

國立臺灣師範大學人類發展與家庭學系
碩士論文

數種植物性雌激素對動脈粥狀硬化
相關因子之影響

The Effects of Several Phytoestrogens
on Atherosclerosis Related Factors

指導教授：吳文惠 博士 (Wen-Huey Wu, Ph.D.)

共同指導：蔡帛蓉 博士 (Po-Jung Tsai, Ph.D.)

研究生：沈 靈 (Ling Shen)

中華民國九十七年七月

謝 誌

兩年的研究生生活就此劃下句點，即將揮別充滿回憶的實驗室，心中充滿了許多不捨與感謝。首先感謝恩師 吳文惠老師，給完全沒實驗經驗的我一個機會，能進到實驗室學習，因為有您細心的批改與指點，這本論文才得以完成。感謝恩師 蔡帛蓉老師，因為您溫柔的包容與提攜，指引我明確的方向，並給予我衝到終點的勇氣與能量。並且感謝台大呂紹俊老師對論文的指教以及細胞的供應，以及台大黃青真老師，給予我更多方向去思考碰到的問題與研究結果。

感謝常常被我叨擾的台大微生所永瀚學長，以及台大解剖所淑惠學姊的指教。感謝嘉玲學姊、湘儒學姊的陪伴與指導；感謝同窗好友秋華，亦師亦友的你總是給我很多寶貴的建議，很高興我們能一起同進退、共患難；感謝天真活潑又可愛的學妹靜玫與妙容，總是當我們的啦啦隊並且不辭辛勞地跑腿、分擔雜務。感謝細心的學妹惟蒂，在我忙不過來的時候適時地伸出援手。感謝于婷、佳穎、佩郁、仲潔，因為你們的加入使實驗室充滿歡笑。感謝血牛們（雅萍、短短、小忻、許富發、立群、靜玫、蔡老師等人）的熱血贊助，論文能完成你們功不可沒。

最後，感謝我的爸爸、媽媽跟妹妹，一直溫暖地陪伴並鼓勵我走完全程。感謝立群，在我碰到挫折的時候，總會給我勇氣與信心，且包容我面對失敗時的壞脾氣；沒有你們，我可能無法堅持到最後一秒。感謝彥霖、怡婷、漪薇、儷軒跟嘉美，你們的關心與體諒也是支持我完成學業很大的動力。

誠摯地感謝所有曾經幫助我、鼓勵我的人，能走到今天實屬不易。這兩年的點點滴滴，我都會牢記在心，祝福大家平安順心。

中文摘要

動脈粥狀硬化是很複雜的血管病變，好發於冠狀動脈。從早期血管腔的內皮層下方出現脂肪條堆積，到出現動脈硬化斑塊等複雜病灶過程需數十年，導致心血管疾病的發生。

許多臨床研究指出大豆異黃酮對心血管具有保護作用，且可能與雌激素活性有關。本研究探討多種含植物性雌激素活性食材之萃物（苜蓿芽、山藥乙酸乙酯萃物，茉莉、菊花甲醇萃物）或純化合物（enterolactone, sesamin, genistein）是否能抑制：(1) 已分化的 THP-1 細胞在氧化型低密度脂蛋白刺激下，促發炎介質（IL-1 β 、TNF- α 、MCP-1）與基質金屬蛋白酶 MMP-9 的 mRNA 表現及蛋白質分泌量 (2) 已分化的 THP-1 細胞在氧化型低密度脂蛋白刺激下，攝入膽固醇的程度以及其 CD36 與 ABCA1 mRNA 表現量。(3) 內皮細胞在氧化型低密度脂蛋白刺激後，與 THP-1 細胞黏附的程度。

實驗設計：(1) 將 THP-1 細胞以 PMA 誘導細胞完全分化後，加入食材萃物或純化合物，先培養兩小時後，再給予氧化型低密度脂蛋白處理細胞共同培養 24 或 48 小時，收集上清液以 ELISA 分析 IL-1 β 、TNF- α 、MCP-1 與 MMP-9 的含量，並且經過共同培養 16 或 48 小時，收集細胞以分析 IL-1 β 、TNF- α 及 MMP-9 之 mRNA 表現。(2) 將已分化 THP-1 細胞加入食材萃物或純化合物，先培養兩小時後，再給予氧化型低密度脂蛋白處理細胞共同培養 16 或 48 小時，收集細胞以分析其總膽固醇含量及 CD36 與 ABCA1 之 mRNA 表現。(3) 將內皮細胞 (HAECs) 加入各種食材萃物或化學物與氧化型低密度脂蛋白共同處理 24 小時，再加入已染有螢光的 THP-1 細胞共同培養後，分析細胞黏附的程度。

結果發現：(1)所有測試物皆顯著下降 IL-1 β 的濃度；除了 enterolactone 外，所有測試物皆顯著下降 TNF- α 濃度；enterolactone, sesamin, genistein 及苜蓿芽乙酸乙酯萃物顯著下降 MCP-1 濃度；enterolactone, genistein, 苜蓿芽乙酸乙酯萃物及山藥乙酸乙酯萃物能顯著下降 MMP-9 濃度與活性。(2) enterolactone、sesamin、茉莉甲醇萃

物和菊花甲醇萃物能顯著下降細胞內總膽固醇濃度，且茉莉和菊花甲醇萃物能顯著下降 CD36 mRNA 表現。(3)所有測試物皆可顯著降低內皮細胞與單核球 THP-1 黏附的程度，其中 sesamin、苜蓿芽乙酸乙酯萃物及菊花甲醇萃物還能顯著下降 MCP-1 濃度。

根據以上結果推測，茉莉與菊花甲醇萃物可能經由抑制 CD36 表現，降低巨噬細胞內總膽固醇量，而具有抑制泡沫細胞生成之潛力。所有測試物除了 enterolactone 外，皆可顯著下降 IL-1 β 及 TNF- α 濃度，可能具抗發炎之效用。Enterolactone、genistein 及苜蓿芽乙酸乙酯萃物皆能顯著抑制 MCP-1 與 MMP-9 濃度及 MMP-9 活性，推測他們可能具有減少單核球聚集、下降單核球與內皮細胞黏附的程度、減少平滑肌細胞移行，及減緩斑塊破裂的可能潛力。

總結以上發現，enterolactone、genistein、山藥乙酸乙酯萃物與苜蓿芽乙酸乙酯萃物皆可能經由抑制初期的細胞黏附，抑制促發炎介質分泌，並增加後期的斑塊穩定性，具有減緩動脈粥狀硬化之潛力。

關鍵字：動脈粥狀硬化、植物性雌激素、巨噬細胞、促發炎介質、內皮細胞

Abstract

Atherosclerosis is now considered to be an inflammatory disease of the blood vessel wall, characterized in early stages by endothelial dysfunction, recruitment and activation of monocyte/macrophages, and dedifferentiation and migration of vascular smooth muscle cells (VSMCs) to later form the bulk of the atherosclerotic plaque. Many clinical studies indicate that dietary soy isoflavones exhibit the atheroprotective effects through their estrogen activity. The aim of this study was to investigate the effects of botanical extracts (ethyl ester extracts of yam and alfalfa & methanolic extracts of jasmine and chrysanthemum) and chemicals (enterolactone, sesamin and genistein), which possess potential estrogen activity, on (1) cellular cholesterol accumulation and gene expression of CD36 and ABCA1, (2) the concentration and gene expression of proinflammatory mediators (IL-1 β , TNF- α , and MCP-1) and MMP-9 in oxidized LDL (oxLDL)-stimulated THP-1 macrophages; (3) the adhesion of monocytic THP-1 cells to oxLDL-treated human aorta endothelial cells (HAECs).

THP-1 derived macrophages activated by PMA were treated with oxLDL for 2 days to induce lipid uptake by macrophages and establish a foam cell-like phenotype. The cells were co-incubated with the botanical extracts and chemicals for 24~48 hr. The concentrations of IL-1 β , TNF- α , MCP-1 and MMP-9 in cultural supernatants were determined by ELISA method. To evaluate the monocyte adhesion to endothelial cells, HAECs were pretreated with the test compounds and oxLDL for 24 hours and then co-cultured with fluorescence-labeled monocytic THP-1 cells. The monocyte adhesion was determined by measuring the fluorescent intensity.

These results showed that enterolactone, sesamin, jasmine and chrysanthemum extracts significantly decreased the cellular cholesterol content. Enterolactone, genistein, jasmine and chrysanthemum extracts significantly inhibited the expression of CD36 after THP-1 macrophages incubated with oxLDL for 16hrs. All of the chemicals significantly inhibited the expression of CD36 after THP-1 macrophages incubated with oxLDL for 48hrs.

All of the test compounds significantly inhibited the secretion of IL-1 β . Sesamin, genistein and the extracts of yam, alfalfa, jasmine and chrysanthemum significantly decreased the concentration of TNF- α . All of the chemicals and alfalfa extract inhibited the secretion of MCP-1. Yam and alfalfa extracts, enterolactone and genistein decreased the production and the activity of MMP-9. All of the test compounds significantly inhibited the adhesion of THP-1 monocytes to HAECs.

These results suggest that enterolactone, sesamin, jasmine and chrysanthemum extracts may reduce cellular cholesterol via the inhibition of CD36 expression. All of the chemicals and extracts may prevent atherogenesis, probably via its anti-inflammatory function by reducing the production of pro-inflammatory cytokines and the adhesiveness between monocytes and endothelial cells.

Key words: Atherosclerosis, phytoestrogens, macrophage, endothelial cells, proinflammatory mediators

目錄

圖目錄 VIII

第一章 緒論	1
一、研究動機.....	1
二、研究目的.....	2
第二章 文獻探討	3
第一節 動脈粥狀硬化致病機轉	3
一、動脈粥狀硬化的開始：低密度脂蛋白的氧化.....	4
二、動脈粥狀硬化早期：單核球的聚集與分化.....	5
三、膽固醇堆積及泡沫細胞形成.....	6
四、脂肪條形成及斑塊穩定.....	7
第二節 促發炎因子與動脈粥狀硬化之相關性	9
一、單核球趨化蛋白質（Monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1）	9
二、TNF- α （Tumor necrotic factor alpha）	9
三、IL-1 β	10
四、MMP-9.....	11
第三節 巨噬細胞膽固醇傳送與動脈粥狀硬化	12
一、CD36.....	12
二、ABC A1.....	14
第四節 植物性雌激素	16
一、雌激素與動脈粥狀硬化.....	16
二、植物性雌激素種類.....	17
三、植物性雌激素與動脈粥狀硬化.....	18
1. 異黃酮.....	19
2. 山藥.....	20
3. 芝麻.....	21
4. 苜蓿.....	22
5. 茉莉.....	22
6. 菊花.....	23
第三章 材料與方法	24
第一節 樣品製備與取得.....	24
第二節 研究材料.....	25
第三節 實驗設計.....	27
一、實驗一.....	27
二、實驗二.....	27
第四節 實驗方法.....	28
一、低密度脂蛋白的分離.....	28

二、	低密度脂蛋白的氧化.....	28
三、	Conjugate-Diene 測定	28
四、	細胞存活率分析 (MTT assay)	29
五、	細胞內膽固醇濃度測定.....	29
六、	IL-1 β 、TNF α 、MCP-1 及 MMP-9 蛋白質量之測定	30
七、	Oil-Red O Staining	31
八、	內皮細胞/單核球黏附試驗	32
九、	CD36 與 ABC A1 mRNA 表現量測定.....	32
十、	MMP-9 活性測定 (Gelatin Zymography)	35
第五節	統計分析.....	36
第四章	結 果	37
第一節	樣品對細胞存活之影響.....	37
第二節	測試物對已分化 THP-1 細胞膽固醇堆積之影響.....	40
第三節	植物性雌激素測試物質對 THP-1 macrophages 表現促發炎因子之影響 51	
第四節	含植物性雌激素測試物對 THP-1 細胞 MMP-9 活性之影響	64
第五節	含植物性雌激素測試物對人類主動脈內皮細胞 HAEC 細胞與 THP-1 細胞黏附之影響.....	66
第六節	含植物性雌激素測試物對 HAEC 細胞 MCP-1 分泌量之影響.....	70
第五章	討論與結論	72
一、	對巨噬細胞膽固醇、脂質堆積之影響.....	72
二、	含植物性雌激素活性測試物之抗發炎效果.....	75
三、	對內皮細胞與單核球黏附之影響.....	78
四、	結論.....	79
參考文獻		82

圖目錄

圖 4-1	不同處理對氧化型低密度脂蛋白刺激 THP-1 細胞之細胞存活率	38
圖 4-2	不同處理對 HAEC 之細胞存活率影響	39
圖 4-3	不同 oxLDL 濃度之處理對 THP-1 細胞內之總膽固醇/蛋白質比例之影響	41
圖 4-4	含植物性雌激素測試物對 oxLDL 處理細胞後之總膽固醇/蛋白質比例之影響	43
圖 4-5	含植物性雌激素測試物經 oxLDL 處理對泡沫細胞形成之影響	45
圖 4-6	含植物性雌激素測試物對 oxLDL 處理後對泡沫細胞生成之影響	46
圖 4-7	含植物性雌激素測試物對氧化型低密度脂蛋白刺激細胞後 CD36 mRNA 表現之影響	48
圖 4-8	含植物性雌激素測試物對氧化型低密度脂蛋白刺激細胞後 ABCA1 mRNA 表現之影響	50
圖 4-9	含植物性雌激素測試物對氧化型低密度脂蛋白刺激 THP-1 細胞生成 IL-1 β 之影響	52
圖 4-10	含植物性雌激素測試物對氧化型低密度脂蛋白刺激 THP-1 細胞生成 TNF- α 之影響	54
圖 4-11	含植物性雌激素測試物對 THP-1 細胞生成 MCP-1 之影響	56
圖 4-12	含植物性雌激素測試物對 THP-1 細胞生成 MMP-9 之影響	58
圖 4-13	含植物性雌激素測試物對氧化型低密度脂蛋白刺激細胞後 IL-1 β mRNA 表現之影響	59
圖 4-14	含植物性雌激素測試物對氧化型低密度脂蛋白刺激細胞後 TNF- α mRNA 表現之影響	61
圖 4-15	含植物性雌激素測試物對氧化型低密度脂蛋白刺激細胞後 MMP-9 mRNA 表現之影響 ...	63
圖 4-16	含植物性雌激素測試物對氧化型低密度脂蛋白刺激細胞後 MMP-9 活性之影響	65
圖 4-17	含植物性雌激素食材萃物對 HAEC 與 monocytic THP-1 黏附之影響	69
圖 4-18	含植物性雌激素食材萃物對 HAEC 分泌 MCP-1 之影響	71

第一章 緒論

一、研究動機

依照行政院衛生署民國九十五年的十大死因統計，腦血管疾病及心臟疾病分別位居國人死因的第二名及第三名，佔死亡比例 9.1% 及 9.3%（行政院衛生署，2006），且十年來不論男性或女性皆居高不下。動脈粥狀硬化是很複雜的血管病變，好發於冠狀動脈。從早期血管腔的內皮層下方出現脂肪條塊堆積，到出現動脈硬化斑塊等複雜病灶，過程需數十年，而導致心血管疾病的發生。

在動脈粥狀硬化初期，血管內皮細胞功能會逐漸變異而損傷。因為功能變異的內皮細胞無法有效釋出一氧化氮，而無法保持平滑肌細胞的舒張，這個過程中會釋出一些發炎相關因子，如單核球趨化蛋白-1（MCP-1）與一系列的細胞黏附因子等，導致循行於血液中的單核球細胞被誘引、吸附於內皮細胞上，而滲入內皮層活化成巨噬細胞。若能抑制血管內皮細胞與巨噬細胞之黏附情形，是抑制動脈粥狀硬化形成很重要的步驟。

被活化的巨噬細胞可表現出清除者受器（Scavenge receptor），攝入已遭氧化的低密度脂蛋白，而轉變成堆積許多膽固醇的泡沫細胞。堆積和死亡的泡沫細胞，就是早期動脈粥狀硬化階段脂肪條的由來。在血管內皮層下方的平滑肌細胞，也因面臨源自內皮細胞、巨噬細胞等釋出的生長因子、細胞激素作用，包括 TNF- α 、IL-1 β 等，而導致移位並增生，動脈硬化斑塊於是漸漸形成。最後發炎反應會引起金屬蛋白酵素（MMP）之分泌，溶解結締組織引起纖維帽破裂，血栓形成而引起栓塞。

近年來許多臨床試驗表示，抑制動脈粥狀硬化早期過程中的關鍵步驟，例如用降低低密度脂蛋白膽固醇濃度的藥物，不但可使動脈粥狀硬化的進展趨緩或退減，也可使已形成的斑塊較安定，因而較不易崩解剝離。目前科學證據支持代謝症候群與動脈粥狀硬化的進展是可逆的，若能從日常生活的食材中，找出有益於預防兩者之食物，則可增進國人的健康，降低腦血管及心臟疾病之罹患率。

Isoflavones, lignans, coumestane 為目前所知三大類植物性雌激素。植物雌激

素之保健效益最早係由跨國族群之飲食與慢性疾病之流行病學比較研究所注意到。這些研究推測每日由日常飲食攝入高量植物雌激素之亞洲人，可能因而具有較低之心血管疾病及荷爾蒙相關癌症罹患率（乳癌及攝護腺癌等）。近年來許多細胞、分子生物及動物實驗的結果指出，植物性雌激素可能具有改善血脂、促進血管內皮細胞功能及抗發炎之功效。

故本篇研究目的在於探討含有植物性雌激素之食材，如芝麻 lignans、苜蓿芽及山藥乙酸乙酯萃物等物，是否能使細胞在受到氧化型低密度脂蛋白的刺激時，能對細胞進行保護作用。

二、研究目的

本研究欲探討含植物性雌激素活性之純物質及萃物，包含有 sesamin、enterolactone、genistein、苜蓿乙酸乙酯萃物、山藥乙酸乙酯萃物、菊花甲醇萃物及茉莉甲醇萃物等，對氧化修飾的低密度脂蛋白刺激 PMA-differentiated THP-1 cells，其細胞內膽固醇堆積以及發炎反應之影響；並探究對人類主動脈內皮細胞與單核球形式 THP-1 細胞黏附情形，是否因測試物的介入而改變，以了解其對抗動脈粥狀硬化之作用。

第二章 文獻探討

第一節 動脈粥狀硬化致病機轉

動脈粥狀硬化是構成多種重要動脈問題的一種致病情況，包含冠狀動脈疾病、中風及周邊動脈疾病，是心血管功能不健全及死亡的主因。在近二十年來，越來越多的研究者重視以發炎 (inflammation) 及免疫反應促使動脈粥狀硬化生成的概念 (Libby, 2002)。

在 1991 年 Ross 等學者提出了細胞受損反應假說 (Response to injury Hypothesis)，認為動脈粥狀硬化是一種慢性發炎的致病過程，推測動脈粥狀硬化損傷的形成是動脈壁上內皮細胞受損的結果。

受損的內皮細胞在細胞表面分泌黏著分子，會與血液循環中的白血球上的特殊接受器結合，進行黏附與滾動。此時內皮細胞通透性增加，使大分子容易通過(如 LDL)，同時使白血球移行至內皮細胞下空間，活化而形成巨噬細胞(Glass & Witztum, 2001)。

單核球 (monocyte) / 巨噬細胞 (macrophage) 在動脈粥狀硬化的起始及發展過程中，也扮演很重要的角色。單核球進入動脈壁後的聚集 (recruitment) 是動脈粥狀硬化最初發生的事件之一。在血管內膜 (intima) 中，單核球因受到刺激變成巨噬細胞，便成為動脈粥狀硬化生成時，發炎反應與先天免疫反應發生的重要媒介。巨噬細胞透過細胞激素 (cytokines)、自由基、蛋白質酵素、及補體 (complement) 調控局部的發炎反應 (Glass & Witztum, 2001)。

巨噬細胞因不斷攝入氧化型低密度脂蛋白 (oxLDL) 形成脂肪小滴 (lipid droplets)，進而擴張成泡沫細胞 (foam cells)，泡沫細胞的聚集形成了脂肪條 (fatty streaks)，是最早可見的損傷，與平滑肌細胞造成了血管內膜增厚 (Tedgui & Mallat, 2006)。初期的動脈粥瘤使血小板分泌 platelet-derived growth factor (PDGF)，促進平滑肌細胞的增生反應。平滑肌細胞增生後也會攝入修飾過的脂蛋白形成泡沫細

胞 (foam cells)，並分泌細胞外基質蛋白質而形成纖維帽 (fibrous cap)，促進斑塊形成，目前認為這是造成動脈阻塞的最終原因 (Ross, 1999)。以上觀點普遍地被接受，且由實驗及臨床觀察所證實 (Tedgui & Mallat, 2006)。

而斑塊破裂及血栓 (thrombosis) 最終會造成心肌梗塞及中風等急性臨床併發症的發生 (Glass & Witztum, 2001; Linton, 2003)。

一、動脈粥狀硬化的開始：低密度脂蛋白的氧化

目前的觀點覺得堆積在動脈壁的氧化型脂蛋白，會啟動一系列促發炎反應，使巨噬細胞聚集進入血管內膜，並且吞噬 oxLDL 形成泡沫細胞，而堆積的泡沫細胞最後造成脂肪條的形成 (Glass & Witztum, 2001)。

血液中升高的低密度脂蛋白膽固醇 (LDL-C) 是心血管疾病的重要危險因子；然而，卻有不少心血管疾病患者的 LDL-C 濃度介於正常範圍 (Genest et al., 1992)。LDL 粒子的大小及密度，與 LDL-C 濃度無關，但是會顯著影響動脈粥狀硬化的發生率；尤其是密度及體積較小的 LDL (small dense LDL) 與心血管疾病風險增加 3~6 倍有關 (Austin et al., 1988)。

LDL 在血漿中，會受到保護而不易被氧化。當它進入到血管內膜後，才容易受到酵素或非酵素性的修飾。oxLDL 依照其氧化程度不同，可以分成低程度氧化修飾的低密度脂蛋白 (mmLDL) 及高程度氧化修飾的低密度脂蛋白 (extensive oxLDL)。mmLDL 仍然可被 LDL 接受器辨認；但 extensive oxLDL 的 apoB 變成碎片，lysine 殘基會被脂質過氧化物進行共價修飾，而使得這些 oxLDL 顆粒不會與 LDL 接受器結合，而是與多種位於巨噬細胞及平滑肌細胞上表現的清除者受器 (scavenge receptors) 結合 (Glass & Witztum, 2001)。氧化修飾後的 LDL (oxLDL) 因此被巨噬細胞攝入而堆積於細胞內，以膽固醇酯的形式儲存於細胞質或溶小體 (lysosomes) 中，促進泡沫細胞的形成且加強對內皮細胞的毒性 (Yancey & Jerome, 2001)。

二、動脈粥狀硬化早期：單核球的聚集與分化

內皮細胞的滲透性增加，可能導致低密度脂蛋白堆積於血管內膜中 (Ross, 1993; Skalen, 2002)。在正常情況下，血管內皮細胞，也就是與血流接觸動脈管最內層，會阻擋中性白血球 (leukocyte) 的黏附 (adhesion)。單核球 (monocyte) 會被吸引到內皮細胞下方，以移除有害的物質，例如：修飾型脂蛋白 (modified lipoprotein)。受到損傷或壓力的內皮細胞會刺激白血球化學趨化分子 (leukocyte chemoattractant molecules) 的產生，導致單核球與內皮細胞間 integrin-dependent 的穩固黏附且向下滲入內皮細胞下方，並移行至血管內膜 (Bobryshev, 2006; Ross, 1993)，如圖 1 所示。

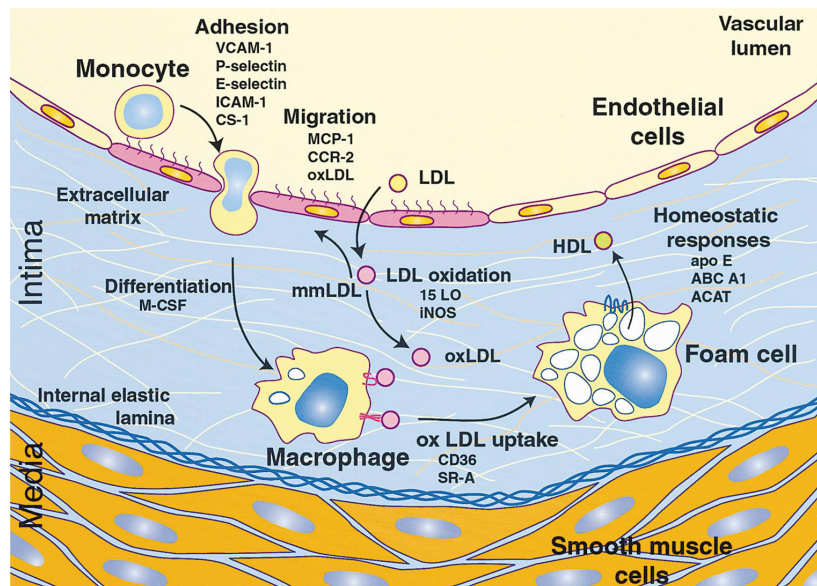


圖 1. 單核球的聚集與分化 (Glass & Witztum, 2001)

單核球與內皮細胞的黏附以及其進入動脈壁內的移行，是受到內皮細胞表面的細胞黏著分子所促進。而巨噬細胞沿著內皮細胞的滾動與黏著，是藉由 selectin 家族所媒介，其中包含有 L-selectin、E-selectin 及 P-selectin；L-selectin 表現在單核球表面，E-selectin 及 P-selectin 則是表現於活化的內皮細胞表面 (Blankenberg, 2003)。而 MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1) 則為單核球指引出行進的方向。

單核球一旦進入血管內膜，便會在細胞激素 macrophage colony-stimulating factor (MCS-F) 的影響下轉變成巨噬細胞 (Hansson, 2001)。在同時缺乏 apoE 及

MCS-F 的小鼠身上，就算餵食高膽固醇含量的飼料，血管也沒有發生動脈粥狀硬化的情形，因而提出了巨噬細胞分化對動脈粥狀硬化發展很重要的證據 (Smith, 1995)。

三、膽固醇堆積及泡沫細胞形成

巨噬細胞為斑塊中主要細胞激素來源，會分泌多種細胞激素 (cytokines)。可將其分泌的細胞激素分成兩類，分別為促發炎細胞激素，如：TNF α 、IL-1、IL-6、IL-12 等，及抗發炎細胞激素，如 IL-10 及 TGF β 。然而，巨噬細胞也會分泌多種趨化細胞激素 (chemokines)，包含 MCP-1 及 IL-8 等 (Tedgui & Mallat, 2006)。若持續大量促發炎細胞激素及趨化細胞激素，會增強內皮細胞損傷及黏附因子的大量表現，而吸引更多單核球進入血管內轉變成巨噬細胞。也會刺激基質金屬蛋白酶 (MMP) 表現，促使平滑肌細胞移行而促進纖維帽的形成 (Glass & Witztum, 2001; Tedgui & Mallat, 2006)，如圖 2 所示。

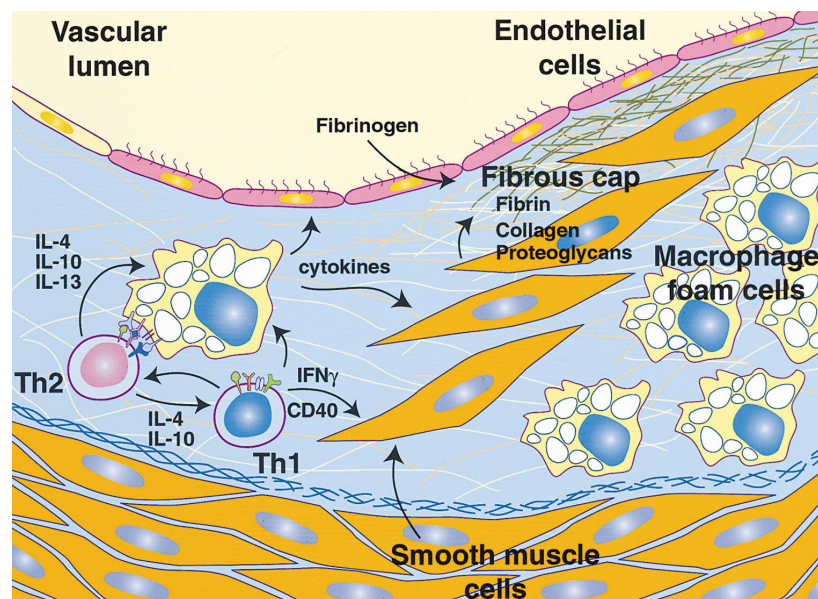


圖 2. 巨噬細胞表現細胞激素與纖維帽的形成 (Glass & Witztum, 2001)

巨噬細胞透過清除者受器 (scavenger receptor)，如 SR-A、CD36 及 CD68 等，對修飾過的脂蛋白進行攝入，導致其內塞滿了脂質，而形成了泡沫細胞 (foam cell)。脂質的吞噬使細胞顯著肥大，最終可以變成原本單核球直徑的十倍之多 (Daugherty et al., 2005)。

近年來許多證據顯示，PPAR γ 會高度表現於巨噬細胞內及損傷處的泡沫細胞中 (Tontonoz *et al.*, 1998)。並且發現，oxLDL 具有單獨活化 PPAR γ 的能力 (Nagy *et al.*, 1998)，因此直接影響其下游目標基因 CD36 表現大增，而增加對 oxLDL 之攝入 (Tontonoz *et al.*, 1998)。

