

## 苦瓜萃物對動脈粥狀硬化及其相關因子的影響

曾雅旻 詹鳳紋 蕭嘉羚 黃湘儒 辛靜玫 顏妙容 吳文惠

國立台灣師大 人類發展與家庭學系 營養科學與教育組

### 摘 要

苦瓜具有活化 PPAR  $\alpha$  及  $\gamma$  的成分，也含抗發炎成分。本研究探討苦瓜萃物或區分物對動脈粥狀硬化相關因子的影響。以容易產生動脈粥狀硬化之 apoE 剔除小鼠為模式，由主動脈橫切觀察，發現苦瓜乙酸乙酯萃物可降低新生內層與中層比值，表對動脈粥狀硬化有抑制功能。在較年輕 apoE 小鼠，也觀察到苦瓜乙酸乙酯萃物可降低整條主動脈縱切的脂肪堆積。而以巨噬細胞為模式，發現苦瓜乙酸乙酯區分物可抑制 LPS 誘發的 PGE2 產生，效果遠高於水萃物，且其成分為含中短鏈脂肪酸之三酸甘油酯，脂肪酸中以 capric acid 抑制巨噬細胞產生 PGE2 能力最高。苦瓜之乙酸乙酯萃物可降低巨噬細胞產生 NO 及生成 MMP-9，降低人類主動脈內皮細胞生成 ICAM 及單核球細胞的粘附。總結：苦瓜乙酸乙酯萃物具有抗動脈粥狀硬化功能，可能經由抗發炎與降低白血球黏附到血管內皮細胞，對 MMP-9 生成的抑制也許有助動脈硬化斑塊的穩定。

**關鍵詞：**苦瓜、抗發炎、動脈粥狀硬化、巨噬細胞、內皮細胞

## 一、前言

國人代謝症候群的發生日益增多，包含胰島素抗性引起的葡萄糖不耐症、腹部肥胖、高 TG、低 HDL 與高血壓，是否轉變為心血管疾病會受到體內未顯現臨床症狀的發炎程度影響。PPAR  $\alpha$  及  $\gamma$  活化劑分別可下降血脂與血糖，目前所用的降血脂藥物 fibrate 及降血糖藥物 glitazones 分屬之。PPAR- $\gamma$  agonists，除可降血糖外，也會降低發炎反應，其分子機轉是活化 PPAR- $\gamma$  後抑制 monocyte 分泌細胞激素 (Jiang et al, 1998; Ricote et al, 1998)。PPAR 亦有抗發炎的功能 (Chinetti et al, 2000)。血管壁上單核/巨嗜細胞、內皮細胞、上皮細胞與平滑肌細胞都會表現各種 PPARs，PPARs 被活化後，干擾 NF-kappaB, STAT, AP-1 訊息傳遞，而抑制發炎反應基因如 IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), metalloproteases 表現 (Chinetti et al, 2000)，使 PPAR agonists 成為治療動脈粥狀硬化藥物 (Francis et al, 2003)，尤其可同時活化兩種受器之藥物，被認為具有最大之潛力。

苦瓜之乙酸乙酯萃取物具有相當於藥物 WY-14643 之 PPAR  $\alpha$  活化能力，促進肝臟 acyl-CoA oxidase 基因表現的成分，具增加肝臟脂肪酸氧化的作用 [Chao et al, 2003]，預期具有透過 PPAR  $\alpha$  調節脂質代謝之能力。進一步測試，發現苦瓜萃取物對 PPAR  $\gamma$  與  $\delta$  也有極佳之活化能力。最近日本學者發現胃液消化過的苦瓜溶液會增高人類巨嗜細胞株 IL-10 分泌，IL-10 功能為抑制 T 細胞功能，若以 5%凍乾苦瓜餵養大白鼠體外實驗，發現脾臟淋巴球細胞減少，故認為苦瓜會抑制發炎 (Manabe et al, 2003)。Huang 等人觀察到苦瓜萃取物可抑制小鼠腹腔巨噬細胞株在 LPS 刺激下 PGE2 之生成，可能具有抗發炎之功效 (Huang et al, 2003)。

在動脈硬化的小動物模式中，apoprotein (apo) E deficient 小鼠 C57BL/6，因無清除血液中引起動脈粥狀硬化的大分子脂蛋白的能力，約 10 週大就會產生與人類動脈粥狀硬化相似的所有現象 [Nakashima et al, 1994]，如血膽固醇高到 600 mg/dL，正常鼠僅 100 mg/dL，與人類 apoE2 突變型或糖尿病人常發生的 Type III hypercholesterolemia 類似，膽固醇與 TG 幾乎同高，於此模式也可見到 aortic root、aortic arch、pulmonary and carotid arteries 泡細胞堆積與損傷，PPAR agonist fenofibrate 可降低此種小鼠動脈粥狀硬化 (Duez et al, 2002)，人類粥瘤形成初期的發炎反應也可在此動物模式顯現，此種小鼠血清含有高濃度的抗各種被氧化的 LDL 的自

體抗體，有些可辨識人血清與粥狀斑上被氧化的 LDL (Palinski W, 1996)。動脈粥狀硬化的進展，無論是飲食引起或是基因缺損 (ApoE deficient, LDL receptor defect, apo B mutation) 都相當類似 (Reddick et al, 1994)，因此以此為動物模式。

本研究用 ApoE knockout mice 模式研究苦瓜對粥狀動脈硬化的改善效果，分析主動脈竇、主動脈竇後、胸主動脈三處的血管 Intima/Media area ratio，及主動脈縱切的脂肪堆積。為了解山苦瓜降低動脈硬化的機轉與成分，以 RAW264.7 巨噬細胞為模式，測試苦瓜乙酸乙酯萃物區分物，或不同的山苦瓜萃取物對 LPS 誘發的 PGE2、NO 等發炎因子，及使動脈粥狀硬化斑塊不穩定的 MMP-9 產生的抑制效果；並以人類主動脈內皮細胞為模式，在 TNF  $\alpha$  刺激下，測試不同山苦瓜萃取物對細胞黏著分子表現與單核球化學趨化物質分泌的影響。

