

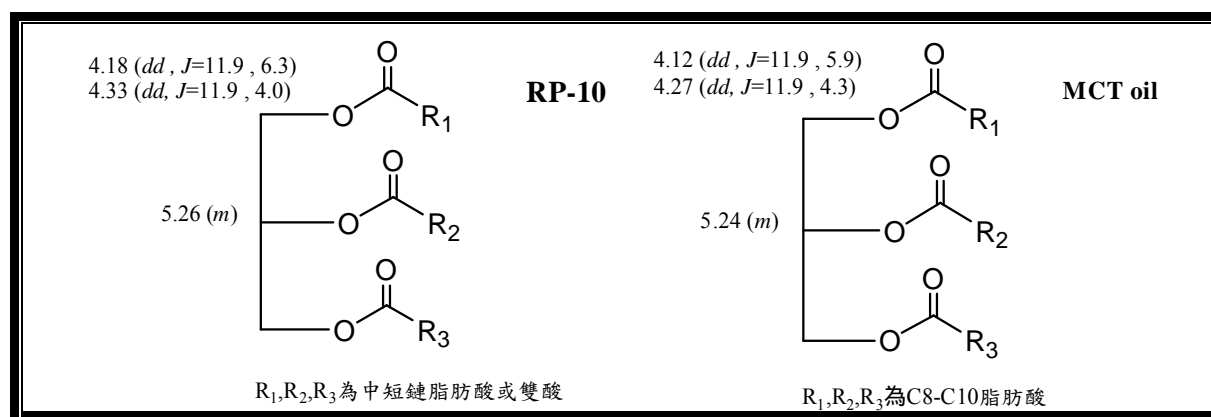
第四章 討論

第一節 山苦瓜中活性成分的萃取與分離

以山苦瓜進行粗萃時發現：不論是水萃物或乙酸乙酯萃物均具有抑制PGE₂合成的效應，以乙酸乙酯萃物的抑制效果較水萃物強。而再將乙酸乙酯萃物續以n-hexane與90%MeOH/H₂O進行對萃後，發現第二次乙酸乙酯(EA)萃出之EAE-2具有較高的抑制效果。而後，將Hexane區分物以矽膠管柱分離，亦發現：具有抑制PGE₂合成的活性成分主要在100%EA所流洗出來。因此，推測山苦瓜中具有活性的成分，應屬於中極性，主要可被EA所萃取。

其中，EAE-2雖有較高的抑制效果，但當濃度大於50µg/mL處理細胞時，則會引起細胞毒性，造成細胞死亡。就苦瓜已知的成分中，曾由苦瓜種籽分離出Lectin(醣蛋白)及Vicine(糖苷化合物)(Ng *et al.*,1986; Basch *et al.*,2003)，會造成血球凝集及溶血的現象，但這些化合物在有機溶劑中之溶解度應不高，故苦瓜萃取物EAE-2中，具有細胞毒性的成分為存在苦瓜種籽中的lectin所造成的可能性不大，而是否因其他saponin類成分，仍有待進一步的研究。

由活性區分物RP-10所測得之¹H-NMR及H-H COSY的結果，並比對MCT oil之¹H-NMR光譜，可知其中主要成分為TG，且其組成以中、短鏈飽和脂肪酸為主。整理如下圖所示：



而經水解後，以GC-Mass分析的結果，確知活性物質極可能為雙酸，並以酯化的型式接在TG上。由於TG上所接的脂肪酸或雙酸的種類不同，比例不一，即可有多種組合的TG型式，這就是為何在分離的過程中，嘗試多次的化學分離，卻難以純化鑑定出明確的成分及結構的最大原因。

此外，就大量山苦瓜正己烷萃取物以矽膠管柱分離後所得的各區分物，比較其¹H-NMR的結果，可明確發現其中主要組成為TG及固醇類，從低極性(100%Hexane)到高極性(90%EA/MeOH)所流洗出的區分物，均有TG及脂肪酸的特徵。而由於本實驗的活性區分物為TG接中、短鏈型式的脂肪酸，抑或是接上雙酸，因此造成其極性相較於一般TG高，故主要在高極性流洗出來。至於在極性低於90%EA/MeOH所流洗出的區分物如：40%EA/Hex所流洗出的F152，亦具有抑制細胞PGE₂生成的作用，其可能的成分是否也是雙酸或中、短鏈脂肪酸，而因接在TG相對位置上的脂肪酸有一些為長鏈，所以在較低極性流洗出來；抑或是存在其他活性成分仍有待進一步的探討。