細胞內的游離膽固醇具有毒性，會造成細胞凋亡 (Tabas, 2004)。因此，巨噬細胞對抗膽固醇毒性的第一步就是把膽固醇酯化：藉由 coenzyme A cholesterol O-acyltransferase-1 (ACAT-1)轉換成膽固醇酯 (Chang *et al.*, 2001)。膽固醇酯在巨噬細胞內的堆積，是形成泡沫細胞的關鍵步驟 (Hirakata, *et al.*, 2004)。

巨噬細胞調節膽固醇流出的機制，對於膽固醇恆定非常重要。巨噬細胞處理多餘膽固醇的兩種可能機制為：以酵素修飾成溶解度較高的型態，和透過細胞膜輸送器調節。然而，較主要的機制可能是後者，由 ABCA1 及 ABCG1 與細胞外的主要接受者 HDL 共同合作，以促進膽固醇排出 (Tall, *et al.*, 2000; Venkateswaran *et al.*, 2000)。

四、脂肪條形成及斑塊穩定

大量的泡沫細胞聚集堆積在動脈管壁上形成脂肪條 (fatty streak)，最後泡沫細胞會走向細胞凋亡或壞死。oxLDL內的氧化型固醇類 (oxysterols)，似乎也會促進泡沫細胞凋亡及壞死 (Colles, 1996)。當泡沫細胞死亡後，原本經吞噬而堆積於細胞內的膽固醇與脂質會流出，而細胞殘骸會形成壞死核 (necrotic core)。壞死核與細胞流出的膽固醇、脂質聚集而促使 gruel 的形成。Gruel 為一種糜粥狀的油脂聚合物，也是形成動脈粥狀硬化斑塊的主因。血管平滑肌細胞會合成細胞外基質蛋白 (extracellular matrix proteins)，促進纖維帽 (fibrous cap) 的形成，而將gruel覆蓋形成斑塊 (Glass & Witztum, 2001)，如圖3所示。

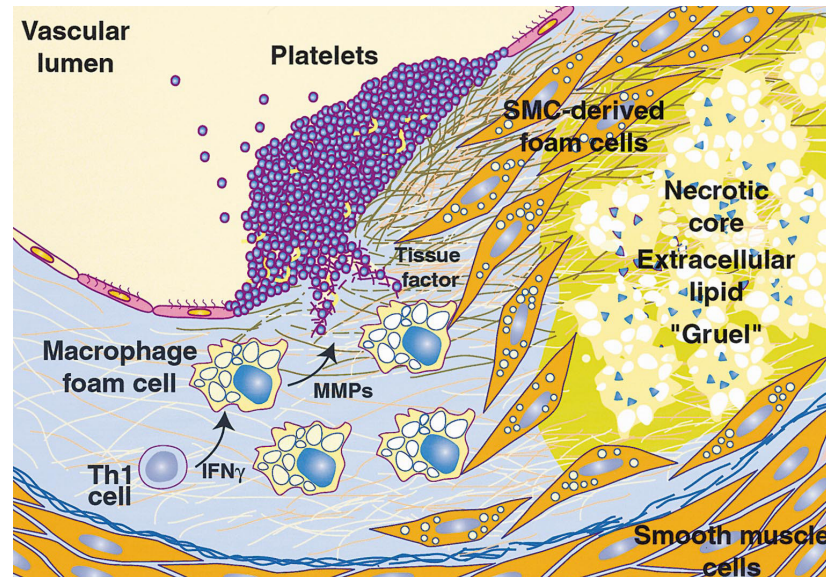


圖 3. 斑塊的形成 (Glass & Witztum, 2001)

嚴重的動脈損傷會導致缺血性心臟病的症狀，造成動脈腔縮減及急性心血管疾病。造成心肌梗塞及中風的原因，通常歸因於斑塊破裂及血栓。若斑塊的結構不穩定，會因斑塊的破裂使其內脂質與tissue factor 暴露而引起血小板的吸附聚集，加上反覆的破裂、凝血，會促使血塊增大而阻塞血管造成血栓 (Glass & Witztum, 2001)。急性心肌梗塞相關的斑塊破裂通常發生在斑塊的兩端 (shoulder region)，較容易發生的損傷情形有：1. 纖維帽較薄 2. 相對高濃度的、充滿脂肪的巨噬細胞堆積 3. 大的壞死核 (Davis, 1993)。

第二節 促發炎因子與動脈粥狀硬化之相關性

一、單核球趨化蛋白質 (Monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)

趨化細胞激素 (chemokines) 是一低分子量、具趨化性細胞激素的蛋白質家族，根據他們第一個 cysteine 殘基可分成四種。單核球趨化蛋白質 (Monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 為 CC chemokines 的成員，其對應的接受器為趨化細胞激素受器-2 (chemokine receptor 2, CCR2) (Linton, 2003)。

MCP-1 為一種會受到 oxLDL 及細胞激素刺激而釋放的化學激素，當白血球通透內皮細胞時，亦會刺激內皮細胞分泌 MCP-1，並吸引更多白血球聚集到損傷部位，指引其通行的方向。目前研究認為 MCP-1 與其他致動脈粥狀硬化危險因子有相關性，因此經常監控 MCP-1 作為發炎指標 (Deo *et al.*, 2004)。使用 fibrates 類藥物處理人類臍靜脈內皮細胞 (HUVECs) 後，可顯著減少由 C 反應蛋白 (C reactive protein, CRP) 誘導之 MCP-1 表現 (Pasceri, *et al.*, 2001)，以此研究結果顯示 MCP-1 會受 PPAR α 活化劑調控，可作為減少動脈粥狀硬化初期白血球聚集於內皮細胞之重要預防機制。

有研究發現，在同時有 MCP-1^{-/-}與低密度脂蛋白受器缺乏 (LDLR^{-/-}) 的小鼠或使用同時有 MCP-1^{-/-}與 apoB^{-/-}的基因轉殖鼠，能減少動脈粥狀硬化的情形 (Linton, 2003)。動物實驗利用基因轉殖技術小鼠 (如 ApoE 剔除小鼠、ApoB 過度表現小鼠等) 作為動脈粥狀硬化與高血脂症研究模式，再剔除 MCP-1 或 CCR2 (白血球上的 MCP-1 receptor) 後餵食高脂飲食，與控制組相比較可顯著減少主動脈巨噬細胞聚集及預防泡沫細胞形成的現象，但對血脂無影響 (Boring *et al.*, 1998; Gosling *et al.*, 1999; Han, K. H. *et al.*, 1999)。

二、TNF- α (Tumor necrotic factor alpha)

動脈粥狀硬化與血栓併發症的危險上升，與 TNF- α 相關的 IL-6、CRP、

fibrinogen、ICAM-1 及 VCAM-1 的表現量增加有關 (Bruunsgaard, *et al.*, 2000)。氧化自由基、病毒、細菌內毒素 (LPS) 或缺氧狀態刺激下，內皮細胞、平滑肌細胞及巨噬細胞皆會分泌 TNF- α ，通常由活化之巨噬細胞釋放後，便開啟體內發炎反應，促進內皮細胞通透性增加，分泌其他細胞激素和生長因子，增強各種黏著分子分泌 (Zeng *et al.*, 2002)。TNF- α 是由 157 個氨基酸所組成的 17 KDa 可溶性蛋白，由原腫瘤壞死因子 (Pro-TNF- α) 受 TNF- α 轉換酶 (TNF- α -converting enzyme) 分解而成 (Wang *et al.*, 1985)

TNF- α 可刺激單核球、內皮細胞和纖維母細胞 (fibroblasts) 產生 IL-1 β (Dinarello & Cannon, 1986; Le *et al.*, 1987; Nawroth *et al.*, 1986)；刺激內皮細胞、血管平滑肌細胞產生 MCP-1 及 IL-8；另外還會活化內皮細胞，增加黏著分子（如：E-selectin、VCAM-1、ICAM-1）的表現 (Pierce, *et al.* 1996)，由此可知其在動脈粥狀硬化的致病過程中，扮演了多功能的角色。

三、IL-1 β

IL-1 β 是個 17 kDa，含有 159 個氨基酸的蛋白質。會被某些細胞激素所增強，像 granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)，及 interferon- γ (IFN- γ)。IL-1 β 能作為中性球 (neutrophil) 的化學趨化物，能引起中性球從骨髓釋放到循環中，引起單核球聚集，加強白血球與內皮細胞的黏附，刺激其他發炎因子釋放 (Osterud & Bjorklid, 2003)。

由 IL-1 β 引起的中性球聚集反應是緩慢的，且為 protein synthesis dependent。但是由 TNF α 引起的則是快速且為 protein synthesis independent (Rampart *et al.*, 1989)。

在缺乏 IL-1 β 的 apoE^{-/-}小鼠身上，能減少約 30% 的動脈粥狀硬化嚴重性，且此結果伴隨著 VCAM-1 及 MCP-1 的分泌減少 (Kirii *et al.*, 2003)。與 TNF- α 相似，IL-1 β 在動脈粥狀硬化的致病過程中，扮演了多功能的角色。

四、MMP-9

在動脈粥狀硬化損傷中，細胞外基質蛋白質的完整性可能會被很多酵素給破壞，大多數屬於以下三種：基質金屬蛋白酶（Matrix metalloproteinases, MMPs）、cysteine protease 或 serine protease family (Daugherty *et al.*, 2005)。

基質金屬蛋白酶對細胞移行及組織重建是必要的 (Osterud & Bjorklid, 2003)。在受損的、發展出明顯增厚的動脈內膜層上可發現 MMP-2 及 MMP-9 的過度表現 (Bendeck *et al.*, 1994)。MMP-2 及 MMP-9，在裂解細胞外基質時是必須的，會使平滑肌細胞移行到血管內膜，導致血管內膜增生 (Luttun *et al.*, 2004)。巨噬細胞在損傷發展時，主要會表現的 MMPs 為 MMP-9 及 MMP-12，而人類的巨噬細胞中，MMP-9 分泌量是最多的，若能減少 MMP-9 則能減緩粥瘤的進展，且能減少損傷面積 (Luttun *et al.*, 2004)。

體內實驗顯示巨噬細胞分泌的 MMP-9 會受到數種細胞激素所調節，例如：TNF α 及 IL-1 β 等。TNF- α 會顯著增加 MMP-9 的表現，而這個誘發反應是經由活化 ERK 路徑所調節的。而 MMP-9 的濃度也可以反應發炎的程度，並可作為藥物抗發炎效果之評估參考 (Lin *et al.*, 2007)。

第三節 巨噬細胞膽固醇傳送與動脈粥狀硬化

一、CD36

CD36 是個 type III 清除者受器 (scavenge receptor)，橫跨細胞膜兩次，形成了細胞外的 glycosylated loop，氧化型脂蛋白是其高親和力的 ligand (Kunjathoor *et al.*, 2002)。

在 1980 年代晚期確認了 CD36 是一個血小板上的受器，會與 thrombospondin 及寄生於紅血球的 *Plasmodium falciparum* 結合。然而，直到 1993 年才被發現他是巨噬細胞對 mmLDL 的接受器，而確認出其在脂質攝入上的角色 (Endemann, 1993; Oquendo, 1989)。

在缺乏 CD36 的 *Apoe*^{-/-} mice 研究中發現，動脈粥狀硬化損傷面積會大幅減少，證實 CD36 調節的 oxLDL 攝入步驟會促成泡沫細胞形成及動脈粥狀硬化 (Febbraio, 2000)，其過度表現可能加重動脈粥狀硬化損傷 (Podrez *et al.*, 2000)。

oxLDL 具有單獨活化 PPAR γ 的能力 (Nagy *et al.*, 1998)，因此直接影響其下游目標基因 CD36 表現大增，而增加對 oxLDL 之攝入 (Tontonoz *et al.*, 1998)。oxLDL 的攝入會經由中性膽固醇酯水解酶 (neutral cholesterol ester hydrolase) 與 acyl coenzyme A cholesterol acyltransferase (ACAT) 兩酵素作用，不斷進行水解又酯化的膽固醇酯循環 (cholesterol ester cycle)。經過水解的游離膽固醇可經由 ABCA1 輸出至細胞外，或者變成膽固醇酯堆積，進而變成泡沫細胞，過程表示如圖 4。而游離膽固醇的堆積對泡沫細胞是有毒性的，會造成細胞自我凋亡 (apoptosis) 或壞死 (necrosis)，最終導致斑塊的形成 (Guest *et al.*, 2007)。

如圖 4 所示，在調節脂質攝入與自我凋亡細胞的清除外，CD36 可以促進促發炎反應的訊息傳導，可能會引起動脈壁的慢性發炎反應 (Moore, 2006; Sophie, *et al.*, 2007)。

OxLDL 的刺激會透過 CD36 及 PKC 而引起 NF κ B 活化，因此增強了促發炎激素如 TNF α 及 IL-1 β 等的分泌 (Han, C. Y., Park, & Pak, 2000; Lipsky *et al.*, 1997)。而在缺乏 CD36 的巨噬細胞中，能顯著抑制上述的情形 (Janabi *et al.*, 2000)。

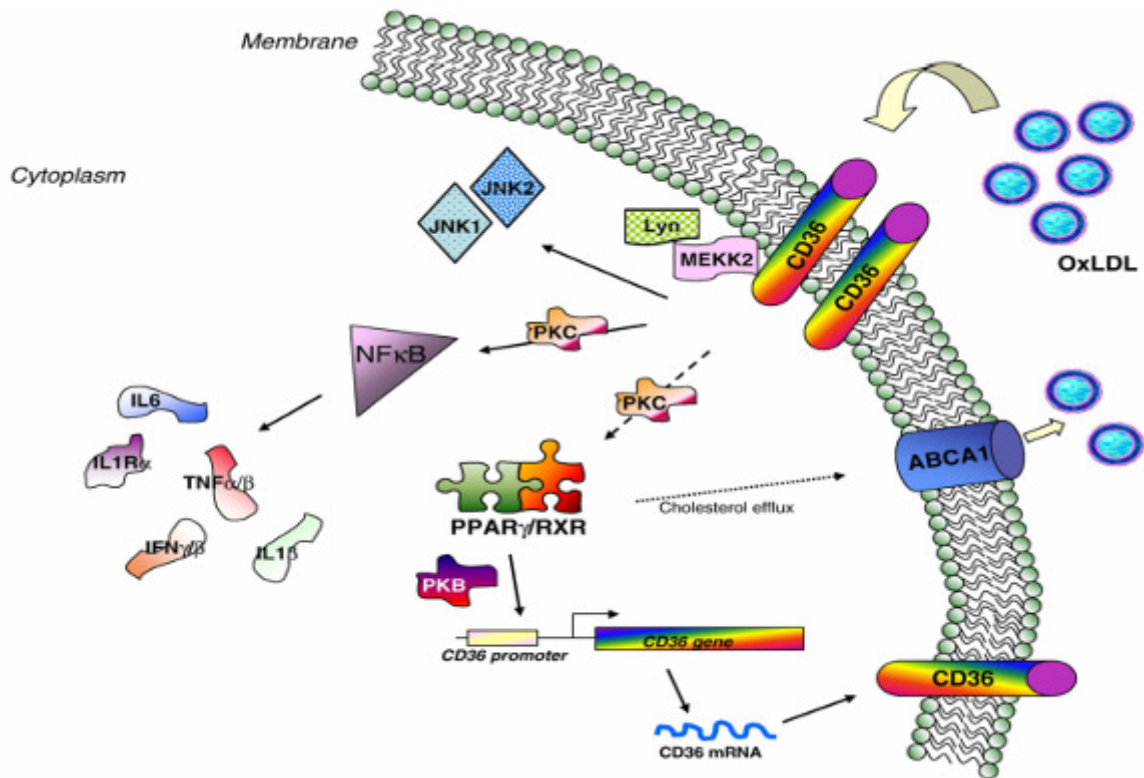


圖 4. 巨噬細胞 CD36 影響膽固醇入攝入及發炎反應之機制

二、 ABC A1

ATP-binding cassette-transporter (ABC A1) 是一種含有 2261 個胺基酸的 240kDa 蛋白質，以 ATP 作為能源，能使多種分子通過細胞膜 (Higgins, 1992)。

目前研究已知 ABC A1 參與了巨噬細胞中 apolipoprotein (Apo A I) 調節的膽固醇流出，於逆向膽固醇傳送途徑中負責重要的角色，把細胞內的膽固醇輸送給細胞外的 HDL 帶去肝臟代謝，而調節了血漿 HDL 的濃度 (Langmann, T., Klucken, J., Reil, M., et al., 1999)。膽固醇傳送之路徑及影響因子如圖 5 所示。

Tangier 疾病患者，正是因為 ABC A1 基因產生突變，造成 ABC A1 傳送膽固醇的功能失常，使該病患者異常容易有動脈粥狀硬化的情形。許多動物模式之研究已證明 ABC A1 具有保護心血管的效用。在 apoE 及 C57BL6 小鼠體內 ABC A1 的過度表現，會造成血清 HDL 膽固醇濃度上升，且減少動脈粥狀硬化之易罹病性 (Joyce et al., 2002; Singaraja et al., 2002)。在動脈粥狀硬化損傷上，ABC A1 藉由對 HDL 膽固醇濃度的影響，獨立地影響損傷之發展 (Lawn et al., 2001)。因此，依賴 ABC A1 的膽固醇流出 (cholesterol efflux)，對預防過多膽固醇堆積在動脈壁的巨噬細胞內，以及預防巨噬細胞轉變成泡沫細胞，是很關鍵的因素 (Van Eck et al., 2005)。另外有研究發現，ABC A1 的高度表現可以避免斑塊產生及發展。所以在脂肪條轉變成損傷的發展過程中，ABC A1 可能是個重要影響因素 (Van Eck et al., 2005)。

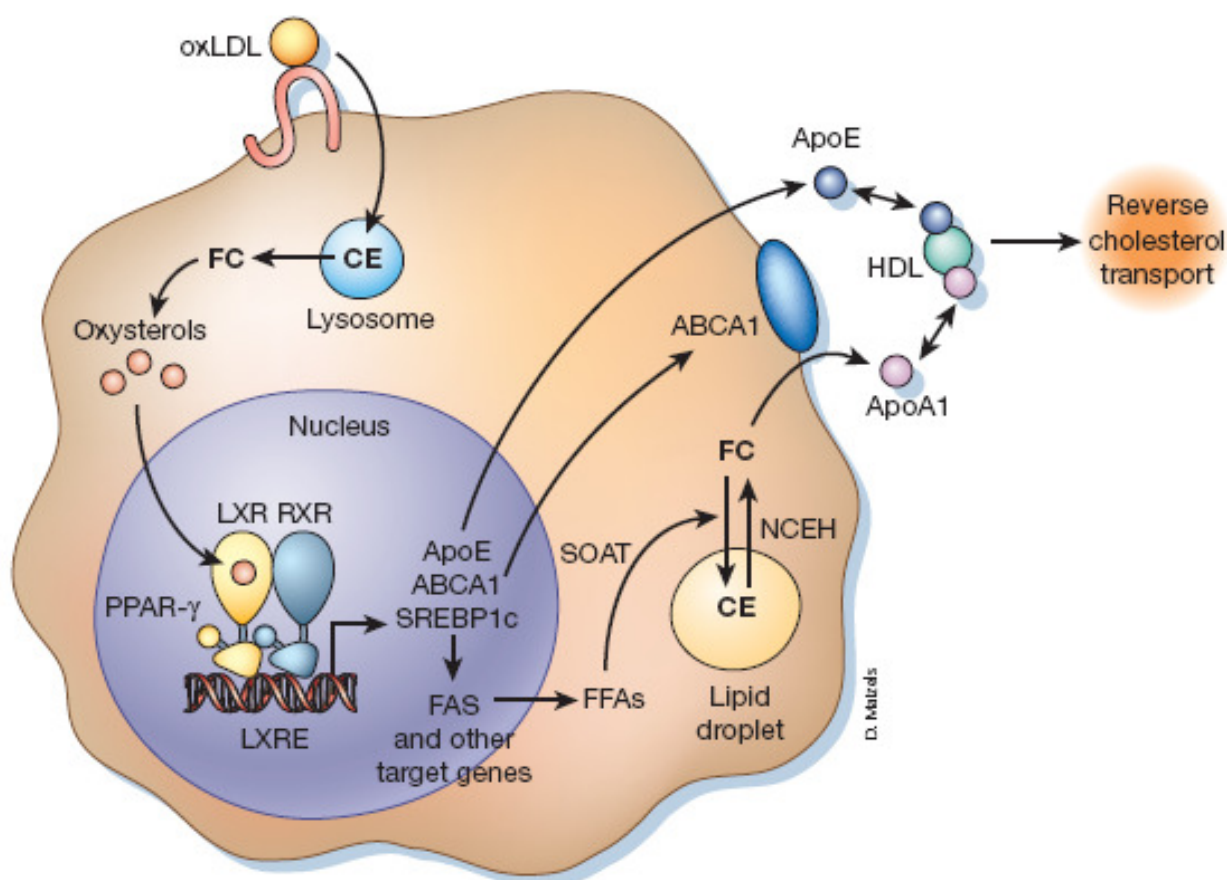


圖 5. 巨噬細胞膽固醇逆傳送機制 (Li, A. C. & Glass, 2002)

游離膽固醇中的Oxysterols 啟動了LXR–RXR heterodimers,增加了目標基因，包含ApoE與ABCA1的轉錄，推動了膽固醇流出。（CE, cholesterol ester; LXRE, liver X receptor E; NCEH, neutral cholesterol ester hydrolase; FAS, fatty acid synthetase)

第四節 植物性雌激素

一、雌激素與動脈粥狀硬化

更年期（menopause）的定義是指女性月經停止達 12 個月以上。接近更年期的月經週期中，雌激素（estradiol）與 FSH 濃度變異很大，使經期不規律，荷爾蒙不穩定，經期長度可能變長、變短或不規律，在最後一次經期來臨前，平均需要經過四年的時間才會停經（Carr, 2003）。

動脈粥狀硬化於男女性之發生是不同的，女性的好發率約比男性晚了十年，而心肌梗塞要一直到他們六十歲時才會比較常見。相較與同年齡的男性，更年期前的女性似乎對心血管疾病具有保護力。雖然女性在五十歲之前幾乎不會發生心血管疾病，但是在七十歲時，心血管疾病（CVD）的發生率在兩性卻是相等的，而推測雌激素缺乏會加速造成心血管疾病危險（Carr, 2003）。

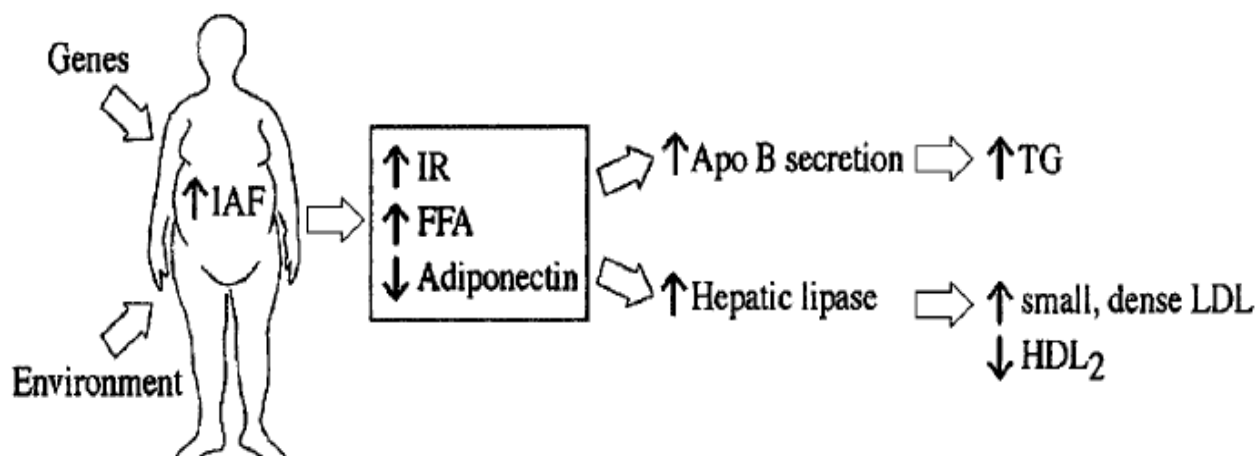


圖 6. 腹部肥胖影響脂質代謝（Carr, 2003）

在 Framingham 調查中發現，經過自然停經十年後，心血管疾病的發生會增加四倍；而比預期早的、手術引起的停經也增加罹患心血管疾病的風險（Gohlke-Barwolf, 2000）。還有研究指出，停經女性的主動脈鈣化程度隨著停經年數而增加（Witteman *et al.*, 1989），且更年期與 60% 代謝症候群風險的增加相關（Park *et al.*, 2003）。由以上研究支持了雌激素缺乏會造成加速心血管疾病危險的推測。

腹部脂肪的堆積與得到糖尿病、高脂血症、small dense LDL、高血壓及 CVD 的高風險有關 (Despres, 1993)。雌激素會促進下半身 (gluteal-femoral) 脂肪堆積，停經後女性因缺少雌激素，使中央型肥胖增加 (Krotkiewski *et al.*, 1983; Poehlman, Toth, & Gardner, 1995)。大量的腹部脂肪與胰島素阻抗升高、游離脂肪酸濃度增加以及 adiponectin 下降有關。這些因子使得含有 apolipoprotein B (apo B) 的 LDL 粒子增加，導致高三酸甘油酯血症，增加了肝臟脂解酶 (hepatic lipase) 活性，使 LDL 粒子大部分為體積小且密度高的型態，並下降了體積大的、能抗動脈粥狀硬化的 HDL₂ (Carr, 2003)。

由多筆研究指出，停經後女性會出現類似以上的脂質異常型態，包含有總膽固醇 (TC)、三酸甘油酯 (TG)、及 lipoprotein(a) 濃度皆較停經前婦女為高，以及 HDL 膽固醇濃度皆較停經前婦女為低 (Jensen, Nilas, & Christiansen, 1990; Li, Z. *et al.*, 1996)。因此，若能改善以上症狀，應該有助於更年期婦女下降動脈粥狀硬化發生及心血管疾病罹病率。

近年來有細胞實驗指出，雌激素能降低發炎因子如 iNOs、PGE₂ 及 MMP9 的分泌 (Vegeto *et al.*, 2001)，可能是透過阻斷 P65 的轉錄活性以抑制 NFκB 活化，而抑制下游促發炎細胞激素、化學趨化物及黏附因子等的表現 (Serena, *et al.*, 2005)。

二、植物性雌激素種類

植物性雌激素是天然存在於植物中的，且構造或功能類似雌二醇 (17-estradiol)。目前已知之植物雌激素化合物大致可分為以下幾類：1. 木質酚 (lignan) 2. 異黃酮 (isoflavone) 3. 香豆素 (coumestans) 4. resorcylic acid lactone，其中以異黃酮與木質酚研究最多。許多植物性雌激素具有雙酚 (diphenol) 之，因此構造與雌激素相似，故可與雌激素受器結合，經由雌激素受器產生雌激素效應。

植物雌激素依其濃度，攝食者內因性雌激素濃度，及個人特質，如性別、停經情況等因子，可能對攝食者具有雌激素或抗雌激素之作用。植物雌激素之活性約為 17β-雌二醇之百分之一至千分之一。但由於攝食者體內濃度可達內因性雌激素

百倍之多，因此可能可經由對雌激素受器之競爭性抑制而產生抗雌激素之效應。

在體內主要有兩種雌激素受器被鑑定出來，分別是ER α 、ER β ，此兩受器功能相似，但其調節機制、人體內分佈情形及對物質親和力不同而有不同的作用 (Harding, 1990)。 α 受器 (ER α) 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 (ER β) 主要分佈在心臟、骨骼、腎、肺、卵巢、尿道等 (Enmark & Gustafsson, 1999)。由於雌激素補充可能增加乳癌及子宮內膜癌之風險，因此認為對雌激素受器 β (Estrogen Receptor β , ER β) 作用遠高於ER α 之SERMs (Selective Estrogen Receptor Modulators)，可能是取代雌激素但能提供雌激素保護作用之較佳選擇。

許多植物雌激素具SERMs之特性，對ER β 之親合力遠高於ER α ，所以認為他們對心血管、骨質等ER β 表現高之組織具保護效果，但不致於造成乳腺與子宮內膜等ER α 表現高之組織異常增生 (Kuiper *et al.*, 1997)。

三、植物性雌激素與動脈粥狀硬化

植物雌激素之保健效益最早係由跨國族群之飲食與慢性疾病之流行病學研究所提出。這些研究推測日常飲食攝入大量黃豆製品而得到高量植物雌激素性之亞洲人，可能因此具有較西方人口低之心血管疾病、骨折、更年期症候群及荷爾蒙相關癌症（乳癌、卵巢癌、子宮內膜癌及攝護腺癌）罹患率 (Adlercreutz & Mazur, 1997)。細胞、分子生物及動物實驗結果指向植物雌激素可能具改善血脂、促進血管內皮細胞功能，抑制癌症之起始階段，促進骨質保存，改善月經及停經不適症狀等。

對乳癌及荷爾蒙替換療法來說，雌激素接受器是藥物瞄準的重要目標，且這些藥物對心血管系統的影響，是他們在臨床使用上很重要的考量 (Roe, 2000)。動物實驗指出SERM型態的藥物，如tamoxifen，能減少動脈LDL的堆積、動脈粥瘤面積及動脈粥狀硬化的發展，且能抑制高膽固醇飲食引起的損傷達88%，以抑制冠心病的進展 (Grainger, 1995; Reckless, 1997; Williams, 1997)。

