
目錄

表目錄.....	V
圖目錄.....	VI
第一章 緒論.....	1
第二章 文獻回顧	3
第一節 代謝症候群 (Metabolic Syndrome)	3
壹、代謝症候群之命名、定義及其診斷標準.....	3
貳、代謝症候群之病理機轉及基礎研究.....	7
參、停經後對於代謝症候群之影響.....	12
第二節 脂肪組織中之重要因子及細胞激素	15
壹、Leptin	15
貳、Adiponectin.....	15
第三節 PPARs 及 LXRs 對於脂質代謝的角色.....	17
壹、PPARs 與 LXRs.....	17
貳、PPAR α 與脂質代謝、肥胖、動脈粥狀硬化的相關性.....	19
參、LXRs 與體內代謝恆定之關係.....	21
第四節 實驗動物模式.....	23
壹、ApoE knockout mice.....	23
貳、卵巢切除誘發肥胖之動物模式.....	25
第五節 植物性雌激素 (phytoestrogen).....	26
壹、植物性雌激素之生理作用.....	26
貳、植物性雌激素分類及來源.....	27
參、植物性雌激素與抗代謝症候群之相關研究.....	30
第三章 芝麻素對動脈粥狀硬化之影響.....	34
第一節 前言.....	34
第二節 材料與方法.....	35
壹、實驗設計及流程.....	35
貳、動物飼養、飼料製備、組織取樣及樣品前處理.....	36

參、血液脂質分析.....	38
肆、血清 adiponectin 分析.....	40
伍、血清中 enterolactone 含量測定.....	41
陸、血管縱切與脂肪堆積染色.....	41
柒、統計分析.....	42
第三節 結果.....	43
壹、攝食及生長情形.....	43
貳、組織器官相對及絕對重量.....	43
參、血液脂質濃度.....	43
肆、血液 adiponectin 濃度.....	44
伍、血液 enterolactone(ENL)濃度.....	44
陸、主動脈脂肪堆積.....	44
第四節 討論與結論.....	51
壹、sesamin 對於血脂及動脈損傷之影響.....	51
貳、sesamin 代謝產物 ENL 之效用.....	53
參、結論.....	54
第四章 芝麻素及異黃酮對代謝症候群之影響.....	55
第一節 前言.....	55
第二節 材料與方法.....	56
壹、實驗設計及檢測項目.....	56
貳、動物飼養、飼料製備、組織取樣及樣品前處理.....	57
參、血液脂質分析.....	60
肆、血液細胞激素(cytokines)含量分析.....	61
伍、血清 insulin 分析.....	61
陸、血清中 enterolactone 含量測定.....	62
柒、肝臟脂質分析.....	62
捌、統計分析.....	63
第三節 結果.....	64
壹、攝食及生長情形.....	64
貳、組織器官相對及絕對重量.....	64
參、血液脂質濃度.....	64
肆、血液 glucose 濃度.....	65
伍、血液 insulin 濃度及 HOMA-IR.....	65
陸、血液 adiponectin 濃度.....	65

柒、血液 enterolactone 濃度	65
捌、肝臟脂質濃度	66
第四節 討論與結論	76
壹、卵巢切除後誘發更年期後引起之代謝症候群	76
貳、芝麻素及異黃酮對肥胖之影響	77
參、芝麻素及異黃酮對 adiponectin 及胰島素阻抗之影響	79
肆、芝麻素及異黃酮對血脂及心血管疾病之影響	81
伍、芝麻素及異黃酮對肝脂之影響	82
陸、結論	83
第五章 具植物性雌激素之食材對肝細胞脂肪酸代謝之影響	84
第一節 前言	84
第二節 材料與方法	85
壹、實驗設計	85
貳、研究材料	85
參、樣品製備及取得	86
肆、細胞存活率分析 (MTT assay)	87
伍、細胞內蛋白質濃度測定	87
陸、細胞內三酸甘油酯含量測定	88
柒、細胞 mRNA 表現量	88
捌、西方墨點法 (Western Blotting) 分析細胞內蛋白質表現	92
玖、統計分析	94
第三節 結果	95
壹、具植物性雌激素食材之樣本對 HepG2 細胞存活率之影響	95
貳、具植物性雌激素食材之樣本對 HepG2 細胞內三酸甘油酯含量之影響	95
參、具植物性雌激素食材之樣本對 HepG2 細胞內脂肪酸代謝酵素 mRNA 表現量之影響	96
肆、具植物性雌激素食材之樣本對 HepG2 細胞內 FAS 表現量之影響	98
第四節 討論與結論	108
壹、兩種模式促進 HepG2 細胞內 TG 含量	108
貳、具植物性雌激素之食材對於 HepG2 細胞內脂肪酸生合成作用 (lipogenesis) 之影響	108
參、具植物性雌激素之食材對於 HepG2 細胞內脂肪酸氧化作用 (β -oxidation) 之影響	109
肆、ENL 的效用	111

伍、研究限制.....	111
陸、結論.....	111
第六章 綜合討論及總結.....	113
第一節 綜合討論.....	113
第二節 總結及未來建議.....	117
第七章 參考文獻	120

表目錄

表 2-1 代謝症候群之定義及診斷標準.....	5
表 2-2 雌激素在脂肪組織的效用.....	13
表 2-3 LXRS 及 PPARs 主要表現之組織及其生理作用.....	18
表 3-1 實驗期飼料之組成.....	37
表 3-2 APOE 剔除且卵巢切除之小鼠餵食實驗飼料 11 週體重增加量、平均攝食量及攝食效應.....	45
表 3-3 APOE 剔除且去卵巢之小鼠餵食實驗飼料 11 週後組織絕對及相對重量..	46
表 3-4 APOE 剔除且予以去除卵巢之小鼠餵食實驗飼料 11 週實驗期間血液總膽固醇、三酸甘油酯及 ENTEROLACTONE 濃度.....	47
表 4-1 實驗期飼料之組成.....	59
表 4-2 假手術或卵巢切除小鼠餵食實驗飼料 14 週體重增加量、平均攝食量及攝食效應.....	67
表 4-3 假手術或卵巢切除小鼠餵食實驗飼料 14 週後組織絕對及相對重量.....	68
表 4-4 假手術及卵巢切除小鼠餵食實驗飼料 14 週實驗期間血液參數值	69
表 4-5 假手術及卵巢切除小鼠餵食實驗飼料 14 週後肝臟中總膽固醇及三酸甘油酯濃度.....	70
表 6-1 芝麻素及異黃酮對於代謝症候群之影響.....	118
表 6-2 具植物性雌激素之食材對於脂肪肝的影響.....	119

圖目錄

圖 2-1 在胰島素阻抗的狀態下，三酸甘油酯堆積在肝臟中可能的代謝機轉.....	11
圖 2-2 PPARs 及 LXRs 轉錄機轉.....	17
圖 2-3 LXRs 對於體內脂質恆定的調節機轉.....	22
圖 2-4 GENISTEIN 在細胞模式上的作用機轉.....	33
圖 3-1 APOE 剔除並予以卵巢切除之小鼠餵食實驗飼料 11 週生長曲線.....	48
圖 3-2 APOE 剔除小鼠予以卵巢切除餵食實驗飼料 11 週後血液 HDL-C 及 ADIPONECTIN 濃度.....	49
圖 3-3 卵巢切除之 APOE 剔除小鼠餵食實驗飼料 11 週後主動脈損傷情形.....	50
圖 4-1 假手術或卵巢切除之小鼠餵食實驗飼料 14 週生長曲線.....	71
圖 4-2 假手術或卵巢切除之小鼠餵食實驗飼料 14 週後血液 HDL-C 濃度.....	72
圖 4-3 卵巢切除之 C57BL/6J 小鼠餵食實驗飼料 14 週後血液游離脂肪酸濃度..	73
圖 4-4 卵巢切除之 C57BL/6J 小鼠餵食實驗飼料 14 週後血液 INSULIN 及 GLUCOSE 濃度.....	74
圖 4-5 卵巢切除之 C57BL/6J 小鼠餵食實驗飼料 14 週後血液 ADIPONECTIN 濃度	75
圖 5-1 T0901317、INTRALIPID 及具植物性雌激素食材樣本對肝細胞存活率之影響	99
圖 5-2 具植物性雌激素之食材對肝細胞內三酸甘油酯含量的影響.....	100
圖 5-3 具植物性雌激素之食材對 T0901317 誘導之肝細胞內 FAS mRNA 表現量的 影響.....	101
圖 5-4 具植物性雌激素之食材對 T0901317 誘導之肝細胞內 ACC mRNA 表現量的 影響.....	102
圖 5-5 具植物性雌激素之食材對 T0901317 誘導之肝細胞內 SREBP-1 mRNA 表現 量的影響.....	103
圖 5-6 具植物性雌激素之食材對 T0901317 誘導之肝細胞內 GPAT mRNA 表現量 的影響.....	104
圖 5-7 具植物性雌激素之食材對 T0901317 誘導之肝細胞內 ACO mRNA 表現量的 影響.....	105
圖 5-8 具植物性雌激素之食材對 INTRALIPID 誘導之肝細胞內 ACO mRNA 表現量 的影響.....	106
圖 5-9 具植物性雌激素之食材對 T0901317 誘導之肝細胞內 FAS 蛋白質表現量的 影響.....	107

縮寫對照表 (1)

縮寫	全名
ApoE	Apolipoprotein E
ABCA1	ATP binding cassette transporter A1
ACC	Acetyl-CoA carboxylase
ACO	Acyl-CoA oxidase
CEBPβ	CCAAT/enhancer binding proteins β
RWAT	Retroperitoneal fat pad
ERα (β)	Estrogen receptor α (β)
END	enterodiol
ENL	enterolactone
FAS	Fatty acid synthase
FFAs	Free fatty acids
GPAT	Glycerol 3-phosphate acyltransferase
HepG2	Human hepatoblastoma G2
HDL-C	High density. lipoprotein cholesterol
HRT	Hormone replacement therapy
IL-6	Interleukin 6
ICAM-1	Intercellular cell adhesion molecule-1
LDL-C	Low density lipoprotein cholesterol
LPL	Lipoprotein lipase
LXRs	Liver X receptors
NEFA	Non esterified fatty acid
OVX	Ovariectomized

縮寫對照表 (2)

縮寫	全名
PPRE	Peroxisome proliferators response element
PWAT	Parametrial fat pad
SCD1	Stearoyl coenzyme-A desaturase-1
SERMs	Selective estrogen receptor modulators
SR-B I	Scavenger receptor class B type 1
SREBP-1	Sterol regulatory binding protein-1
TC	Total cholesterol
TG	Triacylglycerol
TNF-α	Tumor necrosis factor- α
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VLDL-C	Very low density lipoprotein. cholesterol

第一章 緒論

根據民國九十一年行政院衛生署國民健康局高血糖、高血脂、高血壓盛行率研究調查發現，十五歲以上國人整體代謝症候群(Metabolic syndrome)盛行率為15%，男性略高於女性 (16.9% vs. 13.8%)，其盛行率隨年齡而增加，顯示國人代謝症候群的發生日益增多，若未經適當的控制，則可能轉為第2型糖尿病或心血管疾病最終可能猝死。

代謝症候群是指腹部肥胖 (central obesity)、高血壓(hypertention)、高血糖、高密度脂蛋白膽固醇 (HDL-C)過低、低密度脂蛋白膽固醇 (LDL-C)過高至少三項同時存在者，近年來亦發現代謝症候群與非酒精性脂肪肝病 (nonalcoholic fatty liver, NAFLD)之間具有強相關性(McCullough, 2004)。停經後的婦女體內脂肪分佈位置改變，囤積腹部脂肪，使代謝症候群之風險增高，且發現停經前的女性心血管疾病之風險遠低於男性，但停經後心血管疾病風險激增為與男性相當，因此認為雌激素對於心血管疾病可能具保護效用。

植物性雌激素 (phytoestrogen)存在於天然植物中，其構造或功能類似雌二醇 (17 β -estrodial)，具有雌激素之效應，可與 ER α 及 ER β 結合，但其與 ER β 之親合力遠高於 ER α ，可保護心血管疾病，可視為一種選擇性雌激素接受器調節劑 (selective estrogen receptor modulator, SERM)。近年來對於植物性雌激素研究日益增多，發現在飲食中攝取高量之植物性雌激素，可降低荷爾蒙相關癌症及心血管疾病的罹患率。目前已知的植物性雌激素大致分為三大類：異黃酮 (isoflavone)、木質酚 (lignan)及香豆素 (coumestan)，其中以異黃酮研究最多，數個研究指出異黃酮中之 genistein 可減少去卵巢小鼠腹部脂肪堆積且能夠改善血脂 (H. K. Kim et al., 2006; Naaz et al., 2003)，此外另一項研究發現 genistein 可能為 PPAR α ligand，可調節參與脂肪酸代謝之基因表現 (S. Kim et al., 2004)，因此異黃酮具有改善停經後引起之代謝紊亂的潛力。

芝麻或 sesamin，在動物體內腸內菌會將其代謝成 enterolectone 及 enterodial

(Penalvo, Heinonen, Aura, & Adlercreutz, 2005; Penalvo, Hopia, & Adlercreutz, 2006), 此可能具有植物性雌激素之功效; 苜蓿芽乙酸乙酯萃物可顯著延長 SLE (MRL/lpr) 小鼠生命, 故此成分可能抑制與雌激素有關的女性自體免疫疾病, 對 ER β 表現高的組織預期也會有保護效應; 鄭氏在山藥乙酸乙酯萃取物的成分中, 發現其具有活化 ER α 與 ER β 的化合物, 指出山藥確實雌激素之活性 (Cheng, Kuo, & Huang, 2007), 且山藥對停經婦女雌激素濃度、預防乳癌與心血管疾病都可能有助益。因此認為芝麻 lignans、苜蓿乙酸乙酯萃物、山藥乙酸乙酯萃物可能和異黃酮中之 genistein 具有相同的植物性雌激素效用, 預期對停經後產生之代謝症候群與老化相關疾病有所助益。

Apo E 基因剔除小鼠會自發性地產生動脈硬化, 且其進展過程類似人類動脈硬化的各個不同時期, 而損害區域的分佈與人類動脈硬化發生位置相似 (Nakashima et al., 1994)。雌激素除可經由降低體脂肪量, 影響胰島素敏感度與動脈硬化的形成, 也可直接影響脂蛋白代謝、內皮細胞功能等, 亦可降低卵巢切除的 apoE 剔除小鼠主動脈脂肪條的產生 (Elhage et al., 1997); 去除卵巢之大鼠及小鼠, 體重會增加, 給予雌激素治療可下降體重或脂肪重量 (Wallen et al., 2001, 2002)。但停經後使用雌激素治療會增加乳癌及子宮內膜癌風險, 若能在日常生活中找到可能具有植物性雌激素活性之食材, 可發揮類似雌激素功能, 對於停經後引起之代謝紊亂為一大助益。故本研究預期具 SERM 之植物性雌激素食材可提供類似雌激素功能, 體內模式使用 apoE 基因剔除小鼠及卵巢切除小鼠, 探究食材對於停經後引起之代謝症候群及動脈粥狀硬化的效用; 體外模式選用 HepG2 細胞, 誘發細胞內三酸甘油酯堆積, 模擬脂肪肝形成, 以探討食材對於脂肪肝防治之功效。

第二章 文獻回顧

第一節 代謝症候群 (Metabolic Syndrome)

壹、代謝症候群之命名、定義及其診斷標準

(一) 代謝症候群之命名、定義

某些生理代謝層面的心血管危險因子，如：肥胖 (Obesity)、胰島素阻抗 (Insulin resistance)、高三酸甘油酯、高血壓 (Hypertension)、糖尿病 (Diabetes) ... 等之間具有高度相關，並觀察到多項危險因子會同時發生在一個人身上，這樣的聚集現象可統稱為「症候群 (Syndrome)」，而不少學者給予不同的名稱來代表之。Reaven (1988)最早提出胰島素阻抗為此症候群主要之致病原因的假說，但其機制並不明確，將此症候群命名為「X 症候群」 (Syndrome X)，其為多項心血管疾病危險因子的匯集，如高血壓、高血糖、高三酸甘油酯及低高密度脂蛋白膽固醇 (Reaven, 1988)。直至 1998 年世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 才將 X 症候群正式命名為「代謝症候群」 (Metabolic Syndrome)，並設立代謝症候群的診斷標準 (Alberti & Zimmet, 1998)。

(二) 代謝症候群之診斷標準

代謝症候群為數項危險因子合併發生的狀況之，各個危險因子之間可能會產生交互影響因而增加個體發生疾病的風險，因此對於代謝症候群臨床上的診斷標準，應考量需納入哪些生理代謝因子及如何決定這些因子的正常值與異常值，而被納入考慮的因子中，何種組合才能將代謝症候群廣泛的涵蓋之，如何拿捏其間的關係對於代謝症候群的診斷具有高度影響力。

直至 1998 年 WHO 推出一套代謝症候群的診斷標準前，對於代謝症候群幾乎無可依循之診斷或定義的指標。WHO 對代謝症候群之定義是以糖尿病的觀點出發，定義為「在第 2 型糖尿病病患、葡萄糖耐受性異常 (Impaired Glucose

Intolerance) 、或有胰島素阻抗者，若同時具有四項指標之二項者，即可診斷為「代謝症候群」 (Alberti & Zimmet, 1998)。而後美國國家膽固醇教育計劃 (NCEP-ATP III) 也發表了其對代謝症候群診斷的定義，其診斷標準是以心血管疾病發生之風險為考量，「符合五項指標中之三項以上即可稱為代謝症候群」 (Yamauchi et al., 2001)。2005 年國際糖尿病聯盟 (International Diabetes Federation, IDF) 提出必須以中廣型肥胖 (Central Obesity) 為必要條件，其餘四項指標中符合二項以上即可被診斷為代謝症候群，其是以中廣型肥胖為中心伴隨著不同的心血管或代謝異常危險因子 (Alberti, Zimmet, & Shaw, 2005) (表 2-1)，表示代謝症候群可能為心血管疾病或糖尿病的前驅狀態，一旦危險因子聚集，日後發生心血管疾病及糖尿病的機會將較正常人高出許多倍。

過去WHO的診斷標準中，不難發現其是以醣類代謝的問題為出發點，作為滿足病例定義的必要條件。而NCEP-ATP III的標準中，則是聚焦於心血管疾病發生之風險，2005年IDF又提出必須以中廣型肥胖為中心的論點，認為腹部脂肪的堆積造成的肥胖相較於以BMI為切點的肥胖定義對於代謝症候群有更大的相關。雖然對於代謝症候群的診斷標準分歧，且尚未有直接的證據支持，且可能因為環境影響或種族個體差異，必須依不同族群而訂定適切之代謝症候群預測指標。行政院衛生署國民健康局 (2006) 參照國情修正符合我國民眾代謝症候群臨床診斷之準則 (表2-1)，其將腹部肥胖單獨列為五項危險因子之中的一項，無論如何，尋找合適的診斷指標，對於代謝症候群之盛行率及大眾的健康皆具有一定的影響力。

表 2-1 代謝症候群之定義及診斷標準

Table 2-1 Definitions and criteria of metabolic syndrome

	WHO (1988) ¹	NCEP-ATP III (2001) ¹	IDF (2005) ¹	國民健康局 (2006)
考量	以糖尿病的面向為出發點	以心血管疾病發生風險為考量	以中廣型肥胖為主 要考量	綜合心血管疾病發生風險及中廣型肥胖為其考量因素
定義	第 2 型糖尿病病患、葡萄糖耐受性異常、或有胰島素阻抗者，若同時具有下述指標之二項時，即可診斷為代謝症候群	符合五項指標中的三項或三項以上是代謝症候群	腹部（中廣型）肥胖者，若同時具有下述指標之二項時，即可診斷為代謝症候群	符合五項危險因子中的三項或三項以上即可診斷為代謝症候群
必要條件	IGT/DM ³ 或 Insulin resistance	無	Central obesity ²	無
選擇條件	以下指標符合二項以上： (Elhage et al.) 血脂異常：TG ³ ≥ 150mg/dL 或 HDL-C ³ Male ≤ 35mg/dL Female ≤ 40mg/dL	以下指標符合三項以上： (1) Waist Male > 102 cm Female > 88 cm	以下指標符合二項以上： TG ³ ≥ 150mg/dl	以下指標符合三項以上： (1) Waist Male ≥ 90 cm Female ≥ 80 cm
	(2) Obesity : BMI ³ ≥ 30kg/m ² 或腰臀圍比，男性 > 0.90，女性 > 0.85	(2) TG ³ ≥ 150mg/dl	(2) HDL-C ³ Male < 40mg/dl Female < 50mg/dl	(2) TG ³ ≥ 150mg/dl
	(Kannel et al.) Hypertention 使用降血壓藥物或血壓超過 140/90 mmHg	(3) HDL-C ³ Male < 40mg/dl Female < 50mg/dl	(Kannel et al.) BP ³ ≥ 130/85mmHg	(3) HDL-C ³ Male < 40mg/dl Female < 50mg/dl
	(4) 尿液中出現微蛋白尿，整夜尿蛋白排出量超過 20mg/min	(4) BP ³ ≥ 130/85mmHg	(4) Fasting glucose > 110mg/dl	(4) BP ³ ≥ 130/85mmHg

(5) Fasting glucose
> 110mg/dl

(5) Fasting glucose
> 110mg/dl

¹WHO, World Health Organization; NCEP-ATP III, National Cholesterol Education Program - Adult Treat Panel; IDF, International Diabetes Association

²因種族差異而有不同的定義：亞洲及本國定義男性腰圍超過90cm、女性超過80cm為腹部肥胖；日本則定義男性腰圍超過90cm、女性超過85cm。

³IGT, Impaired Glucose Intolerance; DM, Diabetes Mellitus; TG, Triglyceride; HDL-C, High Density Lipoprotein-Cholesterol; BP, Blood Pressure.

貳、代謝症候群之病理機轉及基礎研究

體內脂肪分佈對於代謝症候群及心血管疾病危險因子影響深遠。很多前瞻性流行病學研究指出腹部脂肪堆積增加對於心血管疾病、高血壓、中風 (stroke) 及第二型糖尿病是一項獨立的危險因子 (Ducimetiere et al., 1986; Lapidus et al., 1984; Larsson et al., 1984)。腹部脂肪增加與高胰島素血症 (hyperinsulinism)、胰島素阻抗、血液中游離脂肪酸濃度增加、高血壓、血栓形成、高三酸甘油酯血症、較小且緊密的 LDL 粒子增加及減少 HDL 這些因子之間有顯著強相關，這樣的議題已被提出多年但至今尚未有標準化的定義解釋這些疾病當中複雜的關聯。

(一) 肥胖與胰島素阻抗及第二型糖尿病之關係

橫斷面研究提出具有胰島素阻抗的病人同時存在第二型糖尿病之病症 (Haffner et al., 1990; Lillioja et al., 1993)；另一項前瞻性研究指出胰島素阻抗為未來發展成第二型糖尿病之重要指標 (Warram et al., 1990)。因此，在代謝症候群及第二型糖尿病病理機轉中，胰島素阻抗扮演一個重要的媒介且其對於肥胖、動脈粥狀硬化及心血管疾病亦為一重要之決定要素 (Ginsberg, 2000)。

肥胖是一種慢性發炎反應，可改變細胞激素的生成及活化產生發炎反應之訊息傳導路徑。發炎反應導致胰島素阻抗可能的機轉有二，其一：發炎反應訊息中介產物的活化可能直接參與胰島素受體 (insulin-receptor substrate-1, IRS-1) 的絲胺酸磷酸化 (serine phosphorylation)，且 IRS-1 位於胰島素敏感的細胞型態內(如肝細胞、肌肉細胞) 因而誘導胰島素阻抗的現象；其二：在脂肪組織內，當發炎反應細胞激素滲出，可能造成脂肪細胞之脂質代謝改變 (如腫瘤壞死因子- α [TNF- α]可促進脂肪水解) 因而對其他周邊組織造成影響 (Hotamisligil, 2003; Savage, Petersen, & Shulman, 2005)。

(二) 肥胖與胰島素阻抗及血脂異常 (dyslipidemia)及發炎反應之關係

肥胖並非只易於引發胰島素阻抗及糖尿病，也會造成粥瘤型之血脂異常。近年來，代謝症候群逐漸著重於預防或治療與腹部脂肪堆積相關的脂質代謝異常，包括：高三酸甘油酯血症、高密度脂蛋白膽固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 減少、較小且緊密之低密度脂蛋白膽固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 增加。

在胰島素阻抗的狀況下，周邊組織（如腹部脂肪組織）無法有效的代謝脂肪酸，會以游離脂肪酸的形式釋放至血液中，造成血液中游離脂肪酸的濃度過高 (free fatty acids, FFA)，而 FFA 經由門靜脈循環進入肝臟合成三酸甘油酯 (Triglycerides, TG) 進而堆積在肝臟中或以極低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) 的形式送回到血液中，造成血液中富含 TG 之 VLDL 的量增加。此 VLDL 會將 TG 傳送給 LDL，使 LDL 粒子變小且密度變緊密，易附著於血管內皮細胞，且易於被氧化修飾成氧化型低密度脂蛋白 (oxLDL)，被吞噬細胞吞噬形成泡沫細胞 (foam cell)，活化發炎反應的過程。當肝臟釋出過多的 VLDL，周邊組織之脂蛋白脂解酶的活性受到干擾而降低時，進而造成來自肝臟中富含 TG 之 VLDL 無法有效被利用或清除，累積在血液中，導致血液中 TG 的濃度上升。此外，當血液累積過多之 TG 時，使得 VLDL 攜帶的 TG 透過膽固醇酯轉運蛋白 (cholesterol ester transfer protein, CETP) 之媒介，與 LDL 或 HDL 交換膽固醇酯 (cholesterol ester)，因而減少 HDL 所攜帶之膽固醇，又因胰島素阻抗作用，促進肝臟脂解酶之活性，加速肝臟中 HDL-C 之代謝，造成體內 HDL-C 量下降。而 HDL 具有保護動脈粥狀硬化之功能可能是歸功於 Reverse cholesterol transport 的作用，然而，HDL 粒子也具有傳送抗氧化酵素之功能，此酵素如血小板活化因子乙醯化水解酶 (platelet-activating factor acetylhydrolase) 及對氧臨酶 (paraoxonase) 可破壞氧化脂質，減少促發炎之作用。(Abate, 2000; Grundy, 1998, 1999; Libby, Ridker, & Maseri, 2002)

(三) 發炎及動脈粥狀硬化 (atherosclerosis) 之關係

動脈粥狀硬化為一種錯綜複雜的病灶，血管壁上之氧化型式的脂蛋白、巨噬細胞、T 細胞及正常的細胞之間產生交互作用因而引起之一種慢性發炎反應，這些發炎反應的過程會造成血管壁損傷及斑塊形成。(Glass & Witztum, 2001)

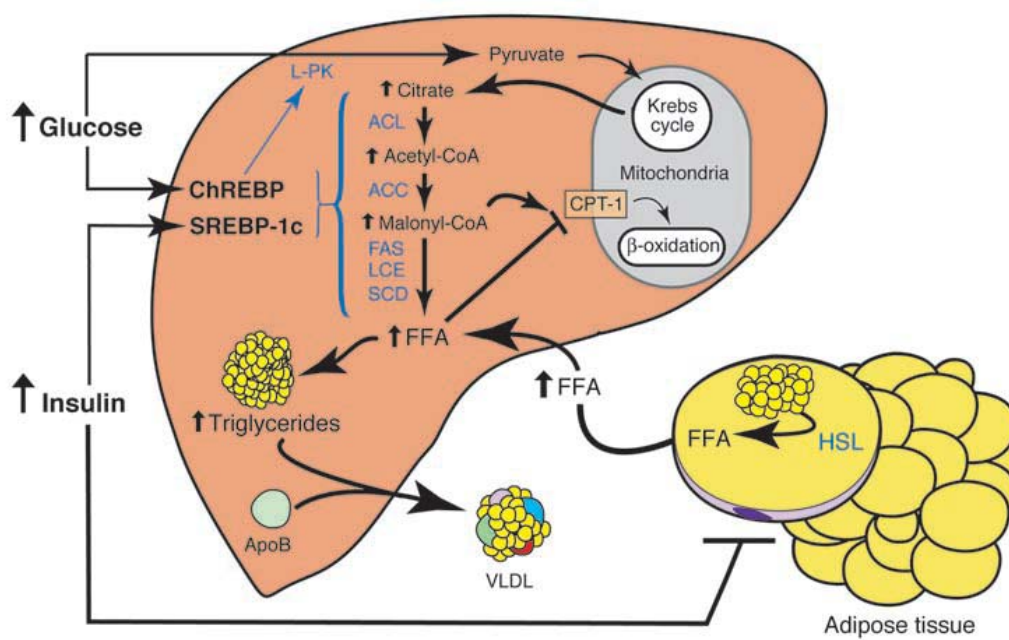
當內皮細胞功能受損及失調，會改變原本細胞恆定狀態，使細胞膜通透性增加，受損的內皮細胞會分泌細胞表面黏著分子（如 ICAM-1、VCAM-1）與循環中單核球細胞上之接受器結合，產生黏附及滾動，並移行至內皮細胞下的空間分化形成巨噬細胞，ox-LDL 也通過細胞膜進入內皮細胞下，巨噬細胞經由清道夫接受器 (scavenger receptor) 將 ox-LDL 攝入形成泡沫細胞 (foam cell)。ox-LDL 會刺激內皮細胞釋出更多趨化物質（如 MCP-1），因而加速單核球細胞滲入，使更多泡沫細胞堆積在血管內層，此階段為脂肪條 (fatty streak) 之生成。當發炎反應的過程持續進行，活化的白血球及泡沫細胞釋出大量細胞激素及生長因子，促使血管內平滑肌細胞從管壁中層移行至內層並增生，合成細胞外基質蛋白（如 fibrin、collagen）覆蓋在平滑肌細胞上，形成纖維帽 (fibrous cap) 隆起，此為複雜的損傷階段。當泡沫細胞中心脂質堆積過多導致細胞產生自戕作用 (apoptosis) 因而導致壞死的核 (necrotic core) 形成，不斷釋出脂質及膽固醇堆積在管腔內，T 淋巴球細胞不斷分泌細胞激素（如干擾素- γ ，IFN- γ ），抑制平滑肌細胞生成膠原蛋白，且巨噬細胞所分泌之基質金屬蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 會分解細胞外之基質蛋白，導致纖維帽變薄最終造成斑塊破裂，接觸到血液中之組織因子，開始凝集造成血栓 (thrombosis) 之形成，此為不穩定的斑塊形成階段，為動脈粥狀硬化之後期進展，若血栓不斷形成造成管腔變窄，容易引發急性心血管疾病如心肌梗塞、中風甚至猝死。(Glass & Witztum, 2001; Libby, 2002; Ross, 1999)

(四) 肥胖與非酒精性脂肪肝(Non-alcoholic fatty liver, NAFL)

近年來，很多研究提出非酒精性脂肪肝病與中廣型肥胖、高脂血症、脂質

代謝異常及胰島素阻抗有很大的相關，超過 90% 產生非酒精性脂肪肝的病人至少具有一項代謝症候群的特徵 (Marchesini et al., 2003)。倘若個體每日攝取酒精含量少於 20 克，而攝入之脂肪主要以三酸甘油酯的形式囤積在肝臟中，且爾後若發生肝硬化並非為藥物或其他病毒引起，此人即可被認定產生「非酒精性脂肪肝病」。(McCullough, 2004) 飲食對於整體生理代謝及荷爾蒙、轉錄因子和脂質代謝之影響對於產生非酒精性脂肪肝病之病症為其重要。Marchesini 等人提出非酒精性脂肪肝病與胰島素阻抗之間的關係主要是受到葡萄糖耐受性受損或空腹血糖異常 (impaired fasting glucose) 影響。(Marchesini et al., 2001; Marchesini et al., 2003; Moon et al., 2004)

脂肪肝的形成是由於三酸甘油酯長時間堆積在肝臟中，造成肝內細胞受損，其確切之機轉到目前為止並不是很明確。Choudhury 等人認為胰島素阻抗為發展非酒精性脂肪肝病或最終形成肝硬化之重要危險因子。(Choudhury & Sanyal, 2004) 在脂肪細胞中，胰島素阻抗增加激素敏感性脂解酶 (hormone-sensitive lipase, HSL) 活性，因而增加三酸甘油酯脂解率，提升血液中游離脂肪酸送到肝臟中，而 FFAs 不僅會在粒線體被氧化形成 ATP 也會酯化產生 TG 堆積在肝臟中或與 apoB 結合經由 VLDL 送出肝臟。在肝臟中，當體內胰島素濃度過高時，誘導固醇調節結合蛋白-1c (Sterol regulatory binding protein-1c, SREBP-1c) 表現，因而活化脂質生合成基因的轉錄作用；而血糖濃度過高時，促進醣類反應元素結合蛋白 (carbohydrate response element binding protein; ChREBP) 的表現，活化 L-丙酮酸激酶 (L-type pyruvate kinase, L-PK) 及脂肪生合成基因之轉錄作用。且 SREBP-1c 及 ChREBP 具有協同作用，能夠共同活化酵素作用，將體內過多的葡萄糖轉換成脂肪酸。當脂肪酸合成作用增加時，增加 malonyl-CoA 生成，因而抑制將脂肪酸傳送至粒線體的重要蛋白質 CPT-1。因此，在胰島素阻抗的狀態下，游離脂肪酸從周邊組織進到肝臟中酯化形成三酸甘油酯堆積在肝中。(Browning & Horton, 2004)



(Browning & Horton, 2004)

圖 2-1 在胰島素阻抗的狀態下，三酸甘油酯堆積在肝臟中可能的代謝機轉

參、停經後對於代謝症候群之影響

(一) 雌激素(estrogen)的作用

荷爾蒙 (hormones) 為脂肪組織主要的調節者，能夠調控脂肪細胞(adipocyte)的生成及影響其功能，其中雌激素對於女性全身脂肪分佈及發展扮演一個重要的角色，且能夠控制脂肪細胞的大小及脂肪細胞生成(Cooke & Naaz, 2004)。雌激素受器 ER α 、ER β 均可在人類及啮齒類動物之脂肪細胞及前體脂肪細胞 (preadipocytes) 上被表現，因此能夠調控前體脂肪細胞生長及分化，進而增加脂肪細胞的數目；而雌激素受器除了表現在脂肪組織上，亦存在於其他組織器官，如：大腦中之下視丘 (hypothalamas)，間接抑制食慾、調節能量消耗及代謝。

在動物模式中，不論小鼠或大鼠將卵巢切除後(Wade, Gray, & Bartness, 1985)，體內脂肪組織的量都增加，Hamoosh 等人提出，卵巢切除後的大鼠會增加體內脂蛋白水解酶 (lipoprotein lipase, LPL) 的活性造成脂肪堆積，若給予雌激素治療可改善脂肪堆積情形(Hamosh & Hamosh, 1975)，而 ER α 基因剔除小鼠也大量增加脂肪含量(Heine et al., 2000)，因此認為雌激素能夠抑制脂肪組織在體內的堆積，是透過抑制脂肪細胞上脂蛋白水解酶 (lipoprotein lipase, LPL) 的活性，進而減少脂肪細胞生合成作用。此外，雌激素也具有促進脂肪水解酵素 HSL 活性的功能，增加脂肪水解。(表 2-2)

表 2-2 雌激素在脂肪組織的效用

Table 2-2 Estrogen Effects on Adipose Tissue (Cooke & Naaz, 2004)

直接效用	文獻來源
脂質生成作用(lipogenesis) ↓ LPL mRNA 及蛋白質表現量	(Hamosh et al., 1975)
脂肪水解作用(lipolysis) ↑ HSL 活性 ↑ 受到腎上腺素誘導的脂肪水解作用 ↓ 皮下脂肪組織水解作用(特定區域)	(Palin et al., 2003) (Ackerman et al.,1981) (Pedersen et al.,2004)
脂肪生成作用(adipogenesis) ↑ 前體脂肪細胞分化 ↓ 脂肪細胞分化因子的表現量	(Lea-Currie et al.,1999) (Dang et al.,2002)
間接影響	
中樞神經系統/下視丘作用 ↓ 攝食量 ↑ 活動量及能量消耗	(Wade et al., 1985) (Heine et al., 2000; Wade et al., 1985)
血脂組成(profile)及在肝中作用 缺乏雌激素可能會造成脂肪肝及改變體內 脂質恆定	

(二) 停經(menopause)與代謝症候群之相關性

女性停經後脂肪分佈改變，由四肢或皮下轉到腹腔內堆積造成腹部肥胖又稱中廣型肥胖，為整體肥胖獨立出之一項心血管疾病危險因子，而脂肪堆積在腹部與糖尿病、高脂血症、小且緊密的 LDL 粒子、高血壓、心血管疾病之間具有相關性(Kannel et al., 1991)。

很多研究指出婦女更年期體內 TC、TG、lipoprotein(a)、LDL-C 濃度增加，而 HDL-C 濃度降低，指出停經後可能引起體內脂質代謝改變(Carr, 2003)。停經後肝臟脂解酶 (hepatic lipase, HL)活性提高，LPL 活性也有些微增加，因而增加 LDL 及 HDL 上之 TG、phospholipid 水解，使 LDL 粒子變得更小且更緊密，使之更易導致血管粥瘤形成(Santamarina-Fojo et al., 1998; Tikkanen et al., 1986)，其血脂組成更傾向於代謝症候群之特徵。此外，Lindheim 等人提出停經後婦女相較於停經前其胰島素敏感性下降(Lindheim et al., 1994)，但有其他研究結果顯示並無差異(Toth et al., 2000)，因此，關於女性停經後是否增加胰島素阻抗的意見分歧，仍須更進一步研究指出。停經後，體內發炎因子如：纖維酶原活化子抑制劑 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)、C-反應蛋白(C-reactive protein, CRP) 及 IL-6 的濃度增加，可能產生發炎反應，增加心血管疾病的發生。綜合以上研究結果，女性停經後，體內雌激素濃度下降，造成代謝改變，出現代謝症候群的特徵，因此認為女性停經後罹患代謝症候群及心血管疾病的風險顯著增加。

第二節 脂肪組織中之重要因子及細胞激素

很多學者提出代謝症候群可能是由腹部肥胖所引起，脂肪組織不再只是儲存脂肪的場所，而是一種前發炎內分泌及旁分泌器官，其所分泌之傳訊蛋白統稱為「脂肪細胞激素 (adipokines)」。

壹、Leptin

Leptin 為一種脂肪組織合成之蛋白質，由希臘文 leptos(=thin)而來的，其分子量為 16 kDa，主要作用在下視丘抑制食慾，控制能量消耗，調節體內脂肪含量。*ob/ob* 小鼠因 *ob* 基因產生突變，脂肪細胞無法分泌 leptin，使食慾大增，基礎代謝率下降，使體重增加造成明顯肥胖，若將 leptin 重組蛋白打入體內，可顯著抑制食慾、體重及脂肪含量都明顯減少。(Friedman & Halaas, 1998; Zhang et al., 1994)

Leptin 可保護 T 淋巴球細胞而不造成細胞自牀，且具調節 T 細胞分化及活化之功能，也會影響 T 淋巴球分泌細胞激素。當缺乏 leptin 基因之個體，予以注射 leptin，可抑制 T 淋巴球產生細胞激素 (Fantuzzi, 2005; Farooqi et al., 2002)。Leptin 也具有調節能量攝取及消耗的作用，主要是透過神經中樞下視丘(hypothalamic)調控神經胜肽 Y (neuropeptide Y, NPY)，因而抑制食慾，也具有一些重要的內分泌功能，包括：調節免疫功能、造血 (hematopoiesis)、血管新生 (angiogenesis) 及骨骼發展。

貳、Adiponectin

Adiponectin 是由脂肪細胞分泌之細胞激素，分子量約 30 kDa，又名 Acrp30 (adipocyte complement-related protein of 30 KD)、apM1 (adipose most abundant gene transcript 1)、AdipoQ 或 GBP28 (gelatin binding protein of 28 KD)，具有抗發炎、保護血管、抗糖尿病之效用 (Guzik, Mangalat, & Korbut, 2006)。在血液中濃度相較於其他種類的細胞激素是較高的，健康的個體正常濃度為 1.9-17.0 mg/dl，

而肥胖者顯著較低 (Arita et al., 1999)。

Adiponectin具有促進胰島素的敏感性的功能可能原因是 (1)增加脂質氧化 (2)直接影響胰島素訊息傳導路徑(3)抑制糖質新生作用(4)抑制脂肪組織上TNF- α 的訊號傳遞 (Beltowski, 2003)。Yamauchi等人認為adiponectin不會影響脂肪組織中hormone-sensitive lipase, HSL的作用，因此血液中脂肪酸含量降低的原因可能是adiponectin增加參與脂肪酸代謝的蛋白質(如：acyl-CoA oxidase)之表現量，進而加速肌細胞中脂肪酸氧化速率，且亦可促進PPAR- α 活化，增加脂肪酸代謝，降低肥胖及高血脂小鼠血中TG含量 (Yamauchi et al., 2001)。因此，Adiponectin對於脂質代謝也扮演一個重要的角色。

Adiponectin可減少內皮細胞黏附因子ICAM-1、VCAM-1之表現，抑制單核球黏附到內皮細胞上，且減少 scavenger receptors 表現，使巨噬細胞無法形成 foam cell (Kershaw & Flier, 2004)；以 recombinant adenovirus expressing human adiponectin (Ad-APN)處理 apoE knockout mice，使 adiponectin 過度表現，其血漿中 adiponectin 濃度顯著增加，可顯著抑制主動脈竇損傷，減少 VCAM-1 及 class A scavenger receptor 之 mRNA 表現量，發現體內 adiponectin 濃度高可抑制動脈粥狀硬化之發展，具有抗動脈粥狀硬化之功效 (Kershaw & Flier, 2004; Okamoto et al., 2002)。

