

深層海水乳酸菌發酵產物對高血脂症倉鼠肝臟之蛋白質體學分析

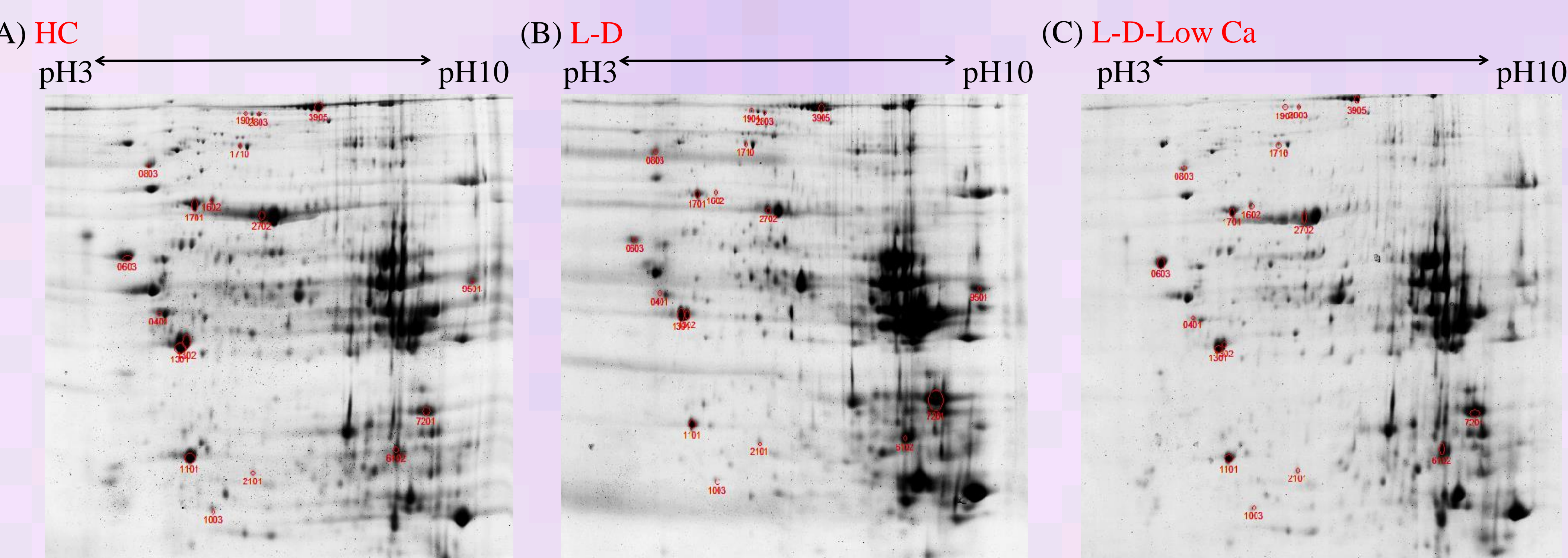
摘要

高血脂症是一種血脂異常症狀，而肝臟為調節脂質的重要場所之一。本研究以高油脂飲食誘發高血脂症倉鼠之動物模式，去探討深層海水 (deep ocean water, DOW) 與乳酸菌共發酵之產物對其肝臟蛋白表現量之影響，連續餵食八週發酵產物，犧牲後取肝臟進行蛋白質二維電泳及後續分析。結果顯示倉鼠肝臟二維電泳之蛋白質點分布，發現深層海水之乳酸菌發酵產物能提高肝臟 trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial 表現量，幫助脂肪分解，降低 keratin, type I cytoskeletal 18 肝纖維化相關蛋白表現量，防止肝臟受損；另外，參與調控細胞凋亡之蛋白如 prohibitin 表現量提升，顯示發酵產物具防止細胞凋亡的能力，其餘蛋白與肝功能之關係較小，有待進一步去驗證。根據蛋白質體學分析結果，深層海水之乳酸菌發酵產物可能藉由促進脂質分解與抑制細胞凋亡以達到保護高血脂誘發之肝臟損傷。

前言

高血脂症是指血液中的脂質或脂類相關蛋白異常的現象，若長期未有改善，會進一步造成心血管疾病、肥胖、糖尿病等症狀。DOW 具有降低膽固醇、促進增加微生物代謝產之作用 (He et al., 2014; Lee, 2015)，而乳酸菌具有降低血脂、促進腸胃消化的能力 (Mishra et al., 2015; J Dairy Sci., 2016)，將兩者結合共同發酵之深層海水乳酸菌發酵產物，應具有調節體內脂質之潛力。肝臟為體內代謝的重要器官之一，已有多種對其蛋白質組成之相關研究，其中二維電泳方式能夠詳細鑑別數千個以上的蛋白質，並可由後續分析可了解其交互作用之關係 (Yablonski et al., 2016)，但尚未了解經深層海水乳酸菌發酵產物之影響後，肝臟內部蛋白表現量變化，故尚需深入研究。本研究將以深層海水乳酸菌發酵產物，進行高油脂飲食誘發高血脂症倉鼠模式之動物實驗，並以蛋白質二維電泳方式，鑑定肝臟中蛋白質表現量變化。

結果與討論



圖一、各組具有顯著差異之蛋白質點比較。(A) HC 組、(B) L-D 組、(C) L-D-Low Ca 組之倉鼠肝組織二維電泳圖譜。紅圈部分為有差異之蛋白質點，數字為各點的編號。