ER α 及ER β 皆會表現於動脈內皮細胞、平滑肌細胞及巨噬細胞；在一個使用大

鼠的研究中發現，大鼠頸動脈上 $ER\beta$ 的表現是 $ER\alpha$ 的四十倍 (Makela *et al.*, 1999)，且由Zhu等學者發現缺乏 $ER\beta$ 的大鼠會有不正常的血管功能與高血壓 (Zhu *et al.*, 2002)，因此由以上結果可以推測會特定與 $ER\beta$ 結合的ligand，可能對心血管是有保護作用的 (Usui, 2006)。

像在 Framingham Offspring 研究中就指出，攝取高量植物性雌激素的更年期婦女，具有較好的血脂組成 (de Kleijn *et al.*, 2002)，而有助於保護心血管功能。

在動脈粥狀硬化的過程中，像是控制 LDL 的含量及氧化，單核球的聚集，清除受器的表現，以及膽固醇逆傳送等步驟，皆為理論上可行之介入方式 (Glass & Witztum, 2001)。而本次研究欲從以上這些方面，探討植物性雌激素是否有調控上述某幾項之功能，而能延緩動脈粥狀硬化之發展。

以下就本次實驗所採用的食材，探討其可能具有抗動脈粥狀硬化作用之機制。

1. 異黃酮

主要的異黃酮有兩種，分別為 genistein 及 daidzein，多存在於黃豆中，通常以不活化的糖苷形式存在。biochanin A 及 formononetin等其他先質，經過小腸的糖苷酶裂解後，也會衍生出genistein 及 daidzein (Setchell, 1998)。

研究發現異黃酮須先經由腸道微生物的糖苷酶 (β -glucosidases) 進行水解作用，去掉糖苷鍵才有助於人體吸收，並轉化為具有雌激素活性的物質，發揮其生理功效 (Setchell *et al.*, 2002)。genistein具有微弱雌激素活性；而daizein則無雌激素活性，必須於人體腸內菌代謝轉換成equol才具有雌激素活性 (Schmitt *et al.*, 2001)。

多個臨床試驗指出，每天攝取 25~50 公克的黃豆蛋白，能安全且有效地下降 LDL 膽固醇約 4~8%。Anderson 等人(1995)發現黃豆蛋白對有肥胖、高血壓且有蛋白尿的第二型糖尿病病人，可以透過減少膽固醇及 TG 濃度，下降其高血脂的症狀。Zhang 等人 (2003)指出攝取黃豆食物可以減少女性冠心病風險。而 Hermansen 等人 (2001)提出，黃豆蛋白可以減少第二型糖尿病病人的 LDL-C、apolipoprotein B-100 及 TG 濃度。而 Jayagopal 等人 (2002)的研究也指出已停經的、第二型糖尿病病人，在服用大豆異黃酮補充劑 12 週後，能顯著下降禁食血糖、

總膽固醇、TC/HDL ratio 等指標。

在體外，由 Raines 等人(1995)整理研究後發現，genistein 可以抑制多種動脈細胞增生、發炎情形，與血管新生作用，血管新生與進一步的損傷有關。且在一個隨機且雙盲的研究中發現，服用 genistein 一年的停經婦女，能使血漿 NO 上升，endothelin-1 下降，改善了 brachial artery flow-mediated dilation (Squadrito et al., 2003)。

2. 山藥

山藥 (*Dioscorea* spp.) 是薯蕷科 (*Dioscoreaceae*)、薯蕷屬 (*Dioscorea*) 多年生蔓性根莖類植物。本次實驗使用的台農二號又稱田薯，是台灣省農業試驗所所育得的新品種，於 1996 年命名，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,1996)。

本實驗室之前的研究，以新鮮山藥取代三分之二主食，發現可以顯著上升停經婦女血清性激素結合蛋白 (SHBG)、雌二醇 (E1)，下降游離男性激素指標，與下降尿液中具基因毒性的雌激素代謝物 (16 α -OH E1) (Wu, 2005)。

以含有2%山藥及0.5%膽固醇飼料餵食紐西蘭白兔12週後，與只餵食膽固醇的組別相比，發現血清總膽固醇、三酸甘油酯及LDL濃度皆能有顯著下降的結果，並大幅提昇HDL濃度達兩倍之多，在主動脈的斑塊堆積可減少達43%，並且能有效增加抗氧化酵素活性 (曾悅和, 2002)。故綜合以上研究結果顯示，山藥對動脈粥狀硬化可能具有保護效果。

鄭氏發現山藥之乙酸乙酯萃取物可活化 hER α 與 hER β ，而甲醇萃取物則無活化效應。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hER β 結合，證實山藥乙酸乙酯萃取物確實具有雌激素活性 (Cheng, W. Y., Kuo, & Huang, 2007)。

以細胞模式研究發現，山藥乙酸乙酯萃取物能顯著降低巨噬細胞及小鼠初代腹

腔細胞IL-6的分泌，因此觀察到山藥乙酸乙酯萃物具有抗發炎的潛力（羅文音，2005）。

3. 芝麻

芝麻(sesame)為胡麻科植物種子芝麻的成熟種子，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。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）。

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 1986）。有研究指出，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，主要是受到 lignans 與其相關化合物之影響。

芝麻的lignans主要為sesamin、sesamolin及sesamol，總含量約1 % (10 mg/g) (Kamal-Eldin, 1995)。Axelson等人(1981)的研究發現，老鼠或人類攝入芝麻或sesamin 後，腸內菌會將其代謝成enterolactone及enterodiol。Enterolactone 於腸道吸收，會進入到血液中循環並於尿液中排出。

經由多筆體內及體外實驗證實 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（Coulman, 2005; Penalvo, et al., 2005; Penttinen, 2007）。

Sesamin 與 sesamolin 可抑制delta 5 desaturase 活性（Shimizu et al, 1991），抑制arachidonic acid 產生；sesamin 藉由抑制p38 MAPK 傳訊及抑制NF-kB 活化，而抑制LPS 刺激BV-2細胞產生的IL-6（Jeng et al, 2005），sesamol也經由同樣的路徑，可以抑制細胞內ROS以及iNOS表現量（Hou, et al., 2006）；還會使內皮細胞NO分泌量增加，且抑制內皮素ET-1的產生，具有抗高血壓的潛能（Lee, et al., 2004; Nakano et al., 2006）。Sesamin 是PPAR- α 天然配子，也能抑制SREBP-1 基因表現，

具促進脂肪酸氧化及抑制肝臟TG 合成的作用 (Ide, T. *et al.*, 2004; Sirato-Yasumoto, *et al.*, 2001)，因此推測sesamin具有抗動脈粥狀硬化之潛力。

4. 苜蓿

本次實驗採用之苜蓿品種為紫花苜蓿，學名為 *Medicago sativa*。苜蓿曾經造成羊的不孕，富含coumestane，coumestane 有很多種，其中具有刺激子宮活性的為coumestrol 與4'-methoxycoumestrol。Coumestrol 與ER α 及ER β 的結合有選擇性，與ER α 的親和力低於estradiol，但與ER β 親和力甚至高於estradiol (Paech *et al.*, 1997)。

以苜蓿加入含膽固醇的飼料，餵食猴子後發現，苜蓿能下降TC/HDL ratio，且可抑制小腸對膽固醇的吸收，增加糞便對內因性及外因性固醇類的排出 (Malinow *et al.*, 1981)。

而研究發現苜蓿乙酸乙酯萃物具有雌激素活性，可高度活化ER β (陳永如, 2007)；且能下降巨噬細胞中以LPS引起之TNF α 與IL-6分泌量，並改善SLE小鼠自體免疫反應 (洪永瀚, 2008)。

5. 茉莉

茉莉學名為 *Jasminum sambac*，原產印度，各地栽培觀賞或大量栽培採收花苞當茶葉的香料。《中藥大辭典》指茉莉花能「理氣開鬱，辟穢和，主治下痢腹痛，結膜炎，瘡毒」。

研究指出，茉莉葉甲醇萃物具有高度抗氧化力，能顯著下降大鼠潰瘍損傷指數，因此具有抗潰瘍的潛力 (Umamaheswari *et al.*, 2007)。茉莉花甲醇萃物能顯著抑制小鼠耳朵水腫，抑制百分比達50%，且顯著下降大鼠肉芽腫 (cotton granuloma) 的重量；表示對急性或慢性發炎反應皆能有抑制效果 (Atta & Alkofahi, 1998)。且發現茉莉花甲醇萃物也具有雌激素活性 (陳永如, 2007)。

6. 菊花

菊花 (chrysanthemum)，學名為*chrysanthemum morifolium Ramat.*，為中國傳統藥用植物，具清熱解毒、明目等功效。

近年來以菊花水萃物培養Raw264.7巨噬細胞株發現，能顯著下降LPS刺激下PGE2之分泌。若將其餵食BALB/c小鼠四週後發現，可顯著降低IFN γ 分泌，且促進IL-5及IL-10之分泌 (王姿晴, 2006)。

2007年張氏之研究選用11種菊花萃取物，發現均對格蘭氏陽性菌有抑制效果，其中又以洋甘菊的抑制效果最好；且台東洋甘菊乙酸乙酯萃取物能發揮良好的抑制癌細胞能力。而大陸杭州菊花不但有最高的總酚類化合物含量且其DPPH自由基清除能力也最好 (張惟雅, 2007)。

目前發現菊花甲醇萃物也具有雌激素活性，活化ER β 能力高於ER α (陳永如, 2007)。有研究指出菊花甲醇萃取物具有抗突變的能力，且能抑制老鼠身上被12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (PMA)引起的發炎反應 (Cheng, W. *et al.*, 2005)。

由以上文獻推測，菊花萃物可能有助於改善體內發炎反應，而具有抗動脈粥狀硬化之潛力。

第三章 材料與方法

第一節 樣品製備與取得

1. Sesamin：自 Cayman chemical 購得。分子量為 354.4，純度 $\geq 95\%$ ，結晶狀固體。使用 DMSO 溶解樣品，做為細胞實驗用。
2. Enterolactone：自 Cayman chemical 購得。分子量為 298.3。先將原本的溶劑用氮氣吹乾，再加入絕對酒精溶解樣品，做為細胞實驗用。
3. Genistein：自 SIGMA 購得。分子量為 270.27，使用 DMSO 溶解樣品，做為細胞實驗用。
4. 苜蓿芽乙酸乙酯萃取物：由國立台灣大學黃青真教授實驗室提供，品種為澳洲紫花苜蓿，自台北市穀堡農坊購得。先將取得的首蓿芽冷凍於 -80°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，利用絕對酒精溶解樣品，做為細胞實驗之用。萃取率為 4.58%。
5. 山藥乙酸乙酯萃取物：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°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，再以乙酸乙酯萃取，萃取液經過減壓濃縮並抽乾後，利用絕對酒精溶解樣品，做為細胞實驗之用。
6. 茉莉甲醇萃取物：將茉莉經過適當的切碎後，以研磨機磨成粉末製品。用 1:10 比例以 100% methanol 隔夜萃取兩次，再以真空濃縮取得茉莉甲醇萃取物 (methanolic extract)。萃取率為 23.7%。
7. 菊花甲醇萃取物：將菊花經過適當的切碎後，以研磨機磨成粉末製品。用 1:10 比例以 100% methanol 隔夜萃取兩次，再以真空濃縮取得菊花甲醇萃取物。萃取率為 24%。

第二節 研究材料

一、細胞培養

(1) THP-1 (Human acute monocytic leukemia)

人類 THP-1 細胞是作為研究人類巨噬細胞脂質代謝時，很有用的一種細胞品系，且是一種更有鑑別度的單核球品系 (Auwerx, 1991)。他們會因為受到 phorbol myristate acetate (PMA) 的刺激而分化，所以在研究巨噬細胞清除者受器表現時，使用 THP-1 細胞是特別有用的 (Via et al., 1989)。

本次使用的 THP-1 購自食工所生資中心，使用 RPMI 1640 培養液 (Gibco)，內含 2 μ M L-glutamin、4.5 g/L glucose、10 μ M HEPES、1.0 mM sodium pyruvate (SIGMA)，外加 fetal bovine serum 10% (Gibco)、0.05 mM 2-mercaptoethanol (SIGMA) 以及抗生素 Antibiotic-Antimycotic (Gibco)，內含 penicillin G sodium 100 units/ml、streptomycin sulfate 100 μ g/ml、amphotericin B 250 ng/ml。

將細胞培養於 75 T flask (Corning) 中。培養箱 (Thermo) 環境維持 37°C、5 %CO₂ 及飽和水蒸氣，並於水盤中加入抗黴劑 Methyl 4-hydroxybenzoate (SIGMA)。每七天更換一次培養液，以滅菌吸管 (Gibco) 將細胞懸浮液全部抽出放入滅菌離心管中，以 1000 rpm 之速度放入離心機 (Hettich) 離心五分鐘。離心完畢後，抽掉上清液，注入適量新鮮培養液混合均勻，再依照細胞量或實驗需求決定分成數盤或種入多孔盤中。以第五代至第二十五代 (P5–P25) 進行實驗。

(2) 人類主動脈內皮細胞株 (Human aortic endothelial cells; HAECs)

人類主動脈內皮細胞株 (Human aortic endothelial cells; HAECs) 購自 Cascade Biologics，使用 M200 培養液 (Cascade Biologics) 內含 1 g/ml hydrocortison、10 ng/ml human epidermal growth factor、3ng/ml basic fibroblast growth factor、10g/ml heparin，將細胞培養於 75T flask 中。培養箱環境維持 37°C、5%CO₂ 及飽和水蒸氣，並於水盤中加入抗黴劑 Methyl 4-hydroxybenzoate (SIGMA)。每二至三天更換一次培養液，以幫浦抽吸器

(GAST) 前端接巴斯德吸管，伸入 flask 中，沿邊緣抽掉舊培養液，再注入新鮮培養液即可。細胞經過七天成長約至九分滿時，需進行繼代；抽掉舊培養液後，以 PBS 洗兩次，加入 3ml TrypLE (Gibco) 均勻搖晃，置入培養箱中等待 3 分鐘，取出後立即加入 6 ml 新鮮培養液終止反應，並以滅菌吸管將細胞液全部抽出放入滅菌離心管中，以 1000rpm 之速度進行離心五分鐘。離心完畢後，抽掉上清液，注入適量新鮮培養液混合均勻，再依照細胞量或實驗需求決定分成數盤或種入多孔盤中。以第三代至第十代 (P3—P10) 進行實驗。

二、細胞數目計算

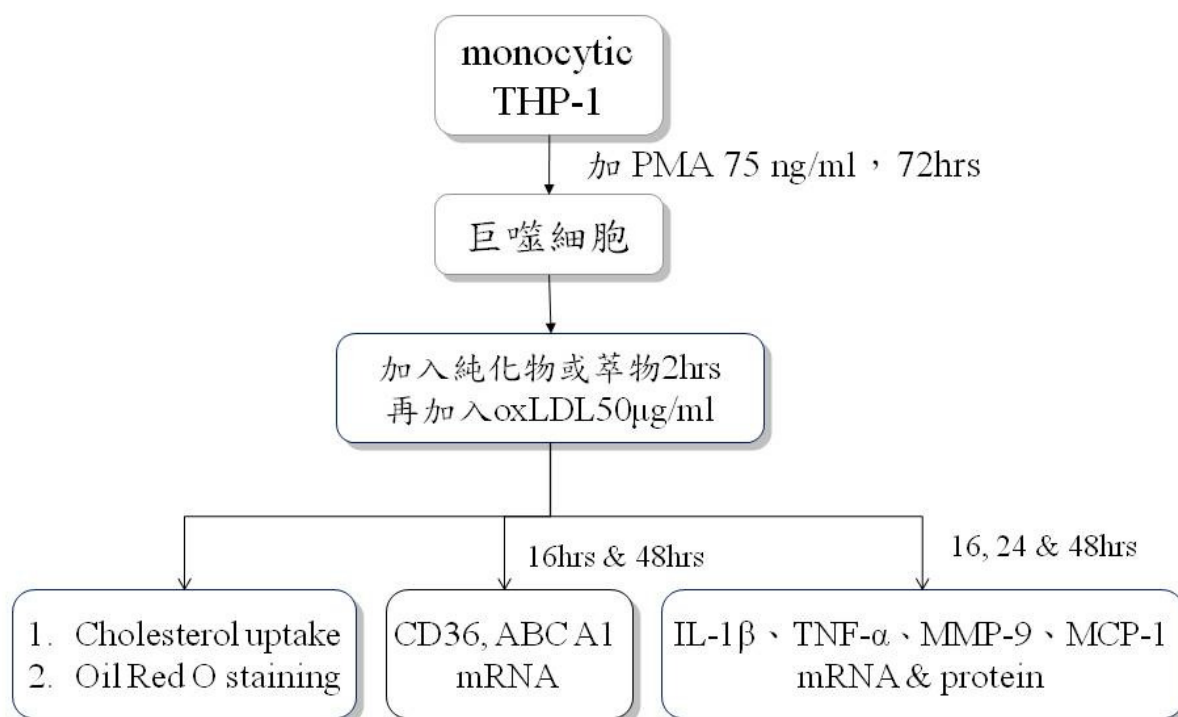
因活細胞會排斥 Trypan Blue 染劑，只有死細胞會被染成深藍色，故以顯微鏡 (Nikon) 計算血球計數盤上的亮點，可得知細胞之相對存活率。取 20 μ l 之細胞懸浮液與 Trypan Blue (SIGMA) 對半稀釋，以血球計數盤計算四大格總數，除以 4 乘以稀釋倍數再乘以 10^4 可得該取樣細胞液之密度 (細胞數/ml)。

三、細胞冷凍

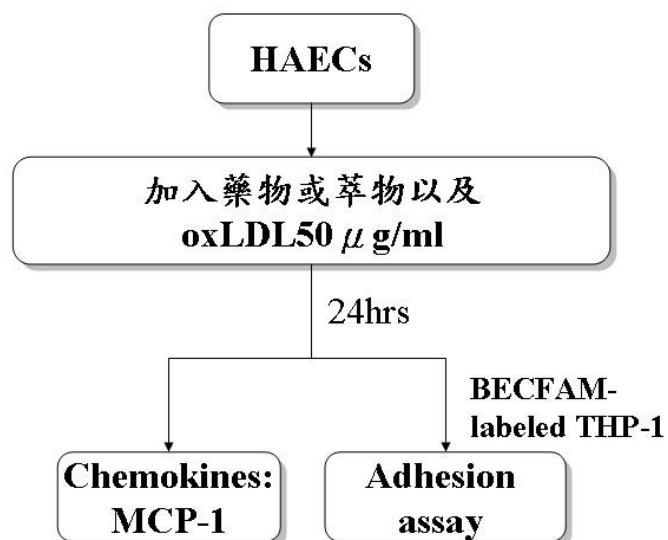
兩種細胞冷凍濃度以 1×10^6 cells/ml 較佳。將細胞懸浮液以 1000 rpm 離心 5 分鐘後，除去上清液，注入以 7%DMSO (SIGMA) 加上 93% 新鮮培養液配置成的冷凍保存液混合均勻，再將含有冷凍保存液的細胞懸浮液各以 1 ml 分裝至冷凍管中。將冷凍管置於保立龍盒中，冰於 -80°C 之冰箱 (Thermo) overnight，最後放入液態氮桶中保存。

第三節 實驗設計

一、實驗一



二、實驗二



第四節 實驗方法

一、 低密度脂蛋白的分離

將新鮮的血液樣品放入離心機 (Beckman) 中，於 3000 rpm、4°C 下離心 15 分鐘，使血漿與血球分離。取得血漿後，準備好超高速離心管，每管加入 3 ml 之血漿，再加入 NaBr (Merck) 密度液 0.5 ml 將密度調整至 1.017g/ml，秤重平衡後置入超高速離心機中，以 41000 rpm、4°C 下離心 16 小時，於每管取最上層之乳白色液體 1 ml，即為 VLDL 與 IDL。取完上層後，再 NaBr 密度液 0.5 ml 調整密度至 1.063 g/ml，秤重平衡後置入超高速離心機中，以 41000 rpm、4°C 下離心 18 小時，於每管取最上層之淡黃色液體 1 ml，即可得到低密度脂蛋白 (LDL)。取得之低密度脂蛋白需裝入透析膜 (Spectra, 分子量 12000-14000)，以 250 倍體積之 PBS 透析四小時之後，將 PBS 倒掉，繼續以新鮮的、250 倍體積的 PBS 繼續透析至隔天早上。

二、 低密度脂蛋白的氧化

將已透析好的 LDL，加入 10 μ M 之 CuCl₂ (Merck)，於 37°C 水浴進行氧化 20 小時，以 EDTA (SIGMA) 終止氧化反應。氧化完成的 LDL 會以 250 倍體積之 PBS 透析四小時，之後將舊 PBS 倒掉，繼續以新鮮的、250 倍體積的 PBS 繼續透析至隔天早上。透析完成之氧化 LDL 放入 4°C 冰箱中保存，兩個星期內使用完畢。

三、 Conjugate-Diene 測定

因經過透析的氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 無法以 TBARS 測定法測知其氧化程度，所以採用 Conjugate-Diene 測定法測之。將分光光度計 (SPECTRONIC GENESYS 5) 之波長設定為 234 nm，以 PBS 作為 Blank，讀取其吸光值。氧化前及氧化後的 LDL 皆會進行測定。

四、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腺體 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。使用 96 孔盤，每 well 中接種 THP-1 macrophages 1×10^5 個細胞，同時加入 PMA (75ng/ml) 使細胞分化，經過 72 小時候，吸去培養液，注入已配好不同濃度之植物性雌激素純化物或萃取物；而 HAECs 則於每 well 內接種 2×10^4 個細胞，待四小時細胞附著後，吸去培養液，注入已配好不同濃度之植物性雌激素純化物或萃取物。兩種細胞皆於測試物培養 24 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 搖晃以溶解細胞，最後送入 ELISA Reader (TELAN) 以 550nm 讀取吸光值，以培養時未加入任何測試物之細胞吸光值為對照組 (100%)，再以實驗組之吸光值除以對照組之吸光值，計算出細胞之相對存活百分比。

五、細胞內膽固醇濃度測定

1. 細胞收集

將 THP-1 細胞種於 6 cm 培養皿中，每個培養皿種入 2×10^6 個細胞，同時加入 PMA (75ng/ml) 使細胞分化，經過 72 小時候，吸去培養液，注入已配好不同濃度之植物性雌激素純化物或萃取物。經過 2 小時後，再加入 oxLDL (50 μ g/ml) 共同培養 48 小時。之後，移除培養液，以 4°C 之 PBS 沖洗兩次，加入 200 μ l 之 cell lysis buffer，以刮杓將細胞刮下，收集於微量離心管中，以 14000g、4°C 離心 10 分鐘。離心後，取其上清液並保存於 -80°C 冰箱中。

2. 細胞內總膽固醇測定

使用商業試劑 (Randox)，將標準品序列稀釋後，從中與樣品各取出 50 μ l 加入試劑混合均勻 10 分鐘後，以波長 500 nm 測定吸光值。以標準品測出的吸光值與膽

固醇濃度畫出標準曲線，求出膽固醇濃度 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)。最後除以各樣品之蛋白質含量以校正。

3. 蛋白質定量

使用 Bradford method，以 Bradford (BioRad) 為蛋白質染劑，將標準品 BSA (SIGMA) 及樣品加入染劑混合均勻五分鐘後，以波長 595 nm 測定吸光值。以標準品測出的吸光值與蛋白質濃度畫出標準曲線，求出趨勢線方程式後，帶入各吸光值，即可以內插法求出蛋白質濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)。欲檢測樣品之濃度時，會取出 5 μl 的樣品與 395 μl 的 DDW 混合，再加入 100 μl 的 Bradford 染劑均勻混合後，測定吸光值。

蛋白質標準曲線製作：

蛋白質濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	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				

六、 IL-1 β 、TNF α 、MCP-1 蛋白質量之測定

將THP-1細胞種於 6 cm 培養皿中，每個培養皿種入 2×10^6 個細胞，同時加入 PMA (75 ng/ml) 使細胞分化，經過 72 小時後，吸去培養液，注入已配好不同濃度之植物性雌激素純化物或萃取物。經過 2 小時後，再加入 oxLDL (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 共同培養；收集共同培養 24 小時及 48 小時之上清液，以市售三明治酵素免疫分析 ELISA sets (eBioscience) 分析 IL-1 β 、TNF α 及 MCP-1 之濃度。

根據 ELISA 原理測量，流程依據廠商說明書簡述如下：

預先在 96 well ELISA plate 上 coating capture antibody 100 μl 後，放置於 4°C overnight，以 wash buffer 清洗掉多餘或未固定於盤底的 capture antibody，接著進行 blocking 的步驟以降低非特異性的干擾，1 小時後以 wash buffer 清洗，再依序

加入 100 μ l 的標準品及樣品培養，2 小時後以 wash buffer 清洗，加入 detection antibody 反應，1 小時後以 wash buffer 清洗，再加入 enzyme reagent (avidin-HRP) 反應，30 分鐘後以 wash buffer 清洗，以 TMB (tetramethylbenzidine) 呈色系統呈色，室溫下避光 15 分鐘，最後加入 2N H_2SO_4 終止反應，測量 450 nm 之吸光值，吸光值愈高者表示樣品中所含之濃度愈高，其濃度利用標準曲線換算，再乘上稀釋倍數，即為實際產生的量。

七、MMP-9 蛋白質量之測定

將 THP-1 細胞種於 6 cm 培養皿中，每個培養皿種入 2×10^6 個細胞，同時加入 PMA (75 ng/ml) 使細胞分化，經過 72 小時後，吸去培養液，注入已配好不同濃度之植物性雌激素純化物或萃取物。經過 2 小時後，再加入 oxLDL (50 μ g/ml) 共同培養；收集共同培養 48 小時之上清液，以市售三明治酵素免疫分析 MMP-9 (R&D) 濃度。根據 ELISA 原理測量，流程依據廠商說明書簡述如下：

預先在 96 well ELISA plate 上 coating capture antibody 100 μ l 後，放置於 4°C overnight，以 wash buffer 清洗掉多餘或未固定於盤底的 capture antibody，接著進行 blocking 的步驟以降低非特異性的干擾，1 小時後以 wash buffer 清洗。加入標準品及樣品培養 2 小時，之後再加入 detection antibody 反應 2 小時，再加入 enzyme reagent (avidin-HRP) 反應 45 分鐘，以 TMB 呈色，室溫下避光反應 20 分鐘，最後加入 2N H_2SO_4 終止酵素呈色反應，於 30 分鐘內送入 ELISA reader 讀取 450 nm 吸光值，吸光值越高者表示樣品中所含濃度越高，其濃度利用標準曲線可相對換算出來，再乘上稀釋倍數，即為實際產生的量。

八、Oil-Red O Staining

使用 96 孔盤，每 well 中接種 THP-1 細胞 1×10^5 個，同時加入 PMA (75 ng/ml) 使細胞分化，經過 72 小時後，吸去培養液，注入已配好不同濃度之植物性雌激素純化物或萃取物。共同培養 48 小時之後，將培養液移除，以 PBS 清洗兩次，之後

使用 6% paraformaldehyde 將細胞固定 1 小時。1 小時後，移除 6% paraformaldehyde，再以 PBS 清洗兩次，加入 60% Oil-Red O 染劑覆蓋細胞 1 小時，移除 Oil-Red O 染劑，以 PBS 清洗兩次。完成上述步驟後，於光學顯微鏡下觀察及拍照，以觀察泡沫細胞生成情形。拍照完後，加入 100 μ l isopropanol with 0.04N HCl 約 30 分鐘，用 shaker 搖晃以溶解細胞，最後送入 ELISA Reader (TELAN) 以 500nm 讀取吸光值，以培養時未加入任何測試物之細胞吸光值減掉 blank (without cells) 後之吸光值為對照組(control)，再以實驗組 (oxLDL treatment, chemicals & extracts) 吸光值減掉 blank 之吸光值除以對照組，計算出相對之吸光倍數。

九、 內皮細胞/單核球黏附試驗

將 HAECs 培養於 24 wells 培養盤中，每個 well 接種 1×10^5 個細胞，待貼附後給予各種植物性雌激素萃取物及純化物，與 ox-LDL 共同培養 24 小時。準備 THP-1 細胞，以不含血清之 RPMI1640 培養液清洗兩次，並以螢光劑：不含血清培養液 = 1 : 1000 之比例標記上螢光染料 BCECF/AM

(2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester ;

Invitrogen)，培養 30 分鐘後，用 PBS 清洗兩次，將多餘螢光劑洗去。

將培養 24 小時之 HAECs 用 PBS 清洗一次，每個 well 注入已標記之 THP-1 細胞 5×10^5 個於 24 wells 培養盤中，將兩種細胞共同培養 1 小時，1 小時後去除懸浮未黏附的 THP-1 細胞，再用 PBS 清洗兩次，最後加入 1 ml lysis buffer (0.01% Triton X 100 in 0.1M Tris buffer, pH=8.0)，以螢光光度計 (TEKON Technologies) 讀取 Ex 485/Em 530 螢光強度。

