第三章　材料與研究方法

第一節　研究對象

於北市台安醫院與師大校園附近招募較年輕(46-60)的健康停經婦女共 90 人。受試者必需符合非素食者、停經一年以上、FSH（濾泡刺激素）大於等於 40 mIU/ml、近一年內沒有使用任何賀爾蒙治療、無服用植物性雌激素有關的健康食品、卵巢與子宮未摘除。無慢性疾病或必須長期服藥的疾病，例如：糖尿病、心臟病 、嚴重高血壓、腎臟病、甲狀腺功能異常以及乳房相關疾病，同時沒有服用抗生素或骨質疏鬆類固醇等藥物。

於醫院門診時間徵求同意參加實驗之受試者,並採訪談及問卷調查(附錄一)，進行初步篩選，有意願且條件合格者始能進行抽血測其 FSH（濾泡刺激素),FSH 大於 40 mIU/ml 者可確定停經並始可參加。問卷調查內容包括個人資料、個人飲食狀況、營養補充品使用狀況（附錄二)、更年期症狀（附錄三）與健康狀態等項目，篩選出飲食狀況良好及無上述疾病且符合參加本研究各項條件之健康受試者。在實驗進行前，單獨對受試者詳細解說實驗目的、實驗流程、實驗安全性，並一一解答每位受試者的問題，以減少受試者服用 isoflavone 的疑慮，最後並取得同意書（附錄四)。每次血液與尿液樣本收集以電話或書面（附錄五）提醒受試者日期和注意事項，確定所收尿液為早晨第一次尿液並以低溫（4℃）保存。

