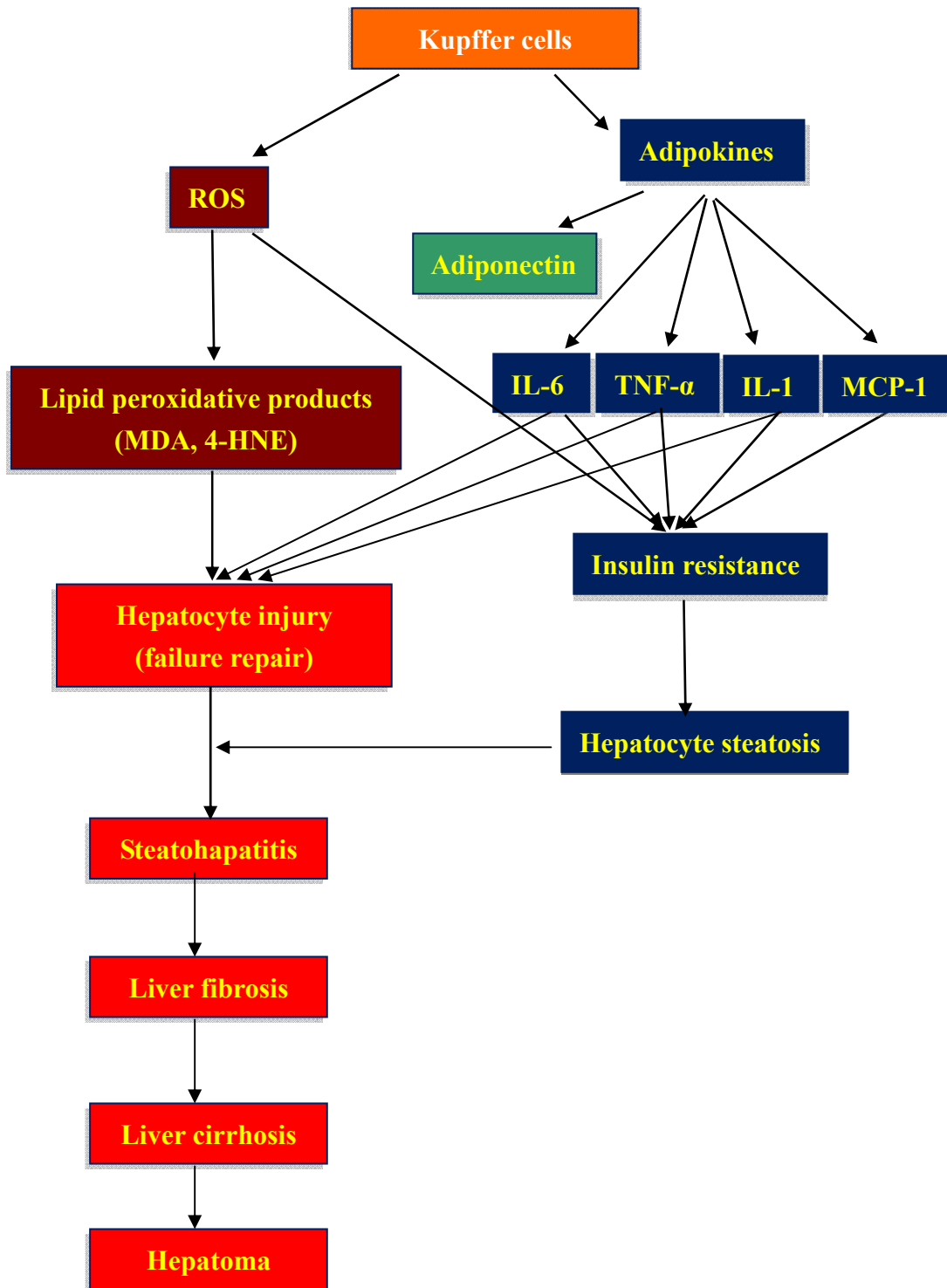
在八週的試驗後，經 30% (v/v) 高果糖飲水誘導非酒精性脂肪肝造型後對照組之小鼠肝臟抗發炎脂肪細胞激素 adiponectin 與正常組相比在各時間點有顯著性降低 ($P < 0.05$)，而在餵飼小鼠乳鐵蛋白 (50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg) 後，在小鼠肝臟抗發炎脂肪細胞激素 adiponectin 與對照組相比可顯著性升高 ($P < 0.05$)。數據以平均值±標準差表示，並以單因子變異數分析後再以 Duncan 多變域分析進行事後檢定。^{a-c} 上標相異字母表示同行中不同字母有顯著差異 ($P < 0.05$)。組別說明如表一所示。

In the eight weeks administration of lactoferrin (0, 50, 100, 200 mg/kg), control group was significantly higher than naïve group in anti-inflammatory adipokine (adiponectin) ($P < 0.05$). Lactoferrin treatment groups (100, 200 mg/kg) were significantly lower than control group in adiponectin ($P < 0.05$). Data present as mean±SD (n=10) and was analyzed with One-way ANOVA and tested with Duncan's Multiple Range Test. ^{a-b}: Different letters in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$). Groups description was shown as Table 1.

