

第參章 研究方法

一、受試者

本實驗挑選 32 位無高血壓、心血管疾病且沒有服用任何抗氧化營養品之受試者，以招募的方式將受試者分配至控制組、運動組、吸菸組及吸菸加運動組共四組，每組人數各為 8 人。吸菸者的菸齡需達到至少一年，且每日香菸數量需達到至少 10 支；規律運動者需達到每週運動至少 3 次，每次至少 30 分鐘，持續至少半年。

每位受試者在實驗開始前需填寫受試者同意書（附錄二）、受試者基本資料及實驗相關調查表（附錄三）、受試者健康情況調查表（附錄四），且於實驗處理前需 48 小時內禁止激烈運動，血液收集前需至少 8 小時禁食；而吸菸者於血液收集前需至少 8 小時禁菸。

二、實驗設計

首先，受試者以跑步機進行單次遞增性運動至衰竭，測量其最大攝氧量（ $\dot{V}O_2\max$ ），以作為相對運動強度訂定的依據。間隔兩天之後，以跑步機實施 85% $\dot{V}O_2\max$ 的強度進行單次高強度運動至衰竭，並於運動前（安靜態）及運動後立即採血。所有受試者皆於早上 6 點至 12 點進行單次高強度運動。實驗設計流程與步驟，描述如下：

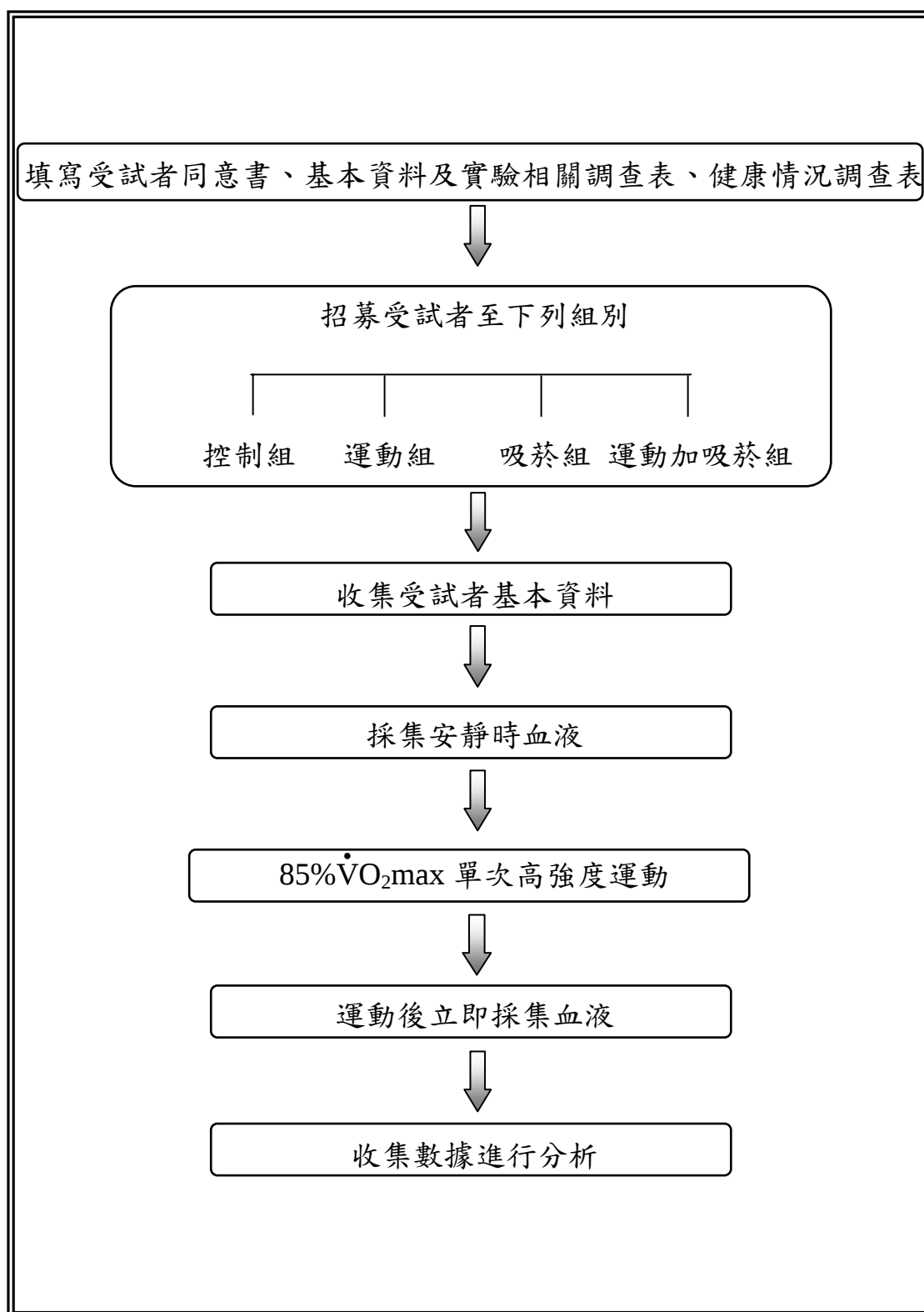
(一) 漸增負荷運動測試

遞增性運動測試開始的速度為 4 mile/hr 持續 5 分鐘，此後每 3 分鐘增加 1 mile/hr；當速度增加至 10 mile/hr 時，每階段改以增加坡度 2%，直到受試者衰竭（吳家慶，2005，頁 33）。

