

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：楊錫坤 博士

謝長奇 博士

Advisor: Shyi-Kuen Yang, Ph. D.

Chang-Chi Hsieh, Ph. D.

台灣水鹿鹿茸對小鼠非酒精性脂肪肝之保護作用

The prevention of nonalcoholic fatty liver disease by the velvet

antler of Formosan sambar deer in mice

研究生：廖君涵 撰

Graduate student: Chun-Han Liao

中華民國一〇四年七月

July, 2015

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：楊錫坤 博士

謝長奇 博士

Advisor: Shyi-Kuen Yang, Ph. D.

Chang-Chi Hsieh, Ph. D.

台灣水鹿鹿茸對小鼠非酒精性脂肪肝之保護作用

The prevention of nonalcoholic fatty liver disease by the velvet

antler of Formosan sambar deer in mice

研究生：廖君涵 撰

Graduate student: Chun-Han Liao

中華民國一〇四年七月

July, 2015

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 廖君涵(學號 G02610002) 君所
提之論文：

台灣水鹿鹿茸對小鼠非酒精性脂肪肝之保護作用，經
本委員會審議，認為符合碩士資格標準。

論文指導教授 楊錫坤 (簽章)

共同指導教授 謝長奇 (簽章)

畜產與生物科技學系主任 羅敏文 (簽章)

考試委員 林文川：林文川 (簽章)

楊錫坤：楊錫坤 (簽章)

謝長奇：謝長奇 (簽章)

_____ (簽章)

中華民國 104 年 7 月 3 日

致謝

感謝恩師 楊錫坤教授、謝長奇教授於在學期間，除了課業上的指導外，也時常警惕我作為一個研究生該有的學習態度，並教導我許多待人處事的方法。感謝中國醫藥大學林文川教授對本論文之撥冗審查。感謝修業期間系所內諸位老師及助教之鼓勵與指導。除此之外，在論文之實驗及寫作方面，也很感謝老師們詳盡的指導，僅此致上萬分的謝意。

感謝鹿舍基因轉殖實驗室的夥伴雅雅、至傑、家豪、瑞瑞，除了對我實驗操作的協助之外，在航行碩士生涯這艘船，也為我瞻前顧後，好讓航行的日子平穩妥當，謝謝有他們的故事。

感謝學長姐治暄、婕妤、佑軒、秀芳、炯呈、宜潔、定邦、羽萱在實驗技術之指導。感謝同學維儒、介文、學弟妹浩仁、明俊、宴宏、迪鈞、育佑、芷妤、維德、沁玲、佳文、羿菲及食科系同學宥勝、健峰在實驗上的協助。感謝同學育婷、冠彰、峻賢、正耀、昱韶、慶安、泰穎及室友筱燕、滢喬、俞汎在生活上的協助與關心。感謝肉品加工實驗室的學長韋融、聖諭及學弟博凱，在我剛進入東海大學，對於周邊環境還不熟悉時，給予熱情的照顧，在此致上我最深的謝意。

由衷感謝父母與家人的支持與栽培，而得以順利完成學業。謹以此論文獻給我摯愛的家人及幫助過我的師長與朋友們。

目錄

| | |
|--|----|
| 壹、 摘要 | 1 |
| 貳、 前言 | 2 |
| 參、 文獻回顧 | 4 |
| 一、 肝臟之功能及代謝性傷害 | 4 |
| (一) 肝臟之碳水化合物代謝 | 4 |
| (二) 肝臟之脂肪代謝 | 6 |
| (三) 肝臟對蛋白質及胺基酸之代謝 | 12 |
| (四) 果糖對肝臟之損害 | 14 |
| (五) 高脂肪飲食對肝臟之損害 | 17 |
| (六) 非酒精性脂肪肝疾病之成因 | 18 |
| (七) 發炎與肝臟病變的關係 | 19 |
| 二、 鹿茸之安全與應用 | 23 |
| (一) 鹿茸之解剖與生理 | 23 |
| (二) 鹿茸之組成分 | 26 |
| (三) 鹿茸之藥理作用 | 29 |
| (四) 鹿茸之毒性與副作用 | 33 |
| 肆、 研究目的與動機 | 34 |
| 伍、 材料與方法 | 35 |
| 一、 藥品材料 | 35 |
| 二、 實驗方法 | 37 |
| (一) 鹿茸萃取物製備流程 | 37 |
| (二) 鹿茸萃取物胺基酸含量之 HPLC (high performance liquid chromatography) 分析 | 37 |
| (三) 動物飼養與試驗分組 | 40 |

| | |
|--|----|
| (四) 脂肪肝造型模式 | 41 |
| (五) 血液採集與血清分離 | 41 |
| (六) 口服葡萄糖耐受性試驗 | 41 |
| (七) 血清胰島素含量測定 | 41 |
| (八) 血清中 AST (aspartate aminotransferase) 活性測定 | 42 |
| (九) 血清中 ALT (alanine aminotransferase) 活性測定 | 42 |
| (十) 血清中三酸甘油酯濃度測定 | 42 |
| (十一) 血清中總膽固醇濃度測定 | 42 |
| (十二) HOMA-IR 計算 | 43 |
| (十三) 肝臟組織學檢查 | 43 |
| (十四) 肝臟三酸甘油酯及總膽固醇濃度分析 | 44 |
| (十五) 肝臟細胞激素濃度測定 | 44 |
| 三、統計分析 | 45 |
| 陸、 結果 | 46 |
| 一、鹿茸胺基酸成分分析 | 46 |
| 二、鹿茸對非酒精性脂肪肝疾病之保護作用 | 47 |
| (一) 小鼠之體重、總增重、臟器與脂肪重量 | 47 |
| (二) 口服葡萄糖耐受性試驗 | 50 |
| (三) 胰島素敏感性 | 52 |
| (四) 肝臟內三酸甘油酯及總膽固醇濃度 | 53 |
| (五) 血清中三酸甘油酯及總膽固醇濃度 | 54 |
| (六) 血清肝功能指標測定 | 55 |
| (七) 肝臟外觀形態圖 | 56 |
| (八) 肝臟病理組織學檢查 | 57 |
| (九) 肝臟細胞激素 (TNF- α 、IL-6、CCL2、IL-33、TSLP) | 59 |
| 柒、 討論 | 60 |

| | |
|---------------------|----|
| 捌、 結論 | 66 |
| 玖、 參考文獻 | 67 |
| Abstract | 92 |
| 壹拾、 小傳 | 93 |
| 壹拾壹、 附件 | 94 |
| 附件一、實驗動物審查同意書 | 94 |
| 附件二、生醫年會摘要 | 95 |

表次

| | |
|--|----|
| 表 1、藥品與材料之來源 | 35 |
| 表 2、儀器廠家 | 36 |
| 表 3、標準品配製 | 38 |
| 表 4、沖提梯度 | 39 |
| 表 5、鹿茸萃取液之胺基酸成分 | 46 |
| 表 6、鹿茸萃取液對高果糖高脂飼料誘導小鼠非酒精性脂肪肝疾病中增重與肝臟、 脾臟及腎臟重量之影響 | 48 |
| 表 7、鹿茸萃取液對高果糖高脂飼料誘導小鼠非酒精性脂肪肝疾病中腹部、附睪及 腎周脂肪重量之影響 | 49 |
| 表 8、鹿茸萃取液對高果糖高脂飼料誘導小鼠非酒精性脂肪肝疾病中空腹血清胰島 素濃度及 HOMA-IR 值之影響 | 52 |
| 表 9、鹿茸萃取液對高果糖高脂飼料誘導小鼠非酒精性脂肪肝疾病中肝臟內三酸甘 油酯及總膽固醇濃度之影響 | 53 |
| 表 10、鹿茸萃取液對高果糖高脂飼料誘導小鼠非酒精性脂肪肝疾病中血清三酸甘 油酯及總膽固醇濃度之影響 | 54 |
| 表 11、鹿茸萃取液對高果糖高脂飼料誘導小鼠非酒精性脂肪肝疾病中血清 AST 及 ALT 活性之影響 | 55 |
| 表 12、鹿茸萃取液對高果糖高脂飼料誘導小鼠非酒精性脂肪肝疾病中肝臟內細胞 激素分泌之影響 | 59 |
| 表 13、胺基酸對肝臟之益處 | 64 |

圖目錄

| | |
|--|----|
| 圖 1、脂質之代謝 | 9 |
| 圖 2、果糖在肝臟之代謝途徑 | 16 |
| 圖 3、鹿茸萃取液對高果糖高脂飼料誘導小鼠非酒精性脂肪肝疾病中體重變化之影響 | 48 |
| 圖 4、鹿茸萃取液對高果糖高脂飼料誘導小鼠非酒精性脂肪肝疾病中口服葡萄糖耐受性試驗之影響 | 51 |
| 圖 5、鹿茸萃取液對高果糖高脂飼料誘導小鼠非酒精性脂肪肝疾病中肝臟外觀之影響 | 56 |
| 圖 6、鹿茸萃取液對高果糖高脂飼料誘導小鼠非酒精性脂肪肝疾病中肝臟切片組織學之影響。 | 58 |

壹、 摘要

非酒精性脂肪肝疾病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是世界上常見的肝臟疾病之一，其致病原因可歸納為脂肪酸合成增加或脂肪酸分解減低。高比例之非酒精性脂肪肝將發展為肝纖維化、肝硬化甚至肝癌。鹿茸被作為傳統中藥材及健康食品已長達兩千年，本研究乃在探討台灣水鹿鹿茸萃取液是否以及如何降低小鼠非酒精性脂肪肝之形成。將雄性 C57BL/6JNarl 小鼠分成五組：正常組、對照組及三個處理組 (每日分別給予 100、200、400 mg/kg 之鹿茸醋萃取液)，其中對照組和三個處理組皆藉由飼予高果糖玉米糖漿及高脂飼料誘導出非酒精性脂肪肝，而正常組則給予蒸餾水及標準飼料。結果顯示對照組之體重顯著較正常組者為高，且顯現出許多 NAFLD 之特徵。雖然對照組與處理組之體重、脾臟、腎臟、肝臟重量皆無顯著差異，但與對照組相比，鹿茸萃取物能顯著降低小鼠血清中 ALT、AST 值以及肝臟中 TNF- α 、IL-6、TSLP、IL-33、CCL2 和三酸甘油脂的含量。另外，組織學檢查顯示中鹿茸萃取液可緩解高果糖玉米糖漿及高脂飼料所引起之脂肪肝。因此，鹿茸萃取液也許可以預防高脂高果糖飲食所引起之脂肪肝疾病。

(關鍵字：抗發炎、小鼠、非酒精性脂肪肝、鹿茸)

貳、 前言

肝臟是參與人體內代謝功能之重要器官，成人之肝臟重約 1.0-2.5 kg，約為體重的 1/50。肝臟具有五大生理功能，包含生產(合成)、加工(轉化)、解毒、排泄及儲存(調節代謝)。我們每天所攝入之食物經消化之後，大部分的產物會直接進入肝臟，經由生化反應產生營養素，以維持身體正常之運作。因此，若肝臟機能受損，將會導致藥物、食品毒素、代謝廢物、酒精代謝等生化反應受到阻礙。當血液中三酸甘油脂含量過高，而以脂肪的形式堆積在肝臟時，即稱之為脂肪肝。根據 103 年行政院衛生福利部統計資料中指出，國人十大死因以慢性疾病為主，其中包含慢性肝病及肝硬化。脂肪肝可分為酒精性脂肪肝疾病與非酒精性脂肪肝疾病。非酒精性脂肪肝疾病 (Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是最常見的肝臟疾病，通常伴隨著代謝綜合徵候。隨著嚴重程度與進程，又可分為脂肪肝 (fatty liver)、非酒精性脂肪肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis, NASH)、肝纖維化 (liver fibrosis)、肝硬化 (liver cirrhosis) 等。這些疾病的產生可能與西式飲食的盛行、果糖攝取量之增加有關。Day and James 在 1998 年提出“二次打擊”假說 (“two-hit” hypothesis) 解釋 NASH 發生之過程。在此假說中，第一擊是脂肪肝之發生，它使肝臟對第二擊更加敏感；第二擊則導致肝細胞損傷、發炎，最後纖維變性，而其中有 15-20% 的肝纖維化患者甚至會造成肝硬化及肝癌。

鹿茸作為傳統的中藥材已有 2000 年以上之歷史 (Gilbey and Perezgonzalez, 2012; Kawtikwar et al., 2010)。鹿茸主要是由蛋白質、脂質、礦物質及水分所組成，內含微量元素、胺基酸、多肽、蛋白質、脂肪酸、磷脂和醣類等具有作用之物質，且這些成分會隨著鹿茸的生長而產生改變。由於鹿茸具有多種活性成分，故在多方面皆具有療效，包含調節免疫系統、抗老化、抗疲勞、抗癌、抗骨鬆、抗發炎、抗氧化、促進傷口癒合及再生，以及抗心臟衰竭等 (Sui et al., 2014)。抗發炎、抗氧化是許多護肝健康食品之理論依據。研究指出，在口服給予雄性老化小鼠梅花鹿鹿

茸水萃液後，其肝臟中超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 之活性會顯著較對照組者為高 (Wang et al., 1988)。高劑量的鹿茸水萃液，不論是冷水萃取或沸水萃取，皆顯著抑制了小鼠巨噬細胞中 TNF- α 和 IL-6 的分泌量 (Dai et al., 2011)。因此本論文藉由飼予 30% 高果糖玉米糖漿及 60% 高脂飼料誘導小鼠非酒精性脂肪肝疾病，並於此過程中同時給予鹿茸萃液，藉此探討台灣水鹿鹿茸對非酒精性脂肪肝小鼠是否具有保護作用，並探討其分子調節機制。

參、 文獻回顧

一、肝臟之功能及代謝性傷害

(一) 肝臟之碳水化合物代謝

肝糖 (glycogen) 是葡萄糖藉 α -(1,4)-與 α -(1,6)-糖苷鍵聚合而成之多醣，主要存在於肝臟與肌肉，少量存在於腎臟與腸道。肝糖之原狀穩定 (Homeostasis) 涉及肝糖之合成與降解。肝糖合成 (glycogen synthesis) 之過程需要能量的攝入，而能量則來自於尿苷三磷酸 (uridine triphosphate, UTP)。UTP 在 UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase 的催化下，可與 Glucose-1-phosphate (G1P) 形成 UDP-glucose (UDPG)。UDPG 在肝糖合成酶 (glycogen synthase) 之催化下，與肝糖進行 α -1,4 鍵結，使肝糖增加長度。肝糖 α -1,6 分枝是由肝糖分枝酶 (glycogen branching enzyme) 所催化。此酶將 6-7 個葡萄糖從 11 個葡萄糖以上之聚醣轉移至 C-6 羥基上。肝糖合成酶只能將肝糖延長，不能將單體 (monomer) 直接聚合成多醣，而單體葡萄糖之聚合有賴於 glycogenin 之作用。glycogenin 是一種同質雙聚體 (homodimer) 蛋白質，可自我催化 (self-catalyze) 其本身之醣苷化作用 (glycosylation)，而將 UDPG 之 C1 附著至其酪胺酸殘基。再將 7-11 個 UDPG (平均 7 個) 附著上去，形成蛋白質結合之 maltosaccharide，而作為肝糖合成酶合成肝糖之引子 (primer) (Alonso et al., 1995)。

肝糖分解作用 (glycogenolysis) 主要發生在肌肉組織或肝臟中，對內分泌素 (hormone) 及神經信號有反應。肝糖分解可調節血液中葡萄糖的濃度，而在戰鬥或逃跑反應中扮演重要的角色 (fight-or-flight response)。肝糖分解之第一步是經由肝糖磷酸化酶 (glycogen phosphorylase) 作用，產生 Glucose-1-phosphate (G1P)。G1P 再經由磷酸六碳醣變位酶 (phosphohexose mutase) 轉變成 Glucose-6-phosphate (G6P)。在肌肉細胞之糖解作用 (glycolysis) 過程中，肝糖分解可以直接提供 G6P，而在肌肉收縮的過程中提供能量，但不釋放葡萄糖入血流。在肝臟細胞中，肝糖分

解的主要目的是將葡萄糖由細胞釋放到血液中。在肝臟，G6P 的磷酸基被 Glucose-6-phosphatase (G6Pase) 移除，而所產生之游離葡萄糖，則經由肝細胞膜上之 GLUT2，易化擴散至細胞外，再進入血流。

絕食期間，血糖之維持有賴於葡萄糖新生成 (gluconeogenesis)。肝臟葡萄糖新生成之受質主要為乳酸 (lactate)、甘油 (glycerol)、丙酮酸 (pyruvate)、丙胺酸 (alanine)，與其他生糖性胺基酸 (glucogenic amino acids)。葡萄糖新生成的速率受單向酶的活性所調控，例如磷酸烯醇丙酮酸羧化酶 (phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)、Fructose-1, 6-bisphosphatase、Glucose-6-phosphatase (G6Pase)。其中，PEPCK 使草醯乙酸 (oxaloacetate) 轉化成磷酸烯醇丙酮酸鹽 (phosphoenolpyruvate, PEP)；G6Pase 是催化葡萄糖新生成的最後步驟，從 G6P 中產生游離葡萄糖 (Campbell and Farrell, 2008)。

內分泌素對肝臟醣類代謝具有調節作用。胰島素 (insulin) 是一種肽類內分泌素，由胰腺之 β 細胞產生，可調節碳水化合物及脂質之代謝。胰島素透過促進葡萄糖從血液進入骨骼肌，促進血糖的轉換及吸收 (Sonksen and Sonksen, 2000)，而可能造成低血糖 (hypoglycemia)。當血糖過低時，身體透過分解儲存於肌肉、肝臟之肝糖，轉變成葡萄糖以作為能源。升糖素 (glucagon) 是一種肽類內分泌素，由胰腺 α 細胞產生，作用與胰島素拮抗。當血液中葡萄糖濃度過低時，胰島腺釋放升糖素。升糖素在與肝細胞之升糖素接受體結合後，可促進儲存之肝糖轉變成為葡萄糖 (即肝糖分解)，並釋放到血液中，因而提高血糖。當儲存之肝糖被消耗殆盡時，升糖素可刺激肝臟及腎臟，經由葡萄糖新生成作用 (gluconeogenesis) 合成葡萄糖。生長素 (growth hormone, GH) 可間接拮抗胰島素之作用，影響碳水化合物的代謝。高劑量 GH 可阻止肝糖分解之下降，而增加葡萄糖之產生 (Ghanaat and Tayek, 2005; Kaplan et al., 2008; Brooks et al., 2007; Fan et al., 2009)。鼠過量表達人類生長激素 (human GH, hGH) 基因時，會增加肝臟中葡萄糖之攝取及肝糖之含量 (Cho et al., 2006)。此外，在缺乏生長素 (GH deficient, GHD) 之 Ames dwarf 小鼠，其胰島素

敏感性上升，可能與肝臟中 PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors) 基因表現量增加有關。此意味 GH 在肝臟中與胰島素相互拮抗 (Masternak et al., 2005; Dominici et al., 2002)。皮質醇 (cortisol) 是人類主要之糖皮質素 (glucocorticoid)，是一種類固醇內分泌素 (steroid hormone)。在人類，皮質醇由腎上腺皮質 (adrenal cortex) 所產生，在壓力大或血糖低時被分泌。在絕食期間，皮質醇透過致活關鍵酵素基因 PEPCCK 及 G6Pase 之轉錄，促進 gluconeogenesis (Oh et al., 2013)。近來有研究指出，非酒精性脂肪肝疾病與第二型糖尿病等肝臟功能代謝之失調相關疾病，可能涉及細胞內甲狀腺素 (thyroid hormone, TH) 的作用 (Sinha et al., 2014)。臨床上，甲狀腺機能亢進 (hyperthyroidism) 者，葡萄糖之生產、吸收、及利用皆增加；低甲狀腺功能症 (hypothyroidism) 者，則周圍組織葡萄糖利用速率下降 (Mullur et al., 2014)。TH 可透過對其他器官如胰臟 (pancreas)、肌肉、脂肪組織及肝臟的作用，影響葡萄糖之代謝。TH 也能經由腦室旁核 (paraventricular hypothalamus) 投射至肝臟之交感神經，促進肝臟葡萄糖之生成與對胰島素敏感性之降低 (Klieverik et al., 2008; Lopez et al., 2013)。

(二) 肝臟之脂肪代謝

肝臟在脂質代謝中扮演重要的角色。肝臟可以自血流獲得脂肪酸與三酸甘油脂 (triglycerides, TG)，也可自血流獲得脂質之先驅分子並將之合成脂肪酸 (即 *de novo* lipogenesis)，且可將脂肪酸與甘油-3-磷酸 (glycerol-3-phosphate) 酯化成 TG。形成之 TG 即與肝細胞所合成之 Apo-B 結合，而以極低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) 型式藉胞卸作用 (exocytosis) 分泌入血流。肝臟亦可將脂肪酸藉由 β -氧化作用而分解，產生能量。當肝臟攝取之脂肪酸及新合成之脂肪酸超過肝臟之 VLDL 分泌及 β -氧化作用時，脂肪即在肝臟堆積。圖 1 描繪肝臟脂質代謝之概況。以下就肝細胞對脂肪酸之攝取、重新合成、甘油酯合成、 β -氧化作用、與 VLDL 之分泌分別敘述。

1. 脂肪酸之攝取

在絕食狀態下，脂肪細胞 TG 之脂解 (lipolysis)，釋出非酯化脂肪酸 (nonesterified fatty acid, NEFA) 到血漿，而被骨骼肌、心肌與肝臟攝取。然而，即使在絕食狀態下，脂蛋白脂酶 (lipoprotein lipase, LPL) 所介導 (mediate) 之血管內 TG 解脂作用，可能對脂肪細胞釋放 NEFA 有明顯貢獻。在進食後，食物脂肪 (以乳糜小滴-TG 形式) 之傳送，以及胰島素抑制脂肪組織之解脂作用，皆使情況更加複雜。許多研究指出，乳糜小滴-TG 是 LPL 的優先基質，而與極低密度脂蛋白三酸甘油酯 (VLDL-triglyceride) 競爭解脂作用 (Bickerton et al., 2007)。

當血液中之 NEFA 移到肝臟，即經由擴散作用及轉運蛋白的轉運，進入肝細胞中。長鏈脂肪酸雖可迅速通過細胞膜，但很多證據顯示脂肪酸之攝取可被多種膜蛋白質所促進，包括脂肪酸轉運蛋白 (fatty acid transporter protein, FATP)、脂肪酸結合蛋白 (plasma membrane FA-binding protein, FABPm) 與脂肪酸轉運酶 (fatty acid translocase, FAT)/CD36。FATP 具有 fatty acyl-CoA 結合酶 (ligase) 之作用，可將 FA 攝取與 FA 利用之第一步相結合。FABP 可能將 FA 攝取與細胞之氧化還原反應往返 (Redox shuttle) 相結合。CD36 之活化可影響總體之代謝，包括 FA 之代謝、胰島素阻抗及肥胖 (Randle et al., 1963)。CD36 透過降低活化能 (activation energy)，促進極性 FA 羧基 (polar FA carboxyl group) 穿過細胞膜 (Abumrad et al., 1999)。葡萄糖轉換成脂肪酸之速率受到營養及內泌素等因素之影響，這主要是透過乙醯輔酶 A 羧化酶 (acetyl-CoA carboxylase, ACC) 及脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase, FAS) 的調節。整體而言，絕食導致脂肪酸合成效率降低。對脂質合成有影響之內泌素主要為胰島素 (進食後的促進脂質生成) 與升糖素 (飢餓狀態下的抑制脂質生成)。胰島素與人體新陳代謝之關係密切，它能廣泛促進糖類的吸收與儲存 (包括脂肪生成)。胰島素促進脂肪生成主要是透過兩個酵素之作用，分別為丙酮酸脫氫酶 (pyruvate dehydrogenase, PDH) 與 ACC。PDH 可將 pyruvate 轉化成 acetyl-CoA，ACC 則會將 acetyl-CoA 轉化成 malonyl-CoA。malonyl-CoA 提供兩個

碳，用以延長脂肪酸。升糖素可能透過抑制 ACC 之活性而抑制粒線體 citrate 的外流 (efflux)，而降低細胞質內的 acetyl-CoA 之轉移 (Beynen et al, 1980)。升糖素有利於丙酮酸羧基化 (Agius and Alberti, 1985)。GH 可影響脂肪組織之脂肪分解，導致游離脂肪酸的增加。在肌肉及肝臟組織中，GH 會刺激三酸甘油酯 (TG) 的攝取，並抑制肝臟內 TG 的脂解 (lipolysis) 及脂質之過氧化作用，而增加脂肪生成。生長激素會拮抗脂肪組織胰島素的訊號傳遞，並降低血清中瘦素 (leptin) 的含量 (Vijayakumar et al., 2010)。另外，甲狀腺素亦可促進脂質合成。

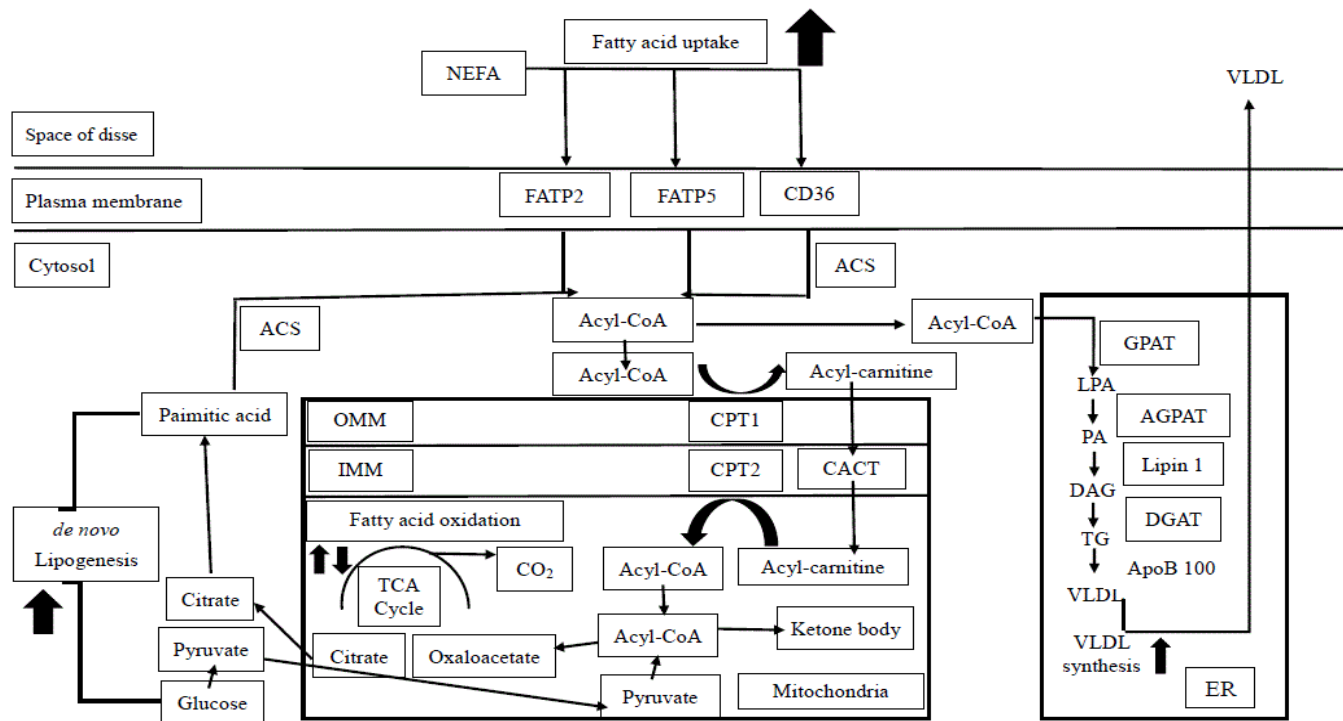


圖 1、脂質之代謝。

Figure 1. The metabolism of lipid in the liver.

