

Effect of *Lactobacillus plantarum* GKM3 on Obesity in High-Fat Diet-Induced Rats

Shih-Wei Lin¹, Jr-Rou Shu², Wei-Tang Chang², Ci-Sian Wang¹, Chang Zhao³,
Yen-Lien Chen¹, Chin-Lin Hsu^{2,4}, Chin-Chu Chen^{1,5,6,7,8}

¹Grape King Bio Ltd., Taoyuan Taiwan

²School of Nutrition, Chung Shan Medical University, Taichung Taiwan

³Shanghai Grape King Enterprise Co., Ltd., Shanghai

⁴Department of Nutrition, Chung Shan Medical University Hospital, Taichung Taiwan

⁵Institute of Food Science and Technology, National Taiwan University, Taipei Taiwan

⁶Department of Food Science, Nutrition, and Nutraceutical Biotechnology, Shih Chien University, Taipei Taiwan

⁷Institute of Biotechnology, National Changhua University of Education, Changhua Taiwan

⁸Bioscience Technology, Chung Yuan Christian University, Taoyuan Taiwan

Email: gkbioeng@grapeking.com.tw

Received: May 6th, 2017; accepted: May 17th, 2017; published: May 26th, 2017

Abstract

High fat diet has been confirmed to cause many obesity-related diseases, such as type 2 diabetes, stroke, cardiovascular disease, fatty liver, colon cancer, hypertension and hyperlipidemia. The aim of this study was to evaluate the effects of *Lactobacillus plantarum* GKM3, separated from sauerkraut in Taiwan, on body fat, body weight and blood biochemical in Wistar rats fed a high fat diet. The rats were randomly divided into three groups, normal diet (ND) group, high fat diet (HFD) group, and high-fat diet with probiotic GKM3 (HFD + GKM3) group. The results showed that GKM3 could significantly inhibit the weight of body and liver, reduce the accumulation of visceral fat and body fat, decrease the concentration of triglyceride and uric acid in the serum, and decrease the lipid contents in the liver and the stool. Based on the above results, GKM3 can beneficially affect the host by reducing the detrimental effects induced by a high-fat diet ($p < 0.05$).

Keywords

Lactobacillus plantarum GKM3, Probiotics, Obesity, Body Fat, Uric Acid

植物乳杆菌GKM3益生菌对高脂饮食肥胖大鼠之影响

林诗伟¹, 孙至柔², 张维棠², 王启宪¹, 赵 敞³, 陈炎炼¹, 徐庆琳^{2,4}, 陈劲初^{1,5,6,7,8}

文章引用: 林诗伟, 孙至柔, 张维棠, 王启宪, 赵敞, 陈炎炼, 徐庆琳, 陈劲初. 植物乳杆菌 GKM3 益生菌对高脂饮食肥胖大鼠之影响[J]. 食品与营养科学, 2017, 6(2): 85-95. <https://doi.org/10.12677/hjfn.2017.62009>

¹葡萄王生技股份有限公司, 台湾 桃园

²中山医学大学营养学系, 台湾 台中

³上海葡萄王企业有限公司, 上海

⁴中山医学大学附设医院营养科, 台湾 台中

⁵国立台湾大学食品科技研究所, 台湾 台北

⁶实践大学食品营养与保健生技学系, 台湾 台北

⁷彰化师范大学生物技术研究所, 台湾 彰化

⁸中原大学生物科技学系, 台湾 桃园

Email: gkbioeng@grapeking.com.tw

收稿日期: 2017年5月6日; 录用日期: 2017年5月17日; 发布日期: 2017年5月26日

摘要

高油脂饮食已经被证实造成许多肥胖相关疾病之发生, 例如: 第二型糖尿病、脑中风、心血管疾病、脂肪肝、肠癌、高血压与高血脂症等。本研究以分离自台湾产腌制酸菜中的植物乳杆菌GKM3益生菌冻干粉末喂食高脂饮食诱导Wistar大鼠, 探讨其对体脂肪、体重及血液生化分析之影响。试验大鼠分为三组, 分别正常组(ND)喂食正常饲料, 高脂饲料组(HFD)及高脂饲料管喂给予GKM3益生菌组(HFD + GKM3)。结果显示给予GKM3可显著抑制高脂饮食诱导之体重增加, 抑制肝脏的肿大、降低内脏脂肪与体脂肪堆积、降低血清中三酸甘油酯与尿酸浓度、降低肝脏中脂质含量及提高粪便中脂质含量($p < 0.05$)。

关键词

植物乳杆菌 GKM3, 益生菌, 肥胖, 体脂, 尿酸

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

肥胖是国人常见的现象, WHO 亦在 1996 年将肥胖列为慢性病的一种, 由于经济发展的提升, 使的人们的生活方式改变、饮食的改变, 导致全球肥胖人口不断的增加[1]。根据研究调查指出, 在 2012 年在美国所进行的调查中, 39.96%的男性及 29.74%的女性过重(BMI > 25), 而过重比例中的 35.04%男性与 26.84%的女性肥胖(BMI > 30)的。追踪肥胖人口数增加的原因, 被发现肥胖人口的比例随着经济的提升而成正比[2], 显示现代的经济发展与肥胖关系俨然已密不可分。

现代的饮食西化, 肥胖的人数上升情形也如同美国肥胖人口一般的大幅度增加。摄取过多的油脂、蛋白与醣类乃是导致肥胖发生的主因。过多的能量在体内将被转换为三酸甘油酯, 以油滴的形式累积在皮下脂肪细胞或内脏器官中。人们体内的脂肪细胞的数量在成年后不再增加, 所以以油滴增大的方式在细胞内储存能量, 因此生物体主要观察油脂细胞的判别时, 主要以每个脂肪细胞内所含有的油滴含量或脂肪细胞大小为依据[3]。

高热量的摄取除了因脂肪堆积改变体态与体型之外, 在体内, 脂肪细胞肿大, 过多的脂肪油滴导致代谢异常而引起发炎反应的发生, 长期的慢性发炎就在体内孕育而生。慢性发炎将促使巨噬细胞累积于脂肪组织中, 除了发炎反应脂外, 更会产生胰岛素阻抗性(insulin resistance)而导致糖尿病的发生及低密度