## 二、材料與方法

### (一) 材料

山苦瓜由行政院農業委員會花蓮區農業改良場提供，三種雜交品系 (農友三苦瓜、花蓮一號、WB15) 共約300公斤，全果直接送至彰化達群公司，洗淨後進行冷凍乾燥，得到17.6公斤凍乾粉末，產率為5.9%。其中澱粉佔39.28%、可溶性糖8.65%、纖維38.2%、蛋白質4.51%、灰分6.7%、脂質2.66%。山苦瓜乙酸乙酯萃物來自山苦瓜凍乾粉末5公斤浸泡於150公升乙酸乙酯，室溫下攪拌萃取24小時，再將萃取液於60°C 進行減壓濃縮，得到250克，萃取率約5% (謝婉郁, 2005)。

### (二) 動物實驗

#### 1. 飼料

飼料的基本組成參考AIN-76 (American Institute of Nutrition, 1997) 配方作修正，將玉米澱粉 (Samyang Genex Corp, Seoul, Korea) 和蔗糖 (台糖精緻細砂) 的比例改成1:1，其他成分包含酪蛋白 (ICN Biomed)、甲硫胺酸 (Sigma, USA)、纖維素 (JRS. Vitacel, German)、AIN-76礦物質混和物 (ICN Biomed)、AIN-76維生素混和物 (ICN Biomed)、膽鹼 (Sigma)、膽固醇 (Hanawa, Japan)、紅花子油 (台糖紅花子油)、奶油 (安佳無水奶油)，另外分別添加山苦瓜凍乾粉末、山苦瓜乙酸乙酯萃物、Clofibrate

(Fluka)、TZD (Avandia)。依山苦瓜成分分析結果，當飼料中給予5%山苦瓜粉末，將依成分比例取代飼料中starch (-2.9%)、cellulose (-2.1%)；而使用山苦瓜乙酸乙酯萃物1%則取代 1% butter；此外，也調整高脂飼料protein, mineral, vitamin, cellulose 之nutrition density，使其同於低脂飼料(chow diet)。實驗一使用6種飼料：(1) chow diet：MF18商業錠狀飼料。(2) 高脂：含20%油脂。(3) 高脂苦瓜：含20%油脂+5%山苦瓜凍乾粉末。(4) 高脂乙酸乙酯萃物：含19%油脂+1%乙酸乙酯萃物。(5) 高脂Clofibrate：含20%油脂+0.5%Clofibrate。(6) 高脂TZD：含20%油脂+0.00123%TZD (rosiglitazone)。實驗二使用與前面相同之高脂、高脂苦瓜、高脂乙酸乙酯萃物三種飼料。

## 2. 實驗動物

實驗一將18週齡的C57BL/6J apo E knockout的雄性小鼠45隻依體重隨機分6組，餵養18週；實驗二15隻10週、7隻9週、11隻6週齡的C57BL/6J apo E knockout的雄性小鼠共33隻，依體重、年齡分成三組，餵食8週。飼養期間，每日光照12小時，黑暗12小時，使用IVC cage (5隻/籠)，每週更換高溫高壓滅菌籠2次，飼料及水自由攝取，飼料攝取量每週紀錄2次，體重每週紀錄1次，並視需要由眼窩採血，犧牲後收集主動脈血管。

## 3. 主動脈橫切面之新生內層及中層面積比

將取下之主動脈弓(aortic arch)及胸主動脈(thoracic aorta)旁的脂肪組織剔除乾淨後，以含4%福馬林(paraformaldehyde)之PBS固定液進行固定，更換兩次後處理隔夜，將經固定液固定完之心臟血管從左右頸動脈分支之動脈弓處分開，將兩段組織分別置於裝有新鮮的PBS的標本瓶1小時後(30鐘更換一次)，再更換新的PBS保存於4°C至進行石蠟包埋(paraffin embedding)，將包埋好的石蠟塊修為梯型並固定於包埋盒座上，以切片機進行切片，含心臟和動脈弓前段之組織以7  $\mu$ m厚度、動脈弓後段血管組織以5  $\mu$ m厚度進行切片，將切出的片子，小心放入37~40°C水浴槽進行展片，每10片收取1片置於上有poly-L-lysine之玻片上，接著置於37°C烘片機中乾燥，採用Mayr, s Hematoxylin & Eosin stain方法，將保存之切片進行蘇木精-伊紅染色(Hematoxylin & Eosin stain)，接著，將已製作好的動脈組織切片，利用光學顯微鏡連接電腦影像分析系統Image-pro plus 2.0軟體(Olympus Model-ck30)拍照並計算動脈組織橫切面之新生內層及中層面積比率Intima/Media Ratio(如附圖3-3-2)，再進行統計比較之。

#### 4.主動脈縱切與脂肪堆積染色

主動脈弓 (aortic arch) 及胸主動脈 (thoracic aorta) 以含4%福馬林 (paraformaldehyde) 之PBS固定後，以PBS清洗後，浸泡於50%isopropanol 10分鐘，再以配置好的Oil red-O (5mg/ml in isopropanol) 染色2分鐘，再以50% isopropanol 退染1分鐘，最後置於PBS內保存。經由Oil-red-O染色後，從血管腹面縱向剪開後，脂肪會呈現深紅色斑點，接著以照相系統 (Olympus) 進行拍照，最後使用ImageJ軟體 (NIH網站提供) 分析主動脈前1公分長度硬塊面積與血管面積的比率。