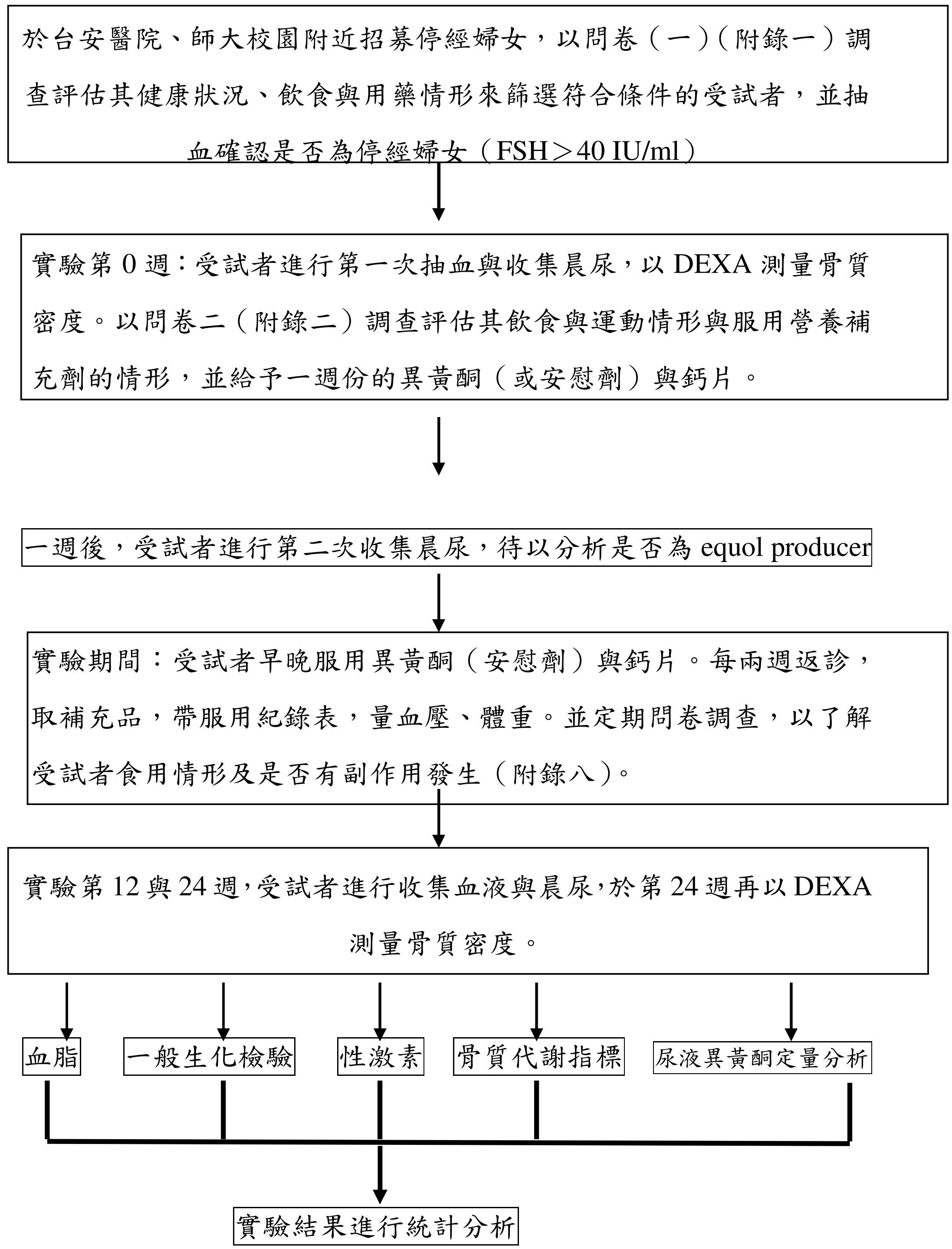
第二節　研究設計

本研究採隨機、單盲、對照組控制的並行試驗設計，因停經婦女骨質會隨時間而降低，故本研究較不適宜交叉設計，有安慰劑當對照以排除生活改變及心理因素對測量項目所造成的影響。招募 90 位以隨機分為實驗組與對照組，實驗組 60 人對照組 30 人，每天早晚空腹各服用 60 mg 黃豆異黃酮（120mg/d）與鈣 560 mg/d，對照組服用安慰劑（無糖麵茶）與同量鈣，實驗為期六個月。在受試者服用一星期後先收集一次尿液樣本分析 equol ，再依能否產生 equol，再將實驗組區分為 equol producers 與 non-equol producers 兩組，所有受試者於試驗開始前（baseline）、三個月後、六個月後收集血液與尿液樣本，另外於試驗開始前與第六個月後以 DEXA 作骨質密度檢測。.研究計畫流程圖見圖 3-1。

實驗進行六個月，每兩週返診，取補充品，帶服用紀錄表，量血壓、體重、臨床期間經常以電話與受試者聯繫並詢問服用情形。參與計畫的期間，告知受試者需維持正常的飲食習慣以及作息，避免攝食黃豆類製品，並於試驗期間不可服用其他荷爾蒙產品與鈣片。在試驗期間，體重如有變化需作飲食指導，並定期作 24 小時飲食回憶以了解受試者的飲食習慣以及飲食攝取量。

。

圖 3-1.研究計畫流程圖


於台安醫院、師大校園附近招募停經婦女，以問卷（一）（附錄一）調查評估其健康狀況、飲食與用藥情形來篩選符合條件的受試者，並抽血確認是否為停經婦女（FSH＞40 IU/ml）
實驗第 0 週：受試者進行第一次抽血與收集晨尿，以 DEXA 測量骨質密度。以問卷二（附錄二）調查評估其飲食與運動情形與服用營養補充劑的情形，並給予一週份的異黃酮（或安慰劑）與鈣片。
一週後，受試者進行第二次收集晨尿，待以分析是否為 equol producer
實驗期間：受試者早晚服用異黃酮（安慰劑）與鈣片。每兩週返診，取補充品，帶服用紀錄表，量血壓、體重。並定期問卷調查，以了解受試者食用情形及是否有副作用發生（附錄八）。
實驗第 12 與 24 週，受試者進行收集血液與晨尿，於第 24 週再以 DEXA 測量骨質密度。
血脂
一般生化檢驗
性激素
骨質代謝指標
尿液異黃酮定量分析
實驗結果進行統計分析

