

第參章 研究方法與步驟

第一節 研究程序

本研究程序步驟(如圖 3-1)所示：

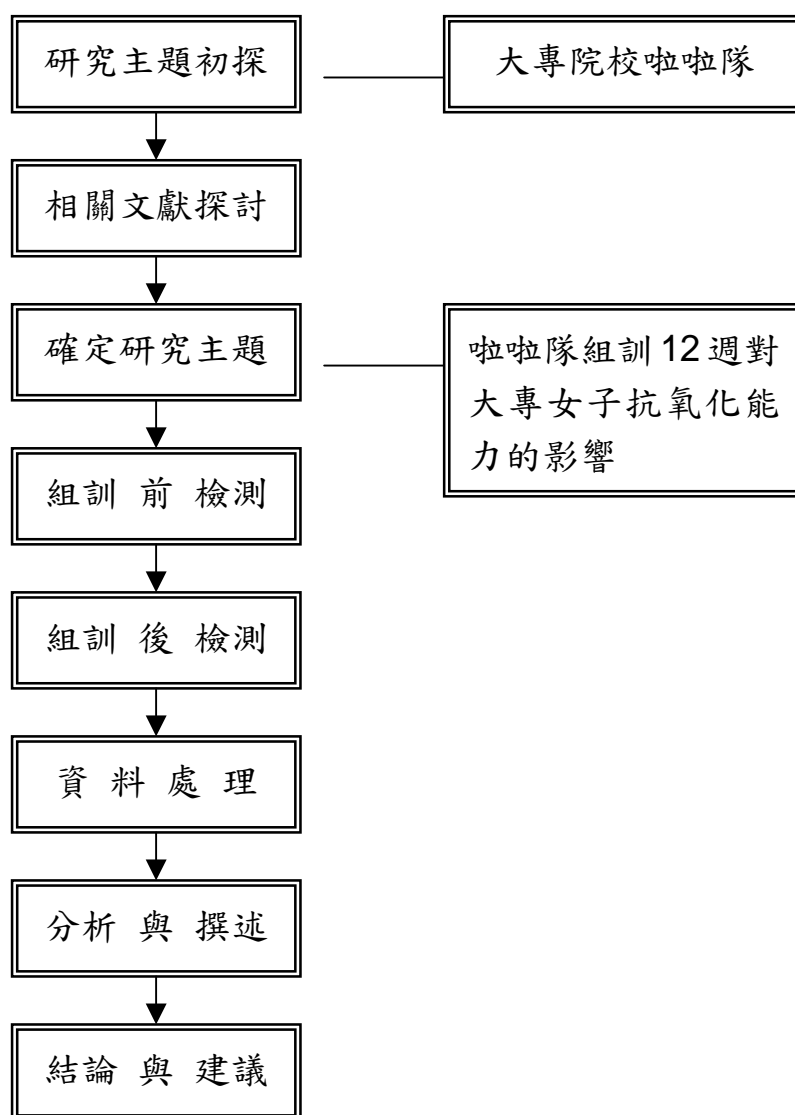


圖 3-1 本研究之流程圖

第二節 研究對象

本研究之對象以參加由教育部主辦，中華民國大專院校體育總會所承辦之「中華民國大專院校九十二學年度啦啦隊錦標賽」康寧醫護暨管理專科學校競技啦啦隊校隊運動員 18 名為研究對象，以一般同齡學生 14 人為對照組。實驗前，每位受試者均發給並填寫「受試者須知與實驗同意書」(如附錄一)以及「受試者健康狀況調查表」(如附錄二)，若發現受試者患有肩部、腰部、下背脊柱受傷疼痛、後腿肌肉拉傷等骨骼肌肉疾患，或懷孕之女生皆不適合接受此項測驗，則予刪除不參與本實驗。年齡、身高、體重等基本資料(如表 3-1)。

表 3-1、受試者基本資料統計表

組 別	年齡(歲)	身高(公分)	體重(公斤)
實驗組(n=18)	18.11±1.84	159.94±6.06	56.99±11.98
對照組(n=14)	18.93±1.21	160.21±5.27	55.29±3.07