脂蛋白的加速氧化, 堆积在血管中引起动脉粥样硬化(atherosclerosis)发生的主因[4]。

研究指出, 高三酸甘油酯血症所引起的慢性发炎乃是引起胰岛素阻抗的主因, 其亦是周围胰岛素敏感性受损的主要原因[5]。高油脂堆积的脂肪细胞中将导致游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)浓度提高, 体内的游离脂肪酸易导致身体器官组织因子(tissue factor, TF)与纤维酶原激活物抑制剂(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)增加, 使的血管中血小板蓄积凝集而形成血栓[6]。

三酸甘油酯堆积在体内中, 除了堆积在皮下组织, 将会影响血管中三酸甘油酯、胆固醇在血清中浓度提升之外, 更容易堆积在器官组织内或周围如肾脏周遭脂肪细胞及脂肪油滴堆积在肝脏中形成了脂肪肝, 脂肪肝的形成主因主要可分为酒精性脂肪肝(alcoholic fatty liver disease, NAFLD)或非酒精性脂肪肝(Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) [7]: 脂肪肝可分为单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎、肝纤维化与肝硬化。非酒精性脂肪肝的形成缘由发现跟肥胖具有高度相关性[8]。过多的油脂摄取在体内被堆积在肝脏中而成的脂肪肝慢性发炎, 虽然可经由脂肪代谢而逆转恢复, 但是饮食及生活习惯若不调整, 将导致脂肪肝发炎的累积与恶化, 如果未做控制, 将恶化发展为肝纤维化、肝硬化或是肝衰竭[9]。

酒精性脂肪肝风行的主因来自国人的应酬酗酒所造成的脂肪肝疾病极为普遍, 而酗酒的风潮下导致酒精性脂肪肝、酒精性肝炎及酒精性肝硬化的病例逐年提升。临床上, 酒精性脂肪肝患者之肝功能检查可能仍正常或轻度异常。急性酒精性肝炎并不常见因而常常被忽略。急性酒精性肝炎常见的症状如发烧、厌食、体重减轻、肝脏肿大、白血球升高及营养不良等现象。直到 1989 年才开始使用酒精饲料喂食小鼠引发慢性酒精性肝损伤。试验结果显示将导致动物诱发脂肪肝且伴随着三酸甘油酯及胆固醇的上升[10]。此一模式慢慢的形成脂肪肝评估的最主要方法且沿用至今。

代谢症候群在国际组织-国际糖尿病联盟(International diabetes federation, IDF)上有着明确的定义指出在中间型肥胖的患者中具有下列两项指标者, 即是代谢症候群患者, 其中指标包含了: 1) 三酸甘油酯升高(大于 150 mg/dL); 2) 高密度脂蛋白胆固醇不足(男性小于 40 mg/dL, 女性小于 50 mg/dL); 3) 高血压(收缩压大于 130 mm Hg, 舒张压大于 85 mm Hg); 4) 空腹血糖升高(大于 100 mg/dL)。由以上定义可知代谢症候群也已经被证实与肥胖具有密不可分的关系, 肥胖易导致代谢症候群的发生, 其衍生并发症如糖尿病、心血管疾病、高血压及脑中风而其中心血管疾病及脑中风方面的危害更是立即性的伤害[11]。

肥胖引起糖尿病的主因是提升胰岛素阻抗性而降低血糖的吸收, 长期下来形成第二型糖尿病[12]。因此肥胖症患者易好发糖尿病, 而糖尿病患者容易引发心血管方面并发症, 追根究底因为肥胖细胞除了提升胰岛素抗性之外, 更会诱导 TNF- α 浓度偏高而引起慢性发炎, 脂质因此容易被分解为游离脂肪酸, 导致血浆中游离脂肪酸浓度的提高, 堆积与氧化后堆积在血管中, 导致血管失去弹性或血管堵塞, 高血压及心血管疾病也就因此伴随产生。

文献中指出体内过多的脂肪与存在肾脏中的肾素 - 血管收缩素转换素系统均是向上调控(up-regulation)的关系, 两者之间呈现正相关[13]。肾素在体内扮演了提高血压的重要角色, 可催化血管收缩素原水解产生血管收缩素 I。经血管收缩素转化酶(Angiotensin Converting Enzyme, ACE)剪切 C-末端两个氨基酸残基而形成血管收缩素 II。血管收缩素 II 具有高效的收缩血管作用, 从而使血压升高; 血管收缩素 II 也能刺激肾上腺皮质分泌醛固酮。醛固酮能促进肾脏对水和钠离子的重吸收, 继而增加体液容量, 升高血压。

在肾脏中, 因过度肥胖而易导致肾小球病变, 其统称为肥胖相关性肾小球病(obesity-associated glomerulonephropathy, ORG), 又可区分为肾小球肥大症与局部肾小球硬化症造成日后肾病变之发生原因[14]。证明肥胖所引起的代谢症候群, 除了血脂、血压、血糖异常与心血管疾病之外, 更容易导致多重器官的异常, 针对肥胖的预防与控制可以藉由降低卡路里(calorie)之摄取或身体之活动, 来达到减低发炎反应与癌症之危害[15]。民众因此容易误认为高血压、糖尿病等疾病容易引起相关并发症, 追根究底, 肥胖才是

众多并发症的起始源头。

近几年, 益生菌被用在抑制肥胖的文献中, 主要锁定在发炎与体脂肪的改善部分[16], 部分文献记载了可同步降低三酸甘油酯与胆固醇, 但是进一步应用在消化代谢上的左证数据却很少, 因此本次研究选用具有降血脂功效之植物乳杆菌 GKM3 进行降低体脂脂功效试验, 希望可探讨与获得更多代谢与消化上的改善证据及关联性。

2. 材料与方法

2.1. 实验菌株

植物乳杆菌 GKM3: 葡萄王公司自传统发酵酸菜分离筛选获得, 经 16SrRNA 鉴定为植物乳杆菌。

2.2. 植物乳杆菌 GKM3 益生菌冻干粉末制备

GKM3 培养于 1 L MRS 培养基中, 经 37°C、16 小时培养后, 以 5000 RPM、25°C、离心 10 分钟取得菌泥, 混入 20% 脱脂乳粉后冷冻干燥而得。调整菌数为 5×10^9 cfu/g 保存于 -20°C 备用。