第三節 實驗材料與藥品

（一） 實驗材料

（1）Isoflavone：SOYGERM

比利時 Acatris Belgium 公司製造，台灣永保健康事業股份有限公司進口衛生署進口字號 86009084。SOYGERM 自黃豆胚軸萃取提煉，每 g 補充劑含 daidzein 10.9 mg 、genistein 2.85mg、glycitein 8.75 mg。每次服用 3 公克含 60mg 的 isoflavone。詳細營養組成分析請見（附錄九）。

（2）安慰劑：無糖麵茶

（3）牛乳鈣片：澳洲 PROBIOTEC 公司製造 台灣永保健康事業股份有限公司進口衛生署進口字號 86009084。牛乳鈣自鮮乳提煉而成的乳清鈣。每一粒牛乳鈣 500 mg 含 140 mg（Ca^{++}），維他命 D_3 100 IU。

食用方式

異黃酮（安慰劑）與鈣片食用方式，皆請受試者於早上空腹、晚上睡前各服用一包與鈣片兩顆。如於空腹食用鈣片會使胃部產生不適者，可將鈣片挪於飯後食用。請受試者可將異黃酮（安慰劑）與溫（冷）水一同服用，亦可放於飲料內攪拌後一同服用

（二）實驗儀器

(1)離心機(Centrifuge)

離心機：Herolab Microcen 13

(2)分光光度計(Spectrophotometer)：Spectromic Genesys 5、Spectromic 1001

(3)乾浴加熱器(Dry Bath Heater)：Boekel，Model:110001

(4)恆溫水浴槽(Water Bath)：RECIPRO Shaker Bath BT-15

(5)酸鹼值測定器(PH Meter)：Sciendustry Model：A-300

(6)震盪混勻器(Vortex-Mixtor)：Vm-2000

(7)電動天秤(Electric Scale)：A&D FX-300，Mettler AB104

(8)生化免疫分析儀(ELISA Reader)

(9)定量吸管(Pipette) ：Gilson，Nichiryo

(10)八爪定量吸管(Multi-channel Pipette)：Gilson

(11)免疫分析盤洗濯機(Microplate Strip Washer)：ELP-40

(12)控溫器(Thermostat)：NEWLAB KD-2

（三）分析用試藥

1. EDTA，Acetate：日本和光純藥株式會社。

2. Genistein，Daidzein，Flavone，Butyrophone，Sulfatase，Equol，β-glucuronidase：美國 Sigma 公司

3. Osteocalcin ：美國 Diagnostic Products Corporation 公司

4. CTX：美國 Nordic Bioscience Diagnostics 公司

5. Dexopyridinoline ： 美國 QUIDEL 公司

6 SHBG：德國 Immuno –Biological Laboratories 公司

第四節 樣品收集與處理

（一）血液收集

每次收集血液、尿液樣本前以電話或當面提醒日期和注意事項。血液樣本為禁食 12 小時以上之空腹血，受試者在抽血前一天晚上 10 點過後至隔天早上抽血前需禁食，除開水外禁止食用任何飲料或食物。抽取 25~30ml 之上臂靜脈血液,分別收集於一管含有 EDTA (Ethylenediaminetetra-acetic acid)的真空管（紫管），及兩管不含抗凝血劑之真空管（黃管），每管約收集 5~10ml 的血液，在分裝前皆保存於碎冰中，所收集到的血液樣本，以 3000rpm、15 分鐘、4℃的低速條件下分離血漿、血清與血球。離心完畢後取出上層血漿或血清分裝，儲存於-70℃直到分析。

（二）尿液收集

尿液樣本為抽血當天早上第一次尿液（晨尿），裝於事先準備好內含 10mg 硼酸粉末的 15ml 塑膠管中，共收集兩管，並置於含冰塊的夾鍊袋中以維持低溫，避免尿液中物質變性而影響測量結果之準確性。受試者須於在家中收集好後，於抽血時交出。收集到的尿液同樣以 3000 rpm、15 min、4℃的條件離心，使沉澱物分離，取出澄清部分，分裝儲存於-70℃以待分析。

