

第一章 Introduction

一、動脈硬化致病機轉

動脈硬化 (atherosclerosis)，主要發生於腦部、冠狀動脈以及周邊動脈血管的疾病。其形成過程可以分為三階段，第一階段為脂肪斑塊 (fatty streak) 的形成，第二階段為纖維性粥樣斑塊 (fibroatheromatous plaque) 形成，第三階段為併發症性損傷 (complicated lesion) (Hegele, 1996; Stary, 1995)。動脈硬化損傷的致病機轉學說眾多，目前多項證據支持的假說是「內皮細胞反應損傷假說」 (Response to injury hypothesis)，此假說是由 Ross 和 Glomset 在1973年所提出，Ross 認為動脈硬化通常發生於動脈分支處(bifurcation)，始於內皮細胞功能損傷或是功能失調 (Ross, 1999)，許多因素會造成內皮細胞功能損傷，其中包括 (1) 家族史 (2) 血液動力學異常：如高血壓 (Wu *et al.*, 1990)、分支擾流 (turbulence) (Boer, 2000) (3) 輻射損傷、(4) 病毒感染 (*Chlamydia pneumoniae*) (NG, 1998) 以及(5) 化學性傷害：如糖尿病的高血糖之刺激(Lin *et al.*, 1993)、吸菸尼古丁刺激(Lin *et al.*, 1992)、高血脂、低密度脂蛋白增加(Leung, 1997)、老化產生的自由基(Laight *et al.*, 1998) 等，上列的因素都會造成血管內皮細胞功能失調，進而使血管

內皮細胞發生代償性反應，改變細胞內原有的恆定狀態(homeostasis)。功能正常的內皮細胞可作為細胞與分子間的障壁，不僅可以調節內皮細胞血管舒張(endothelium-dependent vasodilation)，並且可以有效抑制白血球粘著與遷移、血小板的聚積和血管平滑肌細胞增生；同時抑制血液凝固，促進纖維蛋白分解(fibrinolysis)以及參與活化免疫和發炎反應(Tousoulis, 2003)。

當內皮細胞受損時會在細胞表面分泌黏附蛋白(adhesive proteins)包括，血管細胞黏附分子(vascular cell adhesion molecule-1，VCAM-1)、細胞間黏附分子(intercellular adhesion molecule-1 and -2，ICAM-1,-2)以及血小板內皮細胞黏附分子(platelet-endothelial cell adhesion molecule，PECAM)等，這些蛋白質會與血液循環中的單核球細胞(monocyte)、T-淋巴球細胞(T-lymphocyte)上的接受器結合，又因內皮功能損傷，血管壁通透性增加，使大分子(例如 oxLDL)容易通過並堆積在血管壁(Steinberg, 1989)，進而導致巨噬細胞釋出趨化物質(chemokines)，包括，單核球趨化蛋白(monocyte chemoattractant protein-1，MCP-1)、間白素(interleukin-1；IL-1)、transforming growth factor- β (TGF- β)(Assoian,1987)以及腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor- α ，TNF- α)(Yla-Herttuala, 1991)，趨化物質會加速血液循環中的單核球及 T 淋巴球附著於血管壁(Joris, 1983)，並移行至內皮細

胞下空間(subendothelial space)，經過活化及分化過程轉化為巨噬細胞 (Quinn, 1987)，並會吞噬堆積在內皮細胞下空間的 oxLDL，而形成泡沫細胞，促使單核球附著、移行及轉化的作用 (Mazzone, 1983)。被活化的巨噬細胞、T 細胞及肥大細胞會釋放生長因子如血小板衍生之生長因子 (platelet derived growth factor, PDGF)與前發炎細胞激素(proinflammatory cytokine)，如 interleukin-1、TNF- α 這些物質會加速了病灶惡化，所以動脈硬化亦可以定義為一種慢性發炎過程。動脈硬化形成機轉如 Fig.1 所示：

