

# 定序胜肽在動物體重控制及減重之研究

撰文/張卜介·蔡佳惠·洪佳琪·劉逸軒·林美峰·黃志宏

## 前言

肥胖在近年來已經慢慢演變成中老年人的普遍性問題，根據衛生福利部中央健康保險署這幾年的報告中均提及，45歲以上的國人無論男女，超過50%有過重（其身體質量指數BMI在24~27之間）甚至達肥胖（BMI值大於27）的現象，而隨著肥胖的長時間發展，也通常會伴隨著產生三高（高血糖、高血壓、高血脂），或是脂肪肝的形成，最後發展成相關的慢性疾病，像是糖尿病、心血管相關疾病、非酒精性脂肪性肝炎，或體重負荷過重形成的骨關節炎，這些肥胖與相關疾病的連結，幾乎已經成為國民的基本常識之一，因此如何減重，也變成人們日常所關心的重要課題。

生物體每日能量的獲取量與其每日的能量消耗，分別坐落在體重控制的兩側，當前者大於後者，累積於體內的能量就被生物儲存於化學能中，其儲存的樣式在脊椎動物（尤其是哺乳類）主要以脂肪的方式進行質量的累積，再漸進式的變成肥胖（Anderson *et al.*, 2015）。而哺乳類被歸類為天生的肥胖者，是因為他們能將體內能量狀態的信息傳遞給大腦進而影響進食行為以及能量代謝（Broberger *et al.*, 1998），也因此飲食控制大概是減重方法中最有效，卻也是最難達成的。若要靠外力幫助，目前市面上兩種減肥藥物，一種是羅氏鮮（Xenical），而另一種是諾美婷（Reductie），前者是解脂酶（lipase）的抑制劑，可有效降低腸

道對食物中脂肪的攝取；後者是抑制正腎上腺素（Norepineohrine）及血清素（Serotonin），以及少量的多巴胺（Dopamine）的吸收，進而達到抑制食慾的效果。兩種藥物也都伴隨著相當程度的副作用，因此無法長時間常規使用（Chaput *et al.*, 2007）。除了藥物外，目前也有多種中藥草，或食物的萃取物具有減重的功效，例如桔梗中的Platycodin saponins天然物（Zhao *et al.*, 2005），以及來自茶葉裡的表兒茶素（epicatechin）及EGC（epigallocatechin）、CG（catechin gallate）、ECG（epicatechin-3-gallate）及EGCG（epigallocatechin-3-gallate）等兒茶素類物質可抑制解脂酶；藤黃果萃取物（Ohia *et al.*, 2002）和紅蓼（Kim *et al.*, 2005）可抑制食慾；白藜蘆醇（resveratrol）和大豆異黃酮，都能抑制脂肪細胞的形成（Hwang *et al.*, 2005）；咖啡和辣椒素則可刺激體內能量輸出。此外，在腸道作用的微生物或其代謝物也被證實在體重控制過程中，扮演重要的角色，例如近年來非常多人研究與肥胖相關的腸道菌 *Akkermansia muciniphila*，可藉由與腸道細胞上的TLR2（toll-like receptor 2）的作用而維持腸道結構的完整性，進而減少物質隨意進入血液，降低發炎反應而達到不易增重的功效（Zhai *et al.*, 2019）。但直接大量增加腸道中 *A. muciniphila* 的數量也可能有潛在的風險，例如有研究指出罹患帕金森氏症和濕疹的患者中發現到在腸胃道中有過量的 *A. muciniphila*（Zheng *et al.*, 2016）。

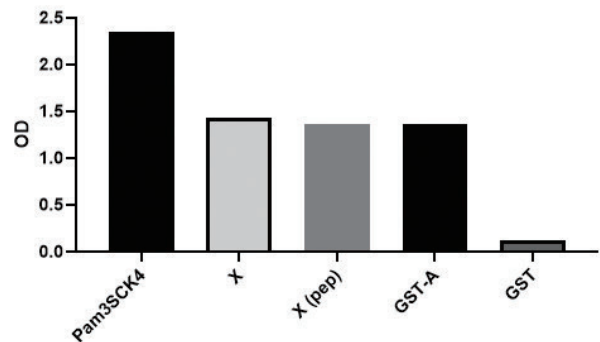
除了人類有肥胖問題外，隨著全球經濟的持續發展，在動物醫療及動物人道主義愈來愈完善狀況下，飼主對伴侶動物的陪伴及照顧上也會更加細心，但還是無法避免面臨到相同的肥胖議題，其原因通常是因為飼主的寵愛導致過量餵食，以及城市可提供運動空間缺乏，使得大約 60% 的犬隻有過重或肥胖的問題，並因此衍生出其他慢性疾病，反而造成飼主需要付出額外的照料時間及開支。因此，在行政院農業委員會研究計畫支持之下，本團隊希望針對伴侶動物中的犬隻開發機能性保健食品，以控制犬隻體重不至於過胖，同時改善血液生化指數中的相關肥胖因子數值，並可進一步與寵物食品業者結合，推出犬隻的機能性體重控制飼料或是添加物。