圖一以 HC 組蛋白質表現量為基準，與 L-D、L-D-Low Ca 兩組別蛋白質表現量之差異進行比較，經分析後共篩選出 18 個與 HC 組具有顯著差異之蛋白質點。

表三、蛋白質點之鑑定結果及試驗物質組與 HC 組組間差異比較

classify	Spot	protein name	Function	L-D (%)	L-D-Low Ca (%)		
肝 代 功 能 與	401	keratin, type I cytoskeletal 18	參與細胞凋亡的過程，與促進肝纖維化有關	-91.9	↓	—	
	1101	otopetrin-2	功能尚不明，可能參與肝脂肪變性與胰島素阻抗的形成	-51.6	↓	-43.7	↓
	7201	fructose-bisphosphate aldolase B	為催化糖解作用的酵素	285.8	↑	—	
	9501	trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	具有催化脂肪酸的 β-氧化的功能	595.6	↑	266.6	↑
	1003	prohibitin	參與多項細胞凋亡的調控	592.3	↑	—	
細 胞 凋 亡	1602	stress-70 protein, mitochondrial	參與細胞增殖和細胞衰老的控制。	275.8	↑	—	
	1701	heat shock cognate 71 kDa protein	參與蛋白質折疊、細胞凋亡、自噬作用	-56.5	↓	—	
	2101	NHL repeat-containing protein 2	具有潛在抗細胞凋亡的能力	1289.7	↑	239.7	↑
	6102	proteasomal ubiquitin receptor ADRM1	參與細胞凋亡或 DNA 損傷修復	528.9	↑	—	
	603	Protein disulfide-isomerase	協助蛋白質形成雙硫鍵，也參與氧化還原蛋白的反應	168.8	↑	—	
其 他	803	prothrombin	血液凝固因子之一，為凝血酶的前體蛋白	-44.2	↓	-40.3	↓
	1301	LOW QUALITY PROTEIN: actin-85C-like	為一種肌動蛋白，普遍存在真核生物細胞中	—	—	-63	↓
	1302	LOW QUALITY PROTEIN: actin-85C-like	為一種肌動蛋白，普遍存在真核生物細胞中	-67.4	↓	—	—
	1710	cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	葉酸代謝的轉化酶	321.7	↑	—	—
	1901	carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial	產生尿素的連接酶，催化脊椎動物尿素循環的初始步驟	381.8	↑	—	—
	2702	serum albumin precursor	為血清白蛋白的前驅物	-66	↓	—	—
	2803	carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial	產生尿素的連接酶，催化脊椎動物尿素循環的初始步驟	265.8	↑	—	—
	3905	carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial	產生尿素的連接酶，催化脊椎動物尿素循環的初始步驟	999.8	↑	—	—

結論

本研究可看出倉鼠二維電泳之蛋白質點分布，從結果可看出 L-D 組影響肝臟蛋白的數量較 L-D-Low Ca 組多，以及發現以 DOW 乳酸菌發酵產物餵食高血脂症倉鼠，具有改善肝臟功能的效果，提高 trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial 的表現量，幫助脂肪分解，也降低了 keratin, type I cytoskeletal 18 肝纖維化相關蛋白的表現量，防止肝臟受損，另一方面，參與調控細胞凋亡之蛋白如 prohibitin、proteasomal ubiquitin receptor ADRM1 表現量提升，也顯示 DOW 乳酸菌發酵產物具有防止細胞凋亡的能力，其餘蛋白與肝功能之關係較小，可能有其他潛在之有益效果，有待進一步去驗證根據蛋白質體學分析結果，深層海水之乳酸菌發酵產物可能藉由促進脂質分解與抑制細胞凋亡以達到保護高血脂誘發之肝臟損傷。

研究方法

本研究試驗物質為以 *Lactobacillus plantarum* BCRC 10069 加入 DOW 之 MRS 培養基進行液態發酵 18 小時後濃縮之產物，DOW 之濃縮液將鎂離子濃度調整至 309.75 mg/L。動物採用雄性敘利亞倉鼠，每組 8 隻，預養一周後分組，餵食高油脂飲食飼料，並以管餵方式餵食倉鼠試驗物質，實驗八周後進行犧牲，並分析血清 Total Cholesterol (TC)、Triglyceride (TG)。

表一、動物分組與餵食劑量

組別	試驗物質	餵食劑量
HC	—	—
L-D	DOW 乳酸菌發酵產物	1 mL/kg
L-D-Low Ca	低 Ca 之 DOW 乳酸菌發酵產物	1 mL/kg

蛋白質二維電泳

參考前人研究方法修改後進行 (石, 2016)。

第一維電泳：IEF 電泳條件為 20 °C 100 V 覆水 12 hr，再來在 500 V 進行 2000 Vhr，1000 V 進行 1000 Vhr，2000 V 進行 2000 Vhr，4000 V 進行 4000 Vhr，8000 V 進行 2.5 hr，最後維持 8000 V 進行 60000 Vhr。

第二維電泳：電流供應條件為 40 mA 進行 11 小時。

表二、倉鼠血清 TC、TG 濃度

Groups	Serum TC (mg/dL)	Serum TG (mg/dL)
HC	152.88 ± 46.93 ^a	171.5 ± 19.49 ^a
L-D	131.25 ± 30.16 ^b	146.63 ± 15.81 ^a
L-D-Low Ca	138.25 ± 32.71 ^{bc}	135.25 ± 16.38 ^a

表二可看出 L-D、L-D-Low Ca 組血清 TC 顯著小於 HC 組，而 TG 雖無顯著差異但與 HC 組相比也具有下降的效果。