

國立臺灣大學生命科學院微生物與生化學研究所

碩士論文

Institute of Microbiology and Biochemistry

College of Life Science

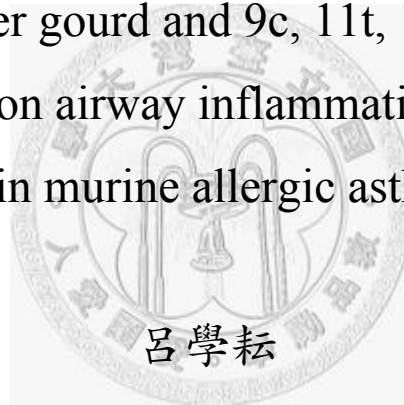
National Taiwan University

Master Thesis

山苦瓜與共軛次亞麻油酸對氣喘模式小鼠發炎

與過敏免疫反應的影響

Effects of bitter melon and 9c, 11t, 13t-conjugated  
linolenic acids on airway inflammation and immune  
responses in murine allergic asthma model



Hsueh-Yun Lu

指導教授：林璧鳳 博士

Advisor: Bi-Fong Lin, Ph. D.

中華民國九十九年七月

July, 2010

## 摘要

已有研究指出山苦瓜果的降血糖功效與其乙酸乙酯萃物含共軛次亞麻油酸 (9c, 11t, 13t-conjugated linolenic acid, CLN)活性成份，但對於免疫調節的影響，尚未有研究發表。本研究首先以細胞培養探討花蓮四號山苦瓜果正己烷(BGP-Hex)、乙酸乙酯(BGP-EA)、酒精(BGP-EtOH)與水草物(BGP-H<sub>2</sub>O)和CLN，對巨噬細胞株RAW264.7、小鼠T細胞株EL4、小鼠初代細胞分泌細胞激素的作用。結果發現BGP-EA、BGP-Hex和BGP-EtOH能顯著的降低RAW264.7的TNF $\alpha$ 及IL-6分泌，也顯著的抑制初代腹腔細胞IL-6的分泌。CLN能降低初代腹腔細胞TNF $\alpha$ 及IL-6的分泌，也能顯著減少小鼠初代脾臟細胞IFN $\gamma$ 與IL-4。在體外實驗初步觀察到山苦瓜果萃物與CLN具有抗發炎的潛力及調節免疫的效果。本研究接續探討山苦瓜果與所含的CLN對氣喘模式小鼠發炎與過敏免疫反應的影響，將 BALB/c 小鼠8週大時以卵蛋白 (ovalbumin, OVA) 加佐劑氫氧化鋁，隔週腹腔致敏以誘發過敏免疫傾向。三次致敏之後，將以小鼠分為五組，分別為OVA-oil控制組、飼料含5%山苦瓜果凍乾粉的OVA-BGP組、每天管餵35 mg共軛次亞麻油酸OVA-CLN組、每天管餵35 mg共軛亞麻油酸 (conjugated linoleic acid, CLA) 的OVA-CLA組、和固醇類藥物prednisolone正對照OVA-Pred組，另有一組為未致敏的PBS-oil組。餵食期間以5%霧化之OVA給予致敏小鼠呼吸道刺激，誘發過敏性呼吸道發炎，而PBS-oil組給予霧化PBS。小鼠餵食13天後，以methacholine (Mch)刺激呼吸道，測定呼吸道過度反應(airway hyperresponsiveness, AHR)時的呼吸阻力。小鼠餵食16天後犧牲，採血液、肺氣管沖洗液、分離脾臟及腹腔細胞、取肺組織進行切片觀察與抽取RNA分析基因表現。結果顯示，OVA-BGP組與OVA-CLN組在Mch各濃度下呼吸道阻力係數Penh值顯著低於OVA-oil控制組，OVA-CLA組在大於25 mg/mL Mch刺激下也顯著較低，表示山苦瓜果、CLN和CLA可減緩過敏性氣喘。與OVA-oil控制組相較，OVA-BGP組顯著減少肺氣管沖洗液中的總細胞、嗜伊紅性白血球及嗜中性白血球的數目、也降低Th2細胞激素IL-4、IL-5、IL-13與促發炎介質IL-6、PGE<sub>2</sub>和eotaxin

含量，肺組織中的COX-2 mRNA表現也顯著較低，且顯著的回復肺組織中的PPAR $\alpha$  基因表現量，顯示山苦瓜抑制發炎反應與Th2免疫反應。並且，OVA-BGP組的脾臟細胞在ConA刺激之下，IFN- $\gamma$ 分泌量顯著高於OVA-oil組，在特異性OVA刺激下的脾臟細胞IL-13分泌量顯著較低，血清總IgE生成量也顯著較低，顯示山苦瓜對調節免疫傾向Th1反應。OVA-CLN組則是顯著降低肺氣管沖洗液中嗜伊紅性白血球的數目和IL-5含量，回復肺組織PPAR $\gamma$  mRNA的表現量，顯示CLN的抗發炎作用。而OVA-CLA組顯著降低脾臟細胞在ConA刺激之下IL-13的分泌，肺組織IL-12與PPAR $\alpha$  mRNA表現量也顯著較高，故也測得顯著低的血清總IgE生成量，顯示CLA具調節免疫傾向Th1的作用。因此，由誘發致敏小鼠產生過敏性氣喘的動物模式顯示，山苦瓜具抑制過敏的免疫調節與抗發炎作用，所含成份的CLN則以降低呼吸道發炎作用較顯著，山苦瓜能減少過敏性抗體IgE的生成，應有助於減緩過敏免疫反應，值得推廣。

關鍵詞： 氣喘、山苦瓜、共軛次亞麻油酸、IgE、呼吸道發炎、共軛亞麻油酸

## Abstract

Studies show bitter gourd (*Momordica charantia*) exerts hypoglycemic effect and 9c, 11t, 13t-conjugated linolenic acid (CLN) from its ethyl acetate extract is the bioactive compounds. Only few reports on immunomodulatory effect of bitter guard have been published. First, the effect of hexane extract (BGP-Hex), ethyl acetate extract (BGP-EA), ethanol extract (BGP-EtOH), water extract (BGP-H<sub>2</sub>O) and CLN on cytokines secretion by RAW264.7 cell, EL4 cell and primary peritoneal cells or splenocytes from BALB/c mice was investigated. The results showed that BGP-EA, BGP-Hex and BGP-EtOH significantly inhibited TNF $\alpha$  and interleukin (IL)-6 secretion in LPS-stimulated RAW264.7. Furthermore, BGP-EA and BGP-EtOH significantly reduced IL-6 secretion and CLN could decrease the TNF $\alpha$  and IL-6 production in LPS-stimulated primary peritoneal cells. Treatment with CLN inhibited IFN $\gamma$  and IL-4 secretion in ConA-stimulated splenocytes. Therefore, bitter gourd and CLN may have an anti-inflammatory and immunoregulatory effect. Subsequently, we investigated effect of bitter gourd and 9c, 11t, 13t-CLN may on airway inflammation and immune response using a murine model of allergic asthma. Eight-week-old BALB/c mice sensitized intraperitoneally and challenged with ovalbumin (OVA) were fed a diet either supplemented with 5 % (wt/diet) bitter gourd powder (OVA-BGP group), or tube-feeding 35 mg/day CLN (OVA-CLN group), 35 mg/day 9c, 11t-conjugated linoleic acid (CLA) (OVA-CLA group), or oil as control (OVA-oil group) for 16 days. The OVA-sensitized mice treated with prednisolone were the positive control (OVA-Pred group). Mice without sensitization were the negative control (PBS-oil group). The hyperresponsiveness (AHR) challenged by methacholine (Mch), airway inflammation, serum antibody levels, cytokine secretions from splenocytes and lung mRNA expression were measured. BGP, CLN and CLA supplementation significantly suppressed the AHR, suggesting the alleviative effects on allergy asthma. Compared to the OVA-oil group, the OVA-BGP group had significantly lower total cells, eosinophil and neutrophil infiltration and Th2 cytokines IL-4, IL-5 and IL-13, and inflammatory mediators IL-6, PGE<sub>2</sub> and eotaxin in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), and pulmonary COX-2 mRNA expression, suggesting anti-inflammatory effect of BGP. The OVA-BGP group also had lower OVA-specific IL-13 secretion and IFN- $\gamma$  secretion from OVA- or ConA-stimulated splenocytes, and lower serum total immunoglobulin (Ig) E level, suggesting immunomodulatory effect of BGP. The OVA-CLN group showed significantly lower eosinophil infiltration and IL-5 in BALF, restored PPAR $\gamma$  mRNA expression that was down-regulated by sensitization, suggesting anti-inflammatory effect of CLN. The CLA group had significantly lower IL-13 secretion from Con-A stimulated splenocytes, higher pulmonary IL-12 and PPAR $\alpha$  mRNA expression, lower

total IgE level in serum, suggesting the immunoregulatory effect of CLA toward Th1 responses. In conclusion, Bitter gourd possessed both anti-inflammatory and immunoregulatory effects, while CLN exerted mainly reduced airway inflammation in a murine model of allergic asthma. Our study suggests that bitter guard suppressing allergic immune responses including serum IgE level may be beneficial for alleviation of allergic responses and worthy of dietary promotion.

Keywords: asthma, bitter gourd, conjugated linolenic acid, IgE, airway inflammation, conjugated linoleic acid



# 目錄

中文摘要 .....	I
英文摘要 .....	III
目錄 .....	V
表目錄 .....	IX
圖目錄.....	X
第一章、序論	
第一節 文獻回顧 .....	1
一、過敏性氣喘 .....	1
(一) 簡介與定義 .....	1
(二) 過敏性氣喘發生機制 .....	2
(三) 樹突細胞與過敏性氣喘 .....	4
(四) T輔助細胞與過敏性氣喘 .....	4
二、PPAR .....	7
(一) PPAR之種類及分佈 .....	7
(二) PPAR活化劑與 ligands .....	7
(三) PPAR與發炎反應之相關 .....	8
三、苦瓜 .....	11
(一) 苦瓜之介紹 .....	11
(二) 山苦瓜之相關研究 .....	11
四、共軛脂肪酸 .....	12
(一) 共軛次亞麻酸之介紹與相關研究 .....	12
(二) 共軛亞麻油酸之介紹與相關研究 .....	13
第二節 研究動機與架構	
一、研究動機 .....	15
二、研究架構 .....	16

第二章、以體外模式評估山苦瓜與共軛次亞麻油酸對發炎與免疫反應的影響	
第一節 前言	17
第二節 材料與方法	18
一、山苦瓜萃取物製備	18
二、CLN與CLA樣品製備	19
三、RAW 264.7 小鼠巨噬細胞株	19
四、EL4 小鼠T細胞株	19
五、腹腔細胞的取得與培養	20
六、脾臟細胞之取得與培養	21
七、樹突細胞之取得與培養	22
八、細胞激素含量測定	23
九、MTT染色法測定細胞存活率	26
十、統計方法	26
第三節 結果	27
一、山苦瓜各種萃物與CLN對RAW264.7小鼠巨噬細胞株的影響	27
二、山苦瓜各種萃物與CLN對初代腹腔細胞的影響	27
三、山苦瓜各種萃物與CLN對EL4小鼠T細胞株的影響	27
四、山苦瓜各種萃物與CLN對初代脾臟細胞的影響	28
五、山苦瓜各種萃物與CLN對骨髓細胞衍生之樹突細胞的影響	29
第四節 討論	37
一、山苦瓜與CLN可能藉由活化PPAR $\alpha$ 與PPAR $\gamma$ 而具有抗發炎的效果	37
二、各樣品的免疫調節作用	38
三、山苦瓜萃物中的CLN	38
第三章、山苦瓜與共軛三烯次亞麻油酸對氣喘模式小鼠發炎與過敏免疫反應的影響	
第一節 前言	40
第二節 材料與方法	41
一、樣品配製	41
二、動物實驗設計	41

(一) 動物飼養 .....	41
(二) 致敏方法 .....	41
(三) 實驗流程及分組 .....	42
(四) 呼吸道過度反應測定 .....	44
三、動物犧牲及實驗材料收集與分析 .....	44
(一) 血液樣品的收集 .....	44
(二) 血清特異性抗體IgE、IgG1、IgG2a測定 .....	45
(三) 血清總IgE、IgG、IgA、IgM抗體含量測定 .....	46
(四) 肺氣管沖洗液細胞之取得與處理 .....	47
(五) 脾臟細胞之取得與培養 .....	47
(六) 脾臟細胞增生測定 .....	48
(七) 腹腔細胞之取得與培養 .....	48
(八) 細胞激素含量測定 .....	49
(九) Real-time PCR 法分析分析肺部組織相關基因 .....	51
(十) 吞噬細胞活性測定 .....	53
(十一) 自然殺手細胞活性分析 .....	54
(十二) 肺部組織切片 .....	55
(十三) 統計方法 .....	55
第三節 結果	
一、生長情形與攝食狀況 .....	56
二、器官重量與相對重量 .....	56
三、呼吸道過度反應 (AHR) .....	56
四、肺沖洗液 (BALF) 中細胞激素含量 .....	57
五、肺沖洗液中各種類細胞數目 .....	57
六、肺組織形態與mRNA基因表現 .....	58
七、脾臟細胞細胞激素分泌量 .....	58
八、脾臟細胞增生反應 .....	59
九、血清中OVA特異性抗體含量 .....	59
十、血清中總抗體含量 .....	60



十一、腹腔細胞細胞激素分泌量 .....	60
十二、循環血液中吞噬細胞之吞噬能力 .....	60
十三、脾臟細胞中自然殺手細胞活性 .....	61
第四節 討論 .....	76
一、餵食BGP、CLN或CLA能降低氣喘模式小鼠呼吸道發炎 .....	76
二、餵食BGP、CLN或CLA對過敏性小鼠全身性免疫反應的調節作用 .....	78
三、餵食BGP與CLA能降低氣喘模式小鼠血清中過敏性抗體的含量 .....	79
四、餵食BGP與CLA能回復氣喘模式小鼠肺組織ppar- $\alpha$ 基因表現量 .....	80
五、餵食CLN能回復氣喘模式小鼠肺組織ppar- $\gamma$ 基因表現量 .....	81
六、Th17在氣喘模式小鼠中扮演的角色 .....	81
 第四章 綜合討論與總結	
第一節 綜合討論 .....	83
一、細胞模式與氣喘小鼠模式之比較 .....	83
二、山苦瓜減緩過敏性氣喘的可能有效成份 .....	84
三、CLN與CLA之比較 .....	85
四、活化PPAR的食材具有減緩過敏性氣喘症狀之潛力 .....	86
第二節 總結 .....	88
 參考文獻 .....	89

## 表目錄

表2.1 山苦瓜各萃物、CLN與CLA對發炎與免疫反應的影響.....	39
表3.1a 飼料配方.....	43
表3.1b 各組管餵內容物與飼料.....	43
表3.2 餵食山苦瓜、CLN與CLA對OVA致敏小鼠生長情形與攝食的影響.....	62
表3.3 餵食BGP、CLN與CLA對OVA致敏小鼠組織器官重量與相對組織器官重量的影響.....	63
表3.4 餵食BGP、CLN與CLA對OVA致敏小鼠BALF中細胞激素與化學趨化激素的影響.....	65
表3.5 餵食BGP、CLN與CLA對OVA致敏小鼠脾臟細胞在OVA刺激下細胞激素影響.....	69
表3.6 餵食BGP、CLN與CLA對OVA致敏小鼠脾臟細胞在conA刺激下細胞激素分泌的影響.....	70
表3.7 餵食BGP、CLN與CLA對OVA致敏小鼠腹腔細胞分泌細胞激素影響.....	74
表3.8 餵食BGP、CLN與CLA對OVA致敏小鼠吞噬細胞能力的影響.....	75
表3.9 餵食BGP、CLN與CLA對OVA致敏小鼠NK細胞能力的影響.....	75
表4.1 餵食BGP、CLN與CLA對氣喘模式小鼠過敏免疫反應的影響.....	87

## 圖目錄

圖1.1 各種細胞與相關細胞激素或蛋白質在過敏性氣喘中的作用.....	6
圖1.2 PPARs合成與天然之ligands .....	8
圖2.1 山苦瓜各萃物、CLN與CLA對RAW264.7細胞株存活率與細胞激素的影響 .30	
圖2.2 山苦瓜各萃物、CLN與CLA對初代腹腔細胞存活率與細胞激素分泌的影響31	
圖2.3 山苦瓜各萃物、CLN與CLA對EL4細胞存活率與細胞激素分泌的影響.....	32
圖2.4 山苦瓜各萃物、CLN與CLA對初代脾臟細胞存活率的影響.....	33
圖2.5 山苦瓜各萃物、CLN與CLA對小鼠初代脾臟細胞細胞激素分泌的影響.....	34
圖2.6 山苦瓜各萃物、CLN與CLA對初代脾臟細胞分泌細胞激素Th1/Th2比例的影響 .....	35
圖2.7 山苦瓜各萃物、CLN與CLA對樹突細胞存活率與細胞激素分泌的影響.....	36
圖3.1 氣喘模式小鼠致敏與餵食飼養流程.....	42
圖3.2 餵食BGP、CLN與CLA對OVA致敏小鼠呼吸道過度反應的影響 .....	64
圖3.3 餵食BGP、CLN與CLA對OVA致敏小鼠BALF中各種類細胞數目的影響 .....	66
圖3.4 餵食BGP、CLN與CLA的OVA致敏小鼠肺切片圖 .....	67
圖3.5 餵食BGP、CLN與CLA對OVA致敏小鼠肺部(a) ppar- $\alpha$ (b) ppar- $\gamma$ (c) il-12p35 (d) cox-2 mRNA表現量的影響 .....	68
圖3.6 餵食BGP、CLN與CLA對OVA致敏小鼠脾臟細胞增生能力的影響 .....	71
圖3.7 餵食BGP、CLN與CLA對OVA致敏小鼠血清中OVA特異性抗體含量的影響 .....	72
圖3.8 餵食BGP、CLN與CLA對OVA致敏小鼠血清中總抗體含量的影響 .....	73

## 第一章、序論

### 第一節 文獻回顧

#### 一、過敏性氣喘

##### (一) 簡介與定義

近年來世界各國過敏性疾病的發生逐漸增加，其中包含異位性皮膚炎、過敏性鼻炎、氣喘、...等。一般認為，過敏疾病之發生與遺傳的過敏體質、生活環境的污染、飲食習慣的改變等因素有關。過敏反應是人體或動物接觸到外來過敏原，所產生的一連串免疫反應。過敏原的種類也相當廣泛，包括有塵蹣、花粉或小分子蛋白等，皆可能引起過敏免疫反應。一般的過敏疾病大多屬於第一型過敏免疫反應(Type I hypersensitivity)，也就是由IgE所主導的過敏反應，如氣喘、花粉熱與蕁麻疹等。

由美國National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) 於1997年的定義，氣喘為一種呼吸道慢性發炎疾病，在症狀上，病人有週期性哮喘、咳嗽、胸悶甚至呼吸困難，易發作於早晚溫差變化較大、接觸到過敏原或是其他刺激時。臨床上主要症狀為呼吸氣流阻塞(airflow obstruction)，通常會自發地或經治療後回復正常；接觸到刺激時會有呼吸道過度敏感反應(airway hyperreactivity)的出現，以及長期造成的慢性呼吸道發炎反應(chronic airway inflammation)。這其中有相當多的細胞與細胞分泌物質參與，包括肥大細胞(mast cell)、嗜伊紅性白血球(eosinophil)、T細胞、巨噬細胞(macrophage)與上皮細胞(epithelial cell)等(Nadel and Busse, 1998)。由於氣管長久在慢性發炎下，只要有過敏原刺激，就容易引發支氣管收縮造成呼吸困難等症狀，稱為呼吸道過度反應(airway hyperresponsiveness, AHR)。

近四十年來過敏性疾病在世界各國的盛行率顯著增加(Beasley et al., 2000)，根據WHO在2005年的估計中，全球約有30億人因氣喘而感到不適，且約有25萬人死

於氣喘；台灣在這20至30年間，兒童與青少年氣喘的盛行率皆有顯著的增加趨勢；以學齡兒童為例，台灣從1973年至2003年間，氣喘的盛行率就從1.3%攀升到19.0% (Huang et al., 2005)。

目前對於過敏性疾病的治療，常見而直接的方法是給予支氣管擴張劑或是抗發炎藥物，像抗組織胺、 $\beta_2$ 交感神經興奮劑以及糖皮質素(glucocorticoid)，主要是針對氣喘症狀的緩解(barnes et al., 1997; holgate and Broide, 2003)，此外，亦有使用單株抗體進行細胞活性的抑制，或是採用口服抗原使免疫反應產生耐受性，因此達到減緩過敏免疫之效用，而支氣管擴張劑與類固醇則是臨床上最普遍使用的藥物，臨床上最常使用的類固醇口服藥劑為prednisolone (Vuillermin et al., 2007)。

## (二) 過敏性氣喘發生機制

過敏性氣喘屬於第一型過敏免疫反應，主要是由IgE所媒介的免疫反應，病發時血清中特異性IgE抗體或總IgE抗體明顯增加(Sunyer et al., 1995)。過敏反應可分為早期過敏反應(early allergic response)及晚期過敏反應(late allergic response)。早期過敏反應是由肥大細胞釋放的發炎介質引起，發生在接觸過敏原後的半小時內；晚期過敏反應是由嗜伊紅性白血球及嗜中性白血球所造成，發生於接觸過敏原4-6小時後。嗜伊紅性白血球在氣喘疾病的致病中是相當主要的發炎細胞，除了在人類氣喘病患肺部病理切片與肺沖洗液中可發現大量的嗜伊紅性白血球，在氣喘的動物模式中，也可以發現呼吸道有嗜伊紅性白血球聚集的現象。

當過敏原經由呼吸道進入個體時，體內的抗原呈獻細胞(antigen presenting cell, APC)，如樹突細胞、巨噬細胞等會捕捉抗原並將其水解成小片段的peptide(約13~25個胺基酸)，透過MHC II呈獻給輔助型T細胞，因此活化T細胞以及B細胞，此時受到活化的T細胞會分化為Th2細胞(type 2 T helper cell)，並分泌IL-4、IL-5、IL-13等細胞激素，使免疫反應傾向於Th2免疫反應，其中IL-4與IL-13會刺激對過敏原有專

一性之B細胞，使其轉變成分泌高量IgE的細胞(Corry and Kheradmand, 1999)。B細胞所釋放出的IgE抗體與肥大細胞上的IgE receptor (Fcε RI)具有高度親和力，當抗原再度進入體內，抗原與IgE結合後促使肥大細胞的活化，產生去顆粒化(degranulation)的現象，釋放組織胺(histamine)、eosinophil chemotatic factor (ECF)、TNFα及chemokine等介質分泌(Holgate, 2000)。

這些介質會造成血管通透性增加及氣管收縮等症狀，造成呼吸道的過度反應，同時呼吸道上皮細胞亦會大量分泌黏液及趨化激素，吸引淋巴球、巨噬細胞、嗜中性白血球與嗜伊紅性白血球等聚集，引起呼吸道的局部發炎現象(Kuby et al., 2007; Marone et al., 1998; Barnes et al., 1998)。呼吸道中聚集的Th2細胞分泌IL-4與IL-13會共同刺激呼吸道上皮細胞，造成黏附因子表現量增加而吸引大量的發炎性細胞聚集，同時也可刺激平滑肌收縮，引發AHR (matsukura et al., 2001)，其中IL-4主要功能是幫助naïve T細胞發展成Th2細胞，亦會刺激其他Th2細胞激素IL-5和IL-13的分泌(Swain et al., 1990)，並幫助B細胞分泌IgG<sub>1</sub>及IgE兩種isotype的抗體(Hasbold et al., 1998)。

IL-5會引起肺部嗜伊紅性白血球的聚集，其可促進骨髓中嗜伊紅性白血球前趨細胞分化成熟，並可藉著抑制細胞凋亡延長成熟嗜伊紅性白血球的生存(Dent et al., 1990)，IL-5也會活化嗜伊紅性白血球，產生去顆粒化釋放物質，如major basic protein (MBP)、eosinophil cationic protein (ECP) 及 eosinophil peroxidase (EPO)，都會對呼吸道上皮組織造成傷害，也會產生促發炎介質的分泌，如leukotrienes (LTC)、TNF-α、GM-CSF及IL-5等，加劇呼吸道的發炎反應 (rothenberg and hogan, 2006)。除了Th2免疫相關之細胞激素外，尚有其他發炎介質與趨化因子參與氣喘發炎反應。

Eotaxin主要由上皮細胞、內皮細胞、纖維母細胞(fibroblast)與肺泡巨噬細胞(alveolar macrophage)所分泌，會趨化更多嗜伊紅性白血球聚集。因此，當過敏性氣喘患者呼吸道暴露抗原時，會嚴重的AHR、Th2免疫反應與發炎反應同時發生，

若能降低這些免疫反應，應能達到預防與治療過敏性氣喘的效果。

### (三) 樹突細胞與過敏性氣喘

樹突細胞在免疫系統中是相當重要的抗原呈獻細胞，其主要功能是捕捉、加工與對 naïve T 細胞呈獻抗原(Banchereau et al., 1998)。在體內，未成熟的樹突細胞會存在非淋巴組織中，當遇到抗原刺激後，樹突細胞將會移動到淋巴器官，並分化成熟，會表現協同刺激分子(co-stimulatory molecules)，例如：CD80、CD86等，還會表現高度的 MHC class II分子，可以誘導naïve T細胞增生(Vermaelen et al., 2001; Akbari et al., 2002)。有研究指出樹突細胞對於不同的抗原所引起的免疫反應扮演決定性的角色(Banchereau et al., 1998)，它可以接受外來訊息的刺激活化T細胞，決定免疫反應走向Th1或是Th2，甚至是調節型T細胞免疫(de Jong et al., 2005; Agrawal et al., 2003)。在體外培養的實驗發現，樹突細胞會因環境或外來刺激的不同，會分泌IL-12p70或不分泌IL-12p70，而IL-12p70的分泌會使得免疫反應走向Th1。呼吸道中的樹突細胞經常接觸大量的過敏原，因此傾向於活化Th2的免疫反應，只有在特定誘發Th1細胞激素的過敏原，如：lipopolysaccharide(LPS)，才會傾向分化成Th1的免疫細胞(Bharadwaj et al., 2007)。由過敏體質的人體內分離出的樹突細胞，與正常人相比分泌IL-12p70的能力較低(Reider et al., 2002)，所以在接觸過敏原後容易傾向Th2免疫反應。在動物模式的研究中，將體外培養的樹突細胞以OVA抗原刺激後打回小鼠體內，發現小鼠在經過呼吸道抗原刺激後，可以發展出氣喘及呼吸道發炎反應(Lambrecht et al., 2000)，因此樹突細胞對引起過敏性氣喘扮演著相當重要的角色。目前有些研究利用修飾後的樹突細胞來減緩過敏性氣喘，如：以氣管內注射的方式，給予致敏小鼠以被表現IL-12質體或IL-10質體的腺病毒感染