### 以快速細胞分析系統篩選出X蛋白可有效激活TLR2

由於先前 *A. muciniphila* 的許多研究已指出經由激活腸道細胞上的特殊 TLR2 受體，可使動物達到不易肥胖的結果，再加上多數動物 TLR2 的蛋白質序列高度相似，因此經由不同生物系統所篩選到的 TLR2 活化物，有很大的機率可以跨物種作用，因此我們以 InvivoGen 公司利用人類腎臟 HEK293 細胞株所發展的 HEK-Blue™ TLR2 cells 的細胞分析系統，快速對多種蛋白及多種微生物代謝物篩選可活化 TLR2 的配體物質，並且為了避免純化過程中微生物本身內毒素對 TLR2 的活化反應，所有純化的特定蛋白或代謝產物均再通過特殊管柱以移除內毒素，並經過釀血試劑來確認內毒素的殘留量不會引起 TLR2 的活化反應。經過多次的細胞實驗分析，我們找到一個蛋白（因應專利申請，暫時命名為 X 蛋白），在每毫升裡有 1 微克的 X 蛋白即可有效活化該細胞 TLR2 的訊號傳遞（圖一，X）。

### X蛋白經胃蛋白酶切割後的水解碎片仍可有效激活TLR2

如果 X 蛋白是要以食入的方式作用，那麼我們



註：不同的TLR2配體，與該細胞株共同培養後，會與表現在細胞表面的TLR2結合，進而激活TLR2的訊號傳遞，可啟動該細胞內的訊號傳遞下游基因NF-κB的表現，並受相同NF-κB啟動子調控而啟動植入的報告基因（外泌型 alkaline phosphatase）的表現，其產生的酵素可將特定無色化合物轉換成藍紫色產物，因此可藉由分光光度計偵測該藍紫色產物的讀值（為圖中的Y值），間接表示TLR2被該配體激活的程度。Pam3CSK4是可激活TLR2的合成配體，是為正對照組。X是X蛋白純化後未經任何處理；X（pep）是X蛋白經胃蛋白酶切割；GST-A是A胜肽與GST（glutathione S-transferase）蛋白接合一起表現；GST是作為負對照組，不會對TLR2有激活反應。

資料來源：黃志宏-微生物遺傳研究室。

圖一 利用HEK-Blue™ TLR2 cells測試TLR2配體的激活反應程度

合理的假設該蛋白得先經過胃酸變性及胃蛋白酶 (pepsin) 的切割後，變成胜肽片段或胺基酸，再進入腸道直接與腸道細胞上的 TLR2 結合並活化其訊號傳遞，或是再經過腸道的胰蛋白酶切割後的胜肽碎片才去活化腸道細胞上的 TLR2。為了驗證這假設，我們將純化後的 X 蛋白，以模擬胃部消化蛋白質的作用方式，先將該蛋白溶液酸度調整至 pH 2，再加入胃蛋白酶作用 2 小時後，將該溶液調回 pH 7（取部分溶液以 SDS PAGE 電泳法確認該蛋白已被水解成小片段胜肽），為避免後續步驟造成胜肽的流失，直接將作用後的溶液抽乾處理，再加水回溶成合適的濃度進行測試。實驗顯示，X 蛋白經胃蛋白酶作用後的胜肽碎片，仍可維持與未水解的完整 X 蛋白活化 TLR2 的相同活性程度（圖一，X (pep)），並驗證上述假設是對的，X 蛋白可以經胃蛋白酶水解成胜