第五節　分析項目與方法

（一）人體測量

受試者於試驗開始前（baseline）、三個月、六個月於台安醫院測量體重、血壓、腰圍、臀圍並紀錄於問卷二（附錄二）。

（二）飲食調查

受試者於試驗開始前（baseline）、三個月、六個月分別以 24 小時

飲食回憶法（附錄七），以了解受試者的飲食習慣以及飲食攝取量是否有差異，依據食物代換表以及行政院衛生署編印的營養成分資料庫(1998)進行統計分析，估算出受試者在這試驗期中三大營養素以及總熱量的攝取。

（三）更年期症狀評估

受試者於試驗開始前（baseline）、三個月、六個月以 Kupperman 指數（附錄三）評估異黃酮對受試者更年期症狀改善的效果。Kupperman index 為綜合性評估更年期症狀指數量表，包含 11 項更年期症狀群：血管運動神經障礙（×4）、知覺障礙（×2）、不眠（×2）、神經質（×2）、憂鬱（×1）、目眩（×1）、全身倦怠（×1）、關節痛（×1）、頭痛（×1）、心悸（×1）、蟻走感（×1）各項症狀分別以無症狀（0 分）、輕微（1 分）、中等（2 分）、嚴重（3 分）再乘以評價指數，以計算各項分數得分，再以各項的計分加總即得更年期指數總分。另外以副作用評估表評估副作用發生之有無（附錄八）。

（四）骨質密度測量

以雙光能吸收測量 DEXA(Dual energy X-ray Absorptiometry)

GE PRODIGY 全身扇型光束骨密度檢測儀測量腰椎 L1~L4 與髖骨骨質密度。DEXA 借助放射性同位數之不同能量的 x 光在骨骼和軟骨組織之穿透度，來計算單位平面積內之礦物質含量，以 g/cm^2 來表示其骨質密檢查之數值。

（五）尿液異黃酮含量分析

自-70℃取出尿液回溫，先將尿液酸鹼值調整至 pH 5.0 並加入 β-glucuronidase (From E.coli：100U/ml；sigma) ，置於水浴加熱 37 ℃培養 17 小時以水解醣基，之後加入 50 μl Butyrophenone 當內標準品以作為定量

校正用，再以 7 ml Ethyl acetate 萃取後離心取上清液。將上清液以氮氣吹乾，以 HPLC 流動相回溶，過濾後取 20μl 打入 HPLC 分析。

HPLC 分析條件：

流動相為 methanol-0.1% Formic acid (v：v=6：4)，流速 1.0ml/min，注射 20μl 的樣品，從滯留時間和標準品來辨識 peak，並計算 genistein、daidzein、equol 在尿液中的含量。daidzein 吸光波長為 249nm 、genistein 吸光波長為 261nm、equol 吸光波長為 230nm。

（六）生化檢驗

(1) 膽固醇之測定

以 enzymatic CHOD-PAR 法測定血漿及脂蛋白中的膽固醇含量。原理是利用 polythylene-glycerol-(p-1,1,3,3-tetramethyl-butyl) phenyl ether 和 polyethylene-glycerolmonalkyl ether，將脂蛋白中的 cholesterol 及 cholesterol-ester 釋放出來，再以 cholesterol esterase 水解，經 cholesterol oxidase 氧化產生 H_2O_2，在 peroxidase 催化下，與 4-aminoantipyrine 與 phenol 作用產生淡紅色的 quinoneimine 以波長 500 nm 測其吸光值。以 cholesterol calibrator standard (Randox)做一標準曲線，利用內插法來換算血漿和脂蛋白中膽固醇濃度。

(2) 三酸甘油脂之測定

以 enzymatic GPO-PAR (Glycerphosphate oxidase ，1-phenyl-2,3-dimethyl-4-aminopyrazolone)法分析血漿及脂蛋白中的三酸甘油酯含量。其原理是利用 lipoprotein lipase 將三酸甘油酯水解成 glycerol，glycerol 再由 glycerol kinase 及 glycerol-3-phosphate oxidase 的

磷酸化和氧化作用，產生 H_2O_2，在 peroxidase 催化下，與 4-aminoantipyrine 及 phenol 作用，產生淡紅色之 quinoneimine，以波長 500 nm 測吸光值。以 triglyceride calibrator standard(Randox)做一標準曲線，利用內插法來換算血漿和脂蛋白中膽固醇濃度。