ACS, Acyl-CoA synthetase; AGPAT, 1-acylglycerol-3-phosphate-O-acyltransferase; ApoB, Apolipoprotein B; CPT, Carnitine palmitoyltransferase; DAG, Diacylglycerol; DGAT, DAG acyltransferase; ER, Endoplasmic reticulum; FATP, Fatty acid transporter protein; GPAT, Glycerol-3-phosphate acyltransferase; IMM, inner mitochondrial membrane; NEFA, LPA, Lysophosphatidic acid; Nonesterified fatty acid; OMM, outer mitochondrial membrane; PA, Phosphatidic acid; TCA cycle, Tricarboxylic acid cycle; TG, triglyceride; VLDL, Very low density lipoprotein.

2. *De novo* lipogenesis

脂質生成 (lipogenesis) 是由乙醯輔酶 A 轉化成脂肪酸之過程，而乙醯輔酶 A 是單糖 (例如葡萄糖) 代謝的中間產物，為生物體能量的來源之一。透過脂質生成與 TG 的合成，能量能以脂肪的形式被有效率地儲存。脂質生成包括兩個過程，分別是脂肪酸的合成與 TG 的合成。最後 TG 與其他脂質與脫脂脂蛋白 (apolipoprotein) 結合成極低密度脂蛋白 (very-low-density lipoproteins, VLDL)，VLDL 即被肝細胞直接分泌進入血液，在血液中成熟，而將內源性衍生之脂質攜帶到周圍組織中。與齧齒動物相比，人體脂肪生成的組織之最大脂肪合成速率較低 (Hellerstein, 1999)。

3. 肝內之酯化作用

合成 TG 最重要的途徑為 *sn*-glycerol-3-phosphate (又稱為 Kennedy 途徑)，此乃 1950 年由 Eugene Kennedy 教授及其同事所提出之理論。在 *sn*-glycerol-3-phosphate 途徑當中，甘油主鏈來自 glycerol-3-phosphate，此醱解作用之產物少部分是甘油激酶 (glycerol kinase) 對游離甘油的作用所產生。在脂肪組織中，甘油的生成是以 pyruvate 作為主要來源。當肝臟細胞接觸升糖素時，雖不影響膽鹼磷酸轉移酶 (cholinephosphotransferase) 的活性，但會導致微粒體 diacylglycerol acyltransferase 活性降低，故升糖素會使得肝臟細胞中 TG 之合成下降，而不影響磷脂的合成 (Geelen et al., 1978)。此外，肝細胞中若存有脂肪酸，則會增強 TG 的合成 (Sundler and Nilsson., 1974)。

脂肪酸結合蛋白及 Acyl-CoA 結合蛋白 (Acyl-CoA binding protein, ACBP) 分別會和非酯化脂肪酸及脂醯輔酶 A (Acyl-CoA) 結合，並將它們運送到細胞內區間。細胞會將脂肪吸收，而其中部分脂肪會被氧化。這些代謝途徑使得 NEFA 和脂肪酸 Fatty Acyl-CoA 在細胞內保持極低量的狀態。脂肪酸的合成對高等動物能量平衡而言是一個重要的代謝路徑。脂肪生成的多寡會受到內泌素和營養條件所控制。

簡而言之，高碳水化合物飲食可促進脂質的生成，而絕食則抑制脂質的生成。這些皆與胰島素濃度以及組織對胰島素的敏感性有關。肝臟及脂肪組織是體內脂肪酸產生之最大來源。脂肪組織的脂肪酸的合成直接促進了原位脂肪的沉積和長期的能量儲存。從肝臟切片的研究中發現，肝臟是一個主要或中度脂肪生成的來源。肝臟中的脂肪酸一部分被酯化成磷脂，進而被併入細胞膜中，運送至前高密度脂蛋白 (pre-high-density lipoprotein particles)。在高濃度 NEFA 存在下，且過多的磷脂被轉移至細胞膜時，肝臟便會迅速合成三酸甘油酯。三酸甘油酯的合成受到轉錄因子、細胞核受體 [(如 SREBP-1c 、 碳水化合物調控元件之結合蛋白、過氧化體增殖劑活化受體 γ (Peroxisome proliferator-activated receptor γ ; PPAR γ)] 及其配體的控制 (Nguyen et al., 2008)。

4. 脂肪酸的氧化

脂肪酸被 FATP 或脂醯輔酶 A 合成酶 (acyl-CoA synthase) 活化成 acyl-CoA 後，經由肉鹼醯基轉移酶 I 及 II (carnitine-palmitoyl transferase I and II, CPT-I and II) 及 translocase (轉運酶) 被運送到粒腺體內進行 β 氧化。脂肪酸氧化乃逐步進行。脂肪酸首先產生 Acetyl-CoA。Acetyl-CoA 經脫氫、加水、再氧化及硫解的過程，獲得縮短的 Acyl-CoA。其中 β -碳位置分別在加水及硫解的過程中，被氧化成羥基並且進一步氧化成酮基。每進行一次 β -氧化，即有一個 Acetyl-CoA 會斷裂開來，使脂肪酸分子脫下兩個碳原子。此過程不斷重複，直到脂肪酸被完全分解。生成之 Acetyl-CoA 可以進入三羧酸循環 (tricarboxylic cycle, TCA cycle)，或在氧化不完全時合成酮體 (ketone bodies)。

此外，調節肝臟脂肪酸氧化程度的兩個因素，分別為：供應脂肪酸給肝臟 (透過脂解)，及氧化與微粒體酯化 (microsomal esterification) 之間的分配 (Nguyen et al., 2008)。

5. 三酸甘油酯的輸出 (極低密度脂蛋白的合成與分泌)

脫脂脂蛋白 (apolipoproteins) 為一群蛋白質，在與脂質結合後，即形成脂蛋白 (lipoproteins)。脂蛋白之脂質部分為疏水端 (不溶於水)，但因脫脂脂蛋白具有雙嗜性 (amphipathic)，使得脂蛋白和其他兩性分子 (親水、疏水) 可以圍繞著脂類，而形成脂蛋白顆粒，懸浮在血液及淋巴液中，而被輸送。脫脂脂蛋白亦可作為輔酶因子 (enzyme cofactors)、受體配體 (receptor ligands) 及協助脂質運輸的攜帶劑，用以調節脂蛋白在組織中的攝取及代謝。脫脂脂蛋白可細分為六類，分別為Apo-A、Apo-B、Apo-C、Apo-D、Apo-E、Apo-H。其中，Apolipoprotein B (Apo-B) 被用以形成低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL)；Apo-E則會形成中間密度脂蛋白 (intermediate-density lipoproteins, IDL)；其他大部分的脫脂脂蛋白則形成高密度脂蛋白 (high-density lipoprotein, HDL)。極低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) 之主要脫脂脂蛋白則包含Apo-E、Apo-C及Apo-B 100。在肝細胞，TG及膽固醇等脂質與脫脂脂蛋白結合形成VLDL，而以此形式被釋放到血液中，故脫脂脂蛋白之功能為將肝臟合成之內源性TG移到肝臟外之組織 (extra-hepatic tissues)。在人類，血漿中NEFA會刺激VLDL的生產，且肝臟中三酸甘油酯輸出的速率和脂肪酸的合成速率成正比 (Nguyen et al., 2008)。在果糖誘導脂肪生成的倉鼠模式中，VLDL的生產速率會增加 (Taghibiglou et al., 2000)，但在小鼠，肝臟脂質生成的增加可能增加或不影響VLDL的生產速率 (Wiegman et al., 2003)。

(三) 肝臟對蛋白質及胺基酸之代謝

肝臟在蛋白質代謝過程中具有四個主要功能：產生血漿蛋白質、胺基酸相互轉換、胺基酸的脫氨作用以及尿素的合成 (氮排泄) (Charlton, 1996)。

1. 血漿蛋白質之形成

肝臟製造的蛋白質包括許多凝血因子、白蛋白 (albumin) (佔全部肝臟蛋白質合成的 40%)、甲狀腺結合球蛋白 (thyroxine-binding globulin, TBG)、脫脂脂蛋白以及補體 (complements)。其中，超過 80% 由肝臟製造的蛋白質會進入體循環。這些

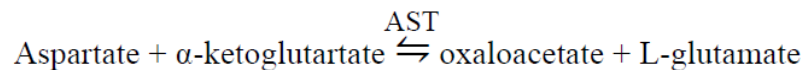
血液中的蛋白質可被用於止血、貢獻膠體滲透壓、運輸內分泌素、運輸脂質、急性發病期之反應。成人每日肝臟血漿蛋白的合成總量範圍介於 30 到 60 g (Charlton, 1996)。

2. 胺基酸相互轉換

肝臟能夠合成所有的非必需胺基酸，此過程涉及酮酸最初的合成，胺基則經由幾個階段轉移到酮酸，而取代酮基的氧 (Charlton, 1996)。

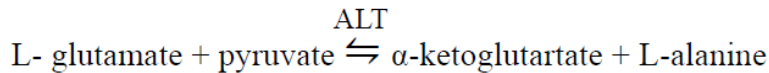
大多數肝臟疾病最初只有輕微症狀，但必須早期發現才能及早治療。肝臟之轉胺酶 [天門冬胺酸轉胺酶 (aspartate transaminase; AST) 與丙胺酸轉胺酶 (alanine transaminase; ALT)] 存在於肝細胞內，當細胞受損則洩漏至循環系統，故其在血清中之活性可被作為肝損傷程度之生物指標。

AST (aspartate transaminase) 亦稱為血清麩胺酸草醯乙酸轉移酶 (serum glutamic oxaloacetic transaminase, SGOT)，可將天門冬胺酸之胺轉移至 α -ketoglutarate，而產生 oxaloacetate 及麩胺酸 (如下式所示)。



AST 存在於肝臟實質細胞內，故 AST 值上升表示急性肝損傷。然而，但因 AST 亦存在於紅血球、心肌、骨骼肌、腎臟與腦，故 AST 值升高並不必然是肝損傷所引起。男性血液中 AST 標準值為 8-40 IU/L，女性則為 6-34 IU/L (Nyblom et al., 2004)。

ALT (alanine transaminase) 亦稱為血清麩胺酸丙酮酸轉胺酶 (serum glutamic pyruvate transaminase, SGPT)，可將麩胺酸之胺基轉移至丙酮酸，而產生 α -ketoglutarate 及 alanine (如下式所示)。



ALT 主要存在於肝臟，當肝臟受損時 ALT 會從肝臟釋放到血液中，導致血液 ALT 含量上升，而作為肝臟發炎之指標。與 AST 相比，ALT 對肝臟健康更具指標性，因為 ALT 僅存在於肝臟。一般而言，男性血液中 ALT 標準值為 10-50 IU/L，女性則為 5-38 IU/L (Nyblom et al., 2004)。

3. 胺基酸脫氨作用 (deamination) 與尿素之形成

脫氨作用 (deamination) 為將胺基酸的氨基去除，而催化這種反應的酵素則稱為脫氨酶 (deaminases)。胺基酸脫氨之產物為酮酸與氨。酮酸可被氧化以產生能量或再循環。胺基酸脫氨作用最主要的部位是肝臟，但 glutamate 之脫氨作用也在腎臟進行 (Charlton, 1996)。氨具有很高毒性，所幸肝臟可透過二氧化碳的參與，而將之轉換成為較不具毒性之尿素 (urea) (大部分哺乳類動物) 或尿酸 (uric acid) (大部分鳥類、爬蟲類)。尿素及尿酸即擴散入血液中，而主要從尿液排出。

肝臟還有許多其他的功能，例如扮演許多內分泌作用的標的，並負責代謝許多內分泌素 (如胰島素、性激素及升糖素)，因此慢性與急性肝病和生理功能障礙有關 (Charlton, 1996)。

(四) 果糖對肝臟之損害

果糖 (fructose) 是一種單糖，易溶於水，存在於許多食物中。在蜂蜜、樹上、藤本植物的果實、花、漿果、及根莖類蔬菜中皆可發現。在商業運用上，果糖的來源通常是甘蔗、甜菜及玉米。其中來自玉米之高果糖玉米糖漿 (high-fructose corn syrup, HFCS) 是葡萄糖和果糖的混和物。果糖被進食後，經由易化擴散作用進入小腸細胞後吸收；未被吸收的果糖則被運送到大腸，在大腸經由腸道微生物發酵產生氫氣，氫氣被吸收後經由肝門靜脈進入體循環，最後被運輸到肺臟，進行氣體交換，

而被排出體外。

肝臟是果糖代謝的主要器官，因肝細胞具有 Glut5 transporter (Douard and Ferraris, 2008)，可以攝取果糖。雖然脂肪細胞亦具有 Glut5 mRNA 和蛋白質，但 Glut5 在脂肪組織對果糖的轉運量微乎其微 (Wood et al., 2007)。所有的單糖 (包含果糖) 皆會經由 GLUT2 被運送至肝臟中。在肝臟中，果糖經由 fructokinase 磷酸化後產生 fructose-1-phosphate (F-1-P)。F-1-P 經 醛縮酶 (aldolase) 分裂成二羥丙酮磷酸 (dihydroxyacetone phosphate, DHAP) 及甘油醛 (glyceraldehyde, GA)。DHAP 可以經由 triosephosphate isomerase 異構化成為 GA-3-P，或經由 glycerol-3-P dehydrogenase 還原成 glycerol-3-phosphate (G-3-P)。DHAP 可直接進入糖解過程，而 GA 的產物因缺少一個磷酸基，故需要三碳糖激酶 (triokinase) 先將之磷酸化，產生 glyceraldehyde-3-phosphate (GA-3-P)，才進入糖解過程，或藉由 glycerol-3-phosphate dehydrogenase 進一步轉化成 glycerol-3-phosphate (G-3-P)。肝臟中 DHAP 與 GA-3-P 濃度之上升則促進葡萄糖新生成，因而促進肝糖之合成 (Parniak and Kalant, 1988)。一旦肝臟之肝糖已被補充，則此等代謝物即朝向 TG 之合成進行。GA-3-P 進一步被轉化成磷酸烯醇丙酮酸(phosphoenolpyruvate, PEP) 後，藉由丙酮酸基酶 (pyruvate kinase) 進一步被轉化成丙酮酸(pyruvate)，而丙酮酸經丙酮酸脫氫酶 (pyruvate dehydrogenase) 催化產生 Acy-CoA。Acy-CoA 會產生 FA，使脂質生成速率提高，而 G-3-P 則與 FA 酯化，最後產生 TG。TG 與脫脂脂蛋白一起形成 VLDL。肝臟分泌之 VLDL 直接進入血液，並在血液中成熟，而將內源性衍生之脂質攜帶到周圍組織中 (圖 2)。

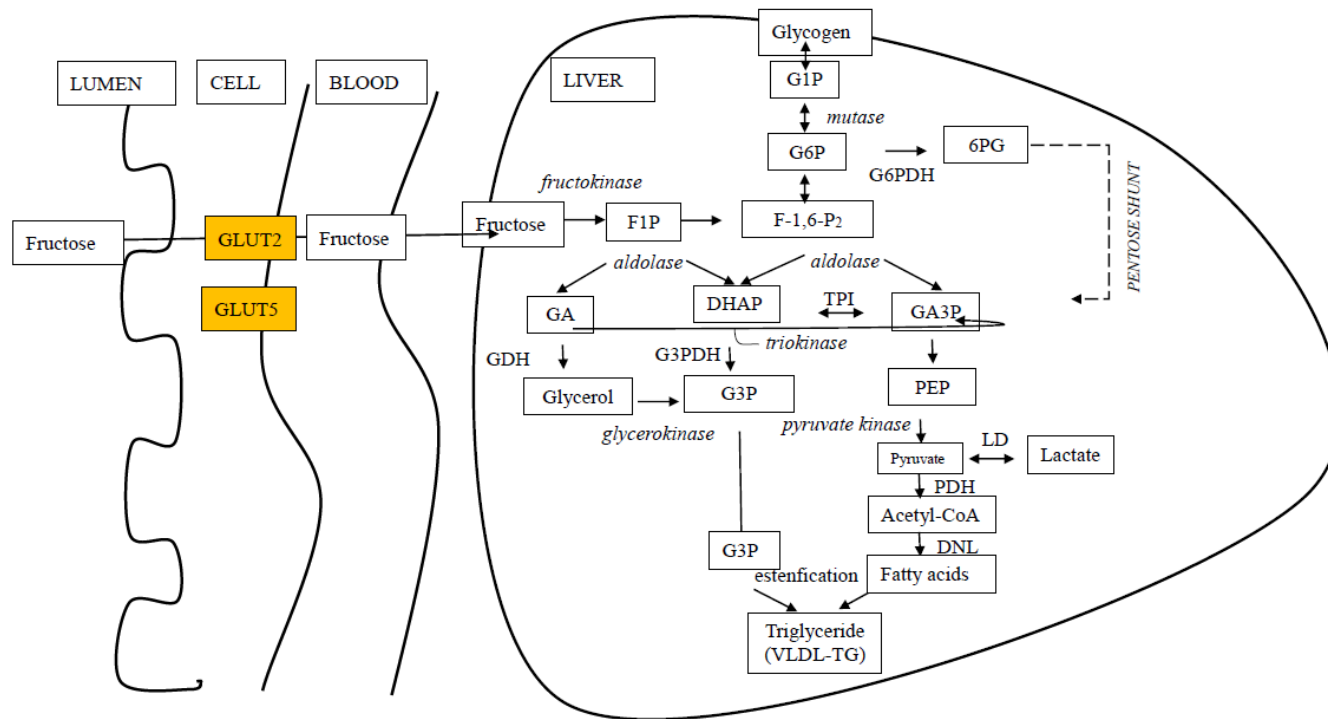


圖2、果糖在肝臟之代謝途徑。

Fig 2. The pathway of fructose metabolism in liver.

6PG, 6 phosphogluconate; DHAP, Dihydroxyacetone phosphate; DNL, *Denovo* lipogenesis; F1P, Fructose-1-phosphate; F-1,6-P₂, Fructose-1,6-bisphosphate; G1P, Glucose-1-phosphate; G3P, Glucose-3-phosphate; G3PDH, G3P dehydrogenase; G6P, Glucose-6-phosphate; G6PDH, G6P dehydrogenase; GA, Glyceraldehyde; GA3P, Glyceraldehyde-3-phosphate; GDH, Glycerol dehydrogenase; LD, lactate dehydrogenase; PDH, pyruvate dehydrogenase; PEP, Phosphoenolpyruvate; TPI, Triose phosphate isomerase.

在肝臟，果糖之代謝與葡萄糖代謝最大的不同，在於果糖之代謝與胰島素無直接關係。果糖在肝臟中的代謝與乙醇相似，皆會誘發 NAFLD (Lustig, 2009)。其可能機制如下：

過多之果糖使 ATP 耗竭，並產生過量檸檬酸 (citrate) 以作為 *de novo* lipogenesis 的基質，而形成過量的 malonyl-CoA，進而抑制 β -oxidation。肝臟之脂質生成因而增加，導致脂肪肝之發生。此外，過量攝取果糖可活化 mitogen-activated protein kinase (MAPK8) 和 protein kinase C ϵ type (PKC ϵ)，促進肝臟對胰島素的阻抗，又促進了高胰島素血症 (hyperinsulinemia) 及脂質的堆積 (Lim et al., 2010)。事實上，飼予 Wistar 鼠 70% 果糖水溶液可顯著增加其肝臟內 TG 之濃度，並使肝臟細胞產生脂肪變性 (Kawasaki et al., 2009)。飼予雄性 C57BL/6J 小鼠 30% 果糖水溶液，可使其產生胰島素阻抗及代謝綜合症 (Li and Hsieh, 2014)。於人體試驗中，攝取含有高果糖玉米糖漿 (high fructose corn syrup, HFCS) 之飲料，會造成代謝異常，並且會促進 NAFLD 之發展 (Basaranoglu et al., 2015)。

(五) 高脂肪飲食對肝臟之損害

當食糜進入十二指腸後，脂肪會刺激腸抑胃泌素 (enterogastrone) 之分泌，進而抑制腸道蠕動，而使得食糜的流速降低，使胰消化酶可充分作用，並同時刺激膽囊收縮素 (cholecystokinin, CCK) 分泌，促使膽囊收縮，而將膽汁排入十二指腸，一方面中和食糜之酸性，一方面促進脂質之乳化形成乳糜小滴 (chylomicron)，進而增加酵素之作用面積，以及減少表面張力，使酵素與乳糜小滴充分作用。食物中之脂質，其主要成分為 TG。在小腸腸腔中，TG 在脂質酶及膽汁的作用下，被分解為單酸甘油酯 (monoglyceride) 和脂肪酸，再進入血液。脂肪消化產物主要在空腸被吸收。正常情況下，飲食中約有 95% 的脂肪會被吸收，膽固醇則有 10~50%。在脂肪吸收不良時，將有大量脂肪排於糞便中，造成脂溶性維生素也吸收不良。

攝取食物中的脂肪會影響肝臟中脂質的堆積情形 (Westerbacka et al., 2005)，不過只佔了肝內脂質來源的 15% (Donnelly et al., 2005)。雖然高脂肪飲食在動物實驗和人體試驗中皆會導致營養過剩疾病，並使肝臟產生油脂，但造成營養過剩及肝內脂質生成的主因被認為是食物中碳水化合物的同時攝入 (Romestaing et al., 2007; Westerbacka et al., 2005; Larter et al., 2008)，因在限制碳水化合物攝取的阿特金斯飲食法 (Atkins diet) 中，並無肥胖或 NAFLD 的風險 (Samaha et al., 2003)。此種將人體從消耗碳水化合物之代謝轉化成消耗脂肪為主的代謝模式，也被稱作低碳減肥法。在一個為期兩年的試驗中，患者在沒有限制熱量的條件下分別使用地中海飲食 (單元不飽和脂肪酸多) 或阿特金斯飲食法 (總脂肪多)，都可得到減脂、降低空腹三酸甘油脂濃度、降低空腹胰島素濃度的結果 (Shai et al., 2008)。搭配高脂、低碳水化合物的飲食方式，也似乎可以改善肝臟酵素升高情形，並降低代謝疾病發生的風險 (York et al., 2009)。因此，脂肪的攝入量似乎沒有成為導致 NAFLD 的主因。然而，膳食脂肪的組成結構仍需予以關注 (Lim et al., 2010)。

(六) 非酒精性脂肪肝疾病之成因

非酒精性脂肪肝疾病 (Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是世界上最常見的肝臟疾病。隨著嚴重程度與進程，NAFLD 包括脂肪肝 (fatty liver)、非酒精性脂肪肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis, NASH)、肝纖維化 (liver fibrosis)、與肝硬化 (liver cirrhosis) 等。NAFLD 通常伴隨有代謝綜合病徵。這些疾病的產生可能與西式飲食的盛行、果糖之攝取量增加有關。其中 Day and James (1998) 提出“二次打擊”假說 (“two-hit” hypothesis) 解釋 NASH 發生之過程。在此假說中，第一擊是脂肪肝之發生，它使肝臟對第二擊更加敏感；第二擊則導致肝細胞損傷、發炎，最後發生纖維變性。