第三節 PPARs 及 LXR_s 對於脂質代謝的角色

壹、PPARs 與 LXR_s

過氧化體增殖劑活化受器 (peroxisome proliferators activated receptors, PPARs)及肝臟 X 受器(liver X receptors, LXR_s)皆為被配子活化 (ligand)的轉錄因子，屬於核內受器的家族成員。PPARs 及 LXR_s 皆可調控目標基因的轉錄作用，當 ligand 與受器結合後形成 heterodimers，分別辨識目標基因 promoter region 上特定序列 PPRE、LXRE，與 coactivator complex 結合後，啟動目標基因的轉錄作用，但若是吸引 corepressor complexes 與之結合後，抑制轉錄作用。PPARs 及 LXR_s 的促效劑 (agonists)能夠抑制其他訊息轉錄因子的作用，如核內轉錄因子 κ B (nuclear factor - κ B, NF- κ B)、活化劑蛋白-1 (activator protein-1, AP-1) (Blaschke, Takata, Caglayan, Law, & Hsueh, 2006; Li & Glass, 2004)。

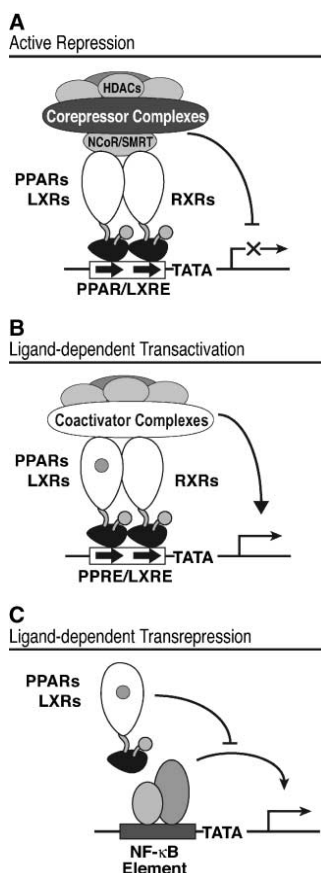


圖 2-2 PPARs 及 LXR_s 轉錄機轉 (Li & Glass, 2004)

LXRs 家族主要有兩種成員，包括：LXR α (NR1H3)、LXR β (NR1H2)；而 PPARs 主要有三種 isoform，分別為 α 、 β/δ 、 γ ，其表現組織器官不同且各司不同生理功能(表 2-2)。

表 2-3 LXRs 及 PPARs 主要表現之組織及其生理作用

(Li & Glass, 2004)

	LXRs		PPARs		
	LXR α	LXR β	PPAR α	PPAR γ	PPAR δ
表現之組織	肝 巨噬細胞	全身組織廣泛存在	肝 心臟 腎臟 腎上腺	脂肪組織 脾臟 腎上腺 大腸	很多組織
生理作用	↓ 膽固醇吸收(小腸) ↑ 膽固醇排除(肝) ↑ 膽固醇釋放 (周邊組織) ↑ VLDL 合成(肝) ↑ 脂肪酸生合成 (肝及 周邊組織)		TG-rich 的脂蛋白合成及代謝 ↑ β -oxidation 抗發炎	脂肪細胞發展 葡萄糖恆定 抗發炎	血管內皮細胞生物作用 能量利用 脂質代謝
目標疾病	↓ 動脈粥狀硬化		高血脂	第 2 型糖尿病	

貳、PPAR α 與脂質代謝、肥胖、動脈粥狀硬化的相關性

PPAR α 具有調節參與 FFAs 氧化及傳送的蛋白質表現的功能，進而調控脂質代謝及能量恆定。活化 PPAR α 影響體內脂質代謝可能的機轉如下：

(1) 促進脂肪酸氧化：促進參與過氧化體 β -oxidation 酵素之轉錄作用，如：

long-chain acyl-CoA synthetase、acyl CoA oxidase；增加 carnitine palmitoyl transferase I 的表現，加速脂肪酸通過細胞膜進入粒線體進行氧化。

(2) 減少脂肪酸合成：破壞 acetyl-CoA carboxylase 及 fatty acid synthase 的作用。

(3) 促進肝中 apoA- I 及 apoA- II 的合成，增加血液中 HDL 的濃度。(Y. X. Wang et al., 2003)

(4) 透過基因轉錄作用增加 LPL 的活性，或間接抑制 LPL 活化作用的抑制劑 apoC-III，使血液中 TG 濃度下降

(Blaschke et al., 2006; Ye et al., 2003; Zuckerman, Kauffman, & Evans, 2002)

PPAR α 亦具有調控肝臟急性期發炎反應之功效。肝臟主要合成 C-reactive protein(CRP)、fibrinogen 及 serum amyloid A(SSA)等蛋白質(Zandbergen & Plutzky, 2007)。在人類肝細胞上，PPAR α 活化劑可增加 I κ B α 表現，抑制 p50-NF κ B 進到核內，且減少 CEBP β 及 p50-NF κ B 蛋白質表現量，進而降低核內轉錄因子 CEBP β 與 p50-NF κ B 複合體形成，抑制 CRP 表現，而在小鼠模式轉殖人類 CRP 蛋白，PPAR α 活化劑亦可降低血液中 CRP 濃度 (Kleemann et al., 2003)。缺乏 PPAR α 基因的小鼠肝細胞上 SSA 基因的表現量顯著增加，但在發炎反應的細胞激素刺激下若給予 PPAR α agonists 治療，可減少 CRP 表現(Gervois et al., 2004)。

PPAR α activator 除了在肝中表現外，也表現在血管平滑肌細胞、內皮細胞及單核球/巨噬細胞上。在內皮細胞上，PPAR α ligands 降低 VCAM-1 表現，因而減少單核球細胞黏附至內皮細胞上(Marx, Sukhova, Collins, Libby, & Plutzky, 1999)；PPAR α activator 會誘導巨噬細胞上參與 cholesterol efflux 的 transporter(如 HDL 接受器 CLA-1/SR-B I 及 ABCA1)，增加膽固醇逆傳送作用，減少脂肪條的

生成，因而降低動脈粥狀硬化之發生(Chinetti et al., 2000; Chinetti et al., 2001)。但是在動物模式上對於動脈粥狀硬化的效用意見分歧，使用缺乏 PPAR α 的巨噬細胞轉殖進入小鼠骨髓內，結果顯示可以減少動脈粥狀硬化，但若在 apoE knockout 小鼠身上缺乏 PPAR α 基因動脈硬化情形反而更嚴重(Tordjman et al., 2001)，PPAR α 在小鼠模式是否能夠保護動脈硬化仍須進一步證實。

肥胖造成血液中游離脂肪酸的濃度增加，刺激胰島素釋放，緩慢造成 β -cell 功能受損，進而產生胰島素阻抗，最終可能演變成第 2 型糖尿病。過去研究指出 PPAR α agonists 可顯著降低血液中之 TG 濃度、預防高脂飲食產生的肥胖、減少肝臟發炎、降低動脈粥狀硬化發生及促進胰島素敏感性之功能(Guerre-Millo et al., 2000; H. Kim et al., 2003)，在醫學上廣泛使用在高血脂病人身上的 fibrate 類藥物(如：fenofibrate、bezafibrate)，主要作用為降血脂，亦為 PPAR α 的 agonists。因此，若能從飲食中找出具有 PPAR α agonists 之作用的之食材，可有效的減少肥胖、胰島素阻抗、脂質代謝異常、心血管疾病…等代謝症候群相關之病灶。

參、LXRs 與體內代謝恆定之關係

LXRs 為肝臟、脂肪組織上 FFAs 及 TG 生合成的重要關鍵因子，主要調控體內膽固醇、脂肪酸的代謝，可能也會交互影響到胰島素訊息傳導途徑，進而調節醣類代謝作用(Ulven, Dalen, Gustafsson, & Nebb, 2005)。目前提出且被發現的主要功能如下 (Kovanen & Pentikainen, 2003; Li & Glass, 2004; Ulven et al., 2005)：

- (1) 調控巨噬細胞內 reverse cholesterol transporter 的作用：ABCA1 及 ABCG1 的作用為幫助膽固醇及磷脂質從細胞內傳送給細胞外膽固醇的接受者(apo A I 或 apo E)，而 LXRs 能夠誘導 ABCA1 及 ABCG1 的表現，進而促進膽固醇的逆傳送作用。
- (2) 參與肝臟脂肪酸的代謝：LXRs 藉由活化參與脂肪酸合成的基因表現，包括 SREBP-1c 及 fatty acid synthase，進而促進肝臟三酸甘油酯的生合成作用；LXRs 促進 LPL 的合成，富含 TG 的 lipoprotein 的 TG 水解成 FFA 進到脂肪組織儲存或是到肌肉中做為能量消耗，因此 LXRs 也具有促進周邊組織脂肪酸增加的功效。
- (3) 幫助肝臟膽汁代謝：LXRs 能夠調控肝臟膽固醇分泌的基因表現(如：膽酸生合成關鍵酵素 CYP7A1)，促進膽酸形成，增加膽固醇排除。

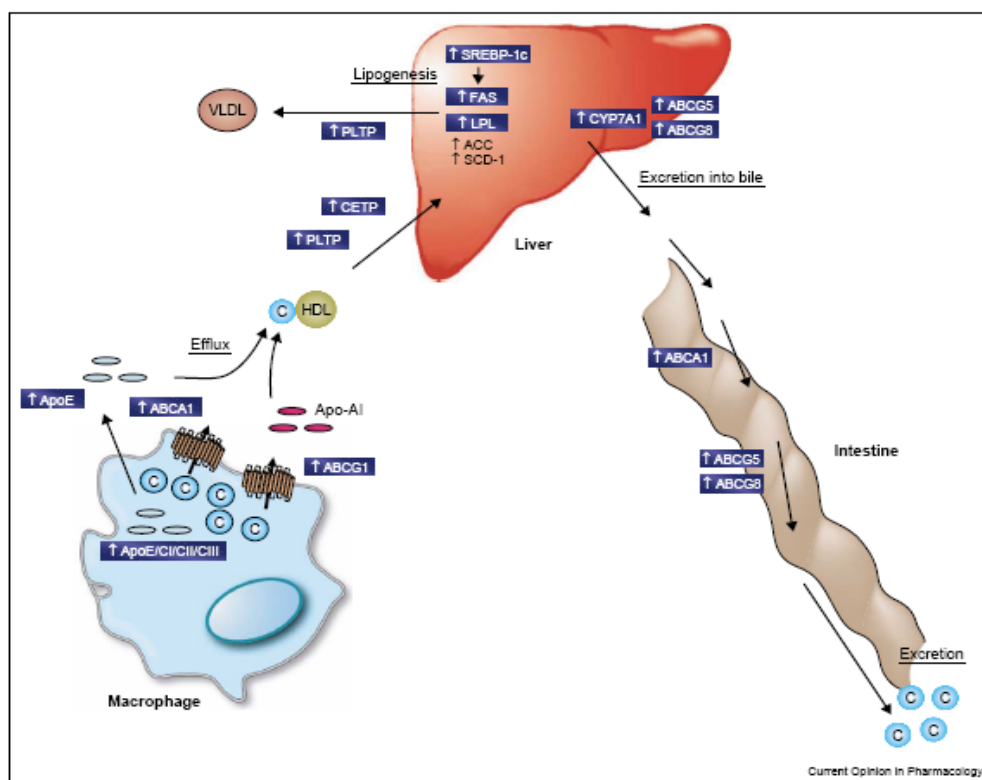


圖 2-3 LXR 對於體內脂質恆定的調節機轉 (Sean et al, 2003)

體外及體內研究指出，insulin 可增加 SREBP-1c 的基因表現，且 insulin 調控參與脂肪生合成的基因表現需要透過 SREBP1-c 的媒介，Tobin 等人提出 LXR $\alpha\beta$ double knockout 小鼠注射 insulin 後，能夠顯著抑制體內參與脂肪酸合成的酵素表現(Tobin et al., 2002; Ulven et al., 2005)，且 SREBP-1c 為 LXR 調控的目標基因，所以認為 LXR 在肝中可視為 insulin 作用的媒介者 (Ulven et al., 2005)。此外，LXR 不僅能夠調節肝中脂質代謝，對於脂肪組織也有其生理作用。3T3-L1 細胞受到 LXR agonists 活化後，LXR 調控 GLUT4 的表現進而促進葡萄糖進入細胞內，可能的機轉為：當 LXR 被活化後，誘導脂肪酸生合成途徑，藉由代謝葡萄糖使之轉變成脂肪酸作為 TG 合成的原料(Laffitte et al., 2003)，而體外實驗發現以 LXR agonists 處理分化的脂肪細胞，增加脂肪堆積，是透過增加脂肪細胞上 LXR 的目標基因 (如：SREBP-1c、ACC、FAS) 的表現量所致(Juvel et al., 2003)，因此，LXR 可能具有調節體內葡萄糖代謝之功效。

第四節 實驗動物模式

壹、ApoE knockout mice

較佳的動脈粥狀硬化動物模式，須能夠自然發生損傷且與人類動脈損傷過程相近且血中脂蛋白之 profile 代謝與人類相似。而小鼠與人類之間的脂蛋白代謝有很大的差異，人類血中約 75% 的膽固醇皆由 LDL 攜帶，而小鼠則由 HDL 所攜帶，HDL 具有保護動脈粥狀硬化之效用，若 wild type 的老鼠餵食一般低脂 chow diet 並不會造成動脈粥狀硬化，因此，一般小鼠並非良好的動脈粥狀硬化模式。

在參與脂質代謝的基因中，發現 apolipoproteinE (apoE) 基因扮演一個重要的角色。ApoE 是一種醣蛋白，分子量約 34kDa，在人類及小鼠身上，主要在肝臟、腦及其他組織合成，存在除了 LDL 以外的脂蛋白中。ApoE 的功能主要是參與脂蛋白的代謝，為細胞表面脂蛋白接受器 (LDL-receptor, LDLr) 及 LDLr-related proteins (LRPs) 之 ligand，促進致動脈硬化之脂蛋白清除，並使肝臟回收富含 TG 的脂蛋白(Hui, Innerarity, & Mahley, 1981; Jawien, Nastalek, & Korbut, 2004)。ApoE 也具有細胞內膽固醇接收之功能，幫助泡沫細胞形成時膽固醇的逆傳送作用。此外，近年更有研究發現，血管中的單核球及巨噬細胞可產生 apoE，認為 apoE 與體內膽固醇恆定及動脈粥狀硬化產生的發炎反應有關，因此具有抗動脈粥狀硬化之功效(Curtiss & Boisvert, 2000)。

最早在 1992 年 Breslow 及 Maeda 的實驗室中，以 C57BL/6 品系小鼠運用胚胎幹細胞剔除技術，培植出 apoE 基因缺乏小鼠 (apoE knockout mice)。其將小鼠進行血脂分析，發現餵食 chow diet 後，血液中 TC 高達 434 ± 129 mg/dL，是一般小鼠的五倍，且不因性別及年齡而有差異；雖然血液中 TC 高於一般小鼠，但 HDL-C 卻較一般小鼠低 45%；而 TG 則高於一般小鼠之 68% (Jawien et al., 2004; Andrew S. Plump et al., 1992)。

對於動脈粥狀硬化的進展，Hayek 等人發展一套與美國人飲食型態相似的飲食，含 21% 脂肪、0.15% 膽固醇及不含膽酸(cholic acid)，稱為 western-type diet，

當餵食此種飲食 wild type 的小鼠血中膽固醇可增加兩倍，而 apoE knockout mice 血膽固醇可高達 2000mg/dl，其主要是 VLDL。當 apoE knockout mice 使用 western-type diet 可加速損傷形成並使增加損傷面積 (Jawien et al., 2004; Andrew S. Plump et al., 1992)。給予一般 chow diet，約 8 週齡出現單核球黏著，9 週齡產生泡沫細胞，15 週齡平滑肌增生損傷形成，20 週齡生成纖維斑塊 (fibrous plaque)；若給 western-type diet，約 6 週齡產生單核球黏著，8 週齡泡沫細胞生成，10 週齡平滑肌增生損傷形成，15 週齡產生纖維斑塊 (Nakashima et al., 1994)。ApoE 剔除鼠其動脈粥狀硬化進展與人類極相似，為一種用於動脈硬化研究良好的小型動物模式。

貳、卵巢切除誘發肥胖之動物模式

雌激素受器 ER α 、ER β 均可表現在人類及齧齒類動物的脂肪細胞上，認為雌激素可能作用在脂肪細胞上產生訊號傳遞路徑，但其代謝作用及確切的機轉仍不是很清楚。過去很多研究使用去除卵巢之齧齒類動物模擬停經後的狀態，探討雌激素在體內之作用及代謝反應。

雌激素具有調節脂肪儲存、影響體內脂質代謝、控制能量消耗降低攝食量及保護心血管疾病...等功用(Liang et al., 2002; Richard, 1986; Sullivan et al., 1995)。研究指出，大鼠切除卵巢 (ovariectomy) 後體內雌激素的量顯著低於假手術，飼養 22 週後其體重、體脂肪、總膽固醇、LDL-C 顯著高於假手術，若給予雌激素補充，可改善血脂及降低體重及體脂肪 (Meli et al., 2004)；卵巢切除之 Wistar rat 相較於假手術者，其攝食量顯著增加，導致體重上升及腹部脂肪堆積(Liang et al., 2002)；C57BL6/J 小鼠卵巢切除後給予高脂飲食，其體重、白色脂肪組織量顯著增加，高於卵巢切除之低脂飲食組及假手術之高脂飲食組 (Jeong et al., 2004)，另一研究指出卵巢切除之 C57BL6/J 小鼠給予雌激素治療，可降低脂肪細胞的量及大小，血液中 leptin 及 resistin 濃度下降，降低肝中參與脂質代謝相關基因的表現量(FAS、ACC-1、SREBP-1c)。因此，卵巢切除之齧齒類動物模式，會增加食物攝取、體重及體脂肪量、改變脂質代謝，認為性固醇(gonadal steroids)可能調控肥胖的發展，且卵巢切除之動物其荷爾蒙狀態與停經後之女性相似，能夠誘發中廣型肥胖，進而探討與代謝症候群相關之病症，為模擬停經後婦女之狀態的一個良好模式。

第五節 植物性雌激素 (phytoestrogen)

壹、植物性雌激素之生理作用

植物性雌激素是一種存在於植物中的化學物質，其構造與雌激素相似，對停經後婦女可提供雌激素活性，而對於原本具備足夠雌激素之未停經女性，反而可以拮抗雌激素活性，其同時具有雌激素促進劑與拮抗劑之效用，將之視為一種選擇性雌激素受體調節器 (selective estrogen receptor modulators, SERMs)。

植物性雌激素與雌激素構造並不相同，但卻能與雌激素受器結合，產生雌激素活性。而主要有兩種雌激素受器被鑑定出來，分別為 ER α 、ER β ，此兩受器功能相似，但其調節機制、在人體內分佈及對物質結合親和力不同而有不同的作用 (Harding *et al.*, 1990)。 α 受器主要分佈於子宮、睪丸、腦下垂體、卵巢、腎上腺等性器官或組織， β 受器主要分佈在心臟、骨骼、腎、肺、卵巢、尿道等 (Enmark & Gustafsson, 1999)。人體卵巢雌激素對這兩種受器的親和力相同，故乳癌風險較大，但植物性雌激素對 ER β 親和力較強，可選擇性作用在心血管與骨骼，減少刺激乳房或子宮內膜。雖然與雌激素相較之下，植物性雌激素和受器親和力較差，但因其日常攝取量高，在血漿中濃度可比血清中內生性雌激素高 100 倍以上 (Adlercreutz, Markkanen, & Watanabe, 1993)，與內生性雌激素競爭結合雌激素受器，結合後活性為內生性雌激素的一百至一千分之一 (Miksicek, 1994)，故可抑制內生性雌激素作用，降低致癌性。

貳、植物性雌激素分類及來源

目前已知的植物性雌激素主要有：異黃酮 (isoflavone)、木質素 (lignan)、香豆素 (coumestane)，其中研究最多的主要是異黃酮、其次是木質素。異黃酮主要食物來源為黃豆及其製品，而木質素來源為蔬果、高纖穀類及種子，其中認為木質素含量最多的食物為胡麻子 (flaxseed)，其次為芝麻 (sesame)，而香豆素主要來自苜蓿及牧草。(周輝政等人，2002) 以下針對本研究所使用可能具有植物性雌激素活性之食材做介紹：

(一) 芝麻(sesame)

芝麻(sesame)，學名 *Sesamum indicum* L.，為一年生草本植物，在中國已經使用上千年的歷史。古書藥典上，視芝麻油為一良好之食療補品，最早於《神農本草經》上記載，名為胡麻，其功效為「芝麻味甜平，主傷中虛羸，補五內，益氣力，長肌肉，填髓腦，久服輕身不老」，而本草綱目上記載芝麻對「身體虛弱、頭暈耳鳴、大便秘結頗有驗效，對鬚早白、產婦奶水不足亦有作用。」

芝麻的 lignans 主要為 sesamin、sesamol 及 sesamol，總含量約 1% (10 mg/g) (Kamal-Eldin, Pettersson, & Appelqvist, 1995)，構造與亞麻籽中的 lignans 大不相同，過去並不被認為是植物性雌激素的來源，但最近有研究發現老鼠或人類攝入芝麻或 sesamin 後，腸內菌會將其代謝成 enterolactone (END) 及 enterodiol (ENL) (Coulman et al., 2005; Z. Liu, Saarinen, & Thompson, 2006; Penalvo et al., 2005)，此兩物為哺乳類之 lignans 與雌激素受器 α 、 β 有弱的結合力，Penttinen 等人經由體內及體外實驗指出 enterolactone 是一種選擇性之 ER α 促進劑，可誘發調節雌激素接受器之轉錄作用，具有雌激素之活性。(Penttinen et al., 2007) 芝麻之 lignan 及其代謝產物(END、ENL)經動物、細胞及人體試驗發現具有許多生理效用，包括：抗氧化 (antioxidant) (Akimoto et al., 1993; Yamashita et al., 1992)、抗癌 (anticarcinogen) (Yokota et al., 2007)、降血壓 (Kita et al., 1995; Matsumura et al., 1995)、預防血栓形成 (P. R. Chen, Tsai, Chang, Liu, & Lee, 2005)及降血脂 (Hirata

et al., 1996; Hirose et al., 1991; Ogawa et al., 1995)。

(二) 山藥 (yam)

山藥 (yam)，學名 *Dioscorea* spp，宋陳熙撰負暄野錄記載：因為唐代宗名預，避諱而改稱薯藥；到了宋代又有英宗名著，再改稱山藥。為薯蕷科(Dioscoreaceae)薯蕷屬(*Dioscorea*)之蔓性植物(Climbing Plant)，原名薯蕷，俗名淮山、山芋、田薯、山薯、長薯、Yam 或 Chinese Yam，為多年生宿根蔓性草本植物 (久保利夫, 1944)。本次實驗使用的台農二號又稱田薯，為台灣省農業試驗所育得的新品種，栽種範圍廣，為中長型塊莖，長度約介於 20 到 50 公分，具有褐皮白肉、黏度高且不易變色之特徵 (劉新裕，王昭月，徐原田，胡敏夫，楊宏仁，何琦琛, 1996)。

鄭氏發現山藥乙酸乙酯萃取物可活化 ER α 與 ER β 。將台農二號山藥萃取物經矽膠管柱層析與製備式 HPLC 分離純化，經 NMR 及 mass 鑑定結構，找出山藥中能活化雌激素受器之成份一共有以下六種化合物，分別為：Hydro-Q9 chromene、 γ -tocopherol-9、RRR- α -tocopherol、coenzyme Q9、cycloartenol、及 1-feruloyl glycerol；這六種化合物皆會與 ER β 結合，指出山藥確實具有雌激素活性 (Cheng et al., 2007)。

山藥塊莖含有豐富的固醇類皂素，經水解去掉糖基的配糖體(aglycone)，稱為薯蕷皂甘素或稱薯蕷皂配基(diosgenin)，為類固醇皂元(steroidalsapogenin)之一種，可作為合成固醇類荷爾蒙、副腎腺皮質素和避孕藥等藥物之原料 (Joseph et al., 1999)。

(三) 苜蓿 (alfalfa)

苜蓿(alfalfa)，學名 *Medicago sativa* L.，禾本科，多年生豆草，立叢生，葉為羽狀三出複葉，輪生，株高 60~90 公分，原產於亞洲西南部，有甚高的飼料價值，其品種甚多，本研究所用之品種為澳洲紫花苜蓿，阿拉伯人稱紫花苜蓿為「AL-FAL-FA」，譯成英文為「father of all foods」，意指所有食物之父，又有「藥草之王」之稱，其營養價值遠勝於其他豆類。

苜蓿含有具植物性雌激素活性的 coumestrol，為 coumestane 的一種，具有刺激子宮的活性。研究指出 coumestrol 與 ER α 及 ER β 的結合能力有選擇性，其與 ER α 的親和力低於 E₂，但與 ER β 親和力甚至高於 E₂ (Kuiper et al., 1998)。另一項研究指出苜蓿芽具有植物性雌激素活性成分，可活化雌激素接受器 ER (Boue et al., 2003)。

(四) 異黃酮 (isoflavone)

在豆科植物中含量很高，如大豆，主要包含去糖基(aglycones)之化合物 genistein 及 daidzein 及具糖基(glycosides)之化合物 genistin 及 daidzin。genistein 本身具有雌激素活性，而 daidzein 本來並無雌激素活性，但在腸道內會經由微生物作用轉變為具雌激素活性的 equol，轉換率因個體不同而有差異。其中 daidzein 比 genistein 少一個 OH 基，因此極性較弱，與 ER 結合能力較 genistein 差，而 genistein 與 ER β 親和力和內生性雌激素 E₂ 相似，有研究指出經卵巢切除的大鼠，給予大豆異黃酮之 genistein，其與 ER β 之親和力大於 ER α 及 E₂ 20 倍，可與 E₂ 競爭，選擇性的作用在血管上，抑制血管平滑肌細胞增生，具有保護血管之效用 (Makela et al., 1999)。

參、植物性雌激素與抗代謝症候群之相關研究

(一) 芝麻

(1) sesamin

Sesamin 藉由抑制 HMG-CoA reductase 之活性，因而抑制肝中膽固醇之吸收及合成作用，降低大鼠血膽固醇濃度(Hirose et al., 1991)；在 SHRSP 模式觀察到 sesamin 及 episesamin 對於脂質代謝之差異，sesamin 可顯著預防膽固醇堆積在肝中，但 episesamin 相較於 sesamin 可能藉由降低肝中粒線體 acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 及增加 cholesterol 7 α -hydroxylase 之活性，有效調節肝及血液之膽固醇代謝 (Ogawa et al., 1995)；且在高血膽固醇的人也觀察到，sesamin 亦可降低其血中膽固醇濃度，特別是 LDL-C (Hirata et al., 1996)。此外，sesamin 也影響到肝中脂肪酸氧化及合成作用，Ashakumary 等人提出 sesamin 可藉由降低大鼠肝中之脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase) 和 pyruvate kinase 之活性及表現量，但增加 malic enzyme 之活性及表現量，因而增加肝中脂肪酸氧化速率及減少脂肪酸合成，推測其可能是透過調控 PPAR α 之活性，影響肝中脂質代謝之機轉，亦可降血脂 (Ashakumary et al., 1999)，而 Ide 等人指出 sesamin 可減少大鼠肝中 SREBP-1c 的表現量，因而降低脂肪酸合成(Ide et al., 2001)。因此，綜合以上之研究，認為 sesamin 可能具有抑制肝中之膽固醇吸收及合成及促進脂肪酸氧化作用，且可減少膽固醇堆積在肝臟中，以達降血脂之功效。Kita 等人提出，sesamin 具有抗高血壓之效用(Kita et al., 1995)，而在有中風傾向且自發性產生高血壓之大鼠 (stroke-prone spontaneously hypertensive rats, SHRSP)模式，也指出若 sesamin 與 Vitamin E 一起食用，可降低血壓且減少血栓形成(Noguchi et al., 2001)。此外，在體外實驗中，指出 sesamin 及 sesamol 皆可誘導一氧化氮 (Nitric oxide, NO) 從內皮細胞中釋出，藉由增加 eNOS 之轉錄及轉譯作用而增加其 mRNA 及蛋白質表現量，且提高一氧化氮合成酶(NO synthase)之活性，因而造成 NO 分泌增加，可能抑制血栓之形成。(P. R. Chen et al., 2005; C. C. Lee et al., 2004)

(2) enterolactone (ENL)

哺乳動物攝取 lignan 可經由腸道微生物代謝成 enterolactone，經由腸道吸收進入血液後再到肝中進行腸肝循環，利用尿液排除體外。血液中 enterolactone 濃度在個體間差異甚大，約 0~100nM，流病研究觀察到乳癌罹患率與血液中 enterolactone 含量呈負相關(Piller, Chang-Claude, & Linseisen, 2006)，體外及體內實驗更指出 enterolactone 是一種選擇性雌激素接受器訊號調控者，具有雌激素效用，促進與雌激素訊號傳遞路徑有關的基因表現，為組織專一性雌激素接受器活化者(Penttinen et al., 2007)。此外，在體外實驗指出 END 及 ENL 能夠顯著抑制 7 α -hydroxylase 之活性，減少一級膽酸的形成推測具有預防大腸癌的效用(L. Q. Wang, 2002)。而 ENL 也具有保護心血管疾病之效用，Vanharanta 等人觀察中年男性血清中含高量 ENL 罹患冠心疾病的風險較低(Vanharanta et al., 1999)，但其確切生化機轉仍需進一步的研究。

(二) 山藥

過去已有許多研究指出山藥具有降血脂、抗氧化、降血糖及預防骨質流失等功效。添加 2%山藥於飼料中，餵食紐西蘭兔子 12 週相較於未添加組，其發現皆能顯著降低血清 TC、TG 及 LDL-C，且 HDL-C 濃度增加兩倍，主動脈斑塊損傷面積減少 43% (曾悅和, 2002)。山藥亦具有抗氧化功效，Chang 等人提出，將山藥粉末(200 mg/kg)添加於飼料中，可顯著降低血液中 TG、TC，降低肝臟中 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)表現量，主動脈損傷面積 40%顯著低於控制組 80%，因此認為山藥粉末中具有降低氧化壓力及改善動脈粥狀損傷之成分(Chang, Yu, Wu, Tseng, & Wu, 2005)。林氏提出本土台農二號山藥水草物可顯著下降 BALB/c 雌鼠血液 TC 及 LDL-C/HDL-C ratio，顯示其具有降血脂之功效(林慧如, 2003)，另外洪氏亦指出蒸熟的台農二號山藥具有延緩停經後骨質密度流失之效用，且是腸道發酵的良好基質(洪菱窈, 2006)。糖尿病兔子予以餵食山藥甲醇萃取物 (20 mg/kgw)亦可達降血糖與緩和糖尿病症狀之效果，但其對於調節血

糖之機制仍不清楚，需更進一步探究(Iwu et al., 1990)。

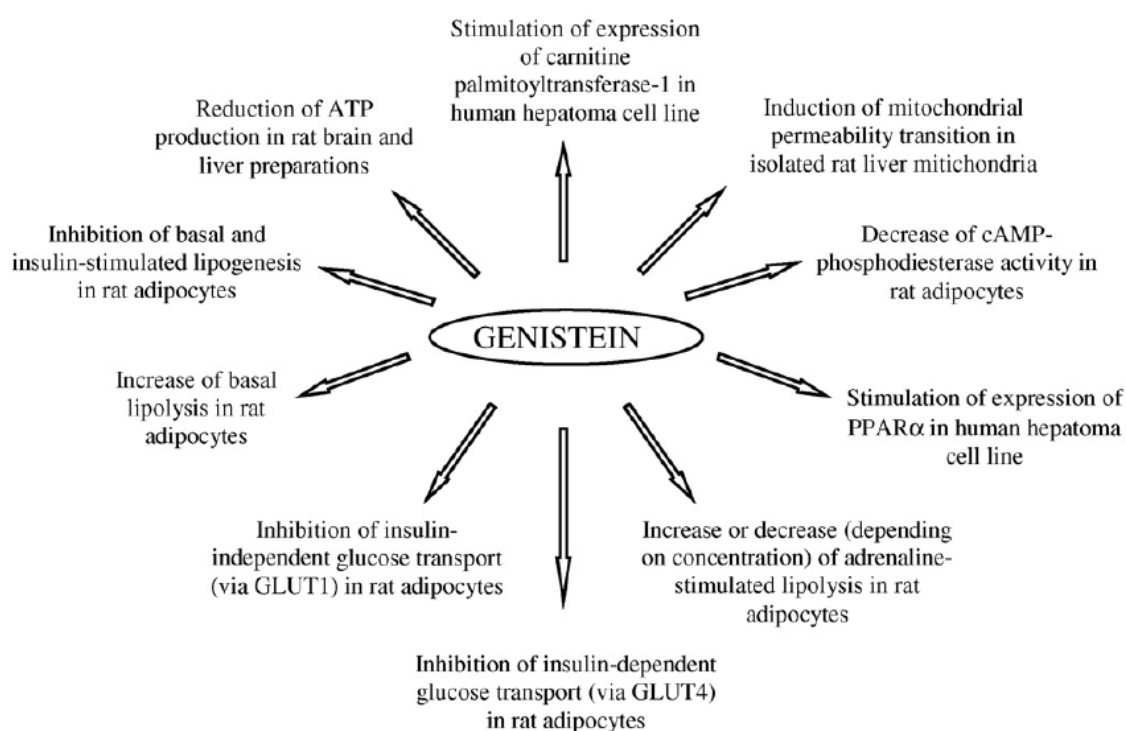
(三) 苜蓿

在雄性兔子主動脈內皮細胞上，以黃豆、苜蓿及西印度櫻桃(acerola)萃取物處理後，皆可減少修飾的 LDL(modified LDL)形成，顯示這些萃取物可能具有抗氧化能力(Hwang, Hodis, & Sevanian, 2001)。

(四) 異黃酮

很多體外及體內實驗指出大豆蛋白及大豆異黃酮能夠降低心血管疾病的風險，包括：降低 TG、TC 及增加 HDL/LDL ratio，藉由調控體內脂質代謝作用，抑制膽固醇吸收、增加膽酸排除及向上調控肝臟 LDL receptor 活性(Xiao, Mei, & Wood, 2008)。以 genistein 處理 HepG2 細胞，可降低 site-1 protease 的表現量，因而抑制 SREBP-1c 的活性，進而抑制受到 SREBP-1c 調控的與脂肪生合成有關之基因(SCD1、FAS、ACC α 、ACC β)的表現 (Shin et al., 2007)。研究指出，肥胖大鼠攝取一般黃豆蛋白(含大豆異黃酮)可降低肝中膽固醇濃度，及向下調控肝中 LXR、FAS 及 SREBP-1c 的 mRNA 表現量 (Tovar et al., 2005)，此外，黃豆蛋白可顯著降低大鼠肝中 TG、副睪脂肪堆積，且可透過活化肝中 PPAR α ，向上調控 CPT-1 mRNA 的表現量，進而增加脂肪酸氧化(Morifuji et al., Morifuji, Sanbongi, & Sugiura, 2006; Tovar et al., 2005)。因此認為 soy protein 及 isoflavone 具有降低肝內脂肪酸及膽固醇生合成及增加脂肪酸氧化之作用。飼料中添加黃豆，可增加能量消耗，顯著降低小鼠體重及減少脂肪細胞大小(Cederroth et al., 2007)，經過發酵過的黃豆其可將糖苷鍵去除，變成去糖基的異黃酮(如 daizein genistein)，可抑制體內吸收過多的脂質，且可顯著抑制 3T1-L1 脂肪細胞分化，具有抗肥胖之效用(Choi et al., 2007)，而卵巢切除小鼠投予不同劑量之 genistein 皆能夠降低脂肪組織堆積及減少 LPL mRNA 表現量，顯示其具有抗脂肪生成之效用(Naaz et al., 2003)，且可抑制食慾、降低體重及降體脂可預防停經後脂肪堆積在腹部(H. K. Kim et al., 2006)。餵食高異黃酮黃豆蛋白顯著改善 obese Zucker Rats 代謝症候

群，包括高胰島素血症、血糖不耐症、血脂異常、肝脂堆積等現象。最近研究發現 genistein 可能為 PPAR α ligand 可增加肝細胞上 PPAR α 表現量，且活化 PPAR α ，增加參與脂肪酸代謝的基因表現，促進脂肪代謝(S. Kim et al., 2004)。genistein 在體外實驗可能影響的代謝機轉如圖 2-3 所示，預期具有降血脂、減少脂肪生成、促進胰島素敏感、降血糖…等功效，能夠預防心血管疾病、與荷爾蒙相關癌症及代謝症候群(Szkudelska & Nogowski, 2007)。



(Szkudelska & Nogowski, 2007)

圖 2-4 genistein 在細胞模式上的作用機轉

第三章

芝麻素對動脈粥狀硬化之影響

第一節 前言

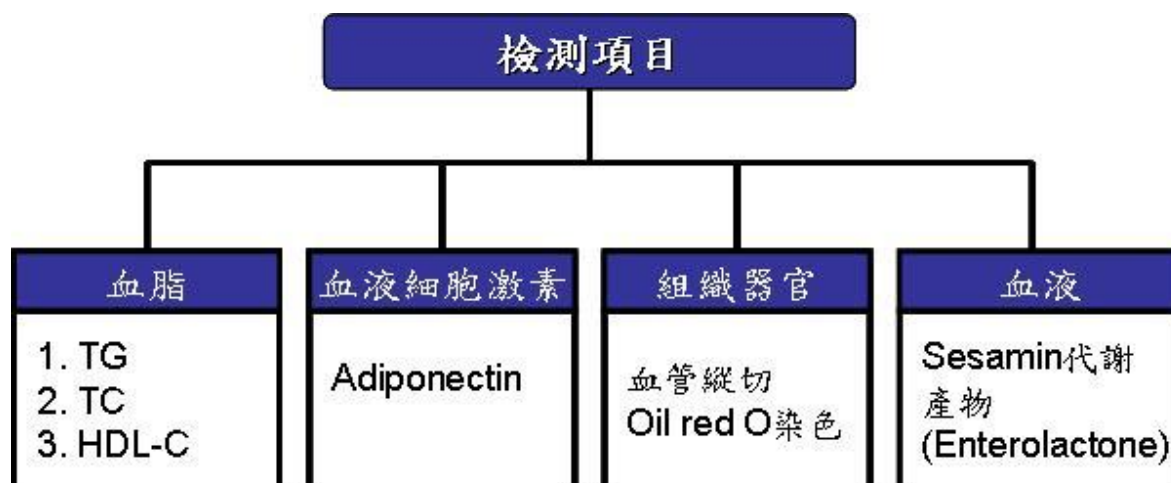
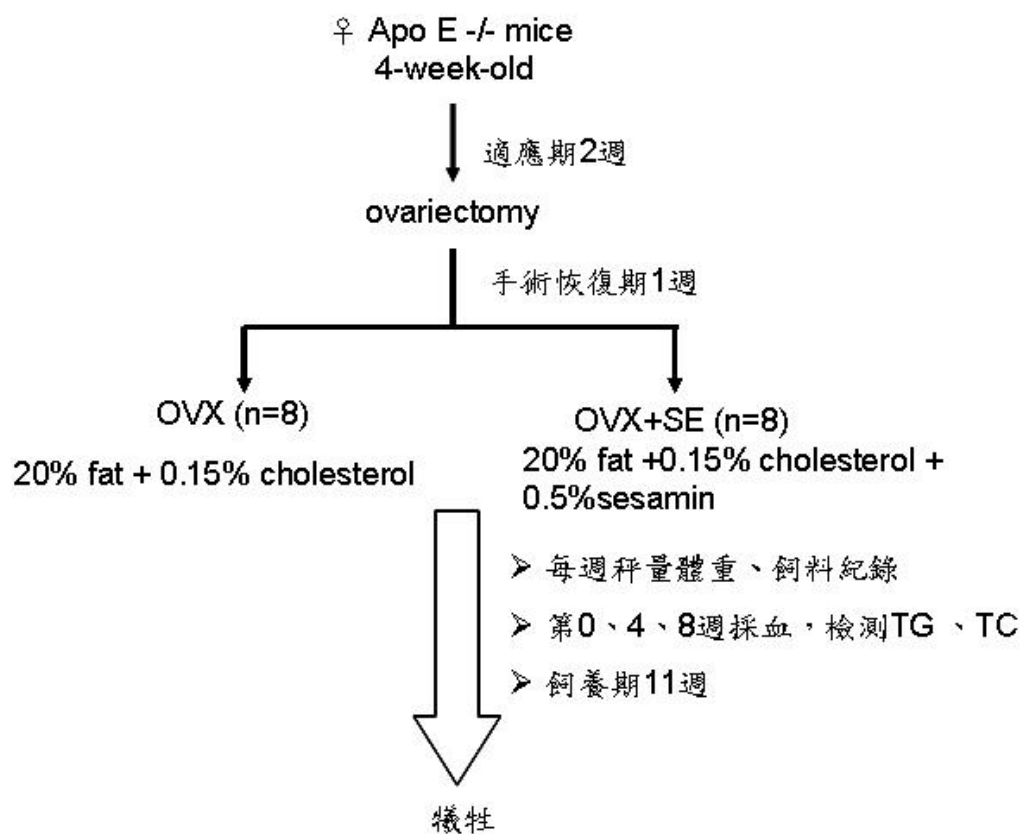
動脈粥狀硬化是一種複雜的病灶，早期血管內腔出現脂肪條堆積到後期斑塊形成，為期數十年，致使心血管疾病之發生。根據民國 96 年行政院衛生署公佈之國人十大死因，與動脈硬化相關之疾病包括腦血管及心臟疾病分別位居第 2 及第 3 位，顯示其對於國人健康影響深遠。