本化學分離的流程是以山苦瓜乙酸乙酯萃物，進行對萃後的Hexane萃物經矽膠管柱分離後，再進行活性區分物的純化分離，而發現具有抑制巨噬細胞PGE₂生成的可能成分為：接有中、短鏈飽和雙酸的TG。然而，在乙酸乙酯萃物進行對萃後所得到的EAE-2亦具有顯著的抑制效果。EAE-2中存在之活性成分，是否亦為酯化型中短鏈脂肪酸、雙酸(TG)或游離之脂肪酸仍有待進一步的分離純化。

第二節 脂肪酸及雙酸對PGE₂合成的影響

起初將F1-6以GC-mass分析的結果得知：山苦瓜中主要的脂肪酸為一般長鏈的型式，以palmitic acid及oleic acid的含量最多，Nasim S (1998)分析苦瓜全果中脂肪酸的組成，指出：苦瓜中主要的脂肪酸為palmitic acid及oleic acid，其次還包含stearic、lauric、linoleic，arachidic、myristic及capric acids。因此，初步以一般脂肪酸進行篩選。結果發現：一般長鏈脂肪酸並不影響細胞PGE₂的合成，且Linoleic acid(LA)及Arachidonic acid(AA)相對的有促進細胞PGE₂合成的作用。由於AA為PGE₂合成的受質，而LA可經由加碳(elongation)及去飽和作用(desaturation)形成AA，因此在提高受質的可利用性下，可使PGE₂的合成增加。Gonchar等學者(1999)以小鼠的巨噬細胞為模式，探討內生性及外源性的AA對PGE₂合成的影響，結果指出：兩者均能促進PGE₂的合成，其中以calcium ionophore A23187誘發其內生性的AA釋放，可使PGE₂的合成在5分鐘即達最大量，而外源性的AA則於2小時後使PGE₂的合成達到最大量。此外，在探討有關 ω -3及 ω -6的脂肪酸對發炎反應的影響亦提到： ω -6脂肪酸如：LA及AA可促進體內系列二-PG的合成，而 ω -3的脂肪酸如：ALA、EPA及DHA，則可與 ω -6脂肪酸競爭COX的作用，形成系列三的PG，減少促發炎介質PGE₂的合成，並且可減少pro-inflammatory cytokine如：TNF- α 及IL-1 β 的生成(Kelley D.S.,2001)。

本實驗室同時也以在山苦瓜分離過程中，發現具有活化PPAR α 作用的CLN，及文獻中所提及具有抑制PGE₂合成的CLA(Iwakiri *et al.*,2002)進行試驗，結果發現：兩者對細胞PGE₂的合成並無影響。然而，Iwakiri等學者(2002)的研究，以RAW264.7細胞為模式下發現：CLA可顯著抑制PGE₂的合成及COX-2 mRNA的表現。Cheng等學者(2004)同樣以RAW264.7細胞為模式研究發現：CLA可改變細胞膜脂肪酸的組成，顯著下降AA並增加CLA，且CLA可顯著抑制I κ B- α 的磷酸化，抑制NF κ B的活化。因此，CLA具有抑制PGE₂合成的可能機制包括：藉由減少細胞膜上受質(AA)的可利用性；或抑制調控COX-2表現的上游基因如：抑制NF κ B的活化。但在本實驗中並無發現CLA具有抑制PGE₂合成的作用，其可能的原因為：在兩篇的研究中，其實驗流程是先加CLA處理細胞24或12小時後，再加入LPS處理6小時，而本研究是將CLA與LPS同時處理細胞，CLA可能因無法立即改變細胞膜的組態或抑制LPS的訊息傳遞路徑，因此並無抑制LPS誘發PGE₂合成的作用。此外，Noguchi等學者(2002)研究指出：CLA在一般食物中的含量通常<1%，但相對的CLN則在一些植物的種籽中含量豐富如：石榴(pomegranate)、梓樹屬(Catalpa)、金盞花(Pot Marigold)及苦瓜(*Momordica charantina* L.)等種籽，而予以大鼠的飲食中添加從苦瓜籽中所萃取的CLN(9-*c*,11-*t*,13-*t*)，可顯著增加其肝臟脂質中CLA(9-*c*,11-*t*)的含量，因此推測：予以動物餵食CLN可在體內經由酵素的作用，轉換為CLA(biohydrogenation)。此外，以CLN(9-*c*,11-*t*,13-*t*)培養Caco-2細胞，分析其脂肪酸的組成亦發現：隨時間的增加，CLN減少而CLA增加，因此推測：腸道細胞具有將CLN轉換為CLA的酵素。而在山苦瓜分離過程中，發現含量豐富的CLN具有活化PPARs作用，雖然在本實驗中並無發現其具有抑制PGE₂合成的作用，但若改以不同的實驗處理流程或細胞模式，是否可能因改變細胞膜的組態或干擾LPS活化訊息傳遞的路徑，仍有待進一步的研究。此外，CLN可在動物體內經酵素作用轉換為CLA，而CLA具有抑制NF κ B的活化，進而下降COX-2的表現，減少PGE₂的合成。因此，可進一步探討苦瓜在動物體內是否具有抗發炎的作用及相關成分與機轉。