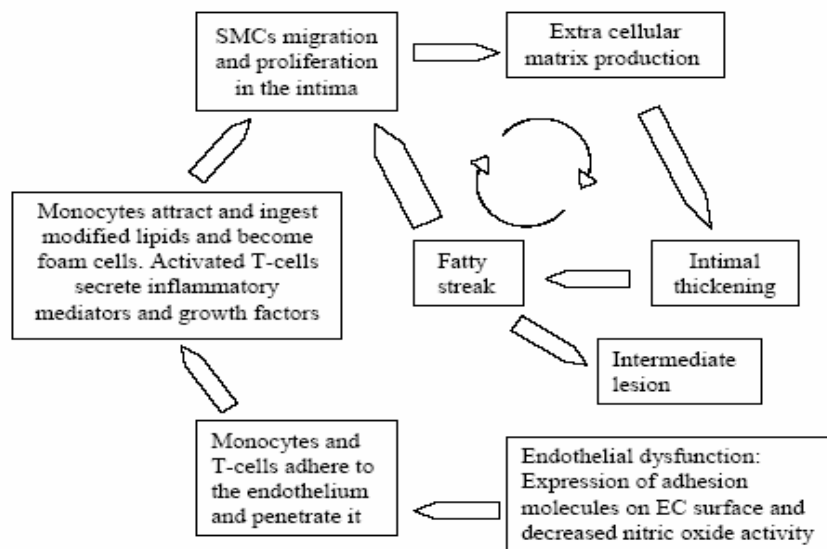


Fig.1 Inflammatory cells (monocytes, T-cells) and proinflammatory mediators (cytokines, interleukins) have a key role in the initial phase and progression of atheroma formation. Repeated cycles of intimal thickening lead from the first lesion of atherosclerosis, the fatty streak, to intermediate and advanced lesions. (E.A.et al., 2006)

二、動脈硬化與內皮細胞 (Endothelial cell) 之相關性

近年來發現許多心血管疾病的形成與血管壁的生化功能相關，血管壁上的生化功能主要是受到所組成的細胞群所控制，內皮細胞就是其中之一。內皮細胞位於血管壁的內層，並且參與許多 physiological processes 包括 materials exchange、coagulation 以及 wound healing (Folkman and Shing, 1992; Siess, 2002)，內皮細胞彼此間相互連結在血管壁內層上形成 monolayer，調控血管壁的滲透性 (Bisset, 1998)，且會釋放調節物質來調控血管的收縮及舒張，內皮細胞會釋放 NO 和 prostacyclin 等因子讓血管舒張，釋放 thromboxane、leukotrienes、endothelins 或細胞激素包括 TNF- α 、IL-1 等因子調控血管的收縮 (Selzmann et al., 2001)。

三、動脈硬化相關之發炎反應標幟 (inflammatory marker)

(一) 細胞黏附分子 (cellular adhesion molecules)

細胞黏附分子調節血液循環中的白血球附著於血管壁且遷移進入內皮細胞下空間，對於動脈硬化的形成扮演著關鍵的角色。黏附分子為細胞膜間的醣蛋白 (transmembrane glycoproteins)，調節許多細胞間之作用，其中包括細胞與細胞間 (cell-cell) 以及細胞與細胞基質間 (cell-extracellular matrix) 的交互作用。細胞黏附發生細胞膜的接受器鍵結於黏附分子相對的接受器上。此過程的調控是由黏附分子接受器

的數量與型態或是與其相對應的配位體 (ligands)所控制。

有三個黏附分子的家族與動脈硬化相關，分別是：selectins、integrins 與免疫球蛋白超家族 (immunoglobulin superfamily)。其功能分述如下：

A. Selectins

Selectins調節白血球黏附到發炎或是損傷的部位，主要藉由牽扯 (tethering)與滾動白血球至內皮細胞表面、血小板或是其他白血球 (Daniel et al., 1999)。Selectins可分為：endothelium的E-selectin、platelets的P-selectin與lymphocytes的L-selectin等三種，其命名方式是依其最先發現的細胞來命名。L-selectin主要位於白血球表面表現，而E-selectin與P-selectin會在已活化內皮細胞與及血小板上表現 (Chia,1998; Loscalzo, 1999)。

B. Integrins

Integrin superfamily 的黏附分子主要參與細胞與細胞外基質的黏附，使細胞得以附著而形成 integration。Integrin 分子還參與白血球與血管內皮細胞的黏附；integrin 由 α 與 β subunits 以非共價的連接組成 heterdimeric molecules (Chia, 1998)。主要功能為使細胞與細胞連接在一起，亦使細胞與其他周圍基質整合成一體 (Lander, 1992)。