1. 第一擊

第一擊是因肝臟 *de novo* lipogenesis 增加、長鏈脂肪酸在粒腺體 β 氧化作用之

抑制、三酸甘油酯的清除受損與 VLDL 輸出之減少等因素所致之肝臟脂肪堆積 (Lim et al., 2010)。

2. 第二擊

由於五員呋喃糖環 (five-membered furanose ring) 分子不穩定，果糖會促進蛋白質發生果糖苷化作用 (fructosylation)，並產生活性氧種 (reactive oxygen species; ROS)。許多 NASH 患者也有些微的營養素缺乏症。他們沒有足夠的抗氧化能力去防止 ROS 的合成，而進一步導致壞死性炎症。因此，過度的攝取果糖可能導致 NAFLD 和代謝綜合徵候群 (Lim et al., 2010)。

(七) 發炎與肝臟病變的關係

促發炎與抗發炎細胞激素 (pro- and anti-inflammatory cytokines) 之平衡對於控制全身性與肝臟之胰島素作用甚為重要，因此也會影響 NAFLD 之發展。胰島素阻抗是 NAFLD 之重要特徵，可被許多因子引起，包括來自脂肪組織或免疫細胞之細胞激素。

1. 來自脂肪組織之因子

(1) 瘦素 (leptin)

瘦素 (leptin) 由脂肪細胞所分泌，其血流中之含量與脂肪量成正比。它是一與飽足有關之激素 (satiety hormone)，有助於抑制飢餓感 (hunger)，並可調節能量之平衡。肥胖症患者之瘦素敏感度降低，因此儘管儲存許多能量依然無飽足感 (Pan et al., 2014)。瘦素也會降低熱量攝取及體脂含量。絕食與發炎介質之增加皆可迅速降低瘦素在血流中之含量 (Lord et al., 1998; Fantuzzi and Faggioni, 2000; Caldefie-Chezet et al., 2001)。長期持續高含量之瘦素，與肥胖、暴飲暴食及炎症相關疾病 (包括高血壓、代謝綜合徵狀和心血管疾病等) 有關。瘦素也會促進血管生成和促進發炎反應，並透過與 IL-1 家族之細胞激素合作而導致炎症的產生 (Perrier et al., 2009)。

(2) 脂聯素 (Adiponectin)

脂聯素 (Adiponectin) 為一種由 244 個胺基酸所組成之多肽，參與葡萄糖代謝之調節及脂肪酸氧化的過程 (Díez and Iglesias, 2003)。脂聯素由脂肪組織分泌，並進入血液中 (Chen et al., 2006)。成年人的脂聯素含量與體脂率呈負相關。此種激素可以抑制代謝紊亂所導致的疾病，如第二型糖尿病 (Ukkola and Santaniemi, 2002)、肥胖症、動脈粥樣硬化 (Díez and Iglesias, 2003)、NAFLD 等代謝綜合徵狀 (Renaldi et al., 2009)。與正常人相比，糖尿病患者之血液中脂聯素濃度相對較低，而減重亦會顯著增加脂聯素的含量 (Coppola et al., 2009)。

(3) 4-hydroxynonenal (4-HNE)

4-hydroxynonenal (4-HNE) 為 n-6-多元不飽和脂肪酸 (n-6-polyunsaturated fatty acids) 過氧化之終端產物。蛋白質及多肽是 HNE 標的之生物分子 (HNE-targeted biomolecules)。HNE 的初級反應物為半胱胺酸 (cysteine)、組胺酸 (histidine) 與離胺酸 (lysine)。HNE 本身活性很高，在肝臟中十分活躍，故很容易在肝臟組織及周圍之血管中被檢測到。HNE 常被用以檢測各種肝臟疾病之病理過程與壞死性炎症 (necro-inflammation) 的強度。此外，HNE 之內轉作用 (adduction reaction) 伴隨著重要傳訊蛋白之產生，此脂質醛在肝臟疾病進展中扮有病理角色 (Poli et al., 2008)。動物組織中氧化壓力的增加可使 4-HNE 含量上升 (Awasthi et al., 2004)。

(4) Toll-like receptor 4 (TLR4)

Toll-like receptor 4 (TLR4) 分子量約為 95 kDa，可被用以偵測來自革蘭氏陰性菌之脂多醣成分，而在致活先天免疫系統 (innate immune system) 中扮演重要角色。從果蠅到人類，TLRs 之結構和功能都很相似 (Takeda et al., 2003)。TLR4 會透過抑制 MAPK (mitogen activated protein kinase) 家族中磷酸化的 ERK1/2 (p-ERK1/2) 之

產生，進而降低 IFN- γ 的產生，有效發展免疫功能。TLR4 之激活將導致下游炎性細胞激素的釋出，包括 TNF- α 和 interleukin-1 (Shavit et al., 2005; Mohan et al., 2010)。

2. 來自免疫細胞之細胞激素

細胞激素為可溶性分子，參與細胞間的通訊，並透過體內各種細胞（包括大多數類型的肝臟細胞）之增生，而對鄰近細胞或整個生物體發生作用 (Tracey and Cerami, 1993)。細胞激素包括幾個亞族 (subfamily)，分別為干擾素 (interferons)、白介素 (interleukins)、腫瘤壞死因子 (TNF)、轉化生長因子 (transforming growth factors, TGF)、集落刺激因子 (colony-stimulating factors) 和趨化因子 (chemokines)。細胞激素參與幾個基本的生理過程，包括：身體成長、肥胖、哺乳、造血、發炎反應及免疫反應，也牽涉到許多種病症，如動脈粥樣硬化、類風濕性關節炎、全身性紅斑狼瘡、牛皮癬和 NAFLD (Tedgui and Mallat, 2006; Tilg and Diehl, 2000)。在正常生理條件下，肝臟只會產生少量的細胞激素，但病理刺激（如脂肪堆積）將誘導肝臟細胞產生這些炎症分子。透過肝臟發炎反應的刺激，NAFLD 會促使這些細胞激素發揮作用，造成組織壞死、細胞凋亡 (apoptosis)，並誘發纖維化。儘管如此，這些細胞激素對於肝臟損傷後之再生作用也是不可或缺 (Tilg and Diehl, 2000)。以下分別敘述這些細胞激素在 NAFLD 中所扮演的角色。

(1) TNF- α

TNF- α 為一種發炎介質，主要由幾種炎症細胞（包括單核球、巨噬細胞、嗜中性球及 T 細胞）所分泌。其他組織如內皮、脂肪組織或神經元組織也少量分泌。在肝臟中，TNF- α 直接由庫氏細胞 (Kupffer cells) 或間接由腹部脂肪所分泌 (Montecucco and Mach, 2008)。在 NAFLD 和 NASH 的發展過程中，TNF- α 被認為是一個關鍵因子，它和胰島素阻抗有關 (Hotamisligil et al., 1993)。脂肪組織是肥胖誘導發炎的一個重要來源，尤其透過 TNF- α 的表達將會誘發炎症反應及胰島素阻抗 (Braunersreuther et al., 2012)。

(2) IL-6

IL-6 在肝臟病理中之作用十分複雜。IL-6 可活化免疫細胞、肝細胞、造血幹細胞及破骨細胞。此外，IL-6 可誘發炎症反應及腫瘤的生成，調節免疫反應，支持造血功能 (Kishimoto, 2010)。在 NAFLD 患者中發現，其肝臟細胞中 IL-6 的濃度，和 NAFLD 之嚴重程度呈正相關 (Wieckowska et al., 2008)。IL-6 也被作為胰島素阻抗與心血管疾病的預測指標。在接受減肥手術之患者中，IL-6 濃度的下降，與重量減輕及胰島素阻抗之改善有關 (Klover et al., 2005)。

(3) IL-10

IL-10 是一種抗發炎的細胞激素。在病理情況下它被用以調控器官和組織的發炎反應，並抑制 T 細胞、單核球和巨噬細胞等細胞之介導功能 (Moore et al., 2001)。在肝臟，IL-10 可在肝細胞、星狀細胞 (stellate cells) 和 Kupffer cells 中被檢測出來 (Braunersreuther et al., 2012)。使用 IL-10 缺陷鼠之研究，顯示內源性 IL-10 可保護肝臟細胞免於發生脂肪變性 (den Boer et al., 2006)。另一項研究亦指出，IL-10 的抑制會導致促炎性標記物 (TNF- α 、IL-6) 表現量及脂肪變性之增加 (Cintra et al., 2008)。50 名非肥胖婦女與 50 名肥胖婦女相比，肥胖婦女罹患代謝綜合症之機率顯著較高，而在肥胖、無代謝綜合症之婦女中發現，其血清中有高濃度之 IL-10，故 IL-10 可能與抑制慢性炎症 (chronic inflammatory) 有關 (Esposito et al., 2003)。此表示 IL-10 對於受到 NAFLD 影響之代謝綜合徵狀患者具有潛在的益處。

(4) CCL2/monocyte chemoattractant protein-1

趨化因子已知是小分子肝素結合蛋白 (small heparin-binding proteins)，它會誘導白血球移動到發炎部位 (Gerard and Rollins, 2001)。趨化因子主要由內皮細胞、平滑肌細胞、白血球、肝細胞、星狀細胞所分泌。趨化因子及其受體，與許多發炎

疾病的產生有關，如動脈粥樣硬化、牛皮癬和胰島素阻抗 (Charo and Ransohoff, 2006)，因此趨化因子也可能在 NAFLD 病理上扮有角色 (Lalor et al., 2007)。

CCL2 是一種強效的趨化因子，主要是由巨噬細胞所分泌，少部分也由活化之內皮細胞、平滑肌細胞、肝臟星狀細胞所分泌 (Ylä-Herttuala et al., 1991; Yu et al., 1992; Nelken et al., 1991; Wobser et al., 2009)。CCL2 透過與其受體 (CCR2) 之結合而活化標的細胞 (主要是巨噬細胞) (Ylä-Herttuala et al., 1991; Yu et al., 1992; Nelken et al., 1991; Wobser et al., 2009)。CCL2 廣泛分佈在肥胖小鼠的脂肪組織及血漿中 (Sartipy et al., 2003)。CCL2 或 CCR2 基因剔除之小鼠在被餵予高脂飼料使其產生脂肪肝後，其肝臟中單核球、巨噬細胞堆積的情況較野生型者為低 (Rull et al., 2007)。另一方面，小鼠脂肪組織過量表達 CCL2 則增加胰島素阻抗及肝臟三酸甘油酯之含量 (Kanda et al., 2006)。

(5) TGF- β

TGF- β 是一種細胞激素及生長因子，並且作為一種免疫抑制劑。TGF- β 具有抗發炎、促進纖維化之功能。在肝臟中，TGF- β 由免疫細胞、肝臟星狀細胞及上皮細胞所分泌 (Syn et al., 2010)，可誘導靜休狀態之星狀細胞轉變成肌纖維母細胞 (myoblasts)。TGF- β 的增加是脂肪性肝炎逐漸轉變成肝臟纖維化的早期指標 (Stärkel et al., 2003)。

(6) Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)

TSLP 會促進 T-cell 趨向分化為 Th2 cell，而參與體內發炎反應的過程 (Al-Shami et al., 2005)。TSLP 會活化表皮之蘭格罕細胞 (Langerhans cells)，誘導 T-cell 產生 TNF- α ，進而引起發炎反應 (Ebner et al., 2007)。

二、鹿茸之安全與應用

(一) 鹿茸之解剖與生理

鹿屬於反芻亞目 (Ruminantia Suborder)、鹿科 (Cervidae)，為極優雅且具吸引力之動物，原產於紐、澳以外之世界各地，從乾燥的沙漠到草原、濕地及北極區，幾乎適應所有的環境。鹿科動物中，麝 (musk; *Moschus moschiferus*) 與牙獐 (Chinese water deer; *Hydropotes inermis*) 雌雄皆無鹿角；馴鹿 (reindeer; *Rangifer tarandus*) 則雌雄皆具鹿角；其餘鹿種則只有雄性具有鹿角。

鹿角長出後，經歷骨化、脫落與重新生長等周而復始之過程，稱為鹿角週期 (antler cycle)。鹿角週期受到光照週期、性腺內分泌素、鹿隻營養、年齡、是否存有寄生蟲或疾病等因素之影響 (Suttie et al., 1984)。雄鹿出生後第二年春天開始生成鹿角。鹿角由角座 (pedicle) 長出，為暫時性且可脫落之組織，初時組織柔軟、外被茸毛，故稱為茸角 (velvet antler)。茸角生長期間，內部即由基部往頂部逐漸骨化。當茸角停止生長並完成骨化後，其外表皮膚逐漸乾涸、剝離，而顯露出骨質硬角 (bony antler)，此過程稱為蛻茸 (cleaning or shedding of velvet)。經過一段時間的硬角過程，在配種季節結束後，硬角即自動脫落，稱為解角 (casting)，此時中間骨質傷口處隨即癒合，並成為一個新的生長點 (Pereira et al., 2005)。鹿角增生期間，血中性腺內分泌素含量低；鹿角的礦化期間 (mineralization) 則伴隨著血中睪固酮含量的上升；解角 (cast) 時血中睪固酮含量則處於快速下降階段 (Bubenik, 2006)。雄鹿屬於短日生殖者 (short day breeder)，其睪丸功能受光照期調節：短光照刺激睪丸功能；長光照抑制睪丸功能 (陳及楊, 1995)。在哺乳類動物，光照對性腺功能之影響由松果腺所媒介。當光線穿透視網膜後會發送信號給松果腺 (pineal gland)，松果腺作為神經內分泌 (neuroendocrine) 之轉換器會將光的訊號轉換為褪黑素 (melatonin)。白天時褪黑素在血液中的濃度極低，但到了夜晚則會急遽增加 (Reiter et al., 1991)。因此，松果腺分泌高量褪黑素之時間，就很忠實地反映出黑夜的長度。

鹿角和洞角 (horn) 不同。成熟鹿角是實心構造，由骨組織所構成之；洞角則是由內部之骨質 (形成於額骨) 和外面之角鞘 (形成於角質層表皮) 所組成。鹿角的形狀和大小會隨著品種的不同而不同，從幾釐米長、不分叉的普刀鹿 (Pudu deer;

Pudu pudu) 到多叉、掌狀的麋鹿 (moose; *Alces alces*) 都有 (Price et al., 2005)。大部分鹿種之雄鹿於出生後第二年之春天先長出角座 (pedicle)，並接著長出鹿角。角座從額骨之骨膜細胞 (periosteal cells) 突起並成長 (Li et al., 2001)。此特殊之骨膜稱為產角骨膜 (antlerogenic periosteum, AP)。AP 含有鞣固酮之特殊結合位點 (Li and Suttie, 1998)。

角座發育可分四個階段 (Price et al., 2005)：

1. 膜內骨化期 (intramembranous ossification)

於此階段，初始之產角細胞 (antlerogenic cell) 開始增殖並分化成骨母細胞 (osteoblasts)，這些骨母細胞會在骨膜形成小梁骨 (trabecular bone)。

2. 過渡骨化期 (transitional ossification)

大多數的頂部產角細胞 (apical antlerogenic cell, AAC) 由前骨母細胞 (preosteoblast) 所組成。AAC 之特點為其細胞內含有膠原纖維，這些纖維位於小泡內。當角座高度成長到 5-10 mm 時出現此一階段。此階段之產角細胞，與初始之產角骨膜相比，具有較高含量之肝糖 (Li and Suttie, 1998)。

3. 角座軟骨內骨化 (pedicle endochondral ossification)

於此過程經歷了細胞分化過程，產角細胞於頂部形成軟骨組織。

4. 鹿茸軟骨內骨化期 (antler endochondral ossification)

於此時期，產角細胞維持軟骨細胞之分化途徑，直到第一個鹿茸完全形成；而鹿茸形成時，從角座到末端皆會覆蓋一層外觀有光澤的茸皮 (velvet skin)。

皮膚作為角座及鹿角發育過程中特殊之外皮，參與鹿角的生長。鹿隻顱骨附加物 (cranial appendage) 的形成與雄性素有關 (Hartwig et al., 1989)。產角骨膜含有

重要訊息，影響鹿角之形態。注射全反式視磺酸 (all-trans retinoic acid, RA) ，可使雄性黓鹿 (fallow deer; *Dama dama*) 之角座及鹿角形態進入早期變化 (Kierdorf and Kierdorf, 1998) ，因此 RA 也許會改變產角骨膜細胞的位置訊息。RA 處理組之雄性黓鹿，刺激了一開始的鹿角生長，經由促進骨膜細胞與軟骨膜細胞 (perichondrial cells) 的增生速率，刺激顱骨附加物之形成 (Kierdorf and Kierdorf, 1998; Kierdorf and Bartos, 1999) 。將產角骨膜移植到雄性黓鹿的前肢時，該位置即發育出鹿角 (Kierdorf and Kierdorf, 2000) 。

雄鹿於春天解角，而芽基 (blastema) 之生成位置則在角座，此過程每年作為一個循環，不斷發生。解角與睪固酮含量降低有關，其細胞機制為特異性位點破骨細胞 (osteoclasts, OCs) 的蝕骨作用。給予高濃度之睪固酮或雌激素，則抑制鹿隻解角，而去勢 (castration) 則會導致解角 (在 2-3 週) (Bartos et al., 2012) 。鹿角骨組織表面會刺激大量的 OC 前驅細胞分化，而 RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) 會調控 OC 前驅細胞分化。性腺內泌素已被證實可抑制 RANKL 之信號，因此，在春天血液中的睪固酮濃度降低時，RANKL 上升，於是增加破骨細胞的生成 (Shevde et al., 2000; Huber et al., 2001) 。甲狀旁腺素 (parathyroid hormone; PTH) 與芽基生成可能也有關聯，因在此過程中許多細胞會表現出 PPR (parathyroid/parathyroid hormone-related peptide receptor) 。

(二) 鹿茸之組成分

鹿茸作為傳統的中藥材已被使用超過 2000 年 (Gilbey and Perezgonzalez, 2012; Kawtikwar et al., 2010) 。在許多中國醫藥典籍中皆有記載鹿茸之藥效。本草綱目記載：鹿茸可生精補髓、養血益陽、強筋健骨；神農本草經描述鹿茸：主漏下惡血、熱寒驚癇、益氣強志、生齒不老。隨著分析技術的進步，鹿茸的化學成分已被分離出微量元素、胺基酸、多肽、蛋白質、脂肪酸、磷脂和醣類等成分，且這些成分會隨著鹿茸的生長而產生改變。

1. 無機物和礦物質

透過原子吸收光譜儀，許多種礦物質元素已從鹿茸中被偵測出來，包含：鈣、磷、鈉、鉀、鐵、錳、鋅、鉻、鎳、鈷、鈇、鋇、鉍、錫和銅 (Sui et al., 2014)。

2. 胺基酸、多肽及蛋白質

鹿茸富含胺基酸、多肽及蛋白質，而這些成分中很多種被認為是鹿茸主要的生物活性成分。將鹿茸經由 6 M 鹽酸處理後，可偵測出 16 種胺基酸，其中天門冬胺酸 (aspartic acid)、麩胺酸 (glutamic acid)、脯胺酸 (proline)、甘胺酸 (glycine) 和精胺酸 (arginine) 總共占了胺基酸總量的 32.5-37.2% (Jeon et al., 2009)。

精胺酸為必需胺基酸，必須從飲食中獲得。對於成人而言，精胺酸也很重要，特別是在罹患外傷、燒傷、腎功能衰竭及小腸切除的情況下。精胺酸除了是蛋白質合成之原料之一，也是許多分子的前驅物，例如一氧化氮 (nitric oxide, NO)。精胺酸可以改善心血管、肺、免疫及消化功能，並可預防罹患癌症 (Scibior and Czczot, 2004)。

鹿茸也含有豐富的牛磺酸 (taurine)。精胺酸及牛磺酸皆具有抗氧化能力 (Hwang et al., 2009; Jemai et al., 2009; Hamden et al., 2009)。牛磺酸雖非必需胺基酸，但是組成膽汁的重要成分，也可以改善高血糖症所引起之肝損傷 (Winiarska et al., 2009; Furfaro et al., 2012; Gentile et al., 2011; Yao et al., 2009)。牛磺酸可以提高糖尿病兔子肝臟中 gamma-glutamylcysteine 之含量 (gamma-glutamylcysteine 為細胞抗氧化之 GSH 前趨物)，進而清除了堆積於肝臟中的羥自由基 (hydroxyl free radicals)，並降低氧化壓力的產生 (Winiarska et al., 2009)。將牛磺酸餵予高碳水化合物飲食之鼠後，可以顯著降低鼠肝臟之損傷及發炎以及血漿中之三酸甘油酯及胰島素之濃度，因此於膳食中添加牛磺酸，被認為具有預防 NAFLD 之潛力 (Gentile et al., 2011)。

在兔子與鼠之動物實驗中可發現，在局部缺血前，自靜脈注射甘胺酸，可顯著改善肝臟缺血再灌注之損傷 (ischaemia-reperfusion injury) (Duenschede et al., 2006; Yamanouchi et al., 2007; Sheth et al., 2011)。在脂肪肝前期之患者缺血前注射甘胺酸或牛磺酸，也可降低其肝臟缺血再灌注之損傷 (Bruns et al., 2011)。在肝臟移植之鼠模式中，於鼠靜脈中注射甘胺酸可降低肝臟損傷，並增加鼠的存活率 (Rentsch et al., 2005; Liu et al., 2006)。與甘胺酸相似，經注射牛磺酸後，亦可提高患者肝臟移植的存活率 (Schemmer et al., 2005)。肝臟熱缺血 (warm ischemia) 會伴隨著 Kupffer cell 相關之病變，而牛磺酸可以防止 Kupffer cell 之活化，並提高肝臟移植者的存活率。牛磺酸顯著降低血清中轉胺酶之活性，並改善病理結果，其中吞噬細胞、血清中 TNF- α 、組織中過氧化氫濃度皆顯著降低，並且白血球細胞浸潤的情形也可獲得改善，這顯示了牛磺酸降低 Kupffer cell 所導致的肝臟疾病，其機制可能涉及白血球與內皮細胞之相互作用及防止脂質過氧化 (Kincius et al., 2007)。

將梅花鹿鹿茸分成五個部位，分別為頂端、前段、中段、基座及底部，則鹿茸頂端含有最多的粗蛋白，且其含量會隨區段往下遞減 (Jeon et al., 2009)。胺基酸的含量也會隨著鹿茸的尖端往基座遞減 (Sunwoo et al., 1995)。在中國傳統醫藥中，鹿茸的尖端較具價值，或許與此情況有關，因此胺基酸的成分及含量也許可以作為鹿茸品質的一個指標。然而，相反的，梅花鹿鹿茸頂端膠原蛋白含量最低，並隨著頂端至底部向下增加 (Cross et al., 1973)，可見膠原蛋白之含量不適用於作為傳統認定鹿茸品質的指標。

由於功能性胜肽具有低毒性且易於被腸道吸收的特性，因此在食品科學領域中日漸受到關注。近年來，肽類生長調控因子 (peptide growth regulatory factors) 及其接受體已被從茸角中分離出來。在鹿角組織中被發現的生長因子包含類胰島素生長因子 I 和 II (insulin-like growth factors I and II) (Suttie et al., 1991; Elliott et al., 1994; Elliott et al., 1996)、表皮生長因子 (epidermal growth factors) (Ko et al., 1986)、骨成形蛋白 (bone morphogenetic proteins) (Feng et al., 1995)、FGF-2、VEGF 及其受

體 (FGFR1、FGFR2、FGFR3 與 VEGFR-2) (Lai et al., 2007)、纖維母細胞生長因子 (fibroblast growth factor)、神經生長因子 (nerve growth factor) (Huo et al., 1997)、血小板衍生生長因子 (platelet-derived growth factor)、腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor) 和轉化生長因子 β (transforming growth factor β) (Centrella and Canalis, 1985)。除此之外，梅花鹿鹿茸中含有一種含 32 個胺基酸的新穎多肽，可以刺激大鼠的表皮細胞生長 (Guan et al., 2006)。

3. 醣類

有些多醣具有生理活性，而在健康產品的開發中日漸受到關注。麋 (Pere David's deer, *Elaphurus davidianus*) 鹿茸中頂部及中間的部分含有 118.5 mg/g 的總糖醛酸 (total uronic acid)，而鹿茸基座的部分則含有 106.1 mg/g；紅鹿鹿茸中頂部及中間的部分含有 15.4 mg/g 的總糖醛酸，鹿茸基座的部分則含有 16.86 mg/g (Jeon et al., 2011)。鹿種間似有很大差異。

4. 脂類和多胺

梅花鹿鹿茸中含有前列腺素 (prostaglandin) A、B、E、F，且脂質的組成物會隨著鹿茸生長的階段不同而有所不同 (Ivankina et al., 1993)。在梅花鹿鹿茸之軟骨生長期中，含有大量的磷脂及不飽和脂肪酸。經由高效液相層析儀，分析 13 種不同來源的鹿茸 18 種性腺內分泌素後顯示，有一個樣品含有 17 α -羥助孕固酮 (17 α -hydroxyprogesterone)，三個樣品含有助孕素 (progesterone)，而幾乎所有樣品皆含有睪固酮 (testosterone) (Lu et al., 2012)。梅花鹿鹿茸中亦含有尿嘧啶 (uridine)、次黃嘌呤 (hypoxanthine)、鞘磷脂 (sphingomyelin)、PC (phosphatidylcholine)、PE (phosphatidylethanolamine)、LPC (lysophosphatidylcholine) 及 LPE (lysophosphatidylethanolamine) (Zhou and Li, 2009)。

