

第五章 討論

本研究實驗設計一，起初使用三種處理方式，分別為預防模式（先預培養山苦瓜後再給予TNF- α 刺激）、共同模式（同時給予）以及修復模式（先刺激再投予山苦瓜）。並測量ICAM-1來決定實驗模式。結果發現，共同模式能顯著降低ICAM-1表現，預防及修復模式皆無效果，因此，我們選擇以共同模式來進行ICAM-1、MCP-1及黏附實驗。實驗設計二以山苦瓜單獨處理來觀察NO、eNOS蛋白質表現及其酵素活化，探討對內皮細胞基本功能的影響。

山苦瓜各種萃取物、已知苦瓜所含有的純化學成分，及已知為PPAR α ligand的藥物對內皮細胞表現之最低有效濃度與最大抑制率整理於表5-1。

第一節 山苦瓜萃取物對ICAM-1、MCP-1的影響

本實驗室先前林氏發現山苦瓜乙酸乙酯萃取物能抑制由LPS誘導巨嗜細胞株PGE₂生成量；動物實驗方面，詹氏以山苦瓜乙酸乙酯萃取物混入高脂半合成飼料中餵食ApoE knockout mice，其胸主動脈橫切之內皮增厚程度與主動脈縱切脂肪堆積皆顯著低於高脂組(林弼玉, 2004; 詹鳳紋, 2006)。本研究設計以內皮細胞為模式的結果顯示，山苦瓜乙酸乙酯萃取物2381-EAE 250 $\mu\text{g/ml}$ 與CK-EAE 150 $\mu\text{g/ml}$ 能顯著減少內皮細胞受TNF α 誘導之ICAM-1的表現($p < 0.05$)；2381-EAE 200 $\mu\text{g/ml}$ 能顯著降低MCP-1生合成($p < 0.05$)，而CK-EAE有呈現下降趨勢但未達顯著差異。除了CK-EAE對ICAM-1沒有發現劑量關係之外，其他項目皆隨濃度提高而下降。再度確定山苦瓜乙酸乙酯萃取物具有抗發炎效果，可能因此改善動脈硬化。

為了進一步了解乙酸乙酯萃取物內含之有效成分為何？將兩品系之乙酸乙酯萃取物進行鹼水解(皂化反應)，區分為可皂化萃取物S(游離脂肪酸)與不可皂化萃取物NS(sterol或triterpenes等其他成份)兩個部份，繼續試驗。

ICAM-1之結果發現，兩品系山苦瓜皂化（S）及不皂化萃取物（NS）僅發現CK-NS 20 $\mu\text{g/ml}$ 可顯著降低ICAM-1的表現（ $p < 0.05$ ），其他並無顯著差異。若單就最大抑制率來看，皂化萃取物中2381與CK品系分別為9%和18%；不皂化萃取物中2381與CK品系分別為6%與22%，亦有些許抑制的可能性，但沒有呈現劑量關係。此結果顯示山苦瓜經皂化區分後降低ICAM-1的能力減弱了，不如乙酸乙酯萃取物效果好，可能是劑量不足使效果未達顯著，或降低ICAM-1之有效成份是以脂肪酸酯化（TG）形式存在，當加鹼水解之後而被分解了的關係。

MCP-1結果發現，兩品系皂化（S）與不皂化（NS）萃取物皆能有效降低MCP-1分泌（ $p < 0.05$ ）。皂化萃取物部分與刺激組比較，2381-S 10 $\mu\text{g/ml}$ 即顯著降低MCP-1，最大抑制率24%，CK-S 60 $\mu\text{g/ml}$ 達顯著差異，最大抑制率36%。不皂化萃取物部分與刺激組比較，2381-NS與CK-NS 20 ~ 40 $\mu\text{g/ml}$ 皆可有效降低MCP-1，最大抑制率分別為14%與37%。顯示山苦瓜三種萃取物都內含具有減少內皮細胞分泌MCP-1的成分。