2.3. 试验动物与饲养

本次试验遵守动物伦理委员会 3R 规范, 以 SPF 级 Wistar 大白鼠 18 只进行试验, 体重介于 201~225 g 之雄性大白鼠经一周稳定其后进行六周的实验饲养。动物房温度控制在 $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度控制在 60%~80%, 光照与黑暗各十二小时(07:00~19:00 为光照期; 19:00~07:00 为黑暗期)。

2.4. 试验设计

18 只试验动物喂予正常成鼠饲料和饮用蒸馏水适应环境 1 周后, 将其随机分为三组, 每组六只。其分组如下: 正常饮食组(normal diet, ND)、高脂饮食组(high-fat diet, HFD)(饲料配方: 以 AIN93G 为基础加以调整油脂比例, 包含饲料固形物 68%、大豆油 7%和猪油 25%)及 HFD + GKM3 组[高脂饮食组合并管喂植物乳杆菌 GKM3 益生菌冻干粉末(其活菌数 5×10^9 cfu/g, 以成人每日摄取 1020 mg/day 换算成大白鼠摄取量为 $102.8 \text{ mg/kg rat/day}$)溶于 100 μL 磷酸盐缓冲溶液管喂食]。试验期间, 大白鼠自由摄食饲料和蒸馏水。每日纪录大白鼠之食物摄取量(food intake)、饮水量(water intake)和食物利用率(feed efficiency)。试验开始先纪录大白鼠之起始体重(initial body weight), 随后每两日精秤体重并观察其变化。给予试验样品之时间为 6 周, 并于试验结束前 12 小时进行禁食。利用 CO₂ 进行牺牲, 并纪录其最终体重(final body weight)和体重改变量(weight change)。从大鼠静脉进行血液采集, 并作为后续血清生化分析。同时, 取出脏器组织(心脏、肺脏、肝脏、脾脏和肾脏)和脂肪组织(肾周围脂肪、副睾脂肪、肠系膜脂肪、腹股沟脂肪和腹膜外脂肪)利用生理食盐水清洗并擦拭, 纪录各个脏器和脂肪组织的重量, 秤量后用铝箔纸包覆, 并以液态氮冷冻, 储存于 -80°C 冰箱, 以供试验分析使用。

2.4.1. 食物利用率(%)之计算公式如下

食物利用率(%) = [体重增加量(g) \div 总饲料摄取量(g)] \times 100%。

2.4.2. 体重改变量(g)之计算公式如下

体重改变量(g) = [最终体重(g) - 起始体重(g)]。

2.4.3. 总脂肪量(total body fat, mg/g rat)之计算公式如下

总脂肪量(mg/g rat) = [肾周围脂肪量(mg) + 副睾脂肪量(mg) + 肠系膜脂肪量(mg) + 腹股沟脂肪(mg) + 腹膜外脂肪量(mg)] \div 最终体重(g)。

2.4.4. 体脂肪率(body fat percentage, %)之计算公式如下

体脂肪率(body fat percentage) = 总脂肪量(g) ÷ 最终体重(g) × 100%。

2.4.5. 内脏脂肪量(visceral adipose tissue, mg/g rat)之计算公式如下

内脏脂肪量(mg/g rat) = [肾周围脂肪量(mg) + 副睾脂肪量(mg) + 肠系膜脂肪量(mg)] ÷ 最终体重(g)。

2.4.6. 皮下脂肪量(subcutaneous adipose tissue, mg/g rat)之计算公式如下

皮下脂肪量(mg/g rat) = [腹股沟脂肪(mg) + 腹膜外脂肪量(mg)] ÷ 最终体重(g)。

2.5. 血清生化参数测定

血液收集于血清分离管(BD Vacutainer, Plymouth, UK)中, 以 4000 g 离心 10 分钟取出血清, 分装于微量离心管中并储存于-80℃冰箱, 作为分析使用。血清三酸甘油酯、葡萄糖、总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、天门冬氨酸转氨酶、丙氨酸转氨酶、尿酸、肌酸酐、钠离子、钾离子与氯离子浓度以市售分析套组(Diasys Co. Ltd., Holzheim, Germany)进行测定。酮体以市售分析套组(Denka Seiken Co. Ltd., Taipei City, Taiwan)进行测定。

2.6. 肝脏总脂质分析

2.6.1. 总脂肪萃取

称取肝脏组织 0.3 g 于离心管, 加入甲醇(methanol) 1.3 mL 与小钢珠后, 置于均质机上(Mini-beadbeater-16, Biospec, OK, USA), 以 30 秒 3 次进行肝脏组织破碎, 即可获得肝脏均质液。吸取肝脏均质液至玻璃螺旋试管, 于均质小管再次加入甲醇 1 mL 冲洗后, 同样吸取至玻璃螺旋试管。玻璃螺旋试管加入氯仿(chloroform) 4.6 mL 后, 利用超音波震荡器(ultrasonic cleaner) (DC150H, DELTA®, New Taipei City, Taiwan), 于室温下震荡 90 分钟后, 置于 10℃ 冷冻离心机(refrigerated benchtop centrifuge)经 1250 g 离心 10 分钟后, 取上清液至已称量空重(W_0)之玻璃螺旋试管。最后, 将玻璃螺旋试管置于吹氮式试管浓缩装置下, 利用吹氮浓缩方式使有机溶剂挥发, 直到 $W_n - W_{(n-1)} \leq 0.01$ g 时, 即达恒重。于玻璃螺旋试管加入异丙醇(isopropanol)回溶肝脏脂质, 利用超音波震荡器使肝脏脂质完全溶于异丙醇, 作为后续三酸甘油酯与总胆固醇含量分析测定。

$$\text{肝脏总脂质 (mg/g liver)} = \frac{W_n - W_0}{0.3 \text{ g liver}}$$

2.6.2. 三酸甘油酯测定

以市售之三酸甘油酯测定套组(TG assay kit, Teco Diagnostics, CA, USA)进行测定。于 96 well 盘加入 2 μ L 标准品或肝脂质均质液与 200 μ L 之 TG reagent, 置于 37℃ 之热循环烘箱(FD-115, BINDER, Tuttlingen, Germany)反应 5 分钟后, 利用分光亮度计(microplate reader) (UVM340, Biochrom, Cambridge, UK)测量 520 nm 吸光值, 计算肝脏中三酸甘油酯含量(mg/g liver)。