停經前的女性罹患心血管疾病之風險遠低於男性，但停經後心血管疾病風險激增為與男性相當，呈現粥瘤型血脂異常現象，可能起因於雌激素在體內濃度下降所致，因此認為雌激素對於心血管疾病可能具保護效用。植物性雌激素是一種存在於植物中的化學物質，其構造與雌激素相似，對停經後女性可提供雌激素活性，攝取高量之植物性雌激素，可降低荷爾蒙相關癌症及心血管疾病的罹患率。過去研究最多的植物性雌激素為異黃酮，而 sesamin 的代謝產物 ENL 亦具有雌激素效應。體外及體內實驗皆指出大豆蛋白及大豆異黃酮能夠降低心血管疾病的風險，包括：下降血液中 TG、TC 濃度及增加 HDL/LDL ratio (Xiao et al., 2008)。

由於齧齒類動物本身不易產生心血管疾病，若將 C57BL/6J 小鼠 apo E 基因剔除後，會自發性地產生動脈硬化，且其進展過程類似人類動脈硬化的各個不同時期 (Nakashima et al., 1994)，故本章研究使用 apoE^(-/-) 小鼠，並將其卵巢切除，模擬更年期女性體內代謝紊亂，引發血脂異常且易產生心血管疾病的狀態，觀察芝麻內容物 sesamin 是否能夠下降血液中 TG 及 TC、增加血液 HDL-C 及 adiponectin 濃度、減少脂肪堆積及減少血管內脂肪條產生，以瞭解 sesamin 對於保護心血管疾病的效用。

第二節 材料與方法

壹、實驗設計及流程



貳、動物飼養、飼料製備、組織取樣及樣品前處理

(一) 動物飼養

自成大醫學院動物中心購入 4 週大之 C57BL/6J apoE knockout 母鼠 19 隻，適應二週後進行卵巢切除手術，手術恢復期一週，適應期及手術恢復期給予 chow diet(MF-18,oriental yeast,日本)餵食。其中有兩隻老鼠因手術過程中麻醉過量致死，一隻因體型較小，故將其排除在外。剩餘 16 隻依體重排序 S 型分成兩組，並剪耳標辨別，分別為 OVX 組(20 % fat)及 OVX + EM 組(20%fat + 0.5 % sesamin)，以眼窩採血方式採取 baseline 血液後，開始給予實驗飼料。小鼠分別飼養於 4 個透明塑膠鼠籠中(4 隻/籠)，動物室環境溫度維持 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，光照週期 14 小時(上午 6 時至下午 20 時)，黑暗週期為 10 小時，飼料及飲水自由攝取，每週更換一次飼料並同時秤重紀錄飼料消耗情形，體重每週秤量一次，直至犧牲為止。

實驗過程中，OVX + EM 組 1 隻於實驗中期因採血過程不幸身亡，故 OVX + EM 組樣本數調整為 $n=7$ 。

(二) 飼料組成及製備

飼料基本組成是以 AIN-76(American Institute of Nutrition,1976)配方為依據再進行適度調整，將 fat 含量 5% (低脂)之 AIN-76 配方比例經調整過後，使 fat 含量 20% (高脂)飲食之 protein, mineral, vitamin, cellulose 其營養密度和 fat 5%相同，並將其 corn starch 與 sucrose 之比例修正為 1:1。實驗期間所使用之飼料組成如表 3-1 所示。

表 3-1 實驗期飼料之組成
Table 3-1 Composition of the Test Diets¹

Ingredients of diets ²	OVX	OVX+SE
	g/kg diet	
Casein ²	235	233
DL-methionine ²	3	3
Corn starch ²	224	223
Sucrose ²	224	223
Cellulose ²	59	59
Butter ²	190	189
safflower oil ²	10	10
AIN-76 mineral mixture ²	41	41
AIN-76 vitamine mixture ²	12	12
Choline ²	2	2
Cholesterol ²	1.5	1.5
Sesamin	-	5.0
Total calorie (Kcal/100g)	458.0	455.5
Calorie density (Kcal/g)	4.6	4.6
CHO/calorie (g /1000 Kcal)	100.4	100.5
Protein/calorie (g /1000 Kcal)	51.3	51.2
Fat/calorie (g /1000 Kcal)	43.7	43.7

1. The composition of AIN-76 Vitamin Mixture and AIN-76 Mineral mixture is as described in AIN. (1977)

2. Casein, ICN purified Biomedicals, Inc ; Metionine, Sigma M-9500 ; Corn starch, Samyang genex Co., LTD. SEOUL, Korea ; Cellulose, Vitacel J. Betten-maier & Sohn, Gernary ; Vitamin mixture, AIN-76, ICN Co. ; Mineral mixture, AIN-76, ICN Co. ; Choline, Sigma C-1879 ; Cholesterol, Hanawa, Japan ; safflower oil: 台糖紅花籽油 ; butter: 安佳無水奶油

半合成飼料成分包括酪蛋白 (ICN Biomed)、甲硫胺酸 (Sigma, USA)、玉米澱粉 (Samyang Genex corp, Seoul, Korea)、纖維素 (JRS. Vitacel, Germany)、AIN-76 礦物質混和物 (ICN Biomed)、AIN-76 維生素混和物 (ICN Biomed)、膽鹼 (Sigma)、膽固醇 (Hanawa, Japan)、紅花籽油 (台糖紅花籽油)、奶油 (安佳無水奶油)、實驗組的飼料另添加之芝麻抽出物 Sesamin, 含量為 95.7%, 由馬來西亞商食益補國際 (股) 公司台灣分公司白蘭氏所提供。

飼料配製方式須先將蔗糖用貴夫人牌磨粉機磨細後使用，再將其所有粉狀成份秤取所需重量，一一加入研鉢中磨細之後混勻。待其粉狀成份混勻後，分次拌入所需比例之奶油及紅花籽油，均勻混合後，以篩網過篩兩次，裝入雙層封口袋密封保存。添加物部份，芝麻抽出物 sesamin 與粉狀成份一同處理。

將粉末飼料製成固體之方式為取一定量粉末緩慢分次加入二次水，稍微攪拌待其可成團即可，秤重，捏成長方形塊狀，置入烘箱中以 40°C 低溫烘乾兩天，秤重後裝入密封袋並置於-20°C 冰箱保存。

(三) 動物犧牲及樣本收集

實驗開始第 0 週先以眼窩採血的方式採集 baseline 血液樣本約 100 μ l，之後開始餵食飼料，在第 4、8 週也以同樣的方式採集血液樣本約 100 μ l，最後於第 11 週進行犧牲，每次採集血樣或犧牲前必須取走飼料隔夜禁食 12~15 小時。犧牲當日先行秤重，以乙醚麻醉，眼窩採血至少 1ml，再注射過量麻醉藥讓動物安樂死後，迅速取下肝臟、腎周脂、子宮周圍脂肪秤重紀錄後丟入液態氮急速冷凍，保存於-80°C 備用；取；脾臟及腎臟秤重記錄。從腹部剖開至胸，以鑷子將腹主動脈 (abdominal aorta) 及胸主動脈 (thoracic aorta) 與周圍之組織分離，接者以鑷子小心將整段動脈挑起，並除去黏附在動脈上的結締組織，以剪刀將動脈連同部分心臟取下，稍微吸乾周圍組織液後秤重，放入含 PBS 之滅菌拋棄式培養皿中，盡量移除動脈周圍之結締組織，隨後將胸主動脈與腹主動脈分成兩段，胸主動脈放入含 4% 福馬林 (paraformaldehyde) 之 PBS 固定液中進行固定 3 小時，腹主動脈則以液態氮冷凍之。血液以 3500g、4°C 15min 離心後，取上層血清分裝保存於-80°C，供日後分析。

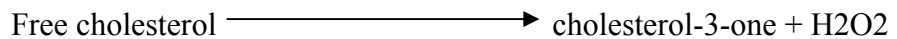
參、血液脂質分析

(一) 血清中膽固醇 (total cholesterol) 含量測定

1. 原理

利用 detergent 將膽固醇及膽固醇酯自 lipoprotein 中釋出，再以 cholesterol

esterase 水解膽固醇酯可得游離膽固醇(free cholesterol)。

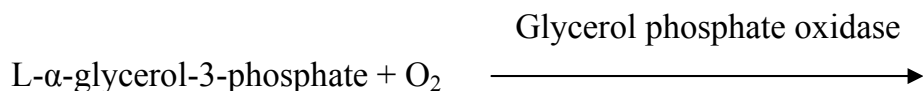
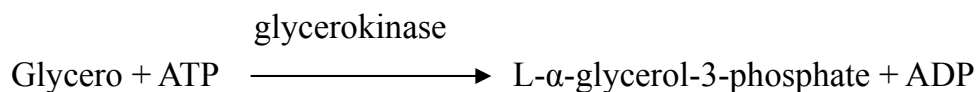
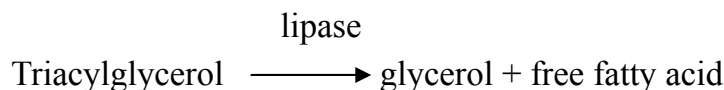


2. 實驗方法

6 μl 血清以生理食鹽水等倍稀釋後，取 5 μl 稀釋後之血清加入於 96 well plate 後再加入 200 μl 反應試劑，反應 10 分鐘，作二重複，使用市售組合試劑 (Randox)，以 Enzymatic CHOD-PAP method 測定。產生紅色的 quinoneimine 測其 500nm 吸光值。以 cholesterol calibrator standard(Randox)做一標準曲線，利用內插法推算其濃度。

(二) 血清中三酸甘油脂(triglyceride)含量測定

1. 原理



2. 實驗方法

取 5 μl 血清加入 96 well plate 中，再加 200 μl 反應試劑，反應時間 10 分鐘，作二重複，使用市售組合試劑 (Randox)，以 Enzymatic CHOD-PAP method 測定。在 peroxidase 催化下， H_2O_2 與 4-aminophenazone 和 4-chlorophenol 作用，產生紅色的 quinoeimine，測其 500nm 吸光值。以 triglyceride calibrator standard(Randox)做一標準曲線，利用內插法推算其濃度。

(三) 血清中高密度脂蛋白膽固醇(HDL-C)含量測定

取 20 μl 血清加入 40 μl 沉澱劑 (Randox)，利用沉澱劑中磷鎢酸 (phosphotungstic acid)及氯化鎂可將血清中含 apoB 的脂蛋白(LDL、VLDL)沉澱，離心後取上層含 HDL 部分，同前述 enzymatic CHOD-PAR 法進行二重複測定

HDL 的膽固醇濃度，以 cholesterol calibrator standard(Randox)做一標準曲線，利用內插法推算其濃度。

肆、血清 adiponectin 分析

1. 原理

本實驗採用市售 adiponectin/Acrp30 ELISA set (R&D)，根據三明治(sandwich)酵素免疫分析原理測量血液中 adiponectin 濃度，此法係利用 96 孔的分析盤中已結合抗 adiponectin 的單株抗體，可與 adiponectin 分子專一結合，再結合 horseradish peroxidase conjugates anti mouse adiponectin polyclonal antibody，藉由 horseradish peroxidase 與 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine 及 H₂O₂ 反應呈色而得知樣本中 adiponectin 濃度。

2. 實驗方法

(a) plate 製備

加入 100μl 稀釋過的 Capture Ab 至 96 well plate，保存於 4°C 隔夜靜置。以 400μl PBST 洗 5 次，拍打數次後移除多餘液體，加入 Block buffer 300μl/well，室溫下靜置 1 小時，再以 400μl PBST 洗 5 次。

(b) 實驗流程

加入 50μl 標準品(序列稀釋)、血樣(稀釋 2000 倍)入分析盤中，室溫靜置 2 小時後，以 400μl PBST 洗 6 次，使未結合的樣本在清洗的過程中被洗去，再加入 100μl biotinylated goat anti-mouse adiponectin(detection antibody)室溫靜置 2 小時，以 400μl PBST 洗 6 次，再加入 100μl Streptavidin-HRP，室溫下避光靜置 20 分鐘，以 400μl PBST 洗 7 次，最後加入 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine 及 H₂O₂(新鮮配製)，室溫下避光反應 20 分鐘後加入 2 N H₂SO₄ 終止酵素呈色反應，使藍色產物變為黃色，於波長 450 nm 讀取吸光值，吸光值愈高表示樣品中所含 adiponectin 濃度愈高，其濃度利用標準品並乘上稀釋倍數即可相對換算出。

伍、血清中 enterolactone 含量測定

1. 原理

本實驗採用市售 Enterolactone ELISA kit (cayman)，根據 Competitive Enzyme Immunoassay 分析原理測量血液中 enterolactone 濃度，此法係利用一定量無標記的 mouse monoclonal antibody 附著在孔盤底部，再加入標記的 enterolactone tracer (enterolactone 與 acetylcholinesterase (AChE) 結合) 及無標記的 enterolactone 互相競爭與吸附在塑膠孔內的抗體結合，洗去非專一性結合後，反應呈色，藉由加入不同量的未標記的已知抗原標準品畫出曲線可比較得知測定樣品中 enterolactone 含量。

2. 方法

將所需的溶液製備好後，依序加入分析孔盤中。加入 100 μ l ELA buffer 至非專一性結合 (NSB) 的孔洞內，加入 50 μ l ELA buffer 至 Maximum Binding (B_0) 孔洞內，再將 50 μ l 標準品及樣品加入孔洞，做二重複，隨後加入 50 μ l enterolactone AChE tracer 入各孔洞中 (除了 Total Activity (TA) 及 Blank (Blk) 外)，最後加入 50 μ l enterolactone antiserum 入各孔洞 (除了 Total Activity (TA)、Blank (Blk) 及 (NEB) 外)，將 plate 覆蓋好，放至 4 $^{\circ}$ C 反應 overnight。隔天，以 wash buffer 洗掉非專一性結合，wash 五次後拍乾，最後在每個 well 中加入 200 μ l Ellman's Reagent，且在 TA 孔洞加入 5 μ l tracer，避光搖晃 90~120 分鐘，於波長 405~420 nm 下可測其吸光值。

陸、血管縱切與脂肪堆積染色

1. 藥品配製

[Oil red-O]

◎使用藥品：

Oil red-O 250mg

Isopropanol 100ml

◎方法：

將 Oil red-O 粉末加入 Isopropanol mix 均勻後，置於 56°C 水浴機加熱 1 小時後取出，待冷卻後過濾之。

2. 實驗方法

將取下之主動脈弓(aortic arch)及胸主動脈(thoracic aorta)旁的脂肪組織剔除乾淨後，以含 4% 福馬林(paraformaldehyde)之 PBS 固定液進行固定，更換兩次後處理隔夜，接著以 PBS 清洗後，浸泡於 50 % isopropanol 10 分鐘，再以配置好的 Oil red-O (5 mg/ml in isopropanol) 染色 2 分鐘，再以 50 % isopropanol 退染 1 分鐘，最後置於 PBS 內保存。經由 Oil-red-O 染色後，從血管腹面縱向剪開後，脂肪條會呈現深紅色斑點，接著以照相系統(Olympus)進行拍照，最後使用 Image J 軟體分析主動脈前 1 公分長度脂肪條面積與血管面積的比率。

柒、統計分析

數值以 mean ± S.E.M 表示。先檢測數據是否為常態分佈，若非常態分佈將進行轉換。採用 student *t*-test 分析組間是否具有顯著差異， $p < .05$ 表示有顯著差異。使用 SPSS 14.0 軟體進行統計分析。

第三節 結果

OVX+SE 組犧牲後發現有一隻卵巢未切除乾淨，不列入本次實驗之統計樣本，因此將 OVX+SE 組樣本數調整為 $n=7$ 。

壹、攝食及生長情形

兩組分別餵食含有 20% fat + 0.15% cholesterol (OVX)、20% fat + 0.15% cholesterol + 0.5% sesamin (OVX+SE) 之半合成飼料，其體重變化如圖 4-1-1 所示。實驗開始，體重於各組間並無顯著差異，給予實驗飼料後，體重逐漸增加，實驗第 1 週 OVX 組體重大於 OVX+SE 組，從第 2 週至實驗結束 (第 11 週) OVX+SE 組體重稍微高於 OVX 組，但並無統計上顯著差異 (圖 3-1)。

體重增加量、攝食量及攝食效應如表 3-2 所示。實驗全程體重增加量兩組並無顯著差異。在攝食量及攝食效應方面，因飼料秤重僅能代表一籠 4 隻老鼠的總攝取量，所以無法進行統計分析比較其差異性。單就組別比較，其每日攝食量 OVX+SE 組稍微高於 OVX 組；攝食效應 HF 組為 2.98 (weight gain g /100g food intake) 低於 OVX+SE 組 3.35 (weight gain g /100g food intake)。

貳、組織器官相對及絕對重量

小鼠組織器官相對及絕對重量如表 3-3 所示。在組織絕對重量方面，OVX+SE 組之腎周脂重量顯著高於 OVX 組，經體重校正後，得組織相對重量，OVX+SE 組之腎周脂重量比 OVX 組增加 2 倍，達顯著差異 ($p < 0.05$)。HF 組之子宮相對重量多了 OVX+SE 組 48%，達邊際顯著差異 ($p=0.063$)，但在其他器官，如肝臟、腎臟、脾臟、心臟絕對及相對重量方面兩組皆無顯著差異。

參、血液脂質濃度

(一) 血清總膽固醇濃度

實驗初始，兩組無顯著差異 (表 3-4)；實驗後第 11 週，OVX+SE 組顯著高於 OVX 組，且高於 OVX 組 34%。在差異值方面，OVX+SE 組亦顯著高於 OVX 組 50%。

(二) 血清三酸甘油酯濃度

實驗初始，兩組無顯著差異 (表 3-4)；實驗後第 11 週，OVX+SE 組稍微高

於 OVX 組，但無顯著差異。在差異值方面，兩組皆為負值，OVX 組低於 OVX+SE 組，但無統計上顯著差異。

(三) 血清高密度脂蛋白濃度

兩組無顯著差異 (圖 3-2)。

肆、血液 adiponectin 濃度

兩組無顯著差異 (圖 3-2)。

伍、血液 enterolactone(ENL)濃度

血液 ENL 濃度如表 3-4 所示。在 OVX 組未測得，而 OVX+SE 組測得血液中 ENL 濃度為 1238.9 pg/ml 顯著高於 OVX 組($p < .05$)。

陸、主動脈脂肪堆積

由於 OVX+SE 組有兩隻老鼠的血管剪不完整，主動脈長度小於 0.5 cm，因此 OVX+SE 組 n 數縮減為 n=5。OVX 組之主動脈脂肪堆積較 OVX+SE 組嚴重 (圖 3-3)，計算主動脈前端 1cm (aorta arch) 之損傷面積百分比，OVX 組高於 OVX+SE 組 (圖 3-3)，達邊際顯著差異($p=0.07$)。

表 3-2 ApoE 剔除且卵巢切除之小鼠餵食實驗飼料 11 週體重增加量、平均攝食量及攝食效應²

Table 3-2 The body weight, weight gain, food intake and feed efficiency of apoE knockout mice with OVX after fed the test diets for 11 weeks²

		OVX	OVX+SE
		n=7	n=7
Initial weight‡	g	17.7 ± 0.33	18.2 ± 0.45
Final weight ‡	g	22.2 ± 0.57	23.3 ± 0.91
Weight gain ‡	g	4.5 ± 0.51	5.1 ± 1.04
Food intake	g/mouse/day	1.95 ³	1.98 ³
Feed efficiency ¹	g/100g	2.98 ³	3.35 ³

1. Feed efficiency = weight gain (g)/total food intake (100g)

2. Values are means ± S.E.M.

3. Data of food intake and feed efficiency are means.

‡ Data were analyzed by Student's *t*-test.

表 3-3 ApoE 剔除且去卵巢之小鼠餵食實驗飼料 11 週後組織絕對及相對重量²Table 3-3 Absolute and relative organ weights of apoE knockout mice with OVX after fed test diets for 11 weeks²

	OVX (n=7)	OVX+SE (n=7)
	g	
PWAT ¹	0.262 ± 0.030	0.401 ± 0.072
RWAT ¹	0.079 ± 0.013	0.170 ± 0.031*
Liver	0.925 ± 0.067	1.025 ± 0.077
Spleen	0.137 ± 0.017	0.121 ± 0.004
Kidney	0.225 ± 0.014	0.228 ± 0.011
Heart	0.177 ± 0.014	0.184 ± 0.012
Uterus	0.021 ± 0.002	0.015 ± 0.002
	g/wt g (%)	
PWAT	1.173 ± 0.114	1.666 ± 0.250
RWAT	0.353 ± 0.056	0.706 ± 0.109*
Liver	4.193 ± 0.336	4.403 ± 0.304
Spleen	0.611 ± 0.061	0.519 ± 0.019
Kidney	1.010 ± 0.041	0.973 ± 0.020
Heart	0.794 ± 0.050	0.798 ± 0.063
Uterus	0.093 ± 0.011	0.063 ± 0.009

1. PWAT, parametrial fat pad ; RWAT, retroperitoneal fat pad.

2. Values are means ± S.E.M.

* Significantly different from OVX group by Student's *t* test ($p < .05$)

表 3-4 ApoE 剔除且予以去除卵巢之小鼠餵食實驗飼料 11 週實驗期間血液總膽固醇、三酸甘油酯及 enterolactone 濃度¹

Table 3-4 Serum total cholesterol, triglyceride, and enterolactone concentrations during experimental period¹

	OVX n=7	OVX+SE n=7
Total cholesterol (mg/dl)		
0 wk	208.3 ± 10.4	217.7 ± 12.6
4 wk	574.5 ± 22.0	748.2 ± 33.6*
11 wk	616.7 ± 44.4	830.3 ± 35.0*
11 wk - 0 wk	408.3 ± 50.6	612.7 ± 30.2*
Triglycerides (mg/dl)		
0 wk	107.9 ± 8.4	107.2 ± 10.6
4 wk	101.3 ± 5.1	91.7 ± 1.2
11 wk	82.9 ± 4.3	88.6 ± 4.0
11wk - 0 wk	- 25.0 ± 8.3	- 18.5 ± 12.8
Enterolactone (pg/ml)	—	1238.9 ± 358.5*

1. Values are means ± S.E.M.

* Significantly different from OVX group by Student's t test ($p < .05$)

Growth Curve

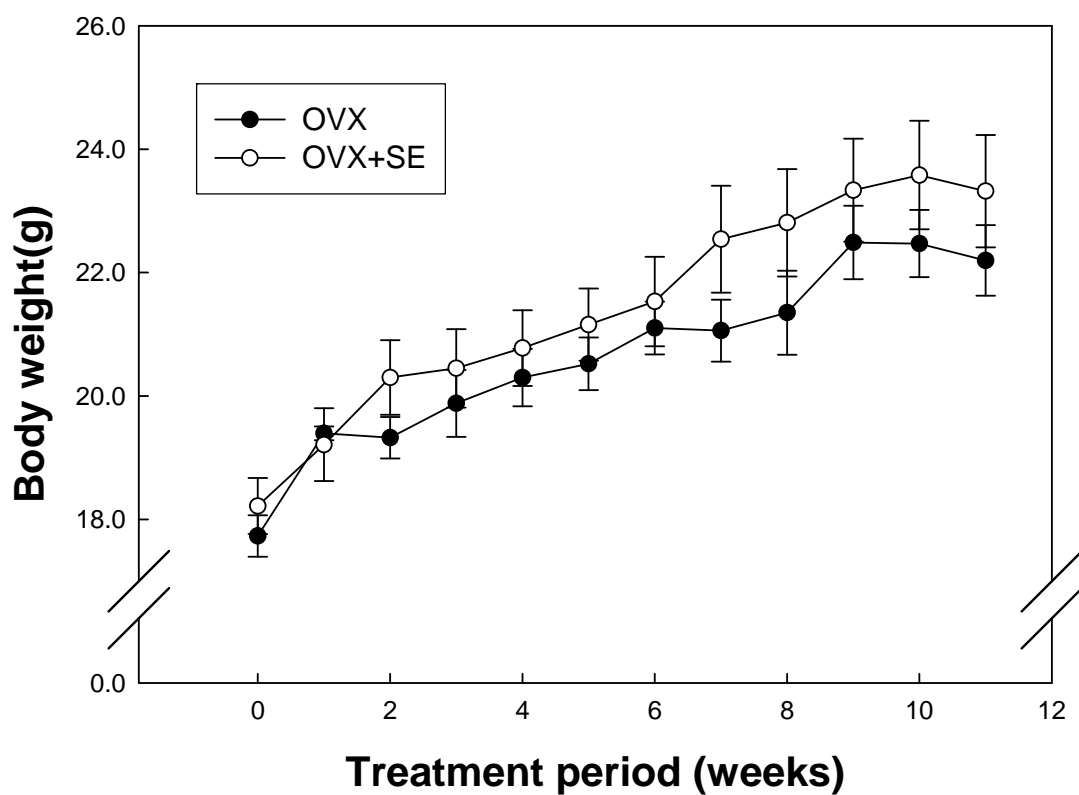


圖 3-1 ApoE 剔除並予以卵巢切除之小鼠餵食實驗飼料 11 週生長曲線

Fig 3-1 The growth curve of apoE knockout female mice with OVX fed a high-fat diet, or sesamin-supplemented (sesamin: 0.5% wt/wt) high-fat diets for 11 weeks.

All values are means \pm S.E.M., $n = 7$. There was no significant difference between OVX and OVX+SE groups analyzed by Student's *t*-test.

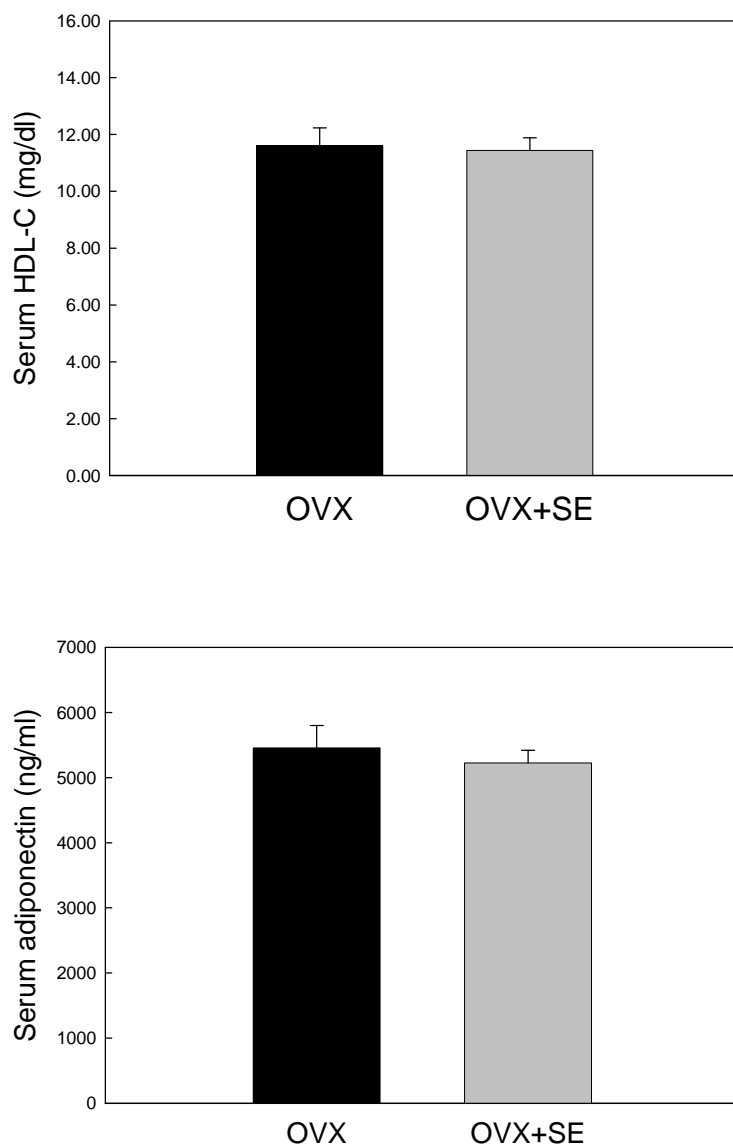


圖 3-2 ApoE 剔除小鼠予以卵巢切除餵食實驗飼料 11 週後血液 HDL-C 及 adiponectin 濃度

fig.3-2 Fasting serum concentrations of HDL-C and adiponectin in OVX apoE knockout mice fed the experimental diets for 11 weeks. Values are means \pm S.E.M, n =7. There was no significant difference between OVX and OVX+SE groups analyzed by Student's *t*-test.

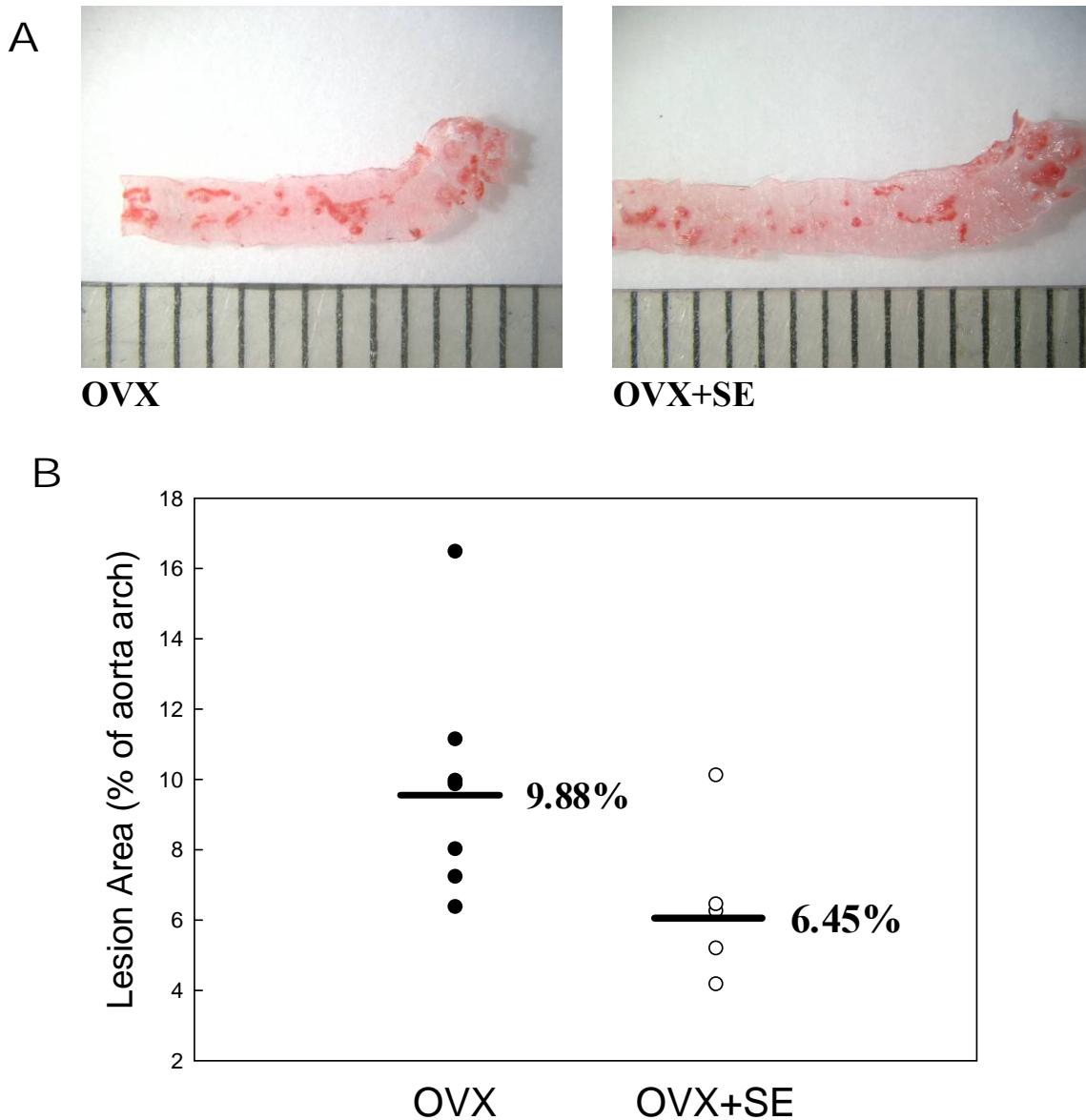


圖 3-3 卵巢切除之 ApoE 剔除小鼠餵食實驗飼料 11 週後主動脈損傷情形

Fig.3-3 Atherosclerotic lesion formation in apoE knockout mice with OVX fed

the experimental diets for 11 weeks. The aortic arch were dissected out and examined for atherosclerotic lesion formation using the *en face* technique. *A*, two representative aortae from the OVX and OVX+SE group. *B*, the extent of atherosclerotic lesion formation in each mouse, expressed as percentage of aortic surface area covered by atherosclerotic lesions. The mean atherosclerotic lesion area of each group of mice is indicated by a *horizontal bar* with mean value shown next to it.

第四節 討論與結論

壹、sesamin 對於血脂及動脈損傷之影響

ApoE 基因剔除小鼠為探討高膽固醇血症及動脈粥狀硬化相關疾病之良好的動物模式(Nakashima et al., 1994; Reddick, Zhang, & Maeda, 1994), 因其缺乏 apoE 無法有效的清除血液中 chylomicron 及 VLDL, 致使血膽固醇及三酸甘油酯濃度上升, 而若給予 western-type diet (含 21% fat 及 0.15%cholesterol), 可使血膽固醇大幅上升且加速動脈損傷進展, 過去已有很多研究選用 apoE^(-/-)小鼠探討動脈損傷及血脂異常, 黑米色素區分物可顯著下降 apoE^(-/-)小鼠血液總膽固醇、減少動脈損傷及上升血液 HDL-C, 具有抑制動脈硬化之功效(M. Xia, Ling, Ma, Kitts, & Zawistowski, 2003), 另一項使用 apoE^(-/-)小鼠探討紅酒多酚對於動脈硬化之影響, 發現其可顯著減少主動脈脂肪堆積(Waddington, Puddey, & Croft, 2004), 故本研究使用 apoE 基因剔除小鼠並餵食 20% fat 及 0.15% cholesterol 之高脂高膽固醇飼料, 以期 sesamin 能減少動脈損傷情形及改善血脂。

過去研究指出 sesamin 具有降血脂的功效, 大鼠餵食含 0.5% sesamin 的未添加膽固醇之飼料 4 週後, 可顯著下降血液及肝臟膽固醇濃度, 其可能抑制膽固醇合成及吸收(Hirose et al., 1991), 另一項研究顯示大鼠予以餵食含 0.2%或 0.5% sesamin 之飼料 15 天, 可顯著下降其血液中 TG 及 FFA 濃度(Ashakumary et al., 1999), 但本研究並未得到相似的結果。本次實驗發現去除卵巢之 apoE^(-/-)小鼠餵食含 0.5% sesamin(w/w)的高脂飼料, 相較於控制組顯著上升血液中 TC 濃度, 但血液中 TG 及 HDL-C 濃度並無顯著影響, 且顯著增加腎周脂重量, 顯示其對於血脂改善及抗肥胖的效用不如預期, 過去研究指出卵巢切除之 apoE^(-/-)小鼠給予雌激素治療後, 顯著下降體重、血液 TC 和 VLDL-C 及主動脈損傷面積(Bourassa, Milos, Gaynor, Breslow, & Aiello, 1996), 同樣的 OVX 大鼠注射 E₂ 後顯著顯著減少體重及腹部脂肪堆積(J. F. Wang et al., 2004), 而雌激素對於改善血脂的作用機

轉可能有：(1)影響 VLDL 產量及清除率(2)降低肝內脂肪生合成作用(3)增加 LDL receptor 表現量(4)增加 LPL 活性(M. S. Liu et al., 1994; Walsh & Schiff, 1991)，故推測餵食 0.5% sesamin 之 apoE^(-/-) 卵巢切除鼠，在體內可能產生 antagonist 之作用，拮抗脂肪組織所製造的雌一醇與飼料中添加之奶油所含雌一醇及雌二醇 (Wolford & Argoudelis, 1979)，導致血清 TC 濃度及腹部脂肪堆積反而比控制組高。

在本實驗條件下含 0.5 % sesamin 之高脂高膽固醇飼料 11 週後，顯著上升 apoE 剔除鼠血液 TC 濃度，過去研究發現 sesamin 能夠增加大鼠肝中脂肪酸氧化速率，可能透過調控 PPAR α 之活性，以達降血脂 (Ashakumary et al., 1999)，臨床上常用在高血脂患者上降血脂的藥物為 fibrate，此類藥物是 PPAR α 之活化劑，透過活化肝中 PPAR α 以達下降血液 TC 及 TG，會促進齧齒類動物肝中過氧化質體增生且亦可能出現腫瘤增生的現象，但在人類沒有此副作用，本研究發現餵食 OVX+SE 組相較於 OVX 組，肝組織絕對重量及相對重量皆有顯著增加，顯示 sesamin 作用可能相似於 fibrate 類藥物，皆為 PPAR α 促效劑，具有降血脂之功效。但有研究發現 apoE 剔除鼠予以餵食含 0.1% 之 fenofibrate 高膽固醇飼料 14 週後，相較於控制組無法下降血脂，反而上升血液 TC、TG，下降血液 HDL-C (Declercq et al., 2005)，而另一項研究也指出餵食同樣為 fibrate 類藥物 ciprofibrate，亦使 apoE 剔除鼠血脂上升情形更加嚴重，且發現血液中攜帶 apoB48 lipoprotein remnants 增加 (Fu, Kashireddy, & Borensztajn, 2003)，一般正常的動物，血液循環中富含 TG 之脂蛋白 chylomicron 或 VLDL remnant 能夠透過 apoE 與 LDL receptor 及 LDL receptor-related protein (LRP) 結合，有效的在肝中進行回收。但 apoE 剔除鼠缺乏 apoE 基因，血液中攜帶 apoB48 之 chylomicron，無法透過 LDL receptor 或 LRP 在肝中回收進而累積在血液中，需透過其他途徑將 remnant 在肝中代謝掉，可能透過肝細胞上接受器 SR-B I 經由胞飲作用將其攝入肝中進行代謝 (Crawford & Borensztajn, 1999)，因此推測 sesamin 可能抑制 SR-B I 之作用使得 apoE 剔除鼠失去清除血液 lipoprotein remnants 能力，進而造成血液 TC

上升。

雖然無顯著改善血脂但對於主動脈脂肪堆積有減少的趨勢，主動脈損傷面積 6.45% 低於控制組 9.88%，達邊際統計差異 ($p=0.07$)。可能原因有(1) 抗氧化性：在高血壓大鼠模式，飼料添加 1% sesamin 可顯著抑制主動脈血管上 O_2^- 的生成量 (Nakano et al., 2002)，而血管壁上若產生過多的 O_2^- 會誘發內皮細胞損傷，致使動脈粥狀硬化產生。過去研究指出 sesamin 在肝中具有抗氧化活性，近來發現此氧化的特性並非來自 sesamin 本身，而是 sesamin 會經由肝臟代謝成具抗氧化效用的化合物，因此在肝中具有對抗氧化損傷之作用 (Nakai et al., 2003)。本次實驗 sesamin 可稍微減少 apoE 剔除小鼠主動脈脂肪條堆積，推測可能為 sesamin 在肝中之代謝產物在血管上發揮與在肝中相同的抗氧化作用，藉由抑制主動脈上 O_2^- 產生，進而減少內皮細胞損傷，使其不易進展至粥狀動脈硬化。

(2) 抗發炎：過去研究亦發現 sesamin 亦具有抗發炎之效用。sesamin 能夠藉由向下調節 p38 MAPK 訊息傳遞路徑且抑制 NF- κ B 活化，進而減少 IL-6 生成，具有抗發炎的效用 (Jeng, Hou, Wang, & Ping, 2005)。而本實驗室先前指出 sesamin 可顯著下降以 TNF α 刺激之主動脈內皮細胞上黏著因子 ICAM-1 的表現量，且近來亦發現其可顯著減少以 oxLDL 刺激之人類單核球細胞之 IL-1 β 及 TNF α 分泌量，而 apoE 剔除鼠若再將 TNF α 基因剔除，其主動脈竇損傷面積顯著低於 apoE 剔除鼠 (Ohta et al., 2005)，發現 TNF α 為致動脈硬化之因子。故推測本研究主動脈脂肪條減少，可能經由抑制促發炎因子 TNF α 及 ICAM-1 表現量，進而減少血管發炎、減少單核球黏著進入血管內，以避免一連串發炎反應進行，可能具有預防心血管疾病發生之潛力。

貳、sesamin 代謝產物 ENL 之效用

Sesamin 在體內的代謝及其代謝產物對其生理效應亦扮演一個重要角色。Penalvo 等人提出在體外實驗 sesamin 可經由糞便發酵成哺乳類動物之 lignan ENL 及 END，且芝麻經人體攝入後其血液中 ENL 及 END 的濃度會上升，因此

指出 sesamin 可經由腸內微生物將其待謝成具生物活性之 ENL 及 END(Penalvo et al., 2005)。本研究發現 apoE 基因剔除小鼠餵食含 sesamin 的高脂高膽固醇飼料 (0.5% sesamin w/w) 10 週後，測得血液中平均 ENL 濃度為 1239 pg/ml，顯著高於未添加 sesamin 的組別，指出 sesamin 確實被小鼠攝入後會經體內消化待謝成 ENL。過去研究指出胡麻子為飲食中植物性木質素的豐富來源，其成分為 secoisolariciresinol diglucoside(SDG)，亦可經由腸內菌將其待謝為 ENL 及 END(L. Q. Wang, Meselhy, Li, Qin, & Hattori, 2000)，而從胡麻子分離出的 lignan 複合物添加於高膽固醇飼料中，可顯著減少兔子主動脈損傷面積 37%、下降血液及主動脈上脂質過氧化產物 malondialdehyde (MDA)、下降血液 TC 及 LDL-C 且上升 HDL-C，具有保護動脈硬化的效用(Prasad, 2005)。本研究部分結果與上述研究結果相歧，apoE 剔除小鼠餵食添加 sesamin 之高膽固醇飼料，顯著上升血液 ENL 及 TC 濃度但不影響血液中 HDL-C 含量，主動脈損傷面積有減少的趨勢，但未達顯著差異，在相關性分析發現 ENL 與主動脈損傷面積無顯著相關，但與血液 TC 濃度達顯著正相關($r = 0.757, p < 0.05$)，sesamin 代謝產物 ENL 可能為血脂上升的可能原因之一，而體外實驗指出 ENL 具有雌激素及抗雌激素效用，故推測 ENL 可能產生抗雌激素作用，因而造成血脂異常。