第三節 實驗設計

本研究採用康寧醫護暨管理專科學校啦啦隊校隊運動員 18 人為實驗組，以一般同齡學生 14 人為對照組。採重複量數(identical subject repeated measures)之設計。對實驗組施以 12 週(每週三天)之啦啦隊集訓實驗，集訓前、後(分別於第一週及第十三週)，於安靜狀態下，由合格護士在彼等肘前靜脈抽血 10 ml，經正常處理程序後，送醫學檢驗所進行抗氧化值包括肌酸激酶(CK)、乳酸脫氫酶(LDH)、過氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽過氧化物酶(GPX)之檢測。於實驗完成後，刪除各組不完整的數據資料，取其正常完整的數據資料，進行統計分析比較。實驗變項：本研究以參加啦啦隊運動為自變

項(independent variables)，依變項(dependent variables)為集訓前、後採血之血液生化值。啦啦隊校隊運動的強度，皆以無線心跳紀錄器於整個實驗期間，各週抽取一天以隨機方式自 18 人中抽取 5(1/4)人，記錄組訓綜合練習隊形時九十分鐘心跳強度。

第四節 實驗控制

在實驗前一週，發給每一位受試者一份「受試者須知與實驗同意書」(如附錄一)，及「受試者健康情況調查表」(如附錄二)，並向受試者說明有關本研究的目的、過程及回答有關問題，同時要求受試者在同意書簽名，表示願意參加本研究實驗，然後再向受試者詳述測驗程序、方法及相關細節。在正式實驗期間，每次抽血時間之前禁食 8 小時，早上 08:00 請專業護士抽血，抽血針頭均使用拋棄式針頭。

受試者在實驗期間，必須遵守受試者須知之注意事項，此外需特別注意的事項包括實驗前一週，及實驗中不可熬夜、禁止喝酒及吸煙、咖啡、茶，保持日常飲食習慣。本研究受試者必須穿戴無線心跳紀錄器(Heart Rate Monitor)，監測其訓練運動強度，以確定全程是否達到中等強度以上的心肺耐力訓練效果。

第五節 啦啦隊組訓內容

實驗組每週組訓三天，分別於早、中、晚時間訓練，並以晚上啦啦隊綜合競賽隊形的 90 分鐘練習時段為運動強度監測值，每次訓練內容(如表 3-2)：

表 3-2、受試者接受 12 週組訓的時間與內容

每天訓練頻率	每天持續時間	訓練內容	總時數
早上	07：30 ? 08：00	1. 晨操熱身運動(10 分鐘) 2. 體適能訓練：含心肺耐力的慢跑、肌力、肌耐力、柔軟度等訓練(40 分鐘) 3. 意象訓練(10 分鐘)	1 小時
中午	12：15 ? 13：15	1. 口號訓練(10 分鐘) 2. 舞蹈訓練(30 分鐘) 3. 複習技巧(10 分鐘) 4. 基本動作(10 分鐘) 5. 檢討溝通(10 分鐘)	1 小時
晚上	18：00 ? 21：00	1. 技巧教學 Stunts(Pyramid、Basket Toss)(30 分鐘) 2. 跳躍教學 Jump(T 形跳躍、高踢、Toe-touch 等動作訓練)(30 分鐘) 3. 翻滾教學(側翻、側翻 1/4 內轉、後手翻、後空翻等動作訓練)(30 分鐘) 4. 綜合競賽隊形練習(90 分鐘運動強度的監測時段)	3 小時

第六節 檢測指標

實驗過程的抗氧化物檢測指標，是將啦啦隊員組訓前、後的血液取得後，立即逕送台北市聯合醫事檢驗所進行分析，並依下列的儀器設備、試劑等標準程序步驟進行分析，所得結果及標準範圍值符合研究的信、效度。

一、肌酸激酶(CK)的測定

(一) 測定儀器：

以美國製貝克曼廠 SYNCHRON CX-7 DELTA 全自動血液分析儀進行測定，儀器系統及原廠試劑為 Dedicated Reagent(試劑如化學反應方程式所述)。

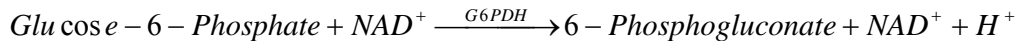
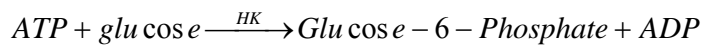
(二) 測定意義：

肌酸激酶與其同功酶的測量是用來診斷和治療心肌梗塞以及肌肉相關的疾病，例如進行性肌失養症(Duchenne)，是指肌肉營養失調。

(三) 測定方法：

肌酸激酶試劑測量肌酸激酶活性的方法，是酵素速率法(Enzymatic rate method)。在反應中，肌酸激酶催化磷酸群從肌酸激酶基質轉移到 ADP。接下來 ATP 的產生是經由己糖激酶(Hexokinase)與葡萄糖-6-磷酸去氫酶(G6PDH)催化而產生還原的 NADH，進而測量出來的。肌酸激酶分析包含活化劑單硫代甘油(monothioglycerol)。檢體與試劑的比例是 1：20。機器會自動偵測 340 nm 吸光度的改變，吸光度的改變直接與肌酸激酶的活性成正比。