(三) 鹿茸之藥理作用

1. 免疫調節

鹿茸具有改善免疫系統之調節作用，其中，單核球 (monocyte) 的正調控 (up-regulation) 和巨噬細胞活性的增加皆被認為有益於免疫力之提升。其中，鹿茸之多肽被認為會影響巨噬細胞的活性，並可以調節免疫功能。梅花鹿鹿茸之一種 3.2 kDa 多肽，在免疫調節的體外試驗中，可以刺激脾臟細胞中 IL-12 的分泌，使 Th0 cell (也就是 Naïve T cell) 趨向分化為 Th1 cell，並可刺激 IFN- γ 的分泌，並降低 IL-4 的分泌量 (Zha et al., 2013)。鹿茸的水萃液也可提升細胞之吞噬能力，而有抵抗金黃色葡萄球菌感染的作用 (Dai et al., 2011)。鹿茸酒萃液可透過活化全身性之 T 調節細胞，使 naïve T 細胞分化趨向為 Th1 cells，進而降低過敏性 IgE 抗體之生成及肺部炎性細胞浸潤之情形，達到降低呼吸道之過度反應 (趙, 2011)。

在添加可促進發炎反應之 LTA (lipoteichoic acid；一種細菌細胞壁之成分) 於小鼠巨噬細胞之體外培養中，添加高劑量的鹿茸水萃液，不論是冷水萃取液或沸水萃取液，皆顯著抑制小鼠巨噬細胞中 TNF- α 和 IL-6 的分泌量 (Dai et al., 2011)。此外，於膠原蛋白誘導關節炎小鼠模式中予以鹿茸水萃液，與控制組相比，顯著降低其關節中 TNF- α 的表現量 (Suh et al., 2007)。凡此皆顯示鹿茸水萃液具有抗發炎之作用。

2. 抗老化

單胺 (monoamines) 是存在於動物系統中的神經傳遞物質。在氧化過程中，單胺氧化酶 (monoamine oxidase, MAO) 所催化之氧化作用，可使單胺之含量減少。MAO 可區分為 MAO-A 與 MAO-B 兩種，其中，MAO-B 的活性隨著動物年齡的增加而增加，並伴隨著一些老年疾病。SAM-P (senescence accelerated male mice-senile prone, SAM-P) 早老化小鼠在 11-12 月齡時即顯示軀體衰老的症狀，例如喪失活性、掉毛與皮膚病等，血液中睪固酮含量亦隨年齡而下降。而在給予雄性老化小鼠口服梅花鹿鹿茸水萃液後，其血液中睪固酮含量、肝臟中蛋白質含量及肝臟中超氧化物

歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 之活性會顯著較對照組者為高，肝臟及腦部組織之丙二醛 (malondialdehyde) 含量、肝臟及腦膜 (brain membranes) 之 MAO-B 活性，則顯著較對照組者為低 (Wang et al., 1988)。這些數據顯示，鹿茸水萃液對於老年動物，可能具有抗老化作用。

3. 抗真菌活性

白色念珠菌 (*Candida albicans*) 為人類常駐真菌群之一，在免疫功能下降時會增加。將梅花鹿鹿茸萃取物分成可溶性及不溶性兩部分，並測試其對真菌之菌絲 (hypha) 及酵母 (yeast) 形成之影響，發現兩者之鹿茸萃取物皆可有效抑制真菌菌絲之活性，且可溶性的鹿茸萃取物抑菌效果較不溶性鹿茸萃取物為佳。但對於酵母之形成則無影響，而真菌菌絲之形成具有致病性 (Park et al., 1998)。進一步研究發現來自鹿茸之脫酸磷脂醯膽鹼 (lysophosphatidylcholine) 可藉由 MAP 路徑抑制菌絲形成 (Min et al., 2001)。

4. 抗骨質疏鬆

給予卵巢功能下降之老化小鼠鹿茸 13 個月後，顯著改善其骨骼狀態，並減緩卵巢切除所引起的血漿中磷與降鈣素含量之降低、股骨骨密度及鈣含量之降低、血漿中甲狀旁腺素 (parathyroid hormone) 及鹼性磷酸鹽酶 (alkaline phosphatase) 含量之增加等情形 (Chen et al., 2007)。在視黃酸 (retinoic acid) 誘導骨質疏鬆症之鼠模式中，與對照組相比，給予鹿茸總多肽之鼠，其骨中鈣含量、骨密度及骨的加權係數皆顯著增加；同時，平均骨小梁之厚度、平均骨小梁之間隙及骨小梁體積與骨質疏鬆症鼠相比也皆明顯獲得改善。因此，鹿茸對於視黃酸誘導之鼠，具有預防或治療骨質疏鬆症的效果 (Duan et al., 2007)。

5. 刺激軟骨細胞增殖

鹿茸多肽在骨性關節炎兔之模式中，對軟骨細胞與細胞週期影響並無顯著，但

會刺激第二型膠原蛋白的表現量，而抑制膠原蛋白 I 及膠原蛋白 X 之 mRNA 的表現量 (Zhang et al., 2011)。軟骨細胞以鹿茸多肽處理，可維持正常的表型，抑制基質金屬蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 的分泌，藉此平衡軟骨基質之代謝，而維持了軟骨細胞得以生存的外環境。更有甚者，鹿茸多肽可減少早期細胞凋亡之比例 (Zhang et al., 2011)。這顯示，鹿茸多肽可以阻止骨性關節炎軟骨細胞 (osteoarthritic chondrocytes, OCs) 的凋亡路徑。

6. 抗氧化

於體外試驗中過氧化氫的刺激下，適當濃度的梅花鹿鹿茸酒萃液可促進抗氧化酶的 mRNA 表現量，減緩小鼠胚胎之氧化壓力，並於體外試驗中維持囊胚發育之能力 (Cheng et al., 2014)。然而，給予早老化小鼠台灣梅花鹿鹿茸後，顯著降低小鼠血漿中 SOD 之活性、肝臟中 H_2O_2 之含量，但對於小鼠肝臟 SOD、cGPX 及 CAT 等基因之表現則無顯著影響 (黃, 2008)。綜合上述，鹿茸給予對動物體內抗氧化系統之影響尚無結論。

7. 促進傷口癒合及再生

鹿茸 3.2 kDa 多肽具有刺激大鼠表皮細胞增生之特性，並具有劑量依賴性 (Guan et al., 2006)。另外，梅花鹿鹿茸多肽亦可促進大鼠表皮細胞增生 (Zhang et al., 2012)。鹿茸對於鼠傷口癒合具有促進作用。於患部使用高濃度鹿茸軟膏 40 天後，與控制組相比，可顯著加速皮膚之傷口癒合，此乃鹿茸可促進 IGF-I、TGF- β 與 EGF 之分泌所致 (Gu et al., 2008)。在研究鹿茸多肽對鼠坐骨神經再生之影響中，發現鹿茸多肽可顯著減緩鼠之緊迫，並促進神經的再生 (Lu et al., 2008)。

8. 抗肌肉疲勞

於強迫力竭游泳小鼠模式中，給予台灣水鹿鹿茸並觀察其改善疲勞之狀況，發現鹿茸萃取物可能透過促進肌肉收縮相關基因 (troponin I、troponin T1、cysteine、

glycine-rich protein 2、 myosin heavy polypeptide 7、 tropomyosin 2、 myomesin family member 3) 的表現，增強小鼠肌肉之力量，因而達到抗疲勞的效果 (Chen et al., 2014)。

(四) 鹿茸之毒性與副作用

鹿茸性質溫和，在亞急性毒性試驗 (subacute toxicity) 中顯示，其最低致死劑量為：口服給予小鼠每公斤體重 5 克之鹿茸 (Shin et al., 1989)。另外，在為期 90 天的毒性試驗中，給予鼠每公斤體重 1 克之鹿茸粉末，則其體重、採食量、臨床症狀、血液生化指標、碳水化合物代謝、肝功能、及腎功能，與對照組相比，皆無明顯不同，且腎臟、腎上腺和腦部之平均臟器重量亦無不同，唯有肝臟重量明顯增加。在病理學檢查上，鹿茸組之鼠，其各種組織無任何異常，因此，在合理的劑量給藥下，儘管鹿茸造成肝臟重量之改變，但並不會造成組織異常 (Zhang., 2000)。

肆、 研究目的與動機

近年來隨著西式飲食的盛行及果糖攝取量的增加，使得國人肥胖、高血脂、脂肪肝、糖尿病等代謝綜合症的現象產生。而非酒精性脂肪肝疾病為世界上常見的肝臟疾病之一，其致病原因可歸納為脂肪酸合成增加或脂肪酸分解減低，進而導致肝細胞損傷、發炎，最後纖維變性。由於鹿茸可顯著抑制小鼠巨噬細胞中 TNF- α 和 IL-6 的分泌量 (Dai et al., 2011)，具有抗發炎的作用。因此，本研究將探討鹿茸在高果糖、高脂飼料誘導小鼠非酒精性脂肪肝疾病之動物模式中，是否以及如何減緩肝臟發炎並降低非酒精性脂肪肝疾病的形成。

伍、 材料與方法

一、 藥品材料

本研究所使用之藥品來源如表 1 所示；所使用之儀器設備廠家如表 2 所示。

表 1、 藥品與材料之來源

Table 1. Sources of reagents and materials

| Reagent | Source |
|--|--|
| 10% formalin | Hold Trade Co. LTD., New-Taipei, Taiwan |
| ALT (GPT) | F. Hoffmann-La Roche LTD., Basel, Switzerland |
| Anti-4-HNE antibody | LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA, USA |
| AST (GOT) | F. Hoffmann-La Roche LTD., Basel, Switzerland |
| Cholesterol | F. Hoffmann-La Roche LTD., Basel, Switzerland |
| Ethanol (99%) | Merck & Co. Inc., Darmstadt, Germany |
| Fonen fructose corn syrup | Fonen and FonHer Ent. Co. LTD., Tainan, Taiwan |
| High-fat-diet | Bio-cando biotechnology Inc., Taoyuan, Taiwan |
| HPLC standards | Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis. MO, USA |
| Hydrogen peroxide, H ₂ O ₂ | Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis. MO, USA |
| IHC kit | LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, WA, USA |
| Insulin ELISA kit | Mercodia Inc., Uppsala, Sweden |
| Isopropanol | Merck & Co. Inc., Piscataway, NJ, USA |
| Maintenance diet | Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG., Lage, Germany |
| Oil-Red-O | Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, Mo, USA |
| Rice vinegar | Kong Yen Foods Co. LTD., Taipei, Taiwan |
| TNF- α , IL-6, IL-33, TSLP, CCL2 ELISA kits | eBiosciences Inc., San Diego, CA, USA |
| Total protein kit | F. Hoffmann-La Roche LTD., Basel, Switzerland |
| Triglycerides | F. Hoffmann-La Roche LTD., Basel, Switzerland |
| Velvet antler | Deer Products Marketing Coop. Assoc., Tainan, Taiwan |
| Xylene | Union Chemical Works LTD., Hsin-Chu, Taiwan |

表 2、儀器廠家

Table 2. Facilities and manufactures

| Facility | Manufacture |
|--|--|
| Automated biochemistry analyzer CoBAS MIRA PLUS | F. Hoffmann-La Roche LTD., Basel, Switzerland |
| Autosampler HITACHI L-7200 | Kabushiki Kaisha Hitachi Seisakusho, Tokyo, Japan |
| Centrifuge HERMLE, HSIANGTAI | Hermle Labortechnik GmbH Co. LTD., Gosheim, Germany |
| Centrifuge KUBOTA 6200 | Kubota Corporation, Tokyo, Japan |
| CNW C18 LC Column (4.6 mm × 250 mm × 5 μm) | Chen Si Technology LTD., Taichung, Taiwan |
| Column oven | Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan |
| ELISA reader (Multiskan spectrum) | Thermo Labsystem, Waltham, MA, USA |
| Microscope Nikon E-200/D70 | Nikon Precision Taiwan LTD., Hsinchu, Taiwan |
| PC-BASED CONTROL UNIT Nikon TS-100/DS-U2 | Nikon Precision Taiwan LTD., Hsinchu, Taiwan |
| Pump HITACHI L-7100 SISC™ software | Kabushiki Kaisha Hitachi Seisakusho, Tokyo, Japan Scientific Information Service Corporation, Davis, U.S.A. |
| Ultrasonic cleaner DC400H | Delta New Instrument Co. LTD., Taipei Hsien, Taiwan |
| UV detector HITACHI L-7400 | Kabushiki Kaisha Hitachi Seisakusho, Tokyo, Japan |

二、實驗方法

(一) 鹿茸萃取物製備流程

將新鮮的鹿茸片切碎後，加入5倍體積之蒸餾水及5倍體積之食醋，在 37 °C 下超音波震盪30 min 後，於120 °C 滅菌15 min，再離心，取其上清液。上清液於 40 mba、37 °C 下減壓濃縮過夜。獲得之鹿茸萃取液濃度為 386 mg dry matter/mL，將每 0.1 mL 之鹿茸萃取液加入 0.0682 g 之重碳酸鈉（小蘇打）中和酸性。最後於 120 °C 滅菌15 min，再儲存於 4 °C 冰箱，以便後續分析使用。總汁每克新鮮鹿茸可得 0.23 g 之萃取液乾物質。

(二) 鹿茸萃取物胺基酸含量之 HPLC (high performance liquid chromatography) 分析

壹、胺基酸標準溶液與鹿茸萃取液之衍生化 (derivatization)

先製備衍生劑 (precolumn derivatization) (Ethanol-ddH₂O-PITC = 7:2:1) 及樣品稀釋液 (710 mg Na₂HPO₄溶於 1000 mL 去離子水後，再以 10% 磷酸：acetonitrile = 95 : 5 之溶液將 pH 值調整至7.4)。

分別精秤不同的胺基酸標準品，根據下表配置成濃度為 4 mmol/L 之溶液。將胺基酸標準品及鹿茸萃取液各取 500 μL，加入 200 μL 衍生劑，於40 mba、37 °C 下減壓濃縮至完全乾燥，再加入 500 μL 樣品稀釋液回溶，以 0.22 μm 孔徑之小飛碟過濾備用。

表 3、標準品配製

Table 3. Preparation of amino acid standard

| Standard | Molecule weight | Weight (mg) for preparing 50 mL of 4 mM solution |
|------------------|-----------------|---|
| Alanine | 89.09 | 17.8 |
| Arginine | 174.20 | 34.8 |
| Aspartic acid | 133.1 | 26.6 |
| Asparagine | 132.12 | 26.4 |
| Anserine nitrate | 303.27 | 60.7 |
| Carnosine | 226.23 | 45.2 |
| Cysteine | 121.16 | 24.2 |
| Glycine | 75.07 | 15.0 |
| Glutammic acid | 147.13 | 29.4 |
| Glutamine | 146.1 | 29.2 |
| Histidine | 155.15 | 31.0 |
| Isolucine | 166.7 | 33.3 |
| Inosine | 268.23 | 53.6 |
| Leucine | 131.17 | 26.2 |
| Lysine | 149.2 | 29.8 |
| Methionine | 146.19 | 29.2 |
| Phenylalanine | 165.19 | 33.0 |
| Proline | 105.1 | 21.0 |
| Serine | 119.12 | 23.8 |
| Threonine | 204.23 | 40.8 |
| Tryptophan | 181.19 | 36.2 |
| Tyrosine | 125.15 | 25.0 |
| Taurine | 268.23 | 53.6 |
| Valine | 117.15 | 23.4 |

貳、分析條件：

Column : 5 μ m , 4.6 \times 250 mm , ODS-2 C18 column

Mobile phase : A – 0.1 M Sodium Acetate : Acetonitrile (97:3)

B – 80% Acetonitrile

Flow rate : 1.0 mL/min

Injection volume : 20 μ l

Detector : 254 nm

Temperature : 38 $^{\circ}$ C

參、沖提梯度：

依王 (2005) 所述進行，簡述如表4。

表 4、沖提梯度

Table 4. Gradient program

| Time (min) | A solution (%) | B solution (%) |
|------------|----------------|----------------|
| 0 | 100 | 0 |
| 13 | 93 | 7 |
| 23 | 77 | 23 |
| 29 | 65 | 35 |
| 35 | 60 | 40 |
| 40 | 0 | 100 |
| 45 | 0 | 100 |
| 47 | 100 | 0 |

*A = 0.1 M Sodium Acetate : Acetonitrile (97:3) , B = 80% Acetonitrile

肆、分析方式：

使用 HPLC 之高壓 pump，混和A、B兩種移動相，並隨著時間變更沖提梯度，以達最佳分離效果。分析一個樣品約耗時 50 min，而每打完一個樣品後，皆以去離子水與清洗劑 (50% MeOH + 50% H₂O) 清洗注射針。

伍、標準檢量線 (calibration curve) 製備：

不同濃度之胺基酸標準品於衍生後，以微量注射針打入 20 μ L 至 HPLC 管柱中，經由滯留時間 (retention time) 及波峰面積，求得標準檢量線。

陸、未知樣品之處理：

使用相同方法測定未知樣品，而以標準品之檢量線做對照，定量未知樣品中胺基酸之含量。

(三) 動物飼養與試驗分組

本試驗研究使用無特定病源之5週齡雄性 C57BL/6 (B6) 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5週後 (即為10週齡；定義為實驗期之第0週)，便開始進行實驗。開始之體重為 21-25 g，依體重隨機分5組，每組12隻。各組之處裡分別為：正常組 (Naïve組)，為不經任何處理之組別；對照組 (Control組)，每日口服給予滅菌蒸餾水 10 mL/kg BW；及三個處理組，包含低劑量、中劑量及高劑量之鹿茸萃取液 (VAE) 之組別，每日分別口服給予100、200、400 mg 萃取物乾物質/kg之鹿茸萃取液。其中對照組和三個處理組皆藉由飼予 30% 高果糖玉米糖漿及 60% 高脂飼料誘導出非酒精性脂肪肝，而正常組則給予蒸餾水及標準飼料。試驗期間小鼠之飲水與飼料皆經滅菌，採任飼，並固定每日光照周期為12 h光照及12 h黑暗，而每週皆紀錄小鼠之體

重、攝食量與飲水量。

(四) 脂肪肝造型模式

於試驗期間第 0 週至第 16 週給予實驗動物 30% (v/v) 果糖水溶液或滅菌後之蒸餾水，且各組皆給予標準飼糧，而於第 13 週至第 16 週，將誘導脂肪肝產生之四組，以 60% 高脂飼糧取代標準飼糧，增加實驗動物脂肪肝的嚴重程度。在第 4 週、第 8 週及第 16 週時進行口服葡萄糖耐受性試驗 (oral glucose tolerance test, OGTT)，以評估實驗動物是否有胰島素抵抗的情形。試驗時，自臉頰採血，測定第 8 週實驗動物血清中三酸甘油酯 (TG) 含量及第 12 週之胰島素的含量，並於第 16 週犧牲小鼠，分離其血清及臟器後，分別將血清及臟器存於 4°C 及 -80°C 冰箱以利後續使用。

(五) 血液採集與血清分離

將小鼠以 forane 麻醉後，使用酒精讓小鼠皮膚濕潤，接著用剪刀將小鼠之皮膚及肌肉層剪開，於找到下腋動脈或頸動脈時，用剪刀剪斷並使用 1 mL 針筒將血液收集至 1.5 mL eppendorf 中，靜置血液 0.5 h 以上待其凝固後，以 10,000 rpm (220.87 V05/6, HERMLE, Hermle Labortechnik) 離心 10 min 分離血清。血清存於 -80°C 冰箱備用。

(六) 口服葡萄糖耐受性試驗

分別在誘導第 4 週、第 8 週、及第 16 週後，將小鼠禁食 16h，再給予小鼠口服 3 g/kg 之葡萄糖，並分別在給糖前與給糖後 30、60、90、120 及 150 min，由小鼠尾靜脈採血，以市售血糖機 (I-SENS, Inc, Korea) 測定血糖值。

(七) 血清胰島素含量測定

使用市售胰島素試劑組 (Mouse Insulin Mercodia, Uppsala, Sweden) 並依其說明測定血清胰島素含量。取待測血清樣品 10 μ L 及胰島素標準品，加入酵素結合

物 (enzyme conjugate)，於室溫下震盪培養 2 h，以清洗液洗 6 次後，加入酵素受質 TMB 呈色，以 2 N 硫酸終止反應，以 ELISA reader (Thermo Labssystem, Multiskan spectrum)，於 450 nm 下測定吸光值，經由標準曲線求得樣品濃度。

(八) 血清中 AST (aspartate aminotransferase) 活性測定

取 120 μ L 血清，以血清生化全自動分析儀 (CoBAS MIRA PLUS, Basel, Switzerland) 及該公司之分析套組 (kit) 分析。其原理如下： α -ketoglutarate 和 L-aspartate 在 AST 的作用下，生成 L-glutamate 和 oxaloacetate；而 oxaloacetate 再與 malate dehydrogenase (MDH) 作用，生成 L-malate，同時 NADH 被氧化成 NAD^+ ，並於 340 nm 下連續監測吸光值下降速度，求得樣品 AST 活性。

(九) 血清中 ALT (alanine aminotransferase) 活性測定

取 120 μ L 血清，以血清生化全自動分析儀 (CoBAS MIRA PLUS, Basel, Switzerland) 及該公司之分析套組 (kit) 分析。其原理如下： α -ketoglutarate 和 L-alanine 在 ALT 的作用下，生成 L-glutamate 和 pyruvate；而 pyruvate 再與 lactic dehydrogenase (LDH) 作用，生成 L-lactate，同時 NADH 被氧化成 NAD^+ ，並於 340 nm 下連續監測吸光值下降速度，求得樣品 ALT 活性。

(十) 血清中三酸甘油酯濃度測定

取 120 μ L 血清，以血清生化全自動分析儀 (CoBAS MIRA PLUS, Basel, Switzerland) 及該公司之分析套組 (kit) 分析。其原理如下：使用 lipoprotein lipase 快速的將 TG 水解為 glycerol，再藉由氧化作用將其氧化成 dihydroxyacetone phosphate 和 hydrogen peroxide，而產生的 hydrogen peroxide 在 peroxidase 催化下與 4-aminophenazone 及 4-chlorophenol 反應，呈現紅色，透過吸光值測定樣品中 TG 之濃度。

(十一) 血清中總膽固醇濃度測定

取 120 μL 血清，以血清生化全自動分析儀 (CoBAS MIRA PLUS, Basel, Switzerland) 及該公司之分析套組 (kit) 分析。其原理如下：使用 cholesterol esterase 將 cholesterol ester 裂解為 cholesterol，再藉由 cholesterol oxidase 之作用將 cholesterol 轉化成 cholest-4-en-3-one 和 hydrogen peroxide，而產生的 hydrogen peroxide 在 peroxidase 催化下與 4-aminophenazone 及 phenol 反應，呈現紅色，透過吸光值測定樣品中膽固醇之濃度。

(十二) HOMA-IR 計算

HOMA-IR 值，可作為判斷是否有胰島素阻抗之情形，以空腹時之血糖及胰島素含量，依下列公式計算 (Matthews *et al.*, 1985)：

$$\text{HOMA-IR} = \text{insulin} (\mu\text{U/mL}) \times \text{glucose} (\text{mmol/L}) / 22.5$$

(十三) 肝臟組織學檢查

肝臟病理分析：於動物犧牲後，將肝臟摘除並秤重、拍照，接著將肝臟分為最大葉、心型葉以及其他小葉，其中，最大葉的部分一半浸泡於 10% 福馬林固定，經脫水製成蠟塊後進行組織切片，以蘇木素-伊紅 (hematoxylin and eosin stain, H&E stain) 及免疫組織染色法 (immunohistochemistry stain) 進行染色。肝臟最大葉的另一半則浸泡於 15% 蔗糖水一天，再於隔天換成 30% 蔗糖水浸泡一天後。將肝臟自糖水中取出，冷凍包埋製成蠟塊後進行組織切片。以 Oil-Red-O 進行染色後，置於光學顯微鏡下觀察。將剩餘的心型葉及其他小葉分別用鋁箔紙包住後，放置於冷凍紙盒，儲存於 -80°C 冰箱以備後續使用。

Oil-Red-O 染色：取 15 mg Oil-Red-O 粉末，加入 50 mL isopropanol，於室溫下避光、震盪過夜使其充分溶解，以作為 stock solution。將 stock solution 與去離子水以 3:2 的比例配置成 working solution。接著分別使用濾紙與 $0.45 \mu\text{m}$ 及 $0.22 \mu\text{m}$ 孔徑之小飛碟過濾，清除 working solution 內未溶解之 Oil-Red-O 顆粒。將保存於 -

80°C 冰箱之肝臟組織冷凍切塊取出，切片成 8-10 μm 厚度。接著將組織切片於 50 % isopropanol 潤洗 15 min，洗去組織上的冷凍包埋液後，滴上 Oil-Red-O 之 working solution，染色 6 min，再以 50 % isopropanol 潤洗，直到洗淨多餘的 working solution。於組織切片風乾後，滴上 60 % 甘油進行封片，於顯微鏡下觀察油滴分佈情形。

免疫組織化學染色(immunohistochemistry stain)：將肝臟組織委外包埋成蠟塊、切片後，利用二甲苯和酒精將組織脫蠟、復水，接著將組織切片置於 10 mM 之 citrate buffer (pH=6.0) 中，於滅菌釜中隔水加熱至 121°C，共 5 min。取出組織切片使其於室溫下冷卻後，用隔水筆沿著組織外圍畫一圈，滴上 peroxidase blocking solution，靜置 5 min 以去除過氧化物之干擾。以清洗液 (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.05 % Tween 20, TTBS) 清洗 2 次後，滴上兔對抗 4-HNE 之第一抗體，靜置 30 min，再以清洗液清洗 2 次，滴上抗兔 IgG 之第二抗體，靜置 10 min，再以洗液清洗 2 次後，滴上 3,3-diaminobenzidine (DAB) 呈色 (咖啡色)，再以 haematoxylin 作為背景色以便觀察。

蘇木素-伊紅染色 (hematoxylin and eosin stain, H&E stain)：將肝臟組織包埋成蠟塊，切片，染 H&E (委外製作)。使用光學顯微鏡觀察肝臟細胞脂肪變性之情形。