九、 CD36 與 ABC A1 mRNA 表現量測定

1. 細胞 RNA 抽取

先將 THP-1 細胞培養 (3×10^6 cells) 於 6 cm dish，加入 PMA (75ng/ml) 共同培

養 72 小時，再加入樣品先處理 2 小時，最後加入 oxLDL 共同培養 16 及 48 小時，移除培養基並加入 1 mL TRIzol 試劑，反應 5 分鐘後收集反應液與細胞，移至 -80 °C 保存備用。

由 -80 °C 冰箱中取出先前收集之細胞，於室溫中解凍 2-3 分鐘，加入 0.2 mL 氯仿於室溫下反應 3 分鐘，4 °C 低溫離心 15 分鐘，抽取上清液至微量離心管。再加入 0.5 mL 異丙醇於室溫下反應 10 分鐘，4 °C 低溫離心 15 分鐘，移除上清液。利用 75% 乙醇清洗 RNA 上雜質與有機溶劑，最後以 DEPC H₂O 回溶備用。

取樣品加 DEPC H₂O 檢測 RNA 在 260 nm 與 280 nm 之吸光值，利用 260 nm 之吸光值來計算 RNA 的濃度、280 nm 之吸光值檢測蛋白質濃度；260 nm 吸光值除以 280 nm 吸光值可得知所萃取 RNA 之純度，最後以 DEPC H₂O 調整樣品 RNA 濃度至一致。

1. 反轉錄聚合酶鏈反應 (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

(1) 將 RNA 合成 cDNA

每管加入 1 µg 的 RNA，以 70 °C 加熱 5 分鐘，置於冰上 5 分鐘，再加入 oligo(dT)、DEPC H₂O、transcriptase (Improm II, Promega)、RT 5X buffer (Improm II, Promega)、MgCl₂ (Promega)、dNTP (Promega) 至總體積為 20 µL 於 PCR tube 中，放入預先開機的 PCR 機 (42 °C，60 分鐘、70 °C，15 分鐘)，離心並移至 -20 °C 保存備用。

(2) 進行聚合酶連鎖反應

將 5 µL cDNA template 分裝至小管，取 1 µL 5'-primer、1 µL 3'-primer、12.5 µL GoTaq Green Master Mix (包含 Reaction Buffer、MgCl₂、dNTP 及 Taq DNA polymerase 混合物，Promega)，以 nucleus-free H₂O 調整體積至 25 µL 後進行 PCR。條件如下：

95 °C 2 mins (讓 cDNA 的二級結構解開，並活化酵素)

94 °C 30 seconds Denature

58 °C 30 seconds Anneal

72°C 30 seconds Extend (gene 的片斷長，時間也會跟著長。)

這樣的週期循環後，在 72°C 停留 10 分鐘，讓尚未完成的片斷繼續完成，之後停留在 4°C，移至 -20°C 保存備用。

使用之 primer：

GAPDH, 24 cycles	
Sense	CCATGGAGAAGGCTGGGG
Antisense	CAAAGTTGTCATGGATGACC
CD36, 26 cycles	
Sense	GAGAACTGTTATGGGGCTAT
Antisense	TTCAACTGGAGAGGCAAAGG
ABCA1, 28 cycles	
Sense	CAGAAAGCACTTTAAGCAGATTCC
Antisense	GGGCCATGTTATTTACTGTTCATAG
IL-1 β , 31cycles	
Sense	TTGTTGCTCCATATCCTGTCC
Antisense	CACATGGGATAACGAGGCTT
TNF- α , 30 cycles	
Sense	CACTAAGAATTCAAACCTGGGGC
Antisense	GAGGAAGGCCTAAGGTCCAC
MMP9, 28 cycles	
Sense	CAACATCACCTATTGGATCC
Antisense	TGGGTGTAGACTCTCTCGCT

(3) 進行電泳

以 1.5% agarose 進行 DNA 電泳以檢定基因表現。將 SybrGold (Invitrogen) 以 1:10000 的比例加入 Agarose 溶液中再進行凝膠。最後以紫外線照膠系統拍照後，使用 Image J 軟體進行定量。

十、MMP-9 活性測定 (Gelatin Zymography)

1. gelatin 電泳膠片製作

gelatin 製備

10%電泳膠片 (gelatin gel)	成分	5%電泳膠片 (Stacking gel)
8300	Gelatin solution	—
—	d.d.water	3400
7000	30% acrylamide (BioRad)	830
5250	1.5 M Tris-HCl (pH = 8.8)	—
—	1.0 M Tris-HCl (pH = 6.8)	630
165	10% SDS (SIGMA)	50
165	50% Glycerol	—
100	10% APS (SIGMA)	50
10	TEMED (SIGMA)	5

單位：μl

配製 gelatin gel 於室溫下混合均勻，注入電泳玻片間，以 75%酒精填滿空隙讓膠得以壓平，待完全聚合。凝結後將酒精倒掉，配製 Stacking gel 於室溫下混合均勻，注入電泳玻片間使 stacking gel 位於 gelatin gel 之上並插入電泳梳，待完全聚合後去除電泳梳，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。

2. Buffer 配置

	Wash Buffer	Incubate Buffer	Running Buffer
成分	50 mM Tris	50 mM Tris	10X TAE buffer, 100ml
	5 mM CaCl	5 mM CaCl	1% SDS
	1 μ M ZnCl ₂	1 μ M ZnCl ₂	d.d.water, 900ml
	2.5% TritonX100		
	pH 7.4	pH 7.4	pH 8.5

3. 蛋白質電泳 (Electrophoresis)

使用之樣本同測定 MMP-9 蛋白質濃度之培養液，檢測培養液之總蛋白質濃度後，使每個樣本之蛋白質濃度一致，每個槽溝需注入含 0.02 μ g 蛋白質的樣本，加入等體積的染料 (5X dye) 及 SDS buffer，再將樣本及 marker 注入各個電泳膠片槽溝中，以電壓 125V 進行電泳 1 小時。

4. Zymography

將跑完電泳的 gelatin 與 wash buffer 共同搖晃 1 小時，之後加入 incubate buffer，經過 37°C、18 小時的培養後將 gelatin 以 CBR solution 染色 30 分鐘，最後以 Destain solution 退染 20 分鐘，將 gelatin 以玻璃紙護貝，將膠片掃瞄後，使用 Image J 軟體進行定量分析。

第五節 統計分析

每次實驗皆有三重複，實驗結果皆以 mean $\pm$ SD 表示。實驗數據以 SPSS12.0 軟體進行分析，以無母數統計之 Mann Whitney U test 檢定有添加測試物的組別與 oxLDL treatment 間的差異，當 $p < .05$ 時，在統計上具有顯著的差異。

第四章 結果

第一節 樣品對細胞存活之影響

各樣品濃度之選定，需以不影響細胞生長為原則，避免細胞數目不同成為實驗干擾因素。以 MTT 測定細胞存活率。分別測定 enterolactone, sesamin, genistein 及各種萃取物對於 PMA-differentiated THP-1 macrophages 之存活率 (圖 4-1)。另外也測定各種測試物單獨處理 HAEC 細胞後其細胞存活率 (圖 4-2)。

一、對於 PMA-differentiated THP-1 macrophages 的影響：

1. 在 chemical 測試物中，enterolactone、sesamin 及 genistein 分別在 1 μM ，50 μM 與 20 μM 的單獨處理下，對 THP-1 macrophages 無顯著的細胞毒性，故選用上述濃度作為後續實驗之條件。
2. 在萃物測試物中，山藥乙酸乙酯萃物、苜蓿芽乙酸乙酯萃物、茉莉甲醇萃物及菊花甲醇萃物分別在 100 $\mu\text{g/ml}$ 的單獨處理下，對 THP-1 macrophages 無顯著的細胞毒性，故選用上述濃度作為後續實驗之條件。

二、對於 Human Aortic Endothelial Cells (HAEC) 的影響：

1. 在 chemical 測試物中，enterolactone、sesamin 及 genistein 分別在 1 μM ，50 μM 與 25 μM 的單獨處理下，對 HAEC 無顯著的細胞毒性，故選用上述濃度作為後續實驗之條件。
2. 在萃物測試物中，山藥乙酸乙酯萃物、苜蓿芽乙酸乙酯萃物、茉莉甲醇萃物及菊花甲醇萃物分別在 100 $\mu\text{g/ml}$ 的單獨處理下，對 HAEC 無顯著的細胞毒性，故苜蓿芽乙酸乙酯萃物、茉莉甲醇萃物及菊花甲醇萃物選用上述濃度作為後續實驗之條件，而山藥乙酸乙酯萃物選用 50 $\mu\text{g/ml}$ 進行實驗。

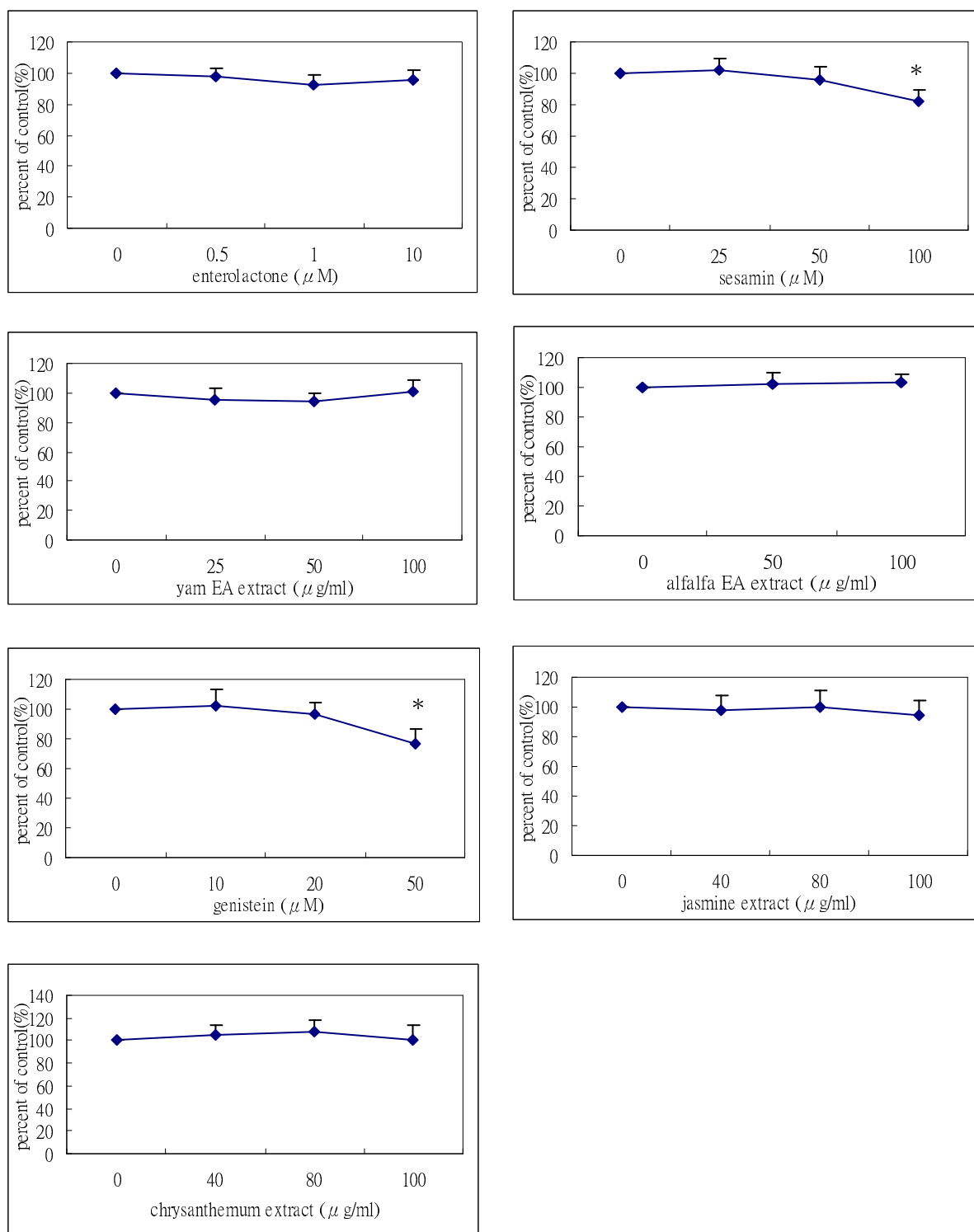


圖 4-1 不同處理對氧化型低密度脂蛋白刺激 THP-1 細胞之細胞存活率

Fig 4-1. Effects of test compounds on viability of PMA-differentiated THP-1.

THP-1 macrophages were treated with PMA at 75 ng/ml for 48hrs and test compounds for 48 hrs. Values are means $\pm$ SD. *Significantly different from control group (0) analyzed by Mann Whitney U t test, $p < .05$

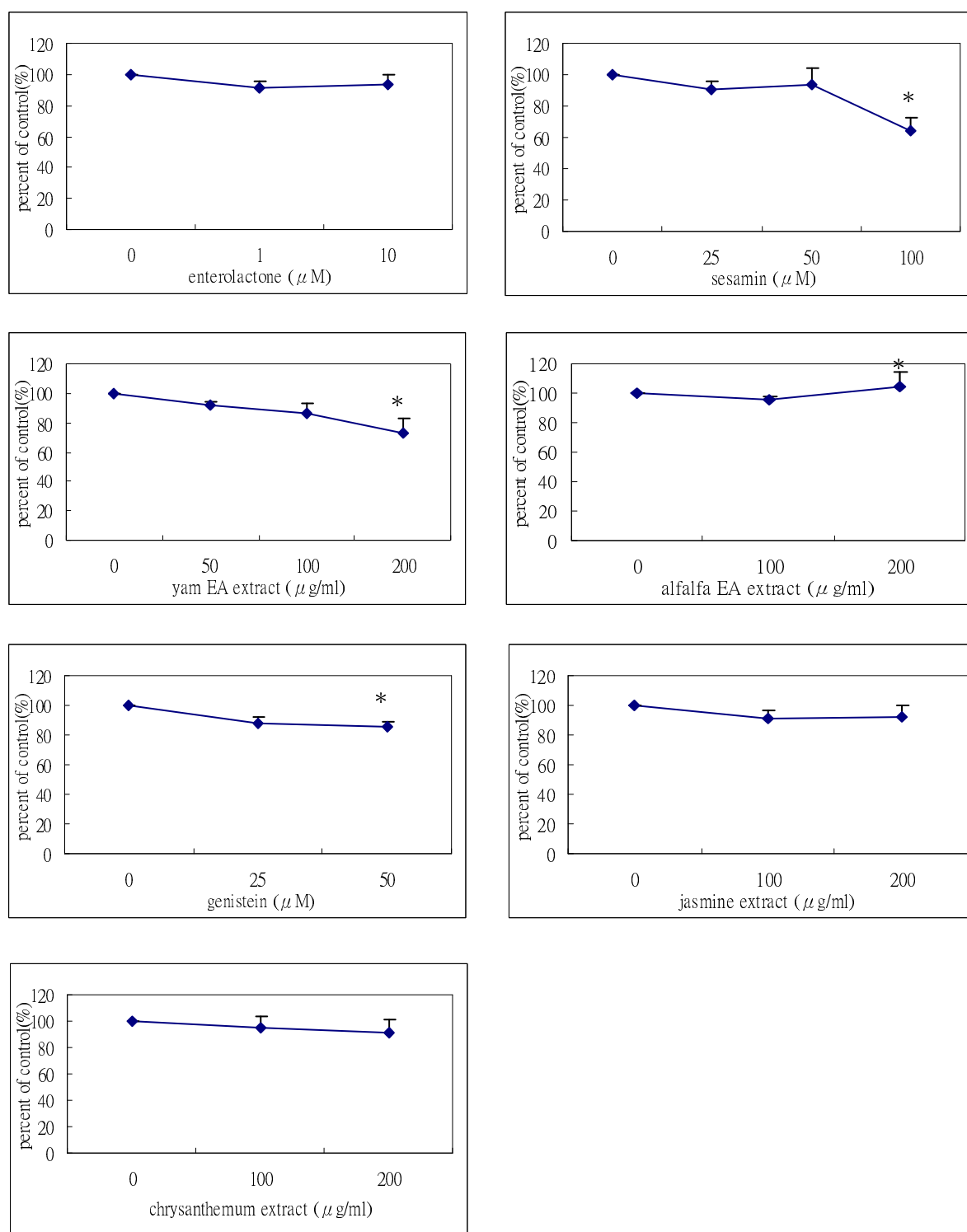


圖 4-2 不同處理對 HAEC 之細胞存活率影響

Fig 4-2. Effects of test compounds on viability of HAECs. HAECs were treated with test compounds for 24 hrs. Values are means $\pm$ SD

*Significantly different from control group(0) analyzed by Mann Whitney U t test, $p < .05$

第二節 測試物對已分化 THP-1 細胞膽固醇堆積之影響

一、氧化型低密度脂蛋白增加細胞內總膽固醇 (圖 4-3)

先以 PMA 處理 monocytic THP-1 細胞 72 小時形成 macrophage-like cells 為 PMA-differentiated THP-1 macrophages。再以氧化型低密度脂蛋白 (oxLDL) 25, 50 及 100 $\mu\text{g/ml}$ 共同培養 48 小時, 觀察細胞內膽固醇堆積情形。

結果發現分別投與 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ oxLDL 與 control 組比較均顯著升高細胞內的總膽固醇量。Control 組的細胞內總膽固醇平均量為 33.73 ± 5.70 ($\mu\text{g cholesterol/mg protein}$), 投與 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ oxLDL 時, 總膽固醇平均量分別為 43.33 ± 1.25 , 49.72 ± 3.95 , 49.72 ± 3.95 ($\mu\text{g cholesterol/mg protein}$); 分別提高總膽固醇百分比分別為 28.5%、47.4%、43.9%。

由於添加 50 及 100 $\mu\text{g/ml}$ oxLDL 對於總膽固醇量之提升無顯著差異, 所以我們選用 50 $\mu\text{g/ml}$ oxLDL 為後續實驗所用之濃度。

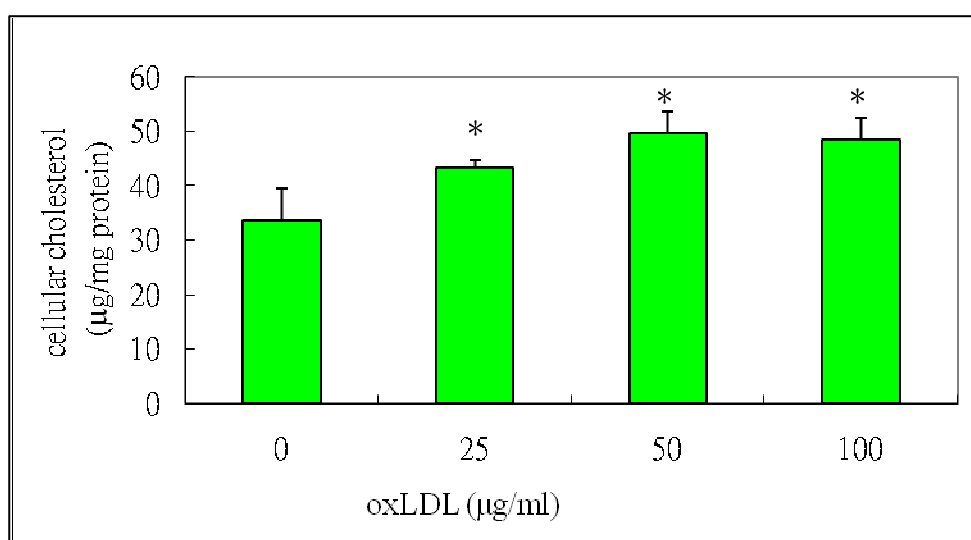


圖 4-3 不同 oxLDL 濃度之處理對 THP-1 細胞內之總膽固醇/蛋白質比例之影響

Fig 4-3. Effects of oxidized LDL treatment on the content of cellular cholesterol in THP-1 cells stimulated with PMA. THP-1 cells (10^6 /ml) were incubated alone or with the indicated concentrations of oxidized LDL for 48 hours. Levels of cellular cholesterol are expressed relative to cellular protein. Values are means $\pm$ SD.

*Significantly different from control group analyzed by Mann Whitney U test at $p < .05$

二、含植物性雌激素測試物對氧化型低密度脂蛋白增加 THP-1 macrophages 細胞內之總膽固醇堆積之影響

先以 PMA 處理 THP-1 細胞 72 小時，再以氧化型低密度脂蛋白 (oxLDL) 50 $\mu\text{g/ml}$ 培養 THP-1 macrophages 48 小時後，測量細胞內總膽固醇含量，並將數值除以蛋白質濃度校正。

Control 組最後得到之膽固醇含量總平均為 33.73 ± 5.70 ($\mu\text{g cholesterol/mg protein}$)，oxLDL treatment 組之總平均則為 49.01 ± 4.02 ($\mu\text{g cholesterol/mg protein}$)，因此得知以 oxLDL 處理後，細胞內總膽固醇量提升了 45.3%。以各次實驗 control 組之膽固醇含量為 100%，計算以測試物處理細胞後之相對增加或抑制百分比 (圖 4-4)。

結果發現 enterolactone 1 μM 、sesamin 50 μM 、茉莉甲醇萃物 100 $\mu\text{g/ml}$ 及菊花甲醇萃物 100 $\mu\text{g/ml}$ ，與單獨處理 oxLDL 的組別 (oxLDL treatment) 相比，可顯著下降細胞內總膽固醇量。enterolactone 可下降 29.6%，sesamin 可下降 25.4%，茉莉甲醇萃物可下降 42.8%，及菊花甲醇萃物可下降 38.6% 之膽固醇堆積。

但是山藥乙酸乙酯萃物 100 $\mu\text{g/ml}$ 顯著上升細胞內總膽固醇堆積達 93.8%。而苜蓿芽乙酸乙酯萃物組及 genistein 組，與 oxLDL treatment 比較則無顯著差異。

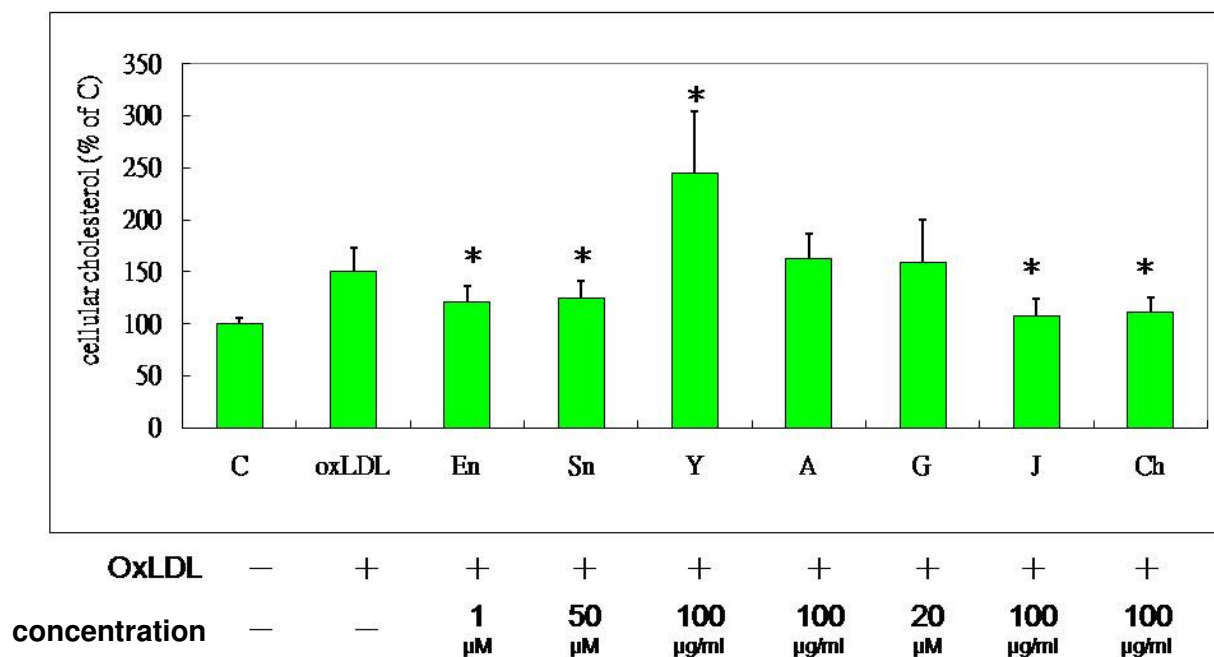


圖 4-4 含植物性雌激素測試物對 oxLDL 處理細胞後之總膽固醇/蛋白質比例之影響

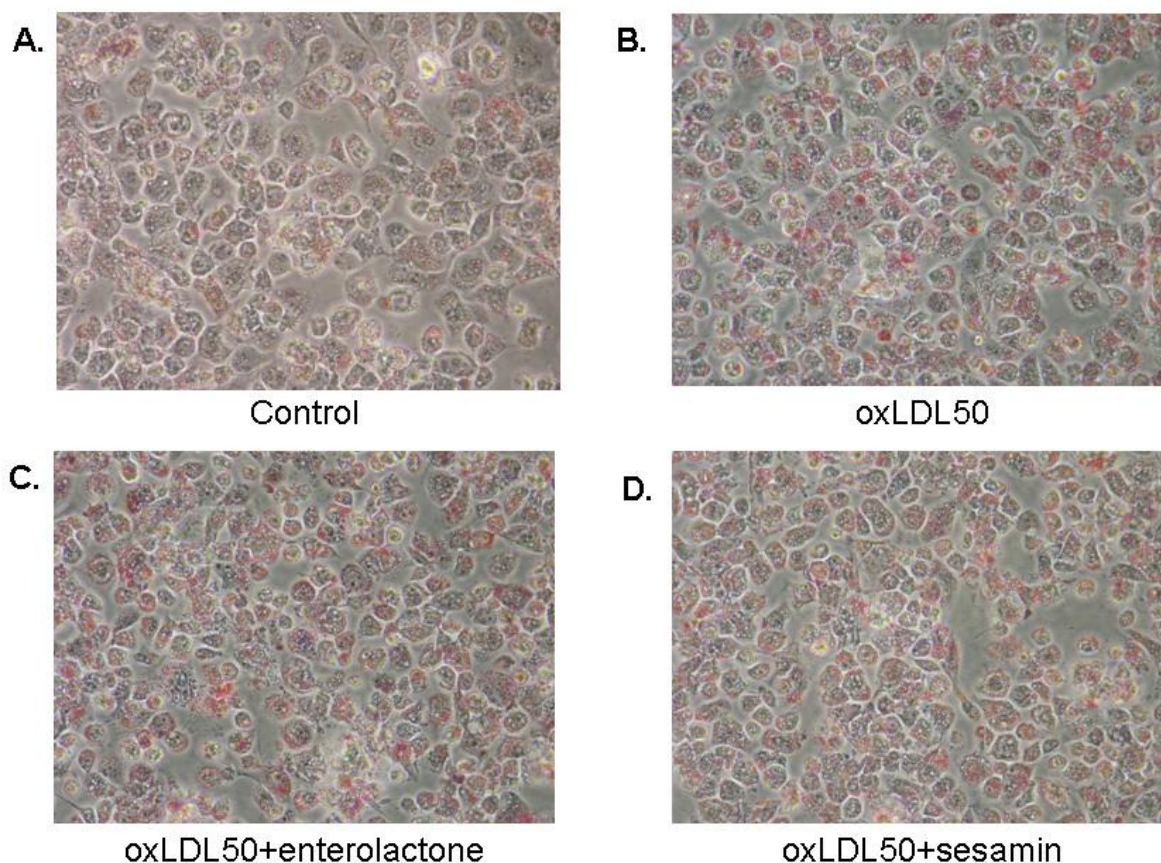
Fig 4-4. The effects of chemicals and extracts on cellular cholesterol in

PMA-differentiated THP-1 macrophages incubated with oxLDL. THP-1 macrophages were treated with enterolactone (En), sesamin (Sn), yam EA extract (Y), alfalfa EA extract (A), genistein (G), jasmine methanol extract (J), and Chrysanthemum methanol extract (Ch) for 2 hrs and then co-cultured with oxLDL at 50 μ g/ml for 48 hrs. Levels of cellular total cholesterol relative to protein were determined and the mean of control was set as 100%. Values are means $\pm$ SD.