### (三) 細胞實驗

#### 1.RAW264.7 cell line之前列腺素(PGE2)、NO、IL-10、TNF- $\alpha$ 分泌，及iNOS 表現

待測苦瓜樣品以培養液 (DMEM) 稀釋為不同濃度進行細胞實驗，培養18小時後，以MTT測細胞存活率，若實驗組之細胞數低於僅以培養液培養的控制組，則表示該濃度之樣品具細胞毒性。因此，決定培養之樣品濃度範圍以不影響細胞生長為原則，以排除樣品濃度對細胞生長之干擾。以LPS 100 ng/ml 處理 RAW264.7 18小時誘導PGE2生成，觀察苦瓜乙酸乙酯萃取物之區分物對RAW264.7細胞株之PGE2生成量的影響，採用市售試劑套組以競爭性免疫分析方法進行PGE2分析，為避免因細胞增生造成PGE2濃度的差異，故將每well所測得之PGE2生成量除以1 x 10<sup>5</sup> 單位細胞數表示之。IL-10、TNF- $\alpha$  以Elisa，iNOS用西方點墨法測量。

#### 2.人類單核球細胞株THP-1之 MMP-9表現

THP-1購自食工所生資中心，使用RPMI 1640培養液 (Gibco)，內含 2  $\mu$  M L-glutamin、4.5g/L glucose、10Mm HEPES、1.0mM sodium pyruvate (SIGMA)，外加 fetal bovine serum 10% (Hyclone) 及 0.05mM 2-mercaptoethanol (SIGMA)。加入100 mg/ml PMA 培養THP-1 48 h 促進分化為巨噬細胞，再加50 mg/ml ox-LDL及苦瓜萃物，收集細胞上清液後，採用市售Human MMP9 set (R&D Systems) 進行分析。

#### 3.人類主動脈內皮細胞表現ICAM-1、分泌MCP-1與NO生合成，以及被單核球黏附情況。

HAECs 細胞株 (Cascade Biologics)、培養液 M200 (Cascade Biologics)、LSGS (Cascade Biologics)、TE/TN (Cascade Biologics)、

PSF 抗生素 (GIBCO)、抗黴劑 Methyl 4-hydroxybenzoate (SIGMA)、細胞級 DMSO (SIGMA)、trypan blue (SIGMA)、液態氮 (巧充)、fetal bovine serum (HyClone)。內皮細胞以 TNF- $\alpha$  (2 ng/ml) 刺激，同時與 2381 及 CK 兩品種山苦瓜之乙酸乙酯萃物、皂化與不皂化萃物 (EAE、S 及 NS) 共同處理 12 小時。以 Human CCL2/MCP-1 kit assay (R&D Systems) 分析 MCP-1；以 Griess Reagent System 組 (Promega) 分析 NO；抽取細胞蛋白質以西方點墨法 (Western blotting) 進行分析 ICAM。內皮細胞/單核球黏附分析，先以螢光劑 (2',7'-bis (2-carboxyethyl) -5 (6) -carboxyfluorescein acetoxymethyl ester; Invitrogen, 進階) 標示 U937 細胞，再與內皮細胞在培養箱中共同培養一小時，以螢光光度計 (TEKON Technologies) 讀取 Ex 485/Em 530 螢光強度。

(四) 統計方法：請見圖表。

### 三、結果

#### (一) 動物實驗

##### 實驗 1. 胸主動脈 Intima / Media area ratio

高脂 Clofibrate 顯著高於 Chow diet、高脂 EA 和高脂苦瓜組，且 EA 組顯著低於高脂組。

表一、胸主動脈 Intima / Media area ratio (Exp. 1)

Table 1. The Intima / Media area ratio of thoracic aorta in apoE knockout mice fed six different diets

組別	n	Intima/Media Area ratio
Chow diet	5	0.230 $\pm$ 0.058 <sup>bc</sup>
高脂	10	0.739 $\pm$ 0.225 <sup>ab</sup>
高脂 苦瓜	10	0.440 $\pm$ 0.114 <sup>bc</sup>
高脂 EA	10	0.320 $\pm$ 0.062 <sup>c</sup>
Clofibrate	5	0.999 $\pm$ 0.297 <sup>a</sup>
TZD	5	0.665 $\pm$ 0.123 <sup>abc</sup>

1. Values are Mean $\pm$ SEM

2. Data were analyzed by one-way ANOVA LSD test. Values with different superscript letters are significantly different at p<0.05 level

實驗 2.主動脈脂肪堆積情形

經由 oil-red-O 染色觀察主動脈脂肪堆積情形，計算出主動脈損傷面積百分比，以 ANOVA LSD 多重比較法分析，高脂 EA 顯著低於高脂苦瓜組與高脂組（如表三）。

表二、主動脈損傷面積百分比

Table 2. Percent of aortic lesion areas in apoE knockout mice fed three different diets.

組別	n	Lesion areas (%)
高脂	11	11.51 ± 1.26 <sup>a</sup>
高脂苦瓜	10	13.04 ± 1.21 <sup>a</sup>
高脂 EA	10	8.35 ± 0.59 <sup>b</sup>

1.Values are Mean±SEM

2.Data were analyzed by ANOVA LSD test. Values with different superscript letters are significantly different at p<0.05 level