C. Immunoglobulin superfamily

包含約90至100個氨基酸的immunoglobulin-like domains。廣泛分佈於淋巴球細胞、單核細胞、內皮細胞等多種細胞的表面(Chia, 1998)。包括有ICAM-1&2、VCAM-1&2以及PECAM-1等，都與動脈粥狀硬化相關(Loscalzo, 1999)。細胞表面黏附分子之生理病理角色整理如table 1所示：

Table 1 Adhesion molecules involved in atherosclerosis, their cellular function and their biological and pathological implications (Brevetti et al., 2006)

Adhesion molecules	Cellular function	Biological and pathological implications
Selectins	Leukocyte-endothelium interaction Leukocyte-platelet interaction	Leukocyte rolling and tethering
Integrins	Leukocyte-endothelium interaction Platelet-endothelium interaction	Firm adhesion, spreading, homing to inflamed tissue
Immunoglobulins	Leukocyte-leukocyte interaction Leukocyte-endothelium interaction	Firm adhesion, leukocyte extravasation, inflammatory and immune responses

(二) 細胞激素(cytokines)

細胞激素主要調節內皮細胞黏附分子的表現(Sluiser *et al.*, 1993)。單核球黏附與遷移進入血管壁是動脈硬化早期態學上的改變(Susan Preston-Martin, 1993)。細胞激素由血管壁上活化的巨噬細胞與淋巴球

細胞所分泌(Nilsson, 1993)，是一群醣蛋白分子(glycoproteins)調節細胞間訊息傳遞，可分為六個家族：(1) interleukins (2) tumor necrosis factor family (3) interferons (4) colony-stimulating factors (5) growth factors 與(6) chemokines (Henderson et al., 2000)。依各家族本質上所活化的反應定義可分為：(A)促發炎反應 (pro-inflammatory action)包括：TNF、介白素(IL-12、IL-18)以及 interferon-gamma (IFN- γ)。(B)抗發炎反應 (anti-inflammatory)：介白素 IL-4、IL-10、IL-13。(C)化學趨化反應 (chemoattraction：chemokines)：單核球趨化蛋白質 (monocyte chemoattractant protein-1，MCP-1)、趨化激素 (RANTES)、巨噬細胞發炎蛋白(macrophage inflammatory protein-1，MIP-1)、IL-8以及IL-16。(Bjørklid, 2003)。細胞激素主要由淋巴球細胞所分泌，同時會刺激體液與細胞免疫的反應(humoral and cellular immune responses)而促使巨噬細胞活化。目前已經發現有許多細胞激素與動脈硬化的斑塊形成相關，主要是因為前發炎反應與抗發炎反應調節失去平衡而造成內皮自我損傷機制持續進行(self-perpetuating mechanism) (Mallat, 2001)。與發炎反應相關之細胞激素分述如下：

(A) 介白素(interleukin)

Table 2. 促發炎反應及抗發炎反應相關介白素的分類(Bjørklid, 2003)

Interleukins	Major source	Major effects
Pro-inflammatory IL-1	Macrophages	1. Stimulation of T cells and antigen-presenting cells. 2. B-cell growth and antibody production. 3. Promotes hematopoiesis (blood cell formation).
IL-2	Activated T cells	Proliferation of activated T cells.
IL-6	Activated T cells	Synergistic effects with IL-1 or TNF-alpha.
IL-12	Activated T cells, B cells and monocytes	Promotes T _H 1 cells while suppressing T _H 2 functions
IL-18	Macrophages	Induces IFN production
Anti-inflammatory IL-4	T cells and mast cells	stimulation of activated <u>B-cell</u> proliferation
IL-10	Activated T cells, B cells and monocytes	Inhibits inflammatory and immune responses.

