

## 第五章 討論與結論

本研究主要分成實驗一和實驗二兩部分，將兩實驗各研究結果整理比較於表 5-1。本實驗所使用的 apoE 剔除小鼠，由於 apoE 基因缺陷，無法清除引起動脈硬化的大分子脂蛋白，故隨年齡增加，則會有動脈硬化發展，本研究實驗一將實驗動物分成 6 組，分別餵予一般商業飼料(n=5)、20%高脂飼料(n=10)、20%高脂飼料含 5%山苦瓜凍乾粉末(n=10)、或含 1%山苦瓜乙酸乙酯萃取物(n=10)、或含 0.5%clofibrate 藥物(n=5)、或含 0.00123%TZD 藥物 (n=5)，從 18 週大開始餵食 18 週。由於只有在胸主動脈切片看到山苦瓜乙酸乙酯萃物具有預期的效果，在發炎和山苦瓜凍乾粉末方面之效果並不如預期，而此 apoE 剔除小鼠，在十週大已有脂肪條的形成，在 15 週大，可觀察到泡沫細胞、平滑肌增生情形的中期損傷，20 週則有纖維斑塊形成(Meir & Leitersdorf, 2004; Nakashima et al., 1994)，因此推測實驗一從老鼠 18 週大才開始給予實驗飼料，再餵 18 週，可能老鼠年紀太大，會影響了山苦瓜抗發炎和動脈硬化的效果，才使得其他研究結果各組無顯著差異，故再次以較小的 apoE 剔除小鼠再進行一次實驗。實驗二將實驗動物分成 3 組，分別餵予 20%高脂飼料(n=10)、20%高脂飼料含 5%山苦瓜凍乾粉末(n=10)、或含 1%山苦瓜乙酸乙酯萃取物(n=10)，從 6-10 週大給予實驗飼料 8 週。

實驗一分析了主動脈竇、主動脈竇後、胸主動脈三處的血管 Intima/Media area ratio，但主動脈處只有高脂組顯著高於 chow diet 組、主動脈竇後處 chow diet 顯著低於高脂苦瓜組，胸主動脈處則是高脂 clofibrate 顯著高於 chow diet、高脂 EA、高脂苦瓜，且高脂 EA 顯著低於高脂組，前兩位置處結果各組比較差異不大，但分析 3 處切片結果的相

關性，發現主動脈竇與主動脈竇後處、胸主動脈處皆呈正相關( $p < 0.05$ )，有一致性，顯示高脂 EA 真的有顯著低於高脂的傾向。因此從實驗一的主動脈血管切片和實驗二的縱切主動脈脂肪堆積染色結果可以發現，高脂 EA 組胸主動脈 Intima/Media area ratio 顯著比高脂組低了 57%，主動脈脂肪堆積顯著比高脂組低了 28%，顯示高脂山苦瓜乙酸乙酯萃取物具有降低動脈硬化的效果，但高脂山苦瓜凍乾粉末組則未看到此好處。本研究實驗二高脂對照組血管縱切損傷面積為  $11.51 \pm 1.26\%$ ，脂肪堆積程度與其他研究結果類似，如在研究 ViteE 對動脈硬化影響的實驗，餵食 apoE 剔除小鼠一般飲食，14 週大飲食未添加 ViteE 之對照組，其動脈弓和胸主動脈的血管縱切損傷面積為  $15.2 \pm 4.6\%$ ；另一個研究綠茶兒茶素對動脈硬化影響的實驗，從 apoE 剔除小鼠 7 週大餵予高脂高膽固醇飲食(0.15%膽固醇，21%脂質)，小鼠 28 週大在其頸動脈置入血管周圍頸圈 (nonocclusive periadventitial collar)，由此注入實驗材料，34 週大只注射 PBS 之對照組，其降主動脈與腹動脈血管縱切損傷面積為  $19 \pm 12\%$ 。