感染的樹突細胞進行治療，可以有效抑制呼吸道阻力及嗜伊紅性白血球的聚集(Ye et al., 2004; Hsu et al., 2010)。

### (四) T輔助細胞與過敏性氣喘

CD4<sup>+</sup> T輔助細胞因分泌的細胞激素不同，可分為不同亞群，如Th1、Th2與

Th17。Th1細胞會分泌IFN- $\gamma$ 、IL-2，這些細胞激素會促進毒殺型T細胞及巨噬細胞活性的細胞性免疫反應；Th2細胞則分泌IL-4、IL-5和IL-13，主要為刺激抗體生成的體液性免疫反應，Th17細胞主要分泌IL-17A與IL-17F，它可以作先天免疫反應(innate immunity)與後天免疫反應(adaptive immunity) 之間的溝通橋樑；也就是說，Th17位於自體免疫與細胞、體液免疫當中的中樞位置，進而引起發炎反應。Th1和Th2兩個系統會透過細胞激素相互調節。當抗原呈獻細胞接受到抗原時，分泌的為IL-12，會促使naïve T細胞發展成Th1細胞，Th1所分泌的IFN- $\gamma$ 會抑制Th2免疫反應；相對的在無IL-12的刺激下，則會使naïve T細胞發展成Th2細胞，而Th2分泌的IL-4會抑制Th1免疫反應。正常情況之下，體內經由IFN- $\gamma$ 與IL-4的互相牽制，可使體內Th1/Th2免疫反應達到平衡。

而過敏性疾病患者體內的免疫平衡易傾向Th2反應(Robinson et al., 1992)，過敏性氣喘患者肺氣管沖洗液中Th2細胞激素含量比健康者高(Walker et al., 1992)，這些Th2細胞激素，除了會促進體內B細胞大量生成IgE抗體外，也會造成促發炎細胞聚集至呼吸道，造成AHR，以及黏液分泌量增加等過敏性氣喘主要症狀。由Th1所分泌的IFN- $\gamma$ 被認為可調節過敏性氣喘的呼吸道發炎反應，可抑制肥大細胞的抗原呈獻能力，減少IL-4等Th2細胞激素的分泌，同時也具有降低肥大細胞透過IgE引起的去顆粒作用(Teixeira et al., 2005)。在小鼠氣喘模式中，在呼吸道接觸過敏原之前，給予吸入性IFN- $\gamma$  可以降低體內特異性IgE抗體，並可降低AHR的發生(Dow et al., 1999; Hofstra et al., 1998)。由Th17所分泌的IL-17A與IL-17F，會促進呼吸道表皮細胞和平滑肌細胞釋放較多的CXCL1、CXCL8，吸引嗜中性白血球的聚集而使得氣喘的發炎情形嚴重(Schmidt-Weber et al., 2007)。研究指出肺表皮細胞和人類肺纖維母細胞在IL-17刺激下可造成IL-6、IL-8分泌量上升(Prause et al., 2003; Molet et al., 2001)，動物實驗也發現支氣管給予IL-17會造成老鼠體內IL-8上升，並在肺部有嗜中性白血球浸潤現象(Linden, 2001)。而氣喘及慢性肺阻塞疾病人的唾液中IL-17的含量皆有上升，且與呼吸道過度反應呈現正相關(Barczyk et al., 2003)。



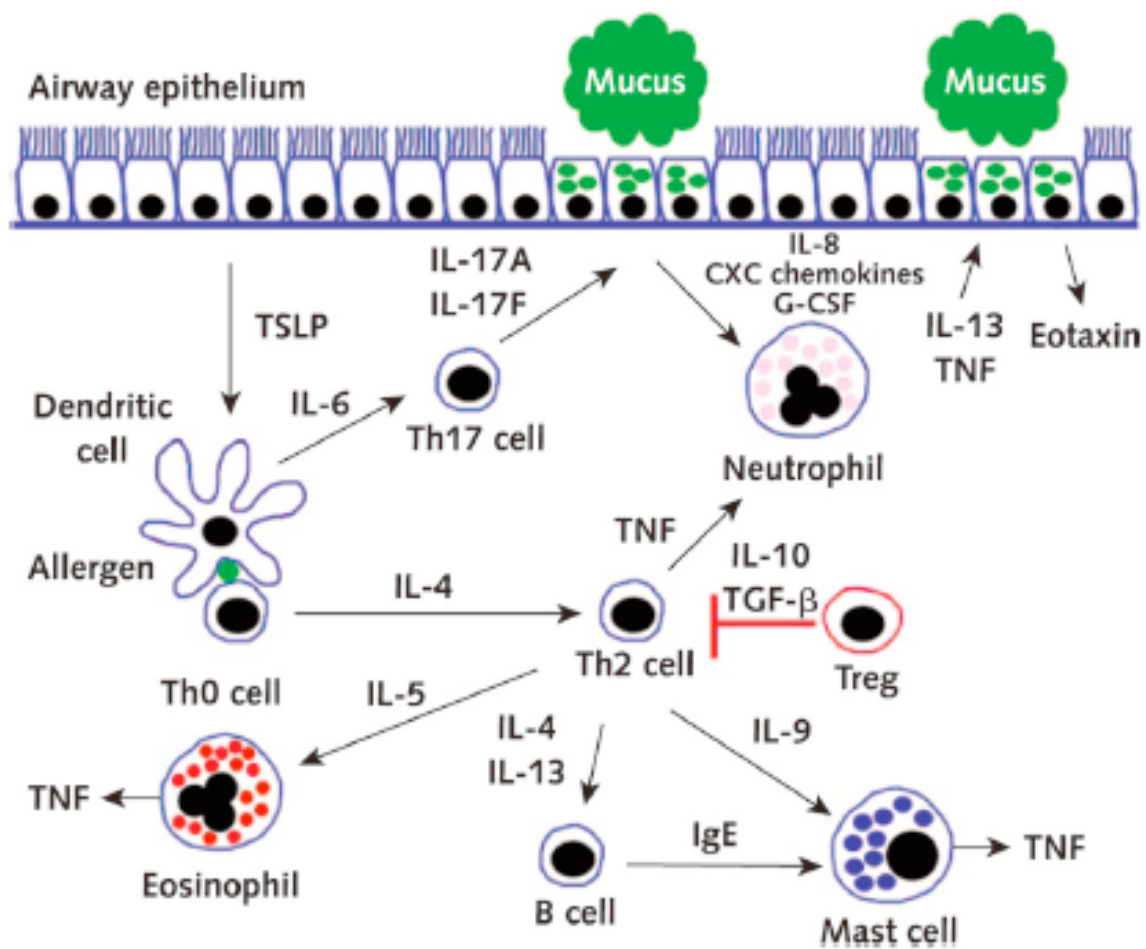


Figure 1.1 Pleiotropic activities of cells and related cytokines in allergic asthma.

(Levlne, 2010)

## 二、PPAR

### (一) PPAR之種類及分佈

過氧化體增殖劑活化受器(PPAR, peroxisome proliferate-activated receptor)是核受器家族的成員，目前已知共有PPAR $\alpha$ 、PPAR $\delta/\beta$ 及PPAR $\gamma$ 三種，PPAR $\alpha$ 主要表現於肝臟，負責脂質代謝之調控，如 $\beta$ -oxidation，另外亦表現在心、腎、脾及脂肪組織中(Braissant et al., 1996)；PPAR $\delta/\beta$ 與三酸甘油酯代謝、發炎反應(Lee et al., 2003a)、HDL濃度調控(Gelman et al., 1999)等有關，廣泛分布於全身組織；PPAR $\gamma$ 又可分為PPAR $\gamma$ 1與PPAR $\gamma$ 2兩種，不同之處在 $\gamma$ 2於N端較 $\gamma$ 1多出30個胺基酸，PPAR $\gamma$ 1主要於心、肝、肌肉與脂肪組織等表現，在一些免疫細胞如：單核球、巨噬細胞、B細胞、T細胞及樹狀細胞等都發現具有PPAR $\gamma$ ，而PPAR $\gamma$ 2則專一表現在脂肪組織，調控脂肪細胞分化與脂質代謝 (Tontonoz et al., 1994)。

### (二) PPAR活化劑與 ligands

大多 PPAR agonists 的發現是透過偵測在細胞中報導基因表現能力所篩選的，經由此法所鑑定出的化合物只可稱為活化劑，不一定為直接結合於 PPAR 而啟動活化的 ligands，或許此化合物可於細胞內轉化為具有活化能力的代謝產物，或其可調節內生性ligand的表現。PPAR的活化劑與ligands並無顯著的專一性，單一類型的活化劑可能兼具活化三種PPAR isoforms的能力，而同一種活化劑於不同物種中的活化效果亦不盡相同(Mukherjee et al., 1994)。PPAR活化劑與ligands主要可分為合成的與天然的。一般常見合成性PPAR ligands有：過氧化體增殖劑(如WY 14643)、降血脂藥物(如colfibrate)、抗糖尿病藥物(如BRL 45653)等等；而天然性的 PPAR ligands 則多為單元或多元脂肪酸如：9c, 11t-CLA(conjugated linoleic acids)，或其代謝物ecosanoids如：15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -ProstaglandinJ<sub>2</sub>(15d-PGJ<sub>2</sub>)。由於三種isoform的PPARs其ligand-binding domain 之序列不同，故以上ligands對不同PPARs之結合活化能力亦有所差異。

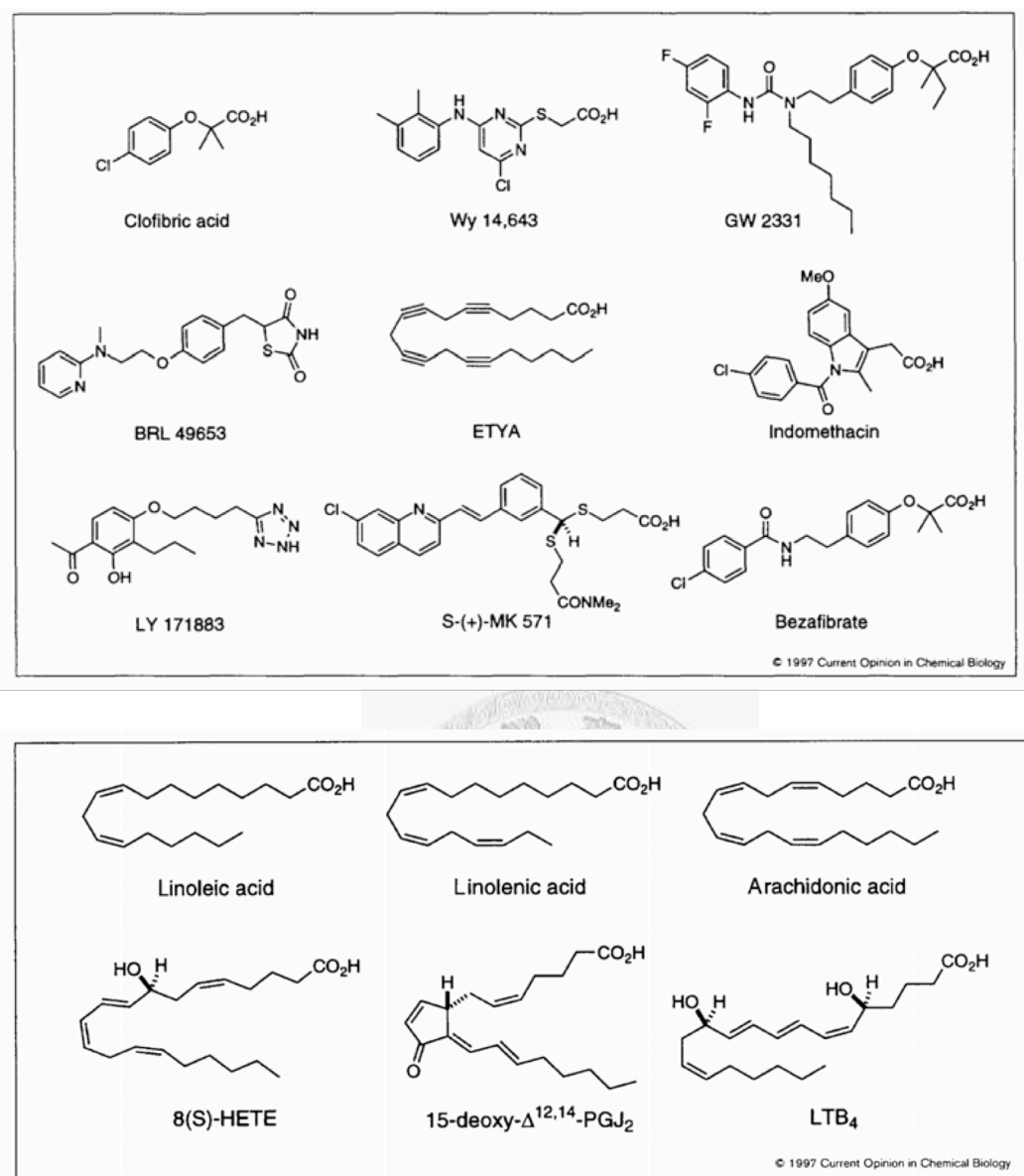


圖1.2 PPARs合成與天然之ligands

Figure1.2 Synthetic and Natural PPARs ligands. (Willson and Wahli, 1997)

### (三) PPAR與發炎反應之相關研究

PPAR $\alpha$ 及PPAR $\gamma$ 近年來被認為具有重要的免疫調節作用，對於呼吸道疾病具有抗發炎的潛力(Becker et al., 2006)。PPAR $\alpha$ 及PPAR $\gamma$ 目前被認為透過向下調節促發炎基因的表現，而降低發炎反應，其機制可能為(1)與其他發炎相關的轉錄因子(如：NF- $\kappa$ B)競爭co-activators，降低轉錄因子與目標DNA結合進行轉錄轉譯作

用。(2) PPAR的ligands直接的與其他轉錄因子作用，抑制與目標基因的結合。(3) PPAR $\gamma$ 被SUMOylation後，與含有NCoR的co-repressor複合體作用，干擾repressor的移除進而抑制了發炎基因的轉錄(Ghisletti et al., 2007; Straus et al., 2007)。除此之外，也發現PPAR $\alpha$ 能直接與NF- $\kappa$ B的p65次單位作用，而抑制了NF- $\kappa$ B相關促發炎基因的表現(Deliver et al., 1999)。因此，不論是PPAR或PPAR ligands都具有抑制發炎反應的作用。以下分別以*in vitro* 及 *in vivo* 說明相關的研究。

### 1. *in vitro* 相關研究

PPAR $\gamma$ 的活化會促進單核球分化為巨噬細胞，此外巨噬細胞的PPAR $\gamma$ 表現受到IL-4的向上調節，IL-4也同時讓內生性的PPAR $\gamma$  ligands增加而使PPAR $\gamma$ 的活化上升(Huang et al., 1999)。內生性的PPAR $\gamma$  ligands；15d-PGJ<sub>2</sub>能抑制巨噬細胞在LPS刺激下IL-10與IL-12的分泌量(Azuma et al., 2001)，給予活化的人類單核球細胞PPAR $\gamma$ 活化劑，可抑制IL-1 $\beta$ 、IL-6與TNF- $\alpha$ 的分泌，亦可以經由降低NF- $\kappa$ B活化與轉位而抑制COX-2基因表現(Jiang et al., 1998; Wang et al., 2001)。有研究也發現大鼠血中單核球PPAR $\gamma$ 活化可降低CCR2的表現，而減少受到MCP-1的趨化(Ishibashi et al., 2002)，所以巨噬細胞中活化PPAR $\gamma$ 應能降低發炎反應的發生。

不論是T細胞與B細胞都會表現PPAR $\alpha$ 和 $\gamma$  (Jones et al., 2002)，在T細胞中活化PPAR $\gamma$ 可能透過抑制NFAT而降低IL-2的分泌(Yang et al., 2000)。亦有研究指出，IL-4可促進T細胞PPAR $\gamma$ 表現，因而降低NF- $\kappa$ B的結合活性(Daynes and Jones, 2002)，反之，與ligand結合而受活化的PPAR $\gamma$ ，對於T細胞生成IL-4亦具有抑制作用(Chung et al., 2003)，顯示PPAR $\gamma$ 與T細胞生成IL-4間，具有相互調節的作用。

給予分離出的小鼠脾臟細胞fenofibrate，一種PPAR $\alpha$  agonist，發現會抑制引起許多發炎性疾病的IFN- $\gamma$ 與IL-17的表現(Lee et al., 2007)。然而嗜伊紅性球是引起過敏性疾病的重要細胞，IL-5與eotaxin對於嗜伊紅性球的活化是主要因子，研究指出PPAR $\gamma$  agonist; troglitazone可以降低IL-5活化的嗜伊紅性球生存，同時也抑制eotaxin對於其趨化的作用，推測這可能為 PPAR $\gamma$  agonist 能作為治療過敏性疾病

的機制之一(Ueki et al., 2004)。樹突細胞是一種專業的抗原呈現細胞，與抗原結合後會移動至淋巴組織中並活化T細胞，引起下游的免疫反應，近年的研究發現帶有抗原的肺部樹突細胞PPAR $\gamma$ 的活化，會降低其自發性的移動至淋巴器官中(Angeli et al., 2003)。綜合以上，活化PPAR能降低發炎反應，同時可能透過免疫調節而具有治療過敏性疾病的潛力。

## 2. *in vivo* 相關研究

有許多針對PPAR $\gamma$ 在呼吸道疾病動物模式下，其抗發炎作用與免疫調節的影響，結果發現都具有減緩症狀的作用。PPAR $\gamma$  ligands對於呼吸道發炎影響如表。

模式	Ligand	影響
小鼠OVA致敏氣喘模式	GI 262570	減少肺部嗜伊紅性球與淋巴球的浸潤。(Trifilieff et al., 2003)。
小鼠OVA致敏氣喘模式	Ciglitazone	減緩肺部呼吸道發炎與黏液的堆積現象(Mueller et al., 2003)，也能降低AHR、嗜伊紅性球浸潤、細胞激素、血清IgE、膠原蛋白沈澱與TGF- $\beta$ 的生成(Honda et al., 2004)。
小鼠OVA致敏氣喘模式	Rosiglitazone	抑制樹突細胞的移動能力，也降低T細胞的增生與嗜伊紅性球的聚集，同時增加IL-10的分泌(Hammad et al., 2004)。
LPS誘導嗜中性球呼吸道發炎模式	Rosiglitazone	降低嗜中性球的浸潤情形(Birrell et al., 2004)。
Bleomycin引發的肺部傷害與纖維化模式	Rosiglitazone 15d-PGJ2	減少嗜中性球的聚集、水腫、肺部傷害與iNOS的分泌(Genovese et al., 2005)。

### 三、苦瓜

#### (一) 苦瓜之介紹

苦瓜，學名 *Momordica charantia*，屬於葫蘆科(cucurbitaceae)，栽培地區分布在亞洲的日本、中國、台灣、菲律賓、馬來西亞等國家，於中國、印度等國家被作為抗糖尿病、治療創傷等疾病之民間醫療用藥。本次研究所使用的苦瓜品種為山苦瓜，英文名 kakorot，學名 *Momordica charantia L.var.abbreviata Seringe*，中文別名野苦瓜、短果苦瓜、小苦瓜，原產於熱帶亞洲，而現今在台灣已馴化為野生植物，產期為4~9月，瓜果外型成長卵橢圓狀，果體較玲瓏，果長約3~15公分，果寬約2~4公分，約為一般苦瓜的10至15分之一，表面具疣狀突起與軟刺，未成熟時其果皮為濃綠色，當成熟後則為黃色果皮。山苦瓜比一般苦瓜更加苦中帶甘，具有促進食慾、解渴、清涼、解毒、明目及驅寒之效用。

#### (二) 山苦瓜之相關研究

在亞洲國家，苦瓜被視為能有效降低血糖之民間食材，有研究已發表山苦瓜降血糖功效，亦有不少研究苦瓜抗癌之作用，Sarmishta 等學者 (2003) 篩選天然化合物或蔬果是否有抗癌的效果，結果發現苦瓜水萃物可顯著保護小鼠週邊血液淋巴球細胞被 dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) 致癌劑誘發的DNA突變。而苦瓜對於抗發炎與免疫反應的影響少有發表，只有研究指出苦瓜水萃物及乙酸乙酯萃物可以顯著抑制被促發炎物質 lipopolysaccharide (LPS) 誘發 RAW264.7 的 PGE<sub>2</sub> 生成 (Huang et al., 2002)，以及另一學著發表苦瓜 placenta 萃物可抑制巨噬細胞株受 LPS 刺激的 TNF- $\alpha$  的分泌，同時降低 IL-1 $\beta$  基因表現與 NF- $\kappa$ B 活性 (Kobori et al., 2008)，顯示苦瓜可能具有抗發炎的效用。2005 年 Ike 等人以 34 種蔬菜汁以腹腔注射予小鼠，每兩天測量血中代表第一型免疫的細胞激素 IFN- $\gamma$  和第二型免疫的 IL-4 的濃度。發現其中苦瓜顯著促進血中 IFN- $\gamma$  的濃度，而不影響 IL-4。

在細胞模式中，發現苦瓜具有 PPAR $\alpha$ / $\gamma$  雙效活化的效果 (Chuang et al., 2006)。

在動物模式中，以AIN-76飲食飼養，短期兩週餵食5%山苦瓜凍乾粉末，可降低C57BL/6J小鼠脂肪堆積、血糖、血脂濃度。過去本研究室曾給予高油飲食誘導肥胖小鼠含有山苦瓜凍乾粉飼料，發現可有效的改善高血糖與胰島素抗性（康，2009）。

#### 四、共軛脂肪酸

##### （一）共軛次亞麻酸之介紹與相關研究

共軛次亞麻油酸(conjugated linolenic acid, CLN)為一種高度不飽和形式的共軛脂肪酸，其雙鍵的位置可能有許多種，如 8, 10, 12；9, 11, 13，並因順式與反式存在許多不同結構的異構物。而CLN在自然界中存在於一些植物種籽的油脂中，例如苦瓜籽油、桐油與石榴子油。Takagi與Itabashi(1981)利用 reversed-phase HPLC 及 open-tubular gas liquid chromatography (GLC)研究不同植物種子中脂肪酸的種類與比例，發現苦瓜籽中含有三種CLN的同分異構物：分別為佔所有脂肪酸 56.24%的 9c, 11t, 13t-CLN、0.32% 9t, 11t, 13t-CLN與0.5% 9c, 11t, 13c-CLN，以9c, 11t, 13t-CLN為最多。由山苦瓜正己烷萃取層分離結果，推算而知一公斤之山苦瓜凍乾物中約含 6.0 g 之 9c, 11t, 13t-CLN；而一公斤之新鮮山苦瓜中約有0.42 g之9c, 11t, 13t-CLN（Chuang et al., 2006）。

9c, 11t, 13t-CLN 為苦瓜中主要且特殊的脂肪酸，在生理效用已證實具有抗癌、降體脂、抗氧化等功能，Dhar等人 (1999)將苦瓜籽萃取出9c, 11t, 13t-CLN，分別以 0.5%、2%與 10% 的CLN取代飼料中脂肪酸比例，餵食大鼠四週後發現，餵食 9c, 11t, 13t-CLN 的三組大鼠的血漿脂質過氧化率、脂蛋白氧化率與紅血球細胞膜脂質過氧化率，均顯著低於葵花子油之控制組，顯示9c, 11t, 13t-CLN 可能有效抑制過氧化物在體內的生成。Kohno 等人 (2002)自苦瓜籽中萃取出CLN，分別以 0.01%、0.1%與 1%的濃度取代大鼠飼料的脂質比例，研究CLN對經 azoxymethane (AOM)誘發大腸癌的大鼠是否有抗癌效果。餵食大鼠五週後發現，

CLN可以增加大腸黏模上的PPAR $\gamma$ 基因表現，並抑制囊泡細胞增生或促進細胞凋亡而達到抑制直腸癌的產生，後有研究也指出山苦瓜分離出的 9c, 11t, 13t-CLN可活化PPAR $\alpha/\gamma$  (Chuang et al., 2006)。Noguchi等人指出以苦瓜籽油餵養大鼠四週，其肝臟中9c, 11t-CLA與22:6n-3含量顯著高於控制組，顯示 9c, 11t, 13t-CLN 在體內可轉化為9c, 11t-CLA，Tsuzuki等人研究 (2006)指出，餵食大鼠9c, 11t, 13t-CLN，被吸收後將近有21%會轉化為9c, 11t-CLA。

## (二) 共軛亞麻油酸之介紹與相關研究

共軛亞麻油酸(conjugated linoleic acids, CLAs)為一般脂肪酸之幾何與位置異構物，主要存在於天然食品中，以反芻動物畜產品中發現之共軛亞麻油酸 (conjugated linoleic acids, CLAs)較為豐富，又以cis-9, trans-11(9c, 11t)和 trans-10, cis-12 (10t, 12c) CLA兩種最多，在飲食中攝取的 CLA 大約有90%都為 9c,11t-CLA (Fritsche et al., 1999)。許多的文獻已報告了CLA之保健功能，例如：降體脂、抗癌、抗動脈粥狀硬化、抗代謝症候群、抗發炎等。

目前許多研究都指出 9c,11t-CLA 與 10t,12c-CLA 是主要對於健康有保健效果的異構物，但此兩者在不同的模式中有相同的影響，有時卻有不同的影響。以下針對CLA對於發炎與免疫反應影響的文獻整理如下: Luongo 等人(2003)的研究，給予人類T細胞株Jurkat T cell含50% 9c,11t-CLA與40% 10t,12c-CLA 的混合物，可顯著的抑制細胞的增生以及IL-2與IFN- $\gamma$ 表現量。小鼠巨噬細胞株RAW264.7在 IFN- $\gamma$ 的刺激下，給予CLA也可以降低發炎性介質的分泌，如 PGE<sub>2</sub>、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和 IL-6 (Yu, 2002)。同樣地，RAW264.7在LPS刺激下，給予兩種異構物的混合物可以降低iNOs、COX-2和NO的mRNA與蛋白質的表現量(Cheng et al., 2004)。

Bhattacharya等人給予餵食BALB/c小鼠高油飲食補充CLA (36.9% 9c,11t-CLA, 37.4% 10t,12c-CLA)，可降低血清中的TNF $\alpha$ 和IL-6。Yang等人的研究，在BALB/c



小鼠餵食六週0.5%CLA後，給予腹腔注射LPS(0.1mg/ml/100gBW)引起急性發炎，注射兩小時後的餵食CLA組比對照組血漿中TNF $\alpha$ 含量顯著降低，且在48小時後CLA組的體重減少克數也較對照組顯著的少，作者也分別在LPS刺激下給予RAW264.7細胞株9c,11t-CLA與10t,12c-CLA，發現只有9c,11t-CLA具有顯著降低TNF $\alpha$ 分泌量，10t,12c-CLA並無作用(Yang et al., 2003)，顯示9c,11t-CLA具有抗發炎的作用。

Jaudszus (2008)將OVA致敏小鼠的飼料中油脂含有1% 9c,11t-CLA 油脂時，可顯著的降低總IgE抗體的分泌、呼吸道過敏免疫反應以及肺沖洗液中Eosinophils的數量，同時也可降低IL-5的分泌量。作者指出可能是透過PPAR $\gamma$ 的路徑達到抑制過敏反應的結果，故在給予PPAR $\gamma$ 抑制劑後，使得CLA原本的抑制現象回復。

在人體試驗部份，給予年輕受試者每天3g的兩種異構物混合CLA，12週後發現血漿中有較高的IgA、IgM和IL-10，且有較低的IgE、TNF $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ ，也降低了遲發性過敏反應(delayed-type hypersensitivity; DTH) (Albers et al., 2003)，可見CLA具有減緩過敏性疾病的潛力。

## 第二節 研究動機與架構

### 一、研究動機

在亞洲國家，山苦瓜被視為能有效降低血糖之民間食材，研究已發表山苦瓜降血糖之功效，而針對山苦瓜或其成份對於免疫反應之影響少有研究發表。山苦瓜與所含的特殊共軛次亞麻油酸已被發現具有活化PPAR $\gamma$ 的效用，PPAR $\gamma$ 近年來被認為具有重要的免疫調節作用，亦有抗發炎之效用。因此本研究先以體外實驗評估山苦瓜與共軛次亞麻油酸對於免疫調節及發炎反應的影響，利用小鼠巨噬細胞株RAW264.7測試樣品是否具有降低發炎介質分泌作用，與小鼠T細胞株EL-4評估樣品的免疫調節，進一步從小鼠分離初代脾臟細胞與腹腔細胞，以及骨髓分離培養而得樹突細胞，測試山苦瓜各萃物與CLN對於發炎反應與免疫平衡的影響。