(B) TNF- α

TNF- α 在發炎反應、感染或是創傷會被刺激產生是由許多不同的細胞分泌包括：巨噬細胞、單核球、淋巴球與角質細胞 (keratinocytes) 以及纖維細胞 (fibroblasts)。TNF- α 為促發炎反應的細胞激素，主要調節細胞增殖、分化以及細胞凋亡 (Karin, 2001)。

四、Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)路徑與動脈硬化之相關性

生物體常藉由磷酸化與去磷酸化蛋白質分子來調控其活性，進而影響細胞內在的生理或對外在環境刺激經由訊息傳遞系統產生適當反應，這些磷酸化與去磷酸化生化反應需藉由蛋白質激酶 (protein kinase)與去磷酸酶 (protein phosphatases)催化，依不同功能的蛋白質，胺基酸被磷酸化與去磷酸化的位置也不同，主要有絲胺酸 (serine)、蘇胺酸(threonine)和酪胺酸(tyrosine)，MAPK在細胞外進入細胞核的訊息傳遞過程中扮演重要角色，主要表現serine-threonine kinases 調節細胞訊息傳遞，由於細胞接觸到外來刺激時，此類的 protein kinase 會被激活，造成細胞內蛋白質的磷酸化。MAPK的活化使細胞能對外界的刺激做出接收、放大及整合等反應，使細胞能適當的回應。(Karin, 2001)。其中主要有三種MAPK: p38家族、細胞外訊息調節(extracellular signal-regulated kinase, ERK) 家族以及c-Jun NH₂- terminal kinase (JNK) 家族，其分類如table 3所示。

Table3. Protein members of the different mitogen-activated protein (MAP) kinase groups (Leonidas, 2003)

Erk kinases	p38 kinases	JNK kinases	Other/unclassified
Erk1	p38 α	JNK1	Erk3
Erk2	p38 β	JNK2	Erk5
—	p38 γ	JNK3	Erk7
—	p38 δ	—	Erk8

MAPK會調節胚胎形成(embryogenesis)、細胞基因轉錄(gene transcription)、細胞分化(cell differentiation)、增殖(cell proliferation)以及細胞凋亡(cell apoptosis)。其調控機制如圖2所示。

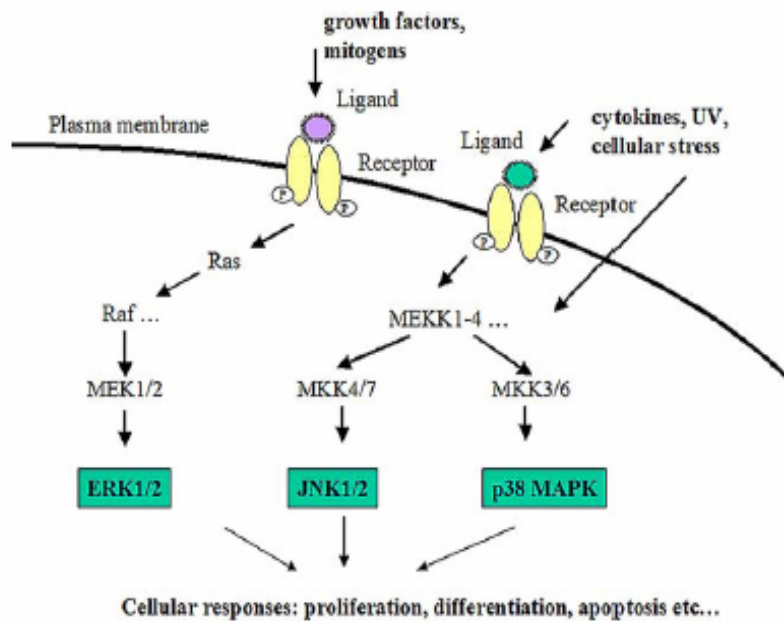


Fig 2 Mitogen-activated protein kinase signal transduction (Kyriakis, 2001)

ERK 家族具有兩個異構體，ERK1(分子量44kDa)與ERK2(分子量42kDa)，會被許多的細胞激素與生長因子所活化並調節 mitogenic 與 antiapoptotic 訊號傳遞作用(Kumar, 1998)。當ERK受到活化時，會促進轉錄因子(NF- κ B)的表現(Karin, 1995)。

p38家族是分子量為38KDa的蛋白，具有四種異構體：p38 α 、p38 β 、p38 γ 、p38 δ ，受到壓力刺激會被活化，同時亦會被許多細胞激素 receptors 的配位體(ligands)所活化。受到活化的p38 kinases具有調節

細胞凋亡與抑制cell-cycle功能，誘導細胞分化(cell differentiation)，產生細胞激素與發炎反應，內皮細胞受損時，p38家族與細胞表面黏附分子ICAM-1的產生有關 (Tamura, 1998)。