(十四) 肝臟三酸甘油酯及總膽固醇濃度分析

將小鼠肝臟心型葉秤取約 0.1 g，加入 2 mL chloroform/methanol (2:1, v/v)，研磨。於室溫下靜置 1 h，使其作用完全。於 5,000 rpm (220.87 V05/6, HERMLE, Hermle Labortechnik) 下離心 10 min，將上層液 (脂質層) 取出。加入 0.2 倍體積之 0.9% 生理食鹽水混合。在呈現乳白色時，再於 2,000 rpm (220.87 V05/6, HERMLE, Hermle Labortechnik) 離心 5 min，將上層液移除，用氮氣將含有脂質的底部液體置於 55°C 乾熱氣上吹乾。加入 1 mL *tert*-butyl alcohol/Triton X-100/methanol (2:1:1, v/v/v) 後，於 65°C 加熱 20 min，收集樣品，以血液生化儀分析之。

(十五) 肝臟細胞激素濃度測定

本研究所測定之肝臟細胞激素包括：腫瘤壞死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白細胞介素 6 (interleukin 6, IL-6)、白細胞介素 33 (interleukin 33, IL-33)、胸腺基質淋巴生成素 (thymic stromal lymphopoietin, TSLP) 及 CC 趨化因子配體 2 (chemokine C-C motif ligand 2, CCL2)。將儲存於 -80°C 之肝臟解凍，秤取約 0.1g，加入 1 mL Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) 將肝臟均質，於 4°C 、 $500 \times \text{g}$ 離心 10 min 後，取上清液，儲存於 -20°C 冰箱備用。使用市售 ELISA 試劑組 (TNF- α 、IL-6、IL-33、TSLP 或 CCL2)，分別將具有專一性之抗體 (TNF- α 、IL-6、IL-33、TSLP 或 CCL2 的 capture antibody) 固定於塑膠孔盤上，於 4°C 培養隔夜。隔日以清洗液 (0.05% Tween 20 in DPBS) 清洗 5 次，以洗去多餘抗體。加入 assay diluent，於室溫下培養 1 h，再以清洗液洗 5 次後，加入待測樣品及標準品 (TNF- α 、IL-6、IL-33、TSLP 或 CCL2)，於室溫下培養 2 h。以清洗液洗 5 次以洗去多餘之待測樣品後，加入 TNF- α 、IL-6、IL-33 或 TSLP 之 detection antibody (第一抗體) 與待測抗原進行鍵結。於室溫下培養 1 h，以清洗液洗 5 次以洗去多餘未鍵結之第一抗體。再加入帶有酵素 Avidin-HRP 之第二抗體。於室溫下反應 0.5 h，與第一抗體鍵結，再以清洗液洗 7 次洗去多餘未鍵結之 Avidin-HRP 後，最後加入酵素受質 TMB 呈色，以 2 N 硫酸終止反應，於 450 nm 下測定吸光值，經由標準曲線求得樣品濃度。

三、統計分析

數據以 SPSS (Statistical Package for Social Science) 之單因子變方分析 (One-way analysis of variance) 檢驗後，以 LSD 比較組間兩兩之差異。

陸、 結果

一、鹿茸胺基酸成分分析

從鹿茸萃取液中可分離出 18 種，包括必需胺基酸及非必需胺基酸等成分 (表 5)。其中最豐富的胺基酸依序為 Proline、Phenylalanine、Valine、Asparagine 及 Leucine。五者共占胺基酸總量之 84.05%。此外，Taurine 占了胺基酸之 2.69%。

表 5、鹿茸萃取液之胺基酸成分

Table 5. The amino acid composition of sambar velvet antler extracts

| Amino acid | Amount (mmol/L) |
|----------------------|-----------------|
| Alanine | 1.14 |
| Arginine+ Threonine | 7.24 |
| Aspartic acid | - |
| Asparagine | 34.49 |
| Cysteine | 28.15 |
| Glycine | 0.31 |
| Glutammic acid | 3.16 |
| Glutamine | 0.16 |
| Histidine | - |
| Isolucine | 14.61 |
| Inosine | - |
| Leucine | 28.84 |
| Lysine | 14.99 |
| Methionine | - |
| Phenylalanine | 46.27 |
| Proline | 371.55 |
| Serine | 0.35 |
| Tryptophan | 2.40 |
| Tyrosine | 10.22 |
| Taurine | 16.78 |
| Valine | 43.26 |
| Anserine + Carnosine | - |

二、鹿茸對非酒精性脂肪肝疾病之保護作用

(一) 小鼠之體重、總增重、臟器與脂肪重量

飼予 30% 高果糖玉米糖漿及 60% 高脂飼料誘導出非酒精性脂肪肝疾病之各組 (對照組及每日分別口服給予 100、200、400 mg/kg 之鹿茸萃取液之處理組)，其體重在整個試驗期皆無組間差異，但於第 12 週開始皆顯著高於正常組者 (Naïve 組) (圖 3； $P < 0.05$)。在整個試驗期間之增重，正常組者顯著低於其它組別者，而給予中劑量鹿茸萃取液之組別者，則顯著較對照組者為低 ($P < 0.05$)。在肝臟重/體重比，各組皆無顯著差異。對照組之肝臟、脾臟及腎臟等重量皆顯著較正常組者為高 ($P < 0.05$)，而鹿茸萃取液給予之各組，其脾臟重量居於正常組與對照組者之間，而與此兩組皆無顯著差異 (表 6)。腹部脂肪、附睪脂肪與腎周脂肪等重量，正常組者皆顯著低於其它組別者 ($P < 0.05$)，而其餘四組之間皆無顯著差異 (表 7)。

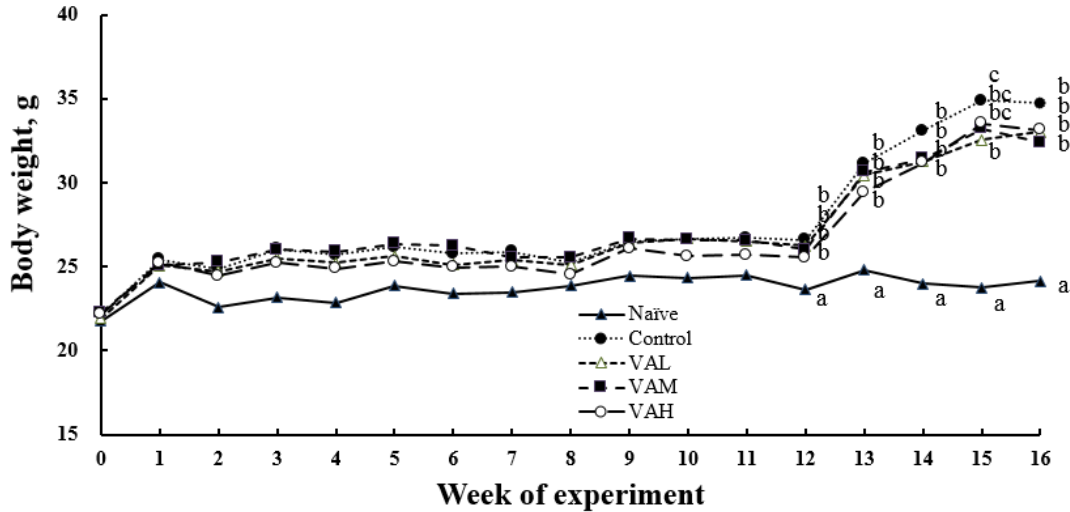


圖 3、鹿茸萃取液對高果糖高脂飼料誘導小鼠非酒精性脂肪肝疾病中體重變化之影響。

VAL：低劑量鹿茸萃取液 (100 mg/kg)；VAM：中劑量鹿茸萃取液 (200 mg/kg)；VAH：高劑量鹿茸萃取液 (400 mg/kg)。

a,b,c 相同時間點、不同英文符號，表示具顯著差異 (P < 0.05)。

每組平均值之觀察數皆為 12。

Figure 3. The effects of velvet antler extracts on the changes in body weights in high fructose corn syrup and high-fat-diet induced NAFLD murine.

VAL: Velvet antler low level of extract (100 mg/kg); VAM: Velvet antler medium level of extract (200 mg/kg); VAH: Velvet antler high level of extract (400 mg/kg).

a,b,c Means in the same time point without same character differ significantly (P < 0.05).

n = 12 for each mean.

表 6、鹿茸萃取液對高果糖高脂飼料誘導小鼠非酒精性脂肪肝疾病中增重與肝臟、脾臟及腎臟重量之影響

Table 6. The effects of velvet antler extracts on the weight gain, and weight of liver, spleen and kidney in high fructose corn syrup and high-fat-diet induced NAFLD murine

| Trait | Naïve | Control | VAL | VAM | VAH | RMSE |
|----------------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|------|
| Final body weight, g | 24.13 ^b | 34.73 ^a | 33.01 ^b | 32.38 ^b | 33.13 ^b | 2.83 |
| Weight gain, g | 2.36 ^c | 12.57 ^a | 11.08 ^{ab} | 10.10 ^b | 10.98 ^{ab} | 2.09 |
| Liver weight, g | 0.92 ^b | 1.11 ^a | 1.05 ^a | 1.03 ^a | 1.03 ^a | 0.10 |
| Liver weight/body weight×100%, % | 3.80 ^a | 3.19 ^a | 3.17 ^a | 3.17 ^a | 3.12 ^a | 0.19 |
| Spleen weight, g | 0.06 ^b | 0.08 ^a | 0.06 ^{ab} | 0.07 ^{ab} | 0.07 ^{ab} | 0.00 |
| Kidney weight, g | 0.28 ^b | 0.33 ^a | 0.32 ^a | 0.31 ^a | 0.32 ^a | 0.03 |

VAL：低劑量鹿茸萃取液 (100 mg/kg)；VAM：中劑量鹿茸萃取液 (200 mg/kg)；VAH：高劑量鹿茸萃取液 (400 mg/kg)。

^{a,b,c} 相同時間點、不同英文符號，表示具顯著差異 (P < 0.05)。

每組平均值之觀察數皆為 12。

VAL: Velvet antler low level of extract (100 mg/kg); VAM: Velvet antler medium level of extract (200 mg/kg); VAH: Velvet antler high level of extract (400 mg/kg).

^{a,b,c} Means in the same time point without same character differ significantly (P < 0.05).

n = 12 for each mean.

表 7、鹿茸萃取液對高果糖高脂飼料誘導小鼠非酒精性脂肪肝疾病中腹部、附睪及腎周脂肪重量之影響

Table 7. The effects of velvet antler extracts on the weights of abdominal fat, epididymal fat and perirenal fat in high fructose corn syrup and high-fat-diet induced NAFLD murine

| Trait | Naïve | Control | VAL | VAM | VAH | RMSE |
|--------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------|
| Abdominal fat weight, g | 0.22 ^b | 1.62 ^a | 1.48 ^a | 1.42 ^a | 1.49 ^a | 0.36 |
| Epididymal fat weight, g | 0.04 ^b | 0.23 ^a | 0.22 ^a | 0.22 ^a | 0.22 ^a | 0.05 |
| Perirenal fat weight, g | 0.08 ^b | 0.81 ^a | 0.72 ^a | 0.70 ^a | 0.71 ^a | 0.16 |

VAL：低劑量鹿茸萃取液 (100 mg/kg)；VAM：中劑量鹿茸萃取液 (200 mg/kg)；VAH：高劑量鹿茸萃取液 (400 mg/kg)。

^{a,b,c} 相同時間點、不同英文符號，表示具顯著差異 (P < 0.05)。

每組平均值之觀察數皆為 12。

VAL: Velvet antler low level of extract (100 mg/kg); VAM: Velvet antler medium level of extract (200 mg/kg); VAH: Velvet antler high level of extract (400 mg/kg).

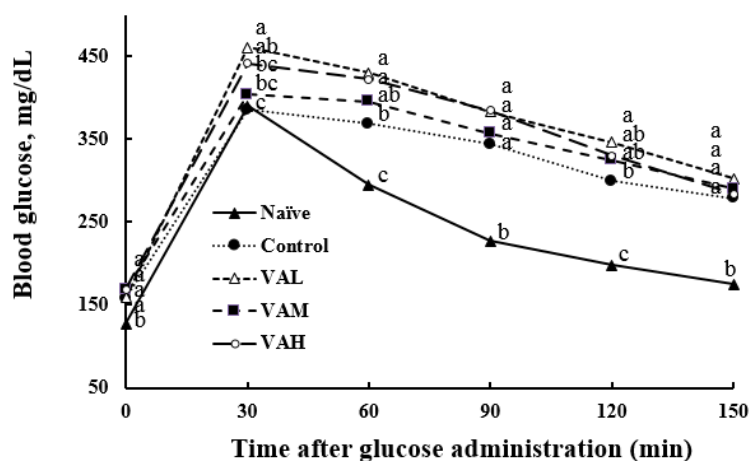
^{a,b,c} Means in the same time point without same character differ significantly (P < 0.05).

n = 12 for each mean.

(二) 口服葡萄糖耐受性試驗

飼予 30% 高果糖玉米糖漿及 60% 高脂飼料誘導出非酒精性脂肪肝疾病之組別，在第 16 週之口服葡萄糖耐受性試驗之 0 min 血糖，皆顯著較正常組者為高 ($P < 0.05$)，但其餘四組之間皆無顯著差異 ($P > 0.05$)。各組於給糖後之 30 min 血糖即達到高峰，並隨著時間而下降。在第 150 min 之血糖值，正常組者皆顯著較其他四組者為高 (圖 4A; $P < 0.05$)。將葡萄糖耐受性試驗以反應曲線下面積表示，則顯示正常組顯著低於其它四組者 (圖 4B; $P < 0.05$)。

(A)



(B)

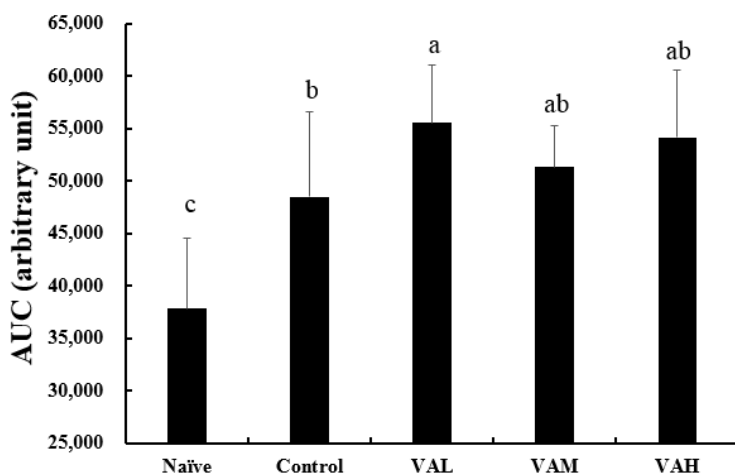


圖 4、鹿茸萃取液對高果糖高脂飼料誘導小鼠非酒精性脂肪肝疾病中口服葡萄糖耐受性試驗之影響。(A) 口服葡萄糖耐受性試驗；(B) 血糖值曲線下面積。

口服葡萄糖耐受性試驗，於禁食 16-h 後灌服 3g/kg 之葡萄糖。

VAL：低劑量鹿茸萃取液 (100 mg/kg)；VAM：中劑量鹿茸萃取液 (200 mg/kg)；

VAH：高劑量鹿茸萃取液 (400 mg/kg)。

a,b,c 相同時間點、不同英文符號，表示具顯著差異 ($P < 0.05$)。

每組平均值之觀察數皆為 12。

Figure 4. The effects of velvet antler extracts on oral glucose tolerance test (OGTT) in high fructose corn syrup and high-fat-diet induced NAFLD murine. (A) the oral glucose tolerance test (OGTT); (B) the area under curve (AUC).

In the oral glucose tolerance test, glucose was administered (3g/kg) by intragastrically administered after 16-h fasting.

VAL: Velvet antler low level of extract (100 mg/kg); VAM: Velvet antler medium level of extract (200 mg/kg); VAH: Velvet antler high level of extract (400 mg/kg).

a,b,c Means in the same time point without same character differ significantly ($P < 0.05$).

n = 12 for each mean.

(三) 胰島素敏感性

在空腹時之血清胰島素含量在組間皆無顯著差異 (表 8)，以空腹時之血清胰島素及葡萄糖含量計算 HOMA-IR，則除低劑量鹿茸組及正常組之間具有顯著差異 ($P < 0.05$) 之外，其餘各組間皆無顯著差異 (表 8)。

表 8、鹿茸萃取液對高果糖高脂飼料誘導小鼠非酒精性脂肪肝疾病中空腹血清胰島素濃度及 HOMA-IR 值之影響

Table 8. The effects of velvet antler extracts on the serum insulin concentration postabsorption and homeostatic model assessment insulin resistance (HOMA-IR) in high fructose corn syrup and high-fat-diet induced NAFLD murine

| Trait | Naïve | Control | VAL | VAM | VAH | RMSE |
|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-------|
| Glucose, mg/dL | 144.67 ^c | 178.92 ^{bc} | 203.75 ^{ab} | 203.25 ^{ab} | 176.50 ^{bc} | 42.80 |
| Insulin, μ U/mL | 6.77 | 7.92 | 7.97 | 6.65 | 7.14 | 1.80 |
| HOMA-IR | 2.42 ^b | 3.53 ^{ab} | 4.12 ^a | 3.42 ^{ab} | 3.08 ^{ab} | 1.39 |

VAL：低劑量鹿茸萃取液 (100 mg/kg)；VAM：中劑量鹿茸萃取液 (200 mg/kg)；VAH：高劑量鹿茸萃取液 (400 mg/kg)。

^{a,b} 相同時間點、不同英文符號，表示具顯著差異 ($P < 0.05$)。

每組平均值之觀察數皆為 12。

VAL: Velvet antler low level of extract (100 mg/kg); VAM: Velvet antler medium level of extract (200 mg/kg); VAH: Velvet antler high level of extract (400 mg/kg).

^{a,b} Means in the same time point without same character differ significantly ($P < 0.05$).

n = 12 for each mean.

(四) 肝臟內三酸甘油酯及總膽固醇濃度

飼予 30% 高果糖玉米糖漿及 60% 高脂飼料誘導出非酒精性脂肪肝疾病之各組，其肝臟內三酸甘油酯濃度皆顯著較正常組者為高，但顯著較對照組者為低 (表 9； $P < 0.05$)。對照組之總膽固醇，顯著較正常組者為高 ($P < 0.05$)，而給予鹿茸萃取液之低劑量處理組則與正常組無顯著差異 (表 9)。

表 9、鹿茸萃取液對高果糖高脂飼料誘導小鼠非酒精性脂肪肝疾病中肝臟內三酸甘油酯及總膽固醇濃度之影響

Table 9. The effects of velvet antler extracts on the contents of hepatic triglyceride and total cholesterol in high fructose corn syrup and high-fat-diet induced NAFLD murine

| Hepatic lipid content | Naïve | Control | VAL | VAM | VAH | RMSE |
|---------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------|
| Hepatic triglyceride, mg/g | 26.7 ^c | 44.9 ^a | 38.6 ^b | 37.6 ^b | 37.4 ^b | 7.34 |
| Hepatic total cholesterol, mg/g | 2.22 ^b | 3.47 ^a | 2.80 ^b | 3.05 ^a | 2.93 ^a | 0.81 |

VAL：低劑量鹿茸萃取液 (100 mg/kg)；VAM：中劑量鹿茸萃取液 (200 mg/kg)；VAH：高劑量鹿茸萃取液 (400 mg/kg)。

^{a,b,c} 相同時間點、不同英文符號，表示具顯著差異 ($P < 0.05$)。

除了 VAH 組之觀察數為 11 之外，其餘各組平均值之觀察數皆為 12。

VAL: Velvet antler low level of extract (100 mg/kg); VAM: Velvet antler medium level of extract (200 mg/kg); VAH: Velvet antler high level of extract (400 mg/kg).

^{a,b,c} Means in the same time point without same character differ significantly ($P < 0.05$).

n = 12 for each mean except for the triglyceride and cholesterol levels in Group VAH, where the numbers of observation were 11.

(五) 血清中三酸甘油酯及總膽固醇濃度

飼予 30% 高果糖玉米糖漿及 60% 高脂飼料誘導出非酒精性脂肪肝疾病之各組，其血清中三酸甘油酯及總膽固醇濃度皆顯著較正常組者為高 ($P < 0.05$)，而與對照組者大致無顯著差異 (表 10)。

表 10、鹿茸萃取液對高果糖高脂飼料誘導小鼠非酒精性脂肪肝疾病中血清三酸甘油酯及總膽固醇濃度之影響

Table 10. The effects of velvet antler extracts on serum levels of triglyceride and total cholesterol in high fructose corn syrup and high-fat-diet induced NAFLD murine

| Serum lipid level | Naïve | Control | VAL | VAM | VAH | RMSE |
|--------------------------|-------------------|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|------|
| Triglyceride, mg/dL | 62.8 ^c | 107.9 ^b | 116.1 ^{ab} | 114.2 ^{ab} | 126.0 ^a | 17.2 |
| Total cholesterol, mg/dL | 65.1 ^b | 149.8 ^a | 152.9 ^a | 150.5 ^a | 146.5 ^a | 16.8 |

VAL：低劑量鹿茸萃取液 (100 mg/kg)；VAM：中劑量鹿茸萃取液 (200 mg/kg)；VAH：高劑量鹿茸萃取液 (400 mg/kg)。

^{a,b,c} 相同時間點、不同英文符號，表示具顯著差異 ($P < 0.05$)。

每組平均值之觀察數皆為 12。

VAL: Velvet antler low level of extract (100 mg/kg); VAM: Velvet antler medium level of extract (200 mg/kg); VAH: Velvet antler high level of extract (400 mg/kg).

^{a,b,c} Means in the same time point without same character differ significantly ($P < 0.05$).

n = 12 for each mean.

(六) 血清肝功能指標測定

給予鹿茸萃取液之各處理組，其血清中 AST 及 ALT 活性顯著較對照組者為低 ($P < 0.05$)，而與正常組者無顯著差異 (表 11)。對照組之 AST 與 ALT 雖皆略高於正常組者，但皆未達顯著水準。

表 11、鹿茸萃取液對高果糖高脂飼料誘導小鼠非酒精性脂肪肝疾病中血清 AST 及 ALT 活性之影響

Table 11. The effects of velvet antler extracts on the serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities in high fructose corn syrup and high-fat-diet induced NAFLD murine

| Serum enzyme activity (U/L) | Naïve | Control | VAL | VAM | VAH | RMSE |
|-----------------------------|---------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------|
| Aspartate aminotransferase | 114.2 ^{ab} | 130.1 ^a | 88.3 ^b | 84.7 ^b | 86.1 ^b | 43.1 |
| Alanine aminotransferase | 44.8 ^{ab} | 53.0 ^a | 33.4 ^b | 29.3 ^b | 31.8 ^b | 20.9 |

VAL：低劑量鹿茸萃取液 (100 mg/kg)；VAM：中劑量鹿茸萃取液 (200 mg/kg)；VAH：高劑量鹿茸萃取液 (400 mg/kg)。

^{a,b} 相同時間點、不同英文符號，表示具顯著差異 ($P < 0.05$)。

每組平均值之觀察數皆為 12。

VAL: Velvet antler low level of extract (100 mg/kg); VAM: Velvet antler medium level of extract (200 mg/kg); VAH: Velvet antler high level of extract (400 mg/kg).

^{a,b} Means in the same time point without same character differ significantly ($P < 0.05$).

n = 12 for each mean.

(七) 肝臟外觀形態圖

飼予 30% 高果糖玉米糖漿及 60% 高脂飼料誘導出非酒精性脂肪肝疾病之對照組，其肝臟由於脂肪過度堆積，導致肝臟腫大、顏色呈現淡黃色。給予鹿茸萃取液之各處理組，其肝臟顏色皆較對照組者為深，而與正常組者相近（圖 5）。

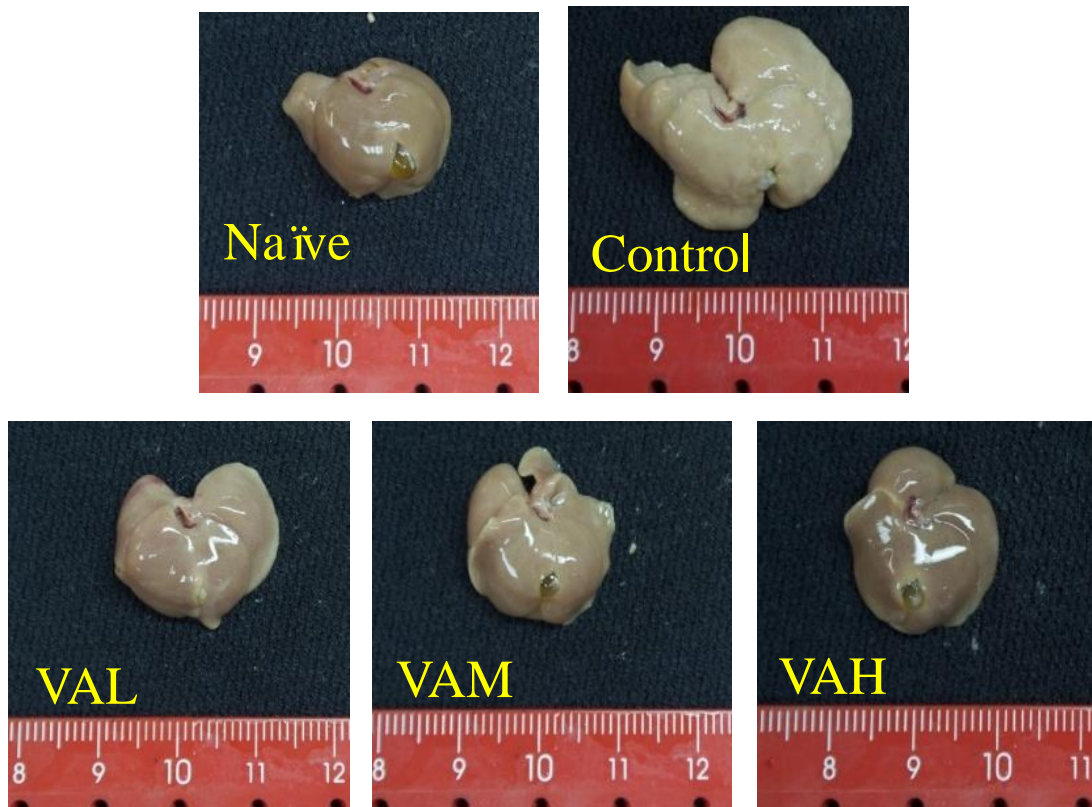


圖 5、鹿茸萃取液對高果糖高脂飼料誘導小鼠非酒精性脂肪肝疾病中肝臟外觀之影響。各組取一代表。

Figure 5. The effects of velvet antler extracts on the liver gross appearance in high fructose corn syrup and high-fat-diet induced NAFLD murine. Each plate is a represent in each group.