第二節 山苦瓜乙酸乙酯萃取物對一氧化氮生成與eNOS之影響

許多研究都顯示eNOS之mRNA、蛋白質表現、酵素活性與NO生成具有相關性(Wallerath *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2000)。我們發現山苦瓜三種萃取物對NO沒有影響，且乙酸乙酯萃取物，不論是2381或CK品系各濃度之間對eNOS蛋白質表現並無顯著差異。在eNOS之酵素的活化方面，測量eNOS活化的必須步驟Ser-1177磷酸化特異位置後，仍顯示兩品系乙酸乙酯萃取物各濃度之間無顯著差異。顯示山苦瓜對內皮細胞NO生成以及其酵素eNOS的蛋白質表現、活化皆沒有影響。

第三節 山苦瓜對U937黏附於內皮細胞的影響

接著我們繼續進行了U937的黏附試驗，觀察山苦瓜是否在降低了ICAM-、MCP-1之後，能成功的減少單核球的黏附上內皮細胞。

我們選擇每一個萃取物在各項實驗中的最大濃度進行黏附試驗，結果顯示除了皂化萃取物不影響U937黏附於內皮細胞之外，兩品系之乙酸乙酯、

不皂化萃取物皆顯著降低U937的黏附作用，並且山苦瓜可能的純化學成分CLN、Capric acid及正對照藥物fenofibrate亦可降低U937黏附於內皮細胞。表示山苦瓜會藉由抑制ICAM-1、MCP-1而抑制單核球的聚集與黏著，應能預防單核球黏附於內皮細胞後外滲到內皮下層的致粥狀動脈硬化初級病理過程。

第四節 山苦瓜中之有效成分評估

一、山苦瓜皂化萃取物與CLN、Capric acid

CLN為山苦瓜中所含之9c,11t,13t-conjugatited linolenic acid可活化PPAR α ，一公斤山苦瓜凍乾粉末含6克CLN，且以山苦瓜籽之乙酸乙酯萃物含量最高(Chuang *et al.*, 2006; 莊佳穎, 2004)，因此推測CLN可能為山苦瓜有效成分之一。capric acid為一種存在苦瓜中的短鏈脂肪酸，由十個碳組成，林氏發現capric acid可顯著抑制細胞PGE₂合成，有劑量效應，並於50 μ M可完全抑制其生合成，推測capric acid亦為山苦瓜有效成分之一(林弼玉, 2004)。本實驗發現100 μ M CLN及capric acid可顯著降低MCP-1達27%與36%，並減少U937黏附作用，但對ICAM-1、NO無影響。

100 μ M CLN = 27.84 mg/ml CLN，和山苦瓜乙酸乙酯萃物經鹼水解所得之皂化萃取物S（游離脂肪酸）比較，2381-S 40 μ g/ml內含CLN約9.40 μ g/ml，CK-S 60 μ g/ml內含CLN約13.96 μ g/ml，較100 μ M CLN含量甚低，而100 μ M CLN、2381-S 40 μ g/ml及CK-S 60 mg/ml對MCP-1抑制率卻相似，分別為27、24、36%，顯示CLN僅為山苦瓜降低MCP-1之有效成分之一，其他成份可能為capric acid或未知游離脂肪酸需進一步試驗。

二、山苦瓜不皂化萃取物

台大黃青真教授實驗室研究發現2381與CK品系之三種萃物（EAE、S及NS）皆能活化PPAR。我們的結果確實也發現了不皂化（NS）萃物可以顯著降低MCP-1合成，在CK品系觀察到CK-NS 20 μ g/ml可顯著降低22% ICAM-1表現，並減少U937黏附於內皮細胞上（ $p < 0.05$ ），所以山苦瓜不皂化部份應該具有抗粥狀動脈硬化的成分存在，而其有效成分為何？可能是

某一種固醇類 (steroids) 或三萜類 (triterpenes) 或其他成份則需進一步試驗。

三、山苦瓜乙酸乙酯萃取物

實驗發現乙酸乙酯萃取物為效果最好之山苦瓜萃取物，區分之後反而減弱下降ICAM-1能力，也許內含有效成份為脂肪酸酯化 (TG) 形式，或因為皂化與不皂化萃取物能給予內皮細胞試驗之濃度太低導致看不出顯著效果。但不論如何，都顯示山苦瓜內含多種有效物質，一起作用可能有加成效應，建議未來製作為健康食品時，可以考量萃取後之複合成份可能會比純化特定成份有效。