JNK家族具有三種異構體 (heterodimer)，JNK1 (分子量46kDa)、JNK2 (分子量55kDa)與JNK3 (分子量57kDa) (Geng, 1996)。當內皮細胞受到壓力或是生長因子刺激時會大量活化，同時調節細胞凋亡、產生細胞激素與cell-cycle進行。TNF- α 刺激內皮細胞時，會造成JNK的活化，而增加細胞黏附分子 (E-selectin、ICAM-1與VCAM-1)的表現 (Read, 1997)。

五、動脈硬化相關之轉錄因子(transcription factor)

NF- κ B 為訊息轉錄因子主要調節發炎與免疫反應(Eun-Kyoung Choi et al., 2006)。轉錄因子NF- κ B 的功能大約是50-75 kDa相同或結構類似的同源性蛋白質二聚體 (dimer)。NF- κ B是屬於Rel家族的一種蛋白質，根據其結構、功能可以分為兩類：第一類為p50 (NF- κ B 1) 和 p52 (NF- κ B 2)，分別由前驅物p105 和 p100 轉變形成；第二類包括：p65 (RelA)、Rel (c-Rel) 及Dif，此類不需經由前趨物的轉變。NF- κ B 在細胞未受到刺激前存在於細胞質中，主要是p50及p65所組成的雙聚合體，會與inhibitory protein kappa B (I- κ B) 結合在一起。當細胞受到刺激後，protein kinase C磷酸化 I- κ B，使 I- κ B 與 NF- κ B

分離，因而活化 NF- κ B，被活化的NF- κ B 進入細胞核內與相關基因的啟動子 (promoter)位置結合，促使基因表現並轉錄出相關基因的 mRNA 製造出蛋白質，這些蛋白質可能為細胞激素、化學趨化物質或是細胞黏附分子，因此 NF- κ B 被認為與發炎反應相關的訊息傳遞因子(Baldwin, 1996)。TNF- α 主要藉由活化轉錄因子NF- κ B調控細胞發炎與增殖反應 (Wu et al., 1994)。NF- κ B在動脈硬化損傷中的平滑肌、巨噬細胞中會被轉錄而增加ICAM-1的表現 (Brian et al., 2004; Rogler G, 1998)。其調控機制如Fig. 3所示：

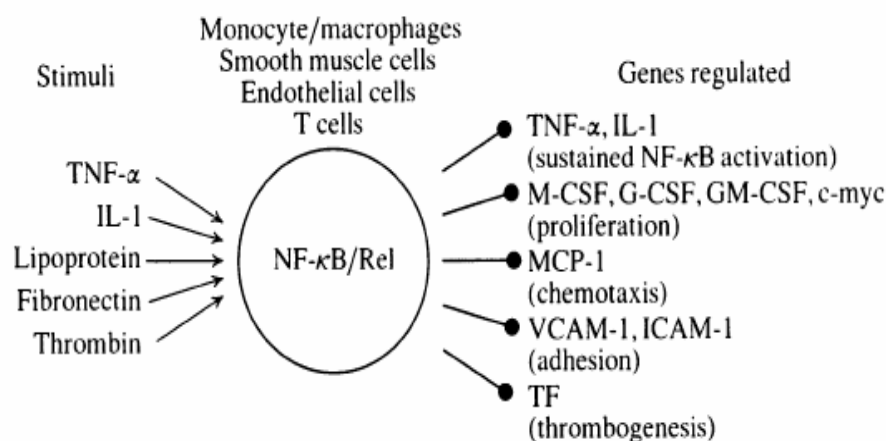


Fig. 3 Model for the role of NF- κ B/Rel transcription factors in the pathogenesis of atherosclerosis. (Brand, 1996)

六、 芝麻簡介

芝麻(sesame)為胡麻科植物種子脂麻的成熟種子，學名 *Sesamum indicum* L.。原產地在印度與埃及，根據考證約在漢武帝張騫通西域時引入油麻，因其來自胡人西域大宛，所以又稱為胡麻。現在芝麻主要分佈於非洲、西亞、中國等地，台灣栽培則是集中於台南與嘉義兩縣。