進一步探討本實驗山苦瓜凍乾粉末無法改善動脈硬化的原因，實驗一先以 Ain76 粉末調整玉米澱粉與蔗糖 1:1 餵養了 7 週的適應期，在正式實驗飼料開始餵食之初，可能由於苦瓜粉末的苦味，使的高脂苦瓜組攝食量明顯降低，但隨著時間的增加，高脂苦瓜組的攝食量也隨之增加；實驗二只以 MF18 餵食適應一週，即給予實驗飼料，高脂苦瓜組攝食量並無明顯較低，故攝食情形應該不是影響山苦瓜凍乾粉末無顯著效果的原因。添加 5% 山苦瓜凍乾粉末和 1% 山苦瓜乙酸乙酯萃物參考自趙氏(趙哲毅, 2003)給予正常 C57BL/6J 小鼠 5% 山苦瓜榨汁殘渣凍乾粉末和每日每公斤體重 1g 乙酸乙酯萃取物，本實驗給予 1% 山苦瓜乙酸乙酯，以山苦瓜乙酸

乙酯萃取物萃取率 5% 換算相當為 20% 山苦瓜凍乾粉末，因此高脂苦瓜組的有效成分可能只有高脂 EA 組的 1/4，故可能可解釋山苦瓜凍乾粉末在本實驗中並無顯著功效之因。

實驗一給予降血糖藥物 TZD(rosiglitazone)和 Clofibrate 當作正對照，但在各項結果顯示並無功效。有研究以 8-10 週大的母 C57BL/6J apoE 剔除小鼠為實驗對象，從頸動脈損傷前一週開始餵食高脂和 10mg/kg rosiglitazone 至頸動脈損傷後 4 週，比只餵予高脂的組別，新生內皮(neointima) 低了 65%(Phillips *et al.*, 2003)；另一研究以 8 週大的公 C57BL/6J apoE 剔除小鼠為實驗對象，以一般 chow diet 餵養，先將老鼠分成 4 組，2 組誘發成糖尿病，另兩組不誘發，選取一組糖尿病、一組非糖尿病組別將 20 mg/kg wt 的 rosiglitazone 添加在飲水中，結果顯示，無論有無糖尿病，給予 rosiglitazone 治療的組別其主動脈竇處斑塊面積皆顯著低於無治療組(Levi *et al.*, 2003)。本研究添加 0.00123% TZD 藥物是依照人類劑量 0.133mg/kg 換算成小鼠劑量 1.64mg/kg，再以 30g 體重小鼠每日約攝取 4g 飼料推得 0.00123%，但與前面提及的兩個研究分別所用的劑量 10mg/kg、20 mg/kg 相比，本研究給予的藥物劑量 1.64mg/kg 低了許多，因此本實驗給予 rosiglitazone 藥物的高脂 TZD 組對於動脈硬化無影響可能是劑量不足所致。

添加 0.5% clofibrate 藥物劑量參考趙氏(趙哲毅, 2003)餵食 Wistar 大鼠 Ain76 配方飼料並添加 0.5% clofibrate 2 週後，較未添加 clofibrate 組可顯著降低血漿 TG、TC、非酯化游離脂肪酸和肝臟 TG、TC，並增加肝臟過氧化體 Acyl-CoA oxidase (ACO) 活性、誘發肝臟 PPAR $\alpha$ 、CYP4A1、ACO、L-FABP mRNA 之表現。由於本研究使用的 Clofibrate 為實驗用

(Fluka)，而非一般食用的藥品，實驗用和一般食用藥品劑型可能略有不同，推測此可能為造成本實驗 Clofibrate 無效的原因。實驗一在相對於體重的重量百分比方面高脂 Clofibrate 的肝臟顯著高於高脂組；在趙氏的研究結果也顯示餵食 0.5% clofibrate 的 Wistar 大鼠肝臟相對重量也顯著高於未添加 clofibrate 組；另外謝氏(謝婉郁, 2005)以 30% 高脂誘發 C57BL/6J 雄性小鼠糖尿病後，餵食 11 週 30% 高脂飼料和 0.5% clofibrate 的小鼠其犧牲時的相對肝臟重量也顯著高於只給予 30% 高脂飼料的高脂組，顯示 0.5% clofibrate 對肝臟可能具有毒性或副作用。