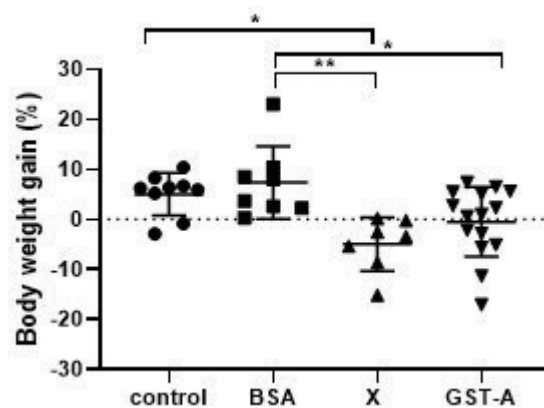
肽片段後，與 TLR2 結合並活化其訊號傳遞。

### X 蛋白上的 A 胜肽片段可以有效激活 TLR2

由於 X 蛋白經胃蛋白酶水解後的胜肽碎片可活化 TLR2，所以接下來就是要找尋是哪個胜肽碎片與 TLR2 結合。我們將 X 蛋白的序列，以模擬胃蛋白酶的切割位置，將之分成不同的胜肽序列，並避免這些不同的小片段胜肽直接以大腸桿菌表現造成後續純化上的困難，我們以水溶性的 GST(glutathione S-transferase) 作為攜帶蛋白 (carrier protein)，直接在質體上將 GST 的 DNA 編碼序列與不同的胜肽片段 DNA 編碼序列直接接合成同一接合蛋白 (fusion protein) 表現，並以 GST 純化管柱將之純化出來後，再通過去內毒素管柱，最後將得到的不同 GST- 胜肽接合蛋白個別調整濃度為 1 微克 / 毫升，再去進行 TLR2 活化分析。實驗顯示，單獨 GST 無法有效活化 TLR2 (圖一，GST)，而 X 蛋白上的一段特定胜肽片段 (暫時命名為 A 胜肽) 與 GST 接合後的蛋白，可有效活化 TLR2 (圖一，GST-A)，這結果指出 A 胜肽片段可以與 TLR2 結合並有效將其活化。

### 管餵 GST-A 接合蛋白對斑馬魚有體重控制的功效

上述的結果是基於細胞實驗，僅指出 GST-A 接合蛋白上的 A 胜肽可活化 TLR2 的訊號傳遞，因此需測試 A 胜肽在動物體內活化腸道細胞上的 TLR2 後，是否可以依循 *A. muciniphila* 相同的 TLR2 活化機制，使動物呈現體重控制的相似結果，因此選用台大所開發的斑馬魚對伴侶動物機能飼料的驗證模型 (蔡佳惠等人, 2019) 進行試驗，實驗設計是藉由增加投食次數讓魚隻自由採食，模擬大吃大喝後慢慢增重的過程。將 5 到 6 個月大的公斑馬魚每日中午測量魚隻空腹重量，然後以餵食管直接管餵各種待測蛋白 (0.003~0.3 毫克)，其餘時間以自動餵食器分四次投餌讓魚自己進食，餵食 14 天後終止實驗，測量體重後犧牲魚隻採取血液或臟器組織進行



註：圖中Y值為斑馬魚開始管餵前第0天跟管餵第14天後的體重變化百分比，計算方式為〔(第14天的體重 - 第0天的體重) / 0天的體重〕\* 100%。實驗過程中，斑馬魚每天中午管餵不同蛋白一次，其餘食物由自動投食機分四次餵食，一天共進食五次。control為不管餵組；BSA為管餵BSA組；X為管餵X蛋白組，GST-A為管餵GST-A蛋白組。

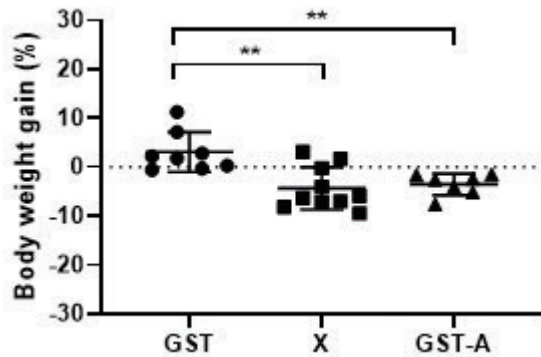
資料來源：黃志宏-微生物遺傳研究室。

圖二 斑馬魚測管餵不同待測物前後期的體重變化

後續分析。實驗顯示 (圖二)，相比於不管餵組及管餵牛血清白蛋白 (BSA) 組的平均體重增加 5~8%，管餵 X 蛋白或是 GST-A 蛋白的斑馬魚在 14 天前後的各組平均體重差異則呈現下降 4% 或是持平的現象，這結果指出不管是 X 蛋白或是帶有 A 胜肽片段的 GST-A 蛋白，對斑馬魚都有體重控制的功效；此外，所有斑馬魚在實驗過程中均未顯示出明顯的活動力差異。