芝麻為一年生草本植物，高度約為 2-4 尺，蒴果是芝麻成長的小室外殼，每一個蒴果內約有 70-100 顆芝麻籽，其品種可依顏色大致分為黑芝麻、赤麻與白芝麻三種。長久以來被東方民族視為保健食品來增加營養及預防老化(清水昌, 2001)，其中更以黑芝麻藥用評價更高。最早記載於『神農本草經』：「胡麻，味甘平。主傷中虛羸。補五內。益氣力。長肌肉。填腦髓。久服輕身不老」。『本草綱目』記載芝麻對於「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」。芝麻素的生理功能分述如下：

(一) 芝麻 Lignans 之效用

芝麻中所含的不飽和脂肪酸高但卻被認為是最不易氧化的油脂，安定性最好的植物油，是因為芝麻的氧化誘導期較其他油脂高(Fukuda, 1990)。芝麻有良好抗氧化力一直被認為是因為含有豐富的維生素 E，但是維生素 E 有 α 、 β 、 γ 與 δ 四種型式，其中 α -tocopherol

的生理活性最強，而芝麻油中的總維生素 E 或是 α 與 γ -tocopherol 的含量皆遠低於大豆油與玉米油(Namiki 1995)。由此可知。芝麻中高氧化安定性不是受到其生育醇的含量的影響而是其他天然抗氧化成分的存在，主要即為 lignans 與其相關化合物。

lignans 是由兩個或是更多個 *P*-hydroxyphenyl propane 結構氧化耦合成的低分子量化合物，廣泛存在於植物界中。芝麻中的 lignans 包括 sesamin、sesamol、sesamol dimer、sesaminol、sesamolol 及 pinoresinol 等(Kamal-Eldin, 1995)。其中含量最高的是 sesamin 及 sesamol，分別占芝麻的 0.2-0.5%及 0.1-0.3%。sesamin 與 sesamol 的抗氧化活性不強，但是 sesamol 是 sesamol、sesaminol、sesamol dimer 與 sesamolol 的前驅物，此四種化合物具有酚類結構，研究證實具有良好的抗氧化活性(Fukuda, 1986)。Sesamol (3,4-methylenedioxyphenol)是芝麻中含量為一種多酚類，過去的研究中認為中 sesamol 是一種抗氧化劑，能夠降低氧化傷害(Kaur, 2000)，抑制發炎反應(Uchida, 1996)，達到保護器官之功能。其結構如 Fig 3. 所示。