*Significantly different from oxLDL analyzed by Mann Whitney U test at $p < .05$

三、含植物性雌激素測試物對氧化型低密度脂蛋白刺激 THP-1 細胞內脂質堆積之影響

THP-1 macrophages 培養 48 小時後，以 Oil-Red-O 染色，依此確定膽固醇酯之生成 (圖 4.5)。之後以 isopropanol 溶解 Oil-Red-O 後，以 500 nm 讀取吸光值，結果如圖 4.6。跟 control 組相比發現，oxLDL treatment 吸光值可增加 1.92 倍，顯著高於 control 組。苜蓿芽乙酸乙酯萃物可增加 4.9 倍，顯著高於 oxLDL treatment；而茉莉甲醇萃物之吸光值為 1.15 倍，顯著低於 oxLDL treatment。另外，sesamin、genistein 之吸光值皆較 oxLDL treatment 低，但未達顯著。



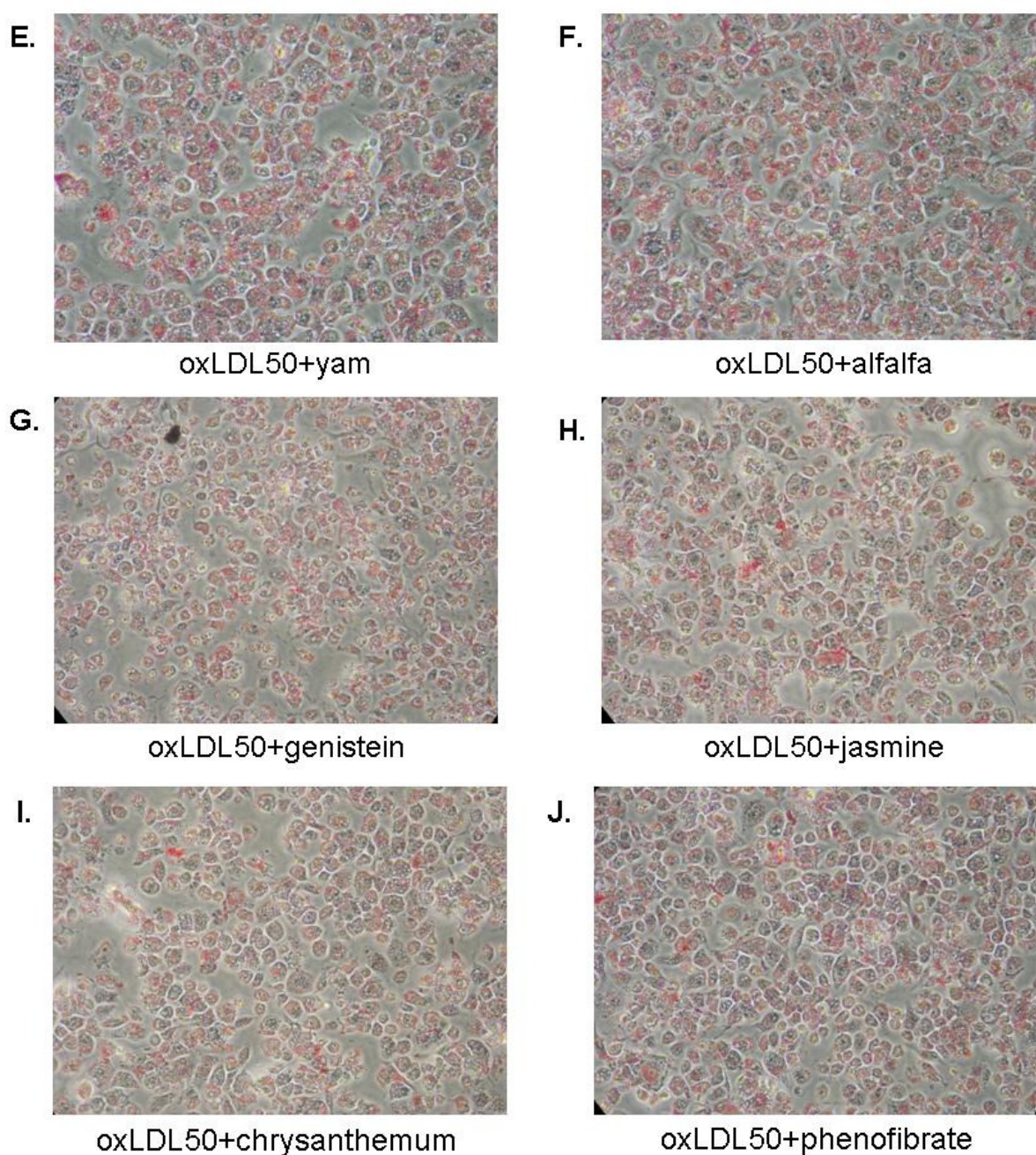


圖 4-5 含植物性雌激素測試物經 oxLDL 處理對泡沫細胞形成之影響

Fig 4-5. Effects of chemicals and extracts on foam cell formation in PMA-differentiated THP-1 macrophages incubated with oxLDL (50 μ g/ml) for 48hrs. THP-1 macrophages were pretreated with the test compounds for 2 hrs followed by oxLDL for 48 hrs. Cells were then stained with Oil-Red-O and then observed by phase-contrast microscopy (200X).

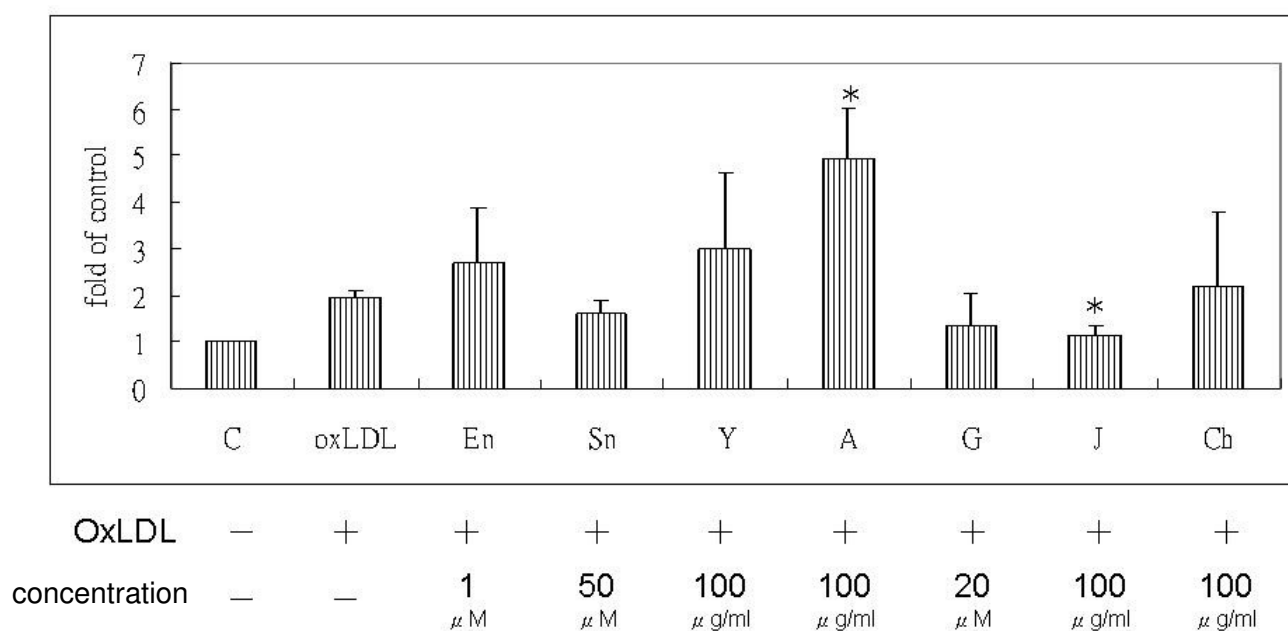


圖 4-6 含植物性雌激素測試物對 oxLDL 處理後對泡沫細胞生成之影響

Fig 4-6. Effects of chemicals and extracts on foam cell formation in

PMA-differentiated THP-1 macrophages incubated with oxLDL (50 μ g/ml) for 48hrs.

THP-1 macrophages were pretreated with the test compounds for 2 hrs followed by

oxLDL for 48 hrs. Cells were then stained with Oil-Red-O and lysed with isopropanol.

Values are means $\pm$ SD.

* Significantly different from oxLDL treatment analyzed by student Mann Whitney U test at $p < .05$

四、含植物性雌激素測試物對 THP-1 macrophages 之 CD36 mRNA 表現的影響

經過共同培養 16 小時後，發現 genistein、茉莉甲醇萃物與菊花甲醇萃物皆能顯著抑制 CD36 mRNA 表現，分別可抑制 30.4% ($p=.05$)，35.9% ($p=.05$)及 27.4% ($p=.05$)。

經過共同培養 48 小時後，發現 enterolactone、sesamin 與 genistein 皆能顯著抑制 CD36 mRNA 表現。Enterolactone 可抑制 29.2% ($p=.05$)，sesamin 可抑制 38.3% ($p=.05$)，genistein 可抑制 52.2% ($p=.05$)。

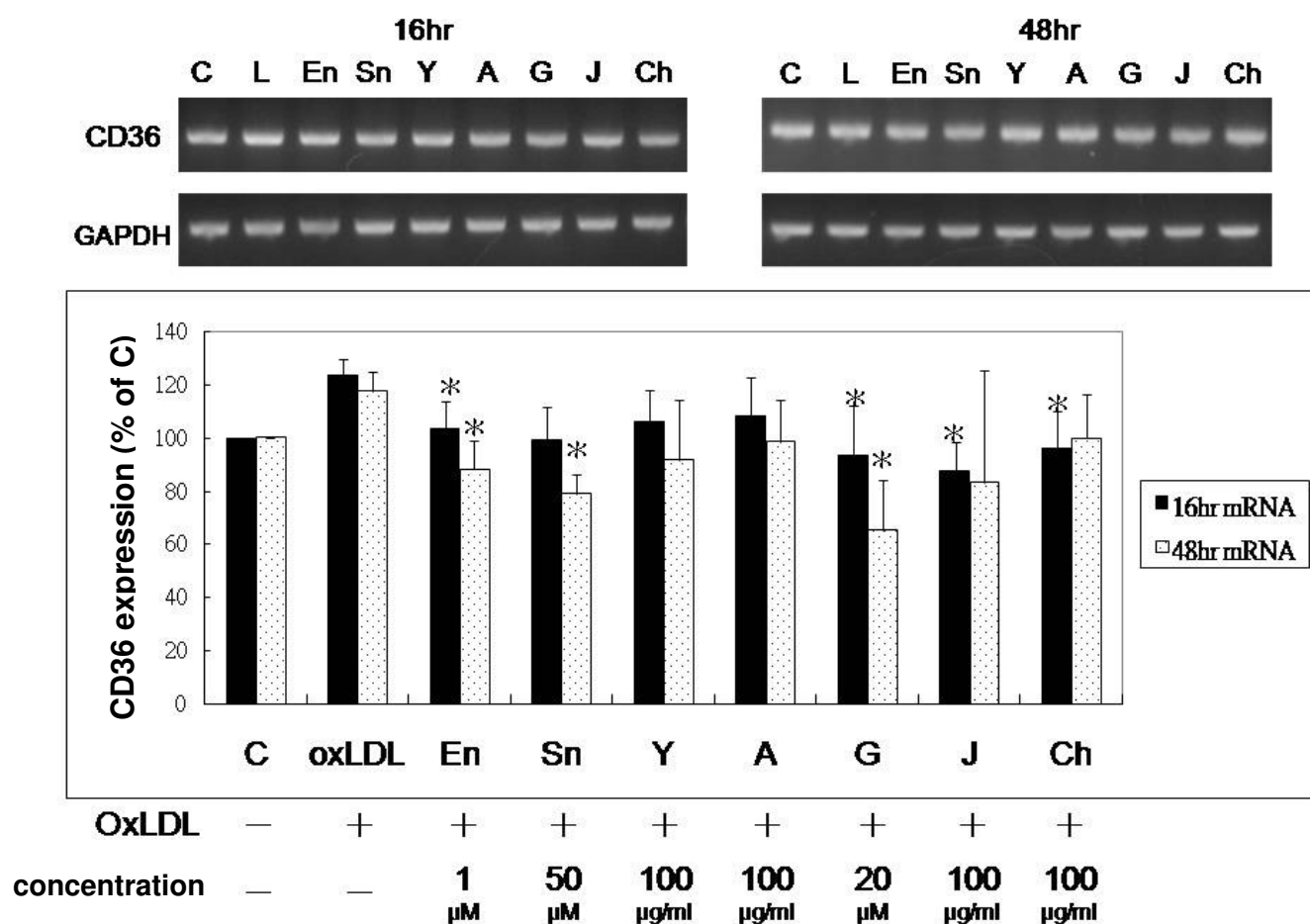


圖 4-7 含植物性雌激素測試物對氧化型低密度脂蛋白刺激細胞後 CD36 mRNA 表現之影響

Fig 4-7. Effects of chemicals and extracts on CD36 mRNA expression in PMA-differentiated THP-1 macrophages incubated with oxLDL (50 μ g/ml) for 16 and 48hrs. THP-1 macrophages were pretreated with the test compounds for 2 hrs followed by oxLDL for 16 and 48 hrs. Expression levels were adjusted by GAPDH mRNA levels and are represented relative to control, which is set as 100%. Values are means $\pm$ SD.

*Significantly different from oxLDL treatment analyzed by Mann Whitney U test at $p < 0.05$.

三、含植物性雌激素測試物對 THP-1 macrophages 之 ABCA1 mRNA 表現的影響

在測試物與 oxLDL 共同培養 16 小時後，發現與 oxLDL 刺激組相較之下，enterolactone、sesamin、genistein 與茉莉甲醇萃物會降低 ABCA1 mRNA ($p=.05$)。

但是培養 48 小時後，所有測試物對於 ABCA1 mRNA 表現量，與 oxLDL treatment 比較皆無顯著差異。

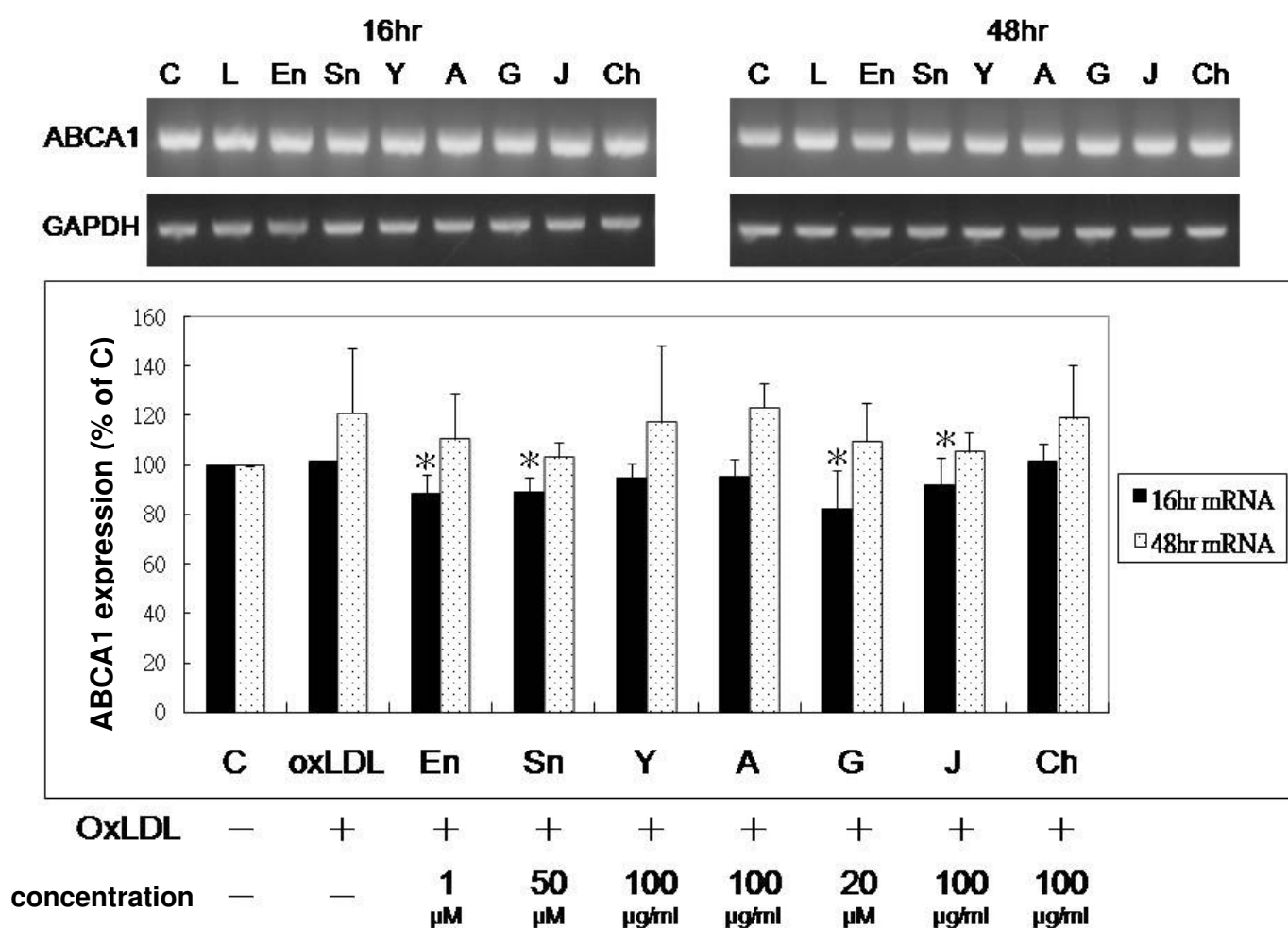


圖 4-8 含植物性雌激素測試物對氧化型低密度脂蛋白刺激細胞後 ABCA1 mRNA 表現之影響

Fig 4-8. Effects of chemicals and extracts on ABC A1 mRNA expression in PMA-differentiated THP-1 macrophages incubated with oxLDL (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 16 and 48hrs. THP-1 macrophages were pretreated with the test compounds for 2 hrs followed by oxLDL for 16 and 48 hrs. Expression levels were adjusted by GAPDH mRNA levels and are represented relative to control, which is set as 100%. Values are means $\pm$ SD.

*Significantly different from oxLDL treatment analyzed by Mann Whitney U test at $p < 0.05$.

第三節 植物性雌激素測試物質對 THP-1 macrophages 表現 促發炎因子之影響

一、含植物性雌激素測試物對 THP-1 macrophages 生成 IL-1 β 之影響

oxLDL treatment 組測得之 IL-1 β 之濃度為 337.7 ± 22.8 pg/ml，而 control 組之濃度為 2.0 ± 3.8 pg/ml。以 oxLDL treatment 組各次實驗的濃度設定為 100%，將實際濃度換算成百分比後，表示如圖 4-9。

本次研究發現，所有測試物皆可顯著下降 THP-1 macrophages 之 IL-1 β 生成量。苜蓿乙酸乙酯萃物組可下降 42.6% ($p < .001$)，山藥乙酸乙酯萃物組可下降 42.1% ($p < .001$)，菊花甲醇萃物組可下降 41.1% ($p < .001$)，genistein 組可下降 35.5% ($p = .003$)，sesamin 組可下降 35.4% ($p < .001$)，enterolactone 組可下降 25.3% ($p < .001$)，茉莉甲醇萃物組可下降 24.0% ($p < .001$)。

其中以山藥、苜蓿乙酸乙酯萃物及菊花甲醇萃物處理的組別下降幅度最高。

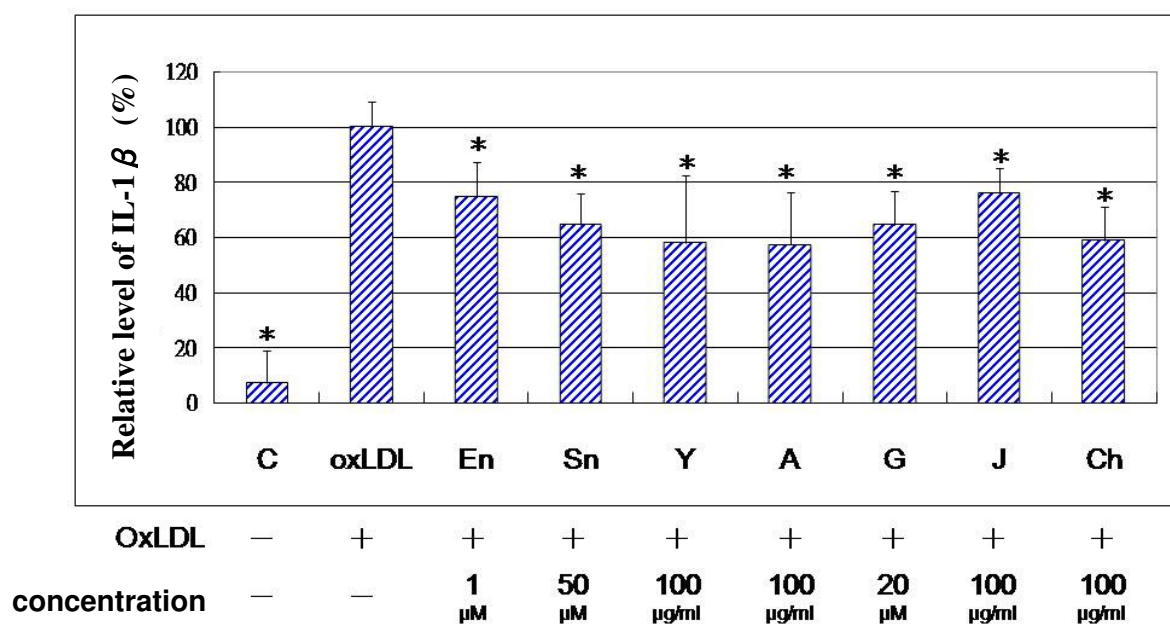


圖 4-9 含植物性雌激素測試物對氧化型低密度脂蛋白刺激 THP-1 細胞生成 IL-1 β 之影響

Fig 4-9. Effects of chemicals and extracts on IL-1 β concentration in PMA-differentiated THP-1 macrophages incubated with oxLDL 50 μ g/ml for 24hrs. THP-1 macrophages were pretreated with the test compounds for 2 hrs followed by oxLDL for 24 hrs.

Medium was collected for IL-1 β analysis using ELISA. The secretion of IL-1 β by cells treated with oxLDL only was expressed as a value of 100. Values are means $\pm$ SD.

*Significantly different from oxLDL treatment analyzed by Mann Whitney U test at $p < 0.05$.

二、含植物性雌激素測試物對 THP-1 macrophages 生成 TNF- α 之影響

oxLDL treatment 組測得 TNF- α 之濃度為 1218.5 ± 113.8 pg/ml，而 control 組之濃度為 8.07 ± 9.09 pg/ml。以 oxLDL treatment 組各次實驗的濃度設定為 100%，將實際濃度換算成百分比後，表示如圖 4-10。

將所有測試物與 oxLDL treatment 相比，除 enterolactone 外，皆可顯著下降 PMA-differentiated THP-1 macrophages 之 TNF- α 生合成量。菊花甲醇萃物組可下降 67.3% ($p < .001$)，genistein 組可下降 62.6% ($p < .001$)，sesamin 組可下降 61.6% ($p = .001$)，苜蓿乙酸乙酯萃物組可下降 52.6% ($p < .001$)，茉莉甲醇萃物組可下降 47.0% ($p < .001$)，山藥乙酸乙酯萃物組可下降 38.2% ($p < .001$)。

其中以 sesamin、genistein 及菊花甲醇萃物處理之組別，可以下降 TNF- α 分泌量的幅度最多，皆可超過 60%。

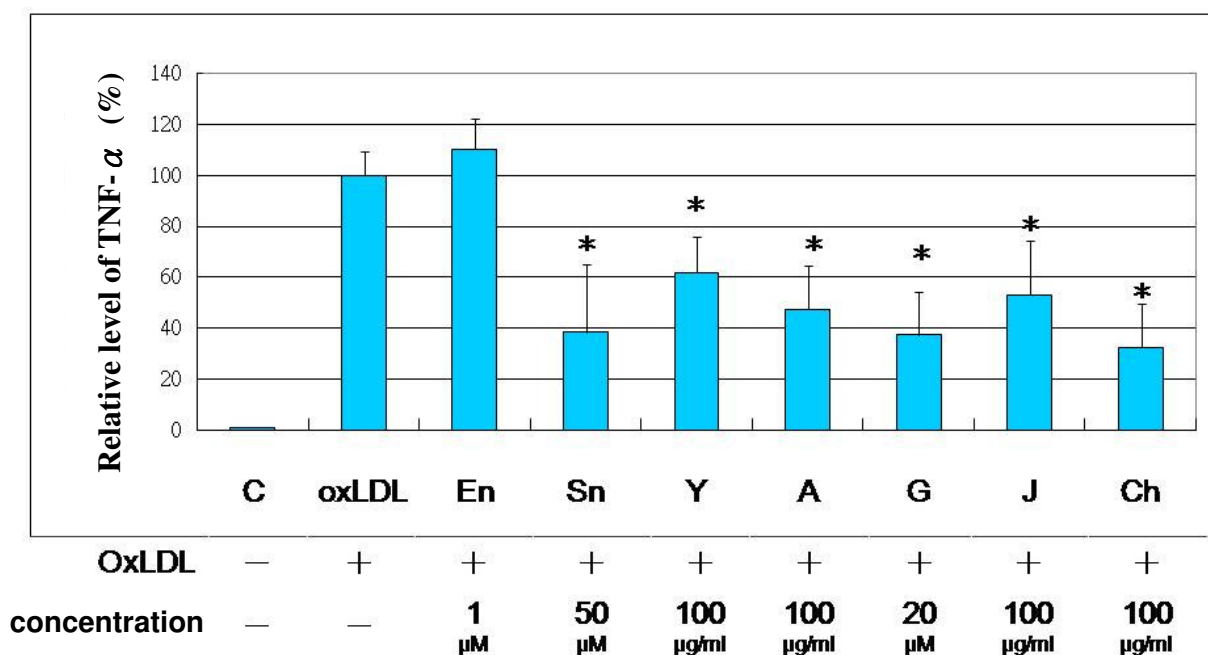


圖 4-10 含植物性雌激素測試物對氧化型低密度脂蛋白刺激 THP-1 細胞生成 TNF- α 之影響

Fig 4-10. Effects of chemicals and extracts on TNF- α concentration in PMA-differentiated THP-1 macrophages incubated with oxLDL 50 μ g/ml for 24hrs. THP-1 macrophages were pretreated with the test compounds for 2 hrs followed by oxLDL for 24 hrs. Medium was collected for TNF- α analysis using ELISA. The secretion of TNF- α by cells treated with oxLDL only was expressed as a value of 100. Values are means $\pm$ SD.

*Significantly different from oxLDL treatment analyzed by Mann Whitney U test at $p < 0.05$.

三、含植物性雌激素測試物對 THP-1 macrophages 生成 MCP-1 之影響

oxLDL treatment 組測得 MCP-1 之濃度為 97.4 ± 41.5 pg/ml。以 oxLDL treatment 組各次實驗的濃度設定為 100%，將實際濃度換算成百分比後，表示如圖 4-11。

將所有測試物質組別與 oxLDL treatment 相比，以 enterolactone、sesamin、genistein、苜蓿芽乙酸乙酯萃物處理之組別，可以顯著下降 MCP-1 之生合成量。山藥乙酸乙酯萃物則是會顯著上升。

Genistein 可下降 32.9% ($p=.007$)，苜蓿芽乙酸乙酯萃物組可下降 25.8% ($p=.002$)，Enterolactone 可下降 24.4% ($p=.002$)，sesamin 可下降 19.8% ($p=.027$)。山藥乙酸乙酯萃物組則會上升 48.4% ($p=.001$)。

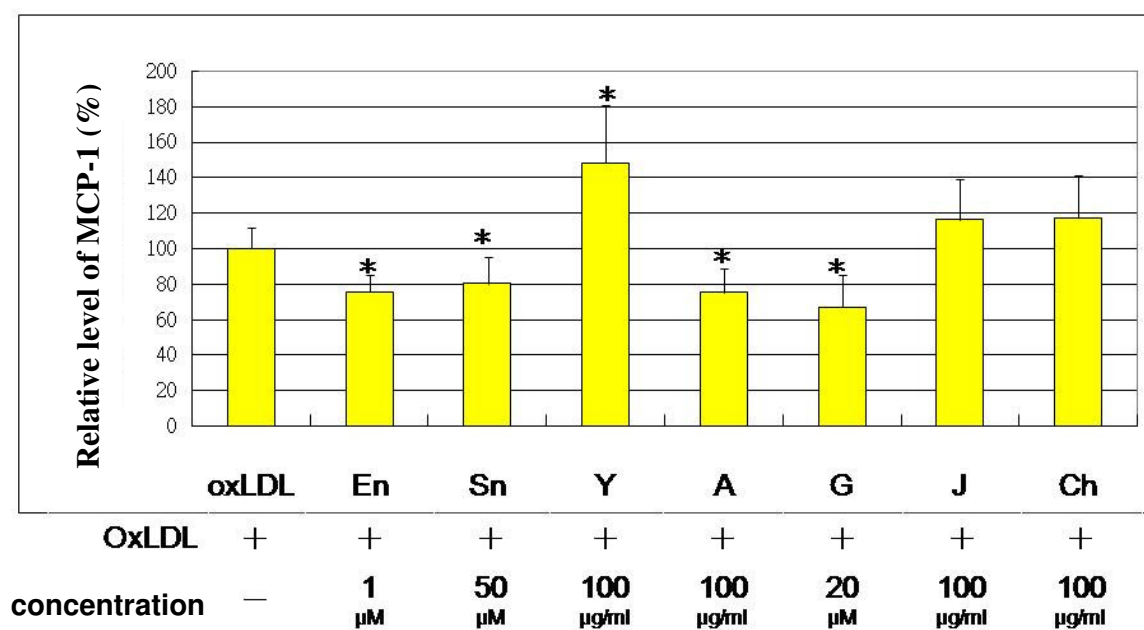


圖 4-11 含植物性雌激素測試物對 THP-1 細胞生成 MCP-1 之影響

Fig 4-11. Effects of chemicals and extracts on MCP-1 concentration in PMA-differentiated THP-1 macrophages incubated with oxLDL 50 μ g/ml for 48hrs. THP-1 macrophages were pretreated with the test compounds for 2 hrs followed by oxLDL for 48 hrs. Medium was collected for MCP-1 analysis using ELISA. The secretion of MCP-1 by cells treated with oxLDL only was expressed as a value of 100. Values are means $\pm$ SD.