(四) 化學反應方程式：



二、乳酸去氫酶(LDH)的測定

(一) 測定儀器：

以美國製貝克曼廠 SYNCHRON CX-7 DELTA 全自動血液分析儀進行測定，儀器系統及原廠試劑為 Dedicated Reagent(試劑如化學反應方程式所述)。

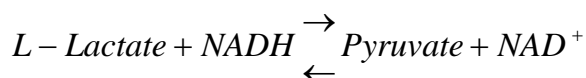
(二) 測定意義：

乳酸去氫酶的測量是用來診斷與治療肝疾病，例如急性病毒性肝炎，肝硬化及轉移性肝癌，心臟疾病(例如心肌梗塞)，肺臟或腎臟的腫瘤等。

(三) 測定方法：

乳酸去氫酶試劑用來測定其活性的原理是藉由酵素速率法。在此反應中，乳酸去氫酶會催化丙酮酸(Pyruvate)成 L-乳酸。此反應是可逆反應。在催化的同時，還原的 β -nicotinamide adenine dinucleotide hydrogenase (NADH) 會氧化成菸草醯胺 (β -nicotinamide adenine dinucleotide, NAD)。檢體與試劑的比例是 1：20。機器會自動偵測 340 nm 吸光度的改變，吸光度的改變直接與乳酸去氫酶的活性成正比。

(四) 化學反應方程式：



三、谷胱甘肽過氧化物酶(GPX)的測定

(一) 測定儀器：

儀器系統以日本製 HITACHI 廠 7070 分析儀進行測定，試劑為美國製 RANDOX 廠 RANSEL 的試藥組。

(二) 測定意義：

谷胱甘肽過氧化物酶是機體細胞(尤其是紅血球)一個重要的對抗氧化劑作用的防禦體系，它在細胞內能消除有害的氧化代謝產物，阻斷脂質過氧化連鎖反應，從而保護細胞膜結構和功能完整，缺乏時可致新生兒黃疸。

(三) 測定方法：

測定方法 1

試 劑	劑 量
麩胺基硫(Glutathione)	4 mmol/l
麩胺基硫的還原酵素 (Glutathione Reductase)	0.5 U/l
菸草醯胺、磷酸鹽、腺嘌呤及氫 (Nicotinamide Phosphate Adenine hydrogenase, NADPH)	0.34 mmol/l

附註：試劑需先前處理，將試劑與緩衝液 2 以等量體積混合，在 4℃ 可放兩天，而室溫下可放 8 小時。

測定方法 2

緩 衝 劑	劑 量
酸鹼緩衝液(Phosphate Buffer), pH 7.2	0.05 mol/l

附註：儲存於 4℃。

測定方法 3

呈色(Cumene)試劑	劑 量
氧化劑(Cumene Hydroperoxide)	0.18 mmol/l

附註：使用時須與等量的二次蒸餾水混合完全並激烈震盪，此溶液不易溶解完全。每次使用時均需當場配置。原溶液需保存於 4℃。

測定方法 4

稀釋液：

一瓶 4 號的稀釋原液與 200 毫升的二次蒸餾水混合均勻，可保存於 4℃ 達一個月。

測血色素的一種試劑(Drabkin)：

一瓶 Drabkin 試劑加入 480 毫升二次蒸餾水，儲存時需避光，在 4℃ 時可保存 6 個月。

(四) 實驗步驟：

1. 抽血時需以內含肝磷脂抗(heparin)凝血劑的綠頭管抽血。
2. 取 0.05 毫升的血液，加入 1 毫升的已配置好的稀釋液，並靜置 5 分鐘。
3. 加入 1 毫升已配置好的試劑，混合完全後 20 分鐘開始分析。
4. 將比色機(spectrophotometer)的波長設定於 340 nm，石英管取 1 公分長的為主。
5. 將待測物(血液檢體)取 0.05 毫升，加入試劑 2.5 毫升及加入 0.1 毫升呈色試劑於石英管中混合均勻。
6. 一分鐘後讀取第一次的吸光值，開始計時並讀取第二分鐘及第三分鐘的吸光值。
7. 空白試驗，將步驟 5 中的待測物以 0.05 毫升水取代之即可。
8. 計算公式：