(二) 單次高強度運動採用 (Van Soeren & Graham, 1998) 的方法

受試者於原地跑步機上進行 85% $\dot{V}O_2\text{max}$ 的運動強度至衰竭，同時採集氣體作事後分析。

三、實驗流程圖



圖一 實驗流程圖

四、血液樣本分析

(一) 血清與血漿樣本製備：

於單次高強度運動前後各採集受試者橈靜脈的血液 21 ml，分別置於真空管與含有 EDTA 或 heparin 的抗凝劑試管，於 4°C 下以 4,000 g 離心 15 分鐘，將其上清液（血清或血漿）取出備用。

(二) 紅血球溶胞液 (erythrocyte lysate) 製備及血紅素移除法：

1. 將含有 EDTA 抗凝劑試管中的上清液完全取出後，移除紅血球上層之白血球，剩餘溶液為紅血球。先取 8 ml 的 HPLC-water (Sigma, USA) 置入離心管內，再加入 2 ml 的紅血球均勻混合，於 4°C 以 10,000 g 離心 15 分鐘後，取出上清液備用。
2. 萃取液 (Extraction Reagent)：ethanol / chloroform 的體積比為 62.5/37.5 (w/v)，並置於 2-8°C。
3. 取 400 μ l 的萃取液並加入 250 μ l 的紅血球溶胞液的樣本，並於震盪器上均勻混合 30 秒。
4. 於 4°C 下以 3,000 g 離心 5 分鐘，並取出上清液（於 24 小時內分析時，可放置於 2 - 8°C，否則需要冷凍）。

(三) 血紅蛋白 (hemoglobin, Hb) 分析

1. 在所有測量的分光比色管內加入 1000 μ l 的 hemoglobin reagent

(Instruchemie, Netherlands)。

2. 在 blank 的分光比色管中加入 2 μl 的 ddH_2O 。
3. 在 standard 的分光比色管中加入 2 μl 濃度為 10.3 mM 的 hemoglobin standard (Instruchemie, Netherlands)。
4. 在 sample 的分光比色管中，分別加入 2 μl 的紅血球溶胞液。
5. 將分光比色計 (Hitachi U-2000, Japan) 的波長設定 540 nm。
6. 先將 blank 置入分光比色計內歸零。
7. 分別置入 standard 與 sample 測量吸光值。
8. Hemoglobin 濃度換算：

sample 的吸光值/standard 的吸光值 $\times$ 10.3 (mM)或

sample 的吸光值 $\times$ 36.8 (g/dl)

(四) 乳酸分析

以血漿乳酸分析檢驗 85% $\dot{V}\text{O}_2\text{max}$ 強度單次高強度運動的效果(步驟請參見附錄五)。

(五) 氧化指標與抗氧化酶活性分析

受試者氧化指標分析項目包括血漿脂質過氧化物-硫巴比妥酸反應物質 (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) 及血漿氧化態低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, oxLDL)，而抗氧化酶活性分析項目則

包括紅血球溶胞液過氧化氫酶 (catalase, CAT)、麩胱甘肽過氧化酶 (glutathione peroxidase, GPx)、超氧離子歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性等 (步驟請參見附錄五)。

五、統計分析

本研究以 SPSS 13.0 套裝軟體系統進行各項資料統計分析，所有測量之數據皆以平均值 $\pm$ 標準誤表示，統計意義至少須為 $p < .05$ 。在考驗研究假設上所使用的統計方法有：

(一) 以配對 t 考驗 (paired t test) 檢定各組運動前及運動後乳酸濃度的差異。

(二) 以獨立樣本單因子變異數分析考驗各組運動前氧化傷害指標 TBARS、oxLDL 濃度及抗氧化酶 CAT、GPx、SOD 活性之差異。

(三) 採用獨立樣本雙因子 (運動 $\times$ 吸菸) 共變異數分析 (ANCOVA)，以各組運動前數據作為共變數，考驗運動後各組氧化傷害指標 TBARS、oxLDL 濃度及抗氧化酶 CAT、GPx、SOD 活性之差異。當主要效果達顯著，再以 Scheffe's 法進行事後比較。