*Significantly different from oxLDL treatment analyzed by Mann Whitney U test at $p < 0.05$.

四、含植物性雌激素食材萃物對 THP-1 macrophages 生成 MMP-9 之影響

oxLDL treatment 組測得 MMP-9 之三次實驗平均濃度為 78.12 ± 59.63 mg/ml，control 組則為 35.51 ± 17.86 mg/ml。以 oxLDL treatment 組各次實驗的濃度設定為 100%，將實際濃度換算成百分比後，表示如圖 4-12。

將所有測試物質組別與 oxLDL treatment 相比，以 enterolactone、genistein、山藥乙酸乙酯萃物、苜蓿芽乙酸乙酯萃物處理之組別，可以顯著下降 MMP-9 之生合成量。其中苜蓿乙酸乙酯萃物組可下降 43.1% ($p=.016$)，genistein 可下降 34.2% ($p=.007$)，Enterolactone 可下降 24.5% ($p<.001$)，山藥乙酸乙酯萃物組可下降 12.2% ($p=.001$)。

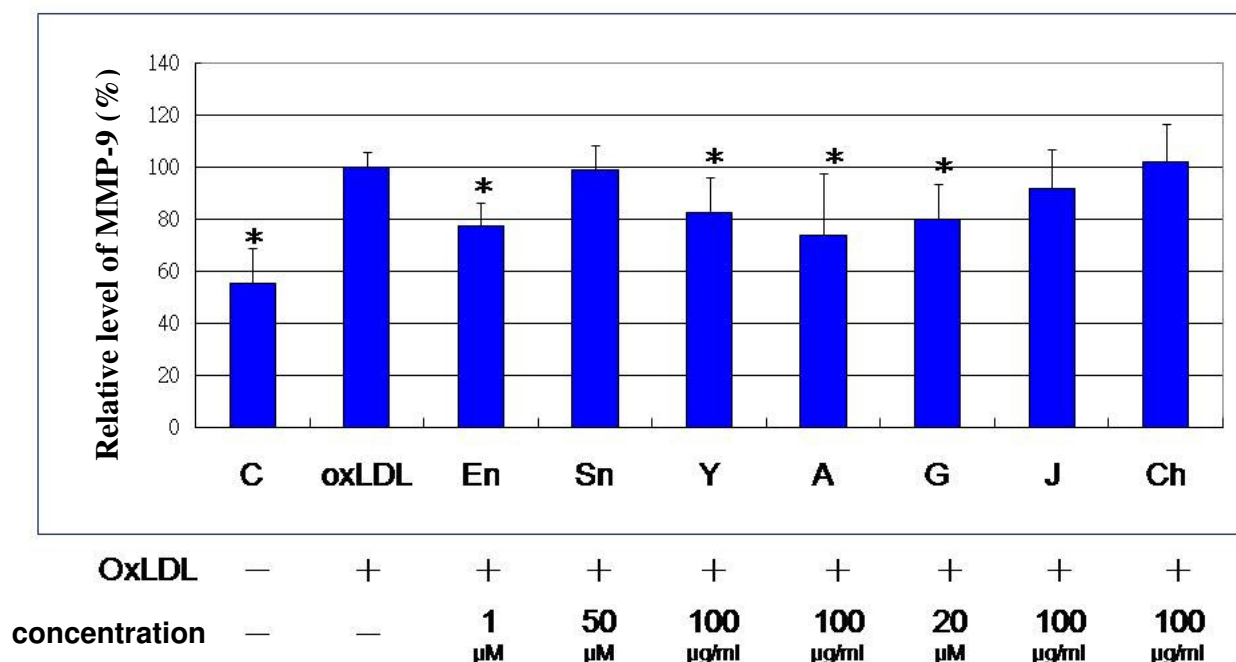


圖 4-12 含植物性雌激素測試物對 THP-1 細胞生成 MMP-9 之影響

Fig 4-12. Effects of chemicals and extracts on MMP-9 concentration in PMA-differentiated THP-1 macrophages incubated with oxLDL 50 μ g/ml for 48hrs. THP-1 macrophages were pretreated with the test compounds for 2 hrs followed by oxLDL for 48 hrs. Medium was collected for MMP-9 analysis using ELISA. The secretion of MMP-9 by cells treated with oxLDL only was expressed as a value of 100. Values are means $\pm$ SD.

*Significantly different from oxLDL treatment analyzed by Mann Whitney U test at $p < 0.05$.

五、含植物性雌激素食材萃物對 THP-1 細胞 IL-1 β mRNA 表現之影響

所有測試物無論於 16 小時或 48 小時測得的 IL-1 β mRNA 表現量，與 oxLDL treatment 相比皆無顯著差異。

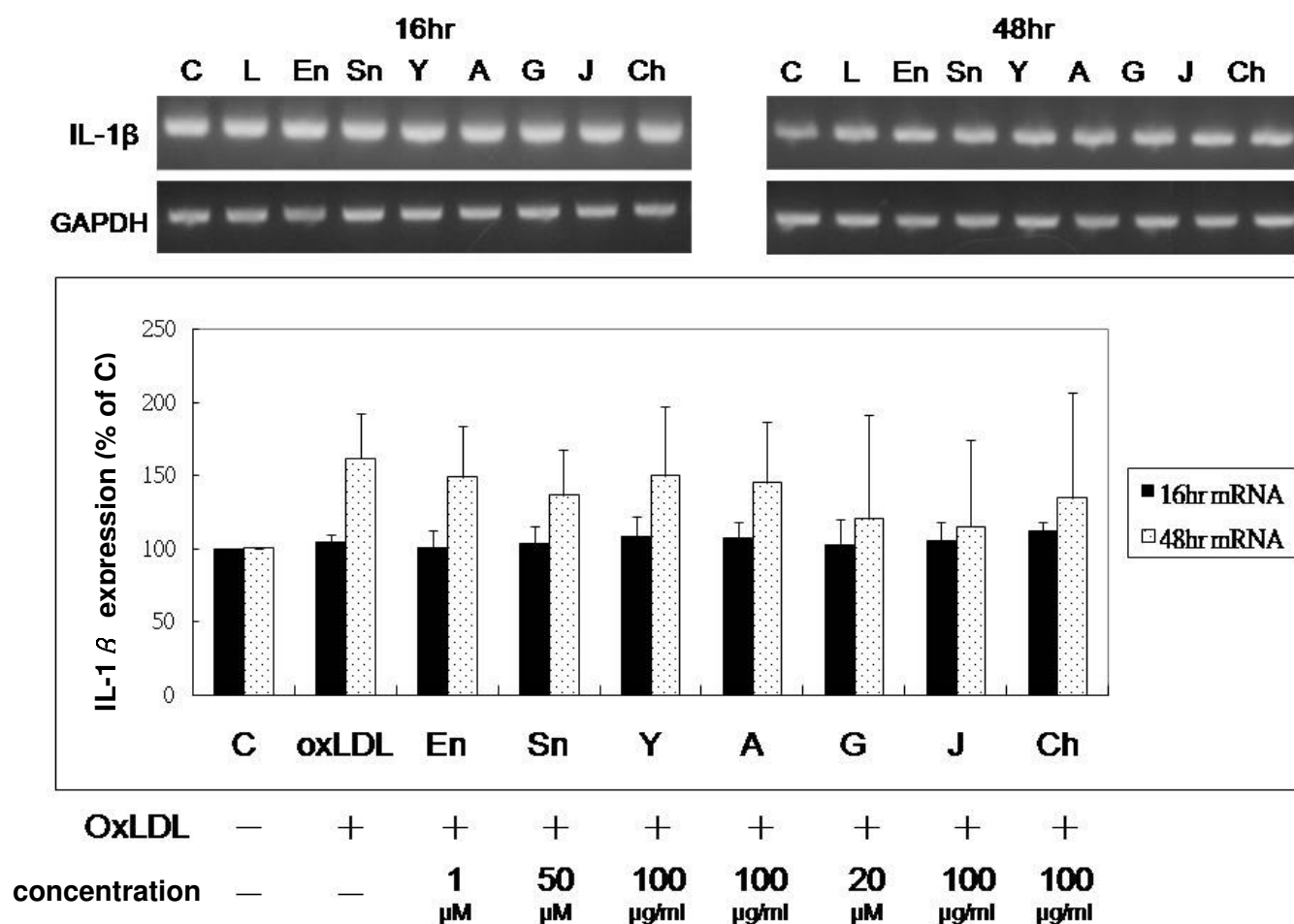


圖 4-13 含植物性雌激素測試物對氧化型低密度脂蛋白刺激細胞後 IL-1 β mRNA 表現之影響

Fig 4-13. Effects of chemicals and extracts on IL-1 β mRNA expression in PMA-differentiated THP-1 macrophages incubated with oxLDL (50 μ g/ml) for 16 and 48hrs. THP-1 macrophages were pretreated with the test compounds for 2 hrs followed by oxLDL for 16 and 48 hrs. Expression levels were adjusted by GAPDH mRNA levels and are represented relative to control, which is set as 100%. Values are means $\pm$ SD. *Significantly different from oxLDL treatment analyzed by Mann Whitney U test at $p < 0.05$.

六、含植物性雌激素食材萃物對 THP-1 細胞 TNF α mRNA 表現之影響

在測試物與 oxLDL 共同培養 16 小時後，enterolactone、sesamin、山藥乙酸乙酯萃物及苜蓿乙酸乙酯萃物，其 TNF- α mRNA 表現顯著低於 oxLDL treatment。而 enterolactone 可下降 12.8%，sesamin 可下降 8.5%，山藥乙酸乙酯萃物可下降 11.1%，苜蓿乙酸乙酯萃物可下降 10%。

但是所有測試物於 48 小時的 TNF α mRNA 表現量，與 oxLDL treatment 相比皆無顯著差異。

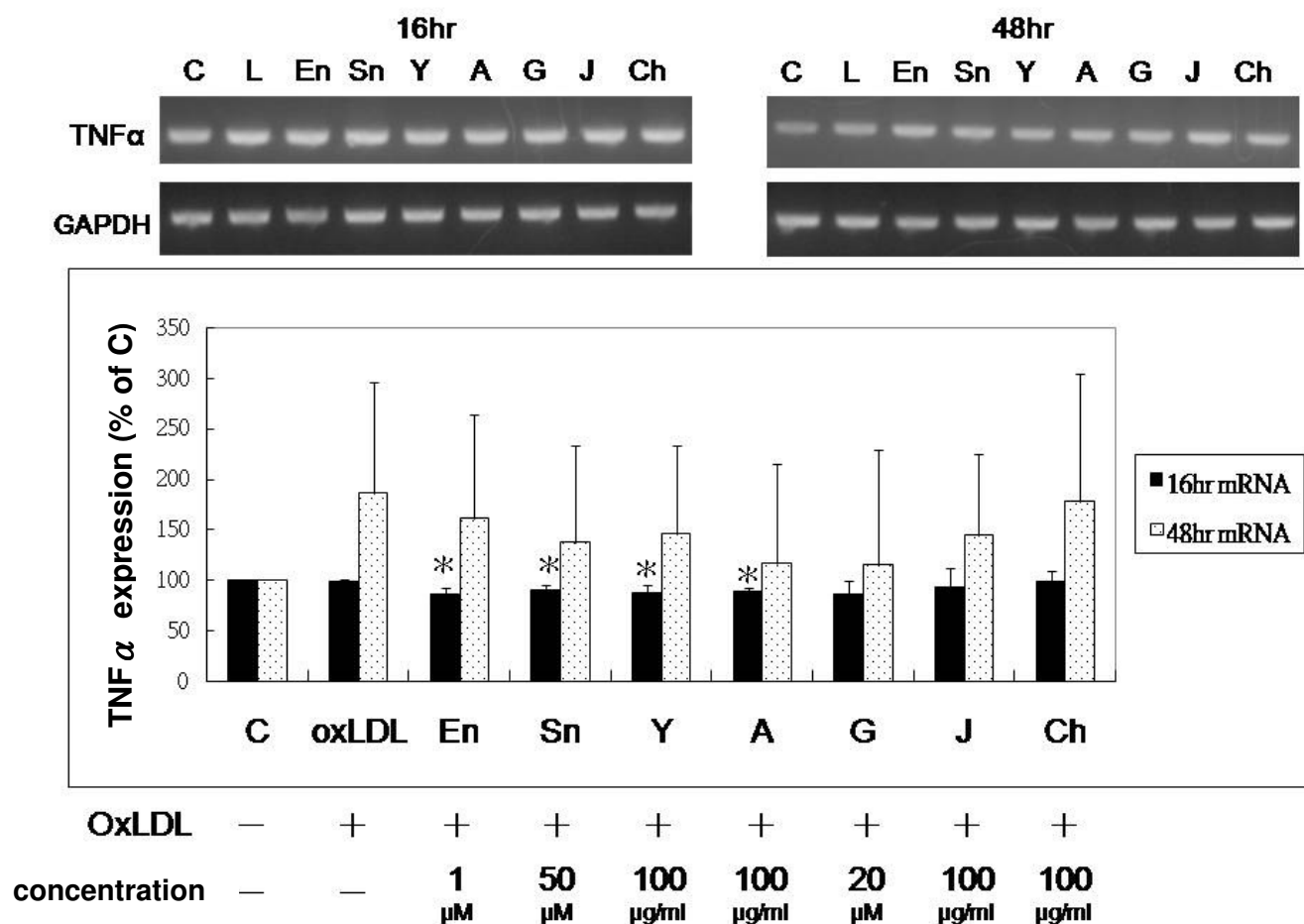


圖 4-14 含植物性雌激素測試物對氧化型低密度脂蛋白刺激細胞後 TNF- α mRNA 表現之影響

Fig 4-14. Effects of chemicals and extracts on IL-1 β mRNA expression in PMA-differentiated THP-1 macrophages incubated with oxLDL (50 μ g/ml) for 16 and 48hrs. THP-1 macrophages were pretreated with the test compounds for 2 hrs followed by oxLDL for 16 and 48 hrs. Expression levels were adjusted by GAPDH mRNA levels and are represented relative to control, which is set as 100%. Values are means $\pm$ SD.

*Significantly different from oxLDL treatment analyzed by Mann Whitney U test at $p < 0.05$.

七、含植物性雌激素食材萃物對 THP-1 細胞 MMP-9 mRNA 表現之影響

本次研究發現，genistein、茉莉甲醇萃物及菊花甲醇萃物可顯著下降 16 小時的 MMP-9 mRNA 表現量。與 oxLDL treatment 相比，genistein 可降低 27.8%，茉莉甲醇萃物可降低 31%，而菊花甲醇萃物可降低 45.3%。

所有測試物於 48 小時測得的 MMP-9 mRNA 表現量，與 oxLDL treatment 皆無顯著差異。

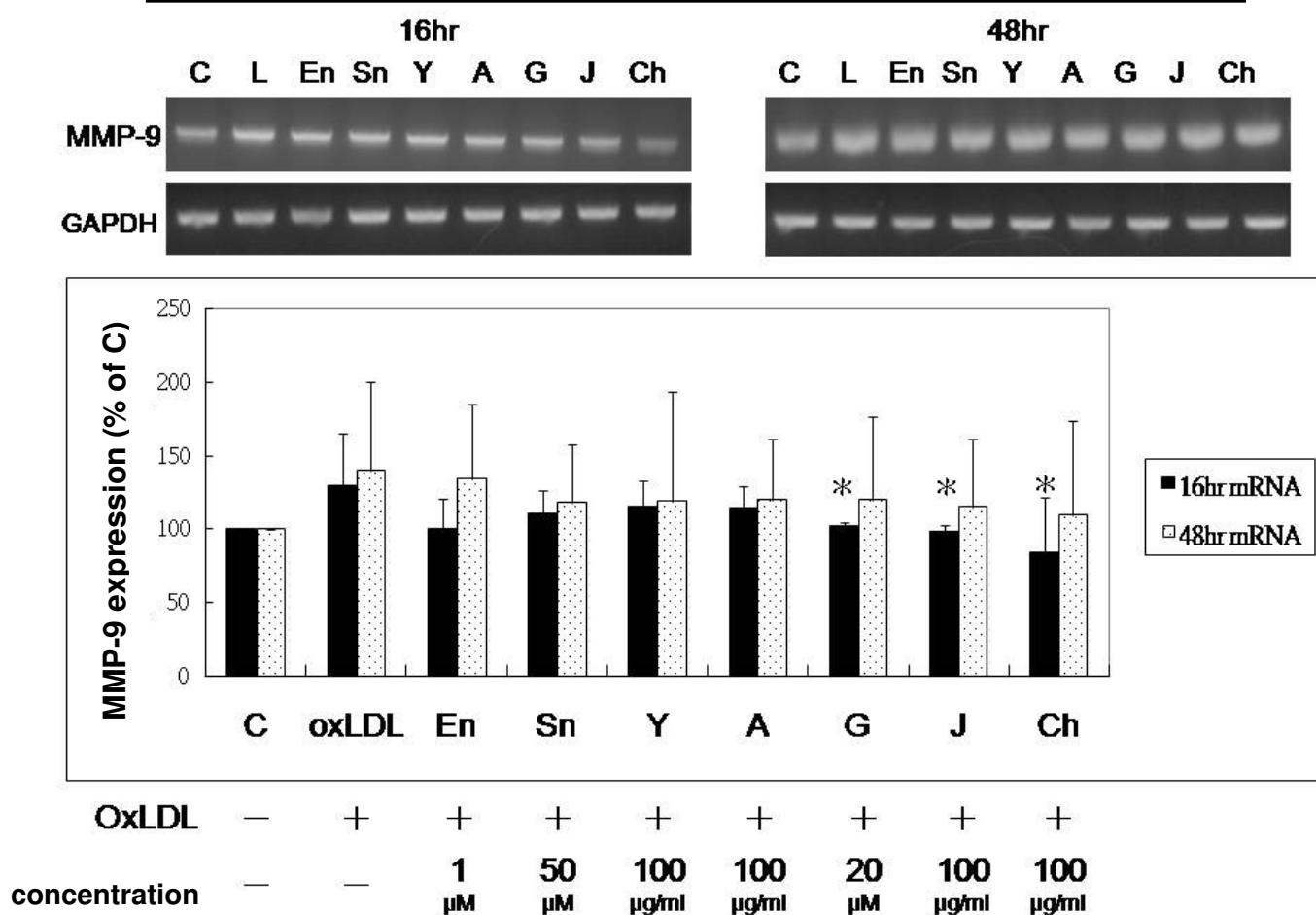


圖 4-15 含植物性雌激素測試物對氧化型低密度脂蛋白刺激細胞後 MMP-9 mRNA 表現之影響

Fig 4-15. Effects of chemicals and extracts on MMP-9 mRNA expression in PMA-differentiated THP-1 macrophages incubated with oxLDL (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 16 and 48hrs. THP-1 macrophages were pretreated with the test compounds for 2 hrs followed by oxLDL for 16 and 48 hrs. Expression levels were adjusted by GAPDH mRNA levels and are represented relative to control, which is set as 100%. Values are means $\pm$ SD.

*Significantly different from oxLDL treatment analyzed by Mann Whitney U test at $p < 0.05$.

第四節 含植物性雌激素測試物對 THP-1 細胞 MMP-9 活性之影響

所有測試物組別與 oxLDL treatment 相比，以 enterolactone、genistein、山藥乙酸乙酯萃物及苜蓿芽乙酸乙酯萃物處理之組別，可以顯著下降 MMP-9 之活性。Genistein 可下降 23.4% ($p=.005$)，Enterolactone 可下降 21.3% ($p=.005$)，山藥乙酸乙酯萃物可下降 13.9% ($p=.005$)，而苜蓿芽乙酸乙酯萃物可下降 13.6% ($p=.031$)。

而菊花甲醇萃物處理之組別雖然也有下降 MMP-9 活性之趨勢，但在統計上未達顯著 ($p=.090$)。

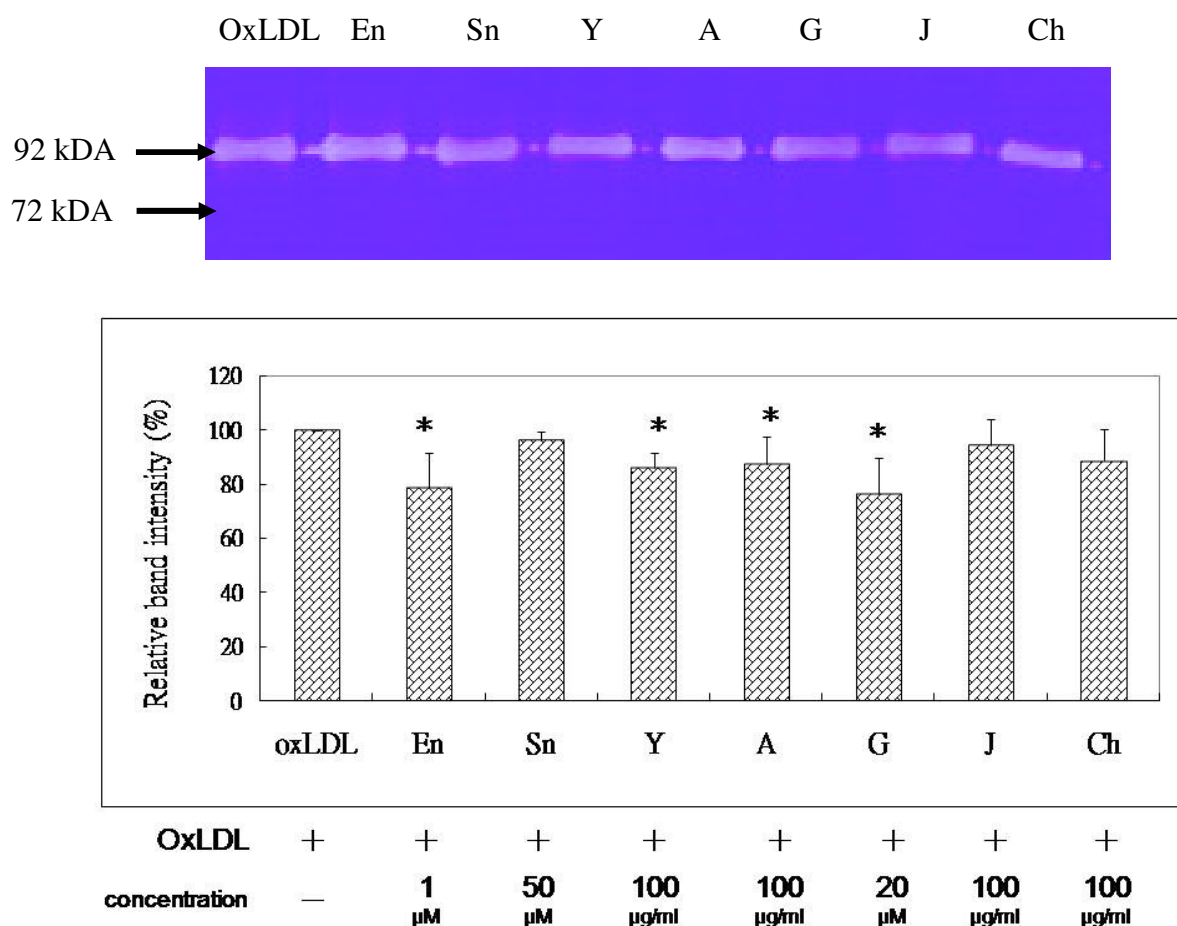


圖 4-16 含植物性雌激素測試物對氧化型低密度脂蛋白刺激細胞後 MMP-9 活性之影響

Fig 4-16. Effects of chemicals and extracts on MMP-9 activity in PMA-differentiated THP-1 macrophages incubated with oxLDL 50 μ g/ml for 48hrs. THP-1 macrophages were pretreated with the test compounds for 2 hrs followed by oxLDL for 48 hrs. Supernatant was collected for assaying MMP-9 activity by gelatin zymography. Values are means $\pm$ SD.

*Significantly different from oxLDL treatment analyzed by student Mann Whitney U test at $p < .05$.

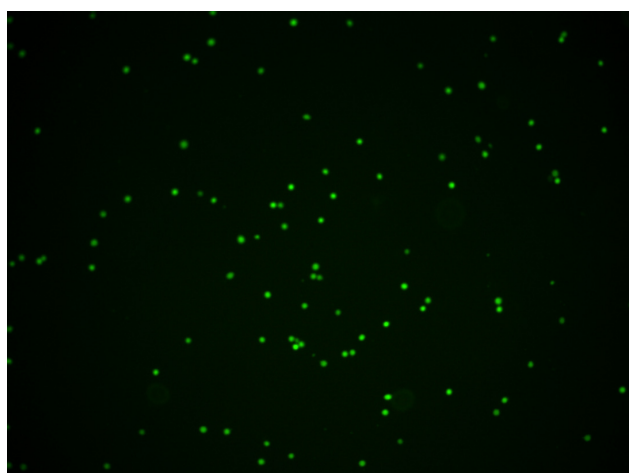
第五節 含植物性雌激素測試物對人類主動脈內皮細胞

HAEC 細胞與 THP-1 細胞黏附之影響

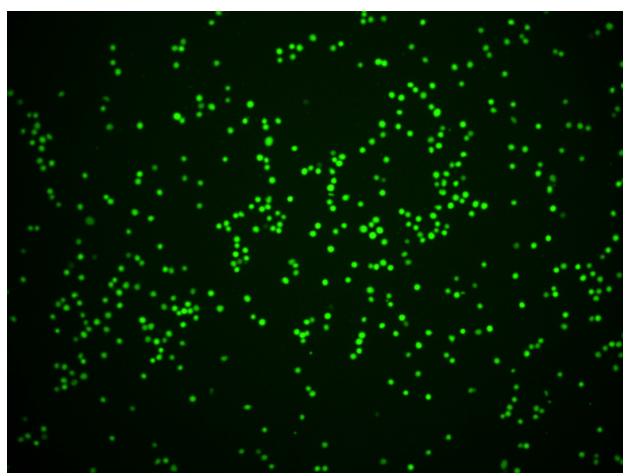
將 control 組測得之螢光強度訂為 100，而 oxLDL treatment 組別之比值為 212.5 ± 56.7 。

所有測試物質組別與 oxLDL treatment 組相比發現，皆可顯著下降內皮細胞與單核球型態 THP-1 間的黏附情形 ($p < .001$) (圖 4-17)。

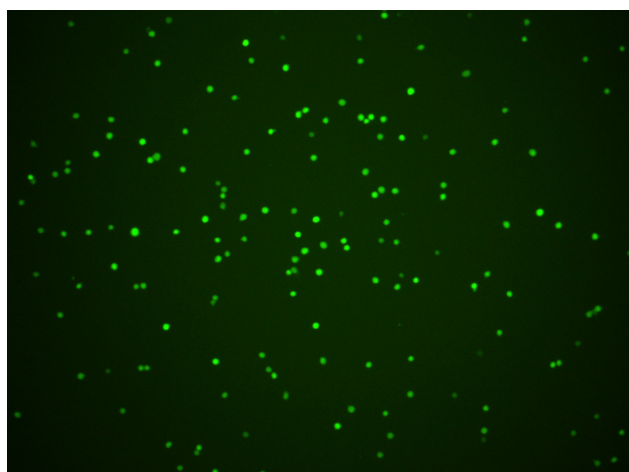
其中，enterolactone 之比值為 134.2 ± 28.4 ，sesamin 之比值為 153.9 ± 28.3 ，genistein 之比值為 125.2 ± 46.4 ，山藥乙酸乙酯萃物之比值為 106.2 ± 27.2 ，苜蓿芽乙酸乙酯萃物之比值為 127.6 ± 30.5 ，茉莉甲醇萃物之比值為 138.4 ± 48.1 ，菊花甲醇萃物之比值為 131.4 ± 27.6 。