2.6.3. 总胆固醇测定

以市售总胆固醇分析套组(Cholesterol assay kit, Teco Diagnostics, Randox Laboratories Co. Ltd., Antrim, UK) 进行测定。于 96 well 盘加入 2 μ L 标准品或肝脂质均质液与 200 μ L 之 TG reagent, 置于 37℃ 之热循环烘箱反应 5 分钟后, 利用分光亮度计测量 500 nm 吸光值, 计算肝脏中总胆固醇含量(mg/g liver)。

2.6.4. 粪便脂质分析

粪便总脂质萃取参考 Tzang 等人[17]之方法进行。将收集到之粪便放入烘箱进行烘干。将粪便捣碎后,

取 0.3 g 放入 10 mL 的玻璃试管中, 进行脂质萃取, 并且分析粪便总脂质含量, 此部份之方法同肝脏总脂质萃取, 含有粪便脂肪之均质液加入 isopropanol 后, 室温下利用超音波震荡器进行震荡 10 分钟, 使粪便脂质完全溶解, 将其吸取至微量离心管内, 至 -20°C 冰箱保存, 以待后续进行粪便三酸甘油酯和总胆固醇含量之检测。粪便中三酸甘油酯和总胆固醇分析方法同肝脏三酸甘油酯和总胆固醇含量之测定方法。

2.7. 统计分析

实验数据使用 SPSS 计算机统计软件进行分析。变异数分析则以 PROC ANOVA 与 Duncan's multiple range test 进行分析, $p < 0.05$ 为具有显著性差异。

3. 结果

3.1. 植物乳杆菌 GKM3 对高脂饮食诱导肥胖大鼠之体重、食物摄取量、能量摄取、饮水量与食物利用率之影响

表 1 为大鼠之体重及增重比较表, 表 2 为大鼠食物摄取量、能量摄取、饮水量与食物利用率之比较表。由结果得知, 全程实验老鼠无任何死亡或异样的情形, 各组之间在起始体重上并无显著差异 ($p > 0.05$)。高脂饮食之 HFD 组别在最终体重上显著高于正常饮食 ND 组 ($p < 0.05$), 而在高脂饮食所诱导之肥胖大鼠, HFD 合并给予植物乳杆菌 GKM3 之 HFD + GKM3 组别, 可显著降低其最终体重 ($p < 0.05$)。在体重改变上亦可得到相同之结果。单纯给予高脂饮食组别之大鼠, 在食物利用率上显著高于正常饮食组 ($p < 0.05$)。而在高脂饮食给予益生菌冻干粉之组别可较高脂饮食组显著降低食物利用率 ($p < 0.05$)。在食物摄取量、能量摄取和饮水量上, 高脂饮食合并 GKM3 组与单纯高脂饮食组别相比, 并不会影响食物摄取和能量摄取 ($p > 0.05$)。

Table 1. Effect of *Lactobacillus plantarum* GKM3 powder on body weights and weight change in high-fat diet-induced obese rats

表 1. 植物乳杆菌 GKM3 粉末对高脂饮食诱导肥胖大鼠之最终体重与体重变化之影响

Groups	ND	HFD	HFD + GKM3
Initial body weight (g)	231.52 ± 4.36 ^a	235.30 ± 3.45 ^a	231.22 ± 3.66 ^a
Final body weight (g)	505.40 ± 12.87 ^b	542.68 ± 14.94 ^a	478.50 ± 7.14 ^b
Weight change (g)	273.88 ± 13.32 ^{ab}	307.38 ± 15.21 ^a	247.28 ± 6.72 ^b

The reported values are the mean ± SEM (n = 6). Mean values with different letters were significantly different ($p < 0.05$). ND, normal diet; HFD, high-fat diet. Weight change (g) = final body weight (g) - initial body weight (g).

Table 2. Effect of *Lactobacillus plantarum* GKM3 powder on food intake, energy intake, water intake, and feed efficiency in high-fat diet-induced obese rats

表 2. 植物乳杆菌 GKM3 粉末对高脂饮食诱导肥胖大鼠之食物摄取、能量摄取、饮水量与食物利用率之影响

Groups	ND	HFD	HFD + GKM3
Food intake (g/rat/day)	25.21 ± 0.31 ^a	20.43 ± 0.47 ^b	19.71 ± 0.56 ^b
Feed efficiency (%)	19.22 ± 0.54 ^c	38.70 ± 2.08 ^a	31.41 ± 0.66 ^b
Energy intake (kcal/rat/day)	99.84 ± 1.25 ^a	106.42 ± 2.47 ^a	102.69 ± 2.93 ^a
Water intake (mL/rat/day)	43.29 ± 2.47 ^a	45.16 ± 2.99 ^a	44.33 ± 3.10 ^a

The reported values are the mean ± SEM (n = 6). Mean values with different letters were significantly different ($p < 0.05$). Feed efficiency (%) = [weight change (g) ÷ total food intake (g)] × 100%.

3.2. 植物乳杆菌 GKM3 对高脂饮食诱导肥胖大鼠之脏器重量之影响

表 3 为本次实验中对高脂饮食诱导肥胖大鼠之脏器重量影响。各试验组大鼠以二氧化碳牺牲后，取下其心脏、肝脏、脾脏、肺脏和肾脏，并分别纪录其重量。由结果得知，各试验组大鼠在心脏、脾脏、肺脏和肾脏重量上，均无显著之差异($p > 0.05$)。在肝脏重量结果上，HFD + GKM3 组相较于单纯给予 HFD 组，可显著降低高脂饮食所诱导肝脏重量之增加($p < 0.05$)。