表三. 動物實驗 1 &amp; 2 結果

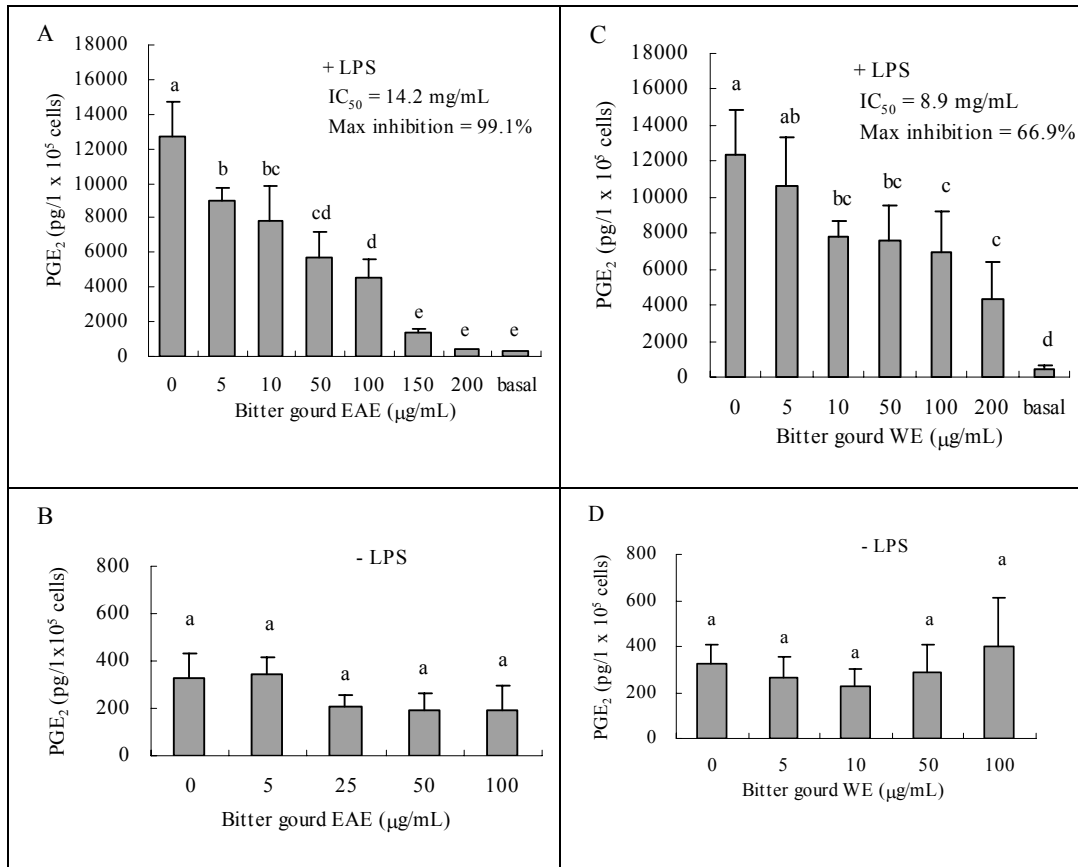
Table3. the outcome of animal models(1&amp;2)

	動物實驗 1	動物實驗 2
餵食劑量	20%高脂 + 5%山苦瓜凍乾粉末 20%高脂 + 1%山苦瓜乙酸乙酯萃物	20%高脂 + 5%山苦瓜凍乾粉末 20%高脂 + 1%山苦瓜乙酸乙酯萃物
開始實驗 age	18 週大	10 週(15 隻)、9 週(7 隻)、6 週(11 隻)大
餵食週數	18 週	8 週
體重變化	高脂苦瓜組在 2-7 週顯著低於與其他組, 13 週後無顯著差異	高脂苦瓜組從第二週開始體重顯著低於高脂、高脂 EA 組
攝食量	高脂 EA 最高, 高脂苦瓜組最低	高脂苦瓜組最高, 高脂組最低
攝食效應	高脂 EA 最高, Clofibrate 組最低	高脂組最高, 高脂苦瓜組最低
器官重	絕對與相對副睪脂高脂 EA 顯著高於 chow diet 組 絕對肝重高脂 Clofibrate 顯著高於高脂組	絕對腎重高脂苦瓜組顯著低於高脂與高脂 EA 組 相對脾重高脂苦瓜顯著高於高脂與高脂 EA 組
血清發炎因子	IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF $\alpha$ 皆無顯著差異	IL-6、TNF $\alpha$ 皆無顯著差異
血清黏著分子	ICAM-1 高脂苦瓜顯著高於 chow diet, VCAM-1 無差異	無測量
白血球上 CD11b/C	無測量	各組無顯著差異
D18 表現		
血清 8-iso-PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	無測量	各組無顯著差異
血管分析	胸主動脈切片高脂 EA 顯著低於高脂組	縱切高脂 EA 顯著低於高脂與高脂苦瓜組



(二) 山苦瓜萃取物對 RAW264.7 之影響

1. 乙酸乙酯萃取物(EAE)與 LPS 同時處理下，具有抑制 PGE<sub>2</sub> 生成的作用 (Fig 1-A)。乙酸乙酯萃取物(EAE)的抑制效果較於水萃物(WE)強 (Fig 1-C)。