$$U/I \text{ of 溶血液(Haemolysate)} = 8412 * \Delta A_{340} \text{ 波長/分鐘}$$

附註： Δ 代表兩個數據相扣。A 代表吸光度。

9. 參考範圍：除以血色素= 27.5-73.6 U/g Hb
未除以血色素= 4171-10881 U/l

四、超氧化物歧化酶(SOD)的測定

(一) 測定儀器：

儀器系統以日本製 HITACHI 廠 7070 分析儀進行測定，試劑為美國製 RANDOX 廠 RANSEL 的試藥組。

(二) 測定意義：

在需氧生物中普遍存在的一種酶。它能催化超氧化物陰離子自由基歧化反應而成為基態的氧分子和過氧化氫。SOD 屬於金屬酶，其性質不僅取決於蛋白質部分，而且還取決於結合到活性部位的金屬離子。

(三) 測定方法：

測定方法 1 (試劑的製備)

混合的受質	劑量
超氧化酶素(Xanthine)	0.05 mmol/l
I. N. T.	0.025 mmol/l

附註：一瓶加入 20 毫升的 CAPS 緩衝液，存於 4℃，可使用 10 天。

測定方法 2

緩衝液	劑量
CAPS, pH 10.2	40 mmol
保存劑(EDTA)	0.94 mmol/l

附註：存於 4℃。

測定方法 3

緩衝液	劑量
黃鹼氧化酶(Xanthine Oxidase)溶液	80 U/l

附註：一瓶加入 10 毫升的二次蒸餾水，存於 4℃，可使用 14 天。

測定方法 4

稀釋液	劑量
酸鹼緩衝液(Phosphate Buffer)，pH 7	0.01 mmol/l

(四) 標準溶液的製備：

1. 將一瓶標準液加入 10 毫升的二次蒸餾水。
2. 以逐步稀釋方式稀釋標準液，並畫出標準曲線，稀釋如下表。
3. 所有稀釋過的標準液，均儲存於 4℃，可使用 14 天。
4. 磷(S1)是為稀釋液。

	標準液的體積	稀釋液的體積	最後濃度
S6	未稀釋的標準液		5
S5	5 毫升的 S6	5 毫升	2.5
S4	5 毫升的 S5	5 毫升	1.25
S3	5 毫升的 S4	5 毫升	0.625
S2	3 毫升的 S3	6 毫升	0.208

附註：S 是代表標準物質(Standard)

(五) 實驗步驟：

1. 抽血時需以內含肝磷脂(heparin)抗凝血劑的綠頭管抽血。
2. 取 0.5 毫升全血以 3000 轉離心 10 分鐘後，倒除血漿。
3. 洗滌血球四次，每次以 0.9% 鹽(NaCl) 3 毫升洗，並每次以 3000 轉離心 10 分鐘後去除上清液。

4. 紅血球加入 2 毫升的冷二次蒸餾水，混合均勻後置 4 15 分鐘。
5. 將檢體混合液以稀釋液稀釋 25 倍。
6. 將比色機的波長設定於 505 波長(nm)，石英管取 1 公分長的為主。
7. 分別將 S1~S6 標準液取 0.05 毫升，加入混合的受質 1.7 毫升混合均勻後，加入 0.25 毫升的黃鹼氧化酶(Xanthine Oxidase)溶液於石英管中並混合均勻。
8. 也分別將待測物(稀釋過的血液檢體)取 0.05 毫升，加入混合的受質 1.7 毫升混合均勻後，加入 0.25 毫升的黃鹼氧化酶溶液於石英管中並混合均勻。
9. 30 秒後讀取第一次的吸光值，開始計時並讀取第三分鐘的吸光值。
10. 計算濃度。

五、丙二醛(MDA)的測定

(一) 測定儀器：

儀器系統以日本製 SHIMADZU 廠 CL-770 比色機 (SPECTROPHOTOMETER)進行測定，利用呈色法讀取吸光值。

(二) 測定意義：

MDA 是體內含量最多的脂質過氧化物，係源自細胞膜遭破壞時，心血管方面的疾病及 DNA 遭破壞的遺跡，為一重要之氧化性傷害的指標。

(三) 測定方法：

1. 採血前不需空腹，無收集時間限制。

2. 全血及抗凝固劑量為 2.0 mL。
3. 避免使用溶血和混濁的檢體。

(四) 控制狀態：

1. 離心血液(3000 轉、五分鐘)將血漿分出。
2. 檢體若 48 小時內未檢驗分析，需-70 冰凍保存，可存放一個月；經冷凍的血清，使用前需混合均勻再離心檢驗。