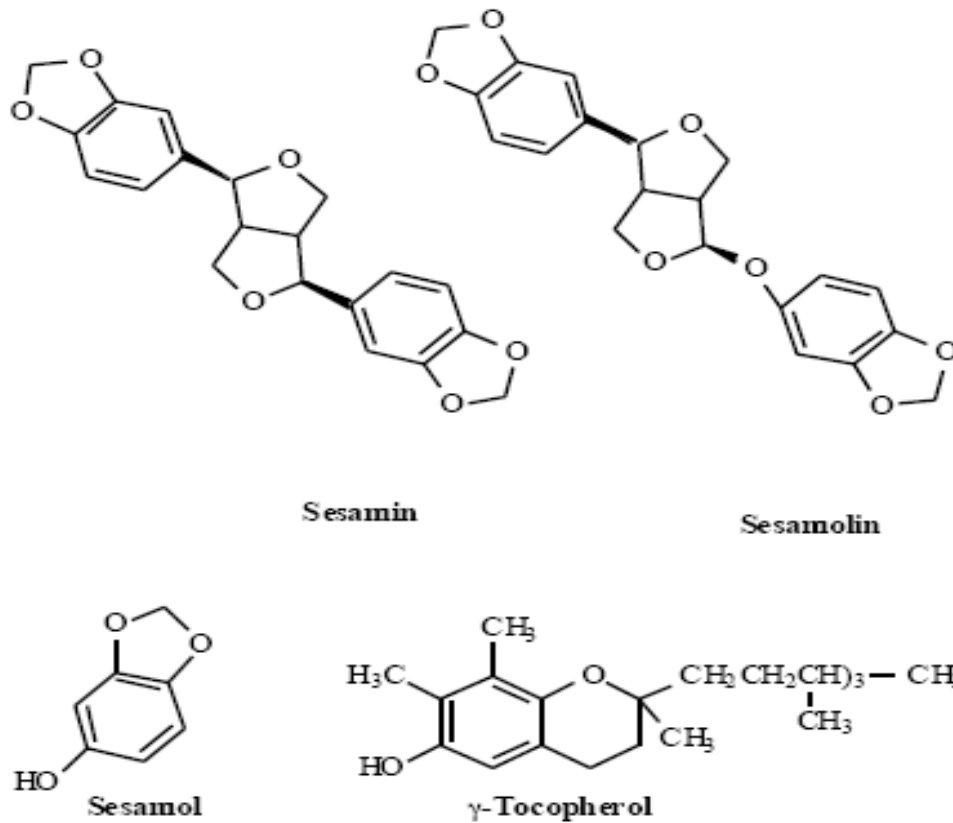


Fig.4 Chemical structure of a few bioactive compounds of sesame (Hou, 2005)

(二) Lignans 與抗發炎

免疫系統包含宿主防禦來預防物質感染、腫瘤細胞和環境刺激。發炎反應是早期的免疫反應。不正常的免疫反應可能會引起急性或慢性發炎疾病。n-6 PUFA如arachidonic acid (AA) 是prostaglandins與leukotrienes的前趨物，而prostaglandins和leukotrienes都是與發炎反應相關的重要物質(Tappia et al., 1994)。Sesamin 會抑制 $\Delta 5$ desaturase 活性，導致dihomo- γ -linolenic acid (DGLA)堆積，而取代AA 減少了proinflammatory 2-series prostaglandins (PGE2)的生成 (Watson et al., 1993)。

(三) Lignans與心血管之相關性

Sesamol 依dose-dependent處理內皮細胞24小時可誘發NO的釋出，藉由增加eNOS基因的表現轉譯 (transcription)與轉錄 (translation)增加NO的分泌 (Mazzio et al., 1998; Chen, 2005)。何等人(2004)研究指出 sesamin 可以顯著的抑制BV-2 microglia中LPS所刺激的 IL-6 mRNA 的表現，且sesamin與sesamolin 可以減少由 LPS-activated p38及NF- κ B 的活化(Jeng, 2005)。Sesamin會使內皮細胞NO分泌量增加與抑制內皮素ET-1的產生，具有抗高血壓的潛能(Lee et al., 2004)。

(四) Enterolactone (ENL)

sesamin在人體內會藉由腸內菌而轉變為mammalian lignans即為腸內酯(enterolactone)與腸內二醇(enterodiol) (Penalvo et al., 2005)。ENL為一種植物性雌激素，天然存在的形式是雙酚的結構且此構造具生理活性 (Adlercreutz, 1987)。ENL於腸道吸收，進入到血液中循環並於尿液中排出 (Axelson,1981)。人體血清中ENL 的含量變異很大，一般血清中的濃度大約為0-100 nM (Kilkkinen, 2001)。素食者通常會攝食大量的lignans如：flaxseed與芝麻，因此其血清中ENL的濃度約可以達 μ M的濃度 (Adlercreutz, 1993)。ENL可以預防荷爾蒙相關的癌症與心血管疾病。在動物模式中，以富含 lignans的飼料餵食動物可以減少心血管疾病的發生及抑制腫瘤的生長 (Thompson,

1996(a)(b))。另外，ENL也被證實具有調控雌激素接受體的活性(Welshons,1987) 某些實驗亦證實高劑量ENL在estrogen-dependent細胞株(MCF-7, T-47D)可以誘發微弱的雌激素效用(Mousavi,1992; Wang,1997; Sathyamoorthy,1994)。

六、 研究目的

依國民健康管理局94年統計十大死因，與動脈硬化相關的疾病腦血管病變、心臟疾病與高血壓分別居於十大死因的二、三及第十位。由此可知動脈硬化為國民健康最大的殺手，有鑑於健康意識抬頭，假使能夠藉由天然食物的攝取進而改善心血管相關疾病，對於國民健康促進是很大的福祉。本論文研究模式為研究芝麻素對於腫瘤壞死因子處理人類主動脈內皮細胞(Human aortic endothelial cells, HAEC)表現細胞黏附分子的影響及其相關機轉，以期瞭解芝麻素是否可以延緩發炎反應，進而改善動脈硬化之形成。