本研究最初的實驗設計推測由於山苦瓜乙酸乙酯萃取物可活化 PPAR  $\gamma$  和 PPAR  $\alpha$ ，因此可能藉由 PPAR  $\gamma$  和 PPAR  $\alpha$  影響發炎反應，進而降低動脈硬化，故測量了血清的發炎因子和黏著分子，將其結果討論如下。

在血清發炎因子方面，實驗一分析了血清 IL-1  $\beta$ 、IL-6、TNF  $\alpha$  的濃度，各組皆無顯著差異，細胞激素主要參與發炎細胞(如單核球、巨噬細胞、淋巴球、嗜中性白血球)和血管細胞(如內皮細胞、血管平滑肌細胞)複雜的交互作用，細胞激素主要可以分成促發炎和抗發炎兩大類，而 IL-1  $\beta$ 、IL-6、TNF  $\alpha$  皆為促發炎的細胞激素，實驗一血清發炎因子濃度無顯著差異，可能受到開始餵食實驗飼料時間太晚影響，但實驗二分析的血清 IL-6、TNF  $\alpha$  的濃度仍無顯著差異，推測山苦瓜乙酸乙酯降低動脈硬化的效果可能不是藉由抑制促發炎的細胞激素，但是否會藉由增加與促發炎反應相反的抗發炎細胞激素，例如：TGF- $\beta$ 、IL-4、IL-10 則待進一步的研究。

在血清黏著分子方面，實驗一分析了血清 ICAM-1 和 VCAM-1 的濃度，結果顯示，高脂苦瓜組 ICAM-1 顯著高於 chow diet 組，其餘各組無顯著

差異；VCAM-1 各組皆無顯著差異。細胞黏著分子在動脈硬化過程中扮演了重要的角色，主要參與白血球黏著在內皮細胞、並轉移至動脈壁的過程；細胞表面的黏著分子會脫落在血液中循環，此為可溶性形式的黏著分子，有許多研究探討血液中黏著分子與動脈硬化、心血管疾病危險因子的關係，例如：血膽固醇、糖尿病、肥胖等(Hope & Meredith, 2003b)，結果卻很少有一致性。本研究將 ICAM-1、VCAM-1 與血管切片分析相關性，並無相關，因此血清黏著分子在此扮演的角色仍不清楚。實驗二分析白血球上 Mac-1 (CD11b/CD18)各組皆無顯著差異，Mac-1 屬於黏著分子中整合素家族之一，整合素與細胞與細胞間、細胞與細胞外基質的黏附有關，可與免疫球蛋白超級家族（如 ICAM-1、VCAM-1）、基質間的大分子（如纖維結合蛋白 fibronectin、纖維蛋白原 fibrinogen）結合(Petruzzelli et al., 1999; Price & Loscalzo, 1999)，Mac-1 其主要功能為與 ICAM-1 結合，分佈於單核球和顆粒球上；有研究以易產生動脈硬化的 C57/BL6J LDL-R<sup>-/-</sup> 將其骨髓經 X 光照射再經骨髓移植產生 CD11b<sup>-/-</sup>和 CD11b<sup>+/+</sup>，使 CD11b<sup>-/-</sup>小鼠血液中 CD11b < 2%，CD11b<sup>+/+</sup>小鼠血液中 CD11b 仍在正常值 25% 左右，給予 CD11b<sup>-/-</sup>和 CD11b<sup>+/+</sup> C57/BL6J LDL-R<sup>-/-</sup>小鼠 16 週高膽固醇飲食，分析主動脈損傷面積結果發現兩組並無顯著差異，由此結果推測白血球 CD11b 的表現對於小鼠動脈硬化的發展不是必須的(Kubo *et al.*, 2000)，因此山苦瓜乙酸乙酯萃取物改善動脈硬化的功效可能不是透過 Mac-1 的表現。