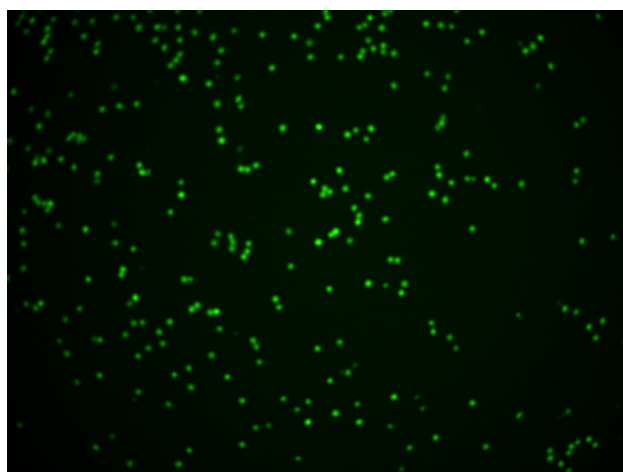
(A) Control



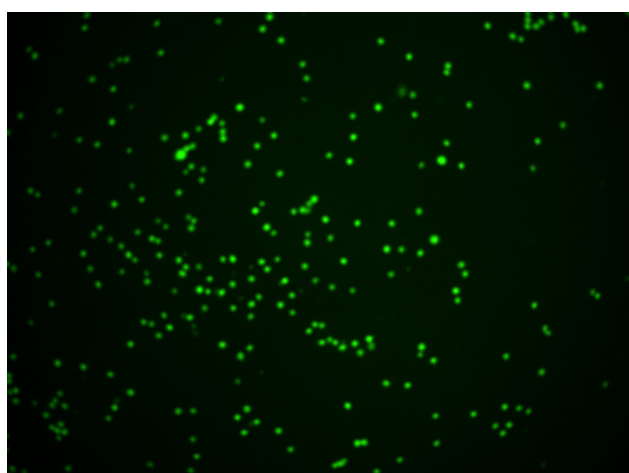
(B) oxLDL



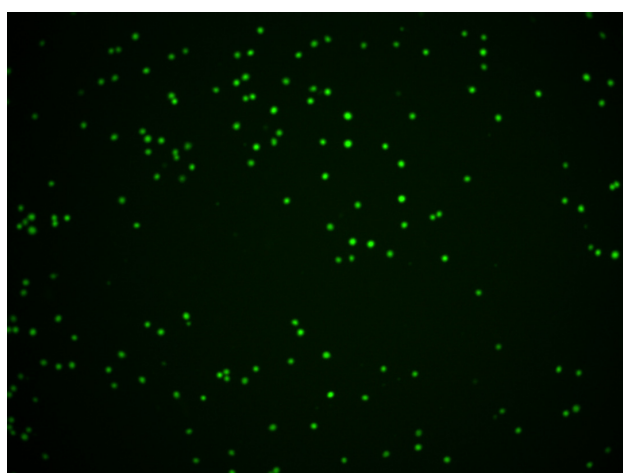
(C) oxLDL + Enterolactone



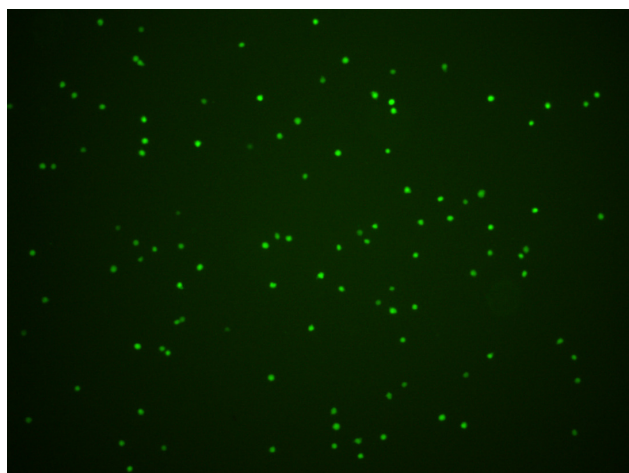
(D) oxLDL + Sesamin



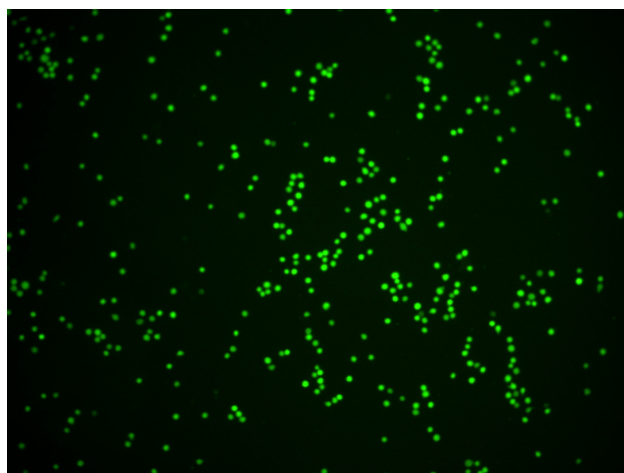
(E) oxLDL + Yam



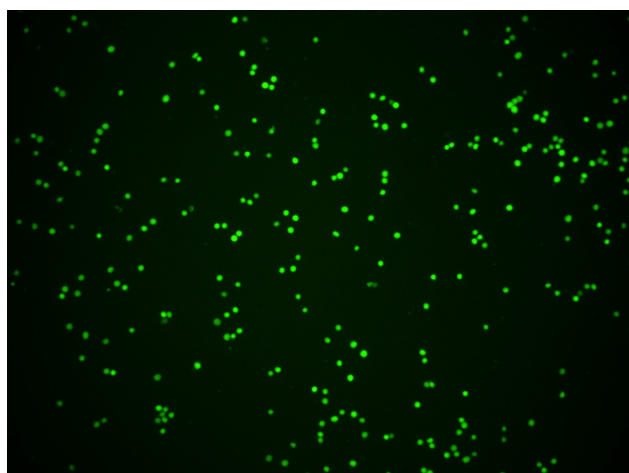
(F) oxLDL + Alfalfa



(G) oxLDL + Genistein



(H) oxLDL + Jasmine



(H) oxLDL + Chrysanthemum

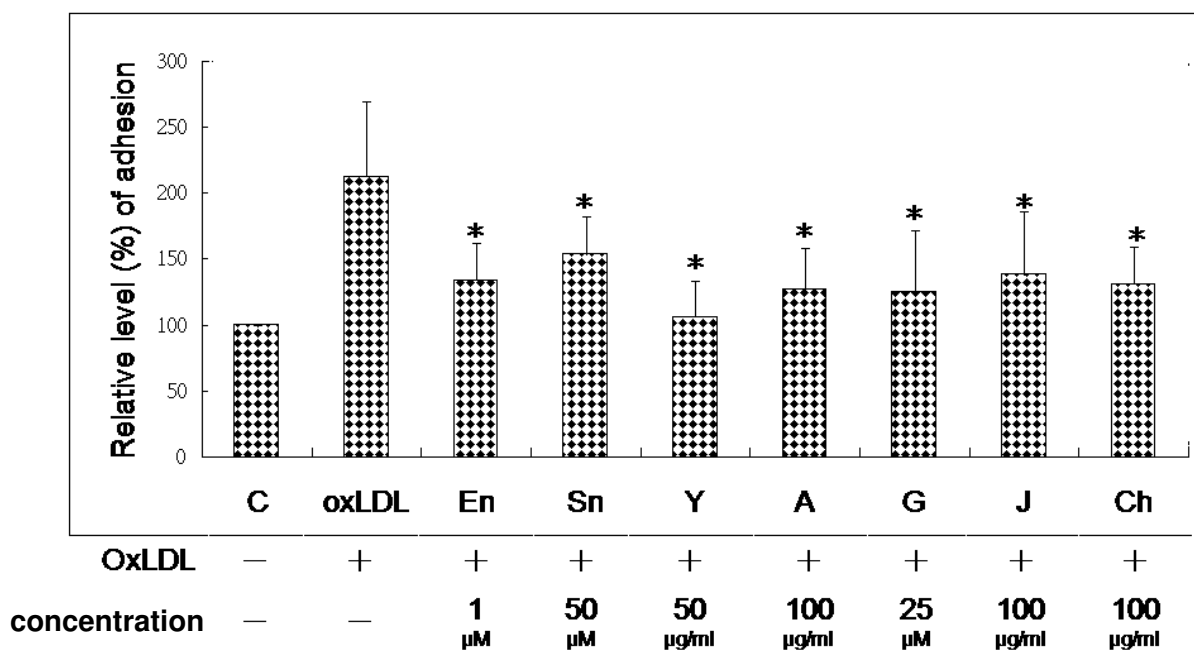


圖 4-17 含植物性雌激素食材萃物對 HAEC 與 monocytic THP-1 黏附之影響

Fig 4-17. Effects of chemicals and extracts on adhesion of monocytes to HAECs.

HAECs were treated with test compounds and oxLDL 50 μ g/ml for 24 hrs and then co-cultured with fluorescence labeled-monocytic THP-1 for 1 h. Values are means $\pm$ SD.

*Significantly different from oxLDL treatment analyzed by student Mann Whitney U test at $p < .05$

第六節 含植物性雌激素測試物對 HAEC 細胞 MCP-1 分泌量之影響

oxLDL treatment 組測得 MCP-1 之三次實驗平均濃度為 $169.45 \pm 90.91 \text{ pg/ml}$ ，而 control 組之濃度為 $74.34 \pm 33.59 \text{ pg/ml}$ 。以 oxLDL treatment 組各次實驗的濃度設定為 100%，將實際濃度換算成百分比後，表示如圖 4-18。

Control 組確實顯著低於 oxLDL treatment，相差 53%；而在本次實驗測試物部分，菊花甲醇萃物、苜蓿芽乙酸乙酯萃物與 sesamin 可以顯著抑制被 oxLDL 刺激之內皮細胞分泌 MCP-1 的量，分別可以下降 38%、28.6%及 25.1%。

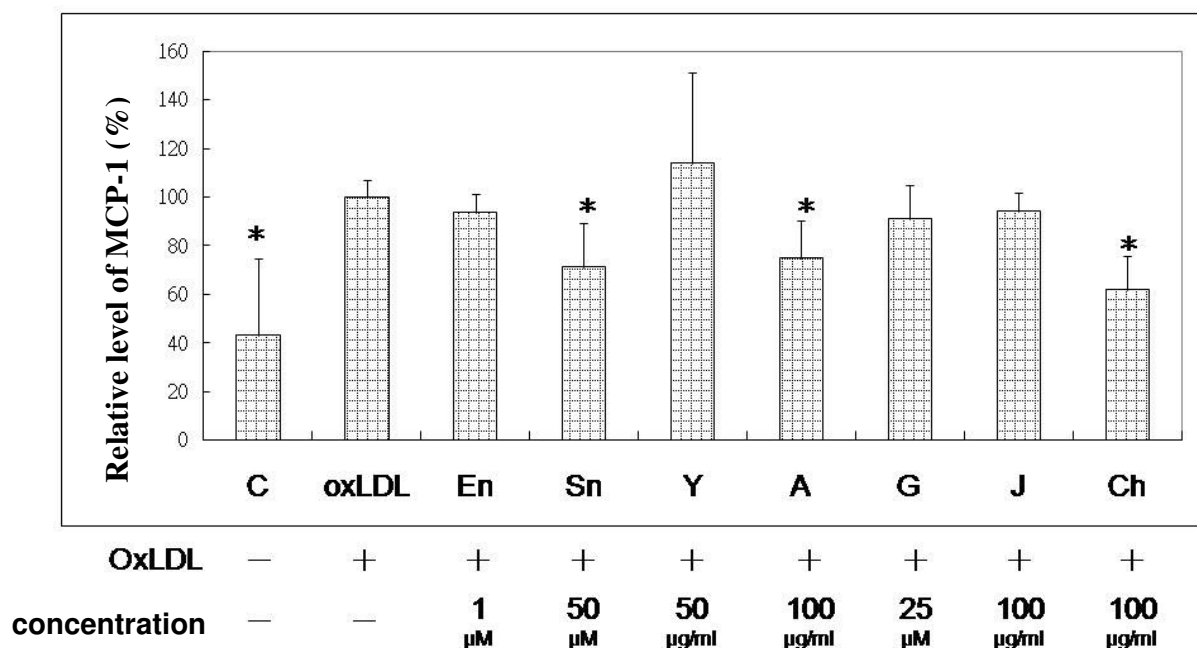


圖 4-18 含植物性雌激素食材萃物對 HAEC 分泌 MCP-1 之影響

Fig 4-18. Effects of chemicals and extracts on MCP-1 concentration in HAEC incubated with oxLDL 50 μ g/ml for 24 hrs. HAECs were treated with test compounds and oxLDL together for 24 hrs. Medium was collected for MCP-1 analysis using ELISA. The secretion of MCP-1 by cells treated with oxLDL only was expressed as a value of 100. Values are means $\pm$ SD.

*Significantly different from oxLDL treatment analyzed by student Mann Whitney U test at $p < .05$

第五章 討論與結論

一、對巨噬細胞膽固醇、脂質堆積之影響

動脈粥狀硬化的發生過程是一連串複雜的生化反應，LDLR (LDL-receptor), LXR α , PPARs (α , γ), CD-36 彼此間 cross-talk 的基因表現與膽固醇代謝、動脈粥狀硬化有關 (Kaul, 2001)。巨噬細胞會經由清除者受器將 oxLDL 攝入，於細胞內堆積成膽固醇酯，不斷累積膽固醇酯的巨噬細胞最終會形成泡沫細胞，且清除者受器會高度表現於動脈粥狀硬化損傷處 lipid-laden 的巨噬細胞上 (Nakata *et al.*, 1999)。CD36 與 scavenger receptor class A (SR-A) 為巨噬細胞中主要負責攝入修飾型脂蛋白的主要受器，兩者可共同負責 75~90% acetylated 及 oxidized LDL 之降解與攝入 (Kunjathoor, *et al.* 2002)，且缺乏 CD36 的 monocyte-derived-macrophages 與正常細胞相比，會減少 40~50% 與細胞結合的 oxLDL (Nozaki *et al.*, 1995)。LDL 氧化時會形成一種氧化的磷脂質，與 CD36 有高度親和力 (Podrez, E. A. *et al.*, 2002)。CD36 表現下降時，會減少巨噬細胞對 oxLDL 的攝入，減緩泡沫細胞生成，而有助於減緩動脈粥狀硬化 (Janabi *et al.*, 2000)。Kaempferol、rhamnocitrin 及 aged garlic extract 皆可顯著抑制與 oxLDL 共同培養之 PMA-differentiated THP-1 macrophages 上 CD36 的表現，且皆可抑制巨噬細胞對 oxLDL 之攝入 (Ide, N., Keller, & Weiss, 2006; Tu *et al.*, 2007)。本研究欲檢視各種含植物性雌激素活性之測試物質，是否也可以透過減少 CD36 mRNA 表現，減少巨噬細胞對 oxLDL 之攝入，下降細胞內總膽固醇量，進而延緩泡沫細胞形成。

Oil-Red-O 能對膽固醇酯、中性脂肪進行染色，可用以觀察巨噬細胞內脂質堆積情形 (Kruth, 1984)，Rahaman 等人 (2006) 與 Pordez 等人 (2000) 亦應用此法作為判斷泡沫細胞生成的依據。由本次染色結果發現苜蓿芽乙酸乙酯萃取物之吸光值顯著高於 oxLDL treatment，茉莉甲醇萃取物則顯著低於 oxLDL treatment，故推測在本實驗條件下，苜蓿芽乙酸乙酯萃取物會增進細胞內脂質、膽固醇酯的堆積，可能促進泡沫細胞生成，而茉莉甲醇萃取物則能抑制細胞內脂質、膽固醇酯的堆積，具有減緩泡沫細胞生成的潛力。

然而，Oil-red-O 除了能對膽固醇酯進行染色，也會染到中性脂肪。因此，為了辨別細胞內膽固醇之堆積是否確實增加，便檢測了巨噬細胞內總膽固醇濃度。在本實驗模式下，oxLDL 確實能引起巨噬細胞內總膽固醇堆積，顯著增加了 1.5 倍之多。在本實驗所有測試物中，以 enterolactone、sesamin、茉莉甲醇萃物及菊花甲醇萃物能有效抑制細胞內總膽固醇量。比較 Oil-red-O staining 和膽固醇堆積量的結果發現，sesamin、山藥乙酸乙酯萃物及茉莉甲醇萃物之 Oil-red-O 染色與細胞內膽固醇量趨勢相符。由此，我們推測 sesamin 及茉莉甲醇萃物具有減緩泡沫細胞生成的潛力。

為了探究測試物能降低細胞內膽固醇堆積的可能原因，我們分析測試物對於巨噬細胞 CD36 mRNA 表現的影響。結果發現，在培養 16 小時後，enterolactone、genistein、茉莉及菊花甲醇萃物可顯著抑制 CD36 mRNA 表現，而培養 48 小時後，enterolactone、sesamin 及 genistein 亦能顯著抑制 CD36 mRNA。所以我們推測 enterolactone、sesamin、茉莉甲醇萃物及菊花甲醇萃物，能夠經由抑制 CD36 表現而減少細胞內膽固醇堆積。

數個臨床試驗研究發現，每日補充 flaxseed 的飲食 (30-50g/day)，對於血脂正常或過高的受試者，皆可發揮有益的功效，可下降血清總膽固醇及 LDL-C (Cunnane *et al.*, 1995; Lucas *et al.*, 2002; Patade *et al.*, 2008)，而有助於延緩動脈粥狀硬化。另外，使用 hamster 卵巢切除小鼠的研究指出，飼料中添加有 flaxseed 的組別，可避免血漿總膽固醇升高，並可減少脂肪條面積及損傷之發生 (Lucas *et al.*, 2004)。而 flaxseed 於腸胃道經腸內菌代謝後產生 enterolactone，進入血液循環。本研究發現，enterolactone 能透過抑制 16 小時及 48 小時之 CD36 mRNA 表現，而減少細胞內總膽固醇堆積量，有助於減少泡沫細胞生成，推測能幫助減少脂肪條面積，而與以上研究結果相符。

山藥 (*Dioscorea rhizome*) 能顯著降低高血脂兔子的 thoracic aorta 的 atherosclerotic lesion (Chang WC, 2005)。本研究發現山藥乙酸乙酯萃物能顯著增加細胞內總膽固醇量，但是由於 CD36 mRNA 表現量並未上升，所以可能透過別的機轉。由於本實驗條件並沒有加入 apoA I 或 HDL，所以 free cholesterol 並無法透

過 ABCA1 的作用排出。山藥乙酸乙酯萃取物促進細胞內總膽固醇量，可能是經由其他的途徑，例如促進 SR-A 的表現或胞飲作用而來。就我們這個細胞實驗模式，與 Chang *et al.* (2005) 的動物實驗結果似乎不符合，可能是因為動物實驗以山藥粉餵食，山藥粉中含有能降血脂的膳食纖維及皂素等物質，所以達到減少動脈損傷的效果。可是本研究使用的是乙酸乙酯萃取物，因此結果不符。且最近有研究指出，餵食山藥乙酸乙酯萃取物的去卵巢小鼠體內，血清總膽固醇量有較控制組增加之趨勢（吳夢婷, 2008）。所以關於山藥乙酸乙酯萃取物的抗動脈粥狀硬化作用需要進一步探討。

苜蓿乙酸乙酯萃取物的細胞內總膽固醇量與 oxLDL treatment 無顯著差異，而檢測了 CD36 mRNA 表現量後也發現同樣沒有差異，故推測苜蓿乙酸乙酯萃取物並不會影響 CD36 mRNA 表現和細胞內膽固醇堆積。然而 Oil-red-O 染色的實驗結果為苜蓿乙酸乙酯萃取物顯著高於 oxLDL treatment，可能由於苜蓿萃取物含有脂質（由於乙酸乙酯的極性）被巨噬細胞所攝入，而染到較多的中性脂肪，導致 Oil-red-O staining 吸光值較高的現象。本實驗室日前發現，以苜蓿乙酸乙酯萃取物餵食 apoE^{-/-} 小鼠，具有減少弓狀動脈內皮層厚度的趨勢（ $p=0.06$ ）。而本細胞實驗模式發現苜蓿乙酸乙酯萃取物並不會刺激膽固醇堆積於巨噬細胞中，因此不會促成斑塊生成，與動物實驗結果相符。

我們發現 genistein 對於細胞內總膽固醇含量無顯著的影響，但具有降低 Oil-red-O 染色值的趨勢，且與 oxLDL 共同培養 16 或 48 小時之後，genistein 皆能顯著抑制 CD36 mRNA 表現。由於 Oil-red-O 僅對膽固醇酯染色，因此不會對游離膽固醇進行染色（Kruth, 1984），所以推測 genistein 可能會影響中性脂肪的堆積或膽固醇的酯化。研究發現 genistein (100 μ M) 能減少 HepG2 細胞內膽固醇酯化達 56%，但是對 acyl-CoA: cholesterol acyltransferase（ACAT）沒有影響（Borradaile *et al.*, 2002）。故我們推測投予 genistein 使得巨噬細胞內膽固醇酯的含量降低，而膽固醇酯的生成與 foam cell 形成有顯著相關，所以 genistein 是否具 anti-atherogenic 潛力可從此方向進行評估。

ABCA1 在 lipid-loaded 巨噬細胞上會被引起高度表現（Langmann, T. *et al.*,

1999)，是促進膽固醇排出的主要路徑。ABCA1 是一種細胞膜上的脂質傳送蛋白 (transporter)，能促進磷脂質及未酯化的膽固醇排出至 apoA- I，以形成 pre- β -HDL (Cuchel & Rader, 2006)。ABCA1 的高度表現 (over-expression) 可以避免斑塊的發生與形成，因此可知 ABCA1 對巨噬細胞膽固醇調節是一個很重要的因素 (Van Eck *et al.*, 2005)。

本研究發現 enterolactone、sesamin、genistein 及茉莉甲醇萃物在刺激 16 小時的 ABCA1 mRNA 表現量有顯著下降，但是所有測試物對於 48 小時的 ABCA1 mRNA 表現均無顯著影響，是否影響巨噬細胞內膽固醇排出仍尚待探討。

二、含植物性雌激素活性測試物之抗發炎效果

1. 對巨噬細胞分泌促發炎細胞激素 TNF α 及 IL-1 β 之影響

免疫系統是一個動態且複雜的網絡，用以辨認及回應受到感染或傷害後的細胞及組織損傷。先天免疫反應的主要影響機制會透過加工或活化 proinflammatory caspases 及細胞激素，而形成急性或慢性的發炎反應，最著名的即是 caspase-1 與 IL-1 β 。Inflammasomes，細胞質內的多種蛋白複合體，作用如同活化 caspase 的支架，最近被認為是調節宿主先天免疫及發炎反應的重要機制 (Johnston, Rahman, & McFadden, 2007)。

許多研究指出，oxLDL 會刺激動脈內 O₂⁻ 形成，增加細胞氧化壓力，活化 MAPK pathway 及轉錄因子 NF κ B，且刺激其調節的基因表現，尤其是促發炎因子的基因，包含 IL-1 β 、TNF α 、MCP-1 等 (Brand *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 1994)。其中 Oxysterols 及 25-hydroxycholesterol 的成分會引起巨噬細胞大量分泌 IL-1 β 並刺激其 mRNA 表現 (Roskint *et al.*, 2002)。不斷分泌的 TNF α 及 IL-1 β 會加重動脈內膜的發炎反應，使內皮細胞及平滑肌細胞受到損傷，且轉變巨噬細胞功能而促進動脈粥狀硬化生成 (Ross, 1999)；所以抑制發炎反應可以減緩動脈粥狀硬化。

雌激素可抑制 NF κ B 活化及其下游 pathway，有助延緩動脈粥狀硬化進程 (White, 2002)。Hamalainen 等人 (2007) 指出，植物性雌激素 genistein 能透過抑制

巨噬細胞中 NF κ B 活化，減少 IL-6、IL-8 之分泌。Sesamin 為一種天然的 PPAR α 配子 (Ide, T. *et al.*, 2004)，而 PPAR α 的活化有助於抑制 NF κ B 活化，減少下游促發炎細胞激素之表現如：TNF α 、IL-6 等 (Delerive, 1999; Inoue *et al.*, 2002)。

本研究結果發現 oxLDL (50 μ g/mL) 並不會顯著增加 un-stimulated monocytic THP-1 的 TNF α 分泌，卻能顯著的提高 THP-1 macrophages 的 IL-1 β 及 TNF α 濃度，可以確認 oxLDL 的誘發 THP-1 macrophage 發炎反應的現象。在純化物方面，genistein 與 sesamin 可顯著下降 oxLDL-stimulated THP-1 macrophages 的 IL-1 β 及 TNF α 濃度，顯示 genistein 與 sesamin 能減少促發炎細胞激素之分泌量，而有抗發炎的作用，與上述研究結果相同。至於它們兩者是否透過抑制 NF κ B 活化，而減少促發炎細胞激素之合成，則有待進一步的探討。而 enterolactone 只顯著抑制 IL-1 β 之分泌量，其 TNF α 分泌量與 oxLDL treatment 無顯著差異。

另外，在萃物測試物部分，發現所有萃物皆可一致且顯著地下降 IL-1 β 及 TNF α 分泌量。研究發現，苜蓿芽乙酸乙酯萃物可有效抑制以 LPS 刺激之 BALB/c 小鼠初代腹腔細胞其 IL-1 β 及 TNF α 分泌量，並在紅斑性狼瘡(SLE)小鼠巨噬細胞模式中發現，山藥乙酸乙酯萃物及苜蓿芽乙酸乙酯萃物皆可抑制 IL-1 β 、TNF α 及 IL-6 之分泌(洪永瀚, 2008)，推測兩種萃物具發抗炎作用，與本研究結果相符。

本實驗觀察各種測試物於反應 16hr 及 48hr 對於 oxLDL-stimulated THP-1 macrophages 的 pro-inflammatory cytokines mRNA 表現的影響。結果發現測試物皆未顯著的影響 IL-1 β mRNA 表現 (16 小時及 48 小時)，然而顯著下降 IL-1 β 濃度 (24 小時)，推測可能由於抑制轉譯後的蛋白質修飾作用(cytokine processing)或者抑制 IL-1 β secretion 所致。Caspase-1 將 pro-IL-1 β 裂解為 IL-1 β (Johnston *et al.*, 2007)，因此這些測試物是否能透過影響 inflammasomes、抑制 caspase-1 活性，進而抑制 pro-IL-1 β 之裂解而降低 IL-1 β 濃度，仍有待進一步實驗證實。

所有測試物中，enterolactone、sesamin、山藥乙酸乙酯萃物及苜蓿芽乙酸乙酯萃物可顯著下降 16 小時之 TNF α mRNA 表現，並且能一致地顯著降低 TNF α 濃度 (24 小時)；故推測 enterolactone、sesamin、山藥乙酸乙酯萃物、苜蓿芽乙酸乙酯萃物、可以透過抑制 TNF- α mRNA 表現，下降促發炎細胞激素之分泌量，而具有抗

發炎之效果。

而 genistein、茉莉甲醇萃物及菊花甲醇萃物皆可顯著下降 TNF α 濃度 (24 小時)，但卻未顯著下降 16 小時之 TNF α mRNA 表現，可能是透過影響 TNF α 的分泌 (secretion) 或轉譯後的蛋白質修飾作用 (cytokine processing)，以降低 TNF α 濃度。

2. 對巨噬細胞分泌 MCP-1 之影響

化學趨化物 (Chemoattractant) 負責聚集單核球，且使單核球轉移 (transmigration) 到損傷部位，而 MCP-1 是內皮細胞及巨噬細胞都會分泌的一種促發炎趨化物，除了使單核球聚集的功能外，他還會引發 ICAM-1 及 tissue factor 的表現，且促進泡沫細胞的形成與堆積 (Boring *et al.*, 1998; Gerard & Rollins, 2001; Reape & Groot, 1999)。

本研究檢測了 oxLDL 刺激巨噬細胞後的 MCP-1 分泌量，發現 enterolactone、genistein 及苜蓿乙酸乙酯萃物能達到顯著抑制的效果。一個以 LPS 誘發巨噬細胞發炎的模式發現，genistein 可顯著下降 MCP-1 分泌 (Nagarajan *et al.*, 2008)。而使用 SLE 小鼠的動物模式中也發現，苜蓿芽乙酸乙酯萃物能顯著降低血清 MCP-1 量 (洪永瀚, 2008)；以上研究結果與本研究相同，推測以上三種測試物可以經由抑制 MCP-1 分泌量，減少單核球的聚集和轉移，而減緩泡沫細胞之生成與堆積。

3. 對巨噬細胞分泌 MMP-9 之影響

基質金屬蛋白酶 (Matrix metalloproteinases, MMPs) 在細胞移行與組織重建上是必須的，TIMP-1 (tissue inhibitors of metalloproteinase) 為 MMP-9 的一種天然抑制劑，能減少 MMP 之活性。在人類單核球衍生的巨噬細胞中，施予 oxLDL 會引起細胞多分泌兩倍的 MMP-9 (Shiffman *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 1999)。本研究將 oxLDL 與巨噬細胞共同培養後，確實會引起 MMP-9 分泌量增加 1.8 倍之多，與 Shiffman *et al.* (2000) 和 Xu *et al.* (1999) 研究結果相符，確認 oxLDL 會促進巨噬細胞 MMP-9 生成。

本研究發現 Enterolactone、genistein、山藥乙酸乙酯萃物及苜蓿芽乙酸乙酯萃

物可以顯著下降 MMP-9 分泌量及活性。推測以上四種測試物質能抑制 MMP-9 活性，是透過增加 TIMP-1 活性之故，尚待後續研究證實。由於 enterolactone、genistein、山藥乙酸乙酯萃物及苜蓿芽乙酸乙酯萃物能夠降低 MMP-9 分泌量及活性，對於穩定斑塊的潛力，值得進一步以動物實驗驗證。由於苜蓿芽乙酸乙酯萃物並不會影響 CD36 mRNA 表現和細胞內膽固醇堆積，而本實驗室發現，苜蓿芽乙酸乙酯萃物減少 apoE^{-/-} 小鼠弓狀動脈內皮層厚度的趨勢 (p=.06)，它是否能經由減少細胞移行或穩定斑塊的作用而具 anti-atherogenic 作用，則需進一步的研究。

三、對內皮細胞與單核球黏附之影響

單核球聚集並且與內皮細胞黏附是動脈粥狀硬化早期的一項特徵。經由數筆研究發現，雌激素可抑制內皮細胞與單核球間的黏附作用 (Gao *et al.*, 2006; Mikkola & St Clair, 2002)；某些 SERMs 類藥物 (raloxifene analogue) 可以透過抑制內皮細胞分泌 VCAM-1 而達到抑制內皮細胞與單核球間的黏附 (Simoncini, De Caterina, & Genazzani, 1999)。由 Mukherjee 等人(2003)的研究發現，一種雌激素代謝物 17-epiestriol，也是一種 ER β agonist，對於 TNF α 引起內皮細胞分泌的 VCAM-1 mRNA 及蛋白質表現量，抑制力約為 17-beta Estradiol 的 400 倍。他們更進一步發現，17-epiestriol 能誘發 endothelial nitric-oxide synthase (eNOs) 的 mRNA 及蛋白質，且能避免 TNF α 引起的 NF κ B 活化。