由細胞實驗初步了解山苦瓜與共軛次亞麻油酸對發炎與免疫反應的影響，而過敏性氣喘屬於一種慢性發炎與免疫平衡傾向Th2疾病，在服用山苦瓜有利於降血糖之餘，其對免疫反應的影響，是否會加強過敏免疫反應？亦或具有減緩的效用？因此，再進一步探討山苦瓜與CLN在氣喘動物模式中對呼吸道發炎與過敏免疫反應的影響。

## 二、研究架構



評估山苦瓜與共軛次亞麻油酸對於發炎與過敏免疫反應的影響

## 第二章 以體外模式評估山苦瓜和CLN對發炎與免疫反應的影響

### 第一節 前言

已有一些文獻發表山苦瓜具有降血糖的功效，值得開發為糖尿病危險族群的保健食品。黃青真教授實驗室將CHO-K1細胞以穩定轉染方式建立出能篩選可活化PPAR $\alpha$ 及 $\gamma$ 物質的細胞株結果發現，苦瓜乙酸乙酯萃取物具有活化PPAR $\alpha$ 及 $\gamma$ 的能力，為PPAR $\alpha$ / $\gamma$ 活化劑，進一步分離出可能的活化成份有CLN(Chao et al., 2003; Chuang et al., 2006)。CLN為山苦瓜中豐富且特殊的脂肪酸，具有共軛雙鍵的結構，許多研究已證實共軛脂肪酸對於免疫反應具有調節作用，如9c, 11t-CLA可以透過活化PPAR $\gamma$ ，降低RAW264.7細胞株發炎性介質PGE<sub>2</sub>、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6的分泌(Yu et al., 2002)。此外，一些研究也指出CLN具有抗癌的作用(Tsuzuki et al., 2004; Yasui et al., 2005)，但少有研究發表山苦瓜與CLN對於免疫反應的影響。因此，本研究首先利用小鼠巨噬細胞與T細胞株，測試山苦瓜各種萃物、CLN或9c, 11t-CLA共同培養下對於發炎介質與細胞激素分泌量的影響。再以BALB/c小鼠初代細胞與骨髓衍生之樹突細胞，測試山苦瓜各種萃物、CLN或CLA共同培養下，對於免疫調節與發炎反應影響為何。

## 第二節 材料與方法

### 一、山苦瓜萃取物製備

#### 【材料與儀器】

1. 山苦瓜為花蓮四號品種，由花蓮區農業改良廠所提供。
2. 減壓濃縮機 (EYELA, Rotary Evaporator N1000)
3. 真空乾燥機 (Labconco)

#### 【方法】

##### 1. 山苦瓜正己烷萃物 (BGP-Hex)

花蓮四號山苦瓜凍乾粉末以二十倍體積正己烷攪動萃取隔夜，完成後經一號濾紙進行抽氣過濾及減壓濃縮抽乾溶劑，得正己烷萃物，萃率為4.4%。以絕對酒精回溶，Stock為6 mg/mL，置於-20°C保存。

##### 2. 山苦瓜乙酸乙酯萃物 (BGP-EA)

將山苦瓜凍乾粉末以二十倍體積正己烷攪動萃取隔夜，完成後以一號濾紙進行抽氣過濾，剩餘乾燥殘渣改以二十倍體積乙酸乙酯攪動萃取隔夜，再經一號濾紙進行抽氣過濾及減壓濃縮抽乾溶劑，得乙酸乙酯萃物，萃率為2.5%。以絕對酒精回溶，Stock為100 mg/mL，置於-20°C保存。

##### 3. 山苦瓜乙醇萃物 (BGP-EtOH)

將上述山苦瓜乙酸乙酯萃物萃取過程中抽氣過濾剩餘乾燥殘渣，改以絕對酒精進行萃取，經抽氣過濾與減壓濃縮抽乾溶劑後，得乙醇萃物樣品，萃率為14%。以絕對酒精回溶為100 mg/mL，置於-20°C保存。

##### 4. 山苦瓜水萃物 (BGP-H<sub>2</sub>O)

山苦瓜凍乾粉末添加二十倍體積去離子水攪動萃取隔夜，萃取完成後以3000rpm, 4°C離心10分鐘，上清液以一號濾紙過濾兩次後凍乾，凍乾粉末以滅菌PBS

溶液回溶為100 mg/mL為Stock，置於-20°C保存。

## 二、CLN與CLA樣品製備

### 【方法】

CLN (Cayman, Cat. No.10008349)純度大於 98%與 9c, 11t-CLA (Matreya LLC, Cat. NO. 1245-10) 純度大於 98%，溶解於絕對酒精中，配製成100 mM的stock，置於-20°C保存，以培養液稀釋後進行細胞培養。

## 三、RAW 264.7 小鼠巨噬細胞株

### 【材料與試劑】

1. RAW264.7 (ATCC No. TIB-71)：為一發展自BALB/c小鼠單核球之巨噬細胞株，購自食品工業發展研究所菌種開發中心。
2. 裂殖素：50 ng/mL LPS (lipopolisaccharide, Sigma L-2654)。
3. 10%FBS/DMEM培養液：5 mL FBS(Fetal bovin serum , Gibco 26140-079) 加入 45 mL DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium , Gibco 11995-040)。

### 【方法】

RAW264.7小鼠巨噬細胞株屬於趴附型細胞，細胞以10%FBS/DMEM 培養液進行培養，每隔三天必須繼代更換培養液。 RAW264.7 細胞株 $2 \times 10^4$  cells/well (100  $\mu$ L/well)，分別注入96 孔盤中，經三小時靜置使細胞完全趴附後，再給予不同食材樣品進行培養，一小時後加入LPS (50 ng/mL)刺激，經24小時培養後收取上清液，儲存於-80°C，待日後進行 TNF- $\alpha$ 及IL-6含量分析。細胞以MTT法進行細胞存活分析。

## 四、EL4 小鼠T細胞株

### 【材料與試劑】

1. EL4 (ATCC No. TIB-39)：為一發展自C57BL/6N 小鼠T細胞株，購自食品工業發展研究所菌種開發中心。
2. 裂殖素：50 ng/mL PMA(Phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma P-8139)與 1 $\mu$ g/mL ionomycin (Ionomycin calcium salt, Sigma I-3909)。
3. 10%FBS/DMEM培養液：同第二章，第二節，三、材料與試劑

#### 【方法】

EL4小鼠T細胞株屬於懸浮型細胞，細胞以10%FBS/DMEM 培養液進行培養，每隔兩天必須繼代更換培養液。EL4 細胞株 $2 \times 10^4$  cells/well (100  $\mu$ L/well)，分別注入96 孔盤中，再給予不同食材樣品進行培養，一小時後加入50 ng/mL PMA 與 1  $\mu$ g/mL ionomycin，經培養24小時後收取上清液，儲存於-80 $^{\circ}$ C，待日後進行IL-2 及IL-4含量分析。細胞以MTT法進行細胞存活分析。

#### 五、腹腔細胞的取得與培養

##### 【材料與試劑】

1. 動物：BALB/c 雌鼠8~12週大（台大動物中心）
2. TCM/RPMI培養液：20 mL 之TCM<sup>TM</sup> 代用血清 (Celox laboratories, Inc.)，加入1L之RPMI-1640 medium (Gibco 11875)，並加入10 mL之三合一抗生素 (Sigma A-5955；成分包含10000 units/mL penicillin、10 mg/mL streptomycin 及 25  $\mu$ g/mL amphotericin)。
3. HBSS 緩衝液：HBSS 緩衝液粉末(Sigma H2387)溶於去離子水中，並定容為1L，經121 $^{\circ}$ C，30 分鐘滅菌後，加入10 mL 三合一抗生素(Sigma A-5955)，再以7.5% NaHCO<sub>3</sub> 將顏色調整為桃紅色。
4. 裂殖素：10  $\mu$ g/mL LPS (lipopolisaccharide, Sigma L-2654)。

#### 【方法】

以二氧化碳令小鼠安樂死後，在小鼠體表噴灑75%酒精，剪開腹腔外側皮毛，

用手撕開，露出整個腹膜。以鑷子輕挑起腹膜，用針筒緩緩打入3 mL HBSS 緩衝液，晃動鼠體後，再將腹腔內液體抽出，共打入三次取得約9 mL的細胞懸浮液。將取得的細胞懸浮液以1500 rpm 離心10分鐘，再以HBSS buffer 洗三次，加入1 mL TCM/RPMI 培養液使細胞均勻懸浮，並計算細胞總數，調整細胞數目至 $3 \times 10^6$  cells/mL。加入100  $\mu$ L/well 細胞液於96孔盤中，加入含有各食材樣品與LPS的TCM/RPMI 培養液，使細胞最終密度為 $1.5 \times 10^6$  cells/mL，LPS最終濃度為10  $\mu$ g/mL，培養48小時後收取上清液，儲存於-80°C待日後分析，以MTT法進行細胞存活分析。

## 六、脾臟細胞之取得與培養

### 【材料與試劑】

1. BALB/c 雌鼠，8~12週齡 (台大動物中心)
2. 裂殖素：ConA 5  $\mu$ g/mL (Concanavalin A, Sigma C-5275)
3. TCM/RPMI培養液與HBSS緩衝液：同第二章，第二節，五、材料與試劑
4. ACK lysing buffer：NH<sub>4</sub>Cl 8.29 g、Na<sub>2</sub>EDTA 37.2 mg、KHCO<sub>3</sub> 1.0 g，加入滅菌水定容至1L，再以0.22  $\mu$ M filter過濾。

### 【方法】

老鼠犧牲後取出脾臟，置於有3 mL TCM/RPMI培養液的3 cm dish中。以無菌針筒尾端將脾臟磨碎，將上層細胞懸浮液吸取至15 mL離心管中，在加入3 mL的HBSS緩衝液，繼續將剩餘的磨碎，在吸取至離心管中，最後用3 mL HBSS緩衝液沖洗dish，將殘留細胞收集。細胞懸浮液以1500 rpm離心10分鐘後，倒去上清液，沉澱的細胞拍散後加入ACK lysing buffer，靜置1分鐘後加入HBSS緩衝液，以1500 rpm離心10分鐘後，以HBSS 緩衝液洗3次，洗去ACK lysing buffer。加入 2mL TCM/RPMI 培養液使成細胞懸浮液。計算細胞總數，將細胞數調整至 $1 \times 10^7$  cell/mL，取500  $\mu$ L 培養於48 孔盤中，加入含有各食材樣品與ConA的TCM/RPMI



培養液，使最終細胞密度為 $5 \times 10^6$  cell/mL，ConA最終濃度為5 mg/mL，培養48小時收取上清液，保存於 $-80^\circ\text{C}$ ，以MTT法進行細胞存活分析。

## 七、樹突細胞之取得與培養

### 【材料與試劑】

1. BALB/c 雌鼠，6~8週齡 (台大動物中心)
2. GM-CSF (Peprotech Cat. NO. 315-03) 與 IL-4 (eBioscience Cat. NO. 34-8041) : GM-CSF配製成 $1 \times 10^7$  unit/mL的stock，IL-4配製成 $5 \times 10^6$  unit/mL的stock，存放於 $-80^\circ\text{C}$ 。
3. 培養液：5mL FBS (Gibco 26140-079) 加入94mL RPMI-1640 medium (Gibco 11875)中，並加入1 mL之三合一抗生素(Sigma A-5955)。
4. 裂殖素：LPS 500 ng/mL (Sigma L-2654)
5. HBSS緩衝液與ACK lysing buffer：同第二章，第二節，五、材料與試劑

### 【方法】

將小鼠腹部處皮毛以剪刀剪開，將皮撕開至後腳腳跟處撕下，再以剪刀從關節處取下後腿兩側之腿骨。利用剪刀將脛骨與股骨的肌肉剔除乾淨，再把腿骨關節間韌帶剪斷，先於裝有70%酒精之3 cm dish浸泡一下，再移至裝有HBSS 緩衝液的3cm dish浸泡沖去酒精。將骨頭從兩端剪開，以針筒(23G針頭)吸取 HBSS 緩衝液，反覆從骨頭剪開處沖洗腿骨內之骨髓至50 mL離心管，直到骨頭內骨髓完全沖出，而呈現中空狀，股骨約沖洗6 mL，脛骨約沖洗4 mL。利用針筒吸取沖出之細胞懸浮液，在沖出於新的 50 mL離心管，將聚集細胞沖散。將細胞懸浮液以 $4^\circ\text{C}$  1500 rpm 離心 10分鐘後，除去上清液。將沉澱細胞打散均勻，並加入1 mL ACK lysis Buffer 作用 1 分鐘後，加入 9 mL HBSS 緩衝液。同樣以  $4^\circ\text{C}$  1500 rpm 離心 6 分鐘，除去上清液後，再以 10 mL HBSS 緩衝液洗兩次。最後計算細胞數目，將細胞數目調整成  $1 \times 10^6$  cells/mL，培養於6 孔盤中，每個well含有5 mL，並培養在

含有 500 unit/mL GM-CSF 與 1000 unit/mL IL-4 之 5%FBS/RPMI 培養液。

將取出細胞當天定為Day 0，Day 4時每個well吸取一半體積上層的培養液，再補回新鮮細胞培養液(含1500 unit/mL GM-CSF、3000 unit/mL IL-4 之5%FBS/RPMI)於各well中。在Day 6時，小心的沖吸數次後吸取所有的懸浮細胞，以除去纖維母細胞與巨噬細胞等黏附性細胞，之後重新計算細胞數目，調整細胞數為 $2 \times 10^6$  cells/mL，取500 mL培養於48孔盤中，加入各食材樣品預處理1小時，再加入含LPS的5%FBS/RPMI，使最終細胞密度為 $1 \times 10^6$  cells/mL，LPS最終濃度為500 ng/mL，培養48小時。收取上清液保存於 $-80^\circ\text{C}$ ，並以MTT法進行細胞存活分析。

## 八、細胞激素含量測定

### (一) BD Pharmingen 系統

#### 【材料與試劑】

1. Coating buffer：carbonate buffer， $\text{NaHCO}_3$  0.586g， $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.381g，溶於 $\text{dH}_2\text{O}$ 中，定容至500 mL， $\text{pH}=9.6$
2. PBS buffer：10x PBS：  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  29.2g， $\text{NaCl}$  80g， $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0g， $\text{KCl}$  2.0g，溶於 $\text{dH}_2\text{O}$ 中， $\text{pH}=7.4$ ，定容至1 L，使用前以 $\text{dH}_2\text{O}$ 稀釋10倍。
3. Wash buffer：PBST，0.05% Tween 20的PBS溶液
4. Blocking buffer：1% BSA (bovine serum albumin, Sigma A-4503) 溶於PBS中
5. ELISA kit (Pharmingen系統：IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、 $\text{IFN}\gamma$ )  
**1<sup>o</sup>Ab**：Rat anti-mouse IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、 $\text{IFN}\gamma$  抗體  
**2<sup>o</sup>Ab**：Biotinylated rat anti-mouse IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、 $\text{IFN}\gamma$  抗體
6. Avidin連結之過氧化酵素：Avidin-horseradish peroxidase (HRP) conjugated (PIERCE 29994)，使用前稀釋15000倍。
7. Citrate buffer：Citric acid monohydrate 13.134g，Sodium citrate dehydrate 18.381g，分別溶於250 mL  $\text{dH}_2\text{O}$ 中，使濃度皆為0.25 M，以Sodium citrate

dehydrate加入Citric acid monohydrate調整pH=4.2。

8. 過氧化酵素基質液：ABTS (2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium) 0.0055 g 溶於10 mL citrate buffer中，呈色前加入10  $\mu$ L 30%  $H_2O_2$ 。

### 【方法】

細胞激素測定採用ABC (avidin-biotin conjugates system) 酵素連結免疫分析法 (ELISA)。於96孔盤中加入1<sup>o</sup>Ab，於4<sup>o</sup>C放置隔夜，以PBST清洗4次後，以blocking buffer進行blocking 1小時。清洗5次後加入適當稀釋的樣品與適當濃度的標準品，反應2~3小時，清洗6次後加入2<sup>o</sup>Ab反應1小時，清洗7次後再加入HRP，反應30分鐘。清洗8次後加入過氧化酵素基質液，呈色20-30分鐘後測定405 nm吸光值。



### (二) R&D系統

#### 【材料與試劑】

1. Coating buffer：1x PBS
2. PBS、Wash buffer與Blocking buffer：同第二章，第二節，八、(一)
3. ELISA kit (R&D系統：TNF $\alpha$ )  
**1<sup>o</sup>Ab**：Rat anti-mouse TNF $\alpha$  Ab，溶於coating buffer  
**2<sup>o</sup>Ab**：Biotinylated rat anti-mouse TNF $\alpha$  Ab，溶於blocking buffer
4. Avidin連結之過氧化酵素：Avidin-horseradish peroxidase (HRP) conjugated，使用前稀釋200倍。
5. 過氧化酵素基質液：TMB

### 【方法】

細胞激素測定採用ABC (avidin-biotin conjugates system) 酵素連結免疫分析法 (ELISA)。於96孔盤中加入1<sup>o</sup> Ab，於4<sup>o</sup>C中放置隔夜，以PBST清洗4次後以blocking buffer進行blocking 1小時。清洗5次後加入適當稀釋之樣品與適當濃度之標準品，

反應2小時，清洗6次後加入 $2^{\circ}$  Ab反應1小時，清洗7次後再加入HRP，反應30分鐘。清洗8次後加入過氧化酵素基質液，呈色20-30min後測定620 nm吸光值。

### (三) eBioscience 系統

#### 【試劑】

1. Coating buffer : ELISA/ELISPOT Coating buffer powder 一包溶於dH<sub>2</sub>O中，定容為1L，混勻後過0.22 $\mu$ m膜。
2. Assay diluent buffer : 將5X Assay diluent用dH<sub>2</sub>O稀釋5倍
3. Wash buffer : PBST，0.05% Tween 20的PBS溶液
4. Capture Antibody ( $1^{\circ}$ Ab) :  
Purified anti-mouse IL-12p35/p70 (Cat. # 14-7122-85)  
Purified anti-mouse IL-10 (Cat. # 14-7101-68)
5. Detection Antibody ( $2^{\circ}$ Ab) :  
Biotin-conjugated anti-mouse IL-12p40 (Cat. # 13-7123-85)  
Biotin-conjugated anti-mouse IL-10 (Cat. # 33-7102-68)
6. Avidin連結之過氧化酵素 : Avidin-horseradish peroxidase (HRP) conjugated，使用前稀釋250倍。
7. 過氧化酵素基質液 : TMB

#### 【方法】

細胞激素測定採用ABC (avidin-biotin conjugates system) 酵素連結免疫分析法 (ELISA)。於96孔盤中加入 $1^{\circ}$  Ab，於4 $^{\circ}$ C中放置隔夜，以PBST清洗4次後以assay buffer進行blocking 1小時。清洗5次後加入以assay buffer適當稀釋之樣品與適當濃度之標準品，反應2小時，清洗6次後加入 $2^{\circ}$  Ab反應1小時，清洗7次後再加入HRP，反應30分鐘。清洗8次後加入過氧化酵素基質液，呈色20-30分鐘後測定620 nm吸光值。

## 九、MTT染色法測定細胞存活率

### 【試劑】

1. MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma M-5655)：以滅菌後PBS溶液配製成濃度5 mg/mL的溶液，再以0.22  $\mu\text{m}$  filter過濾，用鋁箔紙包起來避光，放置於-20°C待用。
2. 0.04N HCl 異丙醇：將12N 的HCl以異丙醇稀釋為0.04N。

### 【方法】

在收取完上清液或吸除培養液後，加入55  $\mu\text{L}$ /well MTT (0.5 mg/mL, 以DMEM配製) 溶液，置於37°C, 5% CO<sub>2</sub>無菌培養箱培養。三小時後在加入100  $\mu\text{L}$ 含有0.04N HCl 的異丙醇，於震盪器中震盪30分鐘，使色劑溶出，以ELISA reader讀取540nm的吸光值。

## 十、統計方法

實驗結果以Mean  $\pm$  SD表示，各組數據以Student's *t*-test分析，與控制組比較，若 $p < 0.05$  表示有顯著差異。**\*\***  $p < 0.01$ ，**\***  $p < 0.05$ ，**#**  $0.05 < p \leq 0.1$ 表示有差異的趨勢。

### 第三節 結果

#### 一、山苦瓜各種萃物與CLN對RAW264.7小鼠巨噬細胞株的影響

巨噬細胞受到刺激後活化，會生成許多發炎介質，包括細胞激素、高反應性含氧分子(reactive oxygen species, ROS)，以及脂質衍生物，引起發炎反應。為探討山苦瓜各萃物與CLN對於發炎反應的影響，將不同濃度的各樣品處理RAW264.7。圖2.1(a)為不同濃度樣品處理下的細胞存活率，以80%做為是否具有細胞毒性之依據，各樣品皆不影響細胞存活率。

各樣品預處理1小時，再以LPS刺激24小時後，TNF $\alpha$ 及IL-6的分泌情形如圖2.1，山苦瓜EA萃物、hexane萃物與酒精萃物能明顯的降低發炎介質TNF $\alpha$ 與IL-6的分泌，且隨著樣品濃度越高分泌量越低。CLA處理不影響TNF $\alpha$ 的分泌，IL-6分泌則被抑制，樣品CLN處理並無任何的影響。

#### 二、山苦瓜各種萃物與CLN對初代腹腔細胞的影響

腹腔細胞大多以單核球和巨噬細胞為主，當其受到外界刺激時，可分泌一些免疫調節因子，如發炎介質TNF $\alpha$ 、IL-6。以山苦瓜各萃物處理BALB/c小鼠初代腹腔細胞，細胞存活率結果如圖2.2。各樣品對於初代腹腔細胞是不影響存活率。

分析上清液中的細胞激素，結果如圖。發現山苦瓜各萃物對於初代腹腔細胞TNF $\alpha$ 分泌量皆無影響，但BGP-EA與BGP-EtOH能顯著的抑制IL-6的分泌，顯示山苦瓜EA與酒精萃物具有抗發炎之潛力。CLN或CLA的處理結果如圖2.2，CLN在25  $\mu$ M的濃度下能顯著的降低TNF $\alpha$ 分泌，並且在高濃度50  $\mu$ M能降低IL-6分泌的趨勢 ( $p=0.08$ )，CLA在50  $\mu$ M可以顯著的抑制分泌TNF $\alpha$ 及IL-6作用，顯示CLN與CLA都具有抗發炎的潛力。

#### 三、山苦瓜各種萃物與CLN對EL4小鼠T細胞的影響

欲了解山苦瓜萃物與CLN對於免疫反應的影響，利用不同濃度的各樣品處理

小鼠T細胞株EL4。圖2.3為不同濃度樣品處理下的細胞存活率，各樣品皆不影響細胞存活率。

EL4細胞株受活化後，可分泌大量的IL-2與IL-4，但不分泌IFN- $\gamma$ ，如圖2.3所示。山苦瓜各萃物中，EA萃物在100、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度下，明顯的抑制細胞IL-2的分泌，酒精萃物在200、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 處理時，能顯著的減少IL-2分泌量。在分泌IL-4的部份，BGP-EA在低濃度25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 能顯著促進IL-4的分泌，但濃度達100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時則顯著的抑制，BGP-EtOH在濃度200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 處理下，IL-4的分泌顯著的被抑制，而山苦瓜正己烷萃物與水萃物的處理不影響IL-2與IL-4的分泌。

以CLN或CLA處理EL4細胞，細胞激素的分泌量如圖2.3。由結果發現，CLN能隨著濃度的增加而顯著降低IL-2的分泌，對於IL-4的分泌則是隨著濃度增加而使IL-4的分泌上升，但無顯著差異。以CLA處理EL4細胞顯著的抑制IL-2與IL-4的分泌，並有劑量效應。

#### 四、山苦瓜各種萃物與CLN對初代脾臟細胞的影響

脾臟為身體內最大的免疫器官，當受到外界刺激時，可以分泌一些細胞激素，調節免疫功能。以山苦瓜各萃物、CLN和CLA處理BALB/c小鼠初代脾臟細胞，細胞存活率結果如圖2.4，除BGP-EA 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 具有細胞毒性外，其餘樣品皆不影響存活率。

各樣品對初代脾臟細胞的細胞激素分泌影響結果如圖2.5。在IL-2分泌量方面，BGP-Hex與BGP-H<sub>2</sub>O在濃度10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 處理下，能趨勢的促進脾臟細胞IL-2的分泌 ( $p=0.07$ ;  $p=0.09$ )，而BGP-EtOH則顯著的抑制IL-2的分泌(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。在IFN- $\gamma$ 的分泌，BGP-EA能顯著的降低IFN- $\gamma$ 的分泌，而酒精萃物能有抑制的趨勢。對於IL-4的分泌量，山苦瓜水萃物在高濃度400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 處理下，有促進分泌的趨勢 ( $p=0.07$ )，其他萃物皆無影響，然而各萃物對於IL-2/IL-4與IFN $\gamma$ /IL-4比例皆無顯著影響。脾臟細胞以CLN與CLA的處理，由圖2.5結果可知，CLA在高

濃度下，IL-2與IFN $\gamma$ 分泌有較低的趨勢，CLN在50  $\mu$ M處理時，能顯著抑制脾臟細胞分泌IFN $\gamma$ 。而兩者在高濃度的處理下(50  $\mu$ M)，皆能抑制IL-4的分泌。以IL-2/IL-4與IFN $\gamma$ /IL-4比例評估免應傾向，並無顯著的影響(圖2.6)。

### 五、山苦瓜各種萃物與CLN對骨髓細胞衍生之樹突細胞的影響

各樣品對骨髓細胞經由培養後所得的樹突細胞，以預先處理1小時，分泌IL-12p70、IL-10、TNF $\alpha$ 與IL-6的影響，如圖2.7為各樣品對樹突細胞存活率的結果，並不顯著影響樹突細胞細胞存活率，唯CLN的處理有較低的細胞存活率，但不低於80%。

各樣品對細胞激素分泌的影響結果如圖2.7，山苦瓜各萃物、CLN與CLA，皆能顯著的降低樹突細胞分泌IL-12p70 (圖2.7(b))，其中山苦瓜EA、Hex萃物與CLA能顯著的抑制IL-10的分泌 (圖2.7(c))。對發炎介質TNF $\alpha$ 分泌，除高濃度山苦瓜水萃外，各樣品都能減少樹突細胞TNF $\alpha$ 的分泌 (圖2.7(d))。對與IL-6的分泌，以山苦瓜EA與CLA較顯著的抑制分泌IL-6，hexane萃物則有趨勢的降低IL-6的分泌。