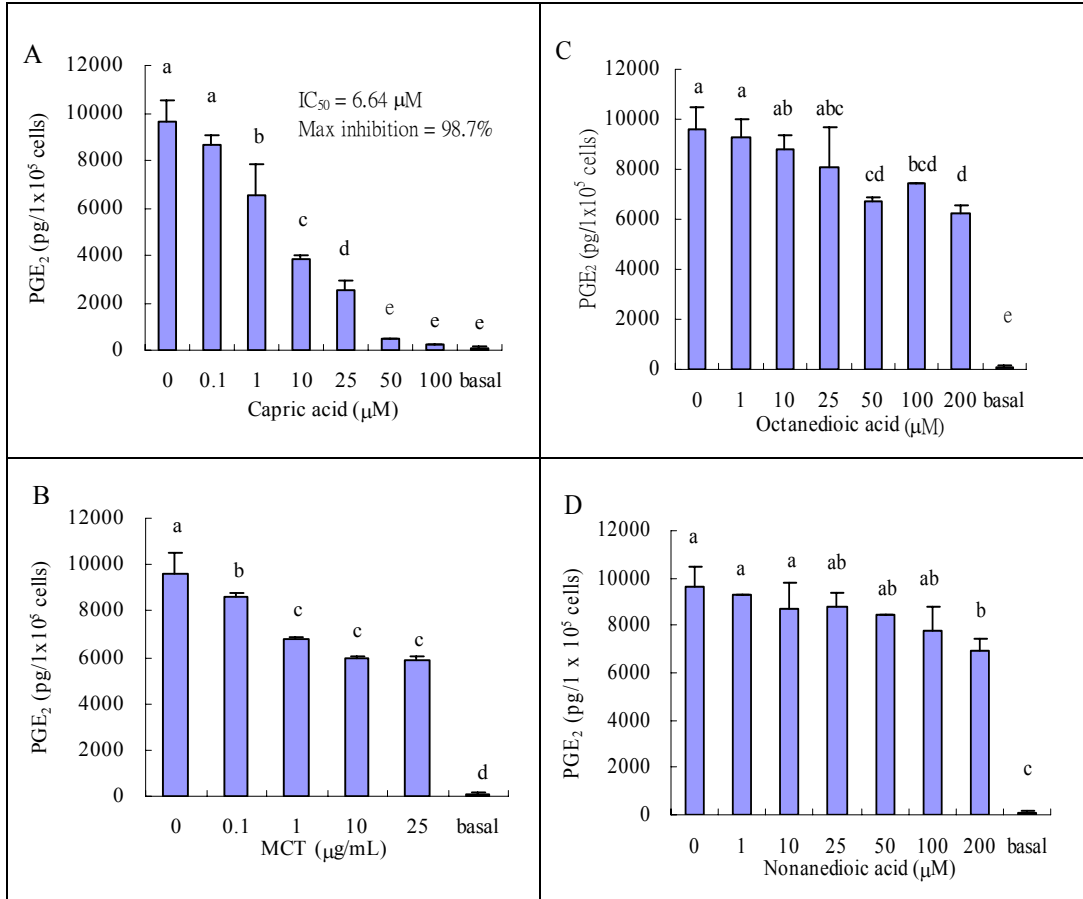


圖一、乙酸乙酯苦瓜萃物與水萃苦瓜對 RAW264.7 細胞 PGE<sub>2</sub> 生成量之影響

Fig 1. Effects of ethyl acetate extract (EAE) (A, B) and water soluble extract (WE) (C, D) of bitter gourd on PGE<sub>2</sub> production in RAW264.7 cells. The cells were treated with various concentrations of the extracts in the presence (+LPS) or absence (-LPS) of LPS (100 ng/mL) for 18 hrs and then medium was collected for PGE<sub>2</sub> analysis using an EIA.

Basal: RAW264.7 cells incubated with medium only. 0: RW264.7 cells treated with LPS only.

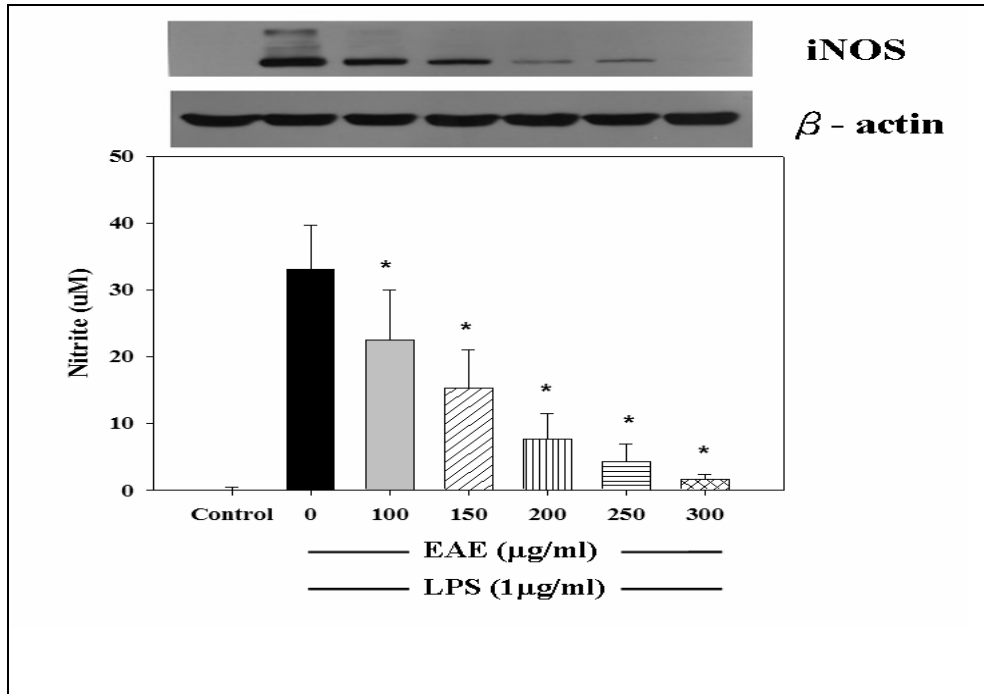
2.山 苦 瓜 EAE 經 不 同 極 性 溶 劑 對 萃 ·4 次 silica gel column chromatographies 與 reverse phase C-18 chromatography 得 活 性 最 高 之 RP-10 區 分 物，再 經 H-NMR 與 H-H COSY 分 析 發 現 為 含 中 短 鏈 脂 肪 酸 之 三 酸 甘 油 酯，以 各 種 脂 肪 酸 測 試 抑 制 PGE<sub>2</sub> 合 成 能 力，發 現 capric acid 活 性 最 高(Fig 2A)，MCT，octanedioic acid, nonanedioic acid 亦 有 較 低 能 力 (Fig2B-D)。



圖二、capric acid (A), MCT (B), octanedioic acid (C)及 nonanedioic acid (D) 對 RAW264.7 細胞 PGE<sub>2</sub> 生成量之影響

Fig 2.Effects of capric acid (A), MCT (B), octanedioic acid (C), and nonanedioic acid (D) on PGE<sub>2</sub> production in RAW264.7 cells. The cells were treated with various concentrations of fatty acids or MCT in the presence of LPS (100 ng/mL) for 18 hrs and then medium was collected for PGE<sub>2</sub> analysis using an EIA.