3.3. 植物乳杆菌 GKM3 对高脂饮食诱导肥胖大鼠之总脂肪重量与脂肪组织重量之影响

如表 4 和表 5 所示，各试验组大鼠牺牲后，取下肾周围脂肪组织、副睾脂肪组织和肠系膜脂肪组织代表内脏脂肪；腹股沟脂肪组织和腹膜外脂肪组织代表皮下脂肪，分别精秤其重量，最后将各脂肪组织加总之总和作为总脂肪重量；将总脂肪重量除以最终体重为体脂肪率。由结果得知，HFD 组之肥胖大鼠，其在内脏脂肪组织重量显著高于正常饮食组($p < 0.05$)。而 HFD + GKM3 组相较于单纯给予 HFD 组，其在总体脂肪、体脂肪率、内脏脂肪(肾周围脂肪、副睾脂肪和肠系膜脂肪组织)和皮下脂肪组织(腹股沟脂肪和腹膜外脂肪组织)重量上，皆显著低于 HFD 组($p < 0.05$)。

3.4. 植物乳杆菌 GKM3 对高脂饮食诱导肥胖大鼠之血清生化参数之影响

表 6 为本次实验各大鼠之血清生化分析结果；大鼠饲养 6 周后以二氧化碳牺牲，并从静脉进行血液收集，作为后续血清生化分析。在血脂质相关结果显示，HFD 组大鼠其血清中三酸甘油酯值着高于正常饮食组($p < 0.05$)。在高脂饮食诱导之肥胖大鼠，给予益生菌冻干粉末之 HFD + GKM3 组中，可见显著

Table 3. Effect of *Lactobacillus plantarum* GKM3 powder on the weights of organs in high-fat diet-induced obese rats

表 3. 植物乳杆菌 GKM3 粉末对高脂饮食诱导肥胖大鼠之脏器重量之影响

Groups	ND	HFD	HFD + GKM3
Heart (g/rat)	1.49 ± 0.05 ^a	1.50 ± 0.05 ^a	1.46 ± 0.06 ^a
Liver (g/rat)	15.88 ± 0.47 ^a	17.41 ± 0.77 ^a	13.20 ± 0.48 ^b
Spleen (g/rat)	0.94 ± 0.07 ^a	0.89 ± 0.04 ^a	0.82 ± 0.04 ^a
Lung (g/rat)	2.37 ± 0.08 ^a	2.45 ± 0.20 ^a	2.21 ± 0.15 ^a
Kidney (g/rat)	3.38 ± 0.05 ^a	3.46 ± 0.06 ^a	3.37 ± 0.10 ^a

The reported values are the mean SEM (n = 6). Mean values with different letters were significantly different ($p < 0.05$).

Table 4. Effect of *Lactobacillus plantarum* GKM3 powder on the weights of total body fat, body fat percentage, visceral adipose tissue, and subcutaneous adipose tissue in high-fat diet-induced obese rats

表 4. 植物乳杆菌 GKM3 粉末对高脂饮食诱导肥胖大鼠之总体脂肪、体脂肪率、内脏脂肪组织和皮下脂肪组织重量之影响

Groups	ND	HFD	HFD + GKM3
Total body fat (mg/g rat)	123.11 ± 4.27 ^a	137.74 ± 6.34 ^a	96.81 ± 5.22 ^b
Body fat percentage (%)	12.31 ± 0.43 ^a	13.77 ± 0.63 ^a	9.68 ± 0.52 ^b
Visceral adipose tissue (mg/g rat)	82.98 ± 2.73 ^b	94.14 ± 3.50 ^a	67.76 ± 3.25 ^c
Subcutaneous adipose tissue (mg/g rat)	40.13 ± 2.27 ^a	43.59 ± 4.02 ^a	29.05 ± 2.48 ^b

The reported values are the mean SEM (n = 6). Mean values with different letters were significantly different ($p < 0.05$). Total body fat (mg/g rat) = [visceral adipose tissue (mg) + subcutaneous adipose tissue (mg)] ÷ final body weight (g). Body fat percentage (%) = total body fat (g) ÷ final body weight (g) × 100%. Visceral adipose tissue (mg/g rat) = [perirenal adipose tissue (mg) + epididymal adipose tissue (mg) + mesenteric adipose tissue (mg)] ÷ final body weight (g). Subcutaneous adipose tissue (mg/g rat) = [retroperitoneal adipose tissue (mg) + inguinal adipose tissue (mg)] ÷ final body weight (g).

Table 5. Effect of *Lactobacillus plantarum* GKM3 powder on the weights of adipose tissue in high-fat diet-induced obese rats**表 5.** 植物乳杆菌 GKM3 粉末对高脂饮食诱导肥胖大鼠之脂肪组织重量之影响

Groups	ND	HFD	HFD + GKM3
Perirenal adipose tissue (mg/g rat)	35.40 ± 1.03 ^a	39.32 ± 1.97 ^a	29.95 ± 2.02 ^b
Epididymal adipose tissue (mg/g rat)	25.33 ± 1.26 ^b	30.79 ± 0.92 ^a	21.05 ± 1.78 ^c
Mesenteric adipose tissue (mg/g rat)	22.25 ± 1.19 ^a	24.04 ± 1.66 ^a	16.76 ± 1.65 ^b
Retroperitoneal adipose tissue (mg/g rat)	23.09 ± 2.13 ^{ab}	25.78 ± 2.74 ^a	18.16 ± 1.65 ^b
Inguinal adipose tissue (mg/g rat)	17.04 ± 1.42 ^a	17.81 ± 2.27 ^a	10.89 ± 1.60 ^b

The reported values are the mean SEM (n = 6). Mean values with different letters were significantly different ($p < 0.05$).