（3）高密度脂蛋白膽固醇測定

利用酵素作用及比色測定原理，先取定量血清，加入適當的沉澱劑將血清中含 apo B 的脂蛋白沉澱，離心後，取定量上清液，加入 chemically modified enzyme 和 cyclodextin sulfate complex ，在 600 nm 波長下測定吸光密度，經計算可得 HDL-C。

（4）低密度脂蛋白膽固醇測定

利用酵素作用及比色測定原理，先取定量血清，加入適當的沉澱劑將血清中含 apo B 的脂蛋白沉澱，離心後，取定量上清液，加入 chemically modified enzyme 和 cyclodextin sulfate complex ，在適當波長下測定吸光密度，經計算可得 LDL-C。

（5） 尿液 creatinine 含量測定

主要原理為 Jaffe reaction。Creatinine 與 picric acid 在鹼性環境中反應成黃色，波長 500 nm 下測其吸光值。離心後取上層澄清尿液，以二次水稀釋 50 倍，蓋緊後再以 100℃乾浴器加熱 10 分鐘去除干擾物質，取加熱後的尿液 75µl，再加入 750µl 體積的 working reagent (picric acid 與 NaOH reagent 以 v/v=1：1 混合)，在室溫下反應 30 秒後，以波長 500nm，測得吸光值(A1)；再經過 1 分 30 秒後測得吸光值(A2)。經計算可得濃度。

計算方式：

ΔA_{sample} **或** $\Delta A_{standar}=A2-A1$

Urine creatinine (mg/ml)= $\Delta A_{sample}/\Delta A_{standard}\times 100$

Serum creatinine (mg/ml)= $\Delta A_{sample}/\Delta A_{standard}\times 2$

（6）血清 High sensitive estradiol （E2）

本實驗原理是利用放射免疫分析測定，樣本以未標定的 estradiol 抗原與標準品和品管血清（control）中已標定的 estradiol 抗原，會相互競爭 estradiol 的抗體結合位，故由已知量的抗原抗體結合體，而計算出樣本中的 estradiol 量。生化儀機型為 RIA-Gamma Counter 。

（7）FSH（Follicle-Stimulating hormone）測定法

利用化學冷光免疫分析法(德國 IBL 試劑)，血清檢體必須 1500 轉離心 15~20 分鐘，以會產生化學冷光之分子作標示物，標示於專一性抗體上，當待測檢體中含有相對抗原時，會形成固相抗體、抗原、抗體標示物複合物，再加入 ACS-180 FSH Lite Reagent 及 ACS-180 FSH solid phase ，便能激發複合物上之標示物產生冷光，最後使用光電倍增管（PMT）測定化學冷光產生之量，便可直接計算 FSH 之濃度高低。

（8）血清中高感度 C 反應蛋白（High sensitive C-reactive protein）

本實驗原理是利用抗原-抗體反應，樣本中的 CRP 會與吸附在 Latex particles 之 anti-CRP 形成凝集反應，利用波長 572 nm 測其吸光值增加量，再對照標準 CRP 濃度做成之檢量線以定量樣本中 CRP 濃度。

（9）SHBG（Sex hormone binding globulin）濃度之測量

本實驗採用三明治(sandwich)酵素免疫分析(德國 IBL)測量血液中 SHBG 濃度。在這個分析中 96 孔的分析盤已結合 anti- SHBG antiserum (monoclonal, mouse)，當血液中的抗原(SHBG)與另外加入已知量的抗體酵素結合體(anti-SHBG antiserum conjugated to horseradish peroxidase)一起加入分析盤中，室溫反應 15 分鐘後，未結合的抗體酵素結合體在清洗過程中會被洗去，當血液中的抗原多時，則抗體-酵素結合體經由血液抗原與分析盤中 anti- SHBG antiserum (monoclonal, mouse)結合數目會增加，此時酵素標定反應物呈色愈深，表示血液中抗原(SHBG)的量愈多。最後以酸性溶液(含 1N 鹽酸)來終止酵素呈色反應，於波長 450 nm 下可測其吸光值。