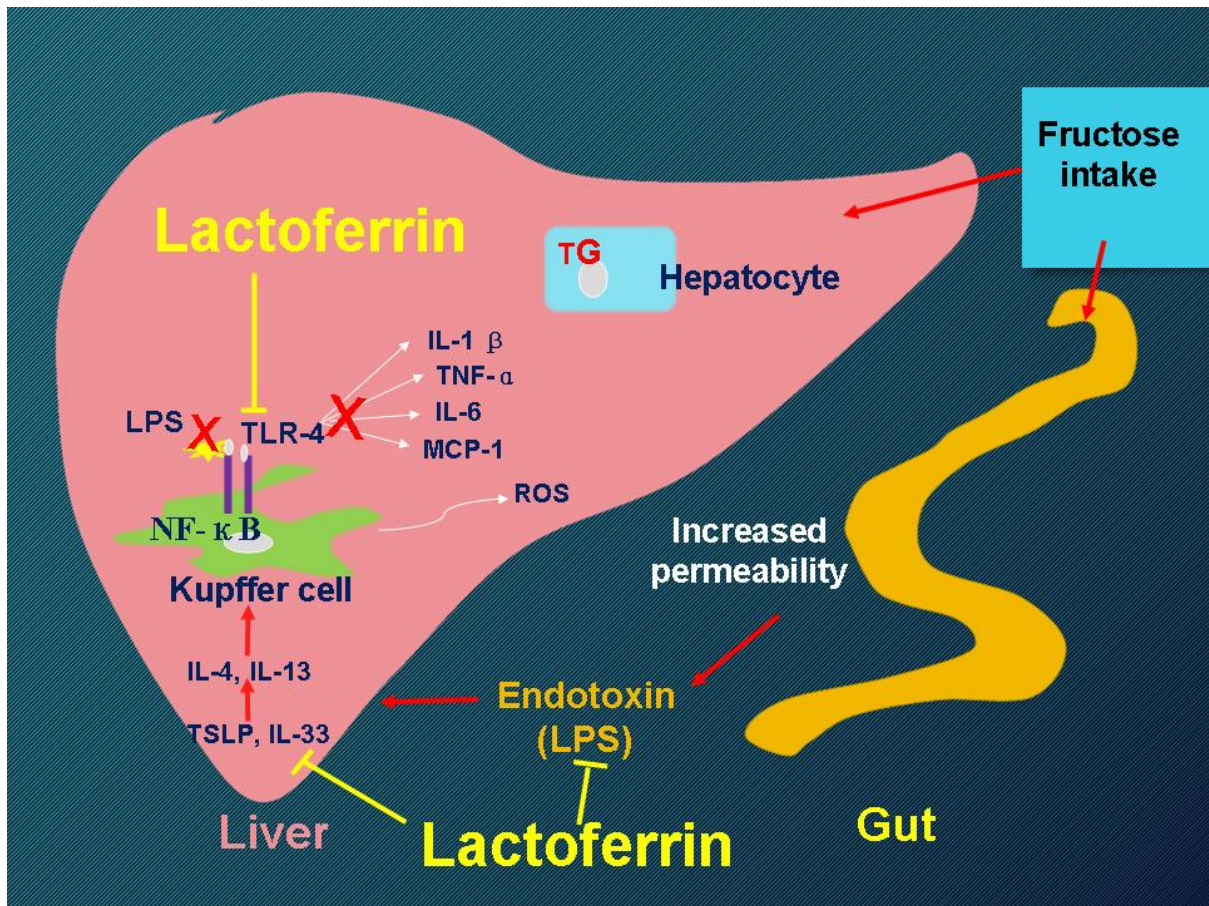


圖十八、高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝的機制。

Figure 18. The mechanism for high fructose syrup induced murine NAFLD.



圖十九、庫氏細胞活化對肝臟發炎的影響。
 Figure 19. Effect of Kupffer cell activation for liver inflammation.



圖二十、乳鐵蛋白調節高果糖漿誘導小鼠非酒精性脂肪肝之機制。
 Figure 20. The regulatory mechanism of lactoferrin in high fructose corn syrup induced murine NAFLD.