Table 6. Effect of *Lactobacillus plantarum* GKM3 powder on the serum biochemical parameters in high-fat diet-induced obese rats**表 6.** 植物乳杆菌 GKM3 粉末对高脂饮食诱导肥胖大鼠之血清生化参数之影响

Groups	ND	HFD	HFD + GKM3
Triglyceride (mg/dL)	129.50 ± 23.50 ^b	229.50 ± 8.65 ^a	71.67 ± 1.33 ^c
Total cholesterol (mg/dL)	116.24 ± 6.74 ^a	98.35 ± 1.94 ^b	90.55 ± 1.96 ^b
HDL-cholesterol (mg/dL)	71.67 ± 2.86 ^a	52.50 ± 4.84 ^b	61.17 ± 2.48 ^{ab}
LDL-cholesterol (mg/dL)	38.33 ± 2.60 ^a	24.67 ± 1.78 ^b	24.83 ± 1.01 ^b
LDL-C/HDL-C (ratio)	0.55 ± 0.04 ^a	0.47 ± 0.03 ^{ab}	0.40 ± 0.03 ^b
Glucose (mg/dL)	242.65 ± 8.45 ^a	240.93 ± 6.96 ^a	247.85 ± 2.85 ^a
AST (U/L)	84.67 ± 11.75 ^a	62.17 ± 4.04 ^a	68.67 ± 9.44 ^a
ALT (U/L)	35.67 ± 4.29 ^a	32.50 ± 2.05 ^a	30.33 ± 5.14 ^a
Uric acid (mg/dL)	5.72 ± 0.10 ^b	7.47 ± 0.15 ^a	5.68 ± 0.11 ^b
Creatinine (mg/dL)	0.60 ± 0.00 ^a	0.55 ± 0.03 ^a	0.53 ± 0.02 ^a
Ketone body (mmol/L)	5.68 ± 0.20 ^b	7.17 ± 0.33 ^a	5.18 ± 0.43 ^b
Na ⁺ (mmol/L)	145.33 ± 0.67 ^a	145.50 ± 0.43 ^a	144.33 ± 0.49 ^a
K ⁺ (mmol/L)	4.62 ± 0.07 ^a	4.42 ± 0.03 ^b	4.55 ± 0.04 ^{ab}
Cl ⁻ (mmol/L)	105.67 ± 0.33 ^a	105.67 ± 0.33 ^a	105.17 ± 0.40 ^a

The reported values are the mean SEM (n = 6). Mean values with different letters were significantly different ($p < 0.05$).

降低高脂饮食引起血清中三酸甘油酯之浓度升高($p < 0.05$)。另外, 正常饮食 ND 组别之大鼠其血清中总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇含量与钾离子浓度, 皆显著高于高脂饮食 HFD 组($p < 0.05$)。高脂饮食 HFD 组别之大鼠其血清中尿酸与酮体显著高于正常饮食 ND 组别($p < 0.05$)。在高脂饮食诱导之肥胖大鼠, 给予益生菌冻干粉末之组别, 可显著降低高脂饮食所诱导之血清酮体和尿酸浓度之升高($p < 0.05$)。此外, 在天门冬氨酸转氨酶、丙氨酸转氨酶、肌酸酐、钠离子和氯离子之浓度上, 各组之间均无统计之显著差异($p > 0.05$)。

3.5. 植物乳杆菌 GKM3 对高脂饮食诱导肥胖大鼠之肝脏总脂质、三酸甘油酯和胆固醇含量之影响

表 7 为益生菌 GKM3 对高脂饮食诱导肥胖大鼠之肝脏总脂质、三酸甘油酯和胆固醇含量之影响。

Table 7. Effect of *Lactobacillus plantarum* GKM3 powder on the hepatic total lipid, triglyceride, and cholesterol in high-fat diet-induced obese rats**表 7.** 植物乳杆菌 GKM3 粉末对高脂饮食诱导肥胖大鼠之肝脏总脂质、三酸甘油酯与胆固醇含量之影响

Groups	ND	HFD	HFD + GKM3
Hepatic total lipid (mg/g liver)	66.23 ± 5.86 ^b	90.71 ± 10.49 ^a	76.78 ± 3.45 ^{ab}
Hepatic triglyceride (mg/g liver)	22.76 ± 1.24 ^b	30.37 ± 2.40 ^a	25.29 ± 1.35 ^{ab}
Hepatic cholesterol (mg/g liver)	11.02 ± 0.63 ^{ab}	12.46 ± 0.64 ^a	10.55 ± 0.41 ^b

The reported values are the mean ± SEM (n = 6). Mean values with different letters were significantly different ($p < 0.05$).

由结果得知, 单纯给予高脂饮食之组别在肝脏总脂质与三酸甘油酯之含量, 均显著高于正常饮食控制 ND 组($p < 0.05$), 而高脂饮食给予益生菌 GKM3, 在肝脏总胆固醇含量上相较于单纯给予高脂饮食组别, 可显著降低其肝脏总胆固醇之含量($p < 0.05$)。

3.6. 植物乳杆菌 GKM3 对高脂饮食诱导肥胖大鼠之粪便总脂质、三酸甘油酯与胆固醇含量之影响

表 8 为益生菌冻干粉末对高脂饮食诱导肥胖大鼠之粪便总脂质、三酸甘油酯与胆固醇含量之影响。由结果显示, 高脂饮食 HFD 组在粪便总脂质、三酸甘油酯和胆固醇含量上, 皆显著高于正常饮食 ND 组($p < 0.05$)。而给予高脂饮食诱导之肥胖大鼠益生菌 GKM3, 可显著较单纯给予高脂饮食 HFD 组, 增加粪便总脂质之排出($p < 0.05$)。

4. 讨论

文献指出, 高热量饮食实验模式已被使用在多种动物模式中, 主要诱导试验动物肥胖与脂肪堆积于内脏形成内脏脂肪。许多的实验结果皆证实, 在高热量饮食后试验动物将导致体重改变与三酸甘油酯形成脂肪, 堆积于脂肪细胞中而脂肪细胞肿大, 产生代谢症候群相关病征[18] [19] [20] [21]。美国心脏协会(American heart association, AHA)指出, 腹部肥胖、血脂异常、高血压和胰岛素阻抗等高危险因子的聚集现象, 为造成代谢性症候群发生的判断指标[22]。

本试验中高脂饮食合并给予植物乳杆菌 GKM3 益生菌冻干粉末, 与 HFD 组相比之下, 发现可在相同的饮食与摄取水量条件下降低体重的增加(表 1 和表 2)。体重增加的减少不仅优于 HFD 组, 甚至更优于 ND 组, 达到统计上的差异($p < 0.05$)。显示 GKM3 益生菌在体重管理上具有显著性的功效潜力。高油脂饮食摄取下, 导致脂肪堆积于肝脏中而肝肿大, 但是经由 GKM3 益生菌介入而降低脂肪的堆积。故未发现肝脏有任何肿大情形, 甚至 HFD + GKM3 组肝脏器官重量更小于 ND 组, 进一步比较表 7, 检测肝脏中总脂质、三酸甘油酯与胆固醇含量, HFD + GKM3 组则高于 ND 组, 推测有效降低脂肪堆积于肝脏之外, 使肝脏组织重量小于 ND 组且达统计上差异。