參、結論

Sesamin 具有減少 apoE 剔除鼠主動脈損傷面積的潛力，但無法有效改善血脂異常及腹部脂肪堆積，其確切機轉仍需進一步研究證實。

第四章

芝麻素及異黃酮對代謝症候群之影響

第一節 前言

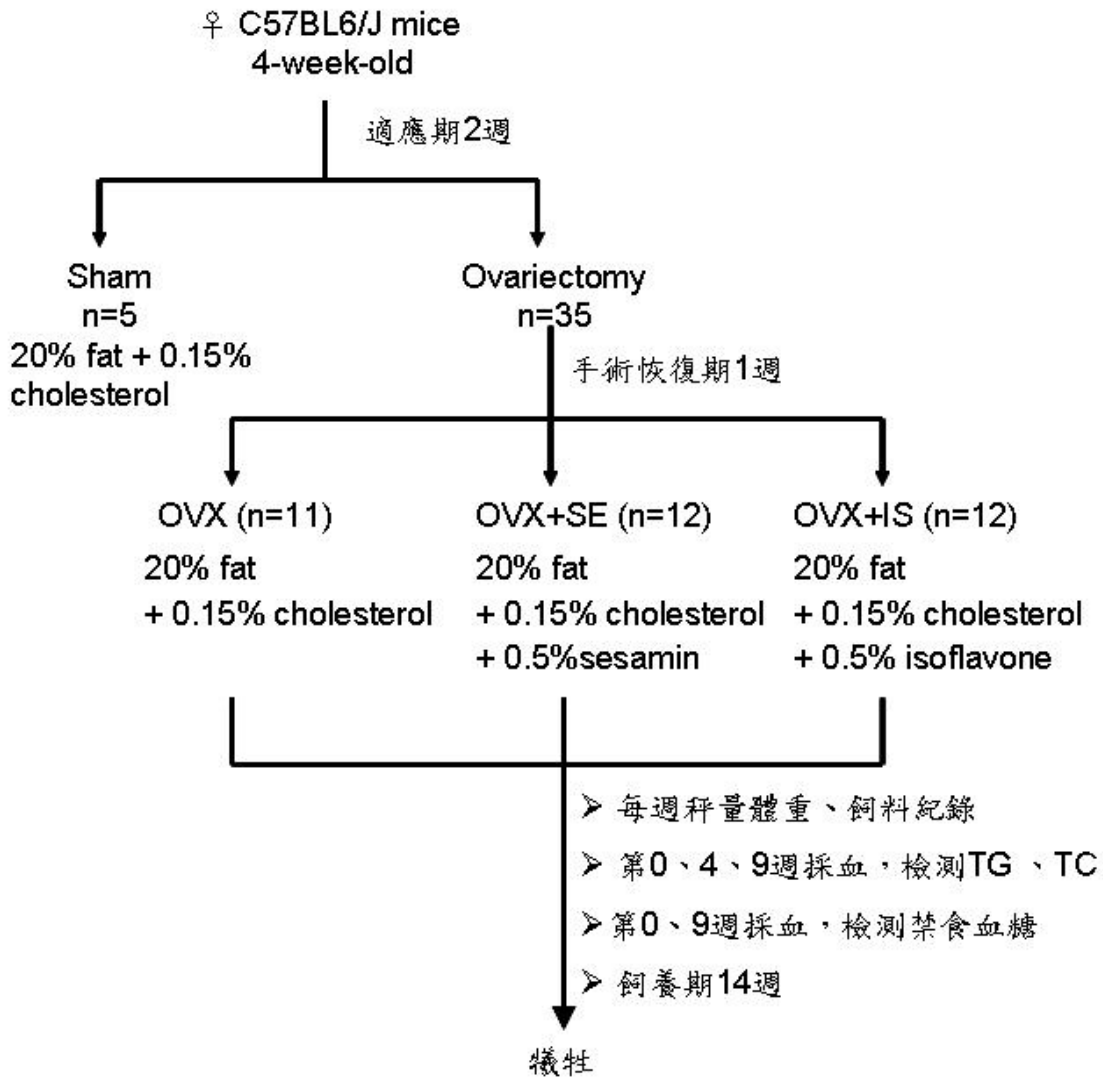
更年期婦女體內雌激素的量下降，造成脂肪分佈改變，由四肢或皮下轉到腹腔內堆積引起腹部肥胖，稱為中廣型肥胖，為引發一連串之代謝紊亂之主因。雌激素對於心血管疾病及代謝症候群相關病灶具保護效應，可降低體脂肪量、影響胰島素敏感度、影響脂蛋白代謝及內皮細胞功能...等，去除卵巢之大鼠及小鼠，給予雌激素治療可下降體重或減少脂肪重量，但若使用雌激素治療可能增加罹患乳癌風險。

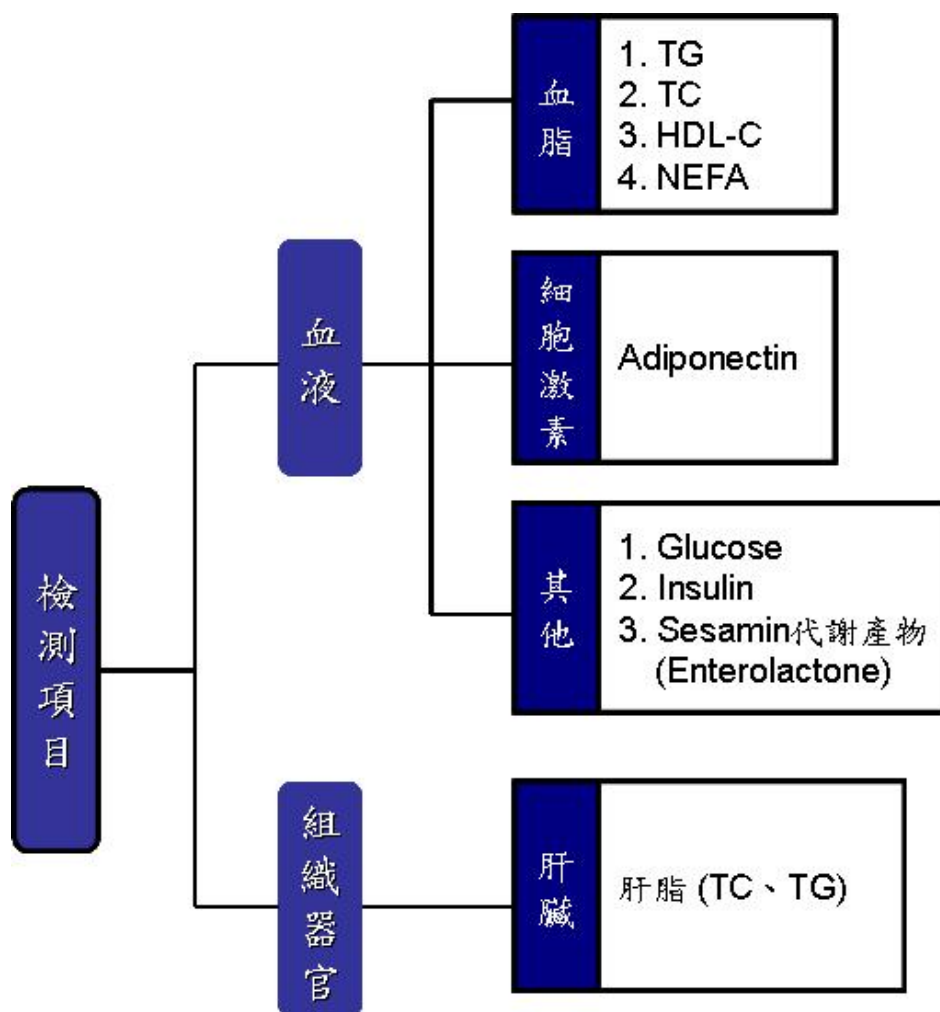
過去研究指出卵巢切除小鼠餵食不同劑量之 genistein 皆能減少脂肪組織堆積及減少 LPL mRNA 表現量，顯示其具有抗脂肪生成之效用(Naaz et al., 2003)，且可抑制食慾、降低體重及降體脂，因此可預防更年期後腹部脂肪的堆積(H. K. Kim et al., 2006)。

故本章研究目的為欲瞭解具 SERM 之植物性雌激素食材是否可提供類似雌激素功能。使用 C57BL/6J 母鼠並將其卵巢切除，誘發體脂增加及血脂異常，模擬女性更年期體內的生理狀態，探討芝麻內容物 sesamin 及大豆異黃酮之 genistein 對停經後引起之代謝症候群的影響，觀察是否能夠下降血脂、血糖、肝臟 TG 及 TC、脂肪細胞激素、減少腹部脂肪堆積。

第二節 材料與方法

壹、實驗設計及檢測項目





貳、動物飼養、飼料製備、組織取樣及樣品前處理

(一) 動物飼養

自財團法人國家實驗中心購入 4 週大之 C57BL/6J 母鼠 40 隻，適應二週後依體重排序 S 型分成四組，並剪耳標辨別，分別為 Sham (20%fat)、High fat (OVX, 20%fat)、0.5% sesamin (OVX+SE, 20%fat + 0.5% sesamin) 及 0.5% isoflavone (OVX+IS, 20%fat + 0.5% isoflavone)，Sham 組進行假手術，其餘三組進行卵巢切除手術，手術恢復期一週，適應期及手術恢復期給予 chow diet (MF-18, oriental yeast, 日本) 餵食。以眼窩採血方式採取 baseline 血液後，開始給予實驗飼料。小鼠分別飼養於 7 個透明塑膠鼠籠中 (5~6 隻/籠)，動物室環境溫度維持 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，光照週期 14 小時 (上午 6 時至下午 20 時)，黑暗週期為 10 小時，飼料及飲水自

由攝取，每週更換一次飼料並同時秤重紀錄飼料消耗情形，體重每週秤量一次，直至犧牲為止。

實驗過程中，OVX 組 1 隻於實驗後期因採血過程不明原因身亡，故 OVX 組樣本數調整為 n=10。

(二) 飼料組成與製備

飼料成分及製備方式同第三章第二節。飼料配方 OVX、OVX+SE 組同第三章第二節；Sham 組飼料成分同 OVX 組；OVX+IS 組的飼料成分亦同 OVX 組，但另添加 0.5% 異黃酮，此為大豆提取物（內含去糖基大豆異黃酮約 40.74%，包括：35.54 % genistein 及 10.90 % daidzein；其餘成分還有皂素 40~50%、多種微量元素 6~7%、脂肪 2~3% 及灰分 <2%），由統園企業有限公司所提供（表 4-1）。

表 4-1 實驗期飼料之組成

Table 4-1 Composition of the Test Diets¹

Ingredients of diets ²	Sham	OVX	OVX+SE	OVX+IS
	g/kg diet			
Casein ²	235	235	233	232
DL-methionine ²	3	3	3	3
Corn starch ²	224	224	223	221
Sucrose ²	224	224	223	221
Cellulose ²	59	59	59	58
Butter ²	190	190	189	187
safflower oil ²	10	10	10	10
AIN-76 mineral mixture ²	41	41	41	40
AIN-76 vitamine mixture ²	12	12	12	12
Choline ²	2	2	2	2
Cholesterol ²	1.5	1.5	1.5	1.5
Sesamin	-	-	5.0	-
大豆提取物(含異黃酮 40%)	-	-	-	12.3
Total calorie (Kcal/100g)	458.0	458.0	455.5	455.0
Calorie density (Kcal/g)	4.6	4.6	4.6	4.6
CHO/calorie (g /1000 Kcal)	100.4	100.4	100.5	97.1
Protein/calorie (g /1000 Kcal)	51.3	51.3	51.2	51.0
Fat/calorie (g /1000 Kcal)	43.7	43.7	43.7	43.4

1. The composition of AIN-76 Vitamin Mixture and AIN-76 Mineral mixture is as described in AIN. (1977)

2. Casein, ICN purified Biomedicals, Inc ; Metionine, Sigma M-9500 ; Corn starch, Samyang genex Co., LTD. SEOUL, Korea ; Cellulose, Virtacel J. Betten-maier & Sohn, Germany ; Vitamin mixture, AIN-76, ICN Co. ; Mineral mixture, AIN-76, ICN Co. ; Choline, Sigma C-1879 ; Cholesterol, Hanawa, Japan ; safflower oil: 台糖紅花籽油 ; butter: 安佳無水奶油

(三) 動物犧牲及樣品收集

實驗開始第 0 週先以眼窩採血的方式採集 baseline 血液樣本約 100 μ l，之後開始餵食飼料，在第 4、9 週也以同樣的方式採集血液樣本約 100 μ l，同時在第 0、9 週取些許血液利用血糖測定儀 (Bayer, Ascensia Elite®) 測量小鼠禁食狀態下的血糖，最後於第 14 週進行犧牲，每次採集血樣或犧牲前必須取走飼料隔夜禁食 12~15 小時。犧牲當日先行秤重，以乙醚麻醉，眼窩採血至少 1ml，取些許血樣測血糖後，再以腹腔注射過量麻醉藥讓動物安樂死後，取下約 0.1g 肝臟 4 塊秤重記錄，以 PBS 潤洗後迅速丟入液態氮，保存於 -80°C，以供日後抽取 RNA 使用，其餘肝臟則剪下秤重記錄後丟入液態氮中急速冷凍，保存於 -80°C 備用；取下腎周脂、子宮周圍脂肪秤重紀錄後各取一小塊子宮周圍脂肪組織置入 4% paraformaldehyde 中(組織和固定液的體積比例至少要 1:15)，在室溫下固定 12~24 小時後，以 PBS 潤洗後保存於 4°C，準備包埋及切片，其餘脂肪組織經 PBS 潤洗後迅速丟入液態氮急速冷凍，保存於 -80°C；腎臟、脾臟、子宮、心臟秤重紀錄；血液依前述方法處理，取上層血清後分裝保存於 -80°C。

參、血液脂質分析

(一) 血清中膽固醇含量測定

同第三章第二節。

(二) 血清中三酸甘油酯含量測定

同第三章第二節。

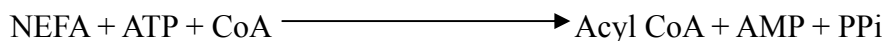
(三) 血清中高密度脂蛋白膽固醇含量測定

同第三章第二節。

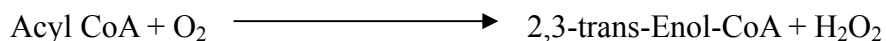
(四) 血清中游離脂肪酸(Non esterified fatty acid, NEFA)含量測定

1. 原理

Acyl CoA synthetase



Acyl CoA oxidase



Peroxidase



最後產生青紫色產物，在 550nm 測定吸光值。

2. 方法

採用市售試劑組(RANDOX FA 115, Amtrim, UK)。先將 10 ml buffer (含 phosphate buffer, pH 6.9、magnesium chloride、surfactant)加入 enzyme/coenzyme (含 acyl coenzyme A synthetase、ascorbate oxidase、coenzyme A、ATP、4-aminoantipyrine) 即為 reagent 1。將 enzyme diluent 與 maleimide 混合均勻，再以 enzyme reagent 混合均勻，即為 reagent 2。取 5 μ l sample 或 NEFA standard (1mmol/l)於 96 well plate，加入 100 μ l reagent 1，37 $^{\circ}$ C 下反應 10 mins，再加入 200 μ l reagent 2，在 37 $^{\circ}$ C 下反應 10 mins，於波長 550nm 測吸光值，做一標準曲線，以內插法可求得樣品濃度。

肆、血液細胞激素(cytokines)含量分析

(一) 血清中 adiponectin 含量測定

同第三章第二節。

伍、血清 insulin 分析

1. 原理

本實驗採用市售 mouse insulin ELISA kit (Mercodia)，根據三明治 (sandwich) 酵素免疫分析原理測量血液中 insulin 濃度，此法係利用 96 孔的分析盤中已結合

抗 insulin 的單株抗體，能專一的與 insulin 分子結合，再與 horseradish peroxidase conjugates anti mouse insulin antibody 結合，利用 horseradish peroxidase 與 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine 及 H₂O₂ 反應呈色而得知樣品中 insulin 濃度。

2. 方法

先將 50 μ l 的 conjugate solution 置於 96 well plate，再將 25 μ l 標準品 (系列稀釋)、血樣加入分析盤中，室溫反應 2 小時後，進行 wash，移除未與抗體結合的樣品，再加入 200 μ l peroxidase substrates 室溫下反應 15 分鐘，最後加入酸性溶液終止酵素呈色反應，於波長 450 nm 下可測其吸光值，吸光值越高者表示樣品中所含 insulin 濃度越高，其濃度值利用標準品並乘上稀釋倍數即可相對換算出。

陸、血清中 enterolactone 含量測定

同第三章第二節。

柒、肝臟脂質分析

(一) 肝脂質萃取液製備

取約 0.2~0.3 克肝臟組織，置入玻璃瓶中，加入 19 倍體積之萃取液 (chloroform:methanol =2:1)，以均質機 (Polytron, Kinematica AG, Littau, Switzerland) 磨碎，再以濾紙 (ADVANTEC 125mm) 過濾，置於 4°C 下加蓋玻璃試管中，以待三酸甘油酯及總膽固醇測定。

(二) 肝臟膽固醇濃度檢測

取適量肝脂萃取液，進行三重複，置於抽氣櫃使其完全揮發。再利用市售試劑組 (Randox) 以 Enzymatic CHOD-PAP method 測定，加入 0.5 ml reagent，混勻後反應 10 分鐘，於 500nm 測定吸光值。以 cholesterol calibrator standard (Randox) 做一標準曲線，利用內插法換算濃度。

(三) 肝臟三酸甘油酯濃度檢測

取適量肝脂萃取液，進行三重複，置於抽氣櫃使其完全揮發。再利用市售試劑 (Randox) 以 Enzymatic CHOD-PAP method 測定，加入 0.5 ml reagent，混勻後反應 10 分鐘，於 500nm 測定吸光值。並以 triglyceride calibrator standard (Randox) 做一標準曲線，利用內插法換算濃度。

捌、統計分析

數值以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示。先檢測數據是否為常態分佈，若非常態分佈將進行轉換。其中體重、血液總膽固醇、血液三酸甘油酯、HDL-C 及 NEFA 呈常態分佈未進行轉換；血液 adiponectin、insulin、各臟器重量及 TC/HDL-C ratio、肝臟膽固醇及三酸甘油酯濃度進行 log 轉換。組間比較採用 one-way ANOVA 分析組間是否具有顯著差異，若有顯著差異，則進一步使用 Tukey multiple comparison test 或 LSD multiple comparison test 分析差異情形， $p < .05$ 為有顯著差異，利用 SPSS 14.0 軟體進行統計分析。

第三節 結果

犧牲後發現 OVX 組有 3 隻、OVX+SE 組有 1 隻及 OVX+IS 組有 1 隻卵巢未切除乾淨，不列入本次實驗統計之樣本，因此各組樣本數調整如下：Sham (n=5)、OVX (n=7)、OVX+SE (n=11)及 OVX+IS (n=11)。

壹、攝食及生長情形

各組分別餵食實驗之半合成飼料 14 週，其體重變化如圖 4-1 所示。手術及實驗開始，體重於各組間並無顯著差異，投予實驗飼料後，從實驗第 1 週至第 13 週 OVX+IS 組體重顯著低於 OVX 組且亦低於 Sham 組；而從第 6 週至實驗結束 (第 14 週)，OVX+SE 組體重顯著高於 Sham 及 OVX 組，體重增加量 $OVX+SE > OVX > Sham > OVX+IS$ (圖 4-1, 表 4-2)。

攝食量及攝食效應如表 4-1 所示。在攝食量及攝食效應方面，因飼料秤重僅能代表一籠 4 隻老鼠的總攝取量，所以無法進行統計分析比較其差異性。單就各組數值比較，其 14 週的攝食量，Sham 組最高 (2.37 g/mouse/d)，OVX+IS 組最低 (1.90 g/mouse/d)；攝食效應最高為 OVX+SE 組 4.89 (weight gain g /100g food intake)，最低為 OVX+IS 組 1.88 (weight gain g /100g food intake)。

貳、組織器官相對及絕對重量

小鼠組織器官相對及絕對重量如表 4-3 所示。子宮周圍脂肪及腎周脂之絕對重量及相對重量，OVX+SE 組顯著高於 OVX+IS 組；在肝臟絕對重量方面，OVX+SE 組顯著高於其他組，其相對重量 OVX+SE 組亦顯著高於 OVX 組；子宮之絕對及相對重量，OVX+IS 組顯著高於 OVX 及 OVX+SE 組，OVX 及 OVX+SE 組子宮重量皆低於 Sham 組；心臟的絕對重量 OVX+IS 組顯著低於其他各組，校正過體重後之相對重量，OVX+IS 組還是顯著低於 Sham 組；腎臟及脾臟之相對重量，各組並無顯著差異。

參、血液脂質濃度

(一) 血清總膽固醇濃度

實驗後第 9 週，OVX 組顯著低於其他各組；第 14 週，各組間無顯著差異，

OVX+SE 組高於 OVX 組 11% (表 4-4)。

(二) 血清三酸甘油酯濃度

實驗後第 9 週，OVX+IS 組最低，低於 OVX 組 11% 且顯著低於 OVX+SE 組 45%；第 14 週，各組間無顯著差異 (表 4-4)。

(三) 血清高密度脂蛋白濃度

餵食實驗飼料 14 週後，OVX+SE 組之 HDL-C 濃度顯著高於其他各組，相較於 OVX 組，OVX+SE 組之 HDL-C 增加 27%，而相較於 Sham 組，其增加 31% (表 4-4, 圖 4-2)。若將 TC 除以 HDL-C 得到 TC/HDL-C ratio，OVX+SE 組之比值低於其他各組，且顯著低於 OVX+IS 組。

(四) 血清游離脂肪酸濃度

餵食實驗飼料 14 週後，Sham 組血液游離脂肪酸濃度最高，且顯著高於 OVX 組 25% ($p < .05$)，其他三組間無顯著差異 (表 4-4, 圖 4-3)。

肆、血液 glucose 濃度

實驗後第 9 週，血糖濃度各組間無顯著差異；實驗第 14 週，OVX+IS 組血糖濃度顯著低於 OVX 及 OVX+SE 組 ($p < .05$) (表 4-4, 圖 4-4(B))。

伍、血液 insulin 濃度及 HOMA-IR

餵食實驗飼料 14 週後，Sham 組血液 insulin 濃度最低，OVX 相較於 Sham 組其濃度增加 60%，但無顯著差異；餵食 0.5% sesamin 之 OVX-EM 組 insulin 濃度並無降低，而餵食 0.5% 之 isoflavone 其 insulin 濃度相較於 OVX 組降低 12%，但亦無顯著差異 (表 4-4, 圖 4-4(A))。HOMA-IR 指數以 OVX 組最高，而 OVX+IV 組最低，但各組間未達統計顯著差異。

陸、血液 adiponectin 濃度

餵食實驗飼料 14 週後，OVX+IS 組血液中 adiponectin 濃度最低，顯著低於 OVX 及 OVX+SE 組，相較於 OVX 組濃度下降 55% ($p < .05$)；OVX 與 Sham 及 OVX+SE 兩組間皆無顯著差異 (圖 4-5)。

柒、血液 enterolactone 濃度

血液 ENL 濃度如表 4-3 所示。在其他組未測得，而 OVX+SE 組測得血液中 ENL 濃度為 806.9 pg/ml 顯著高於其他三組($p < .05$)。

捌、肝臟脂質濃度

(一) 總膽固醇濃度

每克肝中所含 mg 數，三組間無顯著差異 (表 4-5)。

(二) 三酸甘油酯濃度

每克肝中所含 mg 數 Sham 及 OVX 兩組間皆無顯著差異，OVX+IS 組顯著低於 Sham、OVX 及 OVX+SE 組($p < .05$)。進一步換算 TG 占總肝重的百分比，得知 Sham 及 OVX 組兩組亦無顯著差異，分別為 6.74 及 6.19%，其中以 OVX+IS 組所占之%最低，顯著低於 OVX+SE 組($p < .05$) (表 4-5)。

表 4-2 假手術或卵巢切除小鼠餵食實驗飼料 14 週體重增加量、平均攝食量及攝食效應²

Table 4-2 The body weight, weight gain, food intake and feed efficiency in sham-operated or ovariectomized (OVX) mice after fed the test diets for 14 weeks.²

		Sham n=5	OVX n=7	OVX+SE n=11	OVX+IS n=11
Initial weight‡	g	16.2 ± 0.5	17.3 ± 0.6	16.6 ± 0.3	16.5 ± 0.6
Final weight ‡	g	22.4 ± 0.6 ^a	23.9 ± 1.1 ^{ab}	27.4 ± 1.4 ^b	20.0 ± 0.3 ^a
Weight gain ‡	g	6.2 ± 0.6 ^a	6.58 ± 1.3 ^a	10.8 ± 1.3 ^b	3.5 ± 0.5 ^a
Food intake	g/mouse/day	2.37 ³	2.04 ³	2.26 ³	1.90 ³
Feed efficiency ¹	g/100g	2.67 ³	3.29 ³	4.89 ³	1.88 ³

1. Feed efficiency = weight gain (g)/total food intake (100g)

2. Values are means ± S.E.M.

3. Data of food intake and feed efficiency are mean of each group.

‡ Data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey multiple comparison test. Values not sharing a common superscript letter among Sham, OVX, OVX+SE, OVX+IS groups are significantly different at $p < .05$ level.

表 4-3 假手術或卵巢切除小鼠餵食實驗飼料 14 週後組織絕對及相對重量²Table 4-3 Absolute and relative organ weights in sham-operated or ovariectomized (OVX) mice after fed test diets for 14 weeks.²

	Sham (n=5)	OVX (n=7)	OVX+SE (n=11)	OVX+IS (n=11)
	g			
PWAT ¹	0.250 ± 0.041 ^a	0.440 ± 0.121 ^{ab}	0.910 ± 0.189 ^b	0.220 ± 0.019 ^a
RWAT ¹	0.088 ± 0.016 ^{ab}	0.145 ± 0.052 ^{ab}	0.325 ± 0.085 ^a	0.094 ± 0.012 ^b
Liver	0.855 ± 0.034 ^a	0.866 ± 0.026 ^a	1.167 ± 0.072 ^b	0.764 ± 0.015 ^a
Spleen	0.078 ± 0.005	0.083 ± 0.006	0.092 ± 0.011	0.074 ± 0.004
Kidney	0.255 ± 0.008 ^a	0.250 ± 0.012 ^a	0.268 ± 0.010 ^a	0.204 ± 0.004 ^b
Heart	0.144 ± 0.004 ^a	0.160 ± 0.005 ^a	0.119 ± 0.004 ^a	0.086 ± 0.002 ^b
Uterus	0.130 ± 0.014 ^{ab}	0.062 ± 0.021 ^b	0.038 ± 0.009 ^b	0.233 ± 0.041 ^a
	g/wt g (%)			
PWAT	1.244 ± 0.187 ^a	1.947 ± 0.444 ^{ab}	3.364 ± 0.617 ^b	1.221 ± 0.114 ^a
RWAT	0.441 ± 0.068 ^{ab}	0.636 ± 0.198 ^{ab}	1.152 ± 0.250 ^a	0.518 ± 0.069 ^b
Liver	4.314 ± 0.096 ^{ab}	4.032 ± 0.204 ^a	4.569 ± 0.121 ^b	4.169 ± 0.086 ^{ab}
Spleen	0.393 ± 0.026	0.380 ± 0.025	0.377 ± 0.054	0.403 ± 0.018
Kidney	1.287 ± 0.020	1.152 ± 0.044	1.081 ± 0.073	1.112 ± 0.028
Heart	0.576 ± 0.015 ^a	0.490 ± 0.018 ^{ab}	0.478 ± 0.030 ^{ab}	0.469 ± 0.013 ^b
Uterus	0.653 ± 0.061 ^{ab}	0.286 ± 0.097 ^a	0.166 ± 0.044 ^a	1.293 ± 0.242 ^b

1. PWAT, parametrial fat pad ; RWAT, retroperitoneal fat pad.

2. Values are means ± S.E.M.

Data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey multiple comparison test. Values not sharing a common superscript letter among Sham, OVX, OVX+SE, OVX+IS groups are significantly different at $p < .05$ level.

表 4-4 假手術及卵巢切除小鼠餵食實驗飼料 14 週實驗期間血液參數值¹Table 4-4 Modifications of fasted serum parameters in sham-operated or ovariectomized (OVX) mice fed the experimental diets for 14 weeks¹

	Sham n=5	OVX n=7	OVX+SE n=11	OVX+IS n=11
Total cholesterol (mg/dl)				
9 wk	78.9 ± 4.0 ^a	55.5 ± 4.6 ^b	74.7 ± 2.8 ^a	83.5 ± 5.0 ^a
14 wk	72.6 ± 5.3	75.9 ± 3.5	84.6 ± 3.2	79.6 ± 5.0
Triglycerides (mg/dl)				
9 wk	36.2 ± 1.3 ^{ab}	33.2 ± 2.7 ^{ab}	43.3 ± 3.6 ^a	29.8 ± 3.8 ^b
14 wk	37.6 ± 2.0	37.5 ± 1.5	38.1 ± 2.3	35.3 ± 3.1
Glucose (mg/dl)				
9 wk	95.6 ± 5.6	91.0 ± 5.2	99.1 ± 6.8	105.3 ± 6.6
14 wk	91.4 ± 8.3 ^{ab}	106.4 ± 10.7 ^a	104.9 ± 6.6 ^a	84.9 ± 2.7 ^b
HDL-C (mg/dl)	18.8 ± 1.9 ^b	19.6 ± 3.0 ^b	24.6 ± 3.4 ^a	18.4 ± 6.8 ^b
TC/HDL-C	4.0 ± 0.2 ^{ab}	3.9 ± 0.2 ^{ab}	3.5 ± 0.1 ^a	4.9 ± 0.6 ^b
NEFA (mmole/l)	1.02 ± 0.04 ^a	0.82 ± 0.03 ^b	0.91 ± 0.04 ^{ab}	0.92 ± 0.04 ^{ab}
Insulin (μg/l)	0.63 ± 0.09	1.01 ± 0.23	1.02 ± 0.23	0.89 ± 0.14
ENL (pg/ml)	—	—	806.9 ± 276.8	—
HOMA-IR ²	3.55 ± 0.83	6.86 ± 2.07	6.54 ± 1.52	4.19 ± 0.72

1. Values are means ± S.E.M.

Data were analyzed by one-way ANOVA and LSD comparison test. Values not sharing a common superscript letter among Sham, OVX, OVX+SE, OVX+IS groups are significantly different at $p < .05$ level.

2. HOMA-IR index = insulin (μU/mL) × glucose (mmol/L) / 22.5

表 4-5 假手術及卵巢切除小鼠餵食實驗飼料 14 週後肝臟中總膽固醇及三酸甘油酯濃度¹

Table 4-5 Hepatic total cholesterol(TC) and triacylglycerol(TG) concentrations in sham-operated or ovariectomized (OVX) mice fed the experimental diets for 14 weeks¹

	Sham n=5	OVX n=7	OVX+SE n=11	OVX+IS n=11
TC (mg/g liver)	17.3 ± 2.4	17.3 ± 2.5	15.9 ± 1.9	13.4 ± 5.3
TG (mg/g liver)	67.4 ± 10.1 ^a	61.9 ± 7.6 ^a	73.3 ± 8.9 ^a	25.0 ± 1.9 ^b

1. Values are means ± S.E.M.

Data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey multiple comparison test. Values not sharing a common superscript letter among Sham, OVX, OVX+SE, OVX+IS groups are significantly different at $p < .05$ level.

Growth Curve

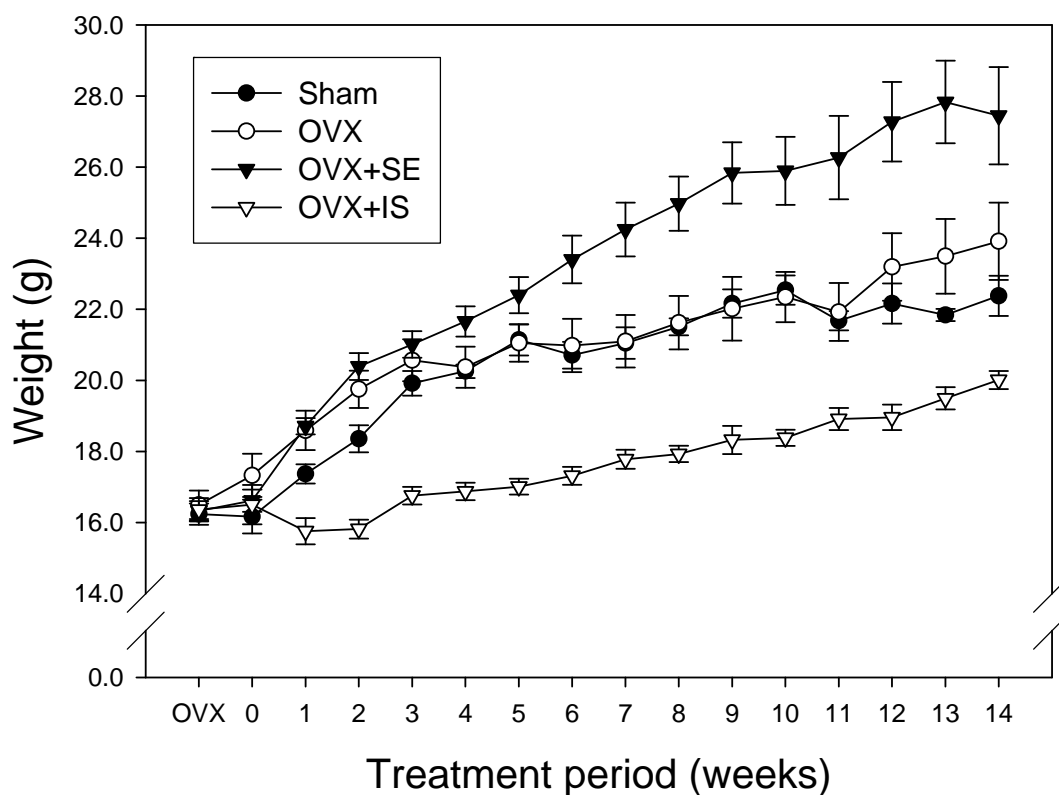


圖 4-1 假手術或卵巢切除之小鼠餵食實驗飼料 14 週生長曲線

Fig 4-1 The growth curve of C57BL/6J female mice in sham-operated or OVX fed a high-fat diet, sesamin-supplemented (sesamin: 0.5% wt/wt) high-fat diets, or isoflavone-supplemented (isoflavone: 0.5% wt/wt) high-fat diets for 14 weeks. All values are means \pm S.E.M. Data were analyzed by one-way-ANOVA and Tukey multiple comparison test. ^aSignificantly different from the OVX group in the same week. ($p < .05$) ^bsignificantly different from the Sham group in the same week. ($p < .05$)

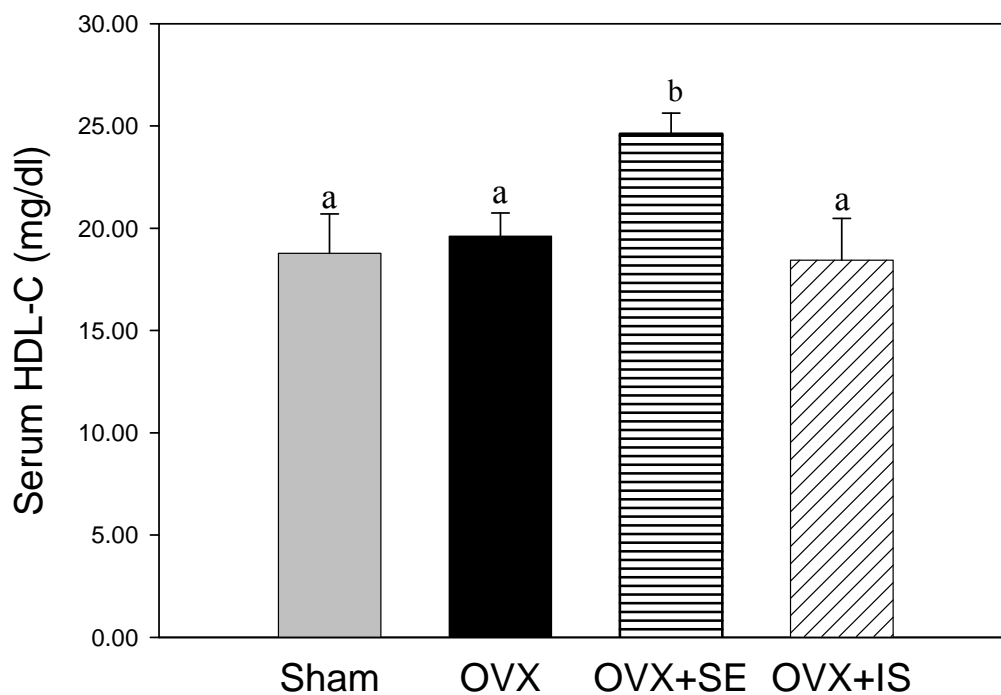


圖 4-2 假手術或卵巢切除之小鼠餵食實驗飼料 14 週後血液 HDL-C 濃度

fig.4-2 Serum level of HDL-C in sham-operated mice or ovariectomized (OVX) mice fed the experimental diets for 14 weeks. Values are means \pm S.E.M. mg/dl.

Data were analyzed by one-way ANOVA and LSD multiple comparison test. Values not sharing a common superscript letter among Sham, OVX, OVX+SE, OVX+IS groups are significantly different at $p < .05$ level.

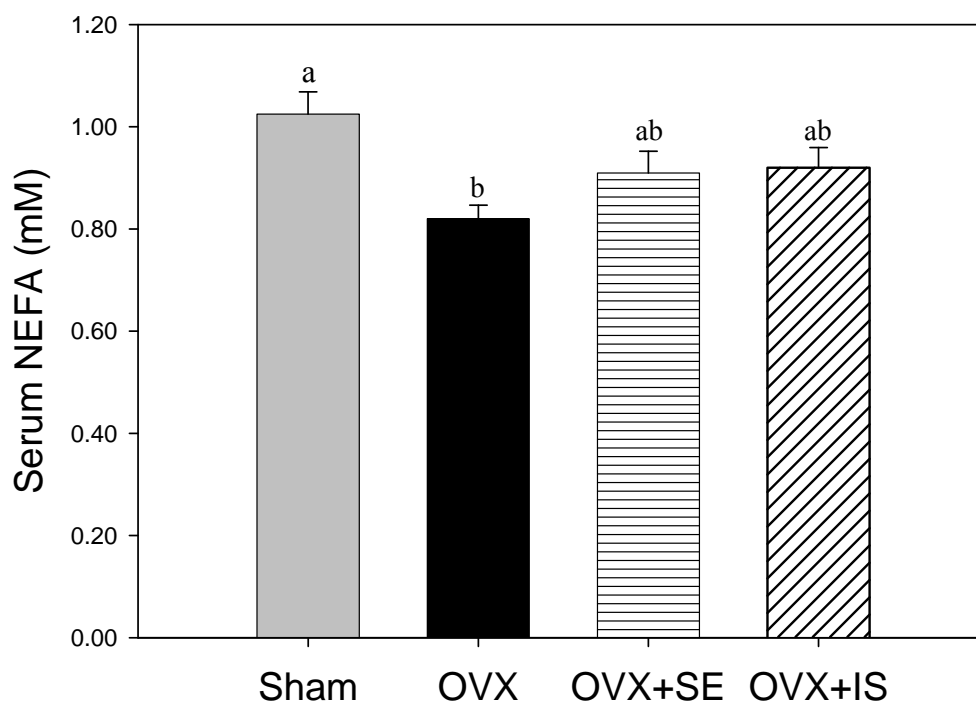


圖 4-3 卵巢切除之 C57BL/6J 小鼠餵食實驗飼料 14 週後血液游離脂肪酸濃度

fig.4-3 Serum level of Free fatty acid in sham-operated mice or ovariectomized

(OVX) mice fed the experimental diets for 14 weeks. Values are means \pm S.E.M.

mM. Data were analyzed by one-way ANOVA and LSD multiple comparison test.

Values not sharing a common superscript letter among Sham, OVX, OVX+SE,

OVX+IS groups are significantly different at $p < .05$ level.