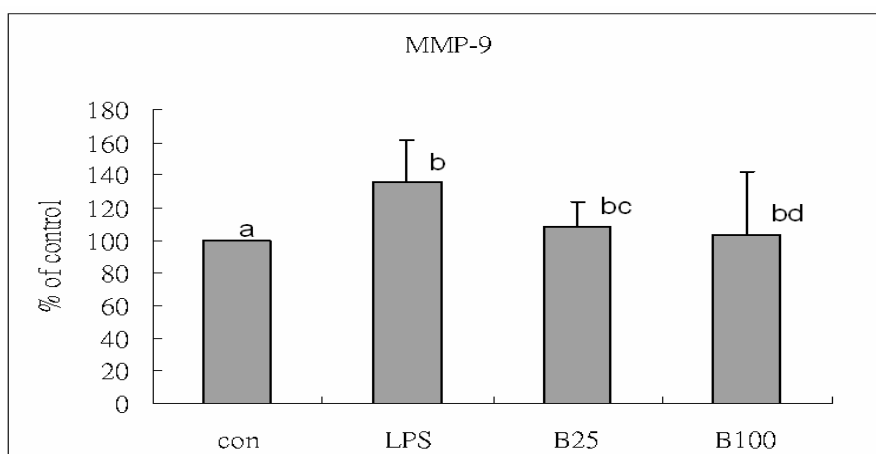
3.巨噬細胞產生大量 NO 是發炎的現象，苦瓜乙酸乙酯萃物可下降 LPS 刺激下 Raw264.7 的 iNOS 酵素活性與 NO 產生，且有劑量反應 (Fig 3)。



圖三、乙酸乙酯苦瓜萃物對 NO 生成量與 iNOS 表現量之影響

Fig 3. Effect of ethyl acetate extract (EAE) of wild bitter gourd on LPS-Induced nitric oxide production and iNOS expression in RAW 264.7 macrophage cells.  $p < 0.05$  vs cells with LPS alone (0 g/ml of EAE).

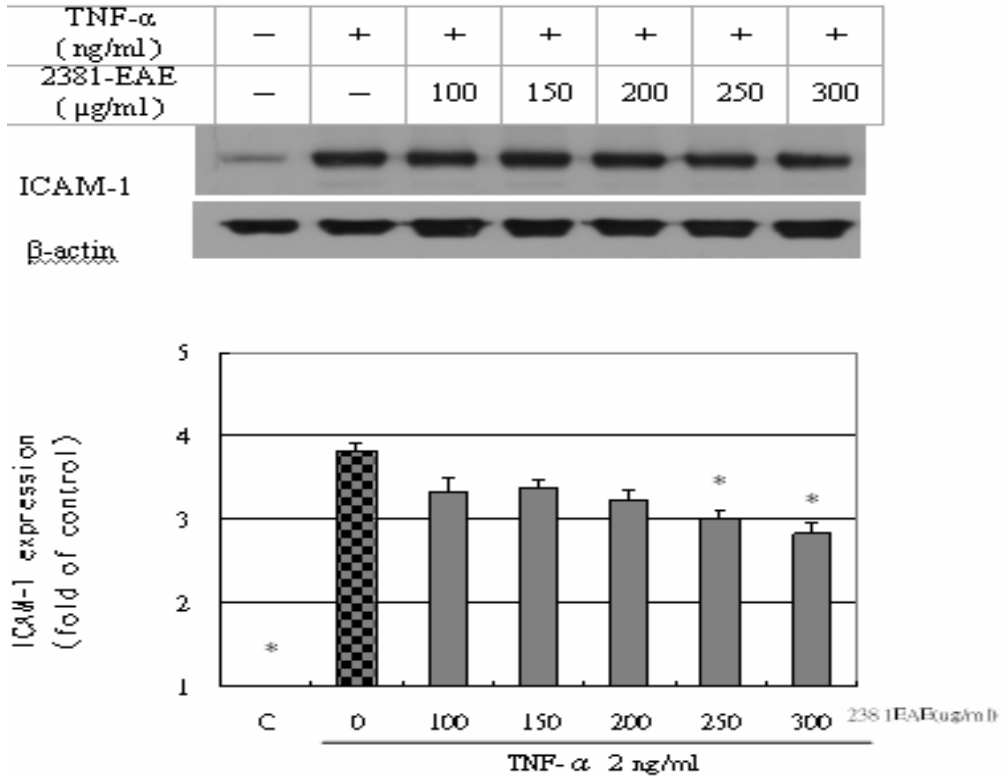
4. 苦瓜萃物下降人類巨噬細胞株 THP-1 在 LPS 刺激下所產生的 MMP-9 (Fig 4)