体脂的部分, 发现实验鼠全身体脂肪 HFD + GKM3 较 ND 组减少 27%、较 HFD 组减少 42.27% (表 4), 再进一步比较实验鼠体内不同部位脂肪组织含量(表 5)。结果可见 GKM3 益生菌不仅在局部的脏器或血清中, 亦可在全身体脂肪的调节上。具有显著的功效, 从表 8 中可看出 GKM3 可有效的降低油脂的吸收, 加速总脂质、胆固醇与三酸甘油酯随着粪便的排除, 因此在粪便中观察到总油脂类的显著增加, HFD + GKM3 组较 HFD 组多增加排出了 43% 总脂质含量, 故推测 GKM3 乃透过抑制脂肪吸收及增加粪便中脂肪排出量来降低体脂与内脏脂肪的堆积。

油脂吸收消化主要在小肠中, GKM3 益生菌具有良好的肠道吸附性与 96% 以上的强耐酸胆盐耐受特性, 可顺利抵达小肠, 在小肠内降低油脂的被消化吸收而达到改善体重管理与体脂的功效。

Table 8. Effect of *Lactobacillus plantarum* GKM3 powder on the fecal total lipid, triglyceride, and cholesterol in high-fat diet-induced obese rats**表 8.** 植物乳杆菌 GKM3 粉末对对高脂饮食诱导肥胖大鼠之粪便总脂质、三酸甘油酯与胆固醇含量之影响

Groups	ND	HFD	HFD + GKM3
Fecal total lipid (mg/g dried feces)	23.66 ± 3.64 ^c	35.17 ± 3.02 ^b	50.34 ± 4.22 ^a
Fecal triglyceride (mg/g dried feces)	3.93 ± 0.07 ^b	6.90 ± 0.58 ^a	7.35 ± 0.15 ^a
Fecal cholesterol (mg/g dried feces)	5.27 ± 0.45 ^b	7.88 ± 0.03 ^a	8.54 ± 0.13 ^a

The reported values are the mean ± SEM (n = 6). Mean values with different letters were significantly different ($p < 0.05$).

在表 6, 血清的检验分析中可发现, HFD 与 HFD + GKM3 组相比血清中三酸甘油酯降低了 220%, 期望更多的研究与后续投入了解更多相关机制。血清中 HFD 组及 HFD + GKM3 组胆固醇类皆少于 ND 组, 推测主因是本研究结果并没有特别诱导高血脂之增加; HFD 组之血清中胆固醇呈现正常的脂质堆积现象, 此为高油脂饮食模式中常见的肝脏脂质堆积现象。据文献指出, 此为实验模式上的差异所致[23]。如肝指数与血糖无差异性乃因无进一步诱导所致。

酮体(Ketone bodies)是处在身体饥饿或淀粉摄取不足时所产生的代谢异常。体内脂肪浓度过高, 大量的脂肪酸被肝细胞吸收和氧化;为了维持血糖浓度的稳定, 在体内糖异生作用(gluconogenesis)草酰乙酸被大量消耗, 影响到草酰乙酸所参与的另一代谢途径三羧酸循环(tricarboxylic cycle), 大量中间物乙酰 CoA 得不到消耗、出现堆积, 并因此生成酮体。酮体被发现于肾脏中, 影响尿酸排泄, 最终导致尿酸代谢异常而堆积在血液中[24]。在表 6 中可发现, HFD + GKM3 组对体脂达到有效控制之后, 可改善体内代谢途径与能量产生。因高油脂所导致异常的酮体与尿酸在本次 GKM3 益生菌的介入后浓度具有显著性的降低, 相较 HFD 组达统计上差异, 与 ND 组十分接近而无统计差异, 说明 GKM3 对于高油脂所引起的尿酸代谢异常具改善效果。

整体而言, 在本次试验中, 可显著的观察到因高油脂饮食所诱导产生的肥胖相关风险与疾病指标, 在 GKM3 益生菌的介入之后可达到有效的改善, 体脂的堆积下降、油脂的排出提高及代谢上的趋向良性改变, 且对 Wistar 大鼠不具任何负面影响。

5. 结论

植物乳杆菌 GKM3 有降低血脂、预防心血管疾病之功效, 也可有效防止体重增加、改善体脂肪堆积、降低高油脂饮食所带来的消化代谢异常与加速油脂的排除, 有效地降低油脂在肠道中的消化吸收与提高脂质、三酸甘油酯及胆固醇在粪便中的含量, 加速排出。实验中大鼠摄取过多能量后形成体脂肪囤积于皮下与内脏中。当日常饮食中糖分摄取不足而饥饿时, 皮下脂肪会分解、燃烧而产生能量, 同时导致许多酮体体积存在体内。在内脏中堆积过多的脂肪, 将影响内脏中的能量代谢, 导致内脏中脂肪细胞因油滴堆积而导致脏器肿大, 走向肝脏病变的开始, 即是典型的脂肪肝。高量的酮体, 来自高油脂的消化代谢而产生, 酮体将妨碍肾脏排泄尿酸, 使体内尿酸升高。本实验中因摄取 GKM3 改善脂质在体内堆积, 同时也预防了体脂代谢异常的酮体及维持了肾脏中尿酸的正常代谢。综合来说, 植物乳杆菌 GKM3 降低了体脂肪、改善油脂的代谢, 更可减轻肾脏的伤害与维持正常机能。

参考文献 (References)

- [1] Yang, L. and Colditz, G.A. (2015) Prevalence of Overweight and Obesity in the United States. *JAMA Internal Medicine*, **175**, 1412-1413. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2015.2405>
- [2] Van Gaal, L.F., Mertens, I.L. and De Block, C.E. (2006) Mechanisms Linking Obesity with Cardiovascular Disease. *Nature*, **444**, 875-880. <https://doi.org/10.1038/nature05487>