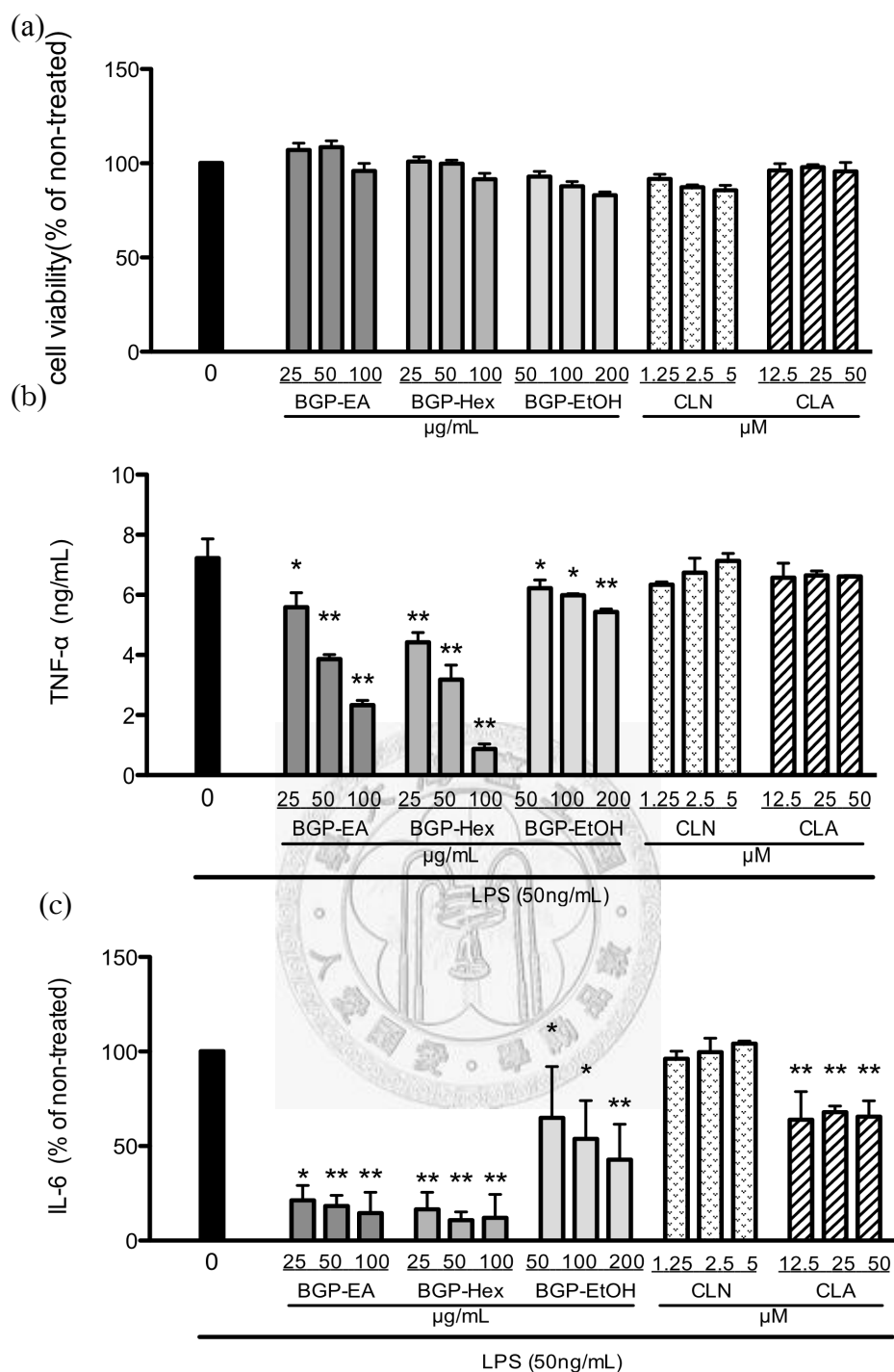


圖2.1 山苦瓜各萃物、CLN與CLA對RAW264.7細胞株存活率與細胞激素的影響

Figure 2.1 The effects of BGP extract, CLN and CLA on (a) cell viability (b) TNF $\alpha$  and (c) IL-6 cytokines production of RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were pretreated with various concentrations of BGP-EA, BGP-Hex, BGP-EtOH, CLN and CLA for 1 hr and further stimulated with 50 ng/mL LPS for 24 hours. Values are mean  $\pm$  SD, n=3. Cells viability was determined by MTT assay. Each group was compared with non-treated group by Student's t-test (\*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ )

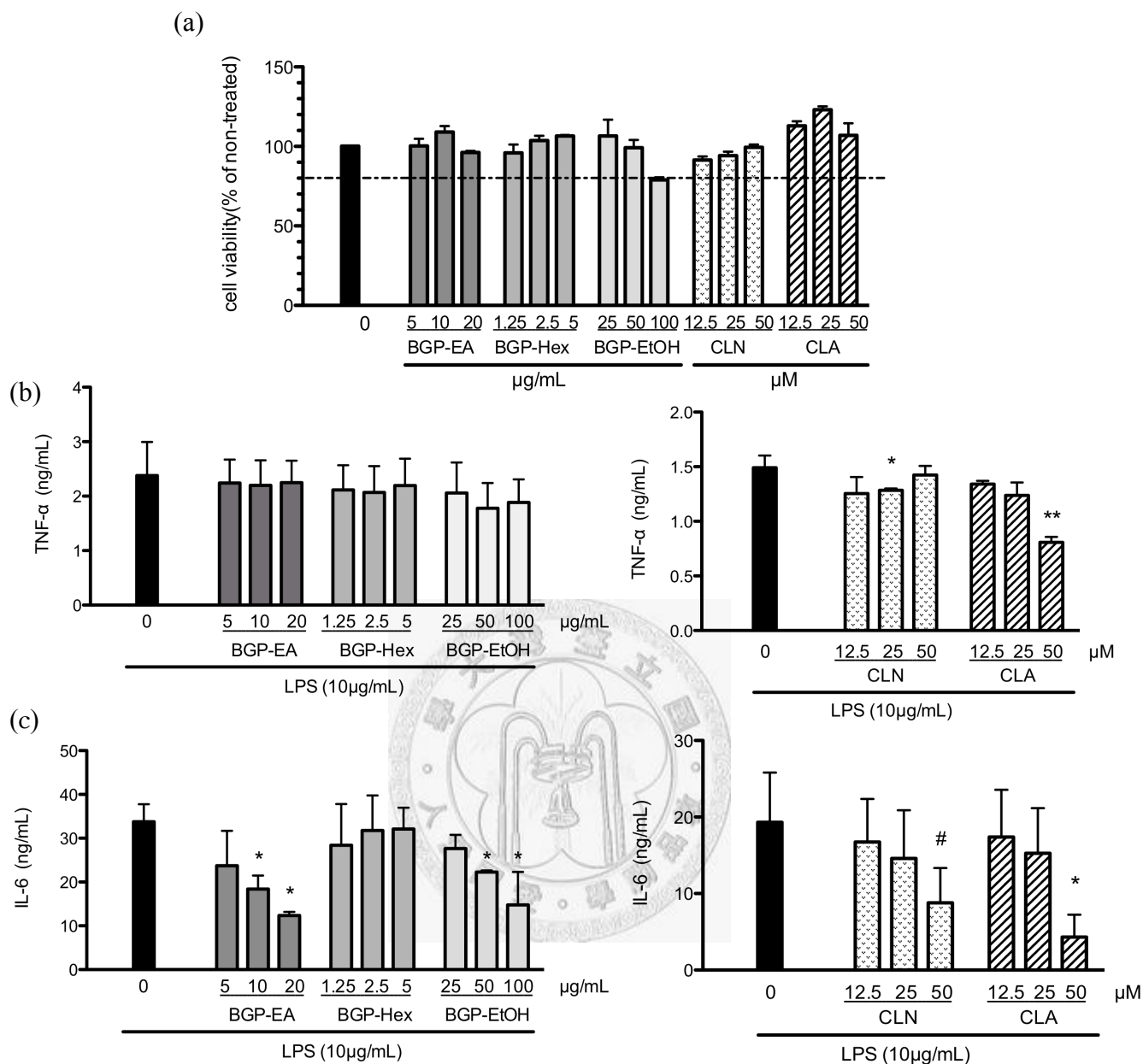


圖2.2 山苦瓜各萃物、CLN與CLA對初代腹腔細胞存活率與細胞激素分泌的影響

Figure 2.2 The effects of BGP-extract, CLN and CLA on (a) cell viability (b) TNF $\alpha$  and (c) IL-6 cytokines production of primary peritoneal cells from BALB/c mice. Peritoneal cells were pretreated with various concentrations of BGP-EA, BGP-Hex, BGP-EtOH, CLN and CLA for 1 hr and further stimulated with 10 $\mu$ g/mL LPS for 48 hours. Cell viability was determined by using MTT assay. Values are mean  $\pm$  SD, n=3. Each group was compared with non-treated group by using Student's t-test ,(\* p<0.05,\*\* p<0.01, # 0.05 $\leq$ p<0.1).

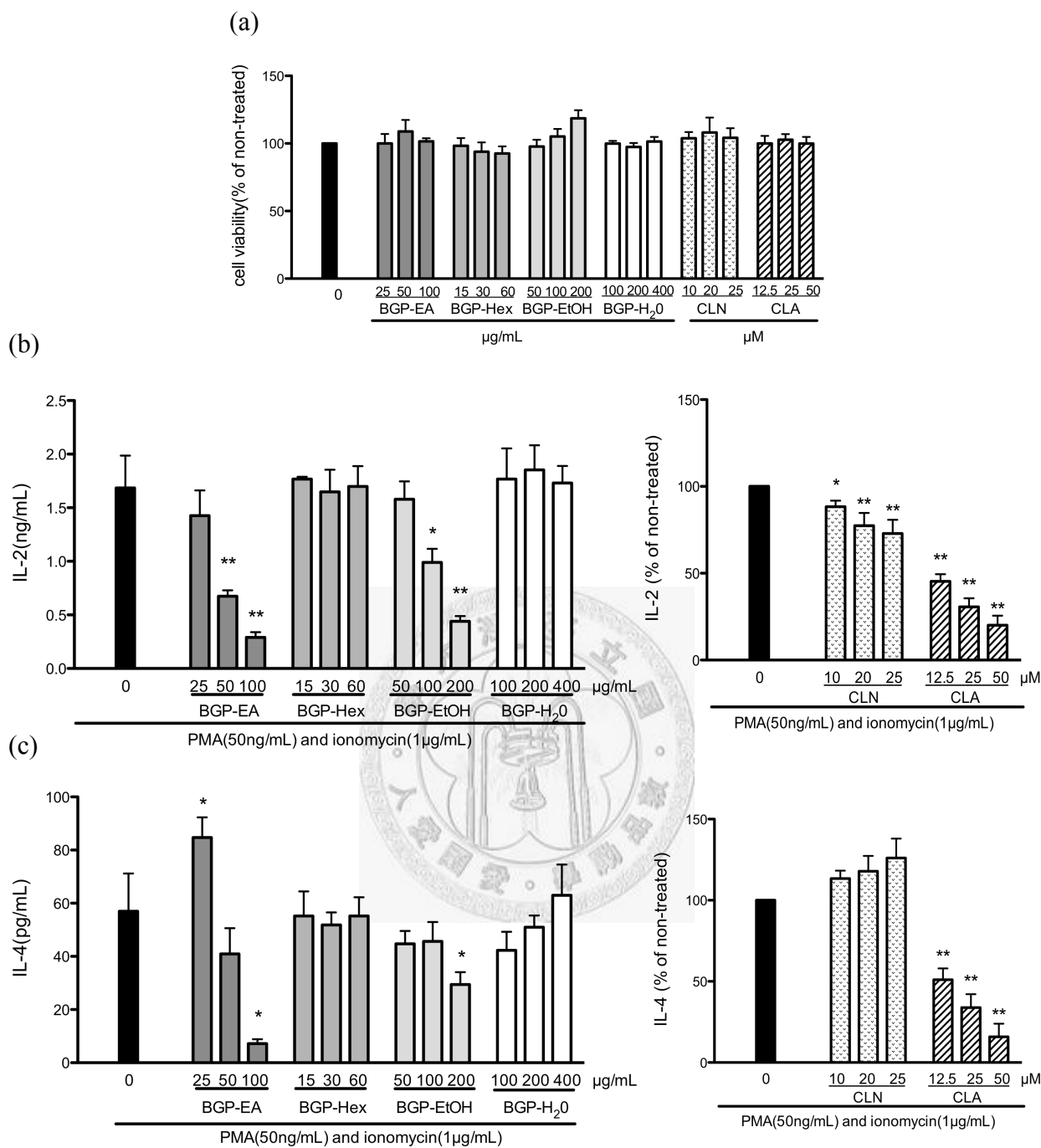


圖2.3 山苦瓜各萃物、CLN與CLA對EL4細胞存活率與細胞激素分泌的影響

Figure 2.3 The effects of BGP-extract, CLN and CLA on (a) cell viability (b) IL-2 and (c) IL-4 cytokines production of EL4. EL4 were pretreated with various concentrations of BGP-EA, BGP-Hex, BGP-EtOH, BGP-H<sub>2</sub>O, CLN and CLA for 1 hr and further stimulated with 50 ng/mL PMA plus 1µg/mL ionomycin for 24 hours. Cell viability was determined by using MTT assay. Values are mean ± SD, n=3. Each group was compared with non-treated group by using Student's t-test, (\* p<0.05, \*\* p<0.01).

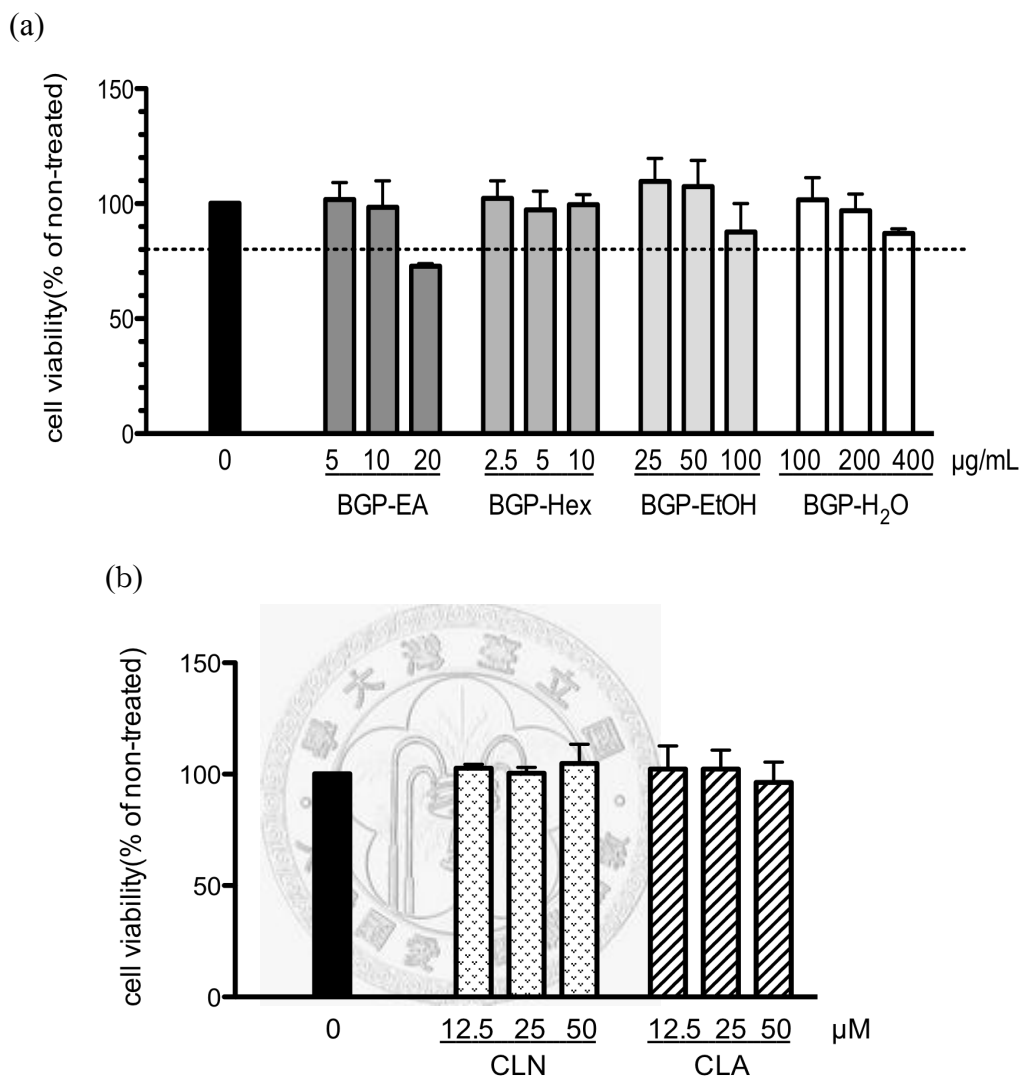


圖2.4 山苦瓜各萃物、CLN與CLA對初代脾臟細胞存活率的影響

Figure 2.4 The effects of (a) BGP-extract and (b) CLN and CLA on the cell viability of primary splenocytes from BALB/c mice. Splenocytes were co-treat with various concentrations of BGP-EA, BGP-Hex, BGP-EtOH, BGP-H<sub>2</sub>O, CLN or CLA for 48 hours. Cell viability was determined by using MTT assay. Values are mean  $\pm$  SD, n=3.

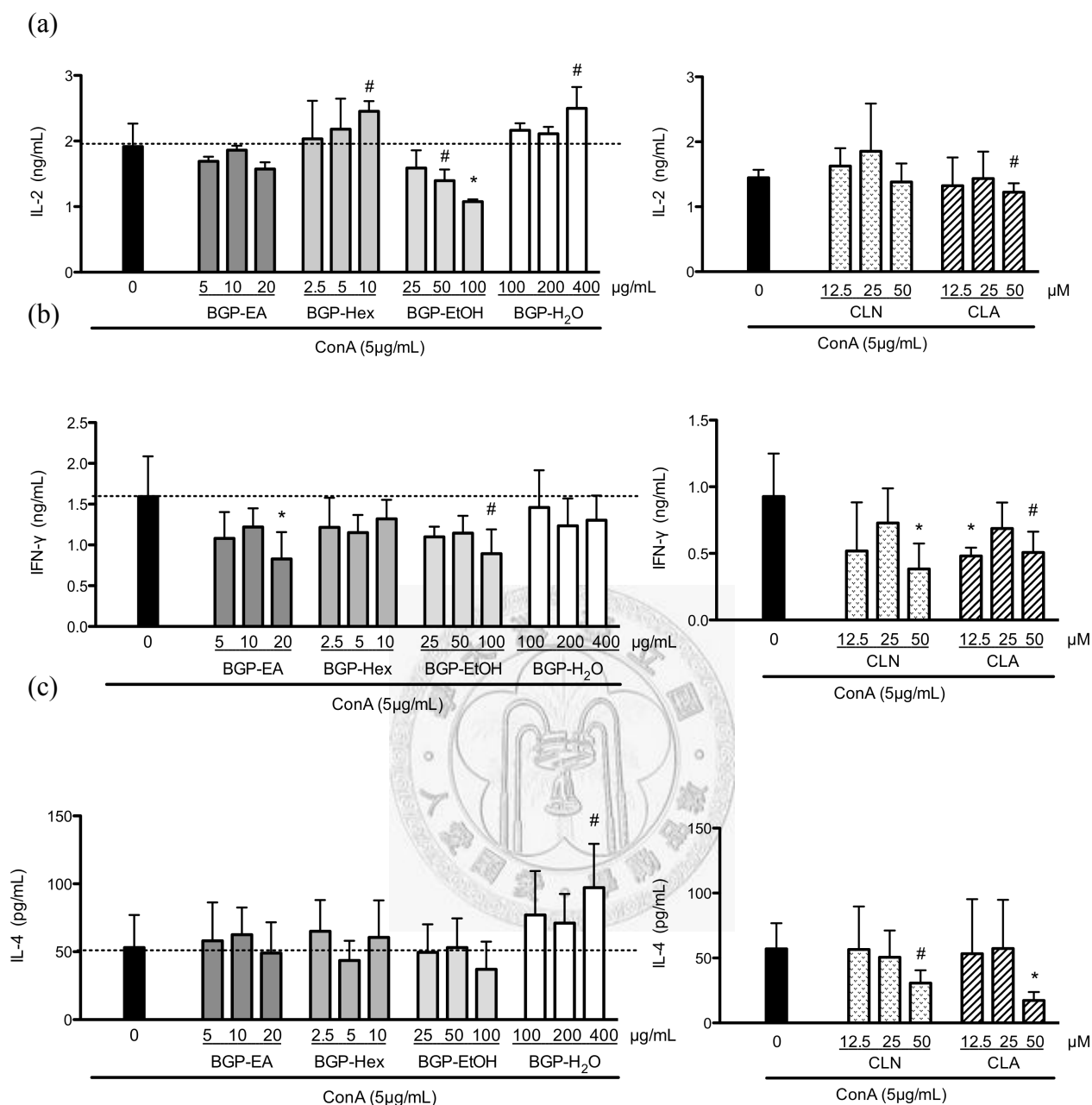


圖2.5 山苦瓜各萃物、CLN與CLA對小鼠初代脾臟細胞細胞激素分泌的影響

Figure 2.5 The effects of BGP-extract, CLN and CLA on (a) IL-2 (b) IL-4 and (c) IFN- $\gamma$  cytokines production of primary splenocytes from BALB/c mice. Splenocytes were pretreated with various concentrations of BGP-EA, BGP-Hex, BGP-EtOH, BGP-H<sub>2</sub>O CLN and CLA for 1 hr and further stimulated with 5  $\mu$ g/mL ConA for 48 hours. Cytokine values are mean  $\pm$  SD, n=3. Each group was compared with non-treated group by using Student's *t*-test (\*  $p$ <0.05, # 0.05 $\leq$  $p$ <0.1).

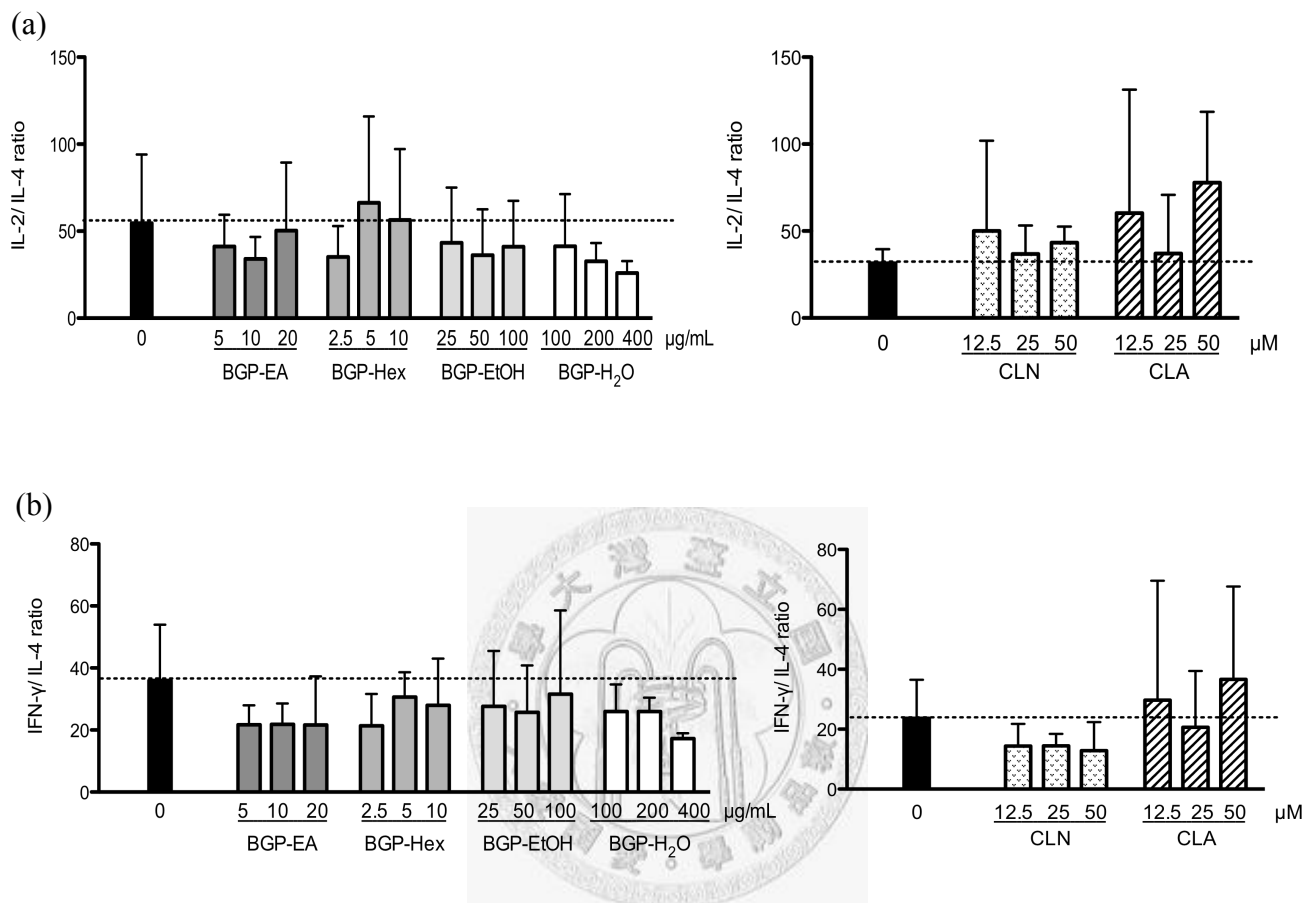


圖2.6 山苦瓜各萃物、CLN與CLA對初代脾臟細胞分泌細胞激素Th1/Th2比例的影響

Figure 2.6 The effects of BGP-extract, CLN and CLA on (a) IL-2/IL-4 and (b) IFN- $\gamma$ /IL-4 ratio of primary splenocytes from BALB/c mice. Splenocytes pretreated with various concentrations of BGP-EA, BGP-Hex, BGP-EtOH, BGP-H<sub>2</sub>O CLN and CLA for 1 hr and further stimulated with 5  $\mu$ g/mL ConA for 48 hours. Values are mean  $\pm$  SD, n=3. Each group was compared with non-treated group by using Student's *t*-test.