第五節 山苦瓜可能作用機制之探討

一、山苦瓜與fenofibrate的比較

我們選用臨床常用降血脂藥物fenofibrate作為正對照組，此為PPAR α ligand，可抑制形成粥狀動脈硬化前之慢性發炎過程，也常被應用於改善發炎上。Ogata等人發現fenofibrate (30 mg/kg/day for 5wks) 可緩和高血压大鼠引發的心肌纖維化變性與舒張功能不全，並能減少由NF κ B調控之IL-6、COX-2、VCAM-1與MCP-1 mRNA表現(Ogata *et al.*, 2004)。本實驗結果給予內皮細胞100 μ M fenofibrate可顯著降低MCP-1表現，且下降程度達85%，並減少U937黏附於內皮細胞上 ($p < 0.05$)，但對ICAM-1及NO沒有影響。相較於山苦瓜各萃取物，雖然降低MCP-1效果不及fenofibrate但亦可達14% ~ 66% ($p < 0.05$)，尤其乙酸乙酯萃取物又同時可降低MCP-1、ICAM-1及提升NO，並減少U937黏附作用，因此，本結果顯示山苦瓜對於預防粥狀動脈硬化之抗發炎有較好的效果。

數個動物實驗研究顯示攝取0.5% fibrate 類似物會增加相對肝臟重量，(詹鳳紋, 2006; 趙哲毅, 2003; 謝婉郁, 2005)可能對肝臟具有毒性或副作用，山苦瓜能免於產生副作用之虞，同時達到抗發炎功效，值得開發為健康食品並推廣國人食用。

二、藉由活化PPAR α 之可能作用機制

本實驗假設為：研究發現山苦瓜為PPAR α 活化劑，且PPAR被認為是一抗粥狀動脈硬化因子，因此我們假設山苦瓜亦具有與PPAR α 活化劑相同之功效，可改善體內發炎反應。實驗結果顯示山苦瓜確實可抑制ICAM-1、MCP-1，推測山苦瓜中有效成分應是藉由活化PPAR α 路徑所調控，可能作用機制推論如下。

目前文獻認為 PPAR α 可透過活化 I κ B 路徑或減少異構體 p50 及 p65 的生成來干擾 NF κ B 表現，並抑制下游基因如 ICAM-1、VCAM-1、IL-6 及 MCP-1 等(Delaville *et al.*, 2000; Marx *et al.*, 1999; Ogata *et al.*, 2004; Staels *et al.*, 1998)。因此我們推測山苦瓜可能透過 PPAR α 抑制 NF κ B 所調控之 ICAM-1 與 MCP-1。(圖 5-2)。