### 管餵 GST-A 蛋白對肥胖後的斑馬魚有減少體重及降低血糖值的功效

經由上述實驗得知 GST-A 具有在增加進食次數的狀態下，還能維持原來的體重，因此接著測試 GST-A 是否對肥胖的斑馬魚有減重的功效。試驗將購得的斑馬魚先增加每日投食次數餵食兩週，待體重增加 50~100% 後，再開始分組管餵進食測試，同樣也是觀察 14 天。實驗顯示 (圖三)，相較於管餵 GST 的正對照組的魚群平均體重持續增加，管餵 X 蛋白或是 GST-A 蛋白，均可使肥胖斑馬魚組的平均



註：斑馬魚先一天五次投食自由進食兩週，待變胖後，才開始管餵實驗。圖中Y值為斑馬魚開始管餵前第0天跟管餵第14天後的體重變化百分比，計算方式為〔（第14天的體重 - 第0天的體重）/ 0天的體重〕\* 100%。管餵時，斑馬魚每天中午管餵不同蛋白一次，其餘食物由自動投食機分四次餵食，一天共進食五次。GST為管餵GST組；X為管餵X蛋白組，GST-A為管餵GST-A蛋白組。

資料來源：黃志宏-微生物遺傳研究室。

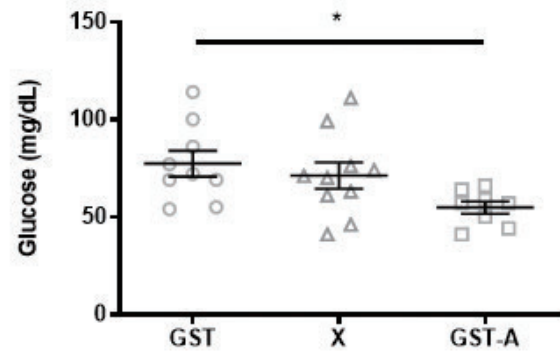
圖三 將斑馬魚先餵胖後再測試餵食不同蛋白前後的體重變化

體重 在 14 天後有顯著的減少，此結果指出 X 蛋白或是 A 胜肽均可對肥胖斑馬魚呈現有效的減重效果。

除了體重差異外，我們也進一步觀察減重後的血糖值變化，由於斑馬魚一隻不到 1 公克，所以無法進行管餵前後的採血，只能犧牲後的採血。實驗顯示（圖四），相比於管餵 GST 的肥胖斑馬魚較高的血糖平均值，管餵 X 蛋白或 GST-A 蛋白組的血糖平均值均有顯著的下降，此結果指出後兩者對血液裡的肥胖生化指數也會有顯著的改善效果。

### 定序胜肽作為食品原料的優缺點

本團隊在得知 X 蛋白的成效後，仍然執著的進一步去找出其相同功效的 A 胜肽，主要原因是，在得知固定序列的功能性短胜肽後，便可以有效的去增加該胜肽片段在表現蛋白中的比例，顯著提高每公克蛋白裡有效成分的比例含量；此外，原 X 蛋白經胃蛋白酶水解後，並未喪失活化 TLR2 的功能性，顯示未來多個 A 胜肽接合表現的蛋白，其立體結構並不重要，只要經胃水解後的 A 胜肽片段，不管



註：延續圖三的實驗內容，先餵胖再進行管餵實驗，待第14天後測量空腹體重後，將魚犧牲後採血，圖中Y值即是血糖值。GST為管餵GST組；X為管餵X蛋白組，GST-A為管餵GST-A蛋白組。