(八) 肝臟病理組織學檢查

藉由 H&E 染色可以觀察肝臟內脂肪空泡分布之情形。H&E 染色之組織學檢查顯示，正常組之肝臟細胞排列整齊，且無明顯之脂肪空泡；對照組則由於脂肪空泡的堆積，導致細胞排列混亂；給予鹿茸萃取液之各處理組，其脂肪空泡堆積之情形獲得改善 (圖 6A)。藉由 Oil-Red 染色可以更清楚觀察肝臟內脂肪油滴堆積之情形，其染色組織學顯示，正常組之肝臟無明顯的油滴堆積情形；對照組則有大量的油滴堆積；給予鹿茸萃取液之各處理組，其油滴堆積之情形獲得改善 (圖 6B)。正常組肝臟無任何 4-HNE 積聚；對照組則有大量積聚；給予鹿茸萃取液之各處理組，其 4-HNE 積聚程度較對照組者下降 (圖 6C)。

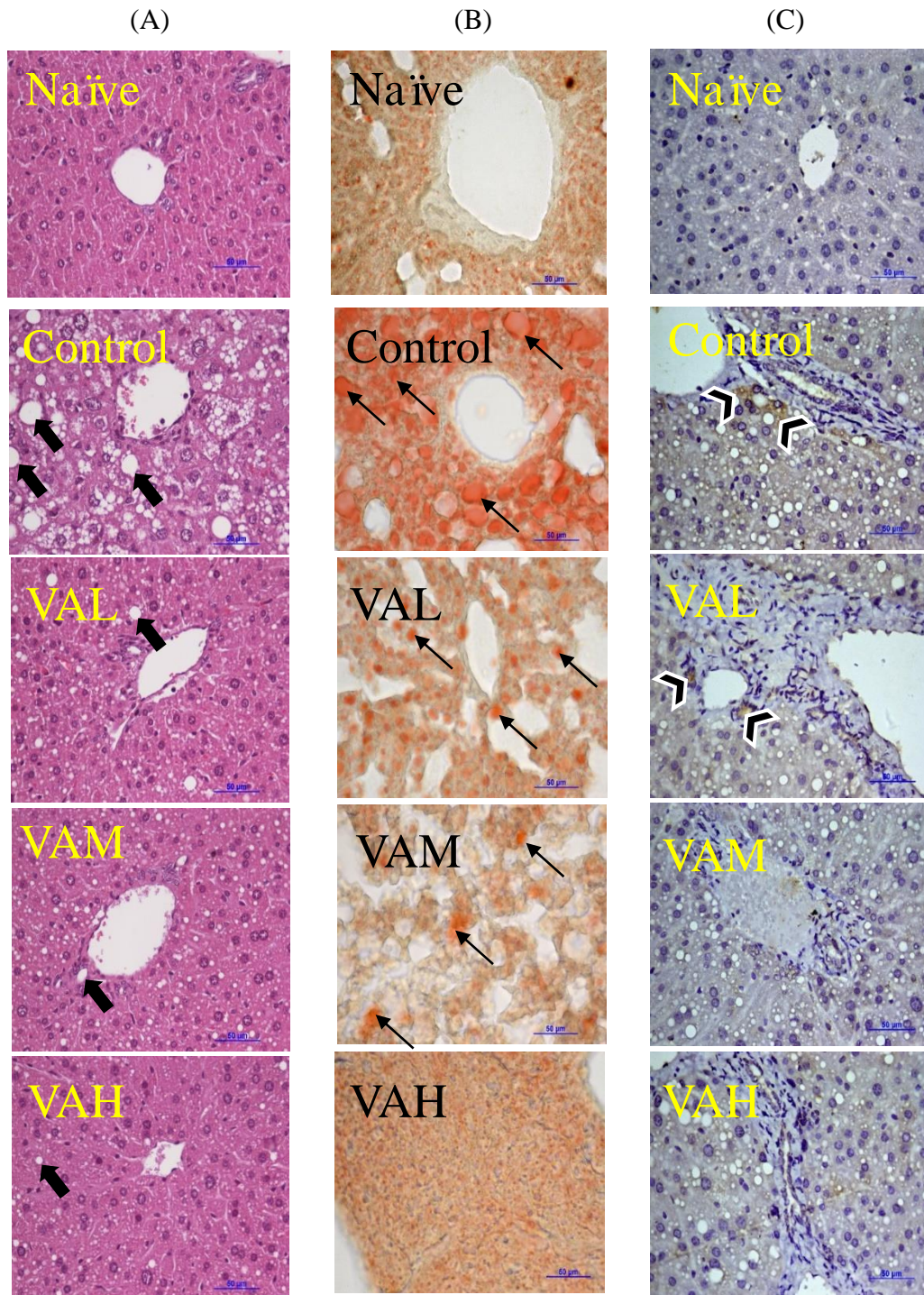


圖 6、鹿茸萃取液對高果糖高脂飼料誘導小鼠非酒精性脂肪肝疾病中肝臟切片組織學之影響。(A) H&E 染色；(B) Oil-Red 染色；(C) 4-HNE 染色。

➡ 脂肪空泡； —→ 油滴； ➤ 4-HNE。

Figure 7. The effects of velvet antler extracts on the histology of liver in high fructose corn syrup and high-fat-diet induced NAFLD murine. (A) stained with hematoxylin and eosin (H&E); (B) stained with Oil-Red; (C) stained with 4-hydroxynonenal (4-HNE) of immunohistochemistry.

➡ Fat vacuoles; —→ Droplets; ➤ 4-HNE.

(九) 肝臟細胞激素 (TNF- α 、IL-6、CCL2、IL-33、TSLP)

促發炎細胞激素 TNF- α 、IL-6、CCL2、IL-33 及 TSLP 在肝臟之含量，對照組者皆顯著較正常組者為高 (表 12； $P < 0.05$)。肝臟內 TNF- α 及 TSLP 之含量在給予中劑量及高劑量鹿茸萃取液之處理組者，顯著較對照組者為低 (表 12； $P < 0.05$)；肝臟內 IL-6 之含量在給予高劑量鹿茸萃取液之處理組者，顯著較對照組者為低 (表 12； $P < 0.05$)；肝臟內 CCL2 及 IL-33 之含量則不論是給予低劑量、中劑量或高劑量之鹿茸萃取液，皆顯著較對照組者為低 ($P < 0.05$)。

表 12、鹿茸萃取液對高果糖高脂飼料誘導小鼠非酒精性脂肪肝疾病中肝臟內細胞激素分泌量之影響

Table 12. The effects of velvet antler extracts on hepatic contents of cytokines in high fructose corn syrup and high-fat-diet induced NAFLD murine

| Cytokine content (ng/g) | Naïve | Control | VAL | VAM | VAH | RMSE |
|-------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------|
| TNF- α | 27.1 ^c | 53.7 ^a | 43.2 ^{ab} | 39.0 ^{bc} | 34.5 ^{bc} | 16.11 |
| IL-6 | 95.6 ^b | 209.3 ^a | 152.8 ^a | 147.5 ^a | 90.1 ^b | 87.96 |
| CCL2 | 22.9 ^b | 43.1 ^a | 26.2 ^b | 31.5 ^b | 29.6 ^b | 14.98 |
| IL-33 | 59.8 ^b | 109.7 ^a | 73.5 ^b | 61.9 ^b | 58.2 ^b | 31.85 |
| TSLP | 42.0 ^c | 81.9 ^a | 63.7 ^{ab} | 60.5 ^{bc} | 51.6 ^{bc} | 23.13 |

VAL：低劑量鹿茸萃取液 (100 mg/kg)；VAM：中劑量鹿茸萃取液 (200 mg/kg)；VAH：高劑量鹿茸萃取液 (400 mg/kg)。

^{a,b,c} 同一排、不同英文符號，表示具顯著差異 ($P < 0.05$)。

除對照組與 VAH 組之 IL-6 之觀察數為 11 之外，其餘各組平均值之觀察數皆為 12。

VAL: Velvet antler low level of extract (100 mg/kg); VAM: Velvet antler medium level of extract (200 mg/kg); VAH: Velvet antler high level of extract (400 mg/kg).

^{a,b,c} Means within the same row without the same superscript differ significantly ($P < 0.05$).

n = 12 for each mean except for the levels of IL-6 in control and VAH, where n = 11.

柒、 討論

本研究所使用之市售台灣水鹿之鹿茸通常是在解角後的 2.5 個月收割。經食醋萃取後之萃取液可分離出 18 種活性成分，包括必需胺基酸及非必需胺基酸等成分。其中最豐富的為 Proline、Phenylalanine、Valine、Asparagine 及 Leucine，總共占胺基酸總量的 84.05%。此結果與 Joen et al. (2009, 2011) 及王 (2005) 所得結果具有相當大之差異。解角後 40 日與 60 日之梅花鹿鹿茸，分為上、中、下三個部位，經由 6 M 鹽酸水解後，可偵測出 16 種胺基酸，其中 Aspartic acid、Glutamic acid、Proline、Glycine 及 Arginine 總共占了胺基酸總量的 32.5-37.2%，且胺基酸含量隨著頂部往基部遞減，同一部位之總胺基酸含量則隨收割時間之延長而下降 (Joen et al., 2009)。解角後 65 日、80 日及 95 日之美洲麋鹿鹿茸分為五個部位 (top; upper; middle; base; bottom)，經由 6 M 鹽酸水解後，頂部鹿茸之胺基酸含量高於其他四個部位，且解角後 65 日之鹿茸，其頂部之 Threonine、Serine、Glutamic acid、Isoleucine、Leucine、Tyrosine、及 Phenylalanine 等含量，皆高於解角後 80 日與 95 日始採收之鹿茸者 (Joen et al., 2011)。此外，將俄羅斯進口之鹿茸分為茸尖、茸頭及粗茸三部分，經乙醇萃取，分析 Glycine、Alanine、Proline、Arginine 及 Valine 等五種胺基酸，顯示茸尖之總胺基酸含量高於茸頭及粗茸者，且五種胺基酸含量由高至低分別為 Glycine、Alanine、Proline、Arginine 及 Valine (王，2005)。此等結果之差異可能是鹿茸萃取方法、鹿茸收割階段、採樣部位與鹿種不同之故。

長期攝取 30% 高果糖玉米糖漿，會造成小鼠脾臟腫大之情形，代表伴隨著發炎的產生 (Li and Hsieh, 2014)。長期攝取 30% 高果糖玉米糖漿及 60% 高脂飼料，會造成小鼠肝臟、脾臟及腎臟重量顯著較正常組者為高 (賴，2014)。在本研究中，此等現象再度被對照組之表現所證實。然而，在給予小鼠鹿茸萃取液後，脾臟重量與正常組相較並無顯著差異，顯示脾臟腫大之情形獲得改善。此表示鹿茸萃取液之給予可以減輕高果糖與/或高脂飲食所致之發炎反應。

胰島素阻抗、氧化壓力及炎症反應之級聯反應 (cascade)，促使 NAFLD 發病。當產生胰島素阻抗時，脂肪與肌肉細胞會首先氧化脂質，導致游離脂肪酸釋放並經由肝臟吸收，而過多的游離脂肪酸堆積於肝臟時，則會形成脂肪肝 (Lewis and Mohanty, 2010)。本研究在第0週至第12週，僅予以對照組及鹿茸處理組之小鼠30%高果糖玉米糖漿。由於對照組在第8週及第12週時，其血清中胰島素濃度與正常組無顯著差異，故在第13週至第16週，本研究除給予對照組及鹿茸處理組之小鼠30%高果糖玉米糖漿之外，亦給予 60% 高脂飼料，以誘導脂肪肝之發生。高糖飲食可改變肝臟細胞之氧化還原狀態，並導致肝臟細胞堆積脂質 (Sodhi et al., 2015)。不論是給予幼鼠 (4週齡) 高脂飼料，或給予成鼠 (12週齡) 高果糖飼料13週，皆會造成其空腹血糖濃度顯著高於正常組者 (de Castro et al., 2013)。給予雄性B6小鼠 40% 高果糖糖漿及60% 高脂飼料8週，會造成小鼠血糖濃度顯著高於正常組者 (Mookkan et al., 2014)。將小鼠隨機分成四組 (高脂高果糖組、高脂組、高果糖組及正常組) 誘導其產生NASH。結果顯示，高脂高果糖飲食可誘導小鼠NASH之產生，並出現典型之肝臟組織學特徵及肥胖等代謝表型。而在單純以高果糖誘導之情形下，則不論是在肝臟組織學、或血清中AST與ALT之活性變化，與正常組者相較，皆不明顯 (Liu et al., 2014)。在本研究中，高果糖高脂誘發 NAFLD 之各組，其空腹時之胰島素濃度雖然與正常組者無異，但其空腹之血糖與糖耐受試驗之曲線下面積皆顯著高於正常組者。然而，由於變異之巨大，使得僅有一組之 HOMA-IR 顯著高於正常組者。綜合上述資料，在本研究中，高果糖、高脂飼糧已引起小鼠之胰島素阻抗。在本研究中，給予鹿茸萃取液之各組，其胰島素濃度及 HOMA-IR，與對照組無顯著差異，表示鹿茸對於血糖之代謝似無影響。

不論是給予幼鼠 (4週齡) 高脂飼料，或給予成鼠 (12週齡) 高果糖飼料13週，皆會造成其血漿中 AST 與 ALT 活性顯著高於正常者 (de Castro et al., 2013)。給予高脂飼料與高果糖 16 週，會造成雄性 B6 小鼠血漿中 ALT 活性顯著較正常組者為高，並產生葡萄糖耐受性下降及胰島素阻抗之情形 (Tetri et al., 2008)。長期攝取

30% 高果糖玉米糖漿及 60% 高脂飼料，會造成小鼠血清中 AST 與 ALT 活性顯著高於正常組 (賴, 2014)。本研究中，對照組之血清 AST 與 ALT 皆顯著高於正常組者，顯示對照組已被誘發出 NAFLD。在高果糖高脂飼糧誘發 NAFLD 中，給予鹿茸萃取液之各處理組，其血清中 AST 及 ALT 活性顯著較對照組者為低，甚至較正常組者為低。此表示鹿茸對小鼠之肝臟具有保護作用。而且，低劑量之鹿茸萃取液即具有與高劑量者相同之效果。

血液中 TG 濃度之高低，與飲食及代謝有關。給予幼鼠 (4 週齡) 高脂飼料，會造成其血漿中 HDL 膽固醇濃度顯著低於正常組者，並誘發 NAFLD 之產生。給予成鼠 (12 週齡) 高果糖飼料，會造成其血漿中 TG 濃度及總膽固醇濃度顯著高於正常組者，並誘發 NAFLD 之產生 (de Castro et al., 2013)。給予雄性 B6 小鼠 40% 高果糖糖漿及 60% 高脂飼料 8 週，會造成小鼠體重及肝臟內 TG 濃度顯著高於正常組者。此外，在肝臟組織學 H&E 染色中可看出明顯的脂肪變性情形 (Mookkan et al., 2014)。本研究之對照組在高果糖與高脂攝取之情況下，其血清中與肝臟中之 TG 與膽固醇含量皆顯著高於正常飲食者，證明飲食確實影響脂質之代謝。本研究中，與對照組者相較，鹿茸萃取液顯著降低小鼠肝臟內 TG 之濃度，但對血清中之 TG 及膽固醇無下降之效，甚至高鹿茸萃取液組之血清中 TG 尚較對照組者為高。予以糖尿病小鼠紅鹿鹿茸多肽，與對照組者相較，可顯著降低其血漿中 LDL 膽固醇濃度，並增加血漿中 HDL 膽固醇濃度。而在血漿中 TG 濃度，則不會造成影響 (Jiang et al., 2015)。此暗示鹿茸可能可以促進肝臟排出脂質，抑制其積聚。本研究中 H&E 染色與 Oil-Red O 染色之組織學特徵也證實肝臟脂肪肝之情況受鹿茸之給予所改善。

脂肪於肝臟中積聚，將誘導肝臟細胞產生發炎分子 (Tilg and Diehl, 2000)。Li and Hsieh (2014) 也在 NAFLD 之小鼠，發現其肝臟內細胞激素 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、CCL2、IL-4、IL-13、IL-33、及 TSLP 之濃度顯著高於正常組者。在本研究中，對照組肝臟內細胞激素 TNF- α 、IL-6、CCL2、IL-33、及 TSLP 之濃度顯著高於正

常組者，顯示對照組已被成功誘發出 NASH。給予鹿茸萃取液之各處理組，其肝臟內細胞激素之濃度顯著較對照組者為低。4-HNE 染色之組織學特徵顯示肝臟過氧化傷害之程度受鹿茸給予所改善。顯示鹿茸具有抗發炎之作用，可使小鼠 NASH 的情形獲得改善。予以鹿角菜膠 (Carrageenan) 誘導鼠足掌發炎後，給予梅花鹿鹿茸多肽，可改善鼠足掌發炎之情形 (Zhang et al., 1994)。予以糖尿病小鼠紅鹿鹿茸多肽，可顯著提高其血清中 SOD 及過氧化氫酶 (catalase) 之活性，並減少肝臟內丙二醛之濃度 (Jiang et al., 2015)。綜合上述資料，顯示鹿茸可能具有抗發炎及抗氧化之作用，可使小鼠 NASH 的情形獲得改善。

在本研究中，鹿茸萃取液富含 Proline，占胺基酸總量的 59.55%。Proline 可活化肝臟中 ROS 清除系統，促進 ROS 之清除 (Obayashi et al., 2015)。在本研究中，鹿茸萃取液之 Valine、Leucine 及 Isoleucine 共占胺基酸總量之 13.90%。支鏈胺基酸已被廣泛作為肝臟衰竭患者、代謝疾病患者及運動員之補充品 (Wang et al., 2015)。在本研究中，鹿茸萃取液無檢測出 Methionine，而 Cysteine 及 Taurine 則共占胺基酸總量的 7.20%。含硫胺基酸具有調控脂質代謝之功能。在日糧中補充 Methionine 會增加鼠血漿膽固醇之濃度，進而誘發高膽固醇血症 (Hirche et al., 2006)。給予 cystathionine β -synthase (Cbs) 缺陷之純合子小鼠 Cysteine，會降低其血漿中膽固醇及 APO-A1 之含量，並增加肝臟中 APO-A1 之含量 (Nuño-Ayala et al., 2010)。Taurine 可降低人類肝臟細胞中 ApoB 及 VLDL 之分泌 (Chen et al., 2012)。將 Taurine 餵予高碳水化合物飲食之鼠，顯著降低其肝臟損傷、發炎及血漿中三酸甘油酯及胰島素之濃度 (Gentile et al., 2011)。在本研究中，鹿茸萃取液之 Asparagin 占胺基酸總量的 5.53%。Asparagin 具免疫調節作用，可透過調控 TLR4 與核甘酸結合寡聚化結構域蛋白 (nucleotide-binding oligomerisation domain protein, NOD) 之信號分子，改善 LPS 造成離乳仔豬肝臟損傷之情形 (Wu et al., 2015)。凡此皆顯示胺基酸對肝臟具有益處。

表 13、胺基酸對肝臟之益處

Table 13. Benefits of amino acid to the liver

| Amino acid | Benefits | Content of total amino acid (%) |
|--|--|---------------------------------|
| Proline | ROS elimination (Obayashi et al., 2015) | 59.55 |
| Branched-chain amino acids (Valine, Leucine, Isoleucine) | Liver failure improvement (Wang et al., 2015) | 13.90 |
| Sulfur-containing amino acids (Methionine, Cysteine, Taurine) | Lipid metabolism regulation (Nuño-Ayala et al., 2010; Chen et al., 2012) | 7.20 |
| Asparagin | Immune regulation (Wu et al., 2015) | 5.53 |

梅花鹿鹿茸之一種 3.2 kDa 多肽，在免疫調節的體外試驗中，可以刺激脾臟細胞中 IL-12 的分泌，使 Th0 cell (也就是 Naïve T cell) 趨向分化為 Th1 cell，並可刺激 IFN- γ 的分泌，並降低 IL-4 的分泌量 (Zha et al., 2013)。鹿茸酒萃液可透過活化全身性之 T 調節細胞，使 naïve T 細胞分化趨向為 Th1 cells，進而降低過敏性 IgE 抗體之生成及肺部炎性細胞浸潤之情形，達到降低呼吸道之過度反應 (趙, 2011)。鹿茸水萃液可提升細胞之吞噬能力，而有抵抗金黃色葡萄球菌感染的作用。在添加可促進發炎反應之 LTA (lipoteichoic acid；一種細菌細胞壁之成分) 於小鼠巨噬細胞之體外培養中，添加高劑量的鹿茸水萃液，不論是冷水萃取液或沸水萃取液，皆顯著抑制小鼠巨噬細胞中 TNF- α 和 IL-6 的分泌量 (Dai et al., 2011)。此外，於膠原蛋白誘導關節炎小鼠模式中予以鹿茸水萃液，與控制組相比，顯著降低其關節中 TNF- α 的表現量 (Suh et al., 2007)。凡此皆顯示鹿茸具有抗發炎及免疫調節之作用。此或許也是鹿茸改善小鼠 NASH 的原因之一。

由於鹿茸給予可以使高糖高脂所誘發 NAFLD 小鼠之血清中 ALT 及 AST 下降至正常組之水平，甚至更低，而各項發炎指標卻仍較正常組者為高，因此，鹿茸萃取液可能對肝細胞具有直接之保護效果，或經由未知機制間接保護肝細胞。

捌、 結論

試驗結果顯示，長期攝取 30% 高果糖玉米糖漿及 60% 高脂飼料，會造成小鼠肝臟脂肪堆積進而形成脂肪肝。此病理刺激將誘導肝臟細胞產生細胞激素（炎症分子），並進一步產生 NASH。而給予小鼠鹿茸萃取液後，顯著降低了小鼠肝臟中 TG 的含量及脂肪肝徵狀，也抑制肝臟發炎的情形，而降低肝臟中炎性細胞激素的分泌量，因而具有保護經由高果糖高脂飲食所導致的脂肪肝炎之效能。

玖、 參考文獻

- 王琮仁。2005。分析進口鹿茸之氨基酸及銅鐵之含量。碩士論文。東華大學。花蓮。
- 李時珍 (明)。1988。本草綱目。國立中國醫藥研究所。台北。
- 孫星衍 (清)。1985。神農本草經。五洲出版社。台北。
- 陳俊吉、楊錫坤。1995。短光照期與長光照期交替進行對臺灣梅花鹿鹿角週期與睪丸功能之影響。中畜會誌 24：61-80。
- 黃泰元。2008。台灣梅花鹿鹿茸給予對早老化小鼠抗氧化能力之影響。碩士論文。東海大學。台中。
- 趙文瑜。2011。鹿茸萃取物對卵白蛋白誘導之呼吸道過度反應的調節作用。碩士論文。東海大學。台中。
- 賴羽萱。2014。植物乳桿菌及合益素對高脂與高果糖飲食誘導肝代謝綜合症小鼠模式之調節作用。碩士論文。東海大學。台中。
- Abumrad, N., C. Coburn, and A. Ibrahim. 1999. Membrane proteins implicated in long-chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm. *Biochim. Biophys. Acta* 1441:4-13.
- Agius, L. and K. G. Alberti. 1985. Regulation of flux through pyruvate dehydrogenase and pyruvate carboxylase in rat hepatocytes. Effects of fatty acids and glucagon. *Eur. J. Biochem.* 152:699-707.
- Alonso, M. D., J. Lomako, W. M. Lomako, and W. J. Whelan. 1995. A new look at the biogenesis of glycogen. *FASEB J.* 9:1126-1137.
- Al-Shami, A., R. Spolski, J. Kelly, A. Keane-Myers, and W. J. Leonard. 2005. A role for TSLP in the development of inflammation in an asthma model. *J. Exp. Med.* 202:829-839.
- Awasthi, Y. C., Y. Yang, N. K. Tiwari, B. Patrick, A. Sharma, J. Li, and S. Awasthi. 2004. Serial review: 4-Hydroxynonenal as a signaling molecule. *Free Radic. Biol. Med.*

37:607-619.