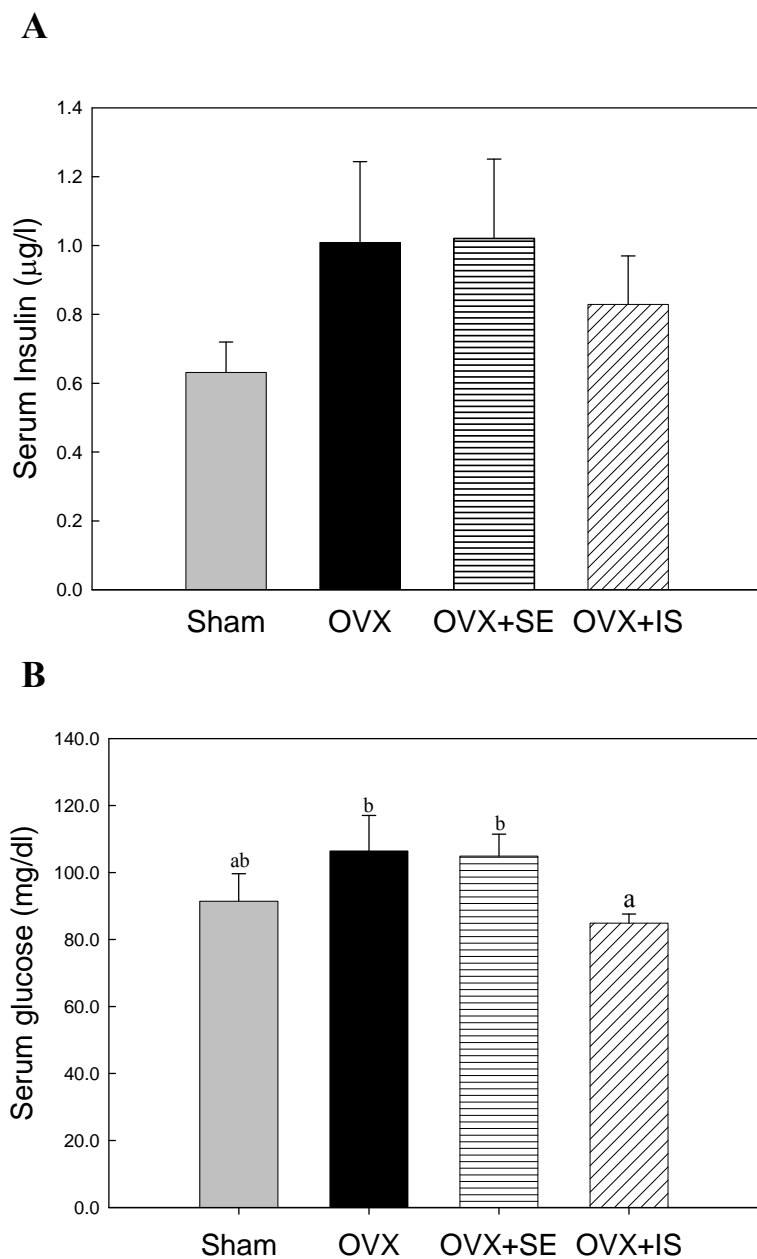


圖 4-4 卵巢切除之 C57BL/6J 小鼠餵食實驗飼料 14 週後血液 insulin 及 glucose 濃度

fig.4-4 Serum level of fasted insulin and glucose in sham-operated mice or ovariectomized (OVX) mice fed the experimental diets for 14 weeks. Values are means \pm S.E.M. $\mu\text{g/l}$ or mg/dl . Data were analyzed by one-way-ANOVA and LSD multiple comparison test. Values not sharing a common superscript letter among Sham, OVX, OVX+SE, OVX+IS groups are significantly different at $p < .05$ level.

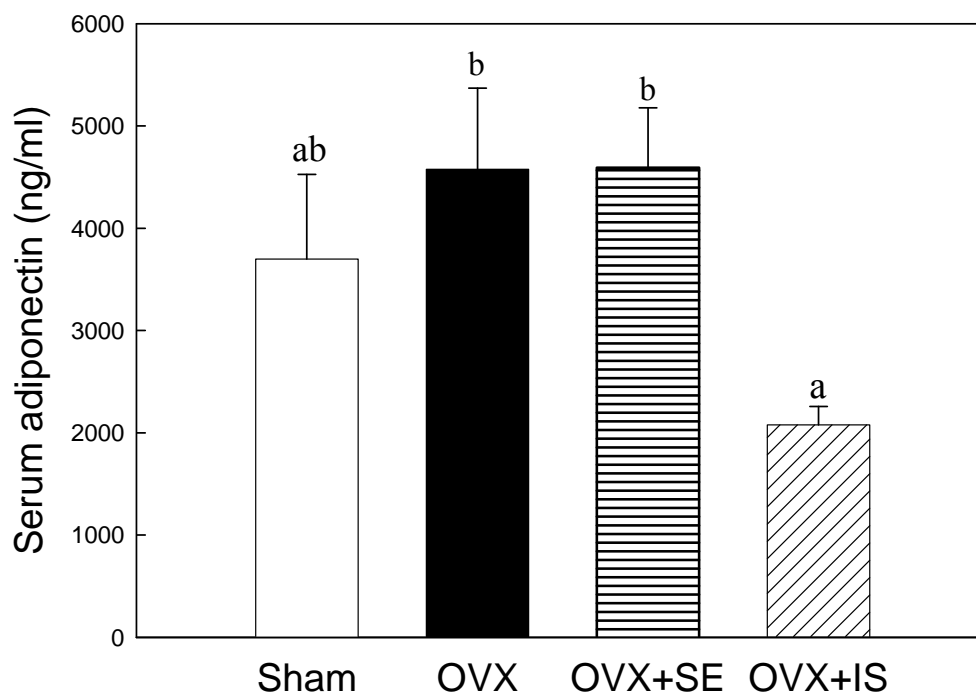


圖 4-5 卵巢切除之 C57BL/6J 小鼠餵食實驗飼料 14 週後血液 adiponectin 濃度

fig.4-5 Serum level of adiponectin in sham-operated mice or ovariectomized

(OVX) mice fed the experimental diets for 14 weeks. Values are means \pm S.E.M.

ng/ml. Data were analyzed by one-way ANOVA and LSD multiple comparison test.

Values not sharing a common superscript letter among Sham, OVX, OVX+SE,

OVX+IS groups are significantly different at $p < .05$ level.

第四節 討論與結論

壹、卵巢切除後誘發更年期後引起之代謝症候群

體內能量平衡會受到性荷爾蒙影響，調節食物攝取量、體重及脂質代謝。女性更年期後因缺乏雌激素的保護，會增加體重及腹部脂肪堆積。齧齒類動物將其雙邊卵巢切除後，瞬間增加食物攝取量及降低活動量和產熱效應，因此造成肥胖(Landau & Zucker, 1976; McElroy & Wade, 1987)。過去研究指出，卵巢切除大鼠實驗 7 週後相較於未切除卵巢的假手術組其可顯著增加體重、攝食量及攝食效應(Sanchez-Mateos et al., 2007)，卵巢切除小鼠利用高脂飲食誘發肥胖，在實驗 6 週後至實驗結束 13 週，其體重皆高於假手術組，實驗 13 週達顯著差異，白色脂肪組織含量亦顯著高於假手術組(Jeong et al., 2004)，顯示利用卵巢切除鼠的模式，可用來探究當雌激素濃度下降，如何影響體內代謝，造成腹部脂肪堆積、肥胖及血脂異常等現象，為一模擬停經後女性體內生理狀態的良好模式。過去研究指出齧齒類動物卵巢切除後，其可顯著上升體重(Chiba et al., 2003; Gomori et al., 2007; Jeong et al., 2004; Sanchez-Mateos et al., 2007; Wu et al., 2004)、增加攝食量及攝食效應(Sanchez-Mateos et al., 2007)、增加腹部脂肪堆積(Jeong et al., 2004; Wu et al., 2004)、可顯著上升血糖及血液 insulin(Gomori et al., 2007)，本研究預期卵巢切除後應出現以上代謝異常的症狀，但結果發現 C57BL/6J 小鼠予以餵食含 20% 的高脂且添加 0.15% 膽固醇飼料 14 週後，卵巢切除組(OVX)相較於假手術組(Sham)體重及攝食量無顯著增加，而攝食效應有增加的趨勢，相較於 Sham 組，OVX 組雖然增加腎周脂及子宮周圍脂肪組織重量，但無統計上顯著差異，血液中 TC、TG、HDL-C 及 glucose 兩組亦無顯著差異，但 OVX 組血液 NEFA 顯著低於 Sham 組，而血液 insulin 有較高的趨勢但也無顯著差異，因此認為本次實驗並未達到成功誘發缺乏雌激素後產生代謝症候群的生理狀態，懷疑卵巢切除後是否確實達成模擬停經後雌激素濃度下降的狀態？Wu 等人研究指出卵巢切除相較於假手術組其子宮重量顯著下降，給予雌激素治療後子宮重量可恢復至與假手術組相近，

發現缺乏雌激素會造成子宮萎縮的現象(Wu et al., 2004)，本次結果顯示 OVX 組相較於 Sham 組子宮重量顯著減少，確實成功模擬更年期後缺乏雌激素的狀態，但為何並未產生代謝異常？推測可能原因有以下兩點：(1)手術實施時間過早(2)飼料配方不恰當。過去研究多在小鼠 8 週齡大實施雙邊卵巢切除手術(Chiba et al., 2003; Jeong et al., 2004; Wu et al., 2004)，也有 14~16 週齡時切除卵巢(Gomori et al., 2007)，但本次實驗在小鼠 6 週齡時進行手術，母鼠達性成熟的年紀約在 7~8 週齡時，卵巢尚未發育完全將其切除，因其尚處於性發育的階段，在這段期間可能造成性生殖系統些微的成長，導致殘存微弱的雌激素效應，以致影響實驗結果。過去研究指出卵巢切除大鼠給予一般飲食(12.5% fat)13 週後相較於未切除卵巢者，可顯著上升體重、增加腹部脂肪堆積及肝脂(Paquette, Shinoda, Rabasa Lhoret, Prud'homme, & Lavoie, 2007)，C57BL/6J 卵巢切除小鼠給予一般飲食(5% fat)30 週後相較於未切除卵巢者，顯著增加體重、肝脂、血糖、血液胰島素及 leptin(Gomori et al., 2007)，另餵食高脂(45% 主要是 lard)飲食誘發 C57BL/6J 小鼠肥胖 12 週後，相較於低脂(5%)飲食顯著增加體重、腹部脂肪、血脂及肝脂(Shih, Lin, & Lin, 2008)，本研究使用的飼料配方為以 AIN-76 為基準將脂肪含量使用奶油調整為高脂(20%)飼料，並另添加 0.15%膽固醇，過去實驗發現奶油中含微量之雌激素，每克奶油約含 539 pg 雌一醇及 82 pg 雌二醇(Wolford & Argoudelis, 1979)，但可能不至於對小鼠體內雌激素濃度造成影響，而我們發現 OVX 組相較於 Sham 組並未提高攝食量，可能是高脂飲食為了維持能量平衡而導致攝食量下降，故往後研究需注意飼料配方中是否含有雌激素或植物性雌激素，可嘗試改用一般配方之低脂(5%)飼料，或許可達到原先實驗設計的預期結果，成功模擬代謝症候群小鼠模式。

貳、芝麻素及異黃酮對肥胖之影響

卵巢切除後體內雌激素濃度下降導致體重及脂肪重量增加，可使用雌激素改善這些症狀(Mohamed & Abdel-Rahman, 2000)。女性停經後增加腹部脂肪組織，

若使用荷爾蒙替代療法(Hormone replacement therapy, HRT)可顯著降低 BMI 及體脂率(Sayegh, Kelly, Wurtman, Deitch, & Chelmow, 1999)，過去常使用的藥物為 raloxifene 及 tamoxifen，可改善更年期婦女骨質大量流失及脂肪堆積的現象，抑制肥胖及骨質疏鬆症同時也具有保護心血管疾病的效用，但是發現其可能具有副作用，會提高乳癌及子宮內膜癌的風險(Lindenfeld et al., 2003)。植物性雌激素(phytoestrogens)構造與 E₂ 相似，具有和 ER α 及 ER β 結合的能力，但與之親合力不同，為 SERMs，具有雌激素及抗雌激素雙向效應，可被用來取代 HRT，預防及治療更年期婦女引發的高膽固醇血症及骨質疏鬆症(Adlercreutz, Hamalainen, Gorbach, & Goldin, 1992; Anderson, Johnstone, & Cook-Newell, 1995; Messina, 2002)，但可減少荷爾蒙相關癌症發生率。

大豆異黃酮中之 genistein 為一種植物性雌激素，過去已有許多相關研究指出 genistein 具有減少腹部脂肪堆積、減少骨質流失、抗動脈粥狀硬化、抗肥胖... 等功效，而在荷蘭的病例對照研究中發現，血液中 genistein 的濃度與乳癌風險呈負相關(Verheus et al., 2007)，因此相較於雌激素治療其乳癌發生率較低。在體外實驗指出，genistein 能夠抑制受到 insulin 誘導之 3T3-L1 前體脂肪細胞脂肪細胞生成作用(Harmon & Harp, 2001)，體內實驗指出卵巢切除小鼠飼料添加 0.16% isoflavone，實驗 6 週後可顯著降低體重(Wu et al., 2004)，本研究中飼料添加 0.5% isoflavone 的組別(OVX+IS)相較於 OVX 組，可降低體重、腎周脂及子宮周圍脂肪重量，顯示其具有減少脂肪堆積之功效。研究指出雌激素能夠下降 LPL 活性，進而調控脂肪細胞生成作用因而抑制脂肪堆積，卵巢切除後會上升脂肪細胞上 LPL 及增加脂肪堆積，若給與雌激素治療後可改善(Hamosh & Hamosh, 1975)，另一項研究發現 C57BL/6J 小鼠卵巢切除後，注射 genistein 21-28 天或飼料中添加 genistein 餵食 12 天，可顯著減少腹部脂肪重量，也指出能夠減少脂肪組織上 LPL mRNA 表現量，認為 genistein 抗肥胖及抑制脂肪生成作用是需要 ER α 的媒介(Naaz et al., 2003)，ER α 及 ER β 皆可表現人類及齧齒類動物不同器官及組織上，在脂肪組織上 ER α 為 E₂ 主要的調控接受器(Heine et al., 2000)，ER α 基因別

除小鼠(α ERKO)小鼠相較於野生型(wild-type)的小鼠顯著增加腹部脂肪組織，指出 E_2 主要經由 $ER\alpha$ 訊號調控系統影響脂肪細胞生成作用(Heine et al., 2000)，因此推測本次研究 genistein 藉由抑制脂肪組織上 LPL 的作用，進而減少脂肪組織生成，能達到與雌激素相同的抗肥胖之效應，這個過程可能經由 $ER\alpha$ 媒介而調控，需再進一步探究其錯綜複雜的機轉。

本研究添加 0.5% sesamin 組(OVX+SE)相較於 OVX 組，其體重、腎周脂及子宮周圍脂肪重量增加，且重量顯著高於 OVX+IS 組，攝食量及攝食效應皆有較高的趨勢。過去研究指出卵巢切除大鼠給與 E_2 治療 7 天後，可顯著下降體重達到與未切除卵巢組相近，且顯著減少攝食效應(Sanchez-Mateos et al., 2007)，本次研究 OVX+IS 組攝食量及攝食效應亦有減少的現象，因此 sesamin 並未達到與 isoflavone 及 E_2 相似的抗肥胖作用。另有研究發現在大鼠或小鼠飼料添加 0.2% sesamin，對於體重及白色脂肪組織重量無顯著影響(Akahoshi et al., 2002; Sugano et al., 2001)，此外，研究發現 ENL 及 ENL 代謝產物具有微弱的雌激素(estrogenic)及抗雌激素(antiestrogenic)活性(Mueller, Simon, Chae, Metzler, & Korach, 2004)，ENL 及 END 為 sesamin 可能之代謝產物，本次研究餵食 sesamin 後測得血液 ENL 濃度個體差異極大，範圍從 70~4277 pg/ml，體外實驗發現 ENL 在低劑量可發揮抗雌激素作用抑制 MCF-7 細胞增生(Carreau, Flouriot, Bennetau-Pelissero, & Potier, 2008)，在脂肪細胞上是否也因為 ENL 之抗雌激素作用而無法透過 ER 作用達到抗肥胖的功效，仍需進一步探究。直至今日，sesamin 對於肥胖及腹部脂肪堆積影響的相關研究很少，至今尚未得到定論，由本次研究發現 sesamin 並無減少卵巢切除之 C57BL6J 小鼠體重及腹部脂肪組織含量，是否對於其他種類的動物甚至是人體也無改善的效用？有待往後研究進一步指出。

叁、芝麻素及異黃酮對 adiponectin 及胰島素阻抗之影響

Adiponectin 為脂肪組織分泌的細胞激素，過去研究在肥胖的糖尿病鼠(Arita et al., 1999; Hu, Liang, & Spiegelman, 1996)或人類(Arita et al., 1999)，發現血漿中

adiponectin 濃度顯著下降且亦顯著減少脂肪細胞上 adiponectin mRNA 表現量，在肥胖的小鼠模式，指出 adiponectin 濃度下降可能會進一步發展胰島素阻抗及第 2 型糖尿病(Yamauchi et al., 2001)，本次研究結果發現，缺乏雌激素的 OVX 組相較於有雌激素保護的 Sham 組，血液中 adiponectin 濃度有較高的趨勢，OVX+SE 組無顯著影響血液 adiponectin 濃度，但 OVX+IS 組顯著減少血液中 adiponectin 濃度，過去研究體內實驗顯示年輕小鼠(7 天大)或成鼠(45 天大)將其卵巢切除後相較於假手術組顯著增加血液 adiponectin 濃度，補充 17- β estradiol 後 adiponectin 反而顯著下降(Combs et al., 2003)，近來研究調查發現更年期婦女其血液中 adiponectin 濃度與雌激素濃度呈顯著負相關(Miyatani et al., 2008)，另一項研究調查行經期、停經 1 年以上未滿 7 年及停經 7 年以上女性血液 adiponectin 濃度，發現三組血液 adiponectin 濃度分別為 8.4、12.0 及 15.3 $\mu\text{g/ml}$ ，停經女性顯著高於未停經者(Jurimae & Jurimae, 2007)，本次實驗結果發現與上述研究相似的現象，發現停經後可能上升血液 adiponectin 濃度，而 OVX+IV 組添加 0.5% isoflavone 可能已遠超過內生性雌激素的效應，因此顯著下降血液中 adiponectin，甚至低於具備內生性雌激素的 sham 組，血液 adiponectin 濃度可能受到體內荷爾蒙控制，往後需要更多的實驗證實雌激素對於 adiponectin 之生理作用機轉。研究調查非肥胖者血液 adiponectin 濃度與心血管疾病危險因子之間的相關性，發現女性體內 adiponectin 濃度與血糖、血液 insulin、TG 及 HOMA-IR 呈現顯著負相關(Im et al., 2006)，另一項研究指出以高脂飲食誘發 KK/Ta 小鼠模式，白色脂肪組織上 adiponectin mRNA 表現量顯著減少，而血漿中 adiponectin 濃度下降與 insulin 及 HOMA-IR 濃度上升有相關(Akagiri et al., 2008)。本研究中 OVX+IS 組相較於 OVX 組顯著下降禁食血糖濃度，血液 insulin 濃度及 HOMA-IR 也有下降的趨勢，但並無統計上顯著差異，顯示 isoflavone 可能具有改善胰島素敏感性的能力，且進一步相關性分析發現 adiponectin 濃度與血糖($r=0.351$, $p=0.070$)、insulin($r=0.095$, $p=0.591$)無顯著相關，故認為 isoflavone 雖然造成血液中 adiponectin 濃度下降，但並不會進一步引發胰島素阻抗或糖尿病。

肆、芝麻素及異黃酮對血脂及心血管疾病之影響

更年期婦女因為缺乏雌激素可能對於體內脂蛋白代謝產生負面影響，使產生易致粥瘤性之血脂狀態，上升體內 TC、TG、LDL-C 及 lipoproteinB 濃度，但下降 HDL-C 及 apolipoproteinA₁ 濃度(Brown et al., 1993; Bruschi et al., 1996)，因此，停經後體內血脂異常的現象易增加心血管疾病之風險。

本研究結果發現，OVX+SE 組及 OVX+IS 組相較於 OVX 組實驗 14 週後，皆無顯著影響血清 TG、TC，但血清 HDL-C 濃度 OVX+SE 組顯著高於 Sham、OVX 及 OVX+IS 組，相較於 OVX 組增加 27%，顯示 C57BL/6J 小鼠餵食添加 0.5% sesamin 之高脂高膽固醇飼料 14 週後可顯著上升血液 HDL-C，而 TC/HDL-C ratio 也明顯較低。過去多項研究指出 HDL-C 為心血管疾病保護因子，具有抗發炎(Yuhanna et al., 2001)及抗血栓形成(P. Xia, Vadas, Rye, Barter, & Gamble, 1999)之功效，故其具有抗動脈硬化之作用，因此推測本研究之 sesamin 對心血管疾病具有保護效用。HDL 上主要的脂蛋白為 apoA-I，在肝臟及小腸皆能合成 apoA-I，若肝內過度表現 apoA-I，顯著上升血液 HDL-C 濃度且可抑制動脈硬化之進展(A. S. Plump, Scott, & Breslow, 1994; Rubin, Krauss, Spangler, Verstuyft, & Clift, 1991; Tangirala et al., 1999)。Fibrates 為臨床上用來降血脂的藥物，可上升 HDL-C 10~15%，為一種 PPAR α agonist，可與 PPAR α 結合後啟動下游基因的轉錄作用，如 apoA-I、促進脂蛋白水解酶(lipoprotein lipase, LPL)，Saku 等人指出其能夠上升血液 HDL-C 濃度可能是由於刺激肝內 apoA-I 表現及促進 LPL 的活性所致(Saku, Gartside, Hynd, & Kashyap, 1985)，而 sesamin 亦具有調控肝臟上 PPAR α 活性的作用(Ashakumary et al., 1999)，故推測 sesamin 可能與 fibrate 有相似的效用，透過 PPAR α 進而增加 apoA-I 表現及促進 LPL 的作用，進而上升血液 HDL-C 濃度。

本研究發現 OVX+IS 組相較於 OVX 組，無顯著影響血液 TG、TC 及 HDL-C，顯示 0.5 % genistein 在卵巢切除小鼠，似乎沒有改善血脂的效用，但過去研究大

多提出 isoflavone 具有改善血脂的功效。飼料添加 0.16% isoflavone 可顯著下降卵巢切除小鼠血液 TG 濃度，但不影響血液 TC 及 HDL-C(Wu et al., 2004)，*db/db* 小鼠飼食添加 0.02% genistein 的飼料，可顯著降低血液 TG、TC 及顯著上升血液 HDL-C 及 HDL/TC ratio (Ae Park et al., 2006)，利用 STZ 誘發糖尿病大鼠模式上，0.06% genistein 亦能夠顯著下降血液 TG、TC 及顯著上升血液 HDL-C(J. S. Lee, 2006)，本研究中缺乏雌激素之 OVX 組血液 TC 比其他各組都低，好像在此模式(去卵巢小鼠、高奶油飼料、添加 0.5% isoflavone or sesamin)，雌激素反而有害血脂，原因不明。

伍、芝麻素及異黃酮對肝脂之影響

肥胖及糖尿病人的脂肪細胞上產生之 FFA 再酯化功能受損，因而導致過多的 FFA 釋放至血液中，增加血液 FFA 濃度進而進入肝中形成 TG 堆積產生脂肪肝。近來脂肪肝已被廣為注意，並將其視為代謝症候群病症之一，過多的脂肪堆積在肝臟中，進一步可能會引發肝發炎、脂性肝炎(steatohepatitis)、肝硬化(cirrhosis)甚至最終導致肝癌(Cortez-Pinto, Camilo, Baptista, De Oliveira, & De Moura, 1999; Marchesini et al., 2001; Marchesini et al., 2003)。控制脂肪肝能夠減緩或抑制肝病的進展亦可降低代謝症候群風險，因此預防脂肪肝形成是勢在必行的。脂肪堆積在肝臟中是受到肝內酵素調節，可催化脂肪攝入、合成、氧化及釋出，除了基因本身影響外，可能還受到環境因子所控制如：飲食、毒物等調節。若肝內 TG 含量超過肝重 5%，即可被認定形成脂肪肝，本次研究使用高脂(20%)飼料飼食小鼠為期 14 週，由結果發現 Sham 及 OVX 組其肝內 TG 含量占肝重% 分別為 6.74%及 6.19%，皆已達到脂肪肝的狀態，因此本次實驗可用來探究對脂肪肝影響。過去研究指出小鼠飼食添加 genistein 之高脂(18%)飼料的 12 週後，相較於控制組飼料含 0.2%及 0.4%之 genistein 可顯著下降肝內 TG 及 cholesterol 含量(Y. M. Lee et al., 2006)，本次結果發現 OVX+IS 組相較於 OVX 組顯著減少肝內 TG 含量，與先前研究結果相似，且肝內 TG 含量僅占肝重之 2.5%，顯示

genistein 具有抑制肝內脂肪堆積的潛力。

而本研究結果中另添加 0.5% sesamin 之 OVX+SE 組相較於 OVX 組並無顯著影響肝內 TG 及 TC 含量，與過去數個研究結果相歧，Ashakumary 等人指出飼料添加 0.2%及 0.5% sesamin 餵食大鼠 15 天，能夠顯著增加肝內脂肪酸氧化酵素活性及表現量(Ashakumary et al., 1999)，且大鼠餵食含 0.2 % sesamin 具有下降脂肪酸合成酵素 fatty acid synthase 及 pyruvate kinase 活性及表現量的能力，可能是透過向下調節 SREBP-1 表現量，進而減少脂肪酸合成(Ide et al., 2001)，顯示 sesamin 具有減少肝內脂肪酸合成及促進氧化之雙重功效，但大多是對於大鼠肝臟的效用，鮮少有 sesamin 針對小鼠肝臟脂肪酸代謝的作用，Kushiro 等人探討不同種類的動物其肝內脂肪酸代謝的差異，發現 sesamin 能夠顯著下降大鼠肝內脂肪酸合成酵素 mRNA 表現量，顯著增加脂肪酸氧化酵素 mRNA 表現量，但無顯著影響小鼠肝內脂肪酸代謝(Kushiro, Takahashi, & Ide, 2004)，因此推測是否因為 sesamin 在不同種類的動物身上生理活性不同，以致其對小鼠肝臟脂質代謝作用微弱，無法發揮作用。

陸、結論

本研究結果顯示，sesamin 能夠上升卵巢切除小鼠血液中 HDL-C 濃度及下降 TC/HDL-C ratio，對心血管疾病具有保護效應，但增加體重及腹部脂肪堆積，不具有抗肥胖的作用；isoflavone 不影響血脂，能夠下降體重減少腹部脂肪堆積及肝脂，具有抗代謝症候群之潛力。

第五章

具植物性雌激素之食材對 肝細胞脂肪酸代謝之影響

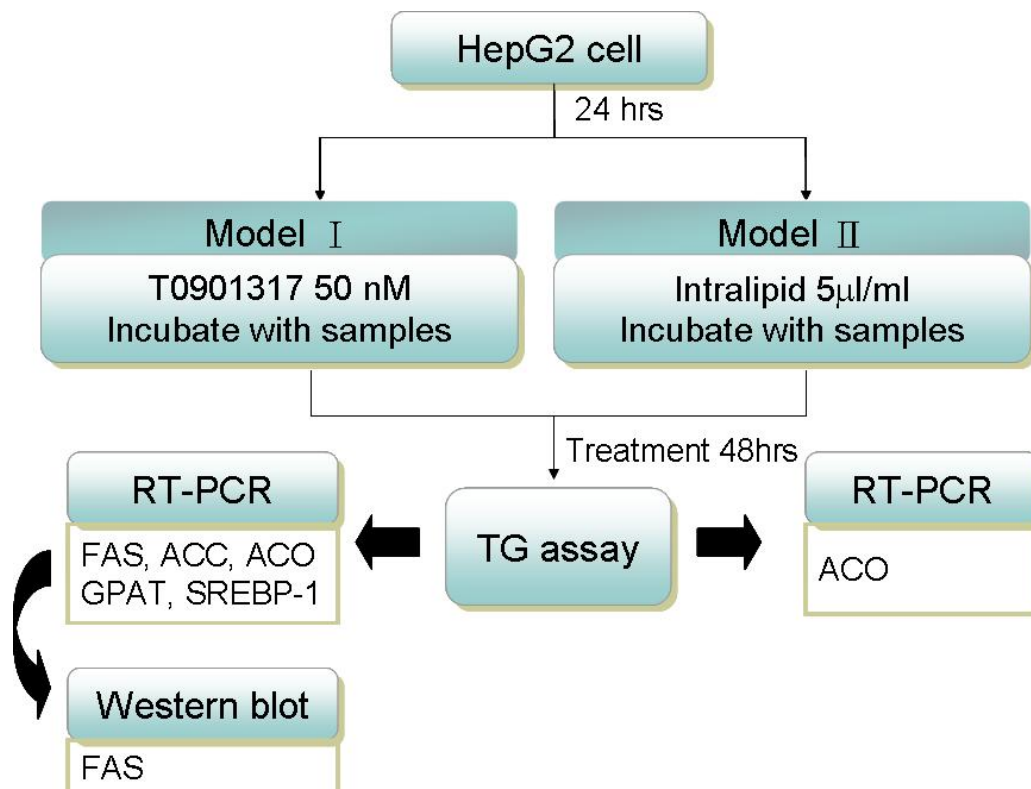
第一節 前言

近年來有愈來愈多的研究指出肥胖、第 2 型糖尿病、高血脂症及心血管疾病等這些代謝症候群相關病症與非酒精性脂肪肝病(nonalcoholic fatty liver, NAFLD)之間具有強相關性(Abdelmalek & Diehl, 2007; Charlton, 2004)。NAFLD 的主要特徵為脂肪堆積在肝中，進而造成肝臟慢性的發炎狀態，可視為代謝症候群之肝病徵(Cortez-Pinto et al., 1999)。女性相較於男性族群，非酒精性脂性肝炎(non-alcoholic hepatic steatosis, NAHS)發生率較低，而在缺乏內生性雌激素之 ArKO 小鼠模式上發現，參與肝臟脂肪酸氧化酵素之表現量下降，認為 E₂ 對於肝內脂肪酸氧化及脂質恆定扮演一個重要角色(Nemoto et al., 2000)，因此內生性雌激素可能具有預防脂性肝炎之功效。

過去尚未發現有良好之體外模式以利篩選大量可能具有防治脂肪肝能力之食材樣本，故本章研究使用 T0901317 及 intralipid 兩種藥物誘發 HepG2 細胞內 TG 堆積，模擬脂肪肝形成，觀察具植物性雌激素食材之樣本是否具有減少細胞內 TG 含量的能力，更進一步探討其如何影響細胞內脂肪酸代謝酵素，是否下降細胞內脂肪酸合成酵素 fatty acid synthase(FAS)、acetyl-CoA carboxylase(ACC)、轉錄因子 sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1)、TG 合成重要酵素 glycerol 3-phosphate acyltransferase (GPAT)表現量或上升脂肪酸氧化酵素 acyl-CoA oxidase (ACO)表現量，以期具有抑制脂肪酸生合成作用及促進脂肪酸氧化作用之效用。

第二節 材料與方法

壹、實驗設計



貳、研究材料

(一) 人類肝癌細胞株(Human hepatoblastoma G2, HepG2) 培養

HepG2細胞來自食工所生資中心 (Bioresource Collection and Research Center, BCRC)，使用HyQ DMEM/HIGH GLUCOSE 培養液 (Hyclone)，內含4 mM L-glutamine、4.5g/L glucose，外加fetal bovine serum 5% (Hyclone)、1% Non-Essential Amino Acids (GIBCO)、1% L-glutamine (GIBCO)及1% penicillin/streptomycin (GIBCO)。將細胞培養於10 cm dish中。培養箱 (Thermo) 環境維持37°C、5%CO₂及飽和水蒸氣，於水盤中加入抗黴劑Methyl 4-hydroxybenzoate (SIGMA)。二天更換培養液一次，細胞長滿後進行細胞繼代。

(二) 細胞計數

活細胞會排斥 Trypan Blue 染劑，只有死細胞會被染成深藍色，故以顯微鏡 (Nikon) 計算血球計數盤上的亮點，可得知細胞之相對存活率。取 20 μ l 之細胞懸浮液加入 80 μ l Trypan Blue (SIGMA) 稀釋五倍，以血球計數盤計算四大格總數，除以 4 乘以稀釋倍數再乘以 10^4 ，得知細胞液之密度 (細胞數/ml)。

(三) 細胞冷凍

將細胞懸浮液以 1000 rpm 離心 5 分鐘，倒除上清液，注入以 7% DMSO (SIGMA) 加上 93% 新鮮培養液配製成的冷凍保存液混合均勻，再取 1 ml 分裝至各冷凍管中。將冷凍管放置保麗龍盒中 -80 $^{\circ}$ C overnight，隔天將冷凍管放入液態氮桶中保存。

參、樣品製備及取得

- (一) Sesamin：自 Cayman chemical 購得。分子量 354.4，純度 $\geq 95\%$ ，結晶狀固體，利用 DMSO 溶解。
- (二) Enterolactone：自 Cayman chemical 購得。分子量為 298.3。原本的溶劑先用氮氣吹乾，再加入絕對酒精溶解。
- (三) Genistein：自 SIGMA 購得。分子量為 270.27，利用 DMSO 溶解。
- (四) Alfalfa EA extract：由國立台灣大學 林璧鳳教授實驗室提供。品種為澳洲紫花苜蓿，自台北市穀堡農坊購得。取得的首蓿芽冷凍於 -80 $^{\circ}$ C，隔夜後放置在冷凍乾燥機內真空乾燥完全，凍乾後的首蓿芽以研磨機磨成粉，再以乙酸乙酯 (ethyl acetate, EA) 萃取，萃取液經過減壓濃縮並抽乾後，利用絕對酒精溶解。
- (五) Yam EA extract：由國立台灣大學 黃青真教授實驗室提供，品種為台農二號。將取得的山藥冷凍於 -80 $^{\circ}$ C，隔夜後放置在冷凍乾燥機內真空乾燥完全，凍乾後的山藥以研磨機磨成粉，再以乙酸乙酯 (ethyl acetate, EA) 萃取，萃取液經過減壓濃縮並抽乾後，最後利用絕對酒精溶解。
- (六) T0901317：自 Cayman chemical 購得。為一種 LXR ligand 分子量為 481.3，

純度 $\geq 98\%$ ，結晶狀固體。利用 DMSO 溶解。

(七) Intralipid：為 10% intralipid 主要含有 100 mg/ml soybean oil、12mg/ml phospholipid、22mg/ml glycerol anhydrous，其中 soybean oil 中 triglycerides 為 7% linolenic acid (C18:3)、51% linoleic acid (C-18:2)、23% oleic acid(C-18:1).也包含飽和脂肪酸 4%stearic acid 及 10% palmitic acid

肆、細胞存活率分析 (MTT assay)

以 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT；SIGMA) 為受質，該受質在活細胞中會被粒線體 dehydrogenase 還原，而產生紫色 formazan 產物。在 550 nm 有最大吸收，利用比色法來測定細胞存活率。當存活細胞越多，產生的 formazan 也越多，可計算出細胞存活率。在 96 孔盤中，每個 well 內接種 2×10^4 個細胞，待 24 小時細胞貼附後，吸去培養液，注入已配好不同濃度之植物性雌激素純物質或萃取物，培養 48 小時後，吸去培養液再加入 60 μ l MTT 溶液 (0.5mg/ml) 於培養箱中反應 2 小時，最後加入 100 μ l isopropanol with 0.04N HCl 反應約 30 分鐘，並用 shaker 輕輕搖晃以溶解細胞，最後利用 ELISA Reader (TELAN) 以 550nm 讀取吸光值，以僅含新鮮培養液細胞之吸光值為對照組 (100%)，再以實驗組之吸光值除以對照組之吸光值，以計算出細胞之相對存活百分比。

伍、細胞內蛋白質濃度測定

(一) 細胞蛋白質抽取

將細胞種於 6 well plate 中，密度為 5×10^5 /well，依照實驗設計之進行後，吸去舊 medium，以冰 PBS wash 兩次，將 PBS 吸乾，加入 200 μ l 之 cell lysis buffer 置於冰上 5 min，將細胞刮下，置入 eppendorf，以 14000g、4°C 離心 10 min，取上清液測定蛋白質濃度，分裝置新的 eppendorf 於 -80°C 保存。

(二) 蛋白質定量

使用 Bradford method，此定量方法利用 Coomassie Brilliant Blue G-250 會與蛋白質結合的特性，在 G-250 與蛋白質結合後，G-250 的顏色會從紅色轉變成為藍色，此時在 595 nm 波長下，會有較高的吸收，以便偵測。標準品 BSA (SIGMA) 及經適當稀釋倍率之樣品加入 Coomassie Brilliant Blue G-250 混合均勻，反應五分鐘後，以波長 595nm 測定吸光值。以標準品 BSA 做出標準曲線，利用內插法求得蛋白質濃度 ($\mu\text{g/ml}$)。

蛋白質標準曲線製作：

蛋白質濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	0	5	10	15	20
0.1mg/ml BSA (μl)	0	25	50	75	100
DDW (μl)	400	375	350	325	300
Bradford (μl)	100				
總體積 (μl)	500				

陸、細胞內三酸甘油酯含量測定

原理同第一節。方法如下：取 50 μl 樣品加入 96 well plate 中，再加 200 μl 反應試劑，反應時間 10 分鐘，作二重複，使用市售組合試劑 (Randox)，以 Enzymatic CHOD-PAP method 測定，波長 500 nm。利用 triglyceride calibrator standard (Randox) 做一標準曲線，標準品補 PBS 至與樣品體積相同，利用內插法推算其濃度。

柒、細胞 mRNA 表現量

(一) 細胞 RNA 抽取

細胞培養於直徑6公分的培養皿中，細胞密度為 $1 \times 10^6/\text{well}$ ，於培養箱隔夜培養後，細胞進行不同處理，48小時後，將其細胞培養液移除，以適量的 1X PBS 清洗殘留的培養液，加入 1 ml TRIzol reagent，均勻搖晃培養皿使細胞溶解，室溫靜置 5 分鐘，將溶液移至 1.5 ml 離心管，此時將所加入 TRIzol reagent 的量定為 1 倍體積，再加入 0.2 倍體積的 chloroform，混合均勻後，劇烈震盪至少 20 秒，使溶液呈現乳白色混濁狀，室溫靜置 3 分鐘，於 4°C 12,000 rpm 離心 15 分鐘，離心後溶液

會分為三層，小心吸取上層溶液至1.5ml離心管，需避免取到混濁界面層，加入與取出上層溶液等體積的isopropanol，將溶液混合均勻，室溫靜置10分鐘後，以4°C 12,000 rpm離心15分鐘，移除上清液，以1ml的70%酒精清洗RNA沉澱物，移除70%酒精後，待RNA沉澱物略乾，以適量的 DEPC-H₂O回溶RNA，測量O.D.₂₆₀以及O.D.₂₈₀吸光值以定量RNA濃度及純度。

(二) 第一股 cDNA 合成

取5 µg的RNA於0.2 ml的離心管，再以DEPC-H₂O將體積補至13 µl後加入1 µl 10 mM oligo-dT primer，接著於70°C加熱10分鐘後迅速冰浴，再加入4µl 5X MMLV-RT buffer、1 µl 10mM dNTP及1µl 200 U/µl MMLV Reverse transcriptase (Promega)。以25°C 反應10分鐘、42°C 反應50分鐘，最後90°C反應5分鐘終止反應。反應結束置於冰上10分鐘，加入1 µl 2U/µl RNase，於37°C反應20分鐘，完成第一股cDNA合成。

(三) 反轉錄酶-聚合酶連鎖反應 (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)

以滅菌二次水將cDNA濃度調整為50 ng/µl，取適量cDNA作為模板，加入5 µl 10X Taq buffer、1µl 10 mM dNTP、3'與5'端引子(皆10 µM)各1µl，及0.5 µl 5U/µl Taq DNA polymerase (Biomax)，並以滅菌二次水將總體積補至50 µl以下述條件進行聚合酶連鎖反應。反應結束後以1.5 %洋菜膠體電泳圖譜觀察其產物。

【primer序列】

基因 (GENBANK)	方向	序列(5' → 3')
<i>FAS</i> (NM_004104)	F	TGTTTGAGTTCGTGGAGCAG
	R	AACTCCAGGTTGTCCCTGTG
<i>ACC</i> (NM_001093)	F	CAAGAAGCAGGCAAACATCA
	R	GACAAACTCAGCGGGAGAAG
<i>ACO</i> (NM_007292)	F	GAACTCACCTTCGAGGCTTG
	R	CAGCTTCTCCCACAAGGAAG
<i>GLYCEROL 3-PHOSPHATE ACYLTRANSFERASE</i> (NM_020918)	F	AGTGAGGAATGGGGTGAGTG
	R	CAGTCACATTGGTGGCAAAC
<i>SREBP-1</i> (NM_001005291)	F	CGGAGAAGCTGCCTATCAAC
	R	GGTCAGTGTGTCCTCCACCT
<i>GAPDH</i> (NM_002046)	F	AAAGGATCCACTGGCGTCTTCACCACC
	R	GAATTCGTCATGGATGACCTTGCCAG

【PCR 反應條件】

基因	反應條件	cDNA 片段
GAPDH	94°C，5分鐘	203bp
	94°C 30秒、60°C 30秒、72°C 30秒，共19個循環	
	72°C，7分鐘	
	4°C，反應終止	
FAS	94°C，5分鐘	412bp
	94°C 30秒、60°C 30秒、72°C 30秒，共26個循環	
	72°C，7分鐘	
	4°C，反應終止	
ACO	94°C，5分鐘	438 bp
	94°C 30秒、60°C 30秒、72°C 30秒，共25個循環	
	72°C，7分鐘	
	4°C，反應終止	
ACCα	94°C，5分鐘	301 bp
	94°C 30秒、60°C 30秒、72°C 30秒，共28個循環	
	72°C，7分鐘	
	4°C，反應終止	
GPAT	94°C，5分鐘	301 bp
	94°C 30秒、60°C 30秒、72°C 30秒，共26個循環	
	72°C，7分鐘	
	4°C，反應終止	
SREBP-1	94°C，5分鐘	380 bp
	94°C 30秒、60°C 30秒、72°C 30秒，共27個循環	
	72°C，7分鐘	
	4°C，反應終止	