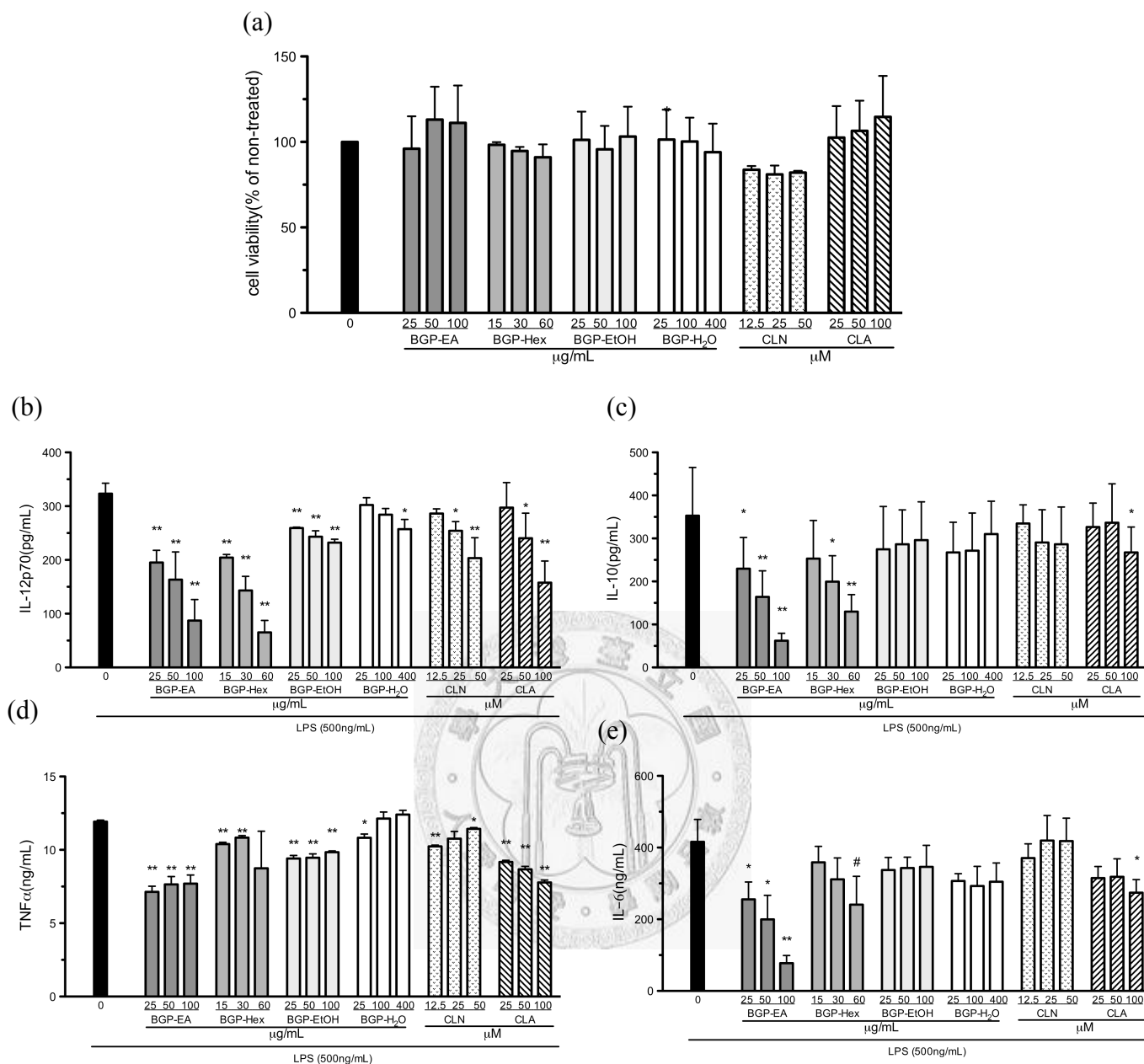


圖2.7 山苦瓜各萃物、CLN與CLA對樹突細胞存活率與細胞激素分泌的影響

Figure 2.7 The effects of BGP-extract, CLN and CLA on (a) cell viability (b) IL-12p70 (c) IL-10 (d) TNF- $\alpha$  and (e) IL-6 cytokines production of bone-marrow derived dendritic cells (BMDC) from BALB/c mice. BMDC were pretreated with various concentrations of BGP-EA, BGP-Hex, BGP-EtOH, BGP-H<sub>2</sub>O CLN and CLA for 1 hr and further stimulated with 500 ng/mL LPS for 48 hours. Values are mean  $\pm$  SD, n=3. Each group was compared with non-treated group by using Student's *t*-test, (\* *p*<0.05, \*\* *p*<0.01, # 0.05  $\leq$  *p*<0.1).

#### 第四節 討論

##### 一、山苦瓜與CLN可能藉由活化PPAR $\alpha$ 與PPAR $\gamma$ 而具有抗發炎的效果

本實驗的結果顯示，山苦瓜萃物能顯著抑制活化RAW264.7細胞株促發炎介質TNF $\alpha$ 與IL-6的分泌，其中乙酸乙酯與酒精萃物亦能降低初代腹腔細胞，LPS刺激下分泌IL-6的能力，因此，山苦瓜萃物具有抗發炎的效果，其中又以乙酸乙酯萃物效果最佳。

過去的研究指出，山苦瓜EA萃物具有PPAR $\alpha$ 與PPAR $\gamma$ 的活性(Chao et al., 2003)，已知在巨噬細胞中活化PPAR $\gamma$ 具有抗發炎的效果(Straus et al., 2007)，且可能是透過NF- $\kappa$ B途徑(Chinetti et al., 2000)，研究也發現苦瓜placenta萃物可抑制活化巨噬細胞株的促發炎介質分泌，並能降低NF- $\kappa$ B的活性(Kobori et al., 2008)。PPAR $\alpha$ 在研究中也發現會降低NF- $\kappa$ B活性與下游促發炎基因的表現(Delaville et al., 1999)。推測山苦瓜萃物的抗發炎作用，或許有部份是透過PPAR $\alpha$ 與PPAR $\gamma$ 的活化。

已有研究指出9c, 11t-CLA具有與PPAR $\gamma$ 結合的能力(Ringseis et al., 2006)，也具有降低RAW264.7細胞在LPS刺激下發炎介質的分泌(Yu et al., 2002; Yang et al., 2003)，本研究同樣的證實CLA具有抗發炎的作用。CLN在細胞實驗中也顯示具有活化PPAR $\alpha/\gamma$ 的能力(Chuang et al., 2006)，本實驗結果顯示，初代腹腔細胞在LPS活化下，CLN的處理可以降低發炎介質的分泌，具有抗發炎的效用，而此作用亦可能是透過PPAR。

本實驗顯示，山苦瓜EA、酒精萃物、CLN與CLA皆可降低脾臟細胞IFN $\gamma$ 的分泌量，與其他研究發現CLA能顯著的抑制人類T細胞株IFN $\gamma$ 的表現量(Luongo et al., 2003)，結果相似。有研究顯示，PPAR $\alpha$ 的活化劑可抑制人類或小鼠活化T細胞分泌IFN $\gamma$ 的能力(Straus et al., 2007)，且活化PPAR $\gamma$ 也會降低T細胞分泌IFN $\gamma$ (Cunard et al., 2004)，IFN $\gamma$ 能夠活化巨噬細胞，增加抗原呈獻的能力，此時活化的巨噬細胞會分泌促發炎細胞激素，促成發炎反應。因此，IFN $\gamma$ 在發炎反應中有其重要的角色。然而是否山苦瓜與CLN確實能透過PPAR，達到抗發炎作用，而抑制T細胞分泌IFN $\gamma$ 是否影響體內免疫平衡，需要更進一步的研究探討。



## 二、各樣品的免疫調節作用

本實驗以樹突細胞、EL4與初代脾臟細胞，探討各樣品對於免疫反應的影響。IL-12p70主要由單核球細胞、巨噬細胞或樹突細胞所分泌，其可促進 Th1 細胞的分化(Sieling et al., 1994)，Th1細胞主要分泌IL-2與IFN $\gamma$ ，主要能活化毒殺性T細胞和巨噬細胞，參與細胞毒殺及局部發炎反應，慢性發炎的過程中，T細胞的活化扮演重要的角色，所分泌的IFN $\gamma$ 使得發炎狀態持續。山苦瓜各萃物、CLN與CLA的處理皆會減少樹突細胞IL-12p70的分泌，其中山苦瓜EA、酒精萃物、CLN與CLA會降低脾臟細胞的IFN $\gamma$ 的分泌，所以若受到外界刺激時，這些樣品可能具有降低Th1的免疫反應，而抑制發炎反應的發生，此可能為抗發炎的機制之一，亦可觀察到各樣品皆可抑制樹突細胞發炎介質TNF $\alpha$ 與IL-6的分泌。

在正常的免疫反應當中，Th1與Th2細胞分泌的細胞激素具有相互調節的作用，而可以維持一平衡的狀態。山苦瓜各萃物對於脾臟細胞Th1與Th2細胞激素的分泌有不同的影響，如：EA萃物能顯著的抑制IFN $\gamma$ 的分泌，酒精萃物則會抑制IL-2與IFN $\gamma$ ，水萃物有趨勢的促進IL-2與IL-4分泌，但都對於Th1/Th2的平衡無顯著的影響。過去本實驗室的研究中，苜蓿芽乙酸乙酯萃物有明顯的抗發炎作用，對於初代脾臟細胞能顯著的抑制IFN $\gamma$ 與IL-4的分泌，且能減緩氣喘模式小鼠呼吸道發炎與過敏免疫反應(洪，2008; 吳，2008)。CLN在本實驗中結果與苜蓿芽乙酸乙酯萃物類似，具有降低脾臟細胞IFN $\gamma$ 與IL-4的分泌，也有抗發炎之潛力，是否CLN具有改善過敏性氣喘的相關症狀？也是本研究後續所要探討的。

## 三、山苦瓜萃物中的CLN

有研究分析苦瓜中脂肪酸種類與含量，發現苦瓜中有四種不同形式CLN，於UV 光下各有不同的最大吸收波長，其中9*c*, 11*t*, 13*t*-CLN於268.8 nm有最大吸收波長(Suzuki et al., 2001)。利用此方法，粗估本次實驗山苦瓜各萃物中CLN的含量，結果顯示以正己烷萃物中含量最高，約有40%，其次為乙酸乙酯萃物1.5%。但有研究也發現，存在於萃物中的這些脂肪酸以酯化的形式存在，然而三酸甘油酯應無法進入細胞被細胞利用，若將萃物進行鹼水解，發現水解後活化PPAR $\alpha$ 的能力較水解前顯著上升(Chuang et al., 2006)。

本實驗所用的山苦瓜正己烷萃物樣品，雖然含有多量的CLN，但可能無法被細胞利用，因此正己烷萃物對初代腹腔細胞的抗發炎作用並未如CLN來得顯著。

表2.1 山苦瓜各萃物、CLN與CLA對發炎與免疫反應的影響

樣品	RAW 264.7		初代腹腔細胞		EL4		初代脾臟細胞			BMDM			
	TNF $\alpha$	IL-6	TNF $\alpha$	IL-6	IL-2	IL-4	IL-2	IFN- $\gamma$	IL-4	IL-12	IL-10	TNF $\alpha$	IL-6
BGP-EA	↓	↓	--	↓	↓	↓	--	↓	--	↓	↓	↓	↓
BGP-Hex	↓	↓	--	--	--	--	↑	--	--	↓	↓	↓	↓
BGP-EtOH	↓	↓	--	↓	↓	↓	↓	↓	--	↓	--	↓	--
BGP-H <sub>2</sub> O	--	--	--	--	--	--	↑	--	↑	↓	--	↓	--
CLN	--	--	↓	↓	↓	--	--	↓	↓	↓	--	↓	--
CLA	--	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓

註：↑:促進分泌，↓:抑制分泌，單箭頭：p<0.05 灰色箭頭：0.05<p≤0.1



## 第三章 山苦瓜與共軛次亞麻油酸對氣喘模式小鼠發炎 與過敏免疫反應的影響

### 第一節 前言

近年來流行病學研究顯示，除了基因及環境因素之外，飲食也可能是氣喘的危險因子之一。抗氧化物、n-3多元不飽和脂肪酸攝取增加及n-6多元不飽和脂肪酸攝取降低等，都可能減少氣喘發生的機會，顯示飲食的確具有調節過敏性氣喘的作用(Graham et al., 2004)。目前市面上已有一些減緩過敏症狀之保健食品，因此，若能以平常會接觸到的食材，透過免疫調節的方式，達到減緩過敏性氣喘的效果，而減少藥物引起的副作用，或許值得開發為保健食品。

過敏性氣喘一般的特徵為：呼吸時氣流阻塞，呼吸道過度反應、慢性呼吸道發炎以及體內傾向於Th2免疫反應。在前一章的細胞實驗中，初步發現CLN在體外試驗確實具有抗發炎與降低脾臟細胞IL-4與IFN $\gamma$ 的分泌，具有調節免疫的作用。而山苦瓜各萃物中，乙酸乙酯與酒精萃物有抗發炎之效用，且對於免疫反應有影響，是否在食用山苦瓜以利降血糖之餘，這樣的影響可能會有不利於過敏性疾病作用？或是具有減緩的效果？值得探討。過去的研究中也指出，c9, t11-CLA具有減緩氣喘模式小鼠呼吸道發炎的症狀，所以在本實驗中，也將其做為一個食材的對照。因此，本研究以氣喘模式小鼠，探討攝食山苦瓜、共軛次亞麻油酸與共軛亞麻油酸對於其發炎和過敏免疫反應之影響，研究的指標包括：局部呼吸道發炎反應、肺呼吸阻力、全身性免疫反應及肺組織基因表現的變化。

## 第二節 材料與方法

### 一、樣品配製

山苦瓜樣品為花蓮四號山苦瓜全果凍乾粉末，以飼料中含有5%凍乾粉末餵食小鼠，依照一般成份分析結果，自原飼料配方中將蛋白質、脂質、碳水化合物和纖維素加以扣除，使各成份總量不變。CLN (Cayman, Cat. No.10008349)純度大於98%與 9c, 11t-CLA (Matreya LLC, Cat. NO. 1245-10) 純度大於 98%，CLN與CLA溶解於黃豆油中，劑量為每日每隻小鼠管餵35 mg，餵食體積為0.1 mL，約等於飲食中含有1% CLN或CLA。

### 二、動物實驗設計

#### (一) 動物飼養

四週大BALB/c雌鼠購自台大動物中心，分別飼養於不鏽鋼籠中，溫度控制於 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，光暗循環時間各為12小時，自由攝食飼料及飲水，每3-4天記錄飼料攝取量，每週記錄小鼠體重。小鼠8週大時開始進行致敏實驗，於8、10週和12週腹腔注射 (intraperitoneal, i.p.) OVA抗原，以 Imject Alum為佐劑，並於每次注射前兩天及最後一次注射後二週採血液分析特異性抗體，並以OVA特異性IgE抗體與體重分組，分別為OVA-oil控制組、飼料含5%山苦瓜凍乾粉的OVA-BGP組、每天管餵35 mg CLN的OVA-CLN組、每天管餵35 mg CLA的OVA-CLA組、和固醇類藥物 prednisolone正對照OVA-Pred組，另有一組為未致敏的PBS-oil組，飼料組成以AIN-76配方為基礎。固醇類藥物 prednisolone的投予時機在AHR前4天開始以管餵方式給予，並管餵至犧牲前，飼料配方與管餵劑量如表3.1。開始餵食後四天，以5%霧化的OVA溶液進行吸入性致敏，而PBS-oil組給予霧化PBS，餵食13天後測量小鼠呼吸道阻力的變化，16天後犧牲小鼠。

#### (二) 致敏方式

致敏方法是以OVA為抗原，溶於佐劑(adjuvant)氫氧化鋁中，在小鼠8週、10週和12週腹腔注射(i.p.)，PBS-oil組則以高溫殺菌處理的PBS取代OVA，每隻小鼠

施打體積為0.2 mL。分組餵食期間、進行呼吸道阻力測試前一天及犧牲前一天以5%霧化的OVA溶液進行吸入性刺激，誘發呼吸道過敏性發炎反應，PBS-oil組則以霧化PBS代替OVA，致敏流程見圖。

1. OVA腹腔注射致敏 (i.p.)

第一次採用OVA (10 µg/mice) 與 Al(OH)<sub>3</sub> (2 mg/mice) 溶於PBS，定容為0.2 mL。

第二及第三次採用OVA (30 µg/mice) 與 Al(OH)<sub>3</sub> (2 mg/mice) 溶於PBS，定容為0.2 mL。

抗原(antigen): Ovalbumin (OVA, albumin chicken egg, Sigma A-5378)，以PBS配製成20 mg/mL，於-20°C保存。

2. 佐劑(adjuvant): Imject<sup>®</sup> Alum，40 mg/mL

3. OVA吸入性致敏(inhalation, i.h.)

配製5% OVA (50 mg/mL)溶於PBS中，利用超音波振蕩器(ULTRA<sup>®</sup>99)使OVA溶液霧化，控制流速為0.4 mL/min，並讓每隻小鼠吸入30分鐘。

(三) 實驗流程及分組

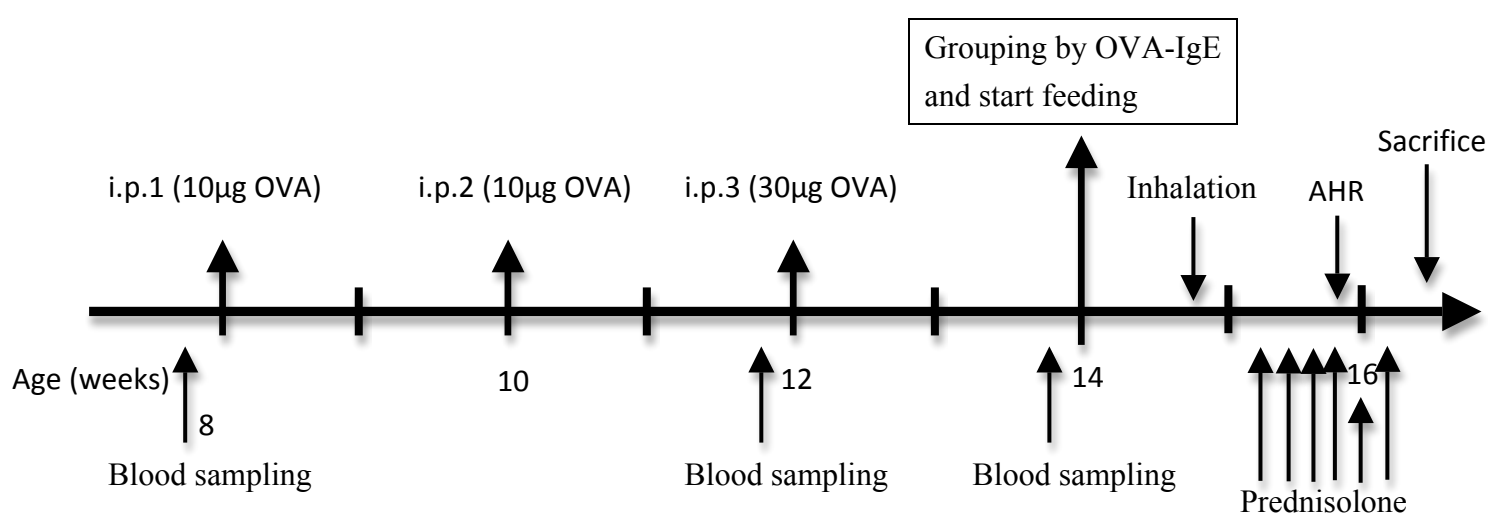


圖3.1 氣喘模式小鼠致敏與餵食飼養流程

Figure 3.1 The protocol of sensitization and treatment in murine model of asthma.

表3.1a 飼料配方

Table 3.1a Composition of the experiment diets (g / kg of diet).

Ingredient	AIN-76		
	Normal	5 % BGP	
Casein (ICN, USA)	200	197.8	2.2
DL-methionine (Sigma, M9500)	3	3	
Corn starch (Samyang genex, Korea)	150	122.7	27.3
Sucrose (台糖細粒特砂，台灣)	500	500	
Cellulose (JRS, Germany)	50	30.9	19.1
Soybean oil (台糖)	50	48	2
AIN-76 vitamin mixture <sup>1</sup> (ICN)	10	10	
AIN-76 mineral mixture <sup>1</sup> (ICN)	35	35	
Choline bitartrate (Sigma, C1879)	2	2	
Bitter gourd power	-	50	

1. The composition of AIN-76 Vitamin Mixture and AIN-76 Mineral Mixture is as described in J. Nutr. 107 : 1340-1348 (1977)

表3.1 b 各組管餵內容物與飼料

Table 3.1 b The different content of treat on each group

Group	Tube feeding	Diet
OVA-oil	0.1 mL soybean oil	AIN-76
OVA-BGP	0.1 mL soybean oil	AIN-76 contains 5% BGP
OVA-CLN	35 mg CLN in 0.1 mL soybean oil	AIN-76
OVA-CLA	35 mg CLA in 0.1 mL soybean oil	AIN-76
OVA-Pred	2 mg pred/kg BW in 0.1 mL soybean oil	AIN-76
PBS-oil	0.1 mL soybean oil	AIN-76

#### (四) 呼吸道過度反應 (AHR) 測定

小鼠在吸入性過敏原刺激後，於隔天接受呼吸道阻力的測試。測試系統為 Buxco system ( Biosystem XA, Buxco Electronics Inc. Sharon, CT, USA )。利用系統中的 transducer ( differential pressure transducer, Buxco ) 及 preamplifier ( MAX II, Buxco ) 收集小鼠呼吸道變化的訊息而計算出Penh值。小鼠在意識清醒狀態下置於 whole body plethysmograph chamber 中，以超音波震盪氣化的PBS導入 chamber 三分鐘，接著抽掉 chamber 中多餘的霧化氣體之後，紀錄小鼠三分鐘內每分鐘平均肺呼吸阻力值 ( Penh )，再以漸增濃度之 Methacholine ( 6.25、12.5、25、50 mg/mL ) 噴霧化給予小鼠刺激，各濃度皆在一樣的操作程序後，紀錄三分鐘刺激之後小鼠呼吸道三分鐘內的平均 Penh 值。

Penh 值的計算方式為  $\text{pause} \times \text{PIF}/\text{PEF}$ ； $\text{Pause} = (\text{Te} - \text{Tr}) / \text{Tr}$ ，( PIF：peak inspiratory flow；PEF：peak expiratory flow；Te：expiratory time；Tr：relaxation time )。

#### 【試劑與儀器】

1. Methacholine (Mch)：Acetyl- $\beta$ -methylcholine chloride (Sigma A2251) ，以PBS 配成 6.25、12.5、25、50 mg/mL。
2. Whole body plethysmograph：Buxco Electronics. Inc.

### 三、動物犧牲及實驗材料收集與分析

#### (一) 血液樣品的收集

小鼠於特定時間採血，如圖3.1所示。分別對小鼠進行眼窩採血，首先將小鼠置於含有乙醚的容器中，待其昏迷後迅速以微量毛細管自眼窩靜脈竇採血，體積約為100  $\mu\text{L}$ ，於4°C靜置3 - 4小時後，以12000 rpm轉速離心20分鐘，收集血清，保存於-80°C待分析。

## (二) 血清特異性抗體IgE、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2a</sub>測定

### 【試劑】

1. coating buffer：0.1M NaHCO<sub>3</sub> (8.401 g) 溶於去離子水中，pH=8.2，定容到1L
2. OVA：溶於 coating buffer 中，濃度為10 µg/mL
3. Blocking buffer：1% BSA in PBS
4. Biotin-conjugated rat anti-mouse IgE、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2a</sub> monoclonal antibody：  
anti-mouse IgE (PharMingen D2112D)、anti-mouse IgG<sub>1</sub> (PharMingen D2002D)、  
anti-mouse IgG<sub>2a</sub> (PharMingen D2012D) 溶於blocking buffer中。
5. Avidin連結之過氧化酵素 (avidin-horseradish peroxidase conjugated, PIERCE 29994)，使用時稀釋3000倍
6. Citrate buffer：Citric acid monohydrate 13.134 g，Sodium citrate dehydrate 18.381g，分別溶於250 mL dH<sub>2</sub>O中，使濃度皆為0.25 M，以Sodium citrate dehydrate加入Citric acid monohydrate調整pH=4.2。
7. TMB：“NeA-Blue”(Tetramethylbenzidine substrate, Clinical Science Product Inc. 01016-1)，用於測定OVA特異性IgE抗體。

### 【方法】

於平底96孔盤(Nunc-Immuno plate) 中加入溶於coating buffer中的OVA 10 µg/mL，200 µL/well，置於4°C過夜。以PBST洗4次，洗去未結合的單株抗體，加入blocking buffer 200 µL/well 以減少非特異性的結合。室溫反應2小時後，以PBST洗5次，再加入已知濃度之標準品或適量稀釋的待測樣品，OVA特異性IgE於4°C反應過夜，OVA特異性IgG<sub>1</sub>或IgG<sub>2a</sub>於室溫反應2小時後，以PBST洗6次，加入連結生物素的抗細胞激素二級抗體100 µL/well，室溫反應2小時，以PBST洗7次，加入avidin-peroxidase 100 µL/well，反應2小時後，以PBST洗8次，最後與基質液TMB反應，待適當時間的作用呈色，測定吸光值620 nm。結果以ELISA unit表示。本次實驗中，以前人實驗中致敏小鼠的血清為正控制，OVA特異性IgE稀釋50



倍；OVA特異性IgG<sub>1</sub>稀釋160000倍、OVA特異性IgG<sub>2a</sub>稀釋8000倍。E.U.的計算方式如下：

$$\text{ELISA unit} = (\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{blank}}) / \text{OD}_{\text{PC}} - \text{OD}_{\text{blank}}。$$

### (三) 血清總IgE、IgG、IgA、IgM抗體含量測定

#### 【試劑】

1. Mouse IgE ELISA Quantitation Kit ( Bethyl, E90-115 )
2. Mouse IgG ELISA Quantitation Kit ( Bethyl, E90-131 )
3. Mouse IgA ELISA Quantitation Kit ( Bethyl, E90-103 )
4. Mouse IgM ELISA Quantitation Kit ( Bethyl, E90-101 )
5. Coating buffer：0.05 M carbonate-bicarbonate buffer。Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2.65 g 溶於dH<sub>2</sub>O中，pH=9.6，定容至500 mL。
6. TBST：0.05 % Tween 20 in 50 mM Tris，0.14 M NaCl。Tris-base 6.05 g，NaCl 8.19 g，溶於dH<sub>2</sub>O中，pH=8.0，定容至1 L。
7. Blocking buffer：1 % BSA in 50 mM in TBS。
8. Sample / standard diluent：同Blocking buffer。
9. TMB：“NeA-Blue”( Tetramethylbenzidine substrate, Clinical Science Product Inc. 01016-1 )。

#### 【方法】

於平底96-well plate中加入100 μL/well 濃度為10 μg/mL之affinity-purified antibody，室溫下反應1小時，以TBST洗4次；加入blocking solution 200 μL/well，室溫反應1小時，以TBST洗5次；加入標準品和經過適當稀釋之待測血清，100 μL/well室溫反應2小時，以TBST洗6次；加入HRP-conjugated affinity purified antibody 100 μL/well，室溫反應1小時，以TBST洗7次；最後加入基質液TMB 100 μL/well，避光反應，待適當時間呈色後測量620 nm吸光值。

#### (四)肺氣管沖洗液 (Bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 細胞之取得與處理

##### 【試劑與儀器】

1. 10% FBS/RPMI-1640 培養液
2. LiuA & Liu B : DELTA
3. 阿拉伯膠 : Canada Balsam, Hayashi 030-01215
4. Cytospin : Shandon, Cytospin 3

##### 【方法】

將小鼠犧牲後，剪開頸部的皮毛及肉，用鑷子將氣管外側肌肉撕開，使氣管露出，用蝴蝶剪將較靠近頭部之氣管上剪一個小洞，以靜脈置留管插入氣管，用細繩將軟管綁緊，取0.5 mL的滅菌PBS注入肺部沖洗再抽回，接著注入15 mL離心管中，重複注入並抽回共4次，抽取約2 mL BALF於15mL離心管，在4°C以1500 rpm離心7分鐘，取上清液，保存於-80°C冰箱，待分析細胞激素含量。下層細胞以HBSS 緩衝液沖洗二次後，以10 % FBS/RPMI培養液重新懸浮，利用trypan blue dye exclusion法染色，以細胞計數器計算所有白血球存活數目。調整細胞密度至 $5 \times 10^5$  cell/mL，取約100  $\mu$ L 細胞液，利用cytospin在500 rpm下離心2分鐘。取下載玻片風乾，以Liu A染劑染色30秒，沖去多餘染劑，風乾後再以LiuB染劑染色5秒，沖去多餘染劑，待玻片風乾後，以阿拉伯膠封片。觀察細胞時，以1000x油鏡，計數至少5個不同視野之細胞組成比例。

#### (五) 脾臟細胞之取得與培養

試劑與方法同第二章第二節中所述，三、脾臟細胞之取得與培養。裂殖素於動物實驗中略有不同，表示如下：

非特異性裂殖素：ConA 1.25  $\mu$ g/mL (concanavalin A, Sigma C-5275)