PMA100ng/ml	+	+	+	+
LPS (10ng/ml)	-	+	+	+
Bitter gourd( $\mu$ g/ml)	-	-	25	100

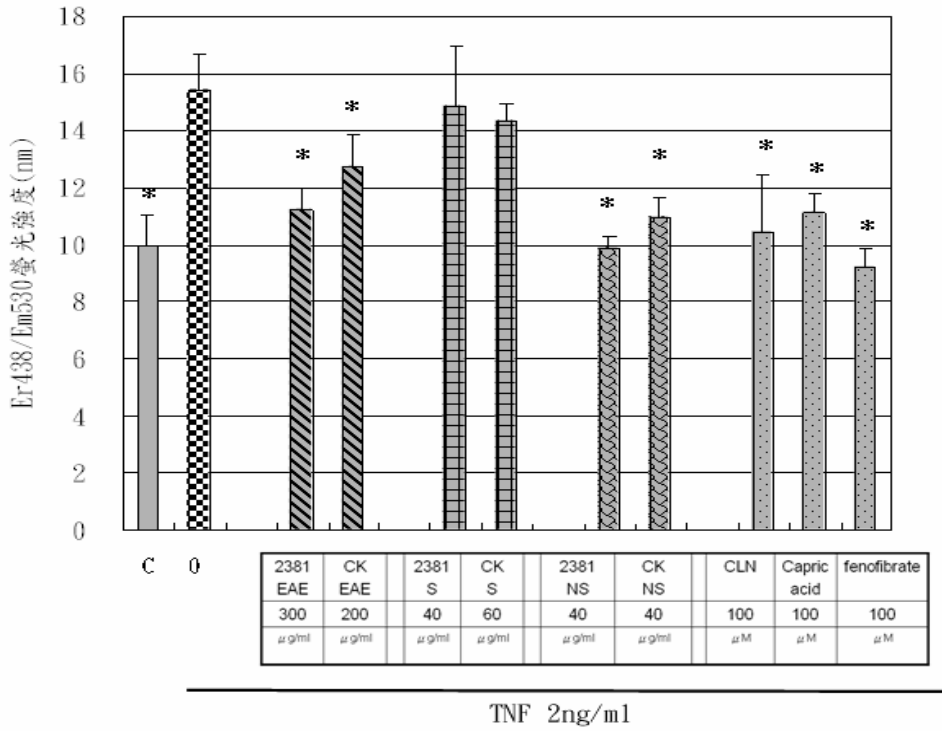
Fig 4. THP-1 were treated with PMA 100ng/ml for 48hrs and then treated with bitter gourd EAE extract and LPS for 24hrs. Medium were collected and assayed for MMP9.

5. 苦瓜萃物下降 TNF $\alpha$  刺激下人類主動脈內皮細胞合成 ICAM (Fig 5) , 及被單核球細胞粘著 (Fig 6)



圖五、 苦瓜 2381 乙酸乙酯萃物對 ICAM-1 表現量之影響

Fig 5. Effects of wild bitter gourd 2381- ethylacetate extracts (2381-EAE) on ICAM-1 expression in TNF- $\alpha$  stimulated HAEC. Cells incubated without bitter gourd and TNF- $\alpha$  were the negative control (C). Amounts of ICAM-1 were quantified using  $\beta$ -actin as loading control and are expressed relative to those of control conditions. Values are means  $\pm$  SD, n=4. \*Significantly different from 0  $\mu$ g/ml analyzed by Mann-Whitney U test at p < 0.05.



圖六、苦瓜萃物對於細胞黏附作用之影響

Fig 6. Effects of extract of bitter gourd on the adhesion of U937 monocytes to TNF $\alpha$ -stimulated HAEC. Monocytes were labeled with 2  $\mu\text{M}$  2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein acetoxymethylester (BCECF-AM, Molecular Probes). Fluorescence was read using a filter pair for excitation at 485 nm and emission at 530 nm. Cells incubated without bitter gourd and TNF- $\alpha$  were the negative control (C). Values are means  $\pm$  SD, n=3. \*Significantly different from 0  $\mu\text{g/ml}$  analyzed by Mann-Whitney U test at  $p < 0.05$ .

#### 四、討論

經兩次獨立實驗分別發現苦瓜 EA 萃物可降低主動脈內皮層增厚程度 57%，及降低主動脈弓與胸主動脈脂肪堆積 28%，因此推論山苦瓜乙酸乙酯萃物具有改善動脈粥狀硬化之功效。山苦瓜凍乾粉末無法改善動脈硬化的原因可能因高脂苦瓜組的有效成分只有高脂 EA 組的 1/4。因為前兩動物實驗，苦瓜 EA 萃物都無下降血脂，故探討其他作用機轉包含抗發炎、降低白血球粘結到血管壁。

由巨噬細胞株實驗得知山苦瓜乙酸乙酯萃物有抗發炎成分，可能是含中短鏈脂肪酸的三酸甘油酯的成分，且第一次發現脂肪酸中 capric acid 具備最強抑制巨噬細胞產生 PGE2 的能力，此效果可能類似它的抗 gram(-) 菌作用。苦瓜萃物也顯示其他抗發炎功能如降低巨噬細胞產生 NO，及使粥狀硬化斑塊不穩定的 MMP-9。在動脈硬化初期先有單核球粘著到動脈壁，才有泡細胞形成，其黏著需內皮細胞分泌黏著因子，若此步驟受到抑制將可延緩動脈粥化的發生與進展，本研究發現苦瓜萃物降低內皮細胞製造粘著因子 ICAM，並觀察到單核球細胞黏著到內皮的程度降低，這些結果可解釋苦瓜萃物改善動脈粥狀硬化的機轉，並可視為篩選苦瓜品種與有效成分的工具。

#### 參考文獻

- 1.林弼玉 2004 以巨噬細胞株為模式探討苦瓜中影響前列腺素 E2 合成之區分物 國立台灣師範大學人類發展與家庭學系, 台北.
- 2.曾雅旻 2006 山苦瓜對 Apo E 剔除小鼠脂質代謝的影響 國立台灣師範大學人類發展與家庭學系, 台北.
- 3.黃湘儒 2007 山苦瓜萃取物對巨噬細胞發炎反應的影響 國立台灣師範大學人類發展與家庭學系, 台北.
- 4.詹鳳紋 2006 山苦瓜對 Apo E 剔除小鼠動脈硬化的影響 國立台灣師範大學人類發展與家庭學系, 台北.
- 5.蕭嘉玲 2007 山苦瓜萃取物對人類主動脈內皮細胞表現與分泌細胞黏著因子的影響 國立台灣師範大學人類發展與家庭學系, 台北.
- 6.Bi-Yu Lin, Ching-Jang Huang, Yueh-Hsiung Kuo, and Wen-Huey Wu, Fractionation and identification of anti-inflammatory components in bitter gourd. (Under review by Food Chemistry)