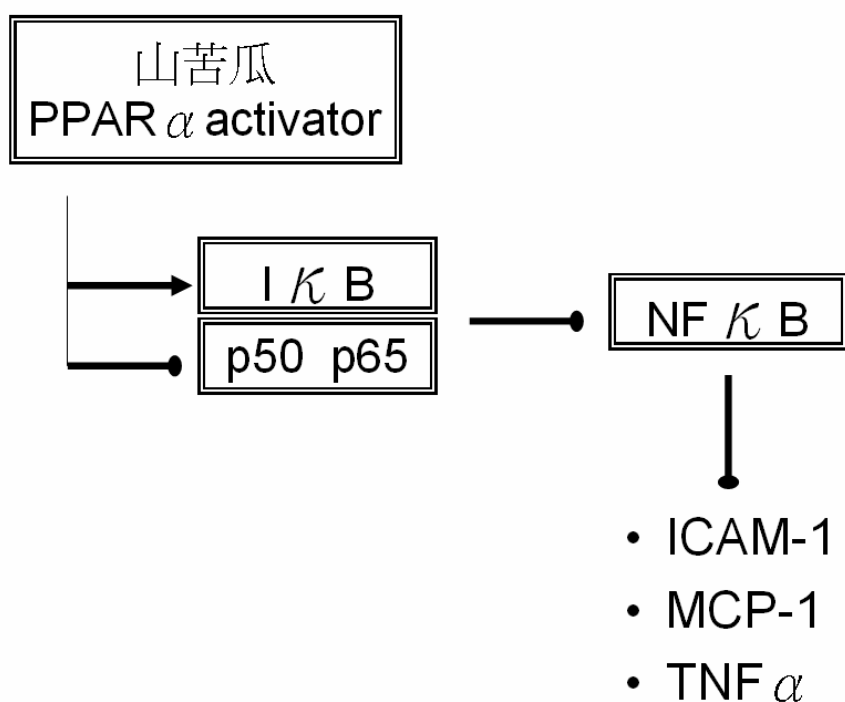


圖 5-2、山苦瓜可能作用機制

第六節 結論

1. 山苦瓜乙酸乙酯萃取物能抑制內皮細胞ICAM-1及MCP-1，並減少U937黏附於內皮細胞上，但對NO生合成、eNOS之蛋白質與酵素活化Ser1177磷酸化位置沒有影響。
2. 山苦瓜皂化萃取物可減少MCP-1生合成，其內含之CLN遠低於27.84 mg/ml (100 μ M CLN)，而抑制率卻相似，推測CLN僅為山苦瓜中可能的有效成分之一，其他有效成分可能包含capric acid或未知的脂肪酸需進一步試驗。
3. 山苦瓜不皂化部份亦顯示可減少MCP-1生合成，並減少U937黏附於內皮細胞上，因此認為山苦瓜中除了脂肪酸形式的有效成份之外，還存在其他改善發炎之特殊物質。
4. 山苦瓜經皂化區分後，降低ICAM-1的能力減弱了，推測可能是劑量不足或降低ICAM-1之有效成份之一是以脂肪酸酯化 (TG) 形式存在，當加鹼水解之後而被分解之故。
5. 對照已知的PPAR α ligand fenofibrate，山苦瓜可能藉由活化PPAR α 路徑調控NF κ B改善發炎反應。

整體而言，本研究發現山苦瓜能改善由TNF α 誘導內皮細胞ICAM-1表現、MCP-1生合成，並減少U937黏附於內皮細胞上，但對NO生合成、eNOS之蛋白質與酵素活化Ser1177磷酸化位置沒有影響。

山苦瓜的好處，由降血糖、血脂到目前具有抗發炎的功效，不斷被揭露出來，期許繼續發掘山苦瓜對預防動脈硬化之能力，以確認有效成份與作用機制，讓每一個人的研究點點滴滴累積，能為國人健康帶來幫助。

表5-1、山苦瓜各種萃取物與已知內含純化學成分及正對照藥物對內皮細胞表現之最低有效濃度與最大抑制率一覽表

各品系 萃取物 測量項目		乙酸乙酯萃取物 (EAE)		皂化萃取物 (S)		不皂化萃取物 (NS)		已知苦瓜純化學成分 與正對照藥物		
		2381	CK	2381	CK	2381	CK	CLN	Capric acid	fenofibrate
內皮細胞適應存活 濃度範圍		0 ~ 400	0 ~ 300	0 ~ 60	0 ~ 60	0 ~ 60	0 ~ 40	0 ~ 250	0 ~ 250	0 ~ 100
ICAM-1	最低有效濃度	250	150	ns	ns	ns	20	ns	ns	ns
	最大 抑制率	35%	33%	9%	18%	6%	22%			
MCP-1	最低有效濃度	200	ns	10	60	20	20	100	100	100
	最大 抑制率	66%	39%	24%	36%	14%	37%	27%	36%	85%
U937黏附試驗	*p<0.05	*	*	ns	ns	*	*	*	*	*
NO	最低有效濃度	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
eNOS 蛋白質表現		ns	ns	-	-	-	-	-	-	-
eNOS 酵素活化		ns	ns							

1. 山苦瓜萃取物濃度單位 $\mu\text{g/ml}$ ；已知苦瓜純化學成分及正對照藥物濃度單位 μM

2. ns 未達顯著差異；- 未檢測；*p<0.05 vs condition with TNF- α only