特異性裂殖素：OVA 400  $\mu$ g/mL

## (六) 脾臟細胞增生測定

### 【試劑與儀器】

1. 細胞培養液與細胞裂質素，同於上述實驗。
2.  $^3\text{H}$ -thymidine：Amersham, TRK-120 B376, 1  $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ ，使用前以 TCM medium 稀釋20倍。
3. Semiautomatic cell harvester：FILTERMATE 196, PACKARD
4. 玻璃纖維濾紙：Skatron, Filter Mat-11731, 102 x 256 mm
5. Direct Beta Counter：MATRIX 96, PACKARD

### 【方法】

將脾臟細胞的密度調整到  $2 \times 10^6$  cells/mL，於96 well plate中加入100  $\mu\text{L}$ 細胞液，再加入100  $\mu\text{L}$ 的TCM medium及各種裂殖素，放進37°C恆溫培養箱中培養48小時，取出加入20  $\mu\text{L}$  0.05 Ci/mL  $^3\text{H}$ -thymidine，再培養24小時，以細胞收集器收集細胞於玻璃纖維濾紙上，待其完全乾燥後，以Direct Beta Counter測定 $^3\text{H}$ -thymidine被細胞攝入的量，由此可得到細胞增生的數目。結果以S.I. (Stimulation index) 表示。

$$\text{S.I.} = (\text{S}_{\text{cpm}} - \text{B}_{\text{cpm}}) / (\text{C}_{\text{cpm}} - \text{B}_{\text{cpm}})$$

$\text{S}_{\text{cpm}}$ ：細胞在刺激物刺激下增生所攝入的 $^3\text{H}$ -thymidine的 $\beta$ 射線強度

$\text{B}_{\text{cpm}}$ ：不加任何細胞及刺激物，僅含有TCM medium所測得的 $\beta$ 射線強度

$\text{C}_{\text{cpm}}$ ：只加入細胞，但無刺激物存在所測得的 $\beta$ 射線強度

## (七) 腹腔細胞之取得與培養

### 【試劑】

試劑同第二章第二節中所述，三、腹腔細胞之取得與培養。裂殖素：LPS 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (lipopolysaccharide, Sigma L-2654)

## 【方法】

以二氧化碳窒息法犧牲小鼠。在小鼠體表噴灑75%酒精後，剪開腹腔外側皮毛，用手撕開，使腹膜整個露出，以鑷子輕挑腹膜，用針筒緩緩注入3 mL HBSS buffer，晃動鼠體後，將液體吸出，重複3次，共得到9 mL 細胞懸浮液。將此細胞懸浮液以1500 rpm離心10分鐘後，到掉上清液，以HBSS緩衝液洗3次，再加入1 mL TCM/RPMI使細胞均勻懸浮。計算細胞總數。並調整細胞數目至 $3 \times 10^6$  cells/mL。取適量的腹腔細胞注入48 well plate中，並加入等量的培養液或含裂殖素之培養液，使細胞最終濃度為 $1.5 \times 10^6$  cells/mL。置於恆溫培養箱中，5%CO<sub>2</sub>，37°C培養48小時，收取上清液，保存於-80°C。

## (八) 細胞激素含量測定

### (1) BD Pharmingen 系統

試劑與方法同第二章第二節 (三) 細胞激素含量測定。

### (2) R&D系統

#### 【試劑】

1. ELISA kit (R&D系統：IL-13、IL-1 $\beta$ 、IL-10、TNF $\alpha$ 、eotaxin)
2. 1<sup>o</sup>Ab：Rat anti-mouse IL-13、IL-1 $\beta$ 、IL-10、TNF $\alpha$ 、eotaxin 抗體，溶於 coating buffer 中
3. 2<sup>o</sup>Ab：Biotinylated rat anti-mouse IL-13、IL-1 $\beta$ 、IL-10、TNF $\alpha$ 、eotaxin 抗體，溶於blocking buffer中

### (3) eBioscience 系統

#### 【試劑】

1. Capture Antibody (1<sup>o</sup>Ab)：

Purified anti-human/mouse TGF $\beta$ 1 (Cat. # 14-9943-68)

Purified anti-mouse IL-17A (Cat. # 14-7175-68)

2. Detection Antibody (2<sup>o</sup>Ab) :

Biotin-conjugated anti-human/mouse TGFβ1 (Cat. # 33-9923-68)

Biotin-conjugated anti-mouse IL-17A (Cat. # 33-7177-68)

3. 1N HCl : 取10N HCl (Katayama Chemical) 10 mL , 加二次水至100 mL

4. 1N NaOH : NaOH (nacalai tesque) 2.4 g 溶於二次水中 , 定容至100 mL

**【方法】**

同第二章

註：測量 TGFβ1時，樣品須先與20 μL的1N HCl 均勻混合，作用10分鐘後，再以1N NaOH 20 μL中和即可。

(4)PGE<sub>2</sub>分析

**【原理】**

PGE<sub>2</sub>生成量的測定原理為competitive immunoassay，即PGE<sub>2</sub>與已知濃度的alkaline phosphatase PGE<sub>2</sub> conjugate競爭有限的PGE<sub>2</sub>單株抗體。

**【試劑】**

Correlate-EIA prostaglandin E<sub>2</sub> kit ( Assay Design 90001, MI, USA )

**【方法】**

於plate中加入適當稀釋的樣品，室溫反應2小時，此時PGE<sub>2</sub>與連結在plate底部的goat anti-mouse IgG Fc antibody結合；洗去未結合的物質後，加入基質p-Npp (p-nitrophenyl phosphate) 進行呈色，1小時後讀取405 nm吸光值，由標準品的吸光值換算樣品中PGE<sub>2</sub>的含量。



### (九) Real-time PCR 法分析分析肺組織相關基因

#### (1) 總RNA 之抽取

##### 【試劑】

1. DEPC-H<sub>2</sub>O：取3 mL diethyl pyrocarbonate (Sigma) 溶於3 L二次水中，混合攪拌隔夜，滅菌後分裝。
2. TRIZOL Reagent：GIBCO (Cat.NO. 15596-018)
3. DEPC-H<sub>2</sub>O saturated phenol：AMRESCO (Cat.NO. 0981)
4. 3M sodium acetate (pH 5.2)：取81.62 g CH<sub>3</sub>COONa·3H<sub>2</sub>O 溶於160 mL二次水，以冰醋酸調至pH 5.2 後定容至200 mL，再加入0.1% DEPC混合攪拌過夜，滅菌後使用。

##### 【方法】

取下右肺加入1 mL之TRIZOL Reagent (Invitrogen)，以均質機於冰上磨碎均質。將均質液移至1.5 mL微量離心管，室溫靜置5分鐘，於4°C以12,000 rpm 離心20分鐘，取粉紅層至新1.5 mL離心管後，加入0.2 mL chloroform (Merck)。震盪均勻後，室溫靜置2-3 分鐘使其自然分層，於4°C以12,000 rpm 離心15分鐘。離心後小心吸取上層無色水層至新的微量離心管中。加入0.5 mL isopropanol (Merck)混勻，於4°C靜置1小時，再以12,000 rpm 離心20分鐘，去除上清液。沉澱之pellet 加入0.4 mL DEPC-H<sub>2</sub>O，劇烈震盪至RNA pellet 溶解，再加入等體積之 DEPC-H<sub>2</sub>O saturated phenol (Amreso 0981)，劇烈震盪30秒，於4°C以12,000 rpm 離心5分鐘。取上層水層加入0.4 mL chloroform，劇烈震盪30秒後，於4°C以12,000 rpm 離心20分鐘。吸取上清液定體積，加入0.1倍體積之3 M sodium acetate (pH 5.2)與兩倍體積之絕對酒精，混勻置於-20°C進行RNA 沉澱1小時 (可沉澱過夜增加產率)，於4°C以12,000 rpm 離心20分鐘。倒去上清液，以70%酒精清洗RNA pellet 兩次，於室溫下晾乾，再以20 µL之DEPC-H<sub>2</sub>O回溶。取少量RNA 溶液稀釋100倍後，測260nm/280nm 吸光值計算RNA濃度。

公式：260nm 吸光值1 unit = 40  $\mu\text{g}$  RNA/mL。

## (2) 總RNA反轉錄成cDNA

### 【試劑】

反轉錄試劑套組 (High Capacity cDNA Archive Kit, P/N: 4368814, Applied Biosystems, USA)

### 【方法】

將RNA溶液以DEPC水稀釋為0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，取10  $\mu\text{L}$  RNA溶液，加入10X RT buffer、25X dNTP mixture、10X RT Random Primer、無菌水及RTase，其體積依序為2  $\mu\text{L}$ 、0.8  $\mu\text{L}$ 、2  $\mu\text{L}$ 、4.2  $\mu\text{L}$ 及1  $\mu\text{L}$ ，總體積為10  $\mu\text{L}$ ，將此混合物進行反轉錄，條件為於25°C 10分鐘，37°C反應120分鐘，85°C 5秒鐘，最後冷卻至4°C。cDNA儲存於-20°C。

## 3.Real-time PCR 分析

### 【試劑】

1. Taqman Universal PCR Master Mix (Part No. Koo861, Applied Biosystems, USA)
2. *ppar- $\alpha$*  probe (Mm00627559\_m1, Applied Biosystems)
3. *ppar- $\gamma$*  probe (Mm01184322\_m1, Applied Biosystems)
4. *il-12p35* probe (Mm00434169\_m1, Applied Biosystems)
5. *cox-2* probe (Mm01307329\_m1, Applied Biosystems)
6. *gapdh* probe (Mm99999915\_g1, Applied Biosystems)

### 【方法】

採用市售Taqman Universal PCR Master Mix 試劑分析，並以GAPDH 作為internal control。將cDNA 以無菌水稀釋至10 ng/mL，取10  $\mu\text{L}$  cDNA，加入12.5  $\mu\text{L}$  Tagman Universal PCR Master Mix，1.25  $\mu\text{L}$  Probe/Primer Mixture 與1.25  $\mu\text{L}$  無菌水，總體積為25  $\mu\text{L}$ 。注入ABI PRISM Optical Strip，再蓋上MicroAmp Optical Cap。離心去除氣泡後即可上機 (ABI PRISM 7000 Sequence Detection) 進行定量

分析。上機條件為50°C 2 分鐘 (Stage 1)，95°C 10 分鐘 (Stage 2)，95°C 15 秒鐘 (Stage 3)，60°C 1 分鐘 (Stage 4)，再回到Stage3，重複40個cycle。

#### 【計算】

Ct 值(Threshold Cycle)：C 代表Cycle，T 代表threshold (閾值)，Ct 值是每個反應管內的螢光信號到達設定的閾值時所經過的PCR 循環數。因此當Ct值小表示cDNA量多基因表現量多。PCR產物與起始放入的cDNA 量成正比，Ct 值與input cDNA 濃度之對數值成反比，當input cDNA 量固定，產物量與 $2^n$  成正比。

Step 1. Ct (Target gene) - Ct (internal control) =  $\Delta$ Ct

Step 2.  $\Delta$ Ct (Sample) -  $\Delta$ Ct (mean of control) =  $\Delta\Delta$ Ct

Step 3. 基因表現量以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示

#### (十) 吞噬細胞活性測定

##### 【原理】

本實驗採用PHAGOTEST Kit (ORPEGEN, Pharma, F.R.G.)，其中含有 fluorescein (FITC) 標記的opsonized bacteria (*E. coli*-FITC)；一個單核球或顆粒細胞會因活性的不同而吞噬入一個或多個*E. coli*-FITC，藉由螢光強度的偵測便可以量測出血液中有表現吞噬活性的細胞百分比。

##### 【試劑】

BD Vascutainer Sodium Heparin 採血管。

PHAGO-TEST kit (ORPEGEN, Pharmingen, F. R. G.)

##### 【方法】

各取50 mL的均勻血樣置於0°C (control) 和37°C (test) 的試管中，冰浴30分鐘後，加入混勻的*E. coli*-FITC 10 mL，震盪均勻；control管置於冰浴中，test管於37°C水浴中反應30分鐘後移至冰浴中。加入混勻的quenching solution 50 mL，震盪均勻後再加入1.5 mL的washing solution，以250 g離心10分鐘後倒掉上清，重複此



方法共洗2次；加入1 mL的lysing solution，均勻震盪後靜置於室溫下20分鐘，以250 g離心10分鐘後倒掉上清，再如上述方法洗1次。最後加入100  $\mu$ L的DNA staining solution，均勻震盪，置於冰浴中避光反應10分鐘；60分鐘內以Flow cytometer進行分析。

### (十一) 自然殺手細胞活性分析

#### 【原理】

本實驗採用LIVE/DEAD Cell-Mediated Cytotoxicity Kit，為一使用兩種顏色螢光的分析方法。以綠色的3, 3'- dioctadecyloxacarbocyanine (DiOC18) 染目標細胞 (target cells)，將目標細胞和作用細胞 (effector cell) 共同培養之後，再以紅色的propidium iodide (PI) 染色。死掉的目標細胞膜上會染有綠色螢光，細胞核會染上紅色；作用細胞則只有細胞核有染上紅色。因此藉由螢光的偵測便可以分析出有多少的目標細胞被killing，計算後可得自然殺手的細胞活性。本實驗使用的目標細胞為YAC-1細胞株，作用細胞是使用犧牲時取得的腹腔細胞。

#### 【試劑】

1. LIVE/DEAD Cell-Mediated Cytotoxicity Kit (Molecular Probes, Inc., L-7010)
2. YAC-1細胞株 (ATCC No. TIB-160)
3. Flow cytometry (Becton Dickinson)

#### 【方法】

將已培養好的目標細胞YAC-1細胞株與DiOC18 (10 mL/ $1 \times 10^6$  cells/mL) 反應2小時後以HBSS buffer洗2次；於實驗試管中加入 $1 \times 10^4$  target cells/10 mL medium，再加入 $1 \times 10^6$  effector cells/130 mL medium (E/T ratio 100)，最後加入130 mL的PI solution (20 mL stock/1 mL RPMI medium) 一起培養2小時。均勻震盪以Flow cytometer進行分析。

### (十二) 肺部組織切片

肺沖洗液收集完後，取下左肺的二分之一浸泡於含有10% formalin的PBS溶液中，再以石蠟包埋法將肺臟組織包埋，以冷凍切片法製成5  $\mu\text{m}$ 厚度之肺組織切片，並以hematoxylin-eosin (H&E) 進行染色，觀察各組別對氣管周遭免疫細胞聚集之影響。

### (十三) 統計方法

實驗結果以Mean  $\pm$  SD或Mean  $\pm$  SEM表示，各組數據以Student's *t*-test分析，若 $p < 0.05$ 表示有顯著差異，\*  $p < 0.05$ ，\*\*  $p < 0.01$ ，#  $0.05 \leq p < 0.1$ 。



## 第三節 結果

### 一、生長情形與攝食狀況

BALB/c小鼠隔週共三次致敏，距離最後一次致敏兩星期之後，依血清OVA特異性IgE含量與體重分組後，即開始餵食不同飲食16天。小鼠餵食前體重與犧牲時各組之間體重皆無顯著差異（表3.2），顯示餵食BGP、CLN或CLA不會影響小鼠的生長。在攝食量方面，各組每天的攝食量是沒有差異的。

### 二、器官重量與相對重量

餵食BGP、CLN或CLA對小鼠器官重量與相對重量結果如表3.3。小鼠在餵食山苦瓜16天後，心臟的絕對重量與相對重量顯著的低於OVA-oil組，而肝臟絕對重量有較低的趨勢（ $p=0.08$ ）；相對重量則顯著較低。OVA-CLN組與控制組相比皆無顯著差異，餵食CLA小鼠脾臟相對重量有較低的趨勢（ $p=0.08$ ）。固醇類藥物OVA-Pred組肺臟比控制組OVA-oil有較小的趨勢（ $p=0.06$ ），並且肝臟絕對重量有較輕的趨勢；相對重量顯著較低。PBS-oil組肺臟絕對重量與相對重量都比致敏組顯著較低。

### 三、呼吸道過度反應 (AHR)

餵食試驗樣品13天對致敏小鼠呼吸道阻力的影響，如圖3.2所示，隨著Mch刺激濃度增加，作為負對照的未致敏PBS-oil組只緩慢增加，呼吸阻力Pehn值最低且顯著的比OVA-oil組低，顯示致敏的操作的確有增加呼吸道阻力。與OVA-oil組相比，給予藥物Predisolone可顯著降低12.5 mg/mL Mch濃度以上引起的AHR，餵食山苦瓜與CLN同樣在12.5 mg/mL Mch 濃度以上刺激下，明顯降低過敏氣喘小鼠的AHR，效果與藥物處理組 (OVA-Pred) 相同。OVA-CLA組則在25、50 mg/mL

Mch刺激時，與OVA-oil組相比顯著的降低呼吸道阻力。顯示餵食BGP、CLN與CLA 13天後，能顯著減緩呼吸道過度反應的現象。

#### 四、肺氣管沖洗液 (BALF) 中各項指標變化

對於肺氣管沖洗液中細胞激素的影響，如表3.4所示。未致敏PBS-oil組小鼠的IL-4、IL-5與IL-10含量都顯著最低；IL-17則顯著的較高。餵食BGP可顯著降低BALF中IL-4、IL-5、IL-13與IL-10含量，OVA-CLN組BALF中細胞激素IL-5的含量顯著低，也趨勢的降低IL-4的含量。與OVA-oil組相比，OVA-CLA則在細胞激素含量上沒有顯著的差異，OVA-Pred組有顯著低的IL-10含量。顯示餵食山苦瓜與CLN可以降低呼吸道中Th2細胞激素的含量。

餵食BGP、CLN與CLA對肺氣管沖洗液中發炎介質含量的影響如表3.4。PBS-oil組小鼠的IL-6、IL-1 $\beta$ 、eotaxin、TGF- $\beta$ 與PGE<sub>2</sub>含量都顯著最低；OVA-Pred組有顯著較低的IL-6與TGF- $\beta$ 含量，且有趨勢較低的IL-1 $\beta$  ( $p=0.08$ )。與OVA-oil組小鼠相比，餵食BGP顯著降低IL-6、eotaxin、TGF- $\beta$ 與PGE<sub>2</sub>含量，也有降低TNF- $\alpha$ 與IL-1 $\beta$ 含量的趨勢；餵食CLN小鼠在發炎介質含量都有較OVA-oil組低，但並未達統計差異。OVA-CLA組與控制組比則無差異。由以上結果顯示，餵食山苦瓜可降低呼吸道發炎介質的含量。

#### 五、肺氣管沖洗液中各種類細胞數目

飲食處理對肺氣管沖洗液各種細胞數目的影響，結果如圖3.3所示。PBS-oil組在總細胞數、嗜伊紅性白血球、嗜鹼性白血球、嗜中性白血球、巨噬細胞與淋巴球等細胞數目都顯著的最低，OVA-Pred組小鼠的總細胞數與各種類細胞數，也均顯著低於OVA-oil組，顯示此藥物可抑制免疫細胞的數目或聚集。餵食BGP顯著降低肺沖洗液中總細胞數、嗜伊紅性白血球、嗜鹼性白血球、嗜中性白血球與淋巴球的數目，OVA-CLN組有顯著較少的嗜伊紅性白血球聚集，而餵食CLA則

在總細胞與各種細胞數目皆無顯著差異。此結果顯示，餵食BGP與CLN可改善肺部細胞聚集的情形，尤其可降低造成過敏性呼吸道發炎反應的嗜伊紅性球聚集。

## 六、肺組織形態與mRNA基因表現

飲食處理對肺組織細胞浸潤的影響，如圖3-4所示，致敏的處理使氣管壁有增厚的現象，且周圍有許多發炎性細胞浸潤的情況。餵食BGP與CLN可觀察到細胞聚集的較少，氣管壁也較無增厚。補充CLA在氣管增厚情形與OVA-oil無法觀察到差異，但氣管周圍有較少的細胞聚集。固醇類藥物亦可明顯的看到細胞聚集的較少，氣管壁也較無增厚的現象。

飲食處理對肺組織PPAR- $\alpha$ 、PPAR- $\gamma$ 、IL-12p35和COX-2基因表現量，如圖3.5所示。與OVA-oil組相比，PBS-oil組有顯著高的PPAR- $\alpha$ 、PPAR- $\gamma$ 與IL-12p35基因表現量。顯示致敏引起過敏免疫傾向會使得肺組織中PPAR- $\alpha$ 、PPAR- $\gamma$ 與IL-12p35基因表現量下降，而在餵食山苦瓜小鼠可以顯著的提升PPAR- $\alpha$ 表現量，並降低肺組織COX-2基因表現量。

OVA-CLN組則可以顯著增加PPAR- $\gamma$ 的基因表現量，而給予CLA可以顯著的提升小鼠PPAR- $\alpha$ 及IL-12p35基因表現量的。給予固醇類藥物也可以顯著的回復PPAR- $\alpha$ 基因表現量，並降低肺組織COX-2基因表現量。

## 七、脾臟細胞的細胞激素分泌量

餵食BGP、CLN與CLA的OVA致敏小鼠脾臟細胞以OVA做特異性刺激，結果如表3.5。與OVA-oil組相比，PBS-oil組脾臟細胞分泌的IL-2顯著較低，IL-5、IL-13與IL-10的分泌也顯著較低，表示未經致敏操作的小鼠分泌這些細胞激素能力較低，而致敏小鼠的全身性免疫反應傾向於Th2免疫反應。

然而，餵食BGP可以顯著的降低脾臟細胞分泌IL-13能力，但也顯著的減少TGF- $\beta$ 分泌，分泌IL-10也有較少的趨勢 ( $p=0.05$ )；OVA-Pred組則有降低IL-5與

IL-13分泌的趨勢 ( $p=0.09$ ;  $p=0.06$ )。餵食CLN與CLA的脾臟細胞在此特異性刺激下，細胞激素的分泌皆無顯著差異。

以非特異性ConA刺激下細胞激素分泌量如表3.6。致敏後的OVA-oil組比PBS-oil組有降低分泌IL-2的趨勢 ( $p=0.07$ )，並顯著增加IL-5的分泌，但分泌IL-17的能力卻反而顯著降低，給予藥物的OVA-Pred組則有降低IL-5分泌的趨勢 ( $p=0.09$ )。

OVA-BGP組可以較OVA-oil組顯著分泌較多的IFN- $\gamma$ ，餵食CLN組的脾臟細胞在非特異性刺激下的IL-13分泌有較少的趨勢( $p=0.07$ )，OVA-CLA組則是顯著減少分泌IL-13。由結果顯示，餵食山苦瓜能調節免疫傾向Th1免疫反應，並降低Th2的細胞激素分泌，而給予CLN或CLA可以降低Th2的免疫反應。

#### 八、脾臟細胞增生反應

各處理對脾臟細胞增生反應的影響如圖3.6。在與未致敏的PBS-oil組相比，OVA-oil組的確有顯著較高的特異性OVA增生能力，OVA-BGP組的脾臟細胞在PHA刺激下有顯著高的增生能力；LPS刺激下則有趨勢的上升，顯示可促進非特異性免疫細胞增生能力。

餵食CLN不論在特異性裂殖素 (OVA) 或非特異性裂殖素 (PHA與LPS) 刺激下，對脾臟細胞增生能力皆顯著增加。而OVA-CLA組則是在PHA刺激下，可以顯著的提高細胞增生的能力，OVA-Pred組小鼠在OVA或PHA刺激下脾臟增生能力顯著的高，LPS刺激下有趨勢較高的增生能力。

#### 九、血清中OVA特異性IgE、IgG<sub>1</sub>與IgG<sub>2a</sub> 抗體含量

IgG<sub>2a</sub>為傾向Th1免疫反應的抗體，IgE與IgG<sub>1</sub>為傾向Th2免疫反應。餵食BGP、CLN與CLA對OVA致敏小鼠血清中特異性抗體生成量，如圖3.7所示。未致敏的PBS-oil組的OVA特異性IgE、IgG<sub>1</sub>和IgG<sub>2a</sub>都顯著最低，表示本實驗的致敏成

功地誘發了OVA特異性抗體。在OVA-IgE的部份各飲食處理組皆無顯著差異，餵食BGP有降低血清中IgG<sub>1</sub>的趨勢 ( $p=0.07$ )，而OVA-CLA組有較高的IgG<sub>2a</sub>的趨勢 ( $p=0.05$ )，OVA-CLN與OVA-Pred組的特異性抗體含量和控制組都無顯著的差異。

#### 十、血清中總 IgE、IgG、IgA與IgM抗體含量

餵食BGP、CLN與CLA對OVA致敏小鼠血清中總IgE、IgG、IgA與IgM抗體生成量的結果如圖3.8。致敏的OVA-oil組與PBS-oil組相比，血清總IgE抗體顯著較高而總IgG與總IgA含量顯著較低。餵食BGP與CLA都可顯著的降低血清總IgE抗體含量，並增加總IgG抗體的含量。顯示餵食山苦瓜與CLA可以降低過敏性抗體IgE的生成，減少抗原所引起的過敏免疫反應。

#### 十一、腹腔細胞細胞激素分泌量

各種不同餵食對小鼠腹腔細胞細胞激素分泌量的影響如表3.7。不論是餵食BGP、CLN或CLA對腹腔細胞在LPS刺激下，IL-6、TNF $\alpha$ 與IL-1 $\beta$  的分泌量皆無顯著影響。

#### 十二、循環血液中吞噬細胞之吞噬能力

餵食BGP、CLN或CLA對OVA致敏小鼠循環血液中吞噬細胞的吞噬能力影響如表3.8，致敏與飲食處理對吞噬活性 (phagocytotic activity) 皆無顯著影響。OVA-oil組與PBS-oil組相比，血液中的吞噬細胞比例顯著較低，餵食BGP、CLN或給予藥物Pred.皆會增加循環血液中顆粒性白血球的比例 (granulocyte %)。因此，給予山苦瓜與CLN可能有助於促進自然免疫力。

### 十三、脾臟中自然殺手細胞活性

餵食BGP、CLN或CLA對OVA致敏小鼠脾臟中自然殺手細胞活性的影響，如表3.9所示，不論是餵食BGP、CLN或CLA其自然殺手細胞活性皆有較OVA-oil高，但並無統計上顯著差異。





表3.2 餵食山苦瓜、CLN與CLA對OVA致敏小鼠生長情形與攝食的影響

Table3.2 The effects of BGP, CLN and CLA on growth and feeding of OVA-sensitized mice

	n	初體重	終體重	飼料攝取
		(g)	(g)	(g/day)
		14週齡	16週齡	
OVA-oil	9	21.7 ± 2.15	21.6 ± 1.97	2.96 ± 0.42
OVA-BGP	9	22.2 ± 2.26	21.3 ± 1.65	2.81 ± 0.30
OVA-CLN	7	22.7 ± 1.30	22.0 ± 1.52	2.99 ± 0.31
OVA-CLA	9	22.7 ± 1.44	22.5 ± 1.20	3.05 ± 0.52
OVA-Pred	6	22.3 ± 2.27	21.2 ± 1.79	2.98 ± 0.42
PBS-oil	6	22.1 ± 1.44	21.5 ± 2.12	2.96 ± 0.35

1. Each values represent mean ± SD

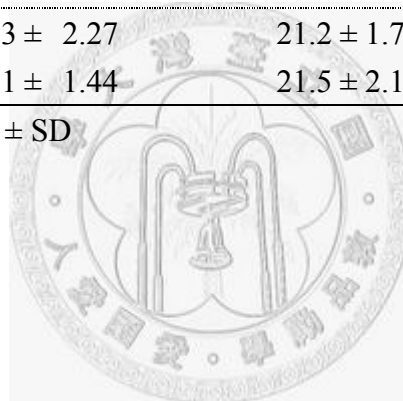


表3.3 餵食BGP、CLN與CLA對OVA致敏小鼠組織器官重量與相對組織器官重量的影響

Table 3.3 The effect of BGP, CLN and CLA on organ weight and relative organ weight of OVA sensitized mice

		肺臟	心臟	肝臟	腎臟	脾臟
	n	絕對重量(g)				
OVA-oil	9	0.46 ± 0.06	0.13 ± 0.02	1.26 ± 0.13	0.29 ± 0.02	0.090 ± 0.014
OVA-BGP	9	0.45 ± 0.07	0.11 ± 0.01*	1.14 ± 0.15 <sup>#</sup>	0.28 ± 0.03	0.082 ± 0.015
OVA-CLN	7	0.48 ± 0.08	0.12 ± 0.02	1.28 ± 0.15	0.29 ± 0.01	0.080 ± 0.026
OVA-CLA	9	0.46 ± 0.07	0.12 ± 0.01	1.28 ± 0.10	0.30 ± 0.02	0.082 ± 0.014
OVA-Pred	6	0.41 ± 0.05	0.13 ± 0.03	1.10 ± 0.14 <sup>#</sup>	0.28 ± 0.03	0.083 ± 0.033
PBS-oil	6	0.30 ± 0.05**	0.16 ± 0.09	1.30 ± 0.22	0.28 ± 0.03	0.082 ± 0.018
	n	相對重量(%)				
OVA-oil	9	2.12 ± 0.26	0.58 ± 0.10	5.85 ± 0.33	1.35 ± 0.11	0.42 ± 0.05
OVA-BGP	9	2.10 ± 0.24	0.50 ± 0.05*	5.34 ± 0.50*	1.30 ± 0.12	0.38 ± 0.05
OVA-CLN	7	2.21 ± 0.46	0.56 ± 0.06	5.80 ± 0.38	1.30 ± 0.05	0.37 ± 0.12
OVA-CLA	9	2.07 ± 0.29	0.56 ± 0.04	5.71 ± 0.57	1.35 ± 0.11	0.37 ± 0.06 <sup>#</sup>
OVA-Pred	6	1.92 ± 0.13 <sup>#</sup>	0.60 ± 0.11	5.20 ± 0.38**	0.33 ± 0.12	0.40 ± 0.19
PBS-oil	6	1.39 ± 0.30**	0.56 ± 0.11	6.00 ± 0.77	1.28 ± 0.08	0.38 ± 0.07

1. Each values represent mean ± SD.

2. \*  $p < 0.05$  ; \*\*  $p < 0.01$  ; <sup>#</sup>  $0.05 \leq p < 0.1$  compared with the OVA-oil group by Student's *t*-test.