而後鑑定出F1-6的活性區分物RP10可能為酯化型中、短鏈飽和脂肪酸(TG)，故選擇以中、短鏈脂肪酸及MCT oil進行實驗。結果發現：Capric acid(10:0)可顯著抑制細胞PGE₂的合成，而MCT oil亦有部份抑制的作用。Kono等學者(2003)以大鼠為模式，分別予以MCT oil及corn oil一週後注射LPS，評估其存活率、病理組織並取其Kuffer cell(庫氏細胞)進行培養分析，結果發現：MCT組的Kuffer cell在LPS的刺激下，TNF- α 的生成量相對於控制組顯著低約60%。此外，分別以AA、LA及

MCT處理Kuffer cell，12小時後加入LPS發現：LA及AA顯著增加TNF- α 的生成，而MCT處理組相較於正控制組(+LPS)及LA、AA組，則呈現顯著下降。由於LPS是藉由與細胞膜上的CD14結合後，活化Kuffer cell，因此亦評估MCT對CD14的表現影響，結果發現：MCT組的CD14表現量相對於corn oil組，顯著減少達70%。因此，推測MCT oil可抑制Kuffer cell CD14的表現，進而抑制LPS活化Kuffer cell，減少TNF- α 的生成。而本實驗中的MCT oil是否也是透過抑制CD14的表現，因而抑制LPS活化RAW264.7細胞，減少PGE₂的合成？此外，Capric acid可顯著抑制細胞PGE₂的合成，其作用的機制為何？均有待進一步的研究。

雖然，將活性區分物F1-6經水解後以GC-Mass分析，並無發現活性區分物的脂肪酸中含有Capric acid，但Nasim S (1998)分析苦瓜全果的脂肪酸組成中，發現當中含有Capric acid。而由於在化學分離的過程中，並沒有將所有具活性的區分物進行分析，因此，在其他有活性的區分物中是否含有Capric acid仍有待進一步的分析。

最後將F1-6鹼水解後，以EA萃取一般極性脂肪酸後甲基化，送測GC-Mass的結果發現：當中含有短鏈雙酸的型式包括：octanedioic acid (八碳雙酸)、nonanedioic acid(九碳雙酸)及decanedioic acid(十碳雙酸)。其中，以nonanedioic acid(九碳雙酸)的含量較多。以標準品進行細胞實驗發現：八碳及九碳雙酸有部分抑制PGE₂合成的趨勢。然而，其抑制效果不如苦瓜中的活性區分物，推測其可能的原因為：1. 在苦瓜中，仍存在其他具有活性的成分或存在cofactor尚未被分離出來。2. 在苦瓜中，雙酸主要以接在TG上的型式存在，其極性及型式與游離型式的雙酸不同，因此推測在抑制PGE₂合成的作用不同。

Nonanedioic acid(九碳雙酸)的相關研究包括：Passi 等學者 (1983)予以受試者服用不同劑量的C9、C10、C11及C12雙酸，探討在人體對這些中鏈飽和型式雙酸的利用情形，結果發現：在服用2-3小時，人體血清中的含量達最高點，12小時後於尿液中原物的排出量分別為60%(C9)、17%(C10)、5%(C11)及1%(C12)，而糞便中並無測得這些雙酸的排出。而以大鼠為模式，予以管餵[1,9-¹⁴C]azelaic acid及[10,11-³H]dodecanedioic acid評估在動物體內的分佈與利用發現：管餵[1,9-¹⁴C]azelaic acid 12及48小時後，呼吸中¹⁴CO₂的排出量分別為13%及14.5%。兩者在管餵後72小時，血清中的含量達最高點。分別收集五天的尿液，分析尿液中的排出量分別為40%(¹⁴C)及50%(³H)。在組織中，以肝臟、肺及腎臟的含量最多，