在犧牲器官重方面，實驗二在相對於體重的重量百分比方面，高脂苦瓜組的脾臟顯著高於高脂與高脂 EA 組，有文獻指出存在於苦瓜種籽的 Lectin（為一種醣蛋白）可造成血球凝集(Ng *et al.*, 1986)；苦瓜種籽

中的另一個成分 Vicine (為一種糖苷化合物) 會造成溶血(Basch et al., 2003; Dutta & Chakravarty, 1981), 可能因此造成高脂苦瓜凍乾粉末組脾臟腫大, 但由於這些化合物在有機溶劑中溶解度可能不高, 因此沒有在高脂 EA 組裡觀察到此現象。

在血清 isoprostanes 方面, 經過 8 週的實驗期的 apoE 剔除小鼠, 高脂、高脂苦瓜、高脂 EA 組血清 8-iso-Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  皆無顯著差異; 在紅酒多酚的研究中(Waddington et al., 2004), 給予 apoE 剔除小鼠高脂高膽固醇飲食與去酒精的紅酒 26 週, 發現給予紅酒的組別其動脈損傷面積, 顯著低於無給予紅酒組, 其測量血漿和主動脈中 F2-isoprostane、主動脈的 15-HETE、HETEs, 組間皆無顯著差異, 推測紅酒多酚抑制動脈硬化與影響脂質過氧化無關; 因此推測本研究山苦瓜 EA 萃取物抑制動脈硬化效果可能也與脂質過氧化無關, 但由於本研究與脂質過氧化相關的項目只有 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ , 仍待進一步研究確定。

根據兩個實驗的結果顯示, 山苦瓜乙酸乙酯萃取物具有降低動脈硬化的功效, 但從促發炎細胞激素 (IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF $\alpha$ )、黏著分子 (白血球 CD11b/18)、與脂質過氧化有關的 isoprostane 方面的分析皆無明顯差異, 推測山苦瓜乙酸乙酯萃取物降低動脈硬化的效果不是透過這些因素。林氏的研究發現山苦瓜乙酸乙酯萃取物可抑制前列腺素  $E_2$  (PGE $_2$ ) 合成(林弼玉, 2003), 前列腺素  $E_2$  具有使血管舒張和增加血管通透性等功能, 故為一重要的促發炎因子, 而環氧酶(cyclooxygenase, COX)為花生四稀酸 (Arachidonic acid, AA) 合成前列腺素的關鍵酵素, 其可分為 COX-1 和 COX-2 兩型, COX-1 為結構性酵素(constitutive enzyme), 廣泛恆定存在各器官及組織中, 負責調控一般生理功能; COX-2 則為誘發表現性酵素

(inducible enzyme)，在正常的生理狀況下並不表現，但會受到細胞激素 (TNF- $\alpha$ 、IL-1)、LPS (lipopolysaccharide)、生長因子等刺激，而在內皮細胞、平滑肌細胞、單核細胞和纖維母細胞大量表現(Chen *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 1992)，並可藉由促進細胞激素 (如 IL-6) 的生成增加發炎作用，在發炎反應過程中扮演了重要的角色。