捌、西方墨點法 (Western Blotting) 分析細胞內蛋白質表現

(一) 細胞蛋白質抽取

將細胞種於6 well plate中，密度為 5×10^5 /well，依照實驗設計之進行後，吸去舊medium，以冰PBS wash兩次，將PBS吸乾，加入200 μ l之cell lysis buffer置於冰上5 min，將細胞刮下，置入eppendorf，以14000g、4°C 離心10 min，取上清液測定蛋白質濃度，分裝置新的eppendorf於 -80°C 保存。

(二) 蛋白質濃度定量

同前述伍方法。

(三) 樣本前處理

將樣品與5x loading buffer (含10% β -mercaptoethanol)以1:4比例均勻混合，於100°C反應10分鐘，立即置於冰上，以備進行電泳。

(四) SDS-PAGE 膠體製備

依下列之配方製備膠體：

	8% separating gel	5% stacking gel
ddH ₂ O	4.6	3.4
30% acrylamide mix (BioRad)	2.7	0.83
1.5M Tris-HCl (pH=8.8)	2	-
1M Tris-HCl (pH=6.8)	-	0.63
10% SDS (SIGMA)	0.1	0.05
10% ammonium persulfate (APS) (SIGMA)	0.1	0.05
TEMED (SIGMA)	0.006	0.005

單位：ml

10%APS、TEMED 最後加入。

配製 Separating gel 於室溫下混合均勻，注入電泳玻片間，以 95%酒精填滿空隙讓膠得以壓平，待完全聚合。凝結後移除酒精，配製 Stacking gel 於室溫下混合均勻，注入電泳玻片間使 stacking gel 位於 separating gel 之上並插入齒梳，待完全聚合後移除齒梳，裝置在電泳槽中，浸泡於電泳緩衝液 (running buffer) 等待加入樣本進行電泳。

(五) 電泳操作

將各樣本及 protein marker 注入電泳膠片槽溝中，先以電壓 60V 進行電泳，讓樣本堆疊於集集膠體 (stacking gel) 中，待樣本進入分離膠體 (separating gel)，再將電壓升至 120V，經適當時間，marker 展開後即停止電泳。接著進行蛋白質樣本的染色或轉印。

(六) 蛋白質樣本轉印 (Electroblotting)

取適當大小 PVDF (nitrocellulose) 膜，先以 methanol 浸濕活化 1 分鐘，再以電泳液 (transfer buffer) 沖洗去除 methanol，連同二張濾紙放入電泳液中。轉印裝置重疊順序由下而上依序為濾紙、PVDF 膜、含有蛋白質樣本之電泳膠片 (SDS-PAGE gel)、濾紙，注意其中不可有氣泡存在。裝置放入轉印槽中，以 350 mA 轉印 90 分鐘，轉印完成後，取出 PVDF 膜。

Transfer buffer 製備：配置時 methanol 最後加入以免溶解不完全。

Transfer buffer	成分
900 ml	H ₂ O ₂
3.03 g	Tris base
14.4 g	Glycine
100 ml	methanol

(七) 抗體結合免疫分析 (Immunoblotting)

將轉印完成之 PVDF 膜置於 blocking buffer (5% non-fat milk in TBST) 作為非特異性 (non-specific antigen) 抗原的阻斷劑，室溫下作用 1 小時。移除 blocking buffer，加入適當稀釋之一級抗體，4°C 反應 overnight。接著以 TBST 清洗 5 分鐘 3-5 次，之後加入適當稀釋之二級抗體，室溫下反應 1 小時，之後同樣以 TBST 清

洗5分鐘3-5次，利用enhanced-chemiluminescence (ECL)系統與二級抗體上帶有的酵素HRP (horse radish peroxidase)進行反應，產生冷光，並以Kodak Biomax light film覆蓋於PVDF membrane上進行壓片數分鐘，洗片後即可獲得影像。顯影完成的底片影像擷取放入電腦中，以Image J軟體讀取每一個band之密度加以分析與比較。

(八) FAS (Fatty acid synthase)測定

欲測抗原	一級抗體	二級抗體
	monoclonal anti β -actin	Anti-mouse IgG
β -actin	(1 : 10000 稀釋) (SIGMA)	(1 : 3000 稀釋) (SIGMA)
	Rabbit anti-Human FAS Ab	Peroxidase anti-rabbit IgG
Human FAS	(1 : 1000 稀釋) (abcam)	(1 : 2000 稀釋) (SIGMA)

玖、統計分析

每次實驗進行三重複，結果皆以 mean \pm SD 表示。實驗數據以 SPSS 14.0 軟體進行分析，利用 Student *t*-test 檢定各組差異，當 $p < .05$ 時，表示統計上具顯著差異。

第三節 結果

壹、具植物性雌激素食材之樣本對 HepG2 細胞存活率之影響

為了瞭解本研究中所使用的待測樣本-具植物性雌激素之食材對於 HepG2 細胞存活率，將不同濃度之樣本與誘發劑(T0901317 或 intralipid)共同培養 48 小時後，利用 MTT 測定細胞存活率。實驗中各樣本所使用的濃度將以不影響細胞生長狀況為原則，避免細胞數影響實驗數據。

本實驗所使用的兩種促進肝細胞 TG 增加之誘發劑，T0901317 50nM 及 intralipid 5 μ l/ml 皆不影響 HepG2 細胞存活率(圖 5-1 (A))。

(一) 5 μ l/ml Intralipid 當誘發劑之模式

各種樣品不同濃度對於 HepG2 細胞存活率如圖 5-1 所示。Sesamin 100 μ M 存活率僅剩 80% ($p < .05$)，將濃度降低為 50 μ M 以下，皆不影響細胞存活率(圖 5-1 (E))；Genistein 50 μ M 存活率僅剩 86 % ($p < .05$)，而濃度降低至 25 μ M 以下，皆不影響細胞存活率(圖 5-1 (F))；Enterolactone 0~100 μ M、苜蓿芽及山藥乙酸乙酯萃取物濃度 0~200 μ g/ml 皆不影響細胞存活率(圖 5-1 (B、C、D))。

(二) 50nM T0901317 當誘發劑之模式

各種樣品不同濃度對於 HepG2 細胞存活率如圖 5-1 所示。Sesamin 100 μ M 存活率僅剩 83% ($p < .05$)，將濃度降低為 50 μ M 以下，皆不影響細胞存活率(圖 5-1 (E))；Genistein 在 50 μ M 存活率僅剩 76 % ($p < .05$)，而濃度降低至 25 μ M 以下，皆不影響細胞存活率(圖 5-1 (F))；Enterolactone 0~100 μ M、苜蓿芽及山藥乙酸乙酯萃取物濃度 0~200 μ g/ml 皆不影響細胞存活率(圖 5-1 (B、C、D))。

貳、具植物性雌激素食材之樣本對 HepG2 細胞內三酸甘油酯含量之影響

本研究利用 T0901317 劑量 50 nM 或 intralipid 5 μ l/ml 誘發 HepG2 細胞內 TG 增加，且將具植物性雌激素食材的樣本與之共同培養 48 小時，視其是否影響

HepG2 細胞內 TG 含量，結果如圖 5-2 所示。

(一) 50nM T0901317 當誘發劑之模式

T0901317 50 nM 的濃度相較於控制組，顯著上升細胞內 TG 含量，達 2.4 倍 ($p < .05$)，當投予不同劑量之樣本與之共同培養，結果發現 25 μM 及 50 μM sesamin 相較於刺激組，皆可顯著下降細胞內 TG 含量分別為 19% 及 33% ($p < .05$)；gensitein 25 μM 顯著下降細胞內 TG 含量達 13% ($p < .05$)，但 12.5 μM 無顯著影響細胞內 TG 含量；ENL 1 μM 相較於刺激組亦可顯著降低細胞內 TG 含量 11% ($p < .05$)；山藥及苜蓿芽乙酸乙酯萃物相較於刺激組無顯著影響細胞內 TG 含量(圖 5-2(A))。

(二) 5 $\mu\text{l/ml}$ Intralipid 當誘發劑之模式

Intralipid 5 $\mu\text{l/ml}$ 的濃度相較於控制組，顯著上升細胞內 TG 含量，達 4.5 倍 ($p < .05$)，若投予 25 μM 及 50 μM sesamin，細胞內 TG 含量有下降的趨勢，而劑量 50 μM 達顯著下降 56% ($p < .05$)；苜蓿芽乙酸乙酯萃物濃度 25、50 $\mu\text{g/ml}$ ，細胞內 TG 含量有下降的趨勢，相較於刺激組分別可減少 23 及 39%，但僅在 50 $\mu\text{g/ml}$ 達顯著差異($p < .05$)；ENL 100 μM 相較於刺激組顯著下降細胞內 TG 含量 39% ($p < .05$)，但 1 μM 無顯著影響 TG 含量；genistein 25 μM 相較於刺激組可下降細胞內 TG 含量達 17%，但未達統計上顯著差異；山藥乙酸乙酯萃物相較於刺激組無顯著影響細胞內 TG 含量(圖 5-2(B))。

叁、具植物性雌激素食材之樣本對 HepG2 細胞內脂肪酸代謝酵素 mRNA 表現量之影響

根據上述實驗，發現純品 sesamin、genistein、enterolactone 及苜蓿芽乙酸乙酯萃物皆有顯著減少 HepG2 細胞內 TG 含量的效用，進一步探究其影響之機轉。

(一) Fatty acid synthase(FAS) mRNA 表現量

T0901317 50 nM 的濃度相較於控制組，顯著增加細胞內 FAS mRNA 表現量，達 2.4 倍($p < .05$)，當投予不同劑量之樣本與之共同培養，結果發現 25 μM 及

50 μM sesamin 相較於刺激組，皆有減少 FAS mRNA 表現量的趨勢，50 μM 減少 61% 達顯著差異 ($p < .05$)；gensitein 25 μM 及 苜蓿芽乙酸乙酯萃物 50 $\mu\text{g/ml}$ 亦可顯著減少細胞內 FAS mRNA 表現量分別為 27% 及 44% ($p < .05$)；其餘樣本如 ENL 1 μM 、山藥乙酸乙酯萃物 25 及 50 $\mu\text{g/ml}$ 、苜蓿芽乙酸乙酯萃物 25 $\mu\text{g/ml}$ 皆無顯著影響細胞內 FAS mRNA 表現量(圖 5-3)。

(二) Acetyl-CoA carboxylase(ACC) mRNA 表現量

T0901317 50 nM 的濃度相較於控制組，顯著增加細胞內 ACC mRNA 表現量約 20% ($p < .05$)，當投予不同劑量之樣本與之共同培養，結果發現 50 μM sesamin 及 25 μM gensitein 相較於刺激組，皆可顯著減少細胞內 ACC mRNA 表現量，分別可下降 44% 及 33% ($p < .05$)；苜蓿芽乙酸乙酯萃物 25 及 50 $\mu\text{g/ml}$ 相較於刺激組亦可減少細胞內 ACC mRNA 表現量，分別為 41%、29%，但無統計上顯著差異；ENL 1 μM 、山藥乙酸乙酯萃物 25 及 50 $\mu\text{g/ml}$ 相較於刺激組皆無顯著影響細胞內 FAS mRNA 表現量(圖 5-4)。

(三) Sterol retinol element binding protein-1 (SREBP-1) mRNA 表現量

T0901317 50 nM 的濃度相較於控制組，顯著增加細胞內 SREBP1 mRNA 表現量 2.6 倍 ($p < .05$)，當投予不同劑量之樣本與之共同培養，結果發現 25 μM 及 50 μM sesamin 相較於刺激組，皆可顯著減少 SREBP1 mRNA 表現量，分別減少 38% 及 55% ($p < .05$)；genistein 25 μM 及 苜蓿芽乙酸乙酯萃物 50 $\mu\text{g/ml}$ 亦可顯著下降細胞內 SREBP1 mRNA 表現量，分別為 16% 及 41% ($p < .05$)，ENL 1 μM 、山藥乙酸乙酯萃物 25 及 50 $\mu\text{g/ml}$ 相較於刺激組，細胞內 SREBP1 mRNA 表現量有下降的趨勢，50 $\mu\text{g/ml}$ 達邊際統計差異 ($p = 0.074$)，但 25 $\mu\text{g/ml}$ 未達顯著差異(圖 5-5)。

(四) glycerol 3-phosphate acyltransferase(GPAT) mRNA 表現量

T0901317 50 nM 的濃度相較於控制組，無顯著影響細胞內 GPAT mRNA 表現量，當投予不同劑量之樣本與之共同培養，結果發現所有樣本皆無顯著影響細胞內 GPAT mRNA 表現量 (圖 5-6)。

(五) Acyl-CoA oxidase(ACO) mRNA 表現量

在 T0901317 50 nM 的模式下，相較於控制組無顯著影響細胞內 ACO mRNA 表現量，當投予不同劑量之樣本與之共同培養，結果發現相較於刺激組僅有 50 μ M sesamin 可顯著增加細胞內 ACO mRNA 表現量，可達 116 % ($p < .05$)；genistein 50 μ M 及 ENL 1 μ M 細胞內 ACO mRNA 表現量也有上升的趨勢，分別為 64% 及 20%，但未達顯著差異。苜蓿及山藥乙酸乙酯萃物 25 及 50 μ g/ml 皆無顯著影響細胞內 ACO mRNA 表現量(圖 5-7)。

在 intralipid 5 μ l/ml 的模式下，相較於控制組下降細胞內 ACO mRNA 表現量 25%，但無統計上顯著差異。當投予不同劑量之樣本與之共同培養，結果發現 25、50 μ M sesamin 及 25、50 μ g/ml 苜蓿芽乙酸乙酯萃取物相較於刺激組細胞內 ACO mRNA 表現量皆有上升的趨勢，且在 50 μ M (or μ g/ml) 達顯著增加，分別為 50% 及 74% ($p < .05$)；ENL 1 μ M 及 100 μ M 細胞內 ACO mRNA 表現量也有上升的趨勢，分別為 39% 及 40%，但未達顯著差異。genistein 50 μ M 及山藥乙酸乙酯萃物 25 及 50 μ g/ml 皆無顯著影響細胞內 ACO mRNA 表現量(圖 5-8)。

肆、具植物性雌激素食材之樣本對 HepG2 細胞內 FAS 表現量之影響

T0901317 50 nM 的濃度相較於控制組，顯著增加細胞內 FAS 蛋白質表現量，達 1.4 倍 ($p < .05$)，當投予不同劑量之具植物性雌激素食材樣本與之共同培養，結果發現 25 μ M 及 50 μ M sesamin 相較於刺激組，皆有減少 FAS 蛋白質表現量的趨勢，50 μ M 達顯著下降 34% ($p < .05$)；gensitein 25 μ M、苜蓿芽乙酸乙酯萃物 25 及 50 μ g/ml、山藥乙酸乙酯萃物 50 μ g/ml 相較於刺激組亦可顯著減少細胞內 FAS 蛋白質表現量分別為 36%、41% 及 53%、40% ($p < .05$)；ENL 1 μ M 無顯著影響細胞內 FAS 蛋白質表現量(圖 5-3)。

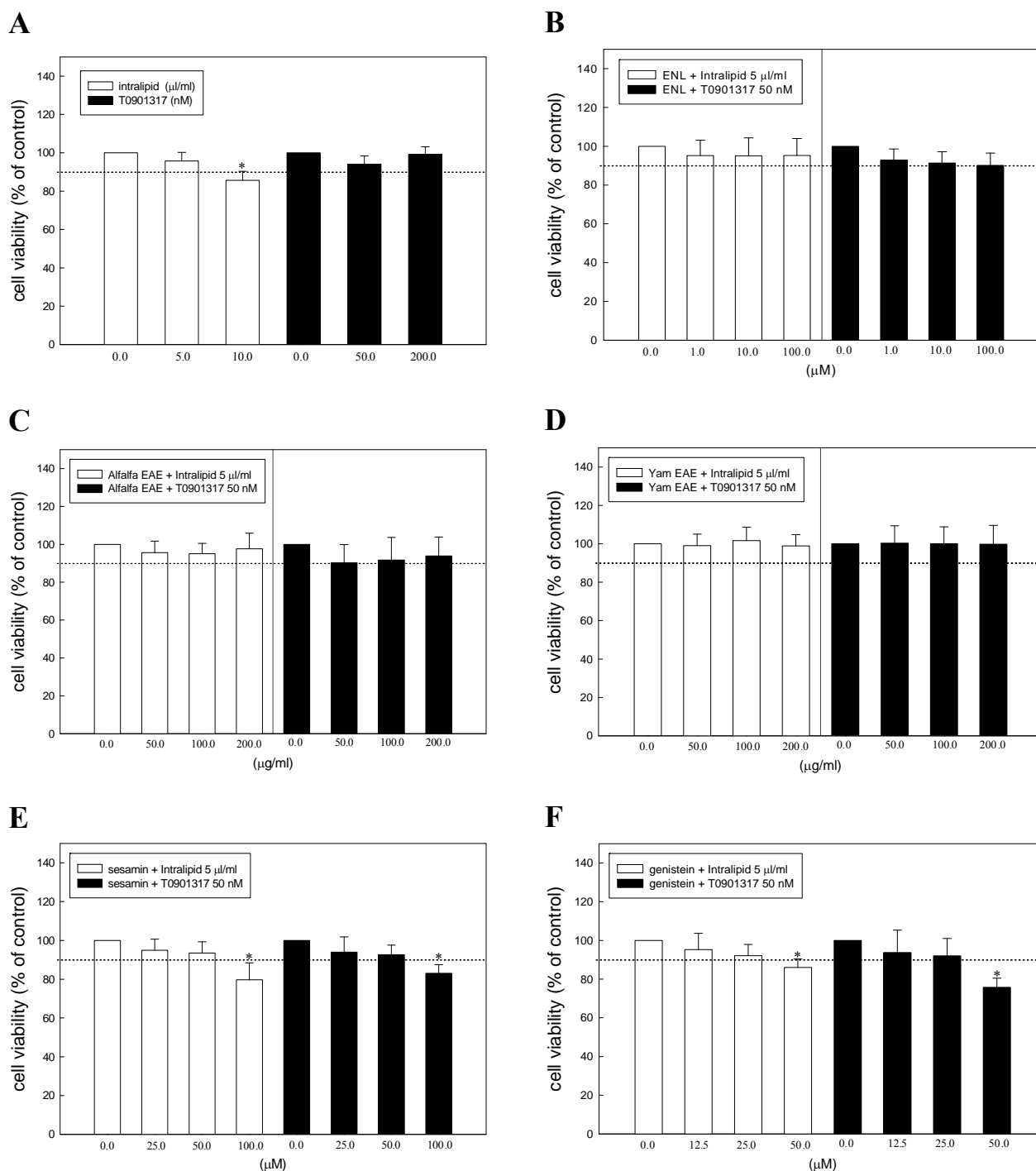


圖 5-1 T0901317、intralipid 及具植物性雌激素食材樣本對肝細胞存活率之影響

(A)T0901317、intralipid (B)enterolactone(ENL) (C) Alfalfa EAE (D) yam EAE (E) sesamin (F) genistein

Fig 5-1. Effects of T0901317, intralipid or phytoestrogens on viability of HepG2 cell. The cells were treated with Intralipid, or T0901317 (A), 5 μl/ml intralipid or 50 nM T0901317 plus enterolactone (ENL) (B), Alfalfa EAE (C), yam EAE (D), sesamin (E), or genistein (F), for 48 hr. Values are means ± S.D. Data were analyzed by Student's *t*-test, *n* = 3. *Significantly different from the induced group. (*p* < .05) †Significantly different from the control group. (*p* < .05)

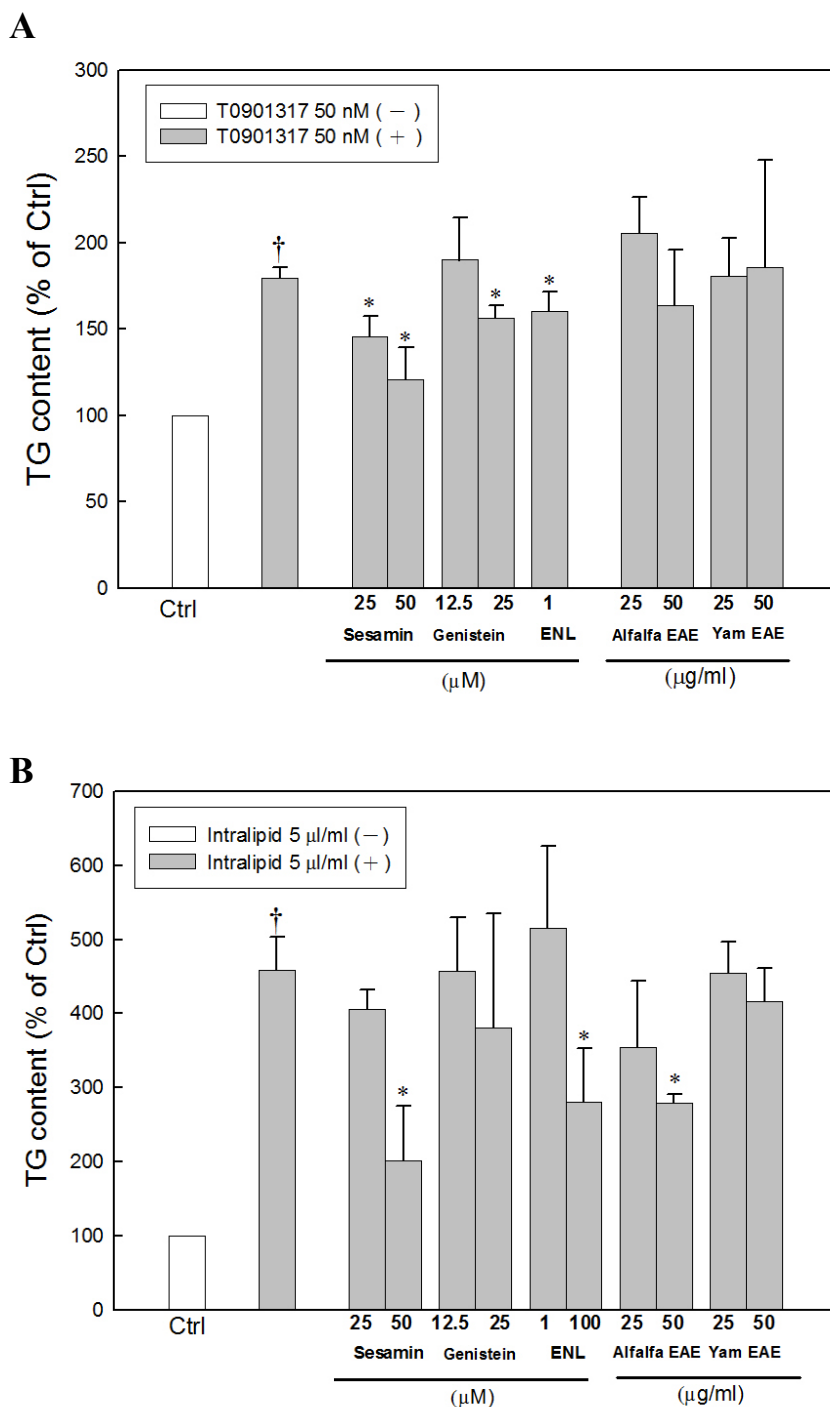


圖 5-2 具植物性雌激素之食材對肝細胞內三酸甘油酯含量的影響

Fig 5-2. Effects of phytoestrogens on cellular triacylglycerol (TG) content in HepG2 cell. The cells were treated with medium containing 50 nM T0901317 (A), or 5 µl/ml intralipid (B), and different concentrations of phytoestrogens for 48 hr. Levels of cellular TG were normalized by cellular protein and are expressed relative to those of Ctrl. Values are means \pm S.D. Data were analyzed by Student's *t*-test. $n=3$. *Significantly different from the induced group. ($p < .05$) †Significantly different from the control group. ($p < .05$)

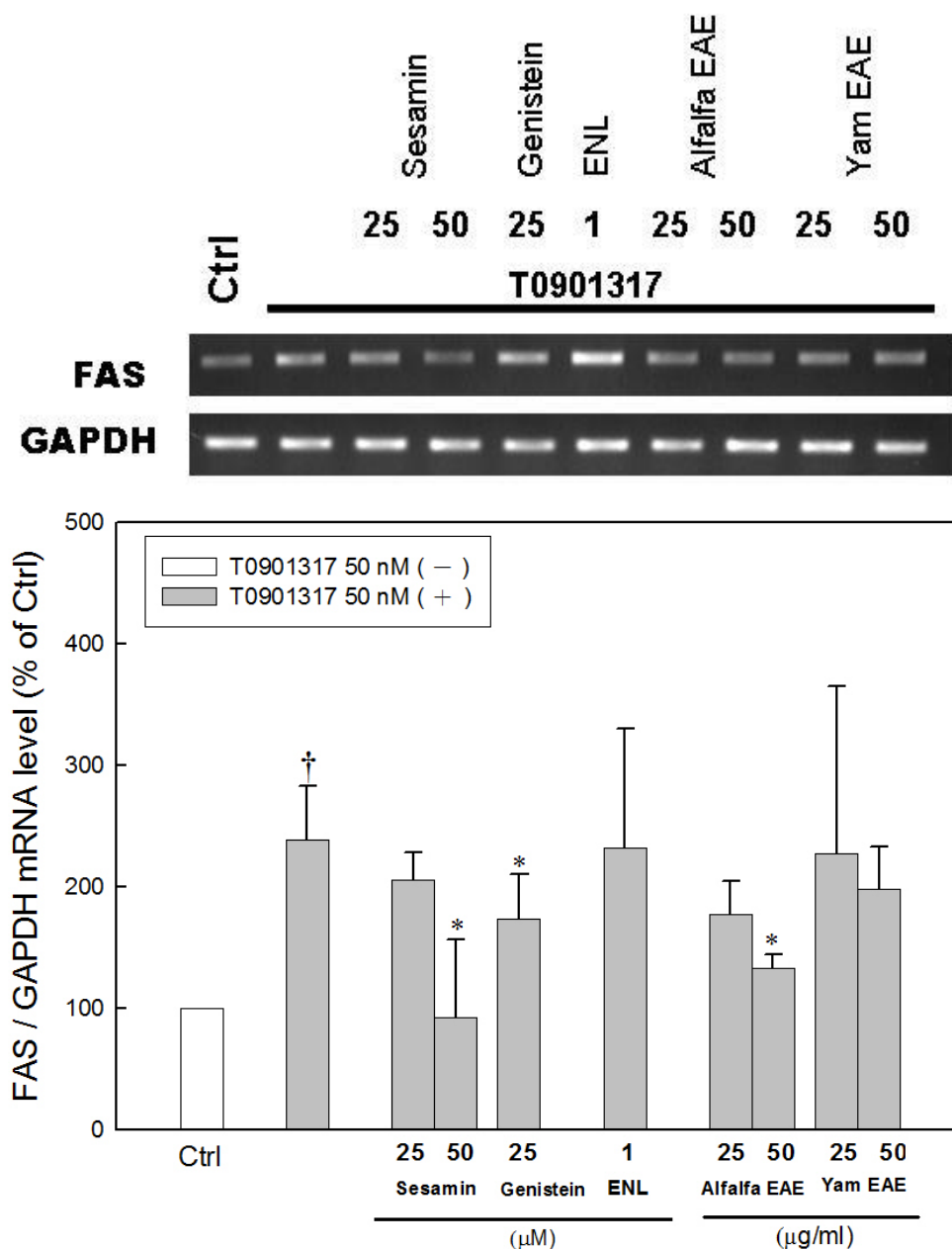


圖 5-3 具植物性雌激素之食材對 T0901317 誘導之肝細胞內 FAS mRNA 表現量的影響

Fig. 5-3 Effects of phytoestrogens on the mRNA expression of fatty acid synthase (FAS) in T0901317 stimulated HepG2 cell. The cells were treated with medium containing 50 nM T0901317 and different concentrations of phytoestrogens for 48 hr. Cells incubated with medium only were the negative control (Ctrl). Cellular RNA level was determined using semiquantitative RT-PCR analysis. Amounts of FAS mRNA were quantified using GAPDH as an internal control and are expressed relative to those of Ctrl, which are designated as 100. Values are means \pm S.D, n=3. Data were analyzed by Student's *t*-test. *Significantly different from the inducer group. ($p < .05$) †Significantly different from the control group. ($p < .05$)

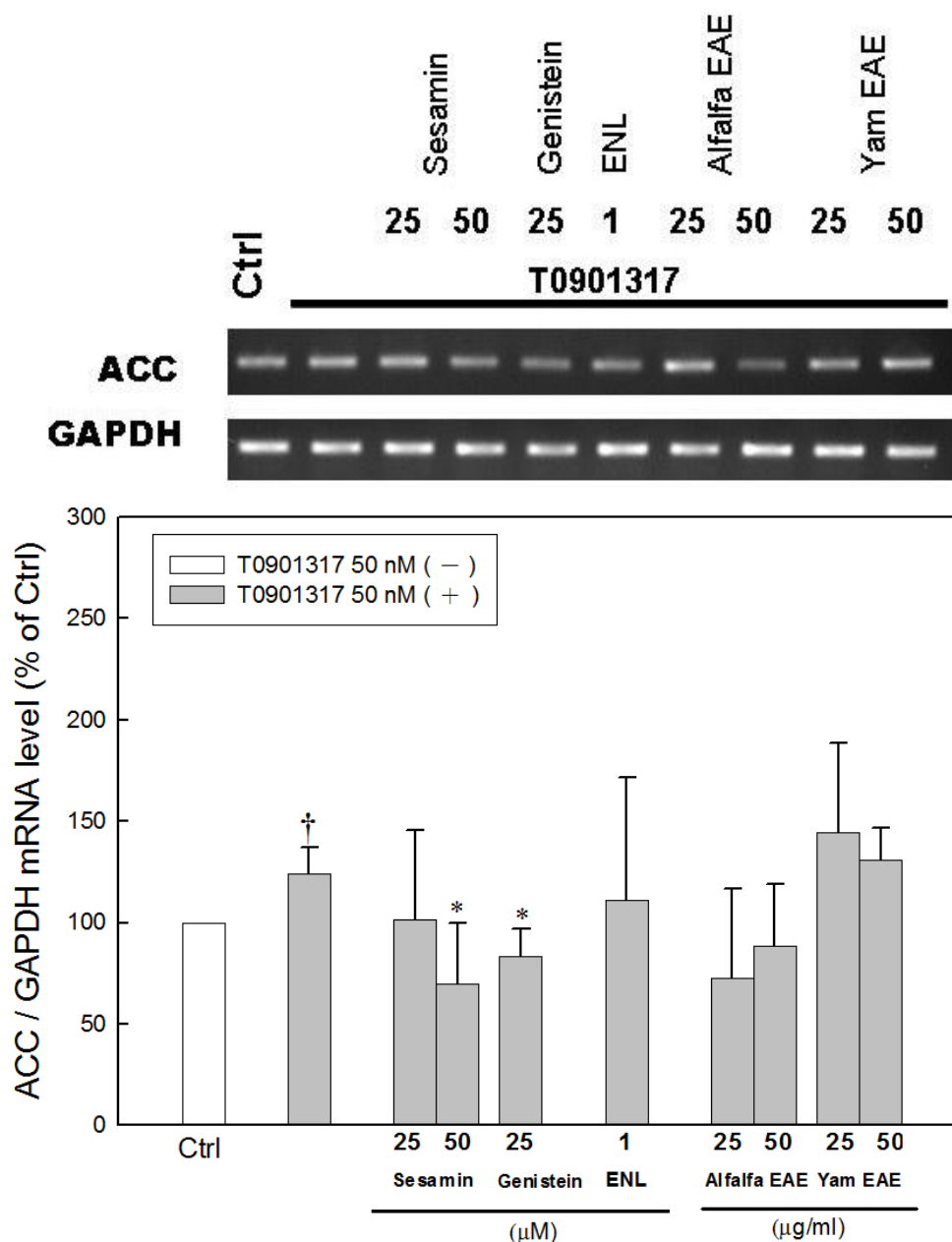


圖 5-4 具植物性雌激素之食材對 T0901317 誘導之肝細胞內 ACC mRNA 表現量的影響

Fig. 5-4 Effects of phytoestrogens on the mRNA expression of acetyl-CoA carboxylase (ACC) in T0901317 stimulated HepG2 cell. The cells were treated with medium containing 50 nM T0901317 and different concentrations of phytoestrogens for 48 hr. Cells incubated with medium only were the negative control (Ctrl). Cellular RNA level was determined using semiquantitative RT-PCR analysis. Amounts of ACC mRNA were quantified using GAPDH as an internal control and are expressed relative to those of Ctrl, which are designated as 100. Values are means \pm S.D, n=3. Data were analyzed by Student's *t*-test*Significantly different from the inducer group. ($p < .05$) †Significantly different from the control group. ($p < .05$)

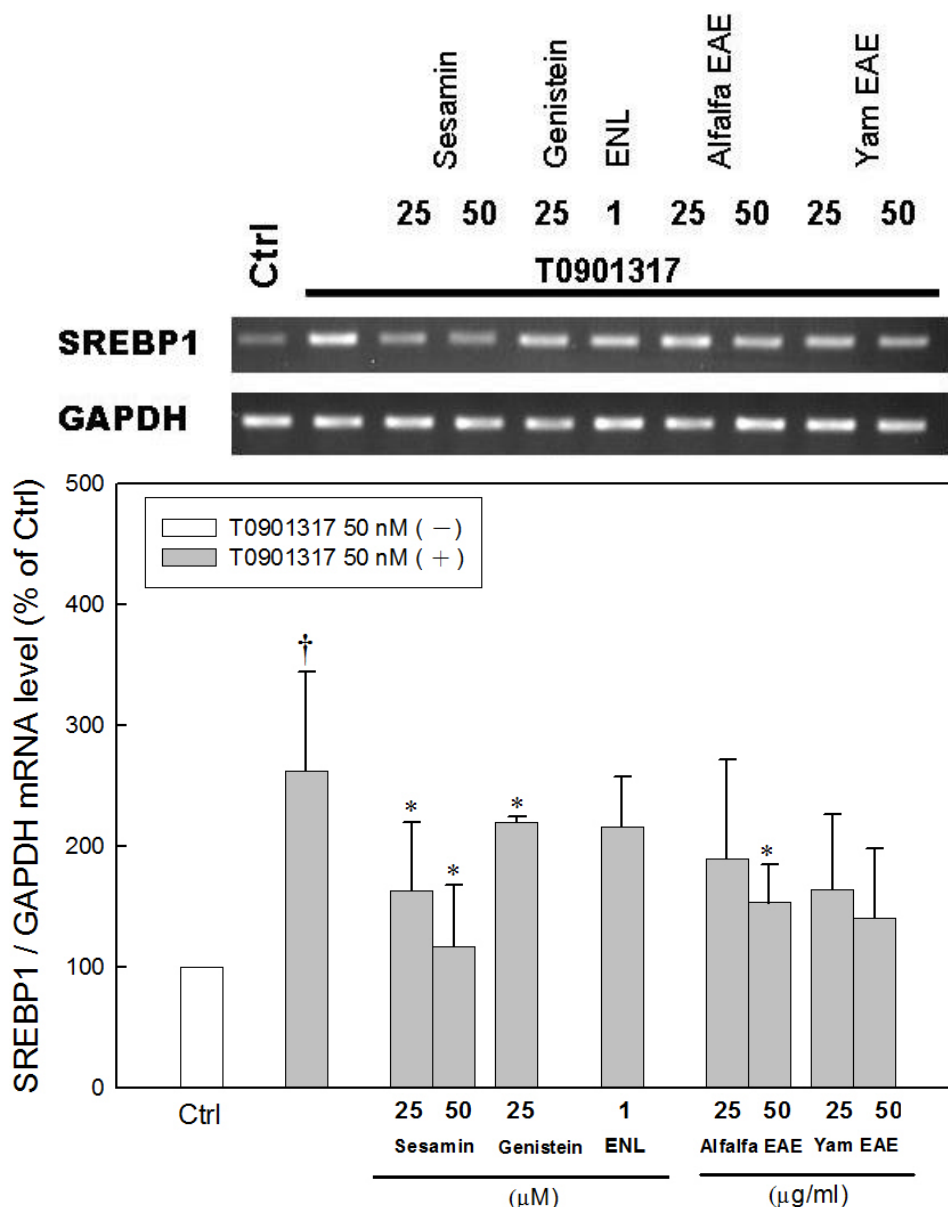


圖 5-5 具植物性雌激素之食材對 T0901317 誘導之肝細胞內 SREBP-1 mRNA 表現量的影響

Fig. 5-5 Effects of phytoestrogens on the mRNA expression of sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) in T0901317 stimulated HepG2 cell. The cells were treated with medium containing 50 nM T0901317 and different concentrations of phytoestrogens for 48 hr. Cells incubated with medium only were the negative control (Ctrl). Cellular RNA level was determined using semiquantitative RT-PCR analysis. Amounts of SREBP-1 mRNA were quantified using GAPDH as an internal control and are expressed relative to those of Ctrl, which are designated as 100. Values are means \pm S.D, n=3. Data were analyzed by Student's *t*-test.