(五) 實驗設備與材料：

1. 高速離心機(High Speed Centrifuge)。
2. 水浴(Water bath)100 。
3. 血液振動儀(Vortex mixer)。
4. 玻璃試管(Glass test tubes)。
5. 2ml 含蓋子的塑膠試管(Eppendorf tubes)。
6. 巴比士酸(Thiobarbituric acid, TBA, 120 mM)。
7. 20 %三氯醋酸(Trichloroacetic Acid, TCA 在 0.6 mol/L 鹽酸)。
8. 乙醇(Ethanol)。
9. 蒸餾水(Distilled water)。

(六) 試劑的製作方法：

1. 巴比士酸(Thiobarbituric acid, TBA, 120 mM)：1.729 g TBA /100 mL 蒸餾水。
2. 20%三氯醋酸(TCA 在 0.6 mol/L 鹽酸)：20 g TCA / 95 mL 蒸餾水+5 mL 12 鹽酸。
3. 標準物質：1,1,3,3-試劑(Tetraethoxypropane)、型號 T9889，廠牌為 Sigma。
吸釋 10 uL 試劑+ 4 mL 乙醇(1000 uM) → 10 uL + 5 mL

蒸餾水(20 uM)。

4. 品管物質：可以收集 2 個組別(正常人及洗腎病人)血清或血漿各 30-50ml 混合均勻，離心 5000 轉 10 分鐘，分裝 750ul 到 2ml 含蓋子的塑膠試管，保存-85 。
5. 參數表現：每 20 支檢體為一批，前面 1 組標準物質，20 支前後必須帶 1 組品管(正常人及洗腎病人)，各一支 0.5 及 1.0uM 標準物質。
6. 儲存時間：試劑，儲存於室溫 3 個月。品管物質，儲存於室溫-70 3 個月。

(七) 校正標準物質：

1. 使用自己配製的標準物質，現泡，每一次泡 2 組。從 20 uM 配製不同濃度 0.5，1.0，2.0，3.0，4.0 uM(用蒸餾水稀釋)。
2. 校對過程：每一批樣本必須用自配的標準物質及品管物質的數據去校正樣本的結果。
3. 品管物質：正常組及洗腎組，以品管物質的結果比較。

(八) 測試過程：

1. 將啦啦隊員血漿檢體，品管物值從-70 移到 4 解凍。
2. 準備 2 ml 含蓋子的塑膠試管，編上號碼，加入下列：

	標準物質	病人血漿
樣本	750 uL (0.75 mL)	750 uL (0.75 mL)
20%試劑	750 uL (0.75 mL)	750 uL (0.75 mL)

3. 因當加入 20%試劑(TCA)，血漿檢體很快凝固所以必須注意一次只能加 4 支而馬上混合均勻。
4. 去蛋白(Deproteinizing)步驟：
 - (1) 保溫 4 20 分鐘。

- (2) 離心 11000 轉/15 分鐘。
 - (3) 準備新玻璃試管。
 - (4) 取 1 ml 離好的上清液到編好號碼的玻璃試管。
 - (5) 各加 200 ul 巴比士酸，混合均勻。
 - (6) 放進水浴 100 °C，30 分鐘。
 - (7) 冷卻後，15–30 分鐘內比色，535 及 580 波長。
5. 計算方式：樣本結果(uM)

$$= \frac{\text{啦啦隊員的樣本}(535 - 580 \text{ 波長})\text{吸光度}}{\text{標準物質 } 1.0 \text{ uM}(535 - 580 \text{ 波長})\text{吸光度}} \times 1.0$$

(九) 結果報告：

1. MDA 範圍值 $0.39 \pm 0.15 \text{ uM}$ 。
2. 結果異常的處理：
 - (1) 特別高或低必須重作。
 - (2) 試劑容易產生結晶，可泡在熱水協助溶解結晶。
3. MDA 濃度結果單位：uM 至小數第二位。

第七節 資料處理

- (一) 所有數據皆以 IBM/PC 與 SPSS 10.0 版統計套裝軟體處理，結果採用 $M \pm SD$ 表示。
- (二) 各指標在組訓前、後各組的組內差異以相依樣本 t-test 分析。
- (三) 顯著水準定為百分之五 ($\alpha = 0.05$)。