7. Bi-Yu Lin, Ching-Jang Huang, Yueh-Hsiung Kuo, & Wen-Huey Wu, 2007 Ionization and identification of anti-inflammatory components in bitter melon, 10th Asian Congress of Nutrition, Sep. 9-13, 2007, Taipei, Taiwan., <http://www.2007acn.org.tw>
8. Chao CY, Huang CJ, 2003 Bitter Melon (*Momordica charantia*) extract activates peroxisome proliferator-activated receptors and upregulates the expression of the acyl-CoA oxidase gene in H4IIEC3 hepatoma Cells, *J Biomed Sci*, 10 : 782-791.
9. Chinetti G, Fruchart JC, Staels B, 2000 Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation, *Inflamm Res*, 49 : 497-505.
10. Chia Lin Hsiao, CJ Huang, WH Wu, 2007 The effects of ethyl acetate extract of bitter melon on factors related to atherosclerosis in TNF- $\alpha$  stimulated human endothelial cells. 10th Asian Congress of Nutrition, Sep. 9-13, 2007, Taipei, Taiwan. <http://www.2007acn.org.tw>
11. Duez H. Chao YS. Hernandez M. Torpier G. Poulain P. Mundt S. Mallat Z. Teissier E. Burton CA. Tedgui A. Fruchart JC. Fievet C. Wright SD. Staels B , 2002 Reduction of atherosclerosis by the peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist fenofibrate in mice, *J Biol Chem*, 277 : 48051-7.
12. Fong-Wun Chan , Ya-Ming Tzeng, Chia-Lin Hsiao, Yuh-Lien Chen, Ching-Jang Huang, Chiu-Hua Kao, Wen-Huey Wu, 2007 Ethyl acetate extract of bitter melon decreases atherosclerosis but not serum lipids in apoE knockout mice. 10th Asian Congress of Nutrition, Sep. 9-13, 2007, Taipei, Taiwan. <http://www.2007acn.org.tw>
13. Francis GA. Annicotte JS. Auwerx J , 2003 PPAR agonists in the treatment of atherosclerosis, *Curr Opin Pharmacol*, 3 : 186-91.
14. Huang CJ, Wu MC, 2002 Differential effects of foods traditionally regarded as “heating” and “cooling” on prostaglandin E2 production by a macrophage cell line, *J Biomed Sci*, 2003; 9: 596-606.
15. Jiang C. Ting AT. Seed B, 1998 PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines, *Nature*, 391 : 82-6.



16. Manabe M, Takenaka Ryo, Nakasa T, Okinaka, 2003 Induction of anti-inflammatory responses by dietary *Momordica charantia* L (Bitter Gourd), *Biosci Biotechnol Biochem*, 67 : 2512-2517.
17. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R, 1994 ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree, *Arterioscler Thromb*, 14 : 133-140.
18. Palinski W. Horkko S. Miller E. Steinbrecher UP. Powell HC. Curtiss LK. Witztum JL, 1996 Cloning of monoclonal autoantibodies to epitopes of oxidized lipoproteins from apolipoprotein E-deficient mice. Demonstration of epitopes of oxidized low density lipoprotein in human plasma, *J Clin Invest* 98 : 800-14.
19. Reddick RL. Zhang SH. Maeda N, 1994 Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression, *Arterioscler Thromb*, 14 : 141-7.
20. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. 1998 The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation, *Nature*, 391 : 79-82.
21. Ya-Ming Tseng, Fong-Wun Chan, Jia-Lin Hsiao, Yuh-Lien Chen, Ching-Jang Huang, Wen-Huey Wu, 2007 Lyophilized bitter gourd powder lowers serum lipids but has no effect on atherosclerotic plaques in apoE knockout mice, 10th Asian Congress of Nutrition, Sep. 9-13, 2007, Taipei, Taiwan. <http://www.2007acn.org.tw>
22. Ya-shi Kao, Wen-Huey Wu, Maio-jung Yan, Yuh-Lien Chen, 2007 Sesame lignans attenuate ICAM-1 expression and monocyte adhesion in TNF- $\alpha$  treated human aortic endothelial cells, 10th Asian Congress of Nutrition, Sep. 9-13, 2007, Taipei, Taiwan. <http://www.2007acn.org.tw>

## **The effect of bitter gourd extracts on atherosclerosis and its related factors**

### **ABSTRACT**

Bitter gourd contains some bioactive constituents which can activate PPAR $\alpha$  and  $\gamma$  induce anti-inflammatory responses. This study was to investigate the effect of bitter gourd extract on atherosclerosis and related factors, and identify its active components for functional food development. The results indicated that ethyl acetate extract of bitter gourd decreased intima/media area ratio of aorta in apoE knockout mice and the effect was consistent in young apoE knockout mice by decreasing en face lipid accumulation of aorta. To investigate the mechanisms and establish screening methods, several cell lines were used. Bitter gourd extract inhibited LPS induced PGE2 production in Raw 246.7, and triglycerides constituted of short chain and medium chain fatty acids were identified in the active fraction. Among 3-20 C fatty acid, capric acid was found to possess the highest PGE2 inhibition effect. LPS induced NO production in Raw264.7, LPS induced MMP-9 production in THP-1, and TNF $\alpha$  induced ICAM production in human aorta endothelial cell (HAEC) decreased by bitter gourd extract. Monocyte adhesion to TNF $\alpha$  stimulated HAEC also decreased. In conclusion, bitter gourd extract improves atherosclerosis through anti-inflammation and inhibiting the adhesion of monocytes to aorta endothelial cells, and potentially improves the stability of atherosclerotic plaques by decreasing the production of MMP-9 in macrophages.

Key words : bitter gourd, plasma lipids, anti-inflammation, atherosclerosis, macrophages