*Significantly different from the inducer group. ($p < .05$) †Significantly different from the control group. ($p < .05$)

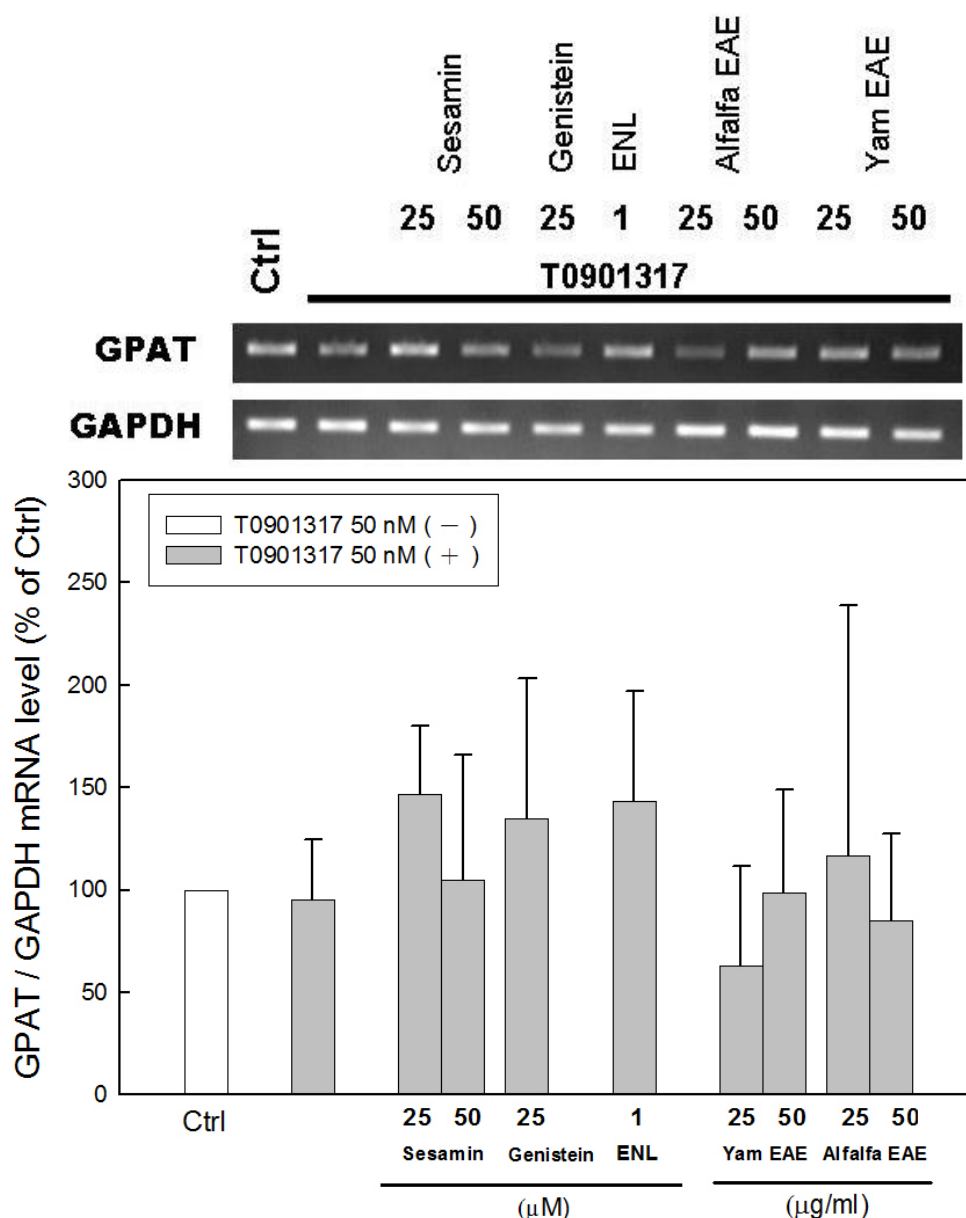


圖 5-6 具植物性雌激素之食材對 T0901317 誘導之肝細胞內 GPAT mRNA 表現量的影響

Fig. 5-6 Effects of phytoestrogens on the mRNA expression of glycerol 3-phosphate acyltransferase (GPAT) in T0901317 stimulated HepG2 cell. The cells were treated with medium containing 50 nM T0901317 and different concentrations of phytoestrogens for 48 hr. Cells incubated with medium only were the negative control (Ctrl). Cellular RNA level was determined using semiquantitative RT-PCR analysis. Amounts of GPAT mRNA were quantified using GAPDH as an internal control and are expressed relative to those of Ctrl, which are designated as 100. Values are means \pm S.D, n=3. Data were analyzed by Student's *t*-test. *Significantly different from the inducer group. ($p < .05$) †Significantly different from the control group. ($p < .05$)

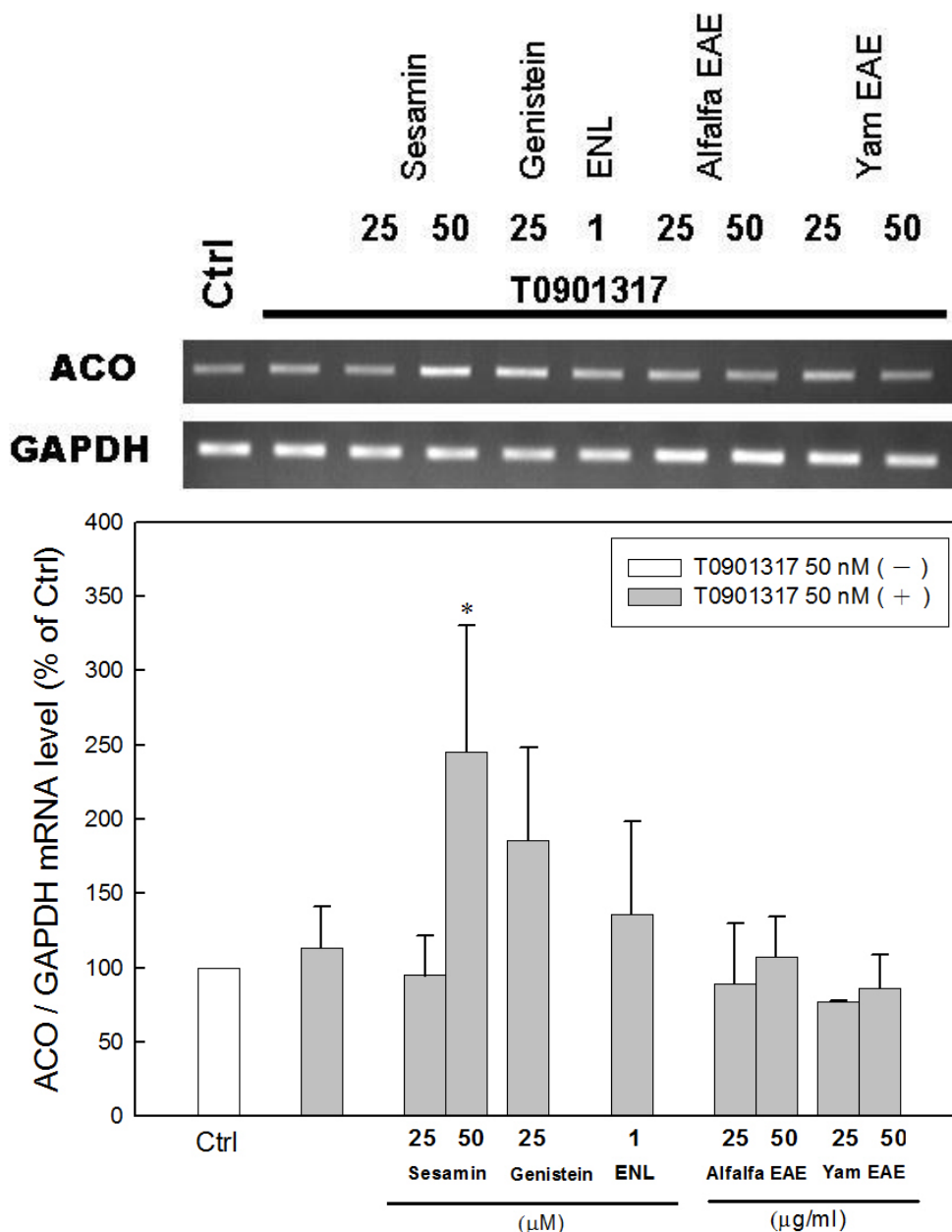


圖 5-7 具植物性雌激素之食材對 T0901317 誘導之肝細胞內 ACO mRNA 表現量的影響

Fig. 5-3 Effects of phytoestrogens on the mRNA expression of acyl-CoA oxidase (ACO) in T0901317 stimulated HepG2 cell. The cells were treated with medium containing 50 nM T0901317 and different concentrations of phytoestrogens for 48 hr. Cells incubated with medium only were the negative control (Ctrl). Cellular RNA level was determined using semiquantative RT-PCR analysis. Amounts of ACO mRNA were quantified using GAPDH as an internal control and are expressed relative to those of Ctrl, which are designated as 100. Values are means \pm S.D, n=3. Data were analyzed by Student's *t*-test. *Significantly different from the inducer group. ($p < .05$) †Significantly different from the control group. ($p < .05$)

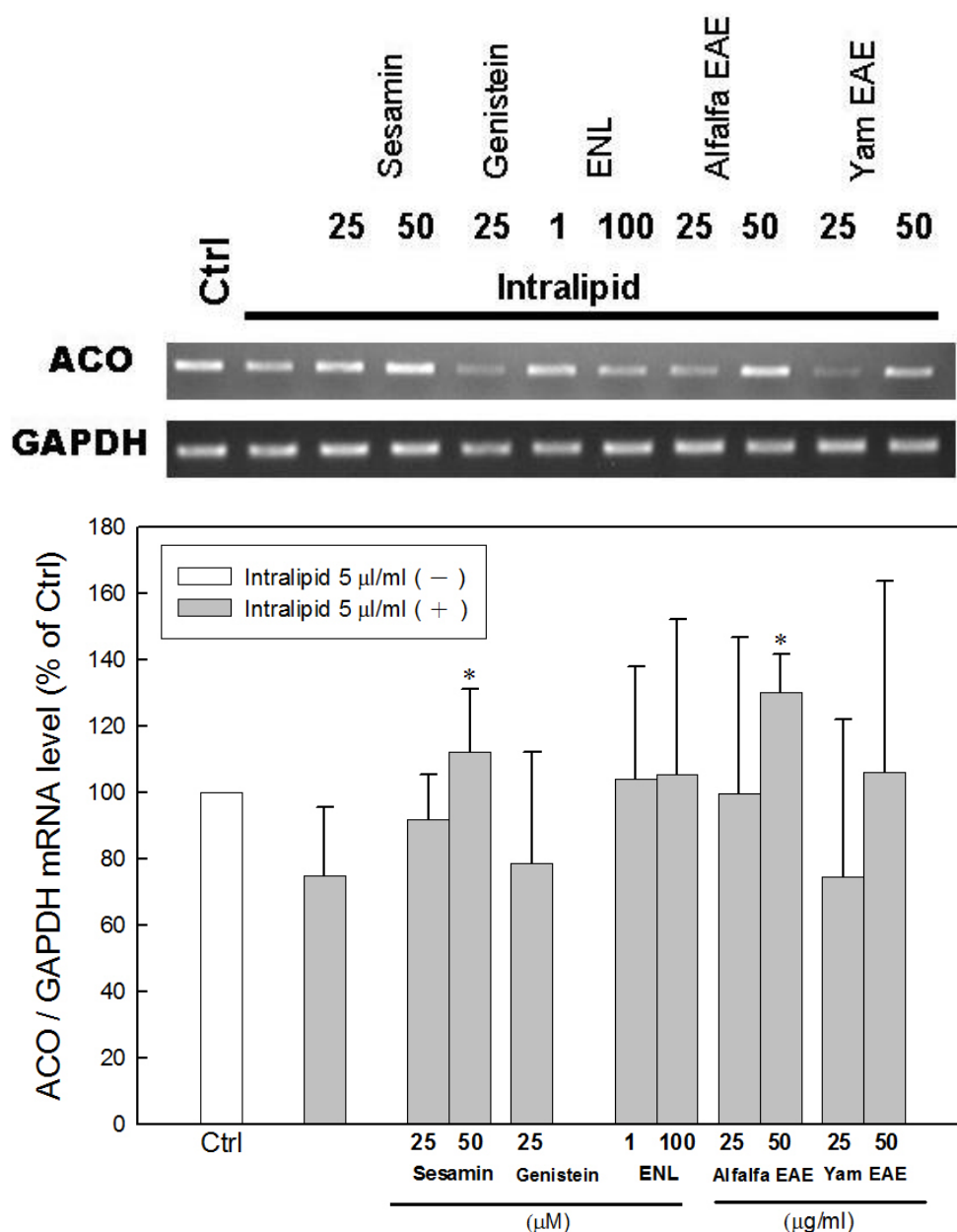


圖 5-8 具植物性雌激素之食材對 intralipid 誘導之肝細胞內 ACO mRNA 表現量的影響

Fig. 5-8 Effects of phytoestrogens on the mRNA expression of acyl-CoA oxidase (ACO) in intralipid stimulated HepG2 cell. The cells were treated with medium containing 5 μl/ml intralipid and different concentrations of phytoestrogens for 48 hr. Cells incubated with medium only were the negative control (Ctrl). Cellular RNA level was determined using semiquantative RT-PCR analysis. Amounts of ACO mRNA were quantified using GAPDH as an internal control and are expressed relative to those of Ctrl, which are designated as 100. Values are means ± S.D, n=3. Data were analyzed by Student's *t*-test. *Significantly different from the inducer group. ($p < .05$)

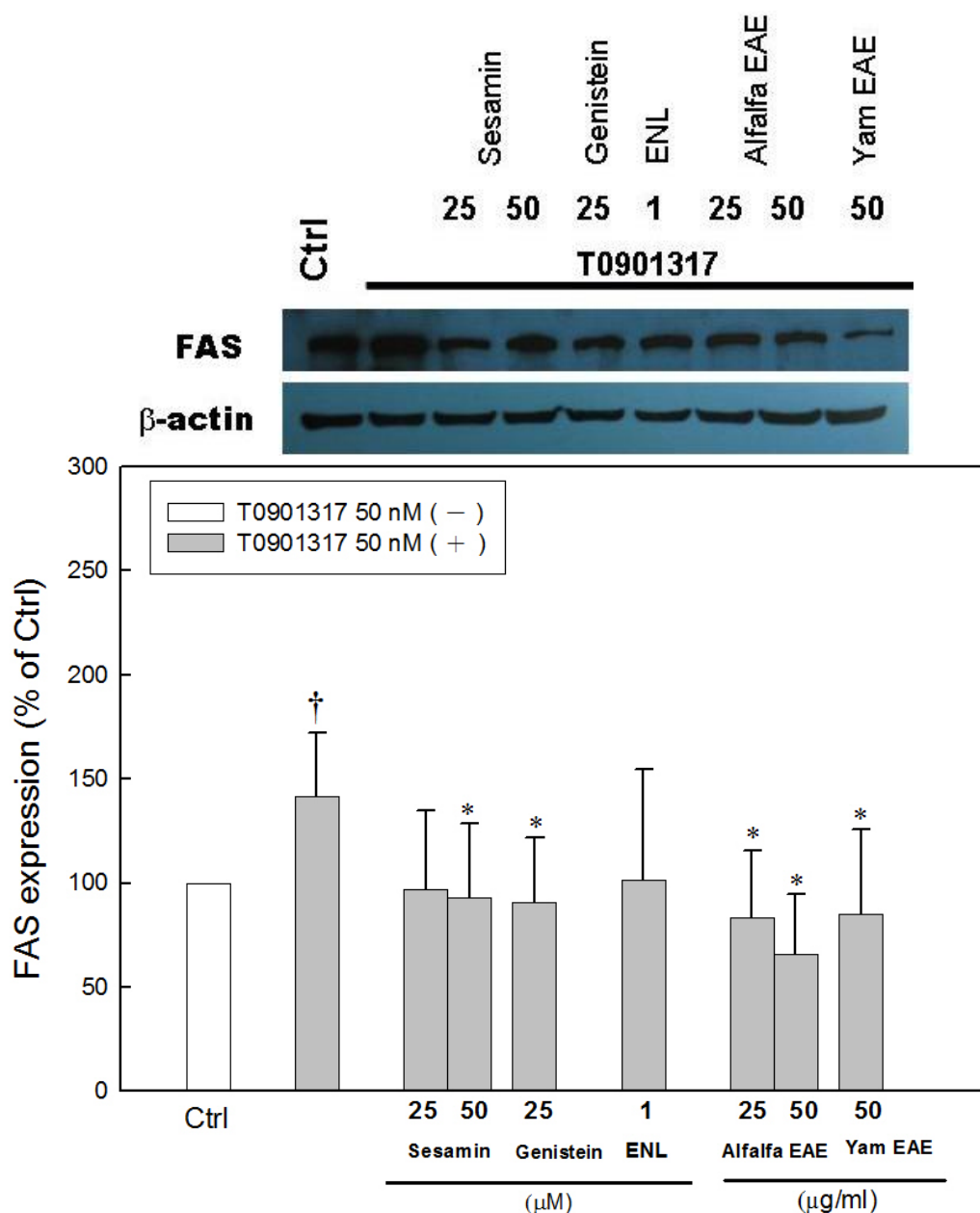


圖 5-9 具植物性雌激素之食材對 T0901317 誘導之肝細胞內 FAS 蛋白質表現量的影響

Fig. 5-9 Effects of phytoestrogens on the protein expression of fatty acid synthase (FAS) in T0901317 stimulated HepG2 cell. The cells were treated with medium containing 50 nM T0901317 and different concentrations of phytoestrogens for 48 hr. Cells incubated with medium only were the negative control (Ctrl). Cellular protein was collected for FAS analysis using western blots. Amounts of FAS were quantified using β -actin as internal control and are expressed relative to those of control conditions, which are designated as 100. Values are means \pm S.D, n=3. Data were analyzed by Student's *t*-test. *Significantly different from the inducer group. ($p < .05$) †Significantly different from the control group. ($p < .05$)

第四節 討論與結論

壹、兩種模式促進 HepG2 細胞內 TG 含量

Liver X receptors (LXRs)為參與脂質及脂蛋白代謝酵素之重要調控者，可刺激肝臟脂肪酸代謝，促進脂肪酸生合成作用。研究指出注射合成性 LXR ligand 的野生型小鼠，顯著上升肝臟 FAS、ACC、SCD1 及 SREBP-1 表現量，但 LXR $\alpha\beta^{-/-}$ 小鼠注射後並無顯著影響肝內 TG 含量，亦不影響肝臟 FAS、ACC、SCD1 及 SREBP-1c 表現量(Schultz et al., 2000)，顯示 LXR 為調控肝臟脂肪生合成作用之重要角色。本研究使用的藥物 T0901317 為一種合成性非固醇類的 LXR agonist，可與肝細胞上 LXR α 結合後，形成 heterodimer，啟動目標基因的轉錄作用，向上調節參與脂肪酸合成酵素如 FAS、ACC、SREBP1 的基因表現，使得脂肪酸(fatty acid, FA)合成增加，過多的 FA 進入到粒線體內進行氧化或進而形成 TG 堆積在肝細胞內，由本實驗結果發現使用 T0901317 之刺激組相較於控制組，顯著上升細胞內 TG 含量達 2.4 倍，確實成功誘發 TG 堆積在細胞內。另一模式 intralipid 成份有 TG 及 FA，可透過細胞膜上傳送者進入細胞內堆積，使用 intralipid 之刺激組相較於控制組顯著上升 TG 含量達 4.5 倍，顯示本研究建立之兩種體外模式，皆成功模擬肝細胞脂肪堆積，以利大量篩選食材樣本。本研究結果發現在 LXR agonist 模式，sesamin、genistein 及 ENL 可顯著下降 HepG2 細胞內 TG 含量；在 intralipid 模式，sesamin、genistein、ENL 及苜蓿芽乙酸乙酯萃物可顯著下降 TG 含量，但山藥乙酸乙酯萃物在兩模式均無顯著影響細胞內 TG 含量。

貳、具植物性雌激素之食材對於 HepG2 細胞內脂肪酸生合成作用 (lipogenesis)之影響

LXR agonist 模式主要可研究脂肪生成，FAS 在脂肪酸合成代謝途徑扮演一個關鍵角色，為速率限制酵素(Volpe & Vagelos, 1976)，ACC 催化梭基化作用(carboxylation)使 acetyl-CoA 轉變成 malonyl-CoA，而 malonyl-CoA 為脂肪酸合成

作用之重要受質，同時亦為粒線體內 β -oxidation 作用之抑制子(suppressor)，這兩個酵素之基因轉錄作用受到轉錄因子 SREBP1 所調控(Horton, Goldstein, & Brown, 2002)，(Talukdar & Hillgartner, 2006)。當 LXR ligand 與 LXR 結合後，活化 SREBP1 且向上調節 SREBP1 表現量，進而上升 FAS 及 ACC 表現量。

本研究結果顯示 HepG2 細胞受到 LXR agonist 誘導後，皆向上調節 FAS、ACC 及 SREBP1 表現量，sesamin、genistein 顯著下降細胞內 FAS mRNA、蛋白質表現量及 ACC mRNA 表現量，而苜蓿芽乙酸乙酯萃物顯著下降 FAS mRNA、蛋白質表現量但不影響 ACC 表現量，更進一步發現 sesamin、genistein 及苜蓿芽乙酸乙酯萃物亦向下調節 SREBP1 表現量，過去研究指出 HepG2 細胞以 genistein 處理後，透過抑制 SREBP-1 活化進而顯著減少受到 SREBP-1 所調控之基因，如：FAS、ACC、stearoyl coenzyme-A desaturase1(SCD1)及 GPAT 表現量(Shin et al., 2007)，且另一項研究發現，大鼠餵食含 0.2%及 0.4% sesamin 飼料皆能顯著下降肝內脂肪酸合成酵素表現量，且 SREBP-1 表現量亦減少，顯示其可能透過抑制 SREBP-1 進而減少脂肪生合成酵素表現量(Ide et al., 2001)，與本次研究結果相似，故推測本研究中 sesamin、genistein 及苜蓿芽乙酸乙酯萃物透過向下調節 SREBP-1 表現量進而下降 FAS 及 ACC 表現量，以達抑制肝細胞內脂肪生合成作用。此外，我們發現本研究山藥乙酸乙酯萃物顯著下降細胞內 FAS 蛋白質表現量但不影響 FAS mRNA 表現量，推測其不影響 FAS 基因轉錄作用，但可能在蛋白質合成的過程中被抑制(轉譯 translation)，因而下降 FAS 蛋白質表現量，但對於 ACC、SREBP1 及 GPAT mRNA 表現量均無顯著影響，在本實驗的條件下並未達抑制肝細胞脂肪堆積之效用。

叁、具植物性雌激素之食材對於 HepG2 細胞內脂肪酸氧化作用(β -oxidation)之影響

過去已有許多 sesamin 對於大鼠肝臟脂肪酸氧化作用之相關研究，指出 sesamin 能夠顯著增加大鼠肝內脂肪酸氧化酵素(如：carnitine

palmitoyltransferase、ACO、3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase 及 3-ketoacyl-CoA thiolase)活性(Ashakumary et al., 1999)及表現量(Ashakumary et al., 1999; Sirato-Yasumoto, Katsuta, Okuyama, Takahashi, & Ide, 2001; Umeda-Sawada, Ogawa, Nakamura, & Igarashi, 2001)，本次研究結果與過去研究相符，發現以 sesamin 處理受到 LXR agonist 或 intralipid 誘導之 HepG2 細胞，皆能顯著上升細胞內 ACO mRNA 表現量，顯示其具有促進肝內脂肪酸氧化之效用。本研究結果另外觀察到苜蓿芽乙酸乙酯萃物雖然在 LXR agonist 誘導的模式下並無顯著影響細胞內 ACO mRNA 表現量，但受到 intralipid 誘導的模式下 ACO mRNA 表現量能夠顯著上升，因此可能也具有促進脂肪酸氧化之能力，但相較於 sesamin 其效用較弱。由本次實驗結果得知 genistein 並無顯著影響肝細胞內 ACO 表現量，過去研究指出以 genistein 處理 HepG2 細胞能夠透過向上調節 carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT1A)的轉錄作用，進而增加 CPT1A 的活性，促進肝細胞內 β -oxidation(Shin et al., 2006)，另一項體內研究指出小鼠飼料添加 genistein 並無顯著影響肝臟 peroxisomal acyl-CoA oxidase 表現量但顯著增加 mitochondrial medium chain acyl-CoA dehydrogenase 表現量，故本研究之 genistein 也許並非無影響 HepG2 脂肪酸氧化作用。

PPARs 為核內家族受器的成員，可被 ligand 活化，啟動下游基因的轉錄作用。PPAR α 高度表現在肝臟上，參與肝臟脂肪酸氧化酵素基因表現量，具有調控肝臟脂質代謝之能力(Aoyama et al., 1998; Latruffe & Vamecq, 1997)，過去研究指出 sesamin 能夠增加肝內脂肪酸氧化酵素基因表現是透過活化 PPAR α (Ide et al., 2001)，陳氏指出苜蓿乙酸乙酯萃物及山藥乙酸乙酯萃物皆具有活化 PPAR α 的能力，但以苜蓿乙酸乙酯萃物活化能力較佳(陳永如, 2007)，故推測本研究苜蓿乙酸乙酯萃物對於肝內脂肪酸氧化作用調控機轉可能相似於 sesamin，可能皆為 PPAR α agonist，透過活化 PPAR α ，進而促進脂肪酸氧化。而山藥乙酸乙酯萃物雖亦能夠活化 PPAR α ，但可能活化程度較差，因此並未達到促進脂肪酸氧化之效用。

肆、ENL 的效用

本研究結果觀察到 ENL 具有減少 HepG2 細胞 TG 堆積的能力，但並無顯著影響脂肪酸生合成及氧化酵素表現量，可能透過抑制肝內其他合成酵素(如 SCD1)或氧化酵素(CPT1)而影響，或者並非透過脂肪酸代謝影響細胞內 TG 含量，也許藉由抑制細胞膜上 FA 傳送者，減少 FA 送至細胞內合成 TG 堆積，其確切之機轉需要進一步研究指出。

伍、研究限制

因動物模式耗費之人力及金錢遠遠超過細胞實驗，故本研究欲利用體外模式以方便大量篩選日常生活之食材，觀察其是否具有減少肝細胞 TG 堆積的能力，但本試驗將細胞破碎後利用 TG assay 測量細胞內 TG 含量，若食材本身含有 TG，無可避免其可能殘留於細胞上或進入細胞內，造成檢測上的誤差。本研究中觀察到 50 $\mu\text{g/ml}$ 苜蓿芽乙酸乙酯萃取物 TG 含量為 0.233 $\mu\text{g/ml}$ ，intralipid TG 含量為 500 $\mu\text{g/ml}$ ，在 intralipid 模式中，發現 50 $\mu\text{g/ml}$ 苜蓿芽乙酸乙酯萃取物顯著下降肝細胞 TG，但在 LXR agonist 模式中卻無顯著影響，可能因為 intralipid 本身 TG 含量遠高於苜蓿芽乙酸乙酯萃物，微量的 TG 不致於造成影響，但 LXR agonist 模式中發現其對於肝細胞內 TG 含量無顯著影響，卻可顯著下降 FAS 及 SREBP1 表現量，也上升 ACC 表現量，推測可能因萃物本身 TG 在 TG assay 中高估細胞內 TG 含量，因而導致此結果。

體內代謝機轉相當複雜，體外模式篩選出有效之食材在體內若經代謝後之產物不一定還保有原本的效用，因此有效之食材樣本需再進一步進行動物及人體試驗，以確認其對於體內脂肪肝之防治功效。

陸、結論

本次研究結果發現 sesamin、genistein 及苜蓿芽乙酸乙酯萃物能夠下降 HepG2 細胞 TG 含量，可能起因於向下調節轉錄因子 SREBP1 基因表現進而抑制 FAS 及 ACC 表現量，因此減少脂肪酸合成；sesamin 及苜蓿芽乙酸乙酯萃物同時具有

增加 peroxisomal ACO 基因表現之能力，推測其透過活化 PPAR α 所致，以達促進脂肪酸氧化；ENL 減少 HepG2 細胞內 TG 含量之可能機轉需再進一步研究確認；山藥乙酸乙酯萃取物雖可下降 FAS 表現量，但不影響肝細胞 TG 堆積。故本研究中 sesamin 及苜蓿芽乙酸乙酯萃物具有抑制脂肪酸合成及促進脂肪酸氧化之雙重功效，具有發展成為防治脂肪肝之保健食品之潛力。

第六章 綜合討論及總結

第一節 綜合討論

綜合以上實驗結果發現，sesamin 能夠減少卵巢切除之 apoE^(-/-)小鼠主動脈脂肪條的產生但上升血液 TC，而對於卵巢切除之 C57BL/6J 雌鼠能夠上升血液 HDL-C 濃度 (表 6-1)。兩次體內實驗之相關性分析皆發現血液 ENL 與 TC 達顯著正相關，相關係數分別為 0.757 及 0.340 ($p < 0.05$)，但 HDL-C 上升卻與 ENL 無關，因此在此實驗模式 ENL 與血膽固醇上升的負面作用有關，體外研究發現 E₂ 能夠顯著增加 HepG2 細胞上 LDL receptor 活性，而 ENL 在高達 50 μM 濃度下才具有向上調節 LDL receptor 活性之效用，END 無顯著影響 LDL receptor 活性 (Owen & Abbey, 2004)。已知 flaxseed 所含 SDG 在體內可經腸道菌代謝成 ENL 及 END，一個隨機雙盲之 placebo-controlled crossover 試驗中發現更年期女性每日補充 500 mg SDG 為期 6 週後，血液及尿液中 ENL 濃度與血脂及血液抗氧化力無顯著相關，其測得血液 ENL 濃度約 385 ± 67 nM (Hallund, Ravn-Haren, Bugel, Tholstrup, & Tetens, 2006)，可能 ENL 濃度不夠高，故無與 E₂ 相似的降血膽固醇效用，本次研究中測得血液 ENL 濃度平均約為 1000 pg/ml，濃度更低。本實驗餵食 sesamin 之 C57BL/6J 小鼠第 9 週時發現血液 TC 顯著上升，但到了第 14 週，相較於控制組血液 TC 稍微上升但未達顯著差異，先前討論中提到，餵食 sesamin 導致 apoE 剔除鼠血液 TC 上升之因可能為肝臟調控 lipoprotein remnants 攝入的接受器(如 SR-B I)被抑制，導致清除 chylomicrons 之能力受阻，而 wild type 的小鼠可透過 apoE 與肝臟 LDL receptor 結合，將循環中富含 TG 之脂蛋白 chylomicron 或 VLDL remnant 到肝中代謝，雖然 sesamin 可能抑制 SR-B I，但仍可經由 LDL receptor 或 LRP 清除 lipoprotein remnants，所以血脂上升幅度到了 14 週時趨於緩和。

sesamin 具有減少卵巢切除之 apoE^(-/-)小鼠主動脈脂肪條的產生的能力，但與血脂無關，且血液 ENL 與主動脈損傷面積亦無顯著相關，停經婦女每日補充

secoisolariciresinol diglucoside (SDG) 500mg, 並無顯著影響內皮細胞功能(Hallund, Tetens et al., 2006), 因此餵食 sesamin 後主動脈損傷面積有減少趨勢可能是 sesamin 及其他代謝物產生之抗氧化及抗發炎作用影響。

本研究並未觀察到 0.5% sesamin 具有改善肥胖的效用, sesamin 本身並不具有雌激素活性, 但其在體內可代謝成具生物活性之 ENL 及 END(Penalvo et al., 2005), 在本研究也觀察到血液中具有微量的 ENL, 而 ENL 及 END 具有活化 ER 的能力, 會產生微弱的雌激素及抗雌激素效應(Penttinen et al., 2007), 近來研究發現 END 誘導 3T3-L1 細胞上與脂肪細胞生成相關基因之表現量, 且具有活化 PPAR γ 的能力(Fukumitsu et al., 2008), 在體內及體外實驗皆指出活化 PPAR γ 能夠促進脂肪細胞生長及分化, 誘發脂肪堆積因而導致肥胖(Kubota et al., 1999; Rosen et al., 1999)。故推測其可能起因於 END 在脂肪細胞上活化 PPAR γ 的效用超過活化 ERs, 進而促進脂肪細胞生長, 但其確切之機轉仍有待指出。

過去最常見且研究最多之植物性雌激素為黃豆食品中之異黃酮, 其含有具雌激素活性之 genistein 及 daidzein 代謝後會產生具雌激素活性之 equol, genistein 維持女性健康狀態, 作用在不同器官上調節血脂、醣類恆定及腹部脂肪堆積, 預防停經後引發之心血管風險(Cruz et al., 2006; Kreijkamp-Kaspers et al., 2004; Park, Huang, & Frishman, 2005)。體外研究指出低劑量之 genistein 能夠與雌激素受器結合, 且與 ER β 親合力較強(Kuiper et al., 1998), 但高劑量之 genistein 為 tyrosine kinase 之抑制劑, 亦具有抗雌激素效應(Hong et al., 2005)。體外實驗發現, 在 KS483 細胞上以 daizein 或 genistein 處理對於骨細胞生成及脂肪細胞生成作用具有雙向作用, daizein 濃度低於 20 μ M 而 genistein 低於 1 μ M 具有抑制骨細胞生成但促進脂肪細胞生長之效用, 但 daizein 高於 30 μ M 而 genistein 高於 1 μ M 卻可促進骨細胞生長但抑制脂肪細胞生長(Z. Dang & Lowik, 2004; Z. C. Dang, Audinot, Papapoulos, Boutin, & Lowik, 2003), 但組織及器官上不僅只有表現 ER, 亦還有其他核內轉錄因子如 PPARs, Dang 等人發現 daizein 可活化 PPAR α 、 γ 及 δ , genistein 可活化 PPAR α 及 γ , 因此當同時活化 ER 及 PPARs 會產生交互影響,

劑量不同產生相歧的反應可能決定於 ERs 及 PPARs 不同作用後產生之平衡效益 (Z. Dang & Lowik, 2004)，骨細胞上發現這樣的機制，在其他細胞、組織或器官上或許也有相似的作用。本研究結果發現，卵巢切除鼠餵食 0.5% isoflavone 可減少體重、腹部脂肪、血糖及肝脂，但子宮重量顯著增加(表 6-1)，而過去研究指出 OVX 鼠餵食 0.05%、0.1% 及 0.15% genistein 12 天後，顯著減少脂肪量但 0.15% genistein 卻顯著增加子宮重量(Naaz et al., 2003)，因此顯示高劑量之 genistein 雖可顯著減少脂肪堆積但可能導致子宮增生，與內生性雌激素效應相似，Penza 等人也發現 genistein 對於脂肪組織堆積有劑量上及性別差異(Penza et al., 2006)，顯示 genistein 使用之劑量可能影響其在體內產生的效用，本實驗使用之劑量，換算小鼠每日約攝取 0.475 g/kgw isoflavone，在此劑量下可能達到內生性雌激素效用，因此促進子宮增生。因此綜合以上推測本次研究 0.5% isoflavone (含 genistein 及 daizein) 在小鼠脂肪細胞上可能主要活化 ER α 及 β ，透過類似雌激素調控路徑，減少脂肪細胞生成及促進子宮增生，但又觀察到其血糖顯著下降，故可能同時也活化 PPAR γ ，但以活化 ER 的效用較強，故體重下降。

具植物性雌激素之食材對於脂肪肝的影響如表 6-2 所示。本研究體外實驗發現 genistein 顯著減少 HepG2 細胞上 FAS、ACC 及 SREBP1 表現量，因而抑制 HepG2 細胞脂肪生合成作用減少肝細胞 TG 堆積，且體內實驗指出 0.5% isoflavone 顯著減少 OVX 鼠肝臟 TG 含量，顯示 isoflavone 無論在體外或體內實驗皆具有防止肝臟脂肪堆積之功效。而本研究體外實驗也發現 sesamin 及 ENL 顯著減少 HepG2 細胞 TG 堆積，且 sesamin 同時具有促進脂肪酸氧化及抑制脂肪酸生合成之雙重功效，但在體內實驗卻發現 OVX 小鼠餵食含 0.5% sesamin 飼料無法有效的減少肝臟 TG 及 TC 含量，為何 sesamin 及其代謝產物 ENL 能夠有效的下降肝細胞 TG 含量，卻對於小鼠肝脂並無改善效用？反而上升肝臟 TG 含量。推測可能原因為 (1) 使用劑量。餵食 0.5% sesamin 在血液中可能無法達到細胞實驗所使用的劑量(25 或 50 μ M) (2) 代謝產物。近來研究發現，sesamin 在體內代謝產物除 ENL 外，在肝中還會代謝成其他具抗氧化能力之產物(Nakai et al.,

2003)，而代謝後的產物對於肝細胞脂肪堆積機轉不明，故可能因此失去功效，且 ENL 在體內濃度極低導致無法發揮效用。(3)種類差異。研究發現 PPAR α agonist 導致齧齒類動物會產生肝腫大及肝腫瘤細胞增生，但在人類並未發現，PPAR α -null 小鼠阻抗肝臟過氧化體增生作用及肝腫大現象，而 PPAR α -humanized 小鼠下降血液 TG 且誘導脂肪酸代謝酵素之作用，卻無產生肝腫大(Yang et al., 2008)，故 PPAR α agonist 在肝臟之作用會有種族歧異性，而本研究使用之 sesamin 可能為 PPAR α 活化劑，體外實驗使用之細胞株為人類肝癌細胞而體內實驗使用小鼠模式，種類上的差異可能為體內及體外實驗結果的不一致性之因。但是 sesamin 及其代謝產物具有抗氧化之效用，可保護肝臟免於受到自由基攻擊產生發炎，故若能維持在脂肪變性的狀態下，不會進展至肝發炎，可能不會造成肝纖維化甚至肝硬化，故其對於肝病可能仍具有保護作用。本研究亦發現苜蓿芽乙酸乙酯萃物在體外實驗也具有良好之效用，同時促進 HepG2 細胞脂肪酸氧化且抑制脂肪酸合成，往後可進行體內實驗確認其經體內代謝後是否仍保有相同的效用。

綜觀以上，我們發現劑量對於不同細胞、組織及器官上產生的效應不盡相同，且不同的劑量對於同種細胞的反應也有很大的歧異性，而體內的代謝反應相當複雜，故未來若要將具植物性雌激素的食材運用至人體上，如何評估及拿捏適當的劑量為其重任。

第二節 總結及未來建議

1. Sesamin 可能具有保護心血管疾病之潛力，但無法改善小鼠肥胖及 apoE 剔除鼠血脂異常的現象；sesamin 及 ENL 在體外實驗均可減少 HepG2 細胞 TG，但在體內並未改善小鼠肝內脂肪堆積情形，故其對於人體的效用需再進一步證實。
2. Isoflavone 具有抗肥胖及防治脂肪肝之效用，可預防女性停經後引起代謝症候群相關病徵，但其劑量需審慎評估。
3. 苜蓿芽乙酸乙酯萃物具有改善脂肪肝之潛力，需再進一步施行動物及人體試驗指出其在體內的確切效益，以供日後開發為防治 NAFLD 之保健食品；而山藥乙酸乙酯萃物對於改善脂肪肝無顯著效用。

表 6-1 芝麻素及異黃酮對於代謝症候群之影響¹Table 6-1 The effects of sesamin and isoflavone on metabolic syndrome.¹

	ApoE ^(-/-)		C57BL/6J	
	0.5 % sesamin	0.5 % sesamin	0.5% isoflavone	
Age	6 wks		6 wks	
Experimental time	11 wks		14 wks	
Body weight	NS	NS		↓
RWAT	↑	NS		NS.
PWAT	NS	NS		↓(<i>p</i> =0.07)
uterus	NS	NS		↑
Food intake ²	NS	NS		NS.
Feed efficiency ²	NS	↑		↓
Serum TG	NS	NS		NS
Serum TC	↑	NS		NS
Serum HDL-C	NS	↑		NS
Serum insulin	ND	NS		NS
Serum NEFA	ND	NS		NS
Fasting glucose	ND	NS		↓
Hepatic TG	ND	NS		↓
Hepatic TC	ND	NS		↓
Serum adiponectin	NS	NS		↓
Serum ENL	↑	↑		NS
Atherosclerotic lesion	↓ (<i>p</i> =0.07)	ND		ND

1. PWAT, parametrial fat pad; RWAT, retroperitoneal fat pad; ENL, enterolactone; ND, none detection ; NS, none significance

表 6-2 具植物性雌激素之食材對於脂肪肝的影響¹Table 6-2 The effects of phytoestrogens on fatty liver.¹

Tests	Samples	Inducer	sesamin	Genistein (isoflavone)	ENL	Alfalpa EAE	Yam EAE
In vitro	Hepatic TG	↑	↓	↓	↓	NS	NS
	FAS mRNA	↑	↓	↓	NS	NS	NS
	protein	↑	↓	↓	NS	↓	↓
	T0901317 50nM	ACC mRNA	↑	↓	↓	NS	NS
	SREBP1 mRNA	↑	↓	↓	NS	↓	NS
	GPAT mRNA	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	ACO mRNA	NS	↑	NS	NS	NS	NS
	Intralipid 5 µl/ml	Hepatic TG	↑	↓	NS	↓	↓
ACO mRNA		NS	↑	NS	NS	↑	NS
In vivo	Hepatic TG		NS	↓	ND	ND	ND
	Hepatic TC		NS	NS	ND	ND	ND

1. ND, none detection; NS, none significance; FAS, fatty acid synthase; ACC, acetyl-CoA carboxylase; SREBP1, sterol regulatory element binding protein-1; GPAT, glycerol 3-phosphate acyltransferase; ACO, acyl-CoA oxidase

第七章 參考文獻

- Abate, N. (2000). Obesity and cardiovascular disease. Pathogenetic role of the metabolic syndrome and therapeutic implications. *J Diabetes Complications*, 14(3), 154-174.
- Abdelmalek, M. F., & Diehl, A. M. (2007). Nonalcoholic fatty liver disease as a complication of insulin resistance. *Med Clin North Am*, 91(6), 1125-1149, ix.
- Ackerman, G. E., MacDonald, P. C., Gudelsky, G., Mendelson, C. R., & Simpson, E. R. (1981). Potentiation of epinephrine-induced lipolysis by catechol estrogens and their methoxy derivatives. *Endocrinology*, 109(6), 2084-2088.
- Adlercreutz, H., Hamalainen, E., Gorbach, S., & Goldin, B. (1992). Dietary phyto-oestrogens and the menopause in Japan. *Lancet*, 339(8803), 1233.
- Adlercreutz, H., Markkanen, H., & Watanabe, S. (1993). Plasma concentrations of phyto-oestrogens in Japanese men. *Lancet*, 342(8881), 1209-1210.
- Ae Park, S., Choi, M. S., Cho, S. Y., Seo, J. S., Jung, U. J., Kim, M. J., et al. (2006). Genistein and daidzein modulate hepatic glucose and lipid regulating enzyme activities in C57BL/KsJ-db/db mice. *Life Sci*, 79(12), 1207-1213.
- Akagiri, S., Naito, Y., Ichikawa, H., Mizushima, K., Takagi, T., Handa, O., et al. (2008). A Mouse Model of Metabolic Syndrome; Increase in Visceral Adipose Tissue Precedes the Development of Fatty Liver and Insulin Resistance in High-Fat Diet-Fed Male KK/Ta Mice. *J Clin Biochem Nutr*, 42(2), 150-157.
- Akahoshi, A., Goto, Y., Murao, K., Miyazaki, T., Yamasaki, M., Nonaka, M., et al. (2002). Conjugated linoleic acid reduces body fats and cytokine levels of mice. *Biosci Biotechnol Biochem*, 66(4), 916-920.
- Akimoto, K., Kitagawa, Y., Akamatsu, T., Hirose, N., Sugano, M., Shimizu, S., et al. (1993). Protective effects of sesamin against liver damage caused by alcohol or carbon tetrachloride in rodents. *Ann Nutr Metab*, 37(4), 218-224.
- Alberti, K. G., Zimmet, P., & Shaw, J. (2005). The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet*, 366(9491), 1059-1062.
- Alberti, K. G., & Zimmet, P. Z. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med*, 15(7), 539-553.
- Anderson, J. W., Johnstone, B. M., & Cook-Newell, M. E. (1995). Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med*, 333(5), 276-282.
- Aoyama, T., Peters, J. M., Iritani, N., Nakajima, T., Furihata, K., Hashimoto, T., et al. (1998). Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in

- mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). *J Biol Chem*, 273(10), 5678-5684.
- Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, M., Maeda, K., Miyagawa, J., et al. (1999). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*, 257(1), 79-83.
- Ashakumary, L., Rouyer, I., Takahashi, Y., Ide, T., Fukuda, N., Aoyama, T., et al. (1999). Sesamin, a sesame lignan, is a potent inducer of hepatic fatty acid oxidation in the rat. *Metabolism*, 48(10), 1303-1313.
- Beltowski, J. (2003). Adiponectin and resistin--new hormones of white adipose tissue. *Med Sci Monit*, 9(2), RA55-61.
- Blaschke, F., Takata, Y., Caglayan, E., Law, R. E., & Hsueh, W. A. (2006). Obesity, peroxisome proliferator-activated receptor, and atherosclerosis in type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26(1), 28-40.
- Boue, S. M., Wiese, T. E., Nehls, S., Burow, M. E., Elliott, S., Carter-Wientjes, C. H., et al. (2003). Evaluation of the estrogenic effects of legume extracts containing phytoestrogens. *J Agric Food Chem*, 51(8), 2193-2199.
- Bourassa, P. A., Milos, P. M., Gaynor, B. J., Breslow, J. L., & Aiello, R. J. (1996). Estrogen reduces atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(19), 10022-10027.
- Brown, S. A., Hutchinson, R., Morrisett, J., Boerwinkle, E., Davis, C. E., Gotto, A. M., Jr., et al. (1993). Plasma lipid, lipoprotein cholesterol, and apoprotein distributions in selected US communities. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Arterioscler Thromb*, 13(8), 1139-1158.
- Browning, J. D., & Horton, J. D. (2004). Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest*, 114(2), 147-152.
- Bruschi, F., Meschia, M., Soma, M., Perotti, D., Paoletti, R., & Crosignani, P. G. (1996). Lipoprotein(a) and other lipids after oophorectomy and estrogen replacement therapy. *Obstet Gynecol*, 88(6), 950-954.
- Carr, M. C. (2003). The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(6), 2404-2411.
- Carreau, C., Flouriot, G., Bennetau-Pelissero, C., & Potier, M. (2008). Enterodiol and enterolactone, two major diet-derived polyphenol metabolites have different impact on ERalpha transcriptional activation in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 110(1-2), 176-185.
- Cederroth, C. R., Vinciguerra, M., Kuhne, F., Madani, R., Doerge, D. R., Visser, T. J., et al. (2007). A phytoestrogen-rich diet increases energy expenditure and decreases adiposity in mice. *Environ Health Perspect*, 115(10), 1467-1473.
- Chang, W. C., Yu, Y. M., Wu, C. H., Tseng, Y. H., & Wu, K. Y. (2005). Reduction of

- oxidative stress and atherosclerosis in hyperlipidemic rabbits by *Dioscorea* rhizome. *Can J Physiol Pharmacol*, 83(5), 423-430.
- Charlton, M. (2004). Nonalcoholic fatty liver disease: a review of current understanding and future impact. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2(12), 1048-1058.
- Chen, P. R., Tsai, C. E., Chang, H., Liu, T. L., & Lee, C. C. (2005). Sesamol induces nitric oxide release from human umbilical vein endothelial cells. *Lipids*, 40(9), 955-961.
- Chen, S. W., Zhang, H. M., Zhang, L. S., Feng, X. F., & Peng, X. (2006). [Effects of soy isoflavone on gene expression of adiponectin in insulin-resistance rats induced by high-fat and high-sugar diet]. *Wei Sheng Yan Jiu*, 35(1), 46-49.
- Cheng, W. Y., Kuo, Y. H., & Huang, C. J. (2007). Isolation and identification of novel estrogenic compounds in yam tuber (*Dioscorea alata* Cv. Tainung No. 2). *J Agric Food Chem*, 55(18), 7350-7358.
- Chiba, H., Uehara, M., Wu, J., Wang, X., Masuyama, R., Suzuki, K., et al. (2003). Hesperidin, a citrus flavonoid, inhibits bone loss and decreases serum and hepatic lipids in ovariectomized mice. *J Nutr*, 133(6), 1892-1897.
- Chinetti, G., Gbaguidi, F. G., Griglio, S., Mallat, Z., Antonucci, M., Poulain, P., et al. (2000). CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. *Circulation*, 101(20), 2411-2417.
- Chinetti, G., Lestavel, S., Bocher, V., Remaley, A. T., Neve, B., Torra, I. P., et al. (2001). PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med*, 7(1), 53-58.
- Choi, I., Kim, Y., Park, Y., Seog, H., & Choi, H. (2007). Anti-obesity activities of fermented soygerm isoflavones by *Bifidobacterium breve*. *Biofactors*, 29(2-3), 105-112.
- Choudhury, J., & Sanyal, A. J. (2004). Insulin resistance and the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis*, 8(3), 575-594, ix.
- Combs, T. P., Berg, A. H., Rajala, M. W., Klebanov, S., Iyengar, P., Jimenez-Chillaron, J. C., et al. (2003). Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes*, 52(2), 268-276.
- Cooke, P. S., & Naaz, A. (2004). Role of estrogens in adipocyte development and function. *Exp Biol Med (Maywood)*, 229(11), 1127-1135.
- Cortez-Pinto, H., Camilo, M. E., Baptista, A., De Oliveira, A. G., & De Moura, M. C. (1999). Non-alcoholic fatty liver: another feature of the metabolic syndrome?