管餵[1,9-¹⁴C]azelaic acid 12 小時後 ¹⁴C 達最大量；而 [10,11-³H]dodecanodioic acid 則在 24 小時後 ³H 達最大量。而後在這些組織的含量減少，相對的脂肪組織中的含量逐漸增加，直至 96 小時後。收集 6 天的糞便，¹⁴C 的量少於 0.1%，³H 少於 2%。而在組織中，¹⁴C 主要存在於不同型式的脂肪酸及膽固醇中。而 ³H 則存在於脂肪酸以外其他分子的型式皆含有。在管餵 [1,9-¹⁴C]azelaic acid 24 小時後，¹⁴C₉、¹⁴C₇ 及 ¹⁴C₅ 的雙酸只有微量；而管餵 [10,11-³H]dodecanodioic acid 24 小時後，其 C₁₂、C₁₀、C₈ 及 C₆ 的雙酸也只有微量。因此，可知 Nonanedioic acid 可被人體吸收，且在動物體內可進行 β-oxidation 被利用合成其他物質，主要仍為脂質的型式存在。其他研究亦指出，Nonanedioic acid 不具毒性或致畸性 (Mingrone *et al.*, 1983)。

此外，Nonanedioic acid 可競爭性抑制 mitochondrial oxidoreductases、5 alpha-reductase 及 tyrosinase，因此 Passi 等學者 (1989) 推測其可能的作用機制為：在酵素的催化位置上，相對的距離間含有帶正電的分子如：-NH₂、-SH，可與 Nonanedioic acid 的兩個 -COO⁻ 形成鍵結，此外，若在 Nonanedioic acid 的第 2、8 的碳上接上帶負電的分子如：-NO₂、-CN，則可增加對酵素的抑制作用。此外，Nonanedioic acid 可通過血腦障壁，Passi 等學者 (1989) 進行初探性的實驗以狗為模式，靜脈注射 20g 的 Azelaic acid 4 小時發現：隨時間的增加，腦脊液 (cerebro-spinal fluid) 中 Azelaic acid 的濃度隨之增加，約為血清濃度的 2-5%。

Nonanedioic acid (Azelaic acid) 可抑制皮膚細菌的生長 (Leeming *et al.*, 1986)，競爭性抑制 mitochondrial oxidoreductases、5 alpha-reductase 及 tyrosinase，因而主要被應用於治療面皰，發炎性青春痘、黑斑及禿髮 (Passi *et al.*, 1983；Passi *et al.*, 1989；Fitton and Goa., 1991)。並於體外實驗發現：Azelaic acid 具有清除氫氧自由基的作用，可顯著抑制 tyrosine 行羥化反應及抑制 AA 的過氧化作用 (Passi *et al.*, 1991)。AA 在代謝成 PGE₂ 的過程中，需有低濃度的 hydroperoxide 存在，啟動 COX 的作用，以形成 endoperoxide 及 hydroperoxide (Lands W.E., 1985)。因此，Nonanedioic acid 是否透過改變細胞內 hydroperoxide 的濃度，或抑制合成 PGE₂ 過程中的酵素作用，抑或透過其他調控機制減少 PGE₂ 的合成，仍有待進一步研究。而目前並無其他相關的研究探討 Nonanedioic acid 對發炎反應的影響。

此外，在苦木科植物：鴨膽子 (*Brucea javanica.*) 的種子 (Su *et al.*, 2002)、菊苣根 (*Cichorium intybus*) (He *et al.*, 2002) 及木槿皮 (*Hibiscus syriacus L.*) (Zhang *et al.*, 1993) 曾分離出 Nonanedioic acid 的成分。

第三節 展望

整體而言，以LPS活化巨噬細胞株模式下，抑制PGE₂合成的方式可能可藉由下列幾種方式達成：

- ①.影響 LPS 活化巨噬細胞
 - 抑制 LPS 與細胞表面受器結合如：CD14
 - 抑制 LPS 活化細胞的訊息傳遞路徑，進而抑制 COX-2 的表現
- ②.透過其他路徑影響 COX-2 的活性如：PPARs
- ③.影響 COX-2 酵素本身的活性
- ④.影響 PGES(Prostaglandin E synthase)酵素的作用
- ⑤.減少受質的可利用性：
 - 影響 phospholipase A2 的活性
 - 影響細胞膜上脂肪酸的組成