在本次研究所有測試物：enterolactone、sesamin、genistein、山藥乙酸乙酯萃物、苜蓿芽乙酸乙酯萃物、茉莉甲醇萃物與菊花甲醇萃物皆可顯著抑制 HAEC 與 monocytic THP-1 間的黏附情形。

genistein 是一種 ER β agonist，被證實能抑制卵巢切除大鼠體內細胞間的黏附作用並抑制內皮細胞內黏附因子之合成 (Kasiyaphat, Siriviriyakul, & Patumraj, 2008; Piao *et al.*, 2006)，且在低濃度時 (1 and 10 nm)，就能抑制 TNF α 引起的 VCAM-1 mRNA 表現 (Mukherjee *et al.*, 2003)，以 flow cytometry 檢測單核球與 HUVEC 間的黏附也發現能顯著減少黏附單核球之數目。本實驗結果則與前述研究

結果相似，顯示 genistein 也能抑制 oxLDL-stimulated 內皮細胞與單核球間的黏附作用。

本實驗室先前研究發現，sesamin (100 μ M)可顯著抑制 TNF α 引起的細胞黏附情形與 ICAM-1 表現量 (高雅詩, 2007)。而本研究使用不同模式，以 oxLDL 刺激內皮細胞，發現以 sesamin 50 μ M 也可以下降內皮細胞與單核球形式 THP-1 間的黏附情形。

本研究測試物或許也是透過抑制 NF κ B 活化，減少受刺激的內皮細胞上 ICAM-1 或 VCAM-1 表現，而達到抑制細胞黏附的作用，尚待後續實驗證實。

四、 結論

1. 推測 enterolactone、sesamin、茉莉甲醇萃物及菊花甲醇萃物可能透過抑制 CD36 mRNA 表現，減少細胞對 oxLDL 之攝入，以降低細胞內總膽固醇量，能因此具有抑制泡沫細胞形成之潛力，而減緩動脈粥狀硬化進程。
2. 所有測試物 (除 enterolactone 外)，皆能顯著下降 IL-1 β 及 TNF α 濃度，可能具有抗發炎的作用。而 Enterolactone、genistein 及苜蓿芽乙酸乙酯萃物皆能顯著抑制巨噬細胞分泌之 MCP-1 與 MMP-9 濃度，以及 MMP-9 活性，推測他們可能藉由減少促發炎因子之形成、減少單核球聚集及平滑肌細胞移行，而具有減緩斑塊之形成或使已形成之斑塊較不易破裂的可能潛力。
3. 所有測試物皆能抑制單核球對受到 oxLDL 刺激之內皮細胞間的黏附情形，推測可以透過減少內皮細胞與單核球間的黏附，而可能具有減緩泡沫細胞生成之效用。

含植物性雌激素活性測試物對動脈粥狀硬化相關因子之影響：實驗一 (PMA-differentiated-THP-1)

	enterolactone	sesamin	Genistein	Yam EAE	Alfalfa EAE	Jasmine extract	Chrysanthemum extract
使用濃度	1 μ M	50 μ M	20 μ M	100 μ g/ml	100 μ g/ml	100 μ g/ml	100 μ g/ml
Cellular cholesterol	↓	↓	NS	↑	NS	↓	↓
CD36 mRNA 16hr	↓	NS	↓	NS	NS	↓	↓
CD36 mRNA 48hr	↓	↓	↓	NS	NS	NS	NS
ABCA1 mRNA 16hr	↓	↓	↓	NS	NS	↓	NS
ABCA1 mRNA 48hr	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Oil-red-O staining	NS	NS	NS	NS	↑	↓	NS
IL-1 β secretion	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
TNF α secretion	NS	↓	↓	↓	↓	↓	↓
MCP-1 secretion	↓	↓	↓	↑	↓	NS	NS
MMP-9 secretion	↓	NS	↓	↓	↓	NS	NS
IL-1 β mRNA 16hr	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
IL-1 β mRNA 48hr	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
TNF α mRNA 16hr	↓	↓	NS	↓	↓	NS	NS
TNF α mRNA 48hr	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
MMP-9 mRNA 16hr	NS	NS	↓	NS	NS	↓	↓
MMP-9 mRNA 48hr	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
MMP-9 activity	↓	NS	↓	↓	↓	NS	NS

- ↑表示顯著上升, $p < .05$ 。
- ↓表示顯著下降, $p < .05$ 。
- NS 表示無顯著差異。

含植物性雌激素活性測試物對動脈粥狀硬化相關因子之影響：實驗二 (HAEC)

	enterolactone	sesamin	Genistein	Yam EAE	Alfalfa EAE	Jasmine extract	Chrysanthemum extract
使用濃度	1 μ M	50 μ M	25 μ M	50 μ g/ml	100 μ g/ml	100 μ g/ml	100 μ g/ml
Adhesion	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
MCP-1 secretion	NS	↓	NS	NS	↓	NS	↓

參考文獻

中文部分

- 王姿晴 (2006)。促進或抑制巨噬細胞分泌前列腺素 E2 的食材對於發炎反應的影響。台灣大學微生物與生化研究所碩士論文，未出版，台北市。
- 吳夢婷 (2008)。數種具植物雌激素活性材料對卵巢剔除鼠代謝症候群及鈣代謝之影響。國立台灣大學微生物與生化學研究所碩士論文，未出版，台北市。
- 洪永瀚 (2008)。苜蓿芽乙酸乙酯萃取物改善 MRL-lpr/lpr 自體免疫鼠病程發展之探討。國立台灣大學微生物與生化學研究所博士論文，未出版，台北市。
- 高雅詩 (2007)。探討芝麻素對腫瘤壞死因子刺激人類主動脈內皮細胞表現細胞黏附分子的影響及相關機轉。國立台灣師範大學人類發展與家庭學系碩士論文，未出版，台北市。
- 張惟雅 (2007)。菊花保健成分之探討。東海大學食品科學系碩士論文，未出版，台中縣。
- 清水昌 (2001)。世界性的健康食品 芝麻。台北市：牧村。
- 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，未出版，台北市。
- 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，未出版，台北市。
- 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。
- 羅文音 (2005)。以卵蛋白致敏小鼠模式探討攝食山藥對過敏性氣喘的影響。台灣大學微生物與生化研究所碩士論文，未出版，台北市。

西文部分

- Adlercreutz, H., & Mazur, W. (1997). Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann Med*, 29(2), 95-120.
- 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.
- Atta, A. H., & Alkofahi, A. (1998). Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of some Jordanian medicinal plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 60, 117-124.
- Austin, M. A., et al. (1988). Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA*, 260(13), 1917-1921.
- Auwerx, J. (1991). The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia*, 47(1), 22-31.
- Axelsson, M., et al. (1981). Estrogen binding in target tissues; a GC/MS method for assessing uptake, retention and processing of estrogens in target cell nuclei under in vivo conditions. *J Steroid Biochem*, 14(12), 1253-1260.
- Bendeck, M. P., et al. (1994). Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase

- expression after arterial injury in the rat. *Circ Res*, 75(3), 539-545.
- Blankenberg, S., Barbaux, S., & Tiret, L. (2003). Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 170(2), 191-203.
- Bobryshev, Y. V. (2006). Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. *Micron*, 37, 208-222.
- Boring, L., et al. (1998). Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*, 394(6696), 894-897.
- Borradaile, N. M., et al. (2002). Soya phytoestrogens, genistein and daidzein, decrease apolipoprotein B secretion from HepG2 cells through multiple mechanisms. *Biochemistry Journal*, 366, 531-539.
- Brand, K., et al. (1997). Dysregulation of monocytic nuclear factor-kappa B by oxidized low-density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17(10), 1901-1909.
- Bruunsgaard, H., et al. (2000). Ageing, tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and atherosclerosis. *Clin Exp Immunol*, 121(2), 255-260.
- Carr, M. C. (2003). The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(6), 2404-2411.
- Chang, T. Y., et al. (2001). Roles of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1 and -2. *Curr Opin Lipidol*, 12(3), 289-296.
- Chang WC, Y. Y., Wu CH, et al. (2005). Reduction of oxidative stress and atherosclerosis in hyperlipidemic rabbits by Dioscorea rhizome. *Can J Physiol Pharmacol*, 83, 423-430
- Cheng, W., et al. (2005). Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of the extracts from the inflorescence of Chrysanthemum indicum Linn'e. *Journal of Ethnopharmacology*, 101, 334-337.
- 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.
- Colles, S. M., Irwin, K.C., & Chisolm, G.M. (1996). Roles of multiple oxidized lipids in cellular injury. *Journal of lipid research*, 37, 2018-2028.
- 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.
- Cuchel, M., & Rader, D. J. (2006). Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis? *Circulation*, 113(21), 2548-2555.
- Cunnane, S. C., et al. (1995). Nutritional attributes of traditional flaxseed in healthy young adults. *Am J Clin Nutr*, 61(1), 62-68.
- Daugherty, A., et al. (2005). Thematic review series: The immune system and

- atherogenesis. Cytokine regulation of macrophage functions in atherogenesis. *J Lipid Res*, 46(9), 1812-1822.
- Davis, M. J., Richardson, P.D., & Woolf N. (1993). Risk of thrombosis in human atherosclerosis plaque: role of extracellular lipid, macrophage and smooth muscle cell content. *British heart journal*, 69, 377-381.
- de Kleijn, M. J., et al. (2002). Dietary intake of phytoestrogens is associated with a favorable metabolic cardiovascular risk profile in postmenopausal U.S.women: the Framingham study. *J Nutr*, 132(2), 276-282.
- Delerive, P., De Bosscher, K., Besnard, S., Vanden Berghe, W., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Fruchart, J.C., Tedgui, A., Haegeman, G., & Staels, B. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *Journal of biological chemistry*, 274, 32048-32054.
- Deo, R., et al. (2004). Association among plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1, traditional cardiovascular risk factors, and subclinical atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*, 44(9), 1812-1818.
- Despres, J. P. (1993). Abdominal obesity as important component of insulin-resistance syndrome. *Nutrition*, 9(5), 452-459.
- Dinareello, C. A., & Cannon, J. G. (1986). Tumor necrosis factor(cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J. Exp. Med*, 163, 1433-1450.
- Endemann, G., Stanton L.W., Madden, K.S., Bryant, C.M., White, R.T., & Protter, A.A. (1993). CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *Journal of biological chemistry*, 268(11811-11816).
- Enmark, E., & Gustafsson, J. A. (1999). Oestrogen receptors - an overview. *J Intern Med*, 246(2), 133-138.
- Febbraio, M., Podrez, E.A., Smith, J.D., Hajjar, D.P., Hazen, S.L., Hoff, H.F., Sharma, K., & Silverstein, R.L. (2000). Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *journal of clinical investigation*, 105(1049-1056).
- Fukuda , Y., Nagata, M., Osawa, T. & Namiki,M (1986). Chemical aspects of the antioxidative activity of roasted sesame seedoil and the effectof using the oil for frying. *Agriculture and biological chemistry*, 50, 857-862.
- Gao, H., et al. (2006). Estrogen attenuates vascular expression of inflammation associated genes and adhesion of monocytes to endothelial cells. *Inflamm Res*, 55(8), 349-353.
- Genest, J., Jr., et al. (1992). Lipoprotein cholesterol, apolipoprotein A-I and B and lipoprotein (a) abnormalities in men with premature coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, 19(4), 792-802.

- Gerard, C., & Rollins, B. J. (2001). Chemokines and disease. *Nat Immunol*, 2(2), 108-115.
- Glass, K. G., & Witztum, J. L. (2001). Atherosclerosis: The road ahead. *Cell*, 104, 503-516.
- Gohlke-Barwolf, C. (2000). Coronary artery disease--is menopause a risk factor? *Basic Res Cardiol*, 95 Suppl 1, I77-83.
- Gosling, J., et al. (1999). MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest*, 103(6), 773-778.
- Grainger, D. J., Witchell, C.M., Metcalfe, J.C. (1995). Tamoxifen elevates transforming growth factor-beta and suppresses diet-induced formation of lipid lesions in mouse aorta. *Nature medicine*, 1, 1067-1073.
- Guest, C. B., et al. (2007). Phagocytosis of cholesteryl ester is amplified in diabetic mouse macrophages and is largely mediated by CD36 and SR-A. *PLoS ONE*, 2(6), e511.
- Hamalainen, M., et al. (2007). Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kappaB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kappaB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators Inflamm*, 2007, 45673.
- Han, C. Y., Park, S. Y., & Pak, Y. K. (2000). Role of endocytosis in the transactivation of nuclear factor-kappaB by oxidized low-density lipoprotein. *Biochem J*, 350 Pt 3, 829-837.
- Han, K. H., et al. (1999). Expression of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 is increased in hypercholesterolemia. Differential effects of plasma lipoproteins on monocyte function. *J Lipid Res*, 40(6), 1053-1063.
- Hansson, G. K. (2001). Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler, thrombosis and vascular biology*, 21, 1876-1890.
- 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.
- Hermansen, K., et al. (2001). Beneficial effects of a soy-based dietary supplement on lipid levels and cardiovascular risk markers in type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care*, 24(2), 228-233.
- Higgins, C. F. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol*, 8, 67-113.
- Hirakata, M., et al. (2004). Comparison of the effects of pioglitazone and rosiglitazone on macrophage foam cell formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 323(3), 782-788.
- Hou, R. C., et al. (2006). Protective effect of 1,2,4-benzenetriol on LPS-induced NO production by BV2 microglial cells. *J Biomed Sci*, 13(1), 89-99.
- Ide, N., Keller, C., & Weiss, N. (2006). Aged garlic extract inhibits homocysteine-induced CD36 expression and foam cell formation in human macrophages. *J Nutr*, 136(3

- Suppl), 755S-758S.
- Ide, T., et al. (2004). Interaction of dietary fat types and sesamin on hepatic fatty acid oxidation in rats. *Biochim Biophys Acta*, 1682(1-3), 80-91.
- Inoue, I., et al. (2002). Fibrate and statin synergistically increase the transcriptional activities of PPARalpha/RXRalpha and decrease the transactivation of NFkappaB. *Biochem Biophys Res Commun*, 290(1), 131-139.
- Janabi, M., et al. (2000). Oxidized LDL-induced NF-kappa B activation and subsequent expression of proinflammatory genes are defective in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20(8), 1953-1960.
- Jayagopal, V., et al. (2002). Beneficial effects of soy phytoestrogen intake in postmenopausal women with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 25(10), 1709-1714.
- Jensen, J., Nilas, L., & Christiansen, C. (1990). Influence of menopause on serum lipids and lipoproteins. *Maturitas*, 12(4), 321-331.
- Johnston, j. B., Rahman, M. M., & McFadden, G. (2007). Strategies that modulate inflammasomes—insights from host–pathogen interactions. *Seminars in Immunopathology*, 29, 261-274.
- Joyce, C. W., et al. (2002). The ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) modulates the development of aortic atherosclerosis in C57BL/6 and apoE-knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(1), 407-412.
- JW Pierce, et al. (1996). Salicylates inhibit I kappa B-alpha phosphorylation, endothelial-leukocyte adhesion molecule expression, and neutrophil transmigration. *J. Immunol*, 156, 3961-3969.
- 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.
- Kasiyaphat, A., Siriviriyakul, P., & Patumraj, S. (2008). Preventive effects of genistein on leukocyte adhesion in femur venules and on bone-loss induced in ovariectomized female rats. *Clin Hemorheol Microcirc*, 38(4), 235-243.
- Kaul, D. (2001). Molecular link between cholesterol, cytokines and atherosclerosis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 219(65-71).
- Kirii, H., et al. (2003). Lack of interleukin-1beta decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23(4), 656-660.
- Krotkiewski, M., et al. (1983). Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *J Clin Invest*, 72(3), 1150-1162.
- Kruth, H. S. (1984). Localization of Unesterified Cholesterol in Human Atherosclerotic Lesions. *American journal of pathology*, 114(2), 201-208.
- Kuiper, G. G., et al. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript

- tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, 138(3), 863-870.
- Kunjathoor, V. V., et al. (2002). Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem*, 277(51), 49982-49988.
- Kunjathoor, V. V., Febbraio, M., Podrez, E.A., Moore, K.J., Anderson, L., Koehn, S., Rhee, J.S., Silverstein, R., Hoff, H.F. & Freeman, M.W. . (2002). Scavenge receptors class A- I / II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *Journal of biological chemistry*, 277, 49982-49988.
- Langmann, T., et al. (1999). Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 257(1), 29-33.
- Langmann, T., Klucken, J., Reil, M., et al. (1999). Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1):Evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 257(1), 29-33.
- Lawn, R. M., et al. (2001). Localization of human ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1) in normal and atherosclerotic tissues. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21(3), 378-385.
- Le, J., et al. (1987). Induction of membrane-associated interleukin 1 by tumor necrosis factor in human fibroblasts. *J. Immunol*, 138, 2137-2142.
- Lee, C. C., Chen, P.R., Lin, S., Tsia, S.C., Wang, B.W., Chen, W.W., Tsai, C.E., Shyu, K.G. (2004). Sesamin induces nitric oxide and decreases endothelin-1 production in HUVECs: possible implications for its antihypertensive effect. *Journal of Hypertension*, 22, 2329-2338.
- Li, A. C., & Glass, C. K. (2002). The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat Med*, 8(11), 1235-1242.
- Li, Z., et al. (1996). Effects of gender and menopausal status on plasma lipoprotein subspecies and particle sizes. *J Lipid Res*, 37(9), 1886-1896.
- Libby, P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420, 868-874.
- Lin, S. J., et al. (2007). Salvianolic acid B attenuates MMP-2 and MMP-9 expression in vivo in apolipoprotein-E-deficient mouse aorta and in vitro in LPS-treated human aortic smooth muscle cells. *J Cell Biochem*, 100(2), 372-384.
- Linton, M. F., & Fazio, S. (2003). Macrophages, inflammation, and atherosclerosis. *International journal of obesity*, 27, s35-s40.
- Lipsky, R. H., et al. (1997). The carboxyl-terminal cytoplasmic domain of CD36 is required for oxidized low-density lipoprotein modulation of NF-kappaB activity by tumor necrosis factor-alpha. *Recept Signal Transduct*, 7(1), 1-11.

- Lucas, E. A., et al. (2004). Flaxseed reduces plasma cholesterol and atherosclerotic lesion formation in ovariectomized Golden Syrian hamsters. *Atherosclerosis*, 173(2), 223-229.
- Lucas, E. A., et al. (2002). Flaxseed improves lipid profile without altering biomarkers of bone metabolism in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(4), 1527-1532.
- Luttun, A., et al. (2004). Loss of matrix metalloproteinase-9 or matrix metalloproteinase-12 protects apolipoprotein E-deficient mice against atherosclerotic media destruction but differentially affects plaque growth. *Circulation*, 109(11), 1408-1414.
- Makela, S., 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.
- Malinow, M. R., et al. (1981). Cholesterol and bile acid balance in *Macaca fascicularis*. Effects of alfalfa saponins. *J Clin Invest*, 67(1), 156-162.
- Mikkola, T. S., & St Clair, R. W. (2002). Estradiol reduces basal and cytokine induced monocyte adhesion to endothelial cells. *Maturitas*, 41(4), 313-319.
- Moore, K. J., & Freeman, M.W. (2006). Scavenger Receptors in Atherosclerosis--Beyond Lipid Uptake. *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology*, 26, 1702-1711.
- Mukherjee, T. K., et al. (2003). 17-epiestriol, an estrogen metabolite, is more potent than estradiol in inhibiting vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) mRNA expression. *J Biol Chem*, 278(14), 11746-11752.
- Nagarajan, S., et al. (2008). Dietary soy protein isolate ameliorates atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice potentially by inhibiting monocyte chemoattractant protein-1 expression. *J Nutr*, 138(2), 332-337.
- Nagy, L., et al. (1998). Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell*, 93(2), 229-240.
- Nakano, D., et al. (2006). Sesamin metabolites induce an endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxation through their antioxidative property-independent mechanisms: possible involvement of the metabolites in the antihypertensive effect of sesamin. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 318(1), 328-335.
- Nakata, A., et al. (1999). CD36, a novel receptor for oxidized low-density lipoproteins, is highly expressed on lipid-laden macrophages in human atherosclerotic aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19(5), 1333-1339.
- Nawroth, P. P., et al. (1986). Tumor necrosis factor/cachectin interacts with endothelial cell receptors to induce release of interleukin 1. *J. Exp. Med*, 163, 1363-1375.
- Nozaki, S., et al. (1995). Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects. *J Clin Invest*, 96(4),

- 1859-1865.
- Oquendo, P., Hundt, E., Lawler, J. & Seed B. (1989). CD36 directly mediates cytoadherence of Plasmodium falciparum parasitized erythrocytes. *Cell*, 58, 95-101.
- Osterud, B., & Bjorklid, E. (2003). Role of monocytes in atherogenesis. *Physiol Rev*, 83(4), 1069-1112.
- Paech, K., et al. (1997). Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science*, 277(5331), 1508-1510.
- Park, Y. W., et al. (2003). The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch Intern Med*, 163(4), 427-436.
- Pasceri, V., et al. (2001). Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation*, 103(21), 2531-2534.
- Patade, A., et al. (2008). Flaxseed reduces total and LDL cholesterol concentrations in Native American postmenopausal women. *J Womens Health (Larchmt)*, 17(3), 355-366.
- Penalvo, J. L., Heinonen, S. M., Aura, A. M., & Adlercreutz, H. (2005). Dietary sesamin is converted to enterolactone in humans. *Journal of Nutrition*, 135(5), 1056-1062.
- 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.
- Piao, M., et al. (2006). Inhibition of endothelial cell proliferation, in vitro angiogenesis, and the down-regulation of cell adhesion-related genes by genistein. Combined with a cDNA microarray analysis. *Endothelium*, 13(4), 249-266.
- Podrez, E. A., et al. (2000). Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *J Clin Invest*, 105(8), 1095-1108.
- Podrez, E. A., Febbraio, M., Sheobani, N., Schmitt, D., Silverstein, R.L., Hajjar, D.P., Cohen, P.A., Frazier, W.A., Hoff, H.F. & Hazen, S.L. (2000). Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *Journal of clinical investigation*, 105, 1095-1108.
- Podrez, E. A., et al. (2002). Identification of a novel family of oxidized phospholipids that serve as ligands for the macrophage scavenger receptor CD36. *J Biol Chem*, 277(41), 38503-38516.
- Poehlman, E. T., Toth, M. J., & Gardner, A. W. (1995). Changes in energy balance and body composition at menopause: a controlled longitudinal study. *Ann Intern Med*, 123(9), 673-675.

- Rahaman, S. O., et al. (2006). A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation. *Cell Metab*, 4(3), 211-221.
- Raines, E. W., & Ross, R. (1995). Biology of atherosclerotic plaque formation: possible role of growth factors in lesion development and the potential impact of soy. *J Nutr*, 125(3 Suppl), 624S-630S.
- Rampart, M., et al. (1989). Different pro-inflammatory profiles of interleukin 1 (IL 1) and tumor necrosis factor (TNF) in an in vivo model of inflammation. *Agents Actions*, 26(1-2), 186-188.
- Reape, T. J., & Groot, P. H. (1999). Chemokines and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 147(2), 213-225.
- Reckless, J., Metcalfe, J.C., Grainger, D.J. (1997). Tamoxifen decreases cholesterol sevenfold and abolishes lipid lesion development in apolipoprotein E knockout mice. *Circulation*, 95, 1542-1548.
- Roe, E. B., Chiu, K.M., & Arnaud, C.D. (2000). Selective estrogen receptor modulators and postmenopausal health. *Advances in internal medicine* 45, 257-278.
- Rosklint, T., et al. (2002). Oxysterols induce interleukin-1beta production in human macrophages. *Eur J Clin Invest*, 32(1), 35-42.
- Ross, R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis : a perspective study for the 1990s. *Nature*, 362(6423), 801-809.
- Ross, R. (1999). Atherosclerosis—an inflammatory disease. *New England journal of medicine*, 340, 115-126.
- Serena Ghisletti, C. M., Adriana Maggi, and Elisabetta Vegeto. (2005). 17 β -estradiol inhibits inflammatory gene expression by controlling NF- κ B intracellular localization. *Molecular and cellular biology*, 25(8), 2957-2968.
- Setchell, K. D. (1998). Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am J Clin Nutr*, 68(6 Suppl), 1333S-1346S.
- Setchell, K. D., et al. (2002). Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 76(2), 447-453.
- Shiffman, D., et al. (2000). Large scale gene expression analysis of cholesterol-loaded macrophages. *J Biol Chem*, 275(48), 37324-37332.
- Simoncini, T., De Caterina, R., & Genazzani, A. R. (1999). Selective estrogen receptor modulators: different actions on vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression in human endothelial cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 84(2), 815-818.
- Singaraja, R. R., et al. (2002). Increased ABCA1 activity protects against atherosclerosis. *J Clin Invest*, 110(1), 35-42.
- Sirato-Yasumoto, S., et al. (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.

- Skalen, K., Gustafsson, M., Rydberg, E.K., Hulten, L.M., Wiklund, O., Innerarity, T.L., & Boren J. (2002). Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature*, 417(6890), 750-754.
- Smith, J. D., Torgan, E., Ginsberg, M., Grigaux, C., Tian, J., & Miyata, M. (1995). Decrease atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and lipoprotein E. *Proc natl acad sci USA*, 92, 8264-8268.
- Sophie Collot-Teixeira, J. M., Chris McDermott-Roe, Robin Poston, and John Louis McGregor. (2007). CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovascular Research*, 75, 468-477.
- Squadrito, F., et al. (2003). Effect of genistein on endothelial function in postmenopausal women: a randomized, double-blind, controlled study. *Am J Med*, 114(6), 470-476.
- Tabas, I. (2004). Apoptosis and plaque destabilization in atherosclerosis: the role of macrophage apoptosis induced by cholesterol. *Cell Death Differ*, 11 Suppl 1, S12-16.
- Tall, A. R., Jiang, X., Lou, Y., & Silver, D. (2000). 1999 Georgr Lyman Duff memorial lecture: lipid transfer proteins, HDL metabolism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology* 20, 1185-1188.
- Tedgui, A., & Mallat, Z. (2006). Cytokines in atherosclerosis: Pathogenic and regulatory pathways. *Physiology review*, 86, 515-581.
- Thomas, C. E., et al. (1994). Multiple lipid oxidation products in low density lipoproteins induce interleukin-1 beta release from human blood mononuclear cells. *J Lipid Res*, 35(3), 417-427.
- Tontonoz, P., et al. (1998). PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*, 93(2), 241-252.
- Tu, Y. C., et al. (2007). Antiatherogenic effects of kaempferol and rhamnocitrin. *J Agric Food Chem*, 55(24), 9969-9976.
- Umamaheswari, M., et al. (2007). Antiulcer and in vitro antioxidant activities of Jasminum grandiflorum L. *Journal of Ethnopharmacology*, 110, 464-470.
- Usui, T. (2006). Pharmaceutical prospects of phytoestrogens. *Endocr J*, 53(1), 7-20.
- Van Eck, M., et al. (2005). Scavenger receptor BI and ATP-binding cassette transporter A1 in reverse cholesterol transport and atherosclerosis. . *Current Opinion in Lipidology*, 16, 307-315.
- Vegeto, E., et al. (2001). Estrogen prevents the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in microglia. *J Neurosci*, 21(6), 1809-1818.
- Venkateswaran, A., et al. (2000). Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(22), 12097-12102.
- Via, D. P., et al. (1989). Induction of acetyl-LDL receptor activity by phorbol ester in human monocyte cell line THP-1. *J Lipid Res*, 30(10), 1515-1524.

- Wang, A. M., et al. (1985). Molecular cloning of the complementary DNA for human tumor necrosis factor. *228*, 149-154.
- White, R. E. (2002). Estrogen and vascular function. *Vascul Pharmacol*, *38*(2), 73-80.
- Williams, J. K., Wagner, J.D., Li, Z., et al. (1997). Tamoxifen inhibits arterial accumulation of LDL degradation products and progression of coronary artery atherosclerosis in monkeys. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, *17*, 403-408.
- Witteman, J. C., et al. (1989). Increased risk of atherosclerosis in women after the menopause. *BMJ*, *298*(6674), 642-644.
- Wu, W. H., Liu, L.Y., Chung, C.J., Jou, H.J., & Wang, T.A. (2005). Estrogenic effect of yam ingestion in healthy postmenopausal women *Journal of the American college of nutrition*, *24*(4), 235-243.
- Xu, X. P., et al. (1999). Oxidized low-density lipoprotein regulates matrix metalloproteinase-9 and its tissue inhibitor in human monocyte-derived macrophages. *Circulation*, *99*(8), 993-998.
- Yancey, P. G., & Jerome, W. G. (2001). Lysosomal cholesterol derived from mildly oxidized low density lipoprotein is resistant to efflux. *Journal of Lipid Research*, *42*(3), 317-327.
- Zeng, M., et al. (2002). Tumor necrosis factor-alpha-induced leukocyte adhesion and microvessel permeability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *283*(6), H2420-2430.
- Zhang, X., et al. (2003). Soy food consumption is associated with lower risk of coronary heart disease in Chinese women. *J Nutr*, *133*(9), 2874-2878.
- Zhu, Y., et al. (2002). Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor beta. *Science*, *295*(5554), 505-508.