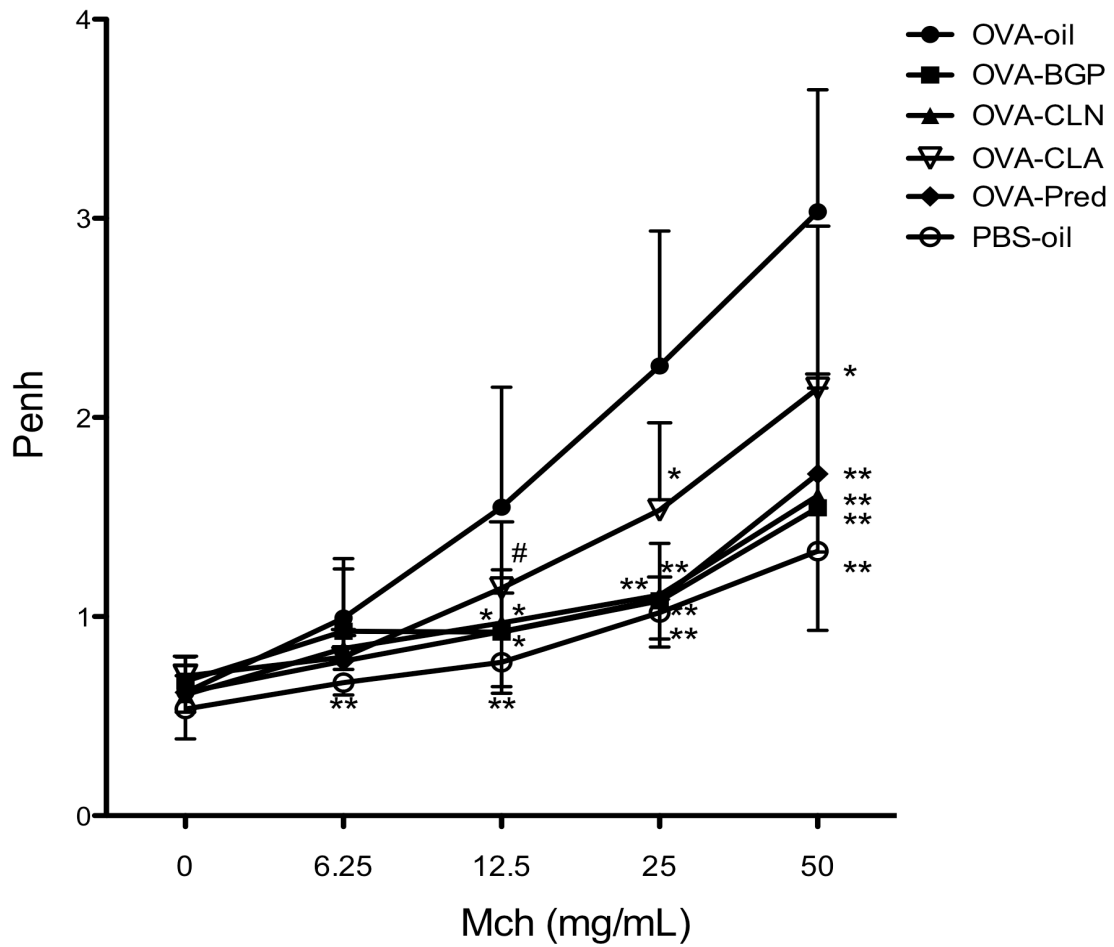


圖 3.2 餵食BGP、CLN與CLA對OVA致敏小鼠呼吸道過度反應的影響

Figure 3.2 The effect of BGP, CLN and CLA on airway hyperresponsiveness (AHR) of OVA-sensitized mice. Value represented as mean  $\pm$  SD, n=7 for OVA-oil, OVA-BGP, OVA-BGP, n=8 for OVA-CLA, n=5 for OVA-Pred, PBS-oil. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; #  $0.05 \leq p < 0.1$  compared with the OVA-oil group by Student's *t*-test.

表3.4 餵食BGP、CLN與CLA對OVA致敏小鼠BALF中細胞激素與化學趨化激素的影響

Table 3.4 The effect of BGP, CLN and CLA on the content of cytokine and chemokine in BALF of OVA-sensitized mice.

	n	IL-4 (pg/mL)	IL-5 (pg/mL)	IL-13 (pg/mL)	IL-17 (pg/mL)
OVA-oil	9	74.2 ± 28.7	744 ± 444	348 ± 122	6.9 ± 2.77
OVA-BGP	9	36.0 ± 29.1*	230 ± 155**	196 ± 85**	6.1 ± 5.28
OVA-CLN	7	39.1 ± 33.9 <sup>#</sup>	326 ± 183*	254 ± 75	5.1 ± 3.25
OVA-CLA	9	87.3 ± 68.9	651 ± 429	270 ± 104	8.5 ± 5.82
OVA-Pred	6	62.9 ± 64.8	556 ± 361	345 ± 82	10.5 ± 6.12
PBS-oil	6	5.5 ± 8.6**	1 ± 2**	537 ± 284	19.6 ± 5.11**

	n	IL-6 (pg/mL)	TNF-α (pg/mL)	IL-1β (pg/mL)	Eotaxin (pg/mL)
OVA-oil	9	34.4 ± 35.2	72.5 ± 12.4	27.9 ± 15.6	28.5 ± 6.8
OVA-BGP	9	5.8 ± 17.4*	48.8 ± 30.8 <sup>#</sup>	15.3 ± 13.2 <sup>#</sup>	19.8 ± 7.4*
OVA-CLN	7	12.2 ± 27.8	64.5 ± 29.3	21.0 ± 9.5	27.3 ± 8.5
OVA-CLA	9	32.5 ± 42.6	61.7 ± 39.6	24.6 ± 15.4	27.0 ± 11.8
OVA-Pred	6	7.2 ± 9.4*	67.3 ± 19.4	14.3 ± 11.7 <sup>#</sup>	22.3 ± 7.5
PBS-oil	6	0.0 ± 0.0**	94.9 ± 65.3	12.7 ± 5.2*	10.4 ± 2.6**

	n	PGE <sub>2</sub> (ng/mL)	TGF-β (ng/mL)	IL-10 (pg/mL)
OVA-oil	9	34.6 ± 27.1	1.19 ± 0.50	95.6 ± 26.3
OVA-BGP	9	12.4 ± 9.0*	0.73 ± 0.27*	59.5 ± 27.8*
OVA-CLN	7	17.2 ± 16.1	0.85 ± 0.50	80.6 ± 33.2
OVA-CLA	9	45.0 ± 43.4	1.30 ± 0.64	84.4 ± 31.4
OVA-Pred	6	16.8 ± 17.2*	0.70 ± 0.25*	65.3 ± 19.3*
PBS-oil	6	1.2 ± 0.3**	0.11 ± 0.07**	55.9 ± 8.4**

1. Each values represent mean ± SD.

2. \*  $p < 0.05$  ; \*\*  $p < 0.01$  ; <sup>#</sup> $0.05 \leq p < 0.1$  compared with the OVA-oil group by Student's *t*-test.

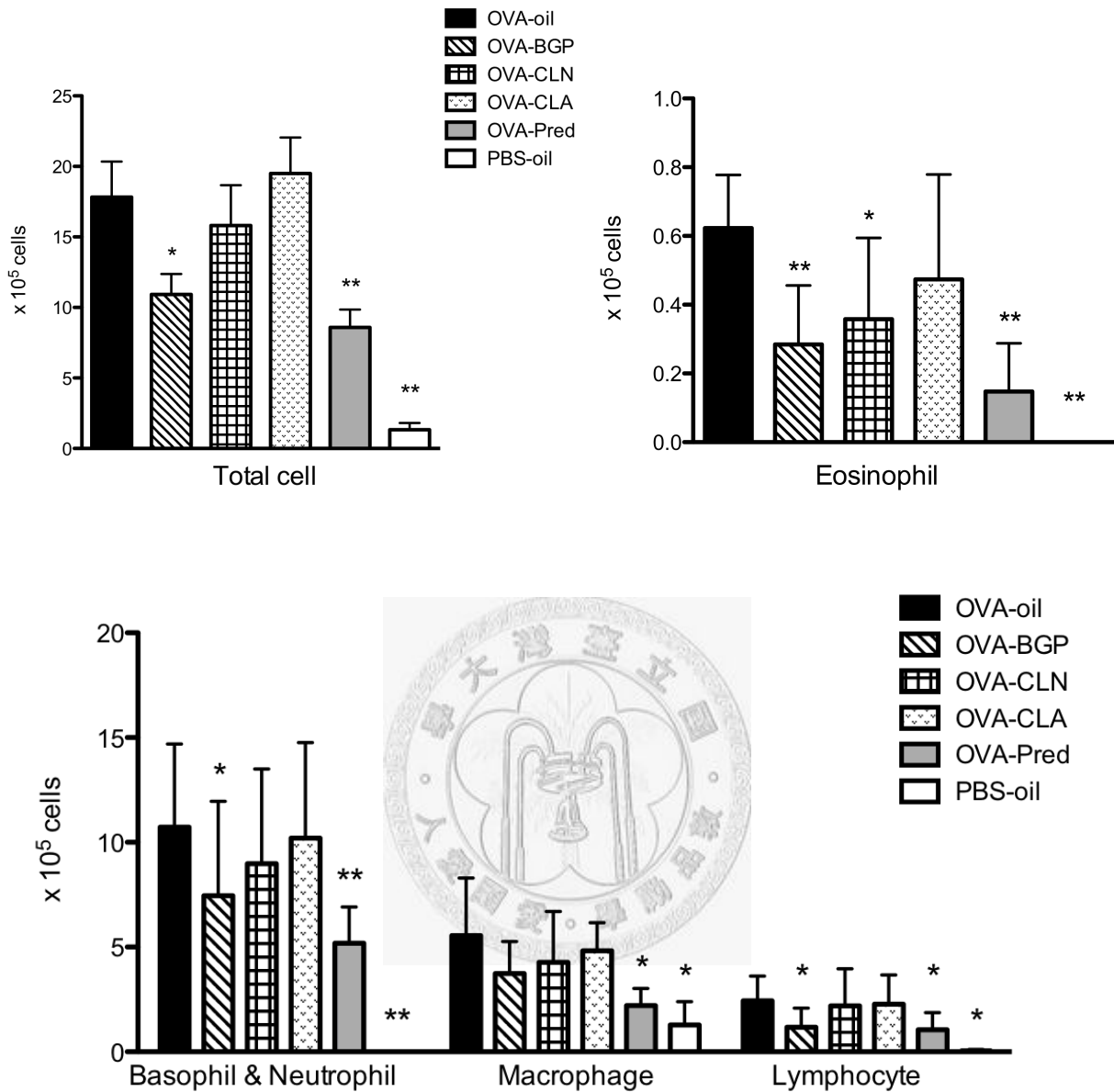


圖3.3 餵食BGP、CLN與CLA對OVA致敏小鼠BALF中各種類細胞數目的影響  
 Figure 3.3 The effect of BGP, CLN and CLA on cell number of different cell type of OVA-sensitized mice. Value represent mean  $\pm$  SD, n=9 for OVA-oil, OVA-BGP, OVA-CLA, n=7 for OVA-CLN, n=6 for OVA-Pred, PBS-oil. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  compared with the OVA-oil group by Student's *t*-test.

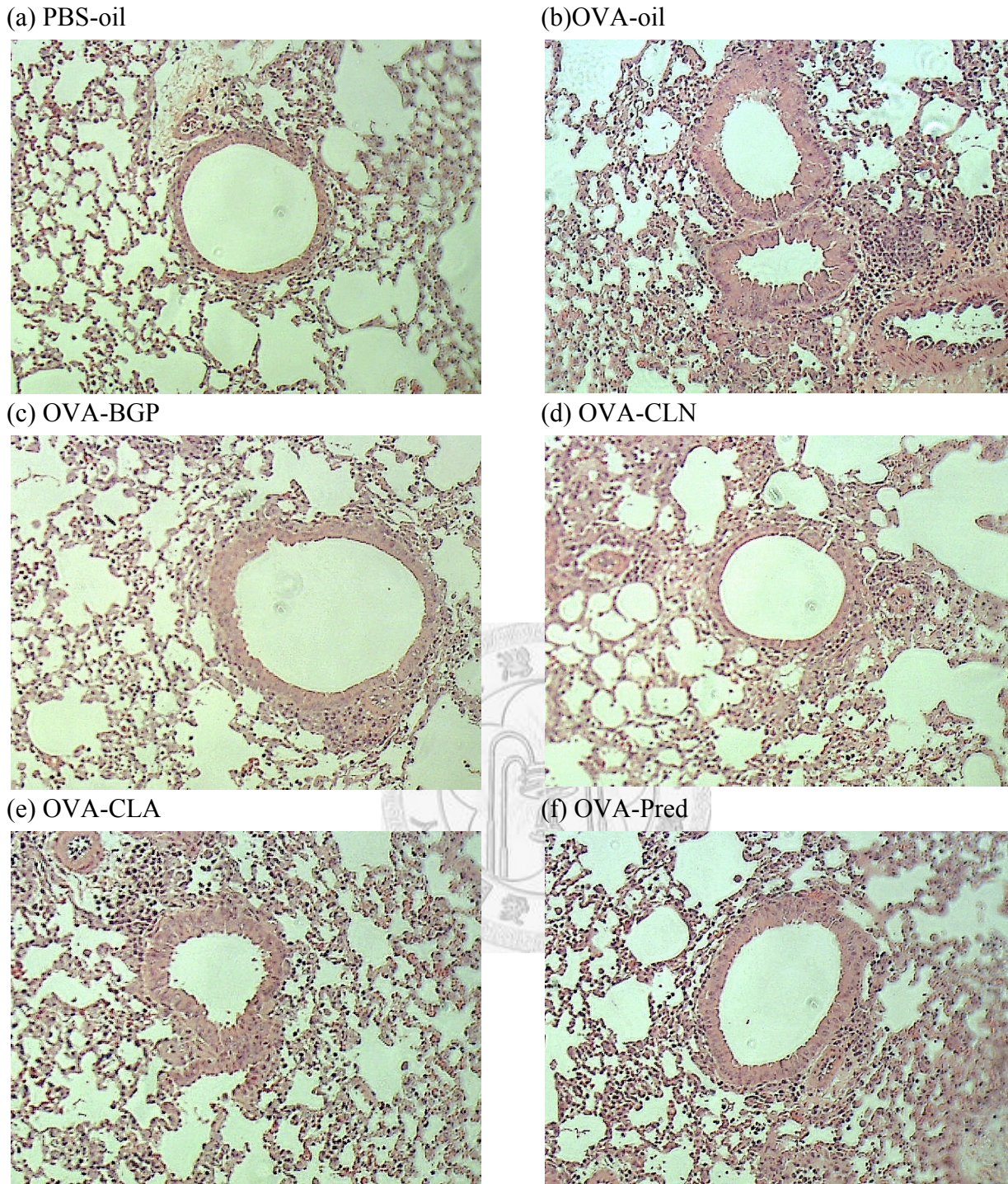


圖3.4 餵食BGP、CLN與CLA的OVA致敏小鼠肺切片圖

Figure 3.4 Histological studies of the lungs of PBS-oil, OVA-oil, OVA-BGP, OVA-CLN, OVA-CLA and OVA-Pred. Microscopic images were made with electronic eyepiece at a magnification of 100. Pictures are representative for the respective diet group or treatment.

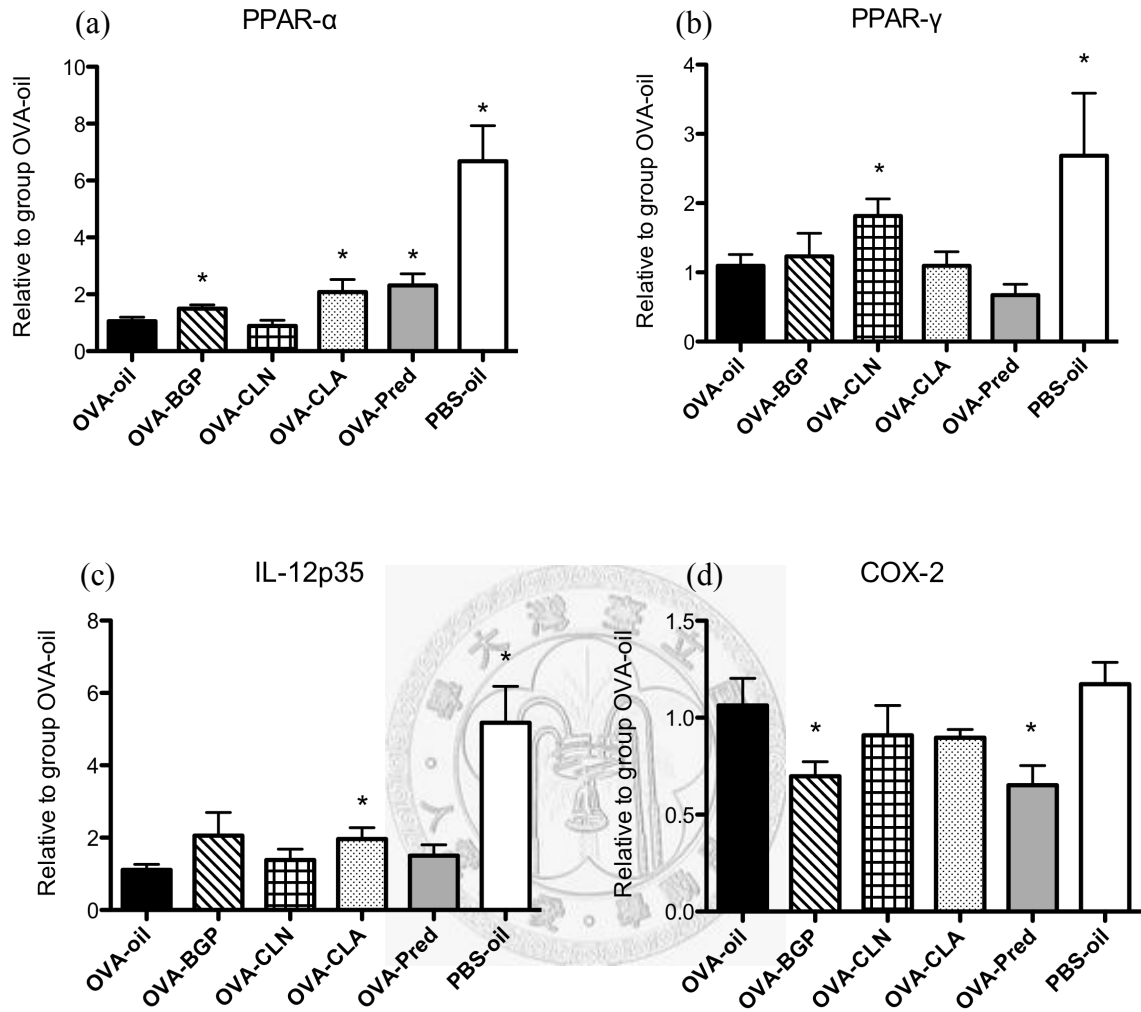


圖3.5 餵食BGP、CLN與CLA對OVA致敏小鼠肺部(a) PPAR $\alpha$  (b) PPAR $\gamma$  (c) IL-12p35 (d) COX-2 mRNA表現量的影響

Figure 3.5 The effect of BGP, CLN and CLA (a) PPAR $\alpha$  (b) PPAR $\gamma$  (c) IL-12p35 (d) COX-2 mRNA expression in lung of OVA-sensitized mice. Value represent mean  $\pm$  SEM, n=9 for OVA-oil, OVA-BGP, OVA-CLA, n=7 for OVA-CLN, n=6 for OVA-Pred, PBS-oil. \*  $p < 0.05$  ; \*\*  $p < 0.01$  compared with the OVA-oil group by Student's  $t$ -test.

表3.5 餵食BGP、CLN與CLA對OVA致敏小鼠脾臟細胞在OVA刺激下細胞激素影響

Table 3.5 The effect of BGP, CLN and CLA on cytokine secretion by specific-stimulated splenocytes of OVA-sensitized mice *ex vivo*.

	n	IFN- $\gamma$		IL-2	
		(pg/mL)		(pg/mL)	
OVA-oil	9	115 ±	53	58.4 ±	16.3
OVA-BGP	9	155 ±	139	60.2 ±	17.7
OVA-CLN	7	94 ±	52	67.9 ±	26.8
OVA-CLA	9	110 ±	45	65.4 ±	21.8
OVA-Pred	6	110 ±	50	66.9 ±	20.9
PBS-oil	6	138 ±	28	39.6 ±	13.5*

	n	IL-4		IL-5		IL-13	
		(pg/mL)		(ng/mL)		(pg/mL)	
OVA-oil	9	36.8 ±	15.6	3.92 ±	1.30	430 ±	60
OVA-BGP	9	25.3 ±	12.5	2.93 ±	1.51	297 ±	12*
OVA-CLN	7	31.4 ±	16.3	3.58 ±	1.58	528 ±	139
OVA-CLA	9	27.4 ±	15.0	3.98 ±	2.40	408 ±	156
OVA-Pred	6	33.4 ±	14.5	2.12 ±	1.85 <sup>#</sup>	322 ±	118 <sup>#</sup>
PBS-oil	6	34.5 ±	14.5	0.15 ±	0.10**	131 ±	12**

	n	IL-10		TGF- $\beta$	
		(ng/mL)		(pg/mL)	
OVA-oil	9	1.20 ±	0.42	474 ±	93
OVA-BGP	9	0.79 ±	0.38 <sup>#</sup>	354 ±	86*
OVA-CLN	7	1.10 ±	0.61	437 ±	67
OVA-CLA	9	1.00 ±	0.34	400 ±	73
OVA-Pred	6	1.00 ±	0.57	525 ±	149
PBS-oil	6	0.13 ±	0.11**	485 ±	68

1. Each values represent mean  $\pm$  SD.

2. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; <sup>#</sup>  $0.05 \leq p < 0.1$  compared with the OVA-oil group by Student's *t*-test.



表3.6 餵食BGP、CLN與CLA對OVA致敏小鼠脾臟細胞在conA刺激下細胞激素分泌的影響

Table 3.6 The effect of BGP, CLN and CLA on cytokine secretion by non-specific-stimulated splenocytes of OVA-sensitized mice *ex vivo*.

	n	IFN- $\gamma$ (ng/mL)		IL-2 (ng/mL)	
OVA-oil	9	2.58 $\pm$ 1.74		6.83 $\pm$ 1.62	
OVA-BGP	9	5.67 $\pm$ 3.15*		6.64 $\pm$ 1.96	
OVA-CLN	7	3.09 $\pm$ 2.46		5.51 $\pm$ 1.85	
OVA-CLA	9	2.93 $\pm$ 1.89		7.66 $\pm$ 2.47	
OVA-Pred	6	3.79 $\pm$ 3.40		8.07 $\pm$ 2.07	
PBS-oil	6	1.39 $\pm$ 0.81		8.47 $\pm$ 1.41#	

	n	IL-4 (pg/mL)		IL-5 (ng/mL)		IL-13 (pg/mL)		IL-17 (pg/mL)	
OVA-oil	9	31.0 $\pm$ 17.8		0.99 $\pm$ 0.43		0.77 $\pm$ 0.16		47.5 $\pm$ 15.2	
OVA-BGP	9	34.6 $\pm$ 15.7		0.69 $\pm$ 0.30		0.73 $\pm$ 0.15		54.5 $\pm$ 16.2	
OVA-CLN	7	26.2 $\pm$ 9.1		0.69 $\pm$ 0.29		0.66 $\pm$ 0.08#		38.1 $\pm$ 15.2	
OVA-CLA	9	29.6 $\pm$ 9.8		0.79 $\pm$ 0.19		0.63 $\pm$ 0.09*		52.2 $\pm$ 22.8	
OVA-Pred	6	30.1 $\pm$ 10.5		0.61 $\pm$ 0.38#		0.87 $\pm$ 0.19		69.3 $\pm$ 34.4	
PBS-oil	6	32.4 $\pm$ 10.0		0.05 $\pm$ 0.07**		0.73 $\pm$ 0.15		116 $\pm$ 55.2*	

1. Each values represent mean  $\pm$  SD.

2. \*  $p < 0.05$  ; \*\*  $p < 0.01$ ; #  $0.05 \leq p < 0.1$  compared with the OVA-oil group by Student's *t*-test.