另外苦瓜種籽油中含有 60%  $\alpha$ -桐酸( $\alpha$ -eleostearic acid,  $\alpha$ -ESA)， $\alpha$ -桐酸為共軛次亞麻油酸(conjugated linolenic acids, CLN)之一，餵食大鼠 4 週包含 1%  $\alpha$ -桐酸的飲食可轉變成共軛亞麻油酸(conjugated linoleic acid, CLA) (Tsuzuki *et al.*, 2003)，有研究餵食 apoE 剔除小鼠 9-cis, 11trans CLA 較未添加組別可顯著減緩動脈硬化的發展(Toomey *et al.*, 2003)，莊氏分析一公斤山苦瓜凍乾粉末含有 6 克的 9c, 11t, 13t- CLN(莊佳穎, 2004)，故推測 CLN 可能為山苦瓜乙酸乙酯萃取物達到減少動脈硬化的有效成分之一。而 CLA 為 COX 的抑制劑，因此苦瓜乙酸乙酯萃取物或許可藉由抑制 COX-2 的表現，改善動脈硬化，但是 Toomey 等人餵食 apoE 剔除小鼠 9-cis, 11trans CLA 並不能降低尿中前列腺素濃度，認為 CLA 對於動脈硬化的影響與抑制 COX 無關，而是可能藉由活化 PPAR- $\gamma$  來調控(Toomey *et al.*, 2003)，因此苦瓜乙酸乙酯萃取物到底是藉由 COX-2 還是 PPAR 的影響仍須進一步研究確定。

## 總結

本研究結果顯示，早期（6-10 週大）或晚期（18 週大）餵食 apoE 剔除小鼠 20% 高脂並添加 1% 山苦瓜乙酸乙酯萃取物飼料，其主動脈脂肪堆積和胸主動脈 Intima/Media area ratio 分別較只給予 20% 高脂飼料顯著低了 28% 和 57%，顯示山苦瓜乙酸乙酯萃取物具有改善動脈硬化的功效。但探討其改善動脈硬化透過的機制，從促發炎細胞激素（IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF $\alpha$ ）、黏著分子（白血球 CD11b/18）、與脂質過氧化有關的 isoprostane 方面的分析皆無明顯差異，而林氏的研究發現山苦瓜乙酸乙酯萃取物可抑制前列腺素 E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 合成(林弼玉, 2003)，前列腺素 E<sub>2</sub> 為一重要的促發炎因子，山苦瓜乙酸乙酯萃取物是否可藉由抑制 COX-2 的表現，改善動脈硬化，仍待進一步研究。



表 5-1 兩次實驗結果整理比較

	實驗一	實驗二
餵食劑量	20%高脂+5%山苦瓜凍乾粉末 20%高脂+1%山苦瓜乙酸乙酯萃物	20%高脂+5%山苦瓜凍乾粉末 20%高脂+1%山苦瓜乙酸乙酯萃物
開始實驗年齡	18 週大	10 週(15 隻)、9 週(7 隻)、6 週(11 隻)大
餵食週數	18 週	8 週
體重變化	高脂苦瓜組在實驗 2.3.4.5.6.7.11 週顯著低於其他或某些組，13 週後無顯著差異	高脂苦瓜組從第二週開始體重顯著低於高脂、高脂 EA 組
攝食量	高脂 EA 最高，高脂苦瓜組最低	高脂苦瓜組最高，高脂組最低
攝食效應	高脂 EA 最高，Clofibrate 組最低	高脂組最高，高脂苦瓜組最低
犧牲器官重	絕對與相對副睪脂高脂 EA 顯著高於 chow diet 組 絕對肝重高脂 Clofibrate 顯著高於高脂組	絕對腎重高脂苦瓜組顯著低於高脂與高脂 EA 組 相對脾高脂苦瓜顯著高於高脂與高脂 EA 組
血清發炎因子	IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF $\alpha$ 皆無顯著差異	IL-6、TNF $\alpha$ 皆無顯著差異
血清黏著分子	ICAM-1 高脂苦瓜顯著高於 chow diet，VCAM-1 無差異	無測量
白血球上	無測量	各組無顯著差異
CD11b/CD18 表現		
血清 8-iso-PGF <sup>2<math>\alpha</math></sup>	無測量	各組無顯著差異
血管分析	主動脈竇切片高脂顯著高於 chow diet 胸主動脈切片高脂 EA 顯著低於高脂組	縱切高脂 EA 顯著低於高脂與高脂苦瓜組