- [3] Park, D.Y., Ahn, Y.T., Huh, C.S., Jeon, S.M. and Choi, M.S. (2011) The Inhibitory Effect of *Lactobacillus plantarum* KY1032 Cell Extract on the Adipogenesis of 3T3-L1 Cells. *Journal of Medicinal Food*, **14**, 670-675. <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.1355>
- [4] Weisberg, S.P., Hunter, D., Huber, R., Lemieux, J., Slaymaker, S., Vaddi, K., Charo, I. and Leibel, R.L. (2006) CCR2 Modulates Inflammatory and Metabolic Effects of High-Fat Feeding. *Journal of Clinical Investigation*, **116**, 115-124. <https://doi.org/10.1172/JCI24335>
- [5] McKane, W.R., Stevens, A.B., Woods, R., Andrews, W.J., Henry, R.W. and Bell, P.M. (1990) The Assessment of Hepatic and Peripheral Insulin Sensitivity in Hypertriglyceridemia. *Metabolism*, **39**, 1240-1245.
- [6] Eckel, R.H., Barouch, W.W. and Ershow, A.G. (2002) Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute-National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Working Group on the Pathophysiology of Obesity-Associated Cardiovascular Disease. *Circulation*, **105**, 2923-2929. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000017823.53114.4C>
- [7] Chen, M., Wang, M.C., Ni, R., Wang, J., Wang, L., Wang, G.N. and Zhang, L.Y. (2017) Role of Probiotics in Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Chinese Journal of Hepatology*, **25**, 77-80.
- [8] Wanless, I.R. and Lentz, J.S. (1990) Fatty Liver Hepatitis (Steatohepatitis) and Obesity: An Autopsy Study with Analysis of Risk Factors. *Hepatology*, **12**, 1106-1110. <https://doi.org/10.1002/hep.1840120505>
- [9] Saadeh, S. (2007) Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Obesity. *Nutrition in Clinical Practice*, **22**, 1-10. <https://doi.org/10.1177/011542650702200101>
- [10] Venkatesan, S. and Simpson, K.J. (1989) Fatty Liver and Plasma Corticosterone Levels in Chronically Alcohol- and Pair-Fed Rats. *Biochemical Society Transactions*, **17**, 1114-1115. <https://doi.org/10.1042/bst0171114>
- [11] Sowers, J.R. (2003) Obesity as a Cardiovascular Risk Factor. *American Journal of Medicine*, **115**, 37S-41S.
- [12] Mcternan, C.L., Mcternan, P.G., Harte, A.L., Levick, P.L., Barnett, A.H. and Kumar, S. (2002) Resistin, Central Obesity, and Type 2 Diabetes. *The Lancet*, **359**, 46-47.
- [13] Barton, M., Carmona, R., Morawietz, H., d'Uscio, L.V., Goettsch, W., Hillen, H., Haudenschild, C.C., Krieger, J.E., Munter, K., Lattmann, T., Luscher, T.F. and Shaw, S. (2000) Obesity Is Associated with Tissue-Specific Activation of Renal Angiotensin-Converting Enzyme *in Vivo*: Evidence for a Regulatory Role of Endothelin. *Hypertension*, **35**, 329-336. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.35.1.329>
- [14] Hall, J.E., Kuo, J.J., da Silva, A.A., de Paula, R.B., Liu, J. and Tallam, L. (2003) Obesity-Associated Hypertension and Kidney Disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, **12**, 195-200. <https://doi.org/10.1097/00041552-200303000-00011>
- [15] Mai, V., Colbert, L.H., Berrigan, D., Perkins, S.N., Pfeiffer, R., Laviqne, J.A., Lanza, E., Haines, D.C., Schatzkin, A. and Hursting, S.D. (2003) Calorie Restriction and Diet Composition Modulate Spontaneous Intestinal Tumorigenesis in (Apc) Min Mice through Different Mechanisms. *Cancer Research*, **63**, 1752-1755.
- [16] Zhang, J., Xiao, X., Dong, Y., Xu, T. and Wu, F. (2016) Dietary Supplementation with *Lactobacillus plantarum* dy-1 Fermented Barley Suppresses Body Weight Gain in High-Fat Diet-Induced Obese Rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **96**, 4907-4917. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7786>
- [17] Tzang, B.S., Yang, S.F., S.G., Yang, H.C., Sun, H.L. and Chen, Y.C. (2009) Effects of Dietary Flaxseed Oil on Cholesterol Metabolism of Hamsters. *Food Chemistry*, **144**, 1450-1455.
- [18] Bray, G.A. and Bouchard, C. (2014) Handbook of Obesity: Clinical AHPP-Glications. 4th Edition, Vol. 2.
- [19] Large, V., Peroni, O., Letexier, D., Ray, H. and Beylot, M. (2004) Metabolism of Lipids in Human White Adipocyte. *Diabetes & Metabolism*, **30**, 294-309.
- [20] Yao, Y., Li, X.B., Zhao, W., Zeng, Y.Y., Shen, H., Xiang, H. and Xiao, H. (2010) Anti-Obesity Effect of an Isoflavone Fatty Acid Ester on Obese Mice Induced by High Fat Diet and Its Potential Mechanism. *Lipids in Health and Disease*, **9**, 49. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-9-49>
- [21] Misra, A. and Vikram, N. (2003) Clinical and Pathophysiological Consequences of Abdominal Adiposity and Abdominal Adipose Tissue Depots. *Nutrition*, **19**, 457-466.
- [22] Takemura, N., Okubo, T. and Sonoyama, K. (2010) *Lactobacillus Plantarum* Strain No. 14 Reduces Adipocyte Size in Mice Fed High-Fat Diet. *Experimental Biology and Medicine*, **235**, 849-856. <https://doi.org/10.1258/ebm.2010.009377>
- [23] Gomes, N.D., de, C.M.M., Soares, M.M., Dos, A.B.L., de, S.D.M., Machado, R.R.S. and Stampini, D.M.H. (2016) Ubá Mango Juices Intake Decreases Adiposity and Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obese Wistar Rats. *Nutrition*, **32**, 1011-1018.
- [24] Roch-Ramel, F., Werner, D. and Guisan, B. (1994) Urate Transport in Brush-Border Membrane of Human Kidney. *American Journal of Physiology*, **266**, F797-F805.

期刊投稿者将享受如下服务：

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：hjfn@hanspub.org