- Clin Nutr*, 18(6), 353-358.
- Coulman, K. D., Liu, Z., Hum, W. Q., Michaelides, J., & Thompson, L. U. (2005). Whole sesame seed is as rich a source of mammalian lignan precursors as whole flaxseed. *Nutr Cancer*, 52(2), 156-165.
- Crawford, S. E., & Borensztajn, J. (1999). Plasma clearance and liver uptake of chylomicron remnants generated by hepatic lipase lipolysis: evidence for a lactoferrin-sensitive and apolipoprotein E-independent pathway. *J Lipid Res*, 40(5), 797-805.
- Cruz, M. N., Luksha, L., Logman, H., Poston, L., Agewall, S., & Kublickiene, K. (2006). Acute responses to phytoestrogens in small arteries from men with coronary heart disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290(5), H1969-1975.
- Curtiss, L. K., & Boisvert, W. A. (2000). Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 11(3), 243-251.
- Dang, Z., & Lowik, C. W. (2004). The balance between concurrent activation of ERs and PPARs determines daidzein-induced osteogenesis and adipogenesis. *J Bone Miner Res*, 19(5), 853-861.
- Dang, Z. C., Audinot, V., Papapoulos, S. E., Boutin, J. A., & Lowik, C. W. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) as a molecular target for the soy phytoestrogen genistein. *J Biol Chem*, 278(2), 962-967.
- Dang, Z. C., van Bezooijen, R. L., Karperien, M., Papapoulos, S. E., & Lowik, C. W. (2002). Exposure of KS483 cells to estrogen enhances osteogenesis and inhibits adipogenesis. *J Bone Miner Res*, 17(3), 394-405.
- Declercq, V., Yeganeh, B., Moshtaghi-Kashanian, G. R., Khademi, H., Bahadori, B., & Moghadasian, M. H. (2005). Paradoxical effects of fenofibrate and nicotinic acid in apo E-deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol*, 46(1), 18-24.
- Ducimetiere, P., Richard, J., & Cambien, F. (1986). The pattern of subcutaneous fat distribution in middle-aged men and the risk of coronary heart disease: the Paris Prospective Study. *Int J Obes*, 10(3), 229-240.
- Elhage, R., Arnal, J. F., Pieraggi, M. T., Duverger, N., Fievet, C., Faye, J. C., et al. (1997). 17 beta-estradiol prevents fatty streak formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17(11), 2679-2684.
- Enmark, E., & Gustafsson, J. A. (1999). Oestrogen receptors - an overview. *J Intern Med*, 246(2), 133-138.
- Fantuzzi, G. (2005). Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 115(5), 911-919; quiz 920.
- Farooqi, I. S., Matarese, G., Lord, G. M., Keogh, J. M., Lawrence, E., Agwu, C., et al. (2002). Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and

- neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest*, 110(8), 1093-1103.
- Friedman, J. M., & Halaas, J. L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395(6704), 763-770.
- Fu, T., Kashireddy, P., & Borensztajn, J. (2003). The peroxisome-proliferator-activated receptor alpha agonist ciprofibrate severely aggravates hypercholesterolaemia and accelerates the development of atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein E. *Biochem J*, 373(Pt 3), 941-947.
- Fukumitsu, S., Aida, K., Ueno, N., Ozawa, S., Takahashi, Y., & Kobori, M. (2008). Flaxseed lignan attenuates high-fat diet-induced fat accumulation and induces adiponectin expression in mice. *Br J Nutr*, 1-8.
- Gervois, P., Kleemann, R., Pilon, A., Percevault, F., Koenig, W., Staels, B., et al. (2004). Global suppression of IL-6-induced acute phase response gene expression after chronic in vivo treatment with the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activator fenofibrate. *J Biol Chem*, 279(16), 16154-16160.
- Ginsberg, H. N. (2000). Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest*, 106(4), 453-458.
- Glass, C. K., & Witztum, J. L. (2001). Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*, 104(4), 503-516.
- Gomori, A., Ishihara, A., Ito, M., Matsushita, H., Mashiko, S., Iwaasa, H., et al. (2007). Blockade of MCH1 receptor signalling ameliorates obesity and related hepatic steatosis in ovariectomized mice. *Br J Pharmacol*, 151(6), 900-908.
- Grundy, S. M. (1998). Hypertriglyceridemia, atherogenic dyslipidemia, and the metabolic syndrome. *Am J Cardiol*, 81(4A), 18B-25B.
- Grundy, S. M. (1999). Hypertriglyceridemia, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *Am J Cardiol*, 83(9B), 25F-29F.
- Guerre-Millo, M., Gervois, P., Raspe, E., Madsen, L., Poulain, P., Derudas, B., et al. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators improve insulin sensitivity and reduce adiposity. *J Biol Chem*, 275(22), 16638-16642.
- Guzik, T. J., Mangalat, D., & Korbout, R. (2006). Adipocytokines - novel link between inflammation and vascular function? *J Physiol Pharmacol*, 57(4), 505-528.
- Haffner, S. M., Stern, M. P., Mitchell, B. D., Hazuda, H. P., & Patterson, J. K. (1990). Incidence of type II diabetes in Mexican Americans predicted by fasting insulin and glucose levels, obesity, and body-fat distribution. *Diabetes*, 39(3), 283-288.
- Hallund, J., Ravn-Haren, G., Bugel, S., Tholstrup, T., & Tetens, I. (2006). A lignan

- complex isolated from flaxseed does not affect plasma lipid concentrations or antioxidant capacity in healthy postmenopausal women. *J Nutr*, 136(1), 112-116.
- Hallund, J., Tetens, I., Bugel, S., Tholstrup, T., Ferrari, M., Teerlink, T., et al. (2006). Daily consumption for six weeks of a lignan complex isolated from flaxseed does not affect endothelial function in healthy postmenopausal women. *J Nutr*, 136(9), 2314-2318.
- Hamosh, M., & Hamosh, P. (1975). The effect of estrogen on the lipoprotein lipase activity of rat adipose tissue. *J Clin Invest*, 55(5), 1132-1135.
- Harding, M., Cowan, S., Hole, D., Cassidy, L., Kitchener, H., Davis, J., et al. (1990). Estrogen and progesterone receptors in ovarian cancer. *Cancer*, 65(3), 486-491.
- Harmon, A. W., & Harp, J. B. (2001). Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280(4), C807-813.
- Heine, P. A., Taylor, J. A., Iwamoto, G. A., Lubahn, D. B., & Cooke, P. S. (2000). Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(23), 12729-12734.
- Hirata, F., Fujita, K., Ishikura, Y., Hosoda, K., Ishikawa, T., & Nakamura, H. (1996). Hypocholesterolemic effect of sesame lignan in humans. *Atherosclerosis*, 122(1), 135-136.
- Hirose, N., Inoue, T., Nishihara, K., Sugano, M., Akimoto, K., Shimizu, S., et al. (1991). Inhibition of cholesterol absorption and synthesis in rats by sesamin. *J Lipid Res*, 32(4), 629-638.
- Hong, M., Lin, M. Y., Huang, J. M., Baumeister, P., Hakre, S., Roy, A. L., et al. (2005). Transcriptional regulation of the Grp78 promoter by endoplasmic reticulum stress: role of TFII-I and its tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*, 280(17), 16821-16828.
- Horton, J. D., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*, 109(9), 1125-1131.
- Hotamisligil, G. S. (2003). Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 27 Suppl 3, S53-55.
- Hu, E., Liang, P., & Spiegelman, B. M. (1996). AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem*, 271(18), 10697-10703.
- Hui, D. Y., Innerarity, T. L., & Mahley, R. W. (1981). Lipoprotein binding to canine hepatic membranes. Metabolically distinct apo-E and apo-B,E receptors. *J. Biol. Chem.*, 256(11), 5646-5655.
- Hwang, J., Hodis, H. N., & Sevanian, A. (2001). Soy and alfalfa phytoestrogen

- extracts become potent low-density lipoprotein antioxidants in the presence of acerola cherry extract. *J Agric Food Chem*, 49(1), 308-314.
- Ide, T., Ashakumary, L., Takahashi, Y., Kushiro, M., Fukuda, N., & Sugano, M. (2001). Sesamin, a sesame lignan, decreases fatty acid synthesis in rat liver accompanying the down-regulation of sterol regulatory element binding protein-1. *Biochim Biophys Acta*, 1534(1), 1-13.
- Im, J. A., Kim, S. H., Lee, J. W., Shim, J. Y., Lee, H. R., & Lee, D. C. (2006). Association between hypoadiponectinemia and cardiovascular risk factors in nonobese healthy adults. *Metabolism*, 55(11), 1546-1550.
- Iwu, M. M., Okunji, C. O., Ohiaeri, G. O., Akah, P., Corley, D., & Tempesta, M. S. (1990). Hypoglycaemic activity of dioscoretine from tubers of *Dioscorea dumetorum* in normal and alloxan diabetic rabbits. *Planta Med*, 56(3), 264-267.
- Jawien, J., Nastalek, P., & Korbut, R. (2004). Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol*, 55(3), 503-517.
- Jeng, K. C., Hou, R. C., Wang, J. C., & Ping, L. I. (2005). Sesamin inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine production by suppression of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB. *Immunol Lett*, 97(1), 101-106.
- Jeong, S., Han, M., Lee, H., Kim, M., Kim, J., Nicol, C. J., et al. (2004). Effects of fenofibrate on high-fat diet-induced body weight gain and adiposity in female C57BL/6J mice. *Metabolism*, 53(10), 1284-1289.
- Joseph, L., Mayo, M., & FACOG. (1999). A Natural Approach to Menopause. *APPLIED NUTRITIONAL SCIENCE REPORTS*, 5(7), 1-8.
- Jurimae, J., & Jurimae, T. (2007). Plasma adiponectin concentration in healthy pre- and postmenopausal women: relationship with body composition, bone mineral, and metabolic variables. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293(1), E42-47.
- Juvet, L. K., Andresen, S. M., Schuster, G. U., Dalen, K. T., Tobin, K. A., Hollung, K., et al. (2003). On the role of liver X receptors in lipid accumulation in adipocytes. *Mol Endocrinol*, 17(2), 172-182.
- Kamal-Eldin, A., Pettersson, D., & Appelqvist, L. A. (1995). Sesamin (a compound from sesame oil) increases tocopherol levels in rats fed ad libitum. *Lipids*, 30(6), 499-505.
- Kannel, W. B., Cupples, L. A., Ramaswami, R., Stokes, J., 3rd, Kreger, B. E., & Higgins, M. (1991). Regional obesity and risk of cardiovascular disease; the Framingham Study. *J Clin Epidemiol*, 44(2), 183-190.
- Kershaw, E. E., & Flier, J. S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin*

- Endocrinol Metab*, 89(6), 2548-2556.
- Kim, H., Haluzik, M., Asghar, Z., Yau, D., Joseph, J. W., Fernandez, A. M., et al. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonist treatment in a transgenic model of type 2 diabetes reverses the lipotoxic state and improves glucose homeostasis. *Diabetes*, 52(7), 1770-1778.
- Kim, H. K., Nelson-Dooley, C., Della-Fera, M. A., Yang, J. Y., Zhang, W., Duan, J., et al. (2006). Genistein decreases food intake, body weight, and fat pad weight and causes adipose tissue apoptosis in ovariectomized female mice. *J Nutr*, 136(2), 409-414.
- Kim, S., Shin, H. J., Kim, S. Y., Kim, J. H., Lee, Y. S., Kim, D. H., et al. (2004). Genistein enhances expression of genes involved in fatty acid catabolism through activation of PPARalpha. *Mol Cell Endocrinol*, 220(1-2), 51-58.
- Kita, S., Matsumura, Y., Morimoto, S., Akimoto, K., Furuya, M., Oka, N., et al. (1995). Antihypertensive effect of sesamin. II. Protection against two-kidney, one-clip renal hypertension and cardiovascular hypertrophy. *Biol Pharm Bull*, 18(9), 1283-1285.
- Kleemann, R., Gervois, P. P., Verschuren, L., Staels, B., Princen, H. M., & Kooistra, T. (2003). Fibrates down-regulate IL-1-stimulated C-reactive protein gene expression in hepatocytes by reducing nuclear p50-NFkappa B-C/EBP-beta complex formation. *Blood*, 101(2), 545-551.
- Kovanen, P. T., & Pentikainen, M. O. (2003). Pharmacological evidence for a role of liver X receptors in atheroprotection. *FEBS Lett*, 536(1-3), 3-5.
- Kreijkamp-Kaspers, S., Kok, L., Grobbee, D. E., de Haan, E. H., Aleman, A., Lampe, J. W., et al. (2004). Effect of soy protein containing isoflavones on cognitive function, bone mineral density, and plasma lipids in postmenopausal women: a randomized controlled trial. *JAMA*, 292(1), 65-74.
- Kubota, N., Terauchi, Y., Miki, H., Tamemoto, H., Yamauchi, T., Komeda, K., et al. (1999). PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell*, 4(4), 597-609.
- Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., et al. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, 139(10), 4252-4263.
- Kushiro, M., Takahashi, Y., & Ide, T. (2004). Species differences in the physiological activity of dietary lignan (sesamin and episesamin) in affecting hepatic fatty acid metabolism. *Br J Nutr*, 91(3), 377-386.
- Laffitte, B. A., Chao, L. C., Li, J., Walczak, R., Hummasti, S., Joseph, S. B., et al. (2003). Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proc*

- Natl Acad Sci U S A*, 100(9), 5419-5424.
- Landau, I. T., & Zucker, I. (1976). Estrogenic regulation of body weight in the female rat. *Horm Behav*, 7(1), 29-39.
- Lapidus, L., Bengtsson, C., Larsson, B., Pennert, K., Rybo, E., & Sjostrom, L. (1984). Distribution of adipose tissue and risk of cardiovascular disease and death: a 12 year follow up of participants in the population study of women in Gothenburg, Sweden. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 289(6454), 1257-1261.
- Larsson, B., Svardsudd, K., Welin, L., Wilhelmsen, L., Bjorntorp, P., & Tibblin, G. (1984). Abdominal adipose tissue distribution, obesity, and risk of cardiovascular disease and death: 13 year follow up of participants in the study of men born in 1913. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 288(6428), 1401-1404.
- Latruffe, N., & Vamecq, J. (1997). Peroxisome proliferators and peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) as regulators of lipid metabolism. *Biochimie*, 79(2-3), 81-94.
- Lea-Currie, Y. R., Monroe, D., & McIntosh, M. K. (1999). Dehydroepiandrosterone and related steroids alter 3T3-L1 preadipocyte proliferation and differentiation. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, 123(1), 17-25.
- Lee, C. C., Chen, P. R., Lin, S., Tsai, S. C., Wang, B. W., Chen, W. W., et al. (2004). Sesamin induces nitric oxide and decreases endothelin-1 production in HUVECs: possible implications for its antihypertensive effect. *J Hypertens*, 22(12), 2329-2338.
- Lee, J. S. (2006). Effects of soy protein and genistein on blood glucose, antioxidant enzyme activities, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci*, 79(16), 1578-1584.
- Lee, Y. M., Choi, J. S., Kim, M. H., Jung, M. H., Lee, Y. S., & Song, J. (2006). Effects of dietary genistein on hepatic lipid metabolism and mitochondrial function in mice fed high-fat diets. *Nutrition*, 22(9), 956-964.
- Li, A. C., & Glass, C. K. (2004). PPAR- and LXR-dependent pathways controlling lipid metabolism and the development of atherosclerosis. *J Lipid Res*, 45(12), 2161-2173.
- Liang, Y. Q., Akishita, M., Kim, S., Ako, J., Hashimoto, M., Iijima, K., et al. (2002). Estrogen receptor beta is involved in the anorectic action of estrogen. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 26(8), 1103-1109.
- Libby, P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420(6917), 868-874.
- Libby, P., Ridker, P. M., & Maseri, A. (2002). Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 105(9), 1135-1143.
- Lillioja, S., Mott, D. M., Spraul, M., Ferraro, R., Foley, J. E., Ravussin, E., et al. (1993). Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of

- non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians. *N Engl J Med*, 329(27), 1988-1992.
- Lindenfeld, J., Ghali, J. K., Krause-Steinrauf, H. J., Khan, S., Adams, K., Goldman, S., et al. (2003). Hormone replacement therapy is associated with improved survival in women with advanced heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 42(7), 1238-1245.
- Lindheim, S. R., Buchanan, T. A., Duffy, D. M., Vijod, M. A., Kojima, T., Stanczyk, F. Z., et al. (1994). Comparison of estimates of insulin sensitivity in pre- and postmenopausal women using the insulin tolerance test and the frequently sampled intravenous glucose tolerance test. *J Soc Gynecol Investig*, 1(2), 150-154.
- Liu, M. S., Jirik, F. R., LeBoeuf, R. C., Henderson, H., Castellani, L. W., Lusic, A. J., et al. (1994). Alteration of lipid profiles in plasma of transgenic mice expressing human lipoprotein lipase. *J Biol Chem*, 269(15), 11417-11424.
- Liu, Z., Saarinen, N. M., & Thompson, L. U. (2006). Sesamin is one of the major precursors of mammalian lignans in sesame seed (*Sesamum indicum*) as observed in vitro and in rats. *J Nutr*, 136(4), 906-912.
- Makela, S., Savolainen, H., Aavik, E., Myllarniemi, M., Strauss, L., Taskinen, E., et al. (1999). Differentiation between vasculoprotective and uterotrophic effects of ligands with different binding affinities to estrogen receptors alpha and beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(12), 7077-7082.
- Marchesini, G., Brizi, M., Bianchi, G., Tomassetti, S., Bugianesi, E., Lenzi, M., et al. (2001). Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes*, 50(8), 1844-1850.
- Marchesini, G., Bugianesi, E., Forlani, G., Cerrelli, F., Lenzi, M., Manini, R., et al. (2003). Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology*, 37(4), 917-923.
- Marx, N., Sukhova, G. K., Collins, T., Libby, P., & Plutzky, J. (1999). PPARalpha activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *Circulation*, 99(24), 3125-3131.
- Matsumura, Y., Kita, S., Morimoto, S., Akimoto, K., Furuya, M., Oka, N., et al. (1995). Antihypertensive effect of sesamin. I. Protection against deoxycorticosterone acetate-salt-induced hypertension and cardiovascular hypertrophy. *Biol Pharm Bull*, 18(7), 1016-1019.
- McCullough, A. J. (2004). The clinical features, diagnosis and natural history of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis*, 8(3), 521-533, viii.
- McElroy, J. F., & Wade, G. N. (1987). Short- and long-term effects of ovariectomy on food intake, body weight, carcass composition, and brown adipose tissue in

- rats. *Physiol Behav*, 39(3), 361-365.
- Meli, R., Pacilio, M., Raso, G. M., Esposito, E., Coppola, A., Nasti, A., et al. (2004). Estrogen and raloxifene modulate leptin and its receptor in hypothalamus and adipose tissue from ovariectomized rats. *Endocrinology*, 145(7), 3115-3121.
- Messina, M. J. (2002). Soy foods and soybean isoflavones and menopausal health. *Nutr Clin Care*, 5(6), 272-282.
- Miksicek, R. J. (1994). Interaction of naturally occurring nonsteroidal estrogens with expressed recombinant human estrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 49(2-3), 153-160.
- Miyatani, Y., Yasui, T., Uemura, H., Yamada, M., Matsuzaki, T., Kuwahara, A., et al. (2008). Associations of circulating adiponectin with estradiol and monocyte chemotactic protein-1 in postmenopausal women. *Menopause*, 15(3), 536-541.
- Mohamed, M. K., & Abdel-Rahman, A. A. (2000). Effect of long-term ovariectomy and estrogen replacement on the expression of estrogen receptor gene in female rats. *Eur J Endocrinol*, 142(3), 307-314.
- Moon, K. W., Leem, J. M., Bae, S. S., Lee, K. M., Kim, S. H., Chae, H. B., et al. (2004). [The prevalence of metabolic syndrome in patients with nonalcoholic fatty liver disease]. *Korean J Hepatol*, 10(3), 197-206.
- Morifuji, M., Sanbongi, C., & Sugiura, K. (2006). Dietary soya protein intake and exercise training have an additive effect on skeletal muscle fatty acid oxidation enzyme activities and mRNA levels in rats. *Br J Nutr*, 96(3), 469-475.
- Mueller, S. O., Simon, S., Chae, K., Metzler, M., & Korach, K. S. (2004). Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta in human cells. *Toxicol Sci*, 80(1), 14-25.
- Naaz, A., Yellayi, S., Zakroczymski, M. A., Bunick, D., Doerge, D. R., Lubahn, D. B., et al. (2003). The soy isoflavone genistein decreases adipose deposition in mice. *Endocrinology*, 144(8), 3315-3320.
- Nakai, M., Harada, M., Nakahara, K., Akimoto, K., Shibata, H., Miki, W., et al. (2003). Novel antioxidative metabolites in rat liver with ingested sesamin. *J Agric Food Chem*, 51(6), 1666-1670.
- Nakano, D., Itoh, C., Takaoka, M., Kiso, Y., Tanaka, T., & Matsumura, Y. (2002). Antihypertensive effect of sesamin. IV. Inhibition of vascular superoxide production by sesamin. *Biol Pharm Bull*, 25(9), 1247-1249.
- Nakashima, Y., Plump, A. S., Raines, E. W., Breslow, J. L., & Ross, R. (1994). ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arteriosclerosis & Thrombosis*, 14(1), 133-140.
- Nemoto, Y., Toda, K., Ono, M., Fujikawa-Adachi, K., Saibara, T., Onishi, S., et al.

- (2000). Altered expression of fatty acid-metabolizing enzymes in aromatase-deficient mice. *J Clin Invest*, 105(12), 1819-1825.
- Noguchi, T., Ikeda, K., Sasaki, Y., Yamamoto, J., Seki, J., Yamagata, K., et al. (2001). Effects of vitamin E and sesamin on hypertension and cerebral thrombogenesis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*, 24(6), 735-742.
- Ogawa, H., Sasagawa, S., Murakami, T., & Yoshizumi, H. (1995). Sesame lignans modulate cholesterol metabolism in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl*, 22(1), S310-312.
- Ohta, H., Wada, H., Niwa, T., Kirii, H., Iwamoto, N., Fujii, H., et al. (2005). Disruption of tumor necrosis factor-alpha gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis*, 180(1), 11-17.
- Okamoto, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Nishida, M., Arita, Y., Kumada, M., et al. (2002). Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 106(22), 2767-2770.
- Owen, A. J., & Abbey, M. (2004). The effect of estrogens and phytoestrogenic lignans on macrophage uptake of atherogenic lipoproteins. *Biofactors*, 20(3), 119-127.
- Palin, S. L., McTernan, P. G., Anderson, L. A., Sturdee, D. W., Barnett, A. H., & Kumar, S. (2003). 17Beta-estradiol and anti-estrogen ICI:compound 182,780 regulate expression of lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase in isolated subcutaneous abdominal adipocytes. *Metabolism*, 52(4), 383-388.
- Paquette, A., Shinoda, M., Rabasa Lhoret, R., Prud'homme, D., & Lavoie, J. M. (2007). Time course of liver lipid infiltration in ovariectomized rats: impact of a high-fat diet. *Maturitas*, 58(2), 182-190.
- Park, D., Huang, T., & Frishman, W. H. (2005). Phytoestrogens as cardioprotective agents. *Cardiol Rev*, 13(1), 13-17.
- Pedersen, S. B., Kristensen, K., Hermann, P. A., Katzenellenbogen, J. A., & Richelsen, B. (2004). Estrogen controls lipolysis by up-regulating alpha2A-adrenergic receptors directly in human adipose tissue through the estrogen receptor alpha. Implications for the female fat distribution. *J Clin Endocrinol Metab*, 89(4), 1869-1878.
- Penalvo, J. L., Heinonen, S. M., Aura, A. M., & Adlercreutz, H. (2005). Dietary sesamin is converted to enterolactone in humans. *J Nutr*, 135(5), 1056-1062.
- Penalvo, J. L., Hopia, A., & Adlercreutz, H. (2006). Effect of sesamin on serum cholesterol and triglycerides levels in LDL receptor-deficient mice. *Eur J Nutr*, 45(8), 439-444.
- Penttinen, P., Jaehrling, J., Damdimopoulos, A. E., Inzunza, J., Lemmen, J. G., van der Saag, P., et al. (2007). Diet-derived polyphenol metabolite enterolactone is a

- tissue-specific estrogen receptor activator. *Endocrinology*, *148*(10), 4875-4886.
- Penza, M., Montani, C., Romani, A., Vignolini, P., Pampaloni, B., Tanini, A., et al. (2006). Genistein affects adipose tissue deposition in a dose-dependent and gender-specific manner. *Endocrinology*, *147*(12), 5740-5751.
- Piller, R., Chang-Claude, J., & Linseisen, J. (2006). Plasma enterolactone and genistein and the risk of premenopausal breast cancer. *Eur J Cancer Prev*, *15*(3), 225-232.
- Plump, A. S., Scott, C. J., & Breslow, J. L. (1994). Human apolipoprotein A-I gene expression increases high density lipoprotein and suppresses atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*(20), 9607-9611.
- Plump, A. S., Smith, J. D., Hayek, T., Aalto-Setälä, K., Walsh, A., Verstuyft, J. G., et al. (1992). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*, *71*(2), 343.
- Prasad, K. (2005). Hypocholesterolemic and antiatherosclerotic effect of flax lignan complex isolated from flaxseed. *Atherosclerosis*, *179*(2), 269-275.
- Reaven, G. M. (1988). Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, *37*(12), 1595-1607.
- Reddick, R. L., Zhang, S. H., & Maeda, N. (1994). Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesion development and progression. *Arterioscler Thromb*, *14*(1), 141-147.
- Richard, D. (1986). Effects of ovarian hormones on energy balance and brown adipose tissue thermogenesis. *Am J Physiol*, *250*(2 Pt 2), R245-249.
- Rosen, E. D., Sarraf, P., Troy, A. E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D. S., et al. (1999). PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell*, *4*(4), 611-617.
- Ross, R. (1999). Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*, *138*(5 Pt 2), S419-420.
- Rubin, E. M., Krauss, R. M., Spangler, E. A., Verstuyft, J. G., & Clift, S. M. (1991). Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. *Nature*, *353*(6341), 265-267.
- Saku, K., Gartside, P. S., Hynd, B. A., & Kashyap, M. L. (1985). Mechanism of action of gemfibrozil on lipoprotein metabolism. *J Clin Invest*, *75*(5), 1702-1712.
- Sanchez-Mateos, S., Alonso-Gonzalez, C., Gonzalez, A., Martinez-Campa, C. M., Mediavilla, M. D., Cos, S., et al. (2007). Melatonin and estradiol effects on food intake, body weight, and leptin in ovariectomized rats. *Maturitas*, *58*(1),

- 91-101.
- Santamarina-Fojo, S., Haudenschild, C., & Amar, M. (1998). The role of hepatic lipase in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 9(3), 211-219.
- Savage, D. B., Petersen, K. F., & Shulman, G. I. (2005). Mechanisms of insulin resistance in humans and possible links with inflammation. *Hypertension*, 45(5), 828-833.
- Sayegh, R. A., Kelly, L., Wurtman, J., Deitch, A., & Chelmow, D. (1999). Impact of hormone replacement therapy on the body mass and fat compositions of menopausal women: a cross-sectional study. *Menopause*, 6(4), 312-315.
- Schultz, J. R., Tu, H., Luk, A., Repa, J. J., Medina, J. C., Li, L., et al. (2000). Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev*, 14(22), 2831-2838.
- Shih, C. C., Lin, C. H., & Lin, W. L. (2008). Effects of *Momordica charantia* on insulin resistance and visceral obesity in mice on high-fat diet. *Diabetes Res Clin Pract*.
- Shin, E. S., Cho, S. Y., Lee, E. H., Lee, S. J., Chang, I. S., & Lee, T. R. (2006). Positive regulation of hepatic carnitine palmitoyl transferase 1A (CPT1A) activities by soy isoflavones and L-carnitine. *Eur J Nutr*, 45(3), 159-164.
- Shin, E. S., Lee, H. H., Cho, S. Y., Park, H. W., Lee, S. J., & Lee, T. R. (2007). Genistein downregulates SREBP-1 regulated gene expression by inhibiting site-1 protease expression in HepG2 cells. *J Nutr*, 137(5), 1127-1131.
- Sirato-Yasumoto, S., Katsuta, M., Okuyama, Y., Takahashi, Y., & Ide, T. (2001). Effect of sesame seeds rich in sesamin and sesamol on fatty acid oxidation in rat liver. *J Agric Food Chem*, 49(5), 2647-2651.
- Sugano, M., Akahoshi, A., Koba, K., Tanaka, K., Okumura, T., Matsuyama, H., et al. (2001). Dietary manipulations of body fat-reducing potential of conjugated linoleic acid in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, 65(11), 2535-2541.
- Sullivan, T. R., Jr., Karas, R. H., Aronovitz, M., Faller, G. T., Ziar, J. P., Smith, J. J., et al. (1995). Estrogen inhibits the response-to-injury in a mouse carotid artery model. *J Clin Invest*, 96(5), 2482-2488.
- Szkudelska, K., & Nogowski, L. (2007). Genistein--a dietary compound inducing hormonal and metabolic changes. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 105(1-5), 37-45.
- Talukdar, S., & Hillgartner, F. B. (2006). The mechanism mediating the activation of acetyl-coenzyme A carboxylase- α gene transcription by the liver X receptor agonist T0-901317. *J Lipid Res*, 47(11), 2451-2461.
- Tangirala, R. K., Tsukamoto, K., Chun, S. H., Usher, D., Pure, E., & Rader, D. J. (1999). Regression of atherosclerosis induced by liver-directed gene transfer

- of apolipoprotein A-I in mice. *Circulation*, 100(17), 1816-1822.
- Tikkanen, M. J., Kuusi, T., Nikkila, E. A., & Stenman, U. H. (1986). Variation of postheparin plasma hepatic lipase by menstrual cycle. *Metabolism*, 35(2), 99-104.
- Tobin, K. A., Ulven, S. M., Schuster, G. U., Steineger, H. H., Andresen, S. M., Gustafsson, J. A., et al. (2002). Liver X receptors as insulin-mediating factors in fatty acid and cholesterol biosynthesis. *J Biol Chem*, 277(12), 10691-10697.
- Tordjman, K., Bernal-Mizrachi, C., Zemany, L., Weng, S., Feng, C., Zhang, F., et al. (2001). PPARalpha deficiency reduces insulin resistance and atherosclerosis in apoE-null mice. *J Clin Invest*, 107(8), 1025-1034.
- Toth, M. J., Sites, C. K., Eltabbakh, G. H., & Poehlman, E. T. (2000). Effect of menopausal status on insulin-stimulated glucose disposal: comparison of middle-aged premenopausal and early postmenopausal women. *Diabetes Care*, 23(6), 801-806.
- Tovar, A. R., Torre-Villalvazo, I., Ochoa, M., Elias, A. L., Ortiz, V., Aguilar-Salinas, C. A., et al. (2005). Soy protein reduces hepatic lipotoxicity in hyperinsulinemic obese Zucker fa/fa rats. *J Lipid Res*, 46(9), 1823-1832.
- Ulven, S. M., Dalen, K. T., Gustafsson, J. A., & Nebb, H. I. (2005). LXR is crucial in lipid metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 73(1), 59-63.
- Umeda-Sawada, R., Ogawa, M., Nakamura, M., & Igarashi, O. (2001). Effect of sesamin on mitochondrial and peroxisomal beta-oxidation of arachidonic and eicosapentaenoic acids in rat liver. *Lipids*, 36(5), 483-489.
- Vanharanta, M., Voutilainen, S., Lakka, T. A., van der Lee, M., Adlercreutz, H., & Salonen, J. T. (1999). Risk of acute coronary events according to serum concentrations of enterolactone: a prospective population-based case-control study. *Lancet*, 354(9196), 2112-2115.
- Verheus, M., van Gils, C. H., Keinan-Boker, L., Grace, P. B., Bingham, S. A., & Peeters, P. H. (2007). Plasma phytoestrogens and subsequent breast cancer risk. *J Clin Oncol*, 25(6), 648-655.
- Volpe, J. J., & Vagelos, P. R. (1976). Mechanisms and regulation of biosynthesis of saturated fatty acids. *Physiol Rev*, 56(2), 339-417.
- Waddington, E., Puddey, I. B., & Croft, K. D. (2004). Red wine polyphenolic compounds inhibit atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice independently of effects on lipid peroxidation. *Am J Clin Nutr*, 79(1), 54-61.
- Wade, G. N., Gray, J. M., & Bartness, T. J. (1985). Gonadal influences on adiposity. *Int J Obes*, 9 Suppl 1, 83-92.
- Wallen, W. J., Belanger, M. P., & Wittnich, C. (2001). Sex hormones and the selective estrogen receptor modulator tamoxifen modulate weekly body weights and

- food intakes in adolescent and adult rats. *J Nutr*, 131(9), 2351-2357.
- Wallen, W. J., Belanger, M. P., & Wittnich, C. (2002). Body weight and food intake profiles are modulated by sex hormones and tamoxifen in chronically hypertensive rats. *J Nutr*, 132(8), 2246-2250.
- Walsh, B. W., & Schiff, I. (1991). Menopause: advanced management strategies. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 3(3), 343-351.
- Wang, J. F., Guo, Y. X., Niu, J. Z., Liu, J., Wang, L. Q., & Li, P. H. (2004). Effects of Radix Puerariae flavones on liver lipid metabolism in ovariectomized rats. *World J Gastroenterol*, 10(13), 1967-1970.
- Wang, L. Q. (2002). Mammalian phytoestrogens: enterodiols and enterolactone. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 777(1-2), 289-309.
- Wang, L. Q., Meselhy, M. R., Li, Y., Qin, G. W., & Hattori, M. (2000). Human intestinal bacteria capable of transforming secoisolariciresinol diglucoside to mammalian lignans, enterodiols and enterolactone. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 48(11), 1606-1610.
- Wang, Y. X., Lee, C. H., Tjep, S., Yu, R. T., Ham, J., Kang, H., et al. (2003). Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell*, 113(2), 159-170.
- Warram, J. H., Martin, B. C., Krolewski, A. S., Soeldner, J. S., & Kahn, C. R. (1990). Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents. *Ann Intern Med*, 113(12), 909-915.
- Wolford, S. T., & Argoudelis, C. J. (1979). Measurement of estrogens in cow's milk, human milk, and dairy products. *J Dairy Sci*, 62(9), 1458-1463.
- Wu, J., Wang, X., Chiba, H., Higuchi, M., Nakatani, T., Ezaki, O., et al. (2004). Combined intervention of soy isoflavone and moderate exercise prevents body fat elevation and bone loss in ovariectomized mice. *Metabolism*, 53(7), 942-948.
- Xia, M., Ling, W. H., Ma, J., Kitts, D. D., & Zawistowski, J. (2003). Supplementation of diets with the black rice pigment fraction attenuates atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein e deficient mice. *J Nutr*, 133(3), 744-751.
- Xia, P., Vadas, M. A., Rye, K. A., Barter, P. J., & Gamble, J. R. (1999). High density lipoproteins (HDL) interrupt the sphingosine kinase signaling pathway. A possible mechanism for protection against atherosclerosis by HDL. *J Biol Chem*, 274(46), 33143-33147.
- Xiao, C. W., Mei, J., & Wood, C. M. (2008). Effect of soy proteins and isoflavones on lipid metabolism and involved gene expression. *Front Biosci*, 13, 2660-2673.
- Yamashita, K., Nohara, Y., Katayama, K., & Namiki, M. (1992). Sesame seed lignans

- and gamma-tocopherol act synergistically to produce vitamin E activity in rats. *J Nutr*, 122(12), 2440-2446.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., et al. (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med*, 7(8), 941-946.
- Yang, Q., Nagano, T., Shah, Y., Cheung, C., Ito, S., & Gonzalez, F. J. (2008). The PPAR alpha-humanized mouse: a model to investigate species differences in liver toxicity mediated by PPAR alpha. *Toxicol Sci*, 101(1), 132-139.
- Ye, J. M., Iglesias, M. A., Watson, D. G., Ellis, B., Wood, L., Jensen, P. B., et al. (2003). PPARalpha /gamma ragaglitazar eliminates fatty liver and enhances insulin action in fat-fed rats in the absence of hepatomegaly. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 284(3), E531-540.
- Yokota, T., Matsuzaki, Y., Koyama, M., Hitomi, T., Kawanaka, M., Enoki-Konishi, M., et al. (2007). Sesamin, a lignan of sesame, down-regulates cyclin D1 protein expression in human tumor cells. *Cancer Sci*, 98(9), 1447-1453.
- Yuhanna, I. S., Zhu, Y., Cox, B. E., Hahner, L. D., Osborne-Lawrence, S., Lu, P., et al. (2001). High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med*, 7(7), 853-857.
- Zandbergen, F., & Plutzky, J. (2007). PPARalpha in atherosclerosis and inflammation. *Biochim Biophys Acta*, 1771(8), 972-982.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372(6505), 425-432.
- Zuckerman, S. H., Kauffman, R. F., & Evans, G. F. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha,gamma coagonist LY465608 inhibits macrophage activation and atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Lipids*, 37(5), 487-494.
- 久保利夫. (1944). 熱帶農林學概要. pp.681.
- 周輝政, 王崇安, 許淳森, & 吳文惠. (2002). 植物性雌激素與停經婦女保健. *中華民國營養學會雜誌*, 27(2), 56-66.
- 林慧如. (2003). 本土山藥塊莖水萃取物之脂質及腸道生理功能評估. 中山醫學大學營養學研究所碩士論文.
- 洪菱窕. (2006). 台農二號山藥對卵巢去除雌鼠骨質及腸道生理之影響. 中山醫學大學營養學研究所碩士論文.
- 陳永如. (2007). 數種植物雌激素食材萃物對 PPAR、脂肪細胞生成及雌激素活性特質鑑定. 國立台灣大學微生物與生化學研究所碩士論文.
- 曾悅和. (2002). 山藥在高血脂兔子上之抗氧化及抗粥狀動脈之影響. 中國醫藥學院醫學研究所碩士論文.

劉新裕，王昭月，徐原田，胡敏夫，楊宏仁，何琦琛.(1996). 山藥新品種-台農二號. 豐年, 46, 22-25.