- Barroso, E., R. Rodríguez-Calvo, L. Serrano-Marco, A. M. Astudillo, J. Balsinde, X. Palomer, and M. Vázquez-Carrera. 2011. The PPAR β/δ activator GW501516 prevents the down-regulation of AMPK caused by a high-fat diet in liver and amplifies the PGC-1 α -Lipin 1-PPAR α pathway leading to increased fatty acid oxidation. *Endocrinology* 152:1848-1859.
- Bartos, L., G. A. Bubenik, and E. Kuzmova. 2012. Endocrine relationships between rank-related behavior and antler growth in deer. *Front. Biosci.* 4:1111-1126.
- Basaranoglu, M., G. Basaranoglu, and E. Bugianesi. 2015. Carbohydrate intake and nonalcoholic fatty liver disease: fructose as a weapon of mass destruction. *Hepatobiliary Surg. Nutr.* 4:109-116.
- Beynen, A. C., M. H. Geelen, and S. G. Van den Bergh. 1980. Short-term control of hepatic lipogenesis by insulin. *Trends Biochem. Sci.* 5:288-290.
- Bickerton, A. S., R. Roberts, B. A. Fielding, L. Hodson, E. E. Blaak, A. J. Wagenmakers, M. Gilbert, F. Karpe, and K. N. Frayn. 2007. Preferential uptake of dietary fatty acids in adipose tissue and muscle in the postprandial period. *Diabetes* 56:168-176.
- Braunersreuther, V., G. L. Viviani, F. Mach, and F. Montecucco. 2012. Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* 18:727-735.
- Brooks, N. L., C. M. Trent, C. F. Raetzsch, K. Flurkey, G. Boysen, M. T. Perfetti, Y. C. Jeong, S. Klebanov, K. B. Patel, V. R. Khodush, L. L. Kupper, D. Carling, J. A. Swenberg, D. E. Harrison, and T. P. Combs. 2007. Low utilization of circulating glucose after food withdrawal in Snell dwarf mice. *J. Biol. Chem.* 282:35069-35077.
- Bruns, H., I. Watanpour, M. M. Gebhard, C. Flechtenmacher, U. Galli, H. Schulze-Bergkamen, M. Zorn, M. W. Büchler, and P. Schemmer. 2011. Glycine and taurine

- equally prevent fatty livers from Kupffer cell-dependent injury: an *in vivo* microscopy study. *Microcirculation* 18:205-213.
- Bubenik, G. A. 2006. Seasonal regulation of deer reproduction as related to the antler cycle: a review. *Vet. Arhiv.* 76:S275-S285.
- Caldefie-Chezet, F., A. Poulin, A. Tridon, B. Sion, and M. P. Vasson. 2001. Leptin: a potential regulator of polymorphonuclear neutrophil bactericidal action? *J. Leukoc. Biol.* 69:414-418.
- Campbell, M. K. and S. O. Farrell. 2008. *Biochemistry*. Sixth edition. Thomson, London.
- Caspary, W. F. 1992. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. *Am. J. Clin. Nutr.* 55:299S-308S.
- Cross, H. R., L. Carpenter, and G. C. Smith. 1973. Effects of intramuscular collagen and elastin on bovin muscle tenderness. *J. Food Sci.* 38:998-1003.
- Chanmugam, P., J. F. Guthrie, S. Cecilio, J. F. Morton, P. P. Basiotis, and R. Anand. 2003. Did fat intake in the United States really decline between 1989-1991 and 1994-1996? *J. Am. Diet. Assoc.* 103:867-872.
- Charlton, M. R. 1996. Protein metabolism and liver disease. *Baillibre's Clin. Endocrinol. Metab.* 10:617-635.
- Charo, I. F. and R. M. Ransohoff. 2006. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *New Engl. J. Med.* 354:610-621.
- Chen, C. C., M. H. Liu, M. F. Wang, and C. C. Chen. 2007. Effects of aging and dietary antler supplementation on the calcium-regulating hormones and bone status in ovariectomized SAMP8 mice. *Chin. J. Physiol.* 50:308-314.
- Chen, J., B. Tan, E. Kareris, S. Zervou, J. Digby, E. W. Hillhouse, M. Vatish, and H. S. Randeva. 2006. Secretion of adiponectin by human placenta: differential modulation of adiponectin and its receptors by cytokines. *Diabetologia* 49:1292-1302.

- Chen, J. C., C. Y. Hsiang, Y. C. Lin, and T. Y. Ho. 2014. Deer antler extract improves fatigue effect through altering the expression of genes related to muscle strength in skeletal muscle of mice. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2014:1-10. doi:10.1155/2014/540580.
- Chen, J., M. R. Woodbury, J. Alcorn, and A. Honaramooz. 2012. Dietary supplementation of female rats with elk velvet antler improves physical and neurological development of offspring. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2012:1-7. doi:10.1155/2012/640680.
- Chen, W., J. X. Guo, and P. Chang. 2012. The effect of taurine on cholesterol metabolism. *Mol. Nutr. Food Res.* 56:681-690.
- Cheng, S. L., Y. L. Lai, M. C. Lee, P. C. Shen, S. S. Liu, and B. T. Liu. 2014. Effects of deer velvet extract from Formosan sika deer on the embryonic development and anti-oxidative enzymes mRNA expression in mouse embryos. *J. Ethnopharmacol.* 154:600-605.
- Cho, Y., M. Ariga, Y. Uchijima, K. Kimura, J. Y. Rho, Y. Furuhata, F. Hakuno, K. Yamanouchi, M. Nishihara, and S. Takahashi. 2006. The novel roles of liver for compensation of insulin resistance in human growth hormone transgenic rats. *Endocrinology* 147:5374-5384.
- Cintra, D. E, J. R. Pauli, E. P. Araújo, J. C. Moraes, C. T. de Souza, M. Milanski, J. Morari, A. Gambero, M. J. Saad, and L. A. Velloso. 2008. Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. *J. Hepatol.* 48:628-437.
- Conaglen, H. M., J. M. Suttie, and J. V. Conaglen. 2003. Effect of deer velvet on sexual function in men and their partners: a double-blind, placebo-controlled study. *Arch. Sex. Behav.* 32:271-278.

- Coppack, S. W., M. Persson, R. L. Judd, and J. M. Miles. 1999. Glycerol and nonesterified fatty acid metabolism in human muscle and adipose tissue *in vivo*. *Am. J. Physiol.* 276:E233-E240.
- Coppola, A., R. Marfella, L. Coppola, E. Tagliamonte, D. Fontana, E. Liguori, T. Cirillo, M. Cafiero, S. Natale, and C. Astarita. 2009. Effect of weight loss on coronary circulation and adiponectin levels in obese women. *Int. J. Cardiol.* 134:414-416.
- Dai, T. Y, C. H. Wang, K. N. Chen, I. N. Huang, W. S. Hong, S. Y. Wang, Y. P. Chen, C. Y. Kuo, and M. J. Chen. 2011. The Antiinfective effects of velvet antler of Formosan sambar deer (*Cervus unicolor swinhoei*) on *Staphylococcus aureus*-infected mice. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2011:1-9. doi: 10.1155/2011/534069.
- Day, C. P. and O. F. James. 1998. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 114:842-5.
- de Castro, U. G., R. A. dos Santos, M. E. Silva, W. G. de Lima, M. J. Campagnole-Santos, and A. C. Alzamora. 2013. Age-dependent effect of high-fructose and high-fat diets on lipid metabolism and lipid accumulation in liver and kidney of rats. *Lipids Health Dis.* 12:1-11. doi: 10.1186/1476-511X-12-136.
- den Boer, M. A., P. J. Voshol, J. P. Schröder-van der Elst, E. Korshennikova, D. M. Ouwens, F. Kuipers, L. M. Havekes, and J. A. Romijn. 2006. Endogenous interleukin-10 protects against hepatic steatosis but does not improve insulin sensitivity during high-fat feeding in mice. *Endocrinology* 147:4553-4558.
- Dey, A. and J. Lakshmanan. 2013. The role of antioxidants and other agents in alleviating hyperglycemia mediated oxidative stress and injury in liver. *Food Funct.* 4:1148-1184.
- Díez, J. J. and P. Iglesias. 2003. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur. J. Endocrinol.* 148:293-300.

- Dominici, F. P., S. Hauck, D. P. Argentino, A. Bartke, and D. Turyn. 2002. Increased insulin sensitivity and upregulation of insulin receptor, insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 in liver of Ames dwarf mice. *J. Endocrinol.* 173:81-94.
- Donnelly, K. L., C. I. Smith, S. J. Schwarzenberg, J. Jessurun, M. D. Boldt, and E. J. Parks. 2005. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.* 115:1343-1351.
- Douard, V. and R. P. Ferraris. 2008. Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295:E227-E237.
- Duenschede, F., S. Westermann, N. Riegler, I. Miesner, K. Erbes, P. Ewald, A. Kircher, H. Schaefer, J. Schneider, A. Schad, P. Dutkowski, A. K. Kiemer, and T. Junginger. 2006. Different protection mechanisms after pretreatment with glycine or alpha-lipoic acid in a rat model of warm hepatic ischemia. *Eur. Surg. Res.* 38:503-512.
- Ebner, S., V. A. Nguyen, M. Forstner, Y. H. Wang, D. Wolfram, Y. J. Liu, and N. Romani. 2007. Thymic stromal lymphopoietin converts human epidermal Langerhans cells into antigen-presenting cells that induce proallergic T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119:982-990.
- Esposito, K., A. Pontillo, F. Giugliano, G. Giugliano, R. Marfella, G. Nicoletti, and D. Giugliano. 2003. Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88:1055-1058.
- Fan, Y., R. K. Menon, P. Cohen, D. Hwang, T. Clemens, D. J. DiGirolamo, J. J. Kopchick, D. Le-Roith, M. Trucco, and M. A. Sperling. 2009. Liver-specific deletion of the growth hormone receptor reveals essential role of growth hormone signaling in hepatic lipid metabolism. *J. Biol. Chem.* 284:19937-19944.
- Fantuzzi, G. and R. Faggioni. 2000. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J. Leukoc. Biol.* 68:437-446.

- Feldstein, A. E., A. Canbay, M. E. Guicciardi, H. Higuchi, S. F. Bronk, and G. J. Gores. 2003. Diet associated hepatic steatosis sensitizes to Fas mediated liver injury in mice. *J. Hepatol.* 39:978-983.
- Furfaro, A. L., M. Nitti, B. Marengo, C. Domenicotti, D. Cottalasso, U. M. Marinari, M. A. Pronzato, and N. Traverso. 2012. Impaired synthesis contributes to diabetes-induced decrease in liver glutathione. *Int. J. Mol. Med.* 29:899-905.
- Geelen, M. J., J. E. Groener, C. G. De-Haas, T. A. Wissershof, and L. M. Van-Golde. 1978. Influence of insulin and glucagon on the synthesis of glycerolipids in rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 90:57-60.
- Gentile, C. L., A. M. Nivala, J. C. Gonzales, K. T. Pfaffenbach, D. Wang, Y. Wei, H. Jiang, D. J. Orlicky, D. R. Petersen, M. J. Pagliassotti, and K. N. Maclean. 2011. Experimental evidence for therapeutic potential of taurine in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 301:R1710-R1722.
- Gerard, C. and B. J. Rollins. 2001. Chemokines and disease. *Nature Immunol.* 2:108-115.
- Ghanaat, F. and J. A. Tayek. 2005. Growth hormone administration increases glucose production by preventing the expected decrease in glycogenolysis seen with fasting in healthy volunteers. *Metabolism* 54:604-609.
- Gilbey, A. and J. D. Perezgonzalez. 2012. Health benefits of deer and elk velvet antler supplements: a systematic review of randomised controlled studies. *N. Z. Med. J.* 125:80-86.
- Goss, R. J. and R. S. Powel. 1985. Induction of antlers by transplanted periosteum. I. Graft size and shape. *J. Exp. Zool.* 235:359-373.
- Gu, L. J., E. K. Mo, Z. H. Yang, Z. M. Fang, B. S. Sun, C. Y. Wang, X. M. Zhu, J. F. Bao, and C. K. Sung. 2008. Effects of red deer antlers on cutaneous wound healing in full-thickness rat models. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 21:277-290.

- Guan, S. W., L. X. Duan, Y. Y. Li, B. X. Wang, and Q. L. Zhou. 2006. A novel polypeptide from *Cervus nippon* Temminck proliferation of epidermal cells and NIH3T3 cell line. *Acta Biochim. Pol.* 53:395-397.
- Haagsman, H. P., C. G. de Haas, M. J. Geelen, and L. M. van Golde. 1982. Regulation of triacylglycerol synthesis in the liver. Modulation of diacylglycerol acyltransferase activity *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 257:10593-10598.
- Hamden, K., N. Allouche, M. Damak, and A. Elfeki. 2009. Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste *in vitro* and in rats. *Chem. Biol. Interact.* 180:421-432.
- Hartwig, H., J. Schrudde, H. Kierdorf, and U. Kierdorf. 1989. Durch unspezifische lokale Periostaktivierung provozierte Bildung eines knöchernen Stirnfortsatzes bei einem weiblichen Reh (*Capreolus capreolus* L.). *Z. Jagdwiss.* 35:130-136.
- Hellerstein, M. K. 1999. *De novo* lipogenesis in humans: metabolic and regulatory aspects. *Eur. J. Clin. Nutr.* 53:S53-S65.
- Hirche, F., A. Schröder, B. Knoth, G. I. Stangl, and K. Eder. 2006. Effect of dietary methionine on plasma and liver cholesterol concentrations in rats and expression of hepatic genes involved in cholesterol metabolism. *Br. J. Nutr.* 95:879-888.
- Hong, C. and P. Tontonoz. 2014. Liver X receptors in lipid metabolism: opportunities for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13:433-444.
- Hotamisligil, G. S., N. S. Shargill, and B. M. Spiegelman. 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87-91.
- Huber, D. M., A. C. Bendixen, P. Pathrose, S. Srivastava, K. M. Dienger, N. K. Shevde, and J. W. Pike. 2001. Androgens suppress osteoclast formation induced by RANKL and macrophage-colony stimulating factor. *Endocrinology* 142:3800-3808.

- Hwang, J. T., D. Y. Kwon, and S. H. Yoon. 2009. AMP-activated protein kinase: a potential target for the diseases prevention by natural occurring polyphenols. *N. Biotechnol.* 26:17-22.
- Ivankina, N. F., S. V. Isay, N. G. Busarova, and T. Ya. Mischenko. 1993. Prostaglandin-like activity, fatty acid and phospholipid composition of sika deer (*Cervus nippon*) antlers at different growth stages. *Comp. Biochem. Physiol.* 106:159-162.
- Jemai, H., A. El Feki, and S. Sayadi. 2009. Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *J. Agric. Food Chem.* 57:8798-8804.
- Jeon, B., S. Kim, S. Lee, P. Park, S. Sung, J. Kim, and S. Moon. 2009. Effect of antler growth period on the chemical composition of velvet antler in sika deer (*Cervus nippon*). *Mamm. Biol.* 74:374-380.
- Jeon, B. T., S. H. Cheong, D. H. Kim, J. H. Park, P. J. Park, S. H. Sung, D. G. Thomas, K. H. Kim, and S. H. Moon. 2011. Effect of antler development stage on the chemical composition of velvet antler in elk (*Cervus elaphus canadensis*). *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 24:1303-1313.
- Jiang, N., S. Zhang, J. Zhu, J. Shang, and X. Gao. 2015. Hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant effects of peptides from red deer antlers in streptozotocin-induced diabetic mice. *Tohoku J. Exp. Med.* 236:71-79.
- Kanda, H., S. Tateya, Y. Tamori, K. Kotani, K. Hiasa, R. Kitazawa, S. Kitazawa, H. Miyachi, S. Maeda, K. Egashira, and M. Kasuga. 2006. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Invest.* 116:1494-505.
- Kaplan, W., A. L. Sunehag, H. Dao, and M. W. Haymond. 2008. Short-term effects of recombinant human growth hormone and feeding on gluconeogenesis in humans. *Metabolism* 57:725-732.

- Kawasaki, T., K. Igarashi, T. Koeda, K. Sugimoto, K. Nakagawa, S. Hayashi, R. Yamaji, H. Inui, T. Fukusato, and T. Yamanouchi. 2009. Rats fed fructose-enriched diets have characteristics of nonalcoholic hepatic steatosis. *J. Nutr.* 139:2067-2071.
- Kawtikwar, P. S., D. A. Bhagwat, and D. M. Sakarkar. 2010. Deer antlers-traditional use and future perspectives. *Indian J. Tradit. Know.* 9:245-251.
- Kierdorf, U. and L. Bartos. 1999. Treatment of the growing pedicle with retinoic acid increased the size of first antlers in fallow deer (*Dama dama* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 124:7-9.
- Kierdorf, U. and H. Kierdorf. 1998. Effects of retinoic acid on pedicle and first antler growth in a fallow buck (*Dama dama* L.). *Ann. Anat.* 180:373-375.
- Kierdorf, U. and H. Kierdorf. 2000. Delayed ectopic antler growth and formation of a double-head antler in the metacarpal region of a fallow buck (*Dama dama* L.) following transplantation of antlerogenic periosteum. *Ann. Anat.* 182:365-370.
- Kincius, M., R. Liang, A. Nickkholgh, K. Hoffmann, C. Flechtenmacher, E. Ryschich, C. N. Gutt, M. M. Gebhard, J. Schmidt, M. W. Buehler, and P. Schemmer. 2007. Taurine protects from liver injury after warm ischemia in rats: the role of kupffer cells. *Eur. Surg. Res.* 39:275-283.
- Kishimoto, T. 2010. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int. Immunol.* 22:347-352.
- Klieverik, L. P., H. P. Sauerwein, M. T. Ackermans, A. Boelen, A. Kalsbeek, and E. Fliers. 2008. Effects of thyrotoxicosis and selective hepatic autonomic denervation on hepatic glucose metabolism in rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294:E513-E520.
- Klover, P. J., A. H. Clementi, and R. A. Mooney. 2005. Interleukin-6 depletion selectively improves hepatic insulin action in obesity. *Endocrinology* 146:3417-3427.

- Kohli, R., M. Kirby, S. A. Xanthakos, S. Softic, A. E. Feldstein, V. Saxena, P. H. Tang, L. Miles, M. V. Miles, W. F. Balistreri, S. C. Woods, and R. J. Seeley. 2010. High-fructose, medium chain trans fat diet induces liver fibrosis and elevates plasma coenzyme Q9 in a novel murine model of obesity and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 52:934-944.
- Kwon, O., P. Eck, S. Chen, C. P. Corpe, J. H. Lee, M. Kruhlak, and M. Levine. 2007. Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. *FASEB J.* 21:366-377.
- Lai, A. K., W. L. Hou, D. J. Verdon, L. F. Nicholson, and P. M. Barling. 2007. The distribution of the growth factors FGF-2 and VEGF, and their receptors, in growing red deer antler. *Tissue Cell* 39:35-46.
- Lalor, P. F., J. Faint, Y. Aarbodem, S. G. Hubscher, and D. H. Adams. 2007. The role of cytokines and chemokines in the development of steatohepatitis. *Semin. Liver Dis.* 27:173-93.
- Lanaspa, M. A., T. Ishimoto, N. Li, C. Cicerchi, D. J. Orlicky, P. Ruzycski, C. Rivard, S. Inaba, C. A. Roncal-Jimenez, E. S. Bales, C. P. Diggie, A. Asipu, J. M. Petrash, T. Kosugi, S. Maruyama, L. G. Sanchez-Lozada, J. L. McManaman, D. T. Bonthron, Y. Y. Sautin, and R. J. Johnson. 2013. Endogenous fructose production and metabolism in the liver contributes to the development of metabolic syndrome. *Nat. Commun.* 4:1-8. DOI: 10.1038/ncomms3434.
- Larter, C. Z. and M. M. Yeh. 2008. Animal models of NASH: getting both pathology and metabolic context right. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 23:1635-1648.
- Le Lay, S., G. Simard, M. C. Martinez, and R. Andriantsitohaina. 2014. Oxidative stress and metabolic pathologies: from an adipocentric point of view. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014:1-18. doi: 10.1155/2014/908539.

- Lewis, J. R. and S. R. Mohanty. 2010. Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update. *Digest. Dis. Sci.* 55:560-578.
- Li, C., A. J. Harris, and J. M. Suttie. 2001. Tissue interactions and antlerogenesis: new findings revealed by a xenograft approach. *J. Exp. Zool.* 290:18-30.
- Li, C. and J. M. Suttie. 1998. Electron microscopic studies of antlerogenic cells from five developmental stages during pedicle and early antler formation in red deer (*Cervus elaphus*). *Anat. Rec.* 252:587-599.
- Li, C. and J. M. Suttie. 1994. Pedicle and antler regeneration following antlerogenic tissue removal in red deer (*Cervus elaphus*). *J. Exp. Zool.* 269:37-44.
- Li, C., R. P. Littlejohn, and J. M. Suttie. 1999. Effects of insulin-like growth factor 1 and testosterone on the proliferation of antlerogenic cells *in vitro*. *J. Exp. Zool.* 284:82-90.
- Li, Y. C. and C. C. Hsieh. 2014. Lactoferrin dampens high-fructose corn syrup-induced hepatic manifestations of the metabolic syndrome in a murine model. *PLoS One* 9:e97341. doi: 10.1371/journal.pone.0097341.
- 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.
- Liu, J., K. L. Ma, Y. Zhang, Y. Wu, Z. B. Hu, L. L. Lv, R. N. Tang, H. Liu, X. Z. Ruan, and B. C. Liu. 2015. Activation of mTORC1 disrupted LDL receptor pathway: a potential new mechanism for the progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 61:8-19.
- Liu, J., Y. Liu, W. Wang, Y. Luo, Z. Zhuang, Q. Jiao, J. Chen, D. Bian, X. Ma, Y. Xun, M. Zhu, and J. Shi. 2014. Development and evaluation of a high-fat/high-fructose diet-induced nonalcoholic steatohepatitis mouse model. *J. Hepatol.* 22:445-450.

- Liu, Y., R. Wei, and T. P. Hong. 2014. Potential roles of glucagon-like peptide-1-based therapies in treating non-alcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* 20:9090-9097.
- Liu, Z. J., L. N. Yan, S. W. Li, H. B. You, and J. P. Gong. 2006. Glycine blunts transplantative liver ischemia-reperfusion injury by downregulating interleukin 1 receptor associated kinase-4. *Acta. Pharmacol. Sin.* 27:1479-1486.
- Longato, L., M. Tong, J. R. Wands, and S. M. de la Monte. 2012. High fat diet induced hepatic steatosis and insulin resistance: Role of dysregulated ceramide metabolism. *Hepatol. Res.* 42:412-427.
- López, M., C. V. Alvarez, R. Nogueiras, and C. Diéguez. 2013. Energy balance regulation by thyroid hormones at central level. *Trends Mol. Med.* 19:418-427.
- Lord, G. M., G. Matarese, J. K. Howard, R. J. Baker, S. R. Bloom, and R. I. Lechler. 1998. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 394:897-901.
- Lu, C., M. Wang, J. Mu, Y. Bai, J. Du, H. Zhang, and J. Wang. 2012. Determination of sex hormones in antler velvet by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Chem. Res. Chin. Univ.* 28:191-194.
- Lustig, R. H. 2009. The fructose epidemic. *Bariatrician* 12:10-18.
- Masternak, M. M., K. A. Al-Regaiey, M. M. D. R. Lim, V. Jimenez-Ortega, J. A. Panici, M. S. Bonkowski, J. J. Kopchick, and A. Bartke. 2005. Effects of caloric restriction and growth hormone resistance on the expression level of peroxisome proliferator-activated receptors superfamily in liver of normal and long-lived growth hormone receptor/binding protein knockout mice. *J. Gerontol. Biol. Sci.* 60:1394-1398.
- Miller, B. G., R. F. Grimble, and T. G. Taylor. 1977. Liver protein metabolism response to cold in genetically obese (*ob/ob*) mice. *Nature* 266:184-186.

- Min, J., Y. J. Lee, Y. A. Kim, H. S. Park, S. Y. Han, G. J. Jhon, and W. Choi. 2001. Lysophosphatidylcholine derived from deer antler extract suppresses hyphal transition in *Candida albicans* through MAP kinase pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 1531:77-89.
- Mohan, S., R. L. Davis, U. DeSilva, and C. W. Stevens. 2010. Dual regulation of mu opioid receptors in SK-N-SH neuroblastoma cells by morphine and interleukin-1 β : evidence for opioid-immune crosstalk. *J. Neuroimmunol.* 227:26-34.
- Montecucco, F., and F. Mach. 2008. Does non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) increase cardiovascular risk? *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug. Targets* 8:301-307.
- Mookkan, J., S. De, P. Shetty, N. M. Kulkarni, V. Devisingh, M. S. Jaji, V. P. Lakshmi, S. Chaudhary, J. Kulathingal, N. B. Rajesh, and S. Narayanan. 2014. Combination of vildagliptin and rosiglitazone ameliorates nonalcoholic fatty liver disease in C57BL/6 mice. *Indian J. Pharmacol.* 46:46-50.
- Mullur, R., Y. Y. Liu, and G. A. Brent. 2014. Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiol. Rev.* 94:355-382.
- Nelken, N. A., S. R. Coughlin, D. Gordon, and J. N. Wilcox. 1991. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J. Clin. Invest.* 88:1121-1127.
- Nguyen, P., V. Leray, M. Diez, S. Serisier, J. Le-Bloc'h, B. Siliart, and H. Dumon. 2008. Liver lipid metabolism. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 92:272-283. doi:10.1111/j.1439-0396.2007.00752.x.
- Nomura, K. and T. Yamanouchi. 2012. The role of fructose-enriched diets in mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease. *J. Nutr. Biochem.* 23:203-208.
- Nuño-Ayala, M., N. Guillén, M. A. Navarro, J. M. Lou-Bonafonte, C. Arnal, S. Gascón, C. Barranquero, J. Godino, M. Royo-Cañas, A. J. Sarría, M. A. Guzmán, E.