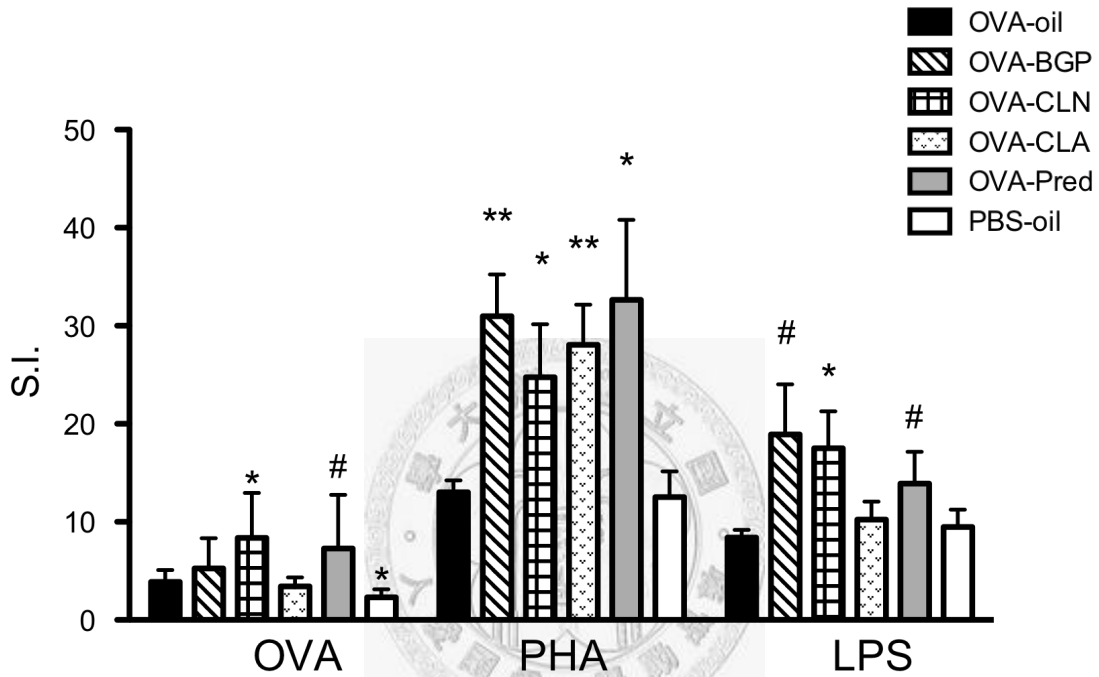


圖3.6 餵食BGP、CLN與CLA對OVA致敏小鼠脾臟細胞增生能力的影響

Figure 3.6 The effect of BGP, CLN and CLA on splenocytes proliferation of OVA-sensitized mice. Value represent mean  $\pm$  SEM, n=9 for OVA-oil, OVA-BGP, OVA-CLA, n=7 for OVA-CLN, n=6 for OVA-Pred, PBS-oil. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; #  $0.05 < p \leq 0.1$  compared with the OVA-oil group by Student's *t*-test.

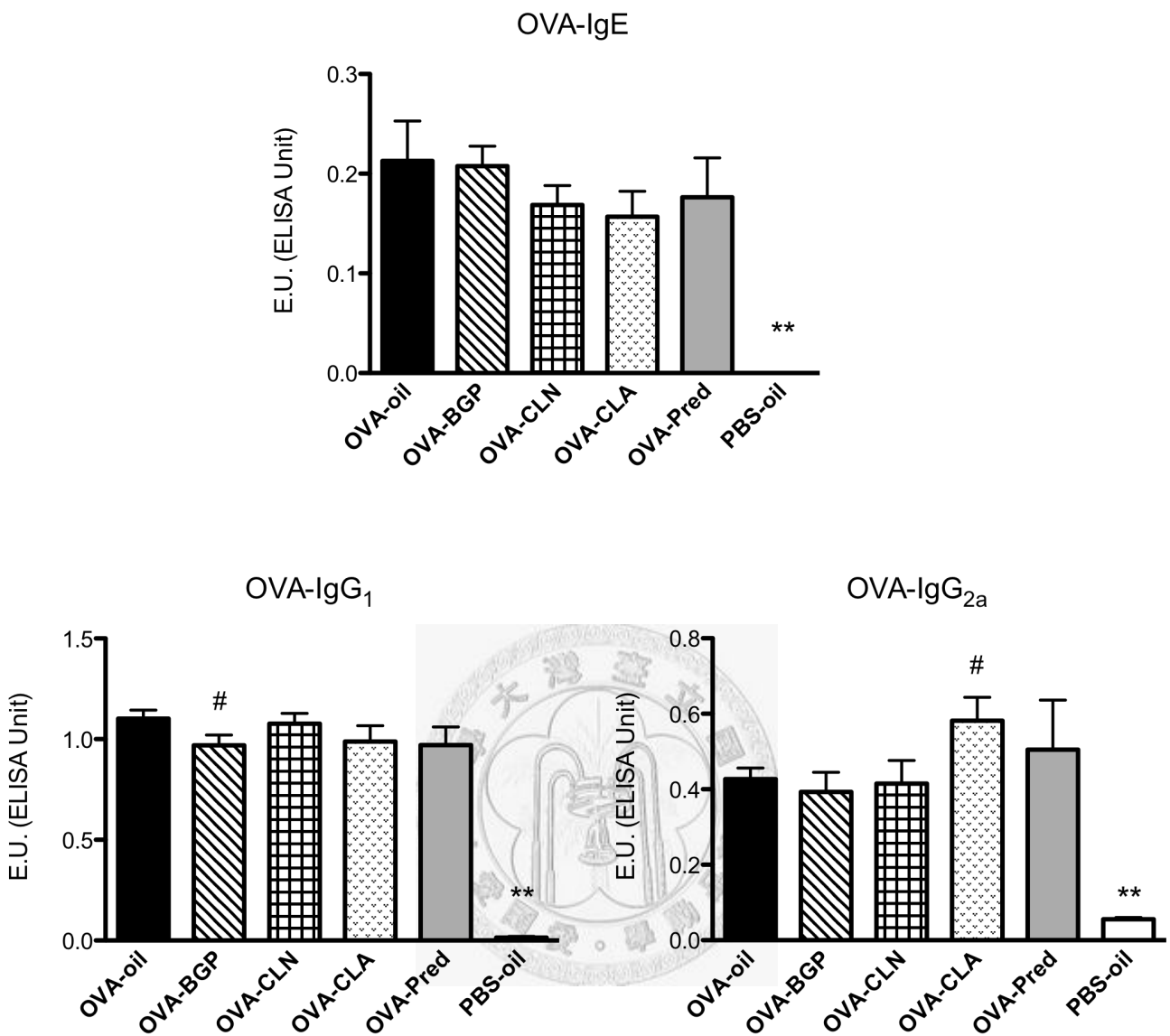


圖3.7 餵食BGP、CLN與CLA對OVA致敏小鼠血清中OVA特異性抗體含量的影響

Figure 3.7 The effect of BGP, CLN and CLA on the level of OVA-specific antibodies in serum of OVA-sensitized mice. Value represent mean  $\pm$  SEM, n=9 for OVA-oil, OVA-BGP, OVA-CLA, n=7 for OVA-CLN, n=6 for OVA-Pred, PBS-oil. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; #  $0.05 \leq p < 0.1$  compared with the OVA-oil group by Student's *t*-test.

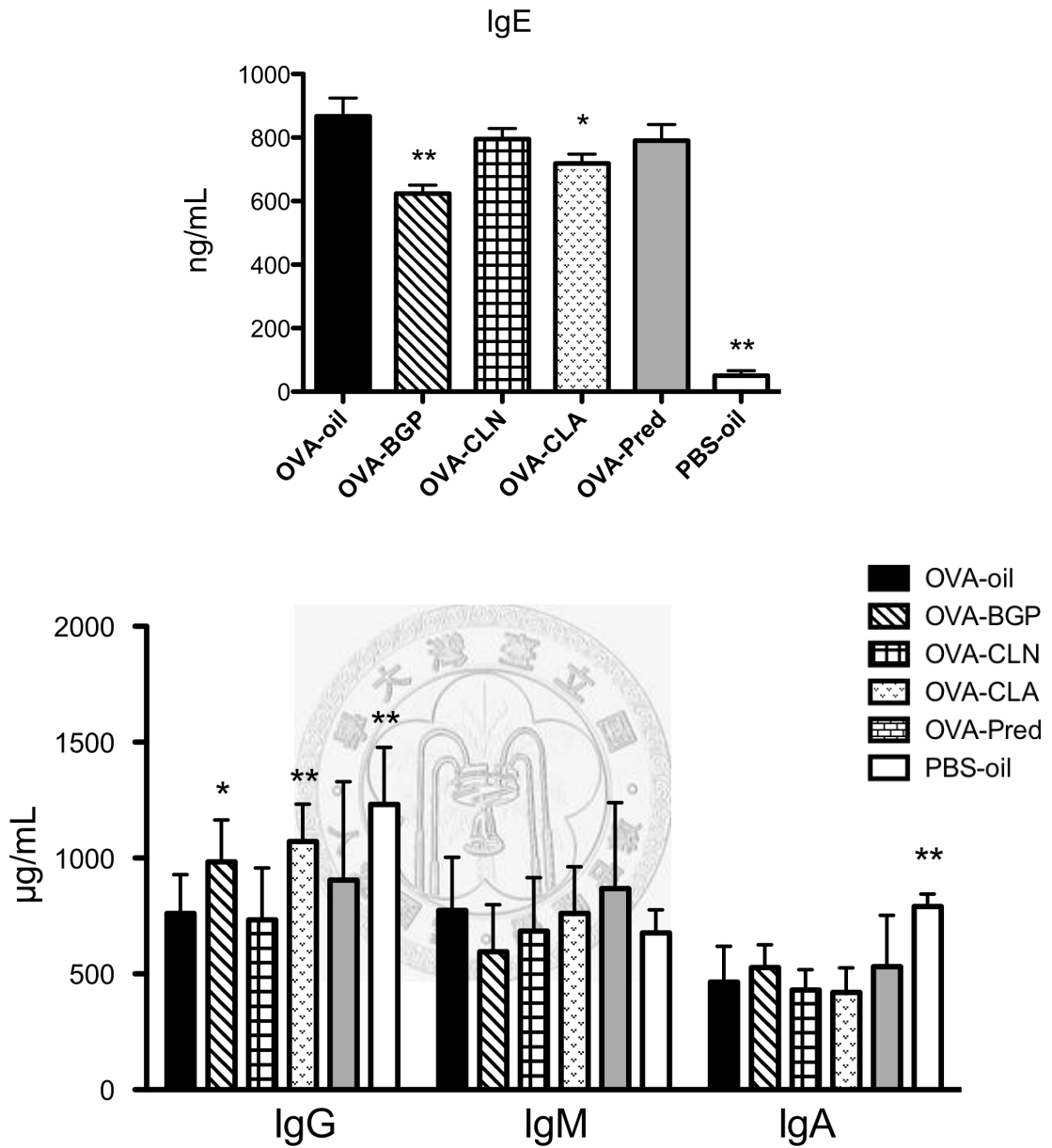


圖3.8 餵食BGP、CLN與CLA對OVA致敏小鼠血清中總抗體含量的影響

Figure 3.8 The effect of BGP, CLN and CLA on the level of total antibodies in serum of OVA-sensitized mice. Value represent mean  $\pm$  SEM, n=9 for OVA-oil, OVA-BGP, OVA-CLA, n=7 for OVA-CLN, n=6 for OVA-Pred, PBS-oil. \*  $p < 0.05$  ; \*\*  $p < 0.01$  compared with the OVA-oil group by Student's *t*-test.

表3.7 餵食BGP、CLN與CLA對OVA致敏小鼠腹腔細胞分泌細胞激素影響

Table 3.7 The effect of BGP, CLN and CLA on cytokine secretion by peritoneal exudates of OVA-sensitized mice ex vivo.

Group		Spontaneous	LPS
		TNF- $\alpha$	
	n	(ng/mL)	
OVA-oil	9	0.16 $\pm$ 0.22	1.09 $\pm$ 0.38
OVA-BGP	9	0.16 $\pm$ 0.16	1.05 $\pm$ 0.53
OVA-CLN	7	0.1 $\pm$ 0.1	0.85 $\pm$ 0.39
OVA-CLA	9	0.16 $\pm$ 0.13	1.25 $\pm$ 0.63
OVA-Pred	6	0.12 $\pm$ 0.1	1.08 $\pm$ 0.47
PBS-oil	6	0.07 $\pm$ 0.07	0.72 $\pm$ 0.33
		IL-6	
	n	(ng/mL)	
OVA-oil	9	ND	0.86 $\pm$ 0.77
OVA-BGP	9	ND	0.93 $\pm$ 0.47
OVA-CLN	7	ND	0.81 $\pm$ 0.49
OVA-CLA	9	ND	1.08 $\pm$ 0.72
OVA-Pred	6	ND	1.27 $\pm$ 0.83
PBS-oil	6	ND	0.34 $\pm$ 0.30
		IL-1 $\beta$	
	n	(pg/mL)	
OVA-oil	9	ND	27.7 $\pm$ 16.0
OVA-BGP	9	ND	48.4 $\pm$ 35.7
OVA-CLN	7	ND	15.1 $\pm$ 11.1
OVA-CLA	9	ND	41.3 $\pm$ 25.0
OVA-Pred	6	ND	16.9 $\pm$ 17.7
PBS-oil	6	ND	16.6 $\pm$ 10.0

1. Each values represent mean  $\pm$  SD.

表3.8 餵食BGP、CLN與CLA對OVA致敏小鼠吞噬細胞能力的影響

Table 3.8 The effect of BGP, CLN and CLA on phagocytotic ability of OVA-sensitized mice.

	n	Spontaneous(0°C)		Activation(37°C)	
		Granulocyte%	Phagocytic activity	Granulocyte%	Phagocytic activity
OVA-oil	9	5.58 ± 1.53	331 ± 44.7	33.7 ± 3.05	433 ± 74.4
OVA-BGP	9	3.91 ± 1.39 <sup>#</sup>	305 ± 43.5	38.9 ± 4.60 <sup>*</sup>	405 ± 77.4
OVA-CLN	7	5.57 ± 1.92	350 ± 52.1	41.6 ± 5.48 <sup>*</sup>	464 ± 66.3
OVA-CLA	9	4.17 ± 1.71	309 ± 44.8	34.7 ± 4.85	454 ± 75.0
OVA-Pred	6	5.36 ± 2.16	346 ± 53.5	42.0 ± 3.05 <sup>**</sup>	469 ± 91.7
PBS-oil	6	3.30 ± 1.12 <sup>**</sup>	338 ± 95.5	43.3 ± 1.74 <sup>**</sup>	404 ± 74.2

1. Each values represent mean ± SD.

2. <sup>\*</sup>  $p < 0.05$  ; <sup>\*\*</sup>  $p < 0.01$ ; <sup>#</sup>  $0.05 \leq p < 0.1$  compared with the OVA-oil group by Student's *t*-test.



表3.9 餵食BGP、CLN與CLA對OVA致敏小鼠NK細胞能力的影響

Table 3.9 The effect of BGP, CLN and CLA on NK cell activity of OVA-sensitized mice.

	n	NK cell activity
		% gated
OVA-oil	9	19.9 ± 5.06
OVA-BGP	9	25.5 ± 9.56
OVA-CLN	7	22.7 ± 6.97
OVA-CLA	9	22.4 ± 8.08
OVA-Pred	6	20.8 ± 9.12
PBS-oil	6	16.6 ± 4.69

1. Each values represent mean ± SD.

## 第四節 討論

### 一、餵食BGP、CLN或CLA能降低氣喘模式小鼠呼吸道發炎

在臨床研究中指出，氣喘患者肺沖洗液中的嗜伊紅性白血球、肥大細胞與巨噬細胞，均顯著的高於一般人。本實驗室先前研究已建立過敏性氣喘小鼠模式，BALB/c小鼠經由OVA注射3次後再以OVA進行吸入性致敏，可以顯著的誘發嗜伊紅性球的聚集，並且促使發炎介質的釋放，如：PGE<sub>2</sub>、eotaxin、IL-4及IL-5，是一個研究過敏性氣喘的良好動物模式。因此本研究採用此動物模式進行山苦瓜、CLN與CLA對氣喘症狀之探討，而在本實驗結果中，此致敏模式可以顯著的誘發呼吸道發炎反應。

由本實驗結果可以觀察到餵食BGP、CLN及CLA皆能顯著的減緩小鼠肺呼吸阻力。在肺沖洗液中的細胞方面，餵食山苦瓜能顯著減少呼吸道中總細胞數目、以及嗜伊紅性白血球、嗜中性白血球、嗜鹼性白血球等發炎細胞的聚集。從組織切片圖也可以明顯的觀察到，給予BGP其氣管周圍細胞浸潤的情形較OVA-oil組來的輕微。同時也降低呼吸道中IL-4、IL-5、IL-13等Th2細胞激素，與TNF $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 及eotaxin等發炎介質。顯示餵食山苦瓜確實減緩氣喘模式小鼠呼吸道發炎的情形。

當免疫細胞受到促發炎介質活化時，如TNF $\alpha$ 、IL-6等，將可促進免疫細胞內許多轉錄因子的活性，如NF- $\kappa$ B、AP-1，使免疫細胞表現COX-2，合成大量PGE<sub>2</sub> (Zamamiri-Davis et al., 2002; Rockwell et al., 2004)。PGE<sub>2</sub>會促進IgE抗體的生合成 (Gauchat et al., 1990)，曾有細胞培養的研究指出，以PEG<sub>2</sub>分別添加於傾向Th1或Th2的T細胞中，發現PGE<sub>2</sub>會抑制Th1細胞分泌IL-2，但對於Th2細胞則無影響(Betz et al., 1991)。在體內有PGE<sub>2</sub>存在下，Th1的免疫反應被抑制，可能使Naïve T細胞反應轉變為以Th2免疫為主導，分泌較多的IL-4及IL-5等。

在本研究中，餵食BGP小鼠肺沖洗液中顯著含有低的發炎介質，也觀察到肺組織COX-2 mRNA顯著的表現較少，而肺沖洗液中PGE<sub>2</sub>的含量也顯著的低。因此，

推測山苦瓜可能降低發炎介質的分泌，抑制COX-2的表現，而減少PGE<sub>2</sub>的生成，達到抗發炎作用及抑制Th2免疫反應，同時也降低血清中IgE的含量。

小鼠補充CLN可以顯著的減少肺部嗜伊紅性白血球的浸潤情形，同時也可觀察到肺沖洗液中IL-5的含量也顯著的較OVA-oil組低。有研究指出，嗜伊紅性白血球在呼吸道的發炎反應上扮演著重要的角色，嗜伊紅性白血球主要受到IL-5與eotaxin誘導而聚集於呼吸道，其中IL-5對於其分化與成熟亦扮演重要角色(Beeh et al., 2003 ; Menzies-Gow et al., 2002)。因此，餵食CLN能降低肺沖洗液中IL-5的含量，而減少嗜伊紅性白血球的聚集，降低呼吸道發炎反應，並減緩肺呼吸阻力，在組織切片圖中，亦可以發現氣管周圍聚集的細胞較OVA-oil組來得少。

IL-12是由p40和p35兩個單元體所構成的。有研究指出，由巨噬細胞、樹突細胞及呼吸道上皮細胞所分泌的IL-12對於Th1細胞的分化與活化扮演重要的角色(Trinchieri et al., 2003)。IL-12基因剔除小鼠研究中發現，缺乏IL-12基因表現的OVA致敏小鼠，可以在肺沖洗液及骨髓中測得較多的嗜伊紅性白血球，並且肺沖洗液中的eotaxin含量也較正常致敏鼠高(Zhao et al., 2000)。在氣喘患者體內，全血細胞所分泌的IL-12顯著的較低(Van der Kraan et al., 1997)，可見IL-12對過敏性氣喘的發展扮演重要角色。在本研究中也發現，致敏小鼠肺組織中IL-12p35基因表現量顯著的較未致敏小鼠低，顯示致敏會使得IL-12p35的表現量下降，可能降低Th1免疫，傾向Th2免疫反應。餵食CLA能顯著的提升IL-12p35基因表現，推測CLA可能使免疫反應傾向Th1，而抑制Th2免疫，雖然並未觀察到肺沖洗液中Th2細胞激素的含量顯著下降，但還是有較低的IL-5及IL-13，而餵食CLA能有效的減緩AHR，從肺組織切片也能觀察到有較少的細胞聚集於氣管周圍，顯示餵食CLA能有效改善呼吸道發炎狀況。

TGF- $\beta$ (transforming growth factor-beta) 能藉由誘導調節型T細胞生成而具有免疫調節之影響，調節型T細胞能抑制Th1以及Th2免疫反應(Wan et al., 2007)，過去的研究中指出，調節型T細胞能藉由降低Th2細胞發展，因而降低呼吸道中嗜伊



紅性白血球聚集的情形(Jaffar et al., 2004)。但TGF- $\beta$ 在氣喘呼吸道重組是一重要因子，其可刺激纖維母細胞生長但抑制表皮細胞增生。基底膜厚度越厚，纖維母細胞越多，疾病嚴重度越厲害，則TGF- $\beta$ 的表現也越明顯。上皮細胞也會分泌 TGF- $\beta$ 造成氣道(small airway)發炎及纖維化和黏液增生。研究指出在過度表現 IL-13 的基因轉殖鼠可誘發嗜酸性白血球、巨噬細胞以及淋巴球細胞為主的發炎反應，造成呼吸道過度反應和黏液過度分泌(Blackburn et al., 2003)；IL-13 作用在肺表皮細胞會誘發 TGF- $\beta$ 和 TNF- $\alpha$  生成造成呼吸道重組現象(Booth et al., 2001)。而在本研究中，發現餵食BGP能顯著的降低肺沖洗液中的IL-13與TGF- $\beta$ 含量，可能是給予山苦瓜補充減緩呼吸道過敏性導致發炎現象，因而減少呼吸道重組與纖維化作用，因此調節型TGF- $\beta$ 含量顯著較低。

## 二、餵食BGP、CLN或CLA對過敏性小鼠全身性免疫反應的調節作用

過敏疾病之發生主要是免疫系統傾向於Th2免疫反應，已有研究指出Th2細胞受到IFN- $\gamma$ 刺激後，促使細胞內IRF-1與IRF-2的表現，此兩種蛋白質為IL-4 promoter的suppressor，降低IL-4的分泌，因而抑制Th2細胞分化，減少其他Th2細胞激素（IL-5、IL-13）的分泌（Elser et al., 2002；Novelli et al., 1997）。本實驗結果顯示，餵食BGP小鼠脾臟細胞在ConA刺激之下，顯著的分泌較高的IFN- $\gamma$ ，而在特異性OVA刺激下顯著的降低IL-13的分泌，同時也有較低的IL-4及IL-5，推測餵食BGP能使免疫傾向於Th1免疫反應，進而抑制了過敏性Th2免疫反應。

在本研究中也觀察到餵食山苦瓜，會使得脾臟細胞在特異性OVA刺激之下，分泌IL-10及TGF- $\beta$ 的能力降低，而此兩種細胞激素與調節型T細胞執行抑制目標細胞的活化與增生相關。在過敏反應中，不論是自然產生或誘發性的調節型T細胞，都可抑制Th2的免疫反應，或許可以應用在治療過敏疾病的發生 (Stock et al., 2004; Larche et al., 2007)。但從過敏免疫來看IL-10所扮演的角色可能有兩方面，一方面是IL-10是傾向Th2免疫反應，抑制Th1免疫反應。另一方面IL-10量增加時會抑制發

炎反應的進行，亦即調節型的細胞激素，調降受活化的免疫反應。在體外細胞培養實驗中，給予樹突細胞 IL-10 刺激後與T細胞共同培養會促進Th2的細胞激素分泌並抑制Th1的細胞激素生成 (De Smedt et al., 1997; Liu et al., 1998)，但將此群樹突細胞用於治療過敏病人的結果卻發現反而抑制Th2細胞激素的產生 (Bellinghausen et al., 2001)。在剔除IL-10基因的動物實驗中，缺乏IL-10可以有效減緩過敏性氣喘的發生與其肺部發炎物質的產生，若給予IL-10重組蛋白則會加重呼吸道的收縮，卻不產生Th2的細胞激素 (van Scott et al., 2000; Yang et al., 2000)。餵食山苦瓜是否因傾向Th1免疫反應但也減緩發炎反應，使得所測得較低的脾臟細胞IL-10與TGF- $\beta$ 分泌量，值得進一步探討。

在腹腔巨噬細胞所分泌細胞激素方面，BGP、CLN與CLA的餵食對於TNF $\alpha$ 、IL-6及IL-1 $\beta$ 發炎介質並無顯著的影響。可能是因本實驗經由OVA的吸入性刺激，造成呼吸道上局部組織的發炎反應，飲食因子的處理對於全身性的發炎反應則較不具有影響。

### 三、 餵食BGP與CLA能降低氣喘模式小鼠血清中過敏性抗體的含量

過敏疾病患者，其血清中IgE的濃度會高於一般人，進而活化肥大細胞，促使進行去顆粒化作用，釋放出許多過敏免疫反應介質 (Kuby, 1994; Marone et al., 1998)。在本實驗中，致敏小鼠血清中OVA特異性IgE、IgG1及IgG2a抗體與總IgE抗體的生成均顯著的高於PBS-oil組，由此可知本實驗致敏小鼠確實具有過敏性體質。

已知eicosanoids與發炎反應有密切的相關 (Goetzl et al., 1995)，已有研究指出，PGE<sub>2</sub>具有促進B細胞同型轉換為分泌大量IgE抗體的作用 (Roper et al., 1995)。而B細胞生成過敏性抗體IgE需要細胞激素IL-4、IL-13，以及協同刺激分子CD40/CD40L的連接，IL-4對於IgE的生成尤其重要 (Brewer et al., 1996)。在本研究中，餵食BGP能顯著降低肺沖洗液中IL-4、IL-13以及PGE<sub>2</sub>，並且抑制OVA刺激

下脾臟細胞分泌IL-13的能力，推測這可能是使血清中IgE含量降低的原因之一。此外，Th2的細胞激素也可幫助B細胞製造IgG<sub>1</sub>和IgG<sub>3</sub>的抗體生成，屬於Th2免疫的抗體，而補充山苦瓜能顯著的抑制Th2的細胞激素的生成，也降低了血清中的IgG<sub>1</sub>。另外，給予CLA的小鼠，血清中也顯著的含有較低的IgE抗體，同時也可發現其脾臟細胞在非特異性刺激之下，能顯著的降低IL-13的分泌，間接的影響B細胞同型轉換產生IgE。

#### 四、餵食BGP與CLA能回復氣喘模式小鼠肺組織 $ppar-\alpha$ 基因表現量

在PPAR $\alpha$ 缺乏的小鼠的實驗中，給予OVA致敏之下，其比野生型有嚴重的嗜伊紅性白血球的聚集及AHR的發生，在血清中也有較高的OVA-IgE，可見PPAR $\alpha$ 的基因表現下降，可能與呼吸道嚴重發炎相關(Woerly et al., 2003)。Fenofibrate為一種PPAR $\alpha$ 的活化劑，在許多發炎疾病的小鼠模式中，都被證實具有抗發炎的作用(Duez et al., 2002; Tanaka et al., 2001)。研究指出，Fenofibrate不論是給予OVA致敏小鼠，或以LPS刺激導致呼吸道發炎小鼠，皆可降低肺沖洗液中嗜伊紅性球的數目，並減緩呼吸道發炎的情形(Becker et al., 2006; Delayre-Orthez et al., 2005)。若處理嗜伊紅性白血球PPAR $\alpha$ 的活化劑WY14653，發現嗜伊紅性白血球的趨化作用被抑制(Woerly, 2003)。顯示PPAR $\alpha$ 的表現或活化，具有降低呼吸道發炎的作用。

在本研究結果中，致敏小鼠肺組織中PPAR $\alpha$ 的基因表現量顯著的比未致敏小鼠低，可見PPAR $\alpha$ 的基因表現下降，與嚴重呼吸道發炎相關。山苦瓜乙酸乙酯萃物及CLA在體外實驗中具有活化PPAR $\alpha$ 的效用，餵食山苦瓜或CLA的致敏小鼠，肺組織中PPAR $\alpha$ 基因表現量顯著的較OVA-oil組高。同時也可觀察到兩組小鼠都有顯著低的AHR，推測山苦瓜與CLA對PPAR $\alpha$ 