（七）骨質代謝指標之測定

（1）骨鈣素（osteocalcin）OC

實驗採用全自動化學冷光免疫分析儀 IMMULITE 1000 、Osteocalcin 試劑（美國 Diagnostic Products Corporation 公司）進行分析，乃根據免疫競爭**之原**理測得血漿中完整（intact）的骨鈣素 Osteocalcin。

（2） CTX（C-terminal telopeptides of Type-1 collagen）

本實驗採用三明治（sandwich）酵素免疫分析 (美國CTX ELISA kit from Nordic Bioscience Diagnostics)測量血液中CTX的濃度。將anti-CTX單株抗體（Streptavidin）先固定在盤壁上，接著加入血清及標定有biotin 之抗體（A）和標定有peroxidase 之抗體（B）之混合液，抗體（A）及抗體（B）對目標抗原具有高度特異性，抗體（A）及抗體（B）會與目標抗原在室溫培養下相互結合形成複合物，而此複合物會結合於盤壁上（Streptavidin表面），於室溫，避光下反應15分鐘後，未結合的物質在清洗過程中被洗去，此時加入呈色劑 ，最後以酸性溶液來終止酵素呈色反應，於波長450nm下測其吸光值。

（3）Dexopyridinoline

本實驗採用競爭型酵素免疫分析實驗採用(美國 METRA® DPD EIA Kit QUIDEL 公司)進行分析，以偵測游離型的 Dexopyridinoline。取 50 μl 尿液加入附著有抗 DPD 之單株抗體的微量滴盤中，尿液中的 DPD 會與 anti-DPD 之單株抗體形成專一性的鍵結，再加入帶有酵素 alkaline phosphatase（AP）的抗 DPD 抗體，最後加入受質 p-Nitrophenyl phosphate（pNPP）呈色，於波長 405nm 下讀取吸光值。最後再以 creatinine 作校正。

第六節 統計方法

本研究使用 SPSS 12.0 版進行統計分析，所有數據以 mean±SD 表示。本研究採用兩種統計方法進行分析，受試者基本資料、飲食攝取型態、受試者尿液異黃酮含量，Kupperman index 採 one way ANOVA 分析比較，其餘皆採共變數分析，先檢定受試者 baseline 數值與介入後數值是否有相關性，當達顯著，即可將 baseline 數值以共變數校正之，以排除組間 baseline 值的差異，並分別檢視受試者服用補充品三個月後、六個月後的變化情形，$p<0.05$ 為達顯著差異。

第七節　實驗限制

一、

由於篩選受試者的條件相當嚴格，受試者本身必須身體健康、飲食規律、無乳房相關疾病，同時無糖尿病、心臟病、肝臟方面疾病..等慢性疾病。並確實停經一年以上、一年內無使用賀爾蒙與植物性雌激素等相關製品、長期無使用抗生素、類固醇等。且子宮與卵巢皆要健全，因此從開始截至完全招募完成時間共歷時六個月之久，招募實為不易。

二、

本研究介入時間為六個月，同時受試者必須接受樣本的採集達四次，且須每 2 週回診一次拿補充品並作問卷紀錄調查，然而本研究除了免費提供補充品外，無法給予任何報酬與津貼，因而面臨受試者可能流失的風險。

三、

雖有電話叮嚀與給予表格勾選食用紀錄，但在受試期間無法得知受試者是否確實食用。

四、

本研究限制受試者於試驗期間攝取黃豆製品，並以 24 小時飲食回憶檢視受試者飲食狀況，但黃豆為常見食材，無法確認受試者是否確實告知。

五、

本研究於試驗前及半年後於台安醫院檢測骨質密度，然而骨質密度檢測儀器，雖經由合格放射師操作，但並非同一人執行，可能會有實驗誤差。另外，採集血液樣本時，少數受試者可能因為緊張，導致抽血量不足，而因本研究檢查項目多以大型生化檢測儀分析，而儀器所需的血液樣本量較多，造成某些項目無法及時檢測，而使項目 n 數不等。