在本實驗中發現Capric acid可顯著抑制巨噬細胞PGE₂的生成，IC₅₀為 6.46μM (1.216μg/mL)，Max inhibition=98.69 %。然而，其他如C8 或C12 的脂肪酸卻無強的抑制效果原因為何？在構型上，長度不同為主要的差異。而在實驗流程上，是將Capric acid與LPS同時處理細胞，若改以不同的處理流程或不同的刺激劑是否會有相同的抑制效果？需進一步分析。

此外，MCT oil對巨噬細胞亦具有抑制PGE₂生成的趨勢，研究指出：MCT oil可能藉由抑制Kuffer cell CD14 的表現，進而抑制LPS活化Kuffer cell，減少TNF-α的生成(Kono *et al.*,2003)。因此，可進一步以Western Blotting分析MCT oil對LPS活化下之RAW264.7 細胞，CD14 的蛋白質表現量，以探討其抑制機制。

LPS在動物體內可引發其發炎反應外，亦會造成敗血現象，造成傷口或整個血液系統的免疫功能被活化，其中TNF-α扮演一重要角色，在有敗血性休克的病患血液中發現：TNF-α顯著增加。此外，一些感染性疾病會誘發體內proinflammatory cytokines的分泌 (Villa and Ghezzi., 2004)。由本實驗可知，MCT oil可降低巨噬細胞在LPS所誘發下，發炎介質PGE₂的合成，因此可進一步分析MCT oil對其他細胞激素的影響，或以其他細胞模式如：T-淋巴球、B-淋巴球，探討MCT oil對免疫系統的調節。此外，亦可以動物為模式，探討給予不同比例之MCT或LCT，對LPS所引發之發炎反應、敗血現象或動物存活率等的影響。

本實驗結果推測山苦瓜中具有抑制巨噬細胞PGE₂合成的可能成分為：酯化型

中、短鏈飽和脂肪酸或雙酸。後續可再進行分析對其他發炎介質如：TNF- α 、IL-1、IL-6 或IFN- γ 生成之影響。

整體而言，在本實驗中以巨噬細胞為模式下篩選具有抑制PGE₂的區分物及可能成分，主要可被EA萃取。而山苦瓜乙酸乙酯萃物中亦含有可活化PPAR α 的CLN。且在分離的過程中，發現山苦瓜乙酸乙酯萃物中含有數種型式的植物固醇類。因此，若以山苦瓜乙酸乙酯萃物進行動物實驗，應可分析出以下功能：

- ①. CLN 可在動物體內經酵素作用轉換為 CLA，不論 CLA 或 CLN 均可活化 PPAR α ，進而調節脂質的代謝，降低血脂。
- ②. 減少發炎介質PGE₂的合成
 - 以巨噬細胞為模式下發現山苦瓜中乙酸乙酯萃物具有抑制PGE₂合成的作用，當中含有抑制發炎介質PGE₂生成的可能成分：酯化型中短鏈飽和雙酸。
 - CLN可在動物體內經酵素作用轉換為CLA，CLA具有抑制NF κ B的活化，進而下降COX-2 的表現，可減少PGE₂的合成。
- ③. 植物固醇類可抑制膽固醇被腸道吸收，因此具有下降血膽固醇的作用。

總結

本研究以巨噬細胞為模式，透過化學分離的方式，篩選苦瓜中能抑制PGE₂合成的區分物，以進一步分離苦瓜中具有此活性的可能成分。歸納結果如下：

- ①. 山苦瓜中具有活性的成分，主要可被 EA 萃取。
- ②. 將 Hexane 區分物經矽膠管柱流洗後，所得之 90%EA+10%MeOH 活性區分物進行分離，發現其組成主要為中、短鏈飽和型式的 TG。
- ③. 將活性區分物進行水解，EA 萃取及甲基化，送測 GC-Mass 的結果發現：含有短鏈雙酸的型式包括：octanedioic acid (八碳雙酸)、nonanedioic acid(九碳雙酸)及 decanedioic acid(十碳雙酸)。
- ④. 透過分析脂肪酸及可能成分的相關標準品對PGE₂合成的影響，發現：Linoleic acid及Arachidonic acid有促進PGE₂合成的作用；Capric acid (C10:0)可顯著抑制PGE₂的合成；而MCT oil及八碳、九碳雙酸標準品均可抑制PGE₂生成。

綜合上述結果，推測山苦瓜中具有抑制巨噬細胞PGE₂合成的可能成分為：酯化型中短鏈飽和脂肪酸或雙酸。此外，山苦瓜中乙酸乙酯萃物或其他活性區分物中仍可能存在其他具有活性的成分。