- Hernandez, M. A. Bregante, M. A. García-Gimeno, and J. Osada. 2010. Cysteinemia, rather than homocysteinemia, is associated with plasma apolipoprotein A-I levels in hyperhomocysteinemia: lipid metabolism in cystathionine beta-synthase deficiency. *Atherosclerosis* 212:268-273.
- Nyblom, H., U. Berggren, J. Balldin, and R. Olsson. 2004. High AST/ALT ratio may indicate advanced alcoholic liver disease rather than heavy drinking. *Alcohol Alcohol.* 39:336-339.
- Obayashi, Y., H. Arisaka, S. Yoshida, M. Mori, and M. Takahashi. 2015. The protection mechanism of proline from D-galactosamine hepatitis involves the early activation of ROS-eliminating pathway in the liver. *Springerplus* 4:1-8.
- Oh, K. J., H. S. Han, M. J. Kim, and S. H. Koo. 2013. CREB and FoxO1: two transcription factors for the regulation of hepatic gluconeogenesis. *Biochem. Mol. Biol. Rep.* 46:567-574.
- Parniak, M. A. and N. Kalant. 1988. Enhancement of glycogen concentrations in primary cultures of rat hepatocytes exposed to glucose and fructose. *Biochem. J.* 251:795-802.
- Pan, H., J. Guo, and Z. Su. 2014. Advances in understanding the interrelations between leptin resistance and obesity. *Physiol. Behav.* 130:157-169. doi:10.1016/j.physbeh.2014.04.003.
- Panchal, S. K. and L. Brown. 2013. Cardioprotective and hepatoprotective effects of ellagitannins from European oak bark (*Quercus petraea* L.) extract in rats. *Eur. J. Nutr.* 52:397-408.
- Park, H. S., G. J. Jhon, and W. Choi. 1998. Deer Antler Extract Selectively Hyphal Growth in Dimorphic Fungus, *Candida albicans*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 8:291-294.

- Pereira, R. J., J. M. Duarte, and J. A. Negrão. 2005. Seasonal changes in fecal testosterone concentrations and their relationship to the reproductive behavior, antler cycle and grouping patterns in free-ranging male Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus bezoarticus*). *Theriogenology* 63:2113-2125.
- Perrier, S., F. Caldefie-Chézet, and M. P. Vasson. 2009. IL-1 family in breast cancer: potential interplay with leptin and other adipocytokines. *FEBS Lett.* 583:259-265.
- Petrat, F., K. Boengler, R. Schulz, and H. de Groot. 2012. Glycine, a simple physiological compound protecting by yet puzzling mechanism(s) against ischaemia-reperfusion injury: current knowledge. *Br. J. Pharmacol.* 165:2059-2072.
- Poli, G., F. Biasi, and G. Leonarduzzi. 2008. 4-Hydroxynonenal-protein adducts: A reliable biomarker of lipid oxidation in liver diseases. *Mol. Aspects. Med.* 29:67-71.
- Poniedziałek-Czajkowska, E., R. Mierzynski, Z. Kimber-Trojnar, B. Leszczynska-Gorzalak, and J. Oleszczuk. 2014. Polyunsaturated fatty acids in pregnancy and metabolic syndrome: a review. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2014:84-99.
- Postic, C., R. Dentin, and J. Girard. 2004. Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. *Diabetes Metab.* 30:398-408.
- Price, J. and S. Allen. 2004. Exploring the mechanisms regulating regeneration of deer antlers. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 359:809-822.
- Price, J. S., S. Allen, C. Faucheux, T. Althnaian, and J. G. Mount. 2005. Deer antlers: a zoological curiosity or the key to understanding organ regeneration in mammals? *J. Anat.* 207:603-618.
- Randle, P. J., P. B. Garland, C. N. Hales, and E. A. Newsholme. 1963. The glucose fatty-acid cycle: Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1:785-789.
- Reiter, R. J. 1991. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrinol. Rev.* 12:151-180.

- Renaldi, O., B. Pramono, H. Sinorita, L. B. Purnomo, R. H. Asdie, and A. H. Asdie. 2009. Hypoadiponectinemia: a risk factor for metabolic syndrome. *Acta. Med. Indones.* 41:20-24.
- Rentsch, M., K. Puellmann, S. Sirek, I. Iesalnieks, K. Kienle, T. Mueller, U. Bolder, E. Geissler, K. W. Jauch, and A. Beham. 2005. Benefit of Kupffer cell modulation with glycine versus Kupffer cell depletion after liver transplantation in the rat: effects on postischemic reperfusion injury, apoptotic cell death graft regeneration and survival. *Transpl. Int.* 18:1079-1089.
- Romestaing, C., M. A. Piquet, E. Bedu, V. Rouleau, M. Dautresme, I. Hourmand-Ollivier, C. Filippi, C. Duchamp, and B. Sibille. 2007. Long term highly saturated fat diet does not induce NASH in Wistar rats. *Nutr. Metab.* Accessed Feb. 21, 2007. <http://www.nutritionandmetabolism.com/content/4/1/4>.
- Rull, A., J. C. Escolà-Gil, J. Julve, N. Rotllan, L. Calpe-Berdiel, B. Coll, G. Aragonès, J. Marsillach, C. Alonso-Villaverde, J. Camps, F. Blanco-Vaca, and J. Joven. 2007. Deficiency in monocyte chemoattractant protein-1 modifies lipid and glucose metabolism. *Exp. Mol. Pathol.* 83:361-366.
- Samaha, F. F., N. Iqbal, P. Seshadri, K. L. Chicano, D. A. Daily, J. McGrory, T. Williams, M. Williams, E. J. Gracely, and L. Stern. 2003. A low-carbohydrate as compared with a low-fat diet in severe obesity. *New Engl. J. Med.* 348:2074-2081.
- Schemmer, P., R. Liang, M. Kincius, C. Flechtenmacher, H. Bunzendahl, C. N. Gutt, A. Mehrabi, M. M. Gebhard, M. W. Büchler, and T. W. Kraus. 2005. Taurine improves graft survival after experimental liver transplantation. *Liver Transpl.* 11:950-959.
- Scibior, D., and H. Czczot. 2004. Arginine-metabolism and functions in the human organism. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 58:321-332.
- Shavit, Y., G. Wolf, I. Goshen, D. Livshits, and R. Yirmiya. 2005. Interleukin-1 antagonizes morphine analgesia and underlies morphine tolerance. *Pain* 115:50-59.

- Sheth, H., T. Hafez, G. K. Glantzounis, A. M. Seifalian, B. Fuller, and B. R. Davidson. 2011. Glycine maintains mitochondrial activity and bile composition following warm liver ischemia-reperfusion injury. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 26:194-200.
- Shevde, N. K., A. C. Bendixen, K. M. Dienger, and J. W. Pike. 2000. Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97:7829-7834.
- Shai, I., D. SchwarzfuchsHenkin, Y. Henkin, D. R. Shahar, S. Witkow, I. Greenberg, R. Golan, D. Fraser, A. Bolotin, H. Vardi, O. Tangi-Rozental, R. Zuk-Ramot, B. Sarusi, D. Brickner, Z. Schwartz, E. Sheiner, R. Marko, E. Katorza, J. Thiery, G. M. Fiedler, M. Bluher, M. Stumvoll, and M. J. Stampfer. 2008. Weight loss with a low-carbohydrate, mediterranean, or low-fat diet. *New Engl. J. Med.* 359:229-241.
- Shin, K. H., E. B. Lee, J. H. Kim, M. S. Chung, and S. I. Cho. 1989. Pharmacological studies on powdered whole part of unossified antler. *Kor. J. Pharmacol.* 20:180-187.
- Sinha, R. A., B. K. Singh, and P. M. Yen. 2014. Thyroid hormone regulation of hepatic lipid and carbohydrate metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 25:538-545.
- Skoog, S. M. and A. E. Bharucha. 2004. Dietary fructose and gastrointestinal symptoms: a review. *Am. J. Gastroenterol.* 99:2046-2050.
- Sleivert, G., V. Burke, C. Palmer, A. Walmsley, D. Gerrard, S. Haines, and R. Littlejohn. 2003. The effects of deer antler velvet extract or powder supplementation on aerobic power, erythropoiesis, and muscular strength and endurance characteristics. *Int. J. Sport. Nutr. Exerc. Metab.* 13:251-265.
- Smith, B. W. and L. A. Adams. 2011. Non-alcoholic fatty liver disease. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 48: 97-113.
- Snyder, D. L., R. L. Cowan, D. R. Hagen, and B. D. Schanbacher. 1983. Effect of pinealectomy on seasonal changes in antler growth and concentrations of testosterone and prolactin in white-tailed deer. *Biol. Reprod.* 29:63-71.

- Sodhi, K., N. Puri, G. Favero, S. Stevens, C. Meadows, N. G. Abraham, R. Rezzani, H. Ansinelli, E. Lebovics, and J. I. Shapiro. 2015. Fructose mediated non-alcoholic fatty liver is attenuated by HO-1-SIRT1 module in murine hepatocytes and mice fed a high fructose diet. *PLoS One* 10:e0128648. doi:10.1371/journal.pone.0128648.
- Sonksen, P. and J. Sonksen. 2000. Insulin: understanding its action in health and disease. *Br. J. Anaesth.* 85:69-79.
- 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. *Hepatology* 50:1094-1104.
- Stärkel, P., C. Sempoux, I. Leclercq, M. Herin, C. Deby, J. P. Desager, and Y. Horsmans. 2003. Oxidative stress, KLF6 and transforming growth factor-beta up-regulation differentiate non-alcoholic steatohepatitis progressing to fibrosis from uncomplicated steatosis in rats. *J. Hepatol.* 39:538-546.
- Suh, S. J., K. S. Kim, A. R. Lee, K. T. Ha, J. K. Kim, D. S. Kim, Y. C. Lee, M. S. Kim, D. Y. Kwon, and C. H. Kim. 2007. Prevention of collagen-induced arthritis in mice by *Cervus korean* TEMMINCK var. *mantchuricus* Swinhoe. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 23:147-153.
- Sui, Z., L. Zhang, Y. Huo, and Y. Zhang. 2014. Bioactive components of velvet antlers and their pharmacological properties. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 87:229-240.
- Sundler, R., B. Akesson, and A. Nilsson. 1974. Effect of different fatty acids on glycerolipid synthesis in isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 249:5102-5107.
- Sunwoo, H. H., T. Nakano, R. J. Hudson, and J. S. Sim. 1995. Chemical composition of antlers from wapiti (*Cervus elaphus*). *J. Agric. Food Chem.* 43:2846-2849.
- Suttie, J. M., G. A. Lincoln, and R. N. Kay. 1984. Endocrine control of antler growth in red deer stags. *J. Reprod. Fertil.* 71:7-15.

- Suzuki, S., S. Nakamura, A. Serizawa, T. Sakaguchi, H. Konno, H. Muro, I. Kosugi, and S. Baba. 1996. Role of Kupffer cells and the spleen in modulation of endotoxin-induced liver injury after partial hepatectomy. *Hepatology* 24:219-225.
- Syn, W. K., S. S. Choi, and A. M. Diehl, 2010. Apoptosis and cytokines in nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis.* 13:565–580.
- Taghibiglou, C., A. Carpentier, S. C. Van-Iderstine, B. Chen, D. Rudy, A. Aiton, G. F. Lewis, and K. Adeli. 2000. Mechanisms of hepatic very low density lipoprotein overproduction in insulin resistance. Evidence for enhanced lipoprotein assembly, reduced intracellular ApoB degradation, and increased microsomal triglyceride transfer protein in a fructose-fed hamster model. *J. Biol. Chem.* 275:8416-8425.
- Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira. 2003. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21:335-376.
- Tedgui, A. and Z. Mallat. 2006. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol. Rev.* 86:515-581.
- Tetri, L. H., M. Basaranoglu, E. M. Brunt, L. M. Yerian, and B. A. Neuschwander-Tetri. 2008. Severe NAFLD with hepatic necroinflammatory changes in mice fed trans fats and a high-fructose corn syrup equivalent. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 295:G987-G995.
- Than, N. N. and P. N. Newsome. 2015. A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis* 239:192-202.
- Tilg, H. and A. M. Diehl. 2000. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N. Engl. J. Med.* 343:1467-1476.
- Tomita, K., Y. Oike, T. Teratani, T. Taguchi, M. Noguchi, T. Suzuki, A. Mizutani, H. Yokoyama, R. Irie, H. Sumimoto, A. Takayanagi, K. Miyashita, M. Akao, M. Tabata, G. Tamiya, T. Ohkura, and T. Hibi. 2008. Hepatic AdipoR2 signaling plays a

- protective role against progression of nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatology* 48:458-473.
- Tracey, K. J. 2002. The inflammatory reflex. *Nature* 420:853-859.
- Tracey, K. J. and A. Cerami. 1993. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9:317-343.
- Trayhurn, P. and J. H. Beattie. 2001. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc. Nutr. Soc.* 60:329-339.
- Ukkola, O. and M. Santaniemi. 2002. Adiponectin: a link between excess adiposity and associated comorbidities? *J. Mol. Med.* 80:696-702.
- Ungerfeld, R., S. González-Pensado, A. Bielli, M. Villagrán, D. Olazabal, and W. Pérez. 2008. Reproductive biology of the pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*): a review. *Acta Vet. Scand.* 50:1-16.
- Vijayakumar, A., R. Novosyadlyy, Y. Wu, S. Yakar, and D. LeRoith. 2010. Biological effects of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism. *Growth Horm. IGF Res.* 20:1-7.
- Wang, B. X., X. H. Zhao, S. B. Qi, S. Kaneko, M. Hattori, T. Namba, and Y. Nomura. 1988. Effects of repeated administration of deer antler extract on biochemical changes related to aging in senescence-accelerated mice. *Chem. Pharm. Bull.* 36:2587-2592.
- Wang, B. X., X. H. Zhao, S. B. Qi, X. W. Yang, S. Kaneko, M. Hattori, T. Namba, and Y. Nomura. 1988. Stimulating effect of deer antler extract on protein synthesis in senescence-accelerated mice *in vivo*. *Chem. Pharm. Bull.* 36:2593-2598.
- Wang, T., H. Xie, X. Chen, X. Jiang, and L. Wang. 2015. Simultaneous determination of leucine, isoleucine and valine in Beagle dog plasma by HPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 114:426-432.

- Warskulat, U., E. Borsch, R. Reinehr, B. Heller-Stilb, C. Roth, M. Witt, and D. Häussinger. 2007. Taurine deficiency and apoptosis: findings from the taurine transporter knockout mouse. *Arch. Biochem. Biophys.* 462:202-209.
- Westerbacka, J., K. Lammi, A. M. Häkkinen, A. Rissanen, I. Salminen, A. Aro, and H. Yki-Järvinen. 2005. Dietary fat content modifies liver fat in overweight nondiabetic subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90:2804-2809.
- Wieckowska, A., B. G. Papouchado, Z. Li, R. Lopez, N. N. Zein, and A. E. Feldstein. 2008. Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. *Am. J. Gastroenterol.* 103:1372-1379.
- Wiegman, C. H., R. H. Bandsma, M. Ouwens, F. H. van der Sluijs, R. Havinga, T. Boer, D. J. Reijngoud, J. A. Romijn, and F. Kuipers. 2003. Hepatic VLDL production in *ob/ob* mice is not stimulated by massive de novo lipogenesis but is less sensitive to the suppressive effects of insulin. *Diabetes* 52:1081-1089.
- Winiarska, K., K. Szymanski, P. Gorniak, M. Dudziak, and J. Bryla. 2009. Hypoglycaemic, antioxidative and nephroprotective effects of taurine in alloxan diabetic rabbits. *Biochimie* 91:261-270.
- Wobser, H., C. Dorn, T. S. Weiss, T. Amann, C. Bollheimer, R. Büttner, J. Schölmerich, C. Hellerbrand. 2009. Lipid accumulation in hepatocytes induces fibrogenic activation of hepatic stellate cells. *Cell Res.* 19:996-1005.
- Wolf, G. 1996. Nutritional and hormonal regulation of fatty acid synthase. *Nutr. Rev.* 54:122-123.
- Wood, I. S., B. Wang, S. Lorente-Cebrián, and P. Trayhurn. 2007. Hypoxia increases expression of selective facilitative glucose transporters (GLUT) and 2-deoxy-D-glucose uptake in human adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 361:468-473.

- Wu, F., H. Li, L. Jin, X. Li, Y. Ma, J. You, S. Li, and Y. Xu. 2013. Deer antler base as a traditional Chinese medicine: a review of its traditional uses, chemistry and pharmacology. *J. Ethnopharmacol.* 145:403-415.
- Wu, H., Y. Liu, D. Pi, W. Leng, H. Zhu, Y. Hou, S. Li, H. Shi, and X. Wang. 2015. Asparagine attenuates hepatic injury caused by lipopolysaccharide in weaned piglets associated with modulation of Toll-like receptor 4 and nucleotide-binding oligomerisation domain protein signalling and their negative regulators. *Br. J. Nutr.* 16:1-13.
- 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.
- Yamanouchi, K., S. Eguchi, Y. Kamohara, K. Yanaga, S. Okudaira, Y. Tajima, and T. Kanematsu. 2007. Glycine reduces hepatic warm ischaemia-reperfusion injury by suppressing inflammatory reactions in rats. *Liver Int.* 27:1249-1254.
- Yao, H. T., P. Lin, Y. W. Chang, C. T. Chen, M. T. Chiang, L. Chang, Y. C. Kuo, H. T. Tsai, and T. K. Yeh. 2009. Effect of taurine supplementation on cytochrome P450 2E1 and oxidative stress in the liver and kidneys of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Food Chem. Toxicol.* 47:1703-1709.
- Ylä-Herttuala, S., B. A. Lipton, M. E. Rosenfeld, T. Särkioja, T. Yoshimura, E. J. Leonard, J. L. Witztum, and D. Steinberg. 1991. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:5252-5256.
- York, L. W., S. Puthalapattu, and G.Y. Wu. 2009. Nonalcoholic fatty liver disease and lowcarbohydrate diets. *Ann. Rev. Nutr.* 29:365-379.
- Yu, X., S. Druz, D. T. Graves, L. Zhang, H. N. Antoniades, W. Hollander, S. Prusty, A. J. Valente, C. J. Schwartz, and G. E. Sonenshein. 1992. Elevated expression of

- monocyte chemoattractant protein 1 by vascular smooth muscle cells in hypercholesterolemic primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:6953-6957.
- Yudkin, J. S., M. Kumari, S. E. Humphries, and V. Mohamed-Ali. 2000. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* 148:209-214.
- Zha, E., X. Li, D. Li, X. Guo, S. Gao, and X. Yue. 2013. Immunomodulatory effects of a 3.2 kDa polypeptide from velvet antler of *Cervus nippon* Temminck. *Int. Immunopharmacol.* 16:210-213.
- Zhang, H., S. Wanwimolruk, P. F. Coville, J. C. Schofield, G. Williams, S. R. Haines, and J. M. Suttie. 2000. Toxicological evaluation of New Zealand deer velvet powder. Part I: acute and subchronic oral toxicity studies in rats. *Food Chem. Toxicol.* 38:985-990.
- Zhang, Z. Q., Y. Wang, H. Zhang, W. Zhang, Y. Zhang, and B. X. Wang. 1994. Anti-inflammatory effects of pilose antler peptide. *Acta Pharmacol. Sin.* 15:282-284.
- Zhang, Z., X. Liu, L. Duan, X. Li, Y. Zhang, and Q. Zhou. 2011. The effects of velvet antler polypeptides on the phenotype and related biological indicators of osteoarthritic rabbit chondrocytes. *Acta Biochim. Pol.* 58:297-302.
- Zhang, Z. Y., L. X. Duan, Q. L. Zhou, J. L. Xin, Y. Lin, and Y. Zhang. 2012. Chemical composition and bioactivity of polypeptide from velvet antlers of *Cervus nippon* Temminck. *Chem. J. of Chin. Univ.* 33:2000-2004.
- Zhou, R. and S. Li. 2009. In vitro antioxidant analysis and characterisation of antler velvet extract. *Food Chem.* 114:1321-1327.
- Zhou, R. and S. Li. 2009. Supercritical carbon dioxide and co-solvent extractions of estradiol and progesterone from antler velvet. *J. Food Compos. Anal.* 22:72-78.
- Zhou, R., J. Wang, S. Li, and Y. Liu. 2009. Supercritical fluid extraction of monoamine oxidase inhibitor from antler velvet. *Sep. Purif. Technol.* 65:275-281.

Zhou, R., S. Li, and D. Zhang. 2009. Combination of supercritical fluid extraction with ultrasonic extraction for obtaining sex hormones and IGF-1 from antler velvet. *Chin. J. Chem. Eng.* 17:373-380.

Zou, Y., J. Li, C. Lu, J. Wang, J. Ge, Y. Huang, L. Zhang, and Y. Wang. 2006. High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Life Sci.* 79:1100-1107.

Abstract

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a common liver disease. The NAFLD is attributed to the increase in fatty acid synthesis or decrease in fatty acid β -oxidation. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with increased lipid contents in liver and serum. Recent studies have suggested that some NAFLD patients may develop into liver fibrosis, cirrhosis, or even hepatocellular carcinoma. Velvet antler has been used in traditional Chinese medicines and health foods about 2000 years. In the present study, we investigated whether and how the velvet antler extract of Formosan sambar deer (*Cervus unicolor swinhoei*) prevents the onset of NAFLD in murine model. Male C57BL/6JNarl mice were randomly allotted into five groups: naïve group, control group, and three treatment groups which were administered with 100, 200, and 400 mg/kg respectively, velvet antler vinegar extracts (VAE) daily, by gavage for 16 weeks. The control and the treatment groups were offered high-fructose corn syrup and high-fat diet (HFHF) *ad libitum* to induce NAFLD, while the naïve group was offered distilled water and normal diet *ad libitum*. Results showed that the control group had a higher body weight than the naïve group, and exhibited many characteristics of NAFLD. There were no significant differences between control group and treatment groups in body weight and weights of spleen, kidney, and liver. Velvet antler extracts significantly lowered serum levels of alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) activities as well as hepatic tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), thymic stromal lymphopoietin (TSLP), interleukin-33 (IL-33), CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 and triglyceride contents, compared with control group. On the basis of histology, VAE alleviated the fatty liver led by HFHF diet. It is concluded that velvet antler extracts may be an idea alternative medicine for preventing HFHF-induced NAFLD.

Keywords: Anti-inflammation, Mouse, Non-alcoholic fatty liver disease, Velvet antler

壹拾壹、 附件

附件一、實驗動物審查同意書

東海大學
實驗動物照護及使用委員會審查同意書
Affidavit of Approval of Animal Use Protocol
Tunghai University

同意書編號： 104-04

計畫主持人(PI)： 謝長奇 職稱： 教授
單位： 畜產與生物科技學系 飼養/應用地點： 畜產系動物房/基因轉殖實驗室
計畫名稱： 開發高附加價值畜產品及副產物利用技術-開發高附加價值鹿茸精
萃口服液及其副產物利用技術

動物實驗申請表編號： 104-04

本計畫之「動物實驗申請表」業經實驗動物照護及使用委員會審查通過。

本計畫預定飼養應用之動物如下：

| 動物種別 | 動物數量 | 計畫執行期間 |
|----------|--------|----------------------------------|
| C57BL/6J | 60 隻/年 | 104 年 01 月 01 日至 104 年 12 月 31 日 |
| ICR | 60 隻/年 | 104 年 01 月 01 日至 104 年 12 月 31 日 |

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

Protocol Title: **The navo technology in development of high value-added deer antler velvet essence and its byproducts**

IACUC Approval No : 104-04

Period of Protocol : Valid From: 01/01/2015 To: 12/31/2015 (mm/dd/yyyy)

Principal Investigator (PI) : Hsieh, Chang-Chi

實驗動物照護及使用委員會召集人 謝長奇 日期 1/28/2015

IACUC Chairman _____ Date _____



附件二、生醫年會摘要

| | | |
|-------------|-------|-------|
| 投稿學會：中國生理學會 | 收件編號： | 分類編號： |
|-------------|-------|-------|

第三十屆生物醫學聯合學術年會

Effect of the Velvet Antler of Formosan Sambar Deer (*Cervus unicolor swinhoei*) on the Prevention of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice

廖君涵¹，謝長奇¹，楊錫坤^{1*}

Chun-Han Lioa, Chang-Chi Hsieh and Shyi-Kuen Yang

¹Department of Animal Science and Biotechnology, Tunghai University

40704 Taichung, Taiwan.

Tel: 886-4-23590121#37116, skyang@thu.edu.tw

Velvet antler has been used in traditional Chinese medicines and health foods about 2000 years. Hepatic manifestations of the metabolic syndrome are implicated in obesity, type 2 diabetes/insulin resistance and non-alcoholic fatty liver disease. Here we investigated whether and how the velvet antler extract of Formosan sambar deer (*Cervus unicolor swinhoei*) protects against the onset of hepatic manifestations of the metabolic syndrome in murine model. Male C57BL/6JNarl mice were divided into five groups: naïve group, control group, and three treatment groups which were administered with 100, 200, and 400 mg/kg velvet antler extracts (VAE) daily, respectively, by gavage for 16 weeks. The control and treatment groups were induced NAFLD *via* high-fructose corn syrup- and high-fat (HFHF) diet and naïve group *ad libitum* in normal diet for 16 weeks. Results showed that there were no significant differences between control group and treatment groups in body weight and weights of spleen, kidney and liver. Velvet antler extracts significantly decreased serum levels of ALT and AST as well as hepatic triglyceride content, compared with control group. It is concluded that velvet antler extracts might be an idea alternative medicine in against HFHF-diet-induced hepatic manifestations of the metabolic syndrome.

Keywords: Anti-inflammatory, Velvet antler, Non-alcoholic fatty liver disease