資料來源：黃志宏-微生物遺傳研究室。

圖四 將斑馬魚先餵胖後再測試餵食不同蛋白前後的血糖變化

是否會再被腸道內的胰蛋白酶水解，在斑馬魚模式實驗中，均能顯示出體重抑制或是減重的效能，此結果可能與短胜肽只會有自然展現的一級或二級結構，不會有一般蛋白質失活 (denature) 的現象，再加上胜肽原本就有耐酸、耐鹼、耐乾燥、耐高溫的特性，因胜肽此原料可直接套用在各式食品加工的程序。而 A 胜肽於犬隻食物適口性問題問題也不大，主要原因有兩個，一是該胜肽換算犬隻的每日有效攝食量，大概不到 0.001 公克 / 5 公斤體重，所需量極低；第二是一般發酵純化的蛋白，不會有太奇特的味道，因此預計應該可直接添加於飼料、點心、添加物中。而在胜肽原料的缺點上，與其他食品相同必須要免微生物的汙染，以免被當成一般胜肽片段消化吸收掉，所以乾燥或是添加適當的保存處理是必要的。

### 結論

雖然斑馬魚跟目標動物（犬）的生理構造差異頗大，而且哺乳動物彼此之間（包含犬）的 TLR2 序列相似度極高，但與斑馬魚的 TLR2 序列比，只

有 C 端的相似度較高，但是，本試驗的 X 蛋白及其內部的 A 胜肽片段，使用的篩選系統是人類的細胞，而衍伸的動物體重控制及減重功能則是在斑馬魚模式系統得到驗證，因此此結果顯示 A 胜肽在哺乳類被餵食後，應也可有效的產生相似的體重控制及減重的功效。本團隊在未來，會持續以鼠、犬以及貓的動物模型測試 A 胜肽在多種哺乳動物的功效。

AgBIO

張卜介 臺北科技大學 化學工程與生物科技系 博士班  
 蔡佳惠 台灣大學 動物科學技術學系 研究助理  
 洪佳琪 台灣大學 動物科學技術學系 研究助理  
 劉逸軒 台灣大學 動物科學技術學系 教授  
 林美峰 台灣大學 動物科學技術學系 教授  
 黃志宏 臺北科技大學 化學工程與生物科技系 助理教授

#### 參考文獻

1. 黃志宏，林美峰。「伴侶動物保健食品及飼料添加物之研發與認證推動策略規劃計畫」，行政院農業委員會主管科技計畫。
2. Anderson A.S., Key T.J., Norat T., Scoccianti C., Cecchini M., Berrino F., Boutron-Ruault M.C., Espina C., Leitzmann M., Powers H., Wiseman M., Romieu I. (2015). *European Code against Cancer 4th Edition: Obesity, body fatness and cancer*. *Cancer Epidemiol* 39, pp. S34-45.
3. Broberger C., De Lecea L., Sutcliffe J.G., Hökfelt T. (1998). *Hypocretin/orexin-and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and Agouti gene-related protein systems*. *Journal of Comparative Neurology* 402, pp. 460-474.
4. Chaput J.P., St-Pierre S., Tremblay A. (2007) *Currently available drugs for the treatment of obesity: sibutramine and orlistat*. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 7, pp. 3-10.
5. Hwang J.T., Park I.J., Shin J.I., Lee Y.K., Lee S.K., Baik H.W., Ha J., Park O.J. (2005). *Genistein, EGCG, and capsaicin inhibit adipocyte differentiation process via activating AMP-activated protein kinase*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338, pp. 694-699.
6. Kim J.H., Hahm D.H., Yang D.C., Kim J.H., Lee H.J., Shim I. (2005). *Effect of crude saponin of Korean red ginseng on high-fat diet-induced obesity in the rat*. *Journal of Pharmacological Sciences* 97, pp. 124-131.
7. Ohia S.E., Opere C.A., LeDay A.M., Bagchi M., Bagchi D., Stohs S.J. (2002). *Safety and mechanism of appetite suppression by a novel hydroxycitric acid extract (HCA-SX)*. *Molecular and Cellular Biochemistry* 238, pp. 89-103.
8. Zhai Q, Feng S., Arjan N., Chen W. (2019). *A next generation probiotic, Akkermansia muciniphila*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59(19):3227-3236.
9. Zhao H.L., Sim J.S., Shim S.H., Ha Y.W., Kang S.S., Kim Y.S.. (2005). *Antiobese and hypolipidemic effects of platycodin saponins in diet-induced obese rats: evidences for lipase inhibition and calorie intake restriction*. *International Journal of Obesity* 29, pp. 983-990.
10. Zheng H., Liang H., Wang Y., Miao M., Shi T., Yang F., Liu E., Yuan W., Ji Z. S., Li D. K. (2016). *Altered gut microbiota composition associated with eczema in infants*. *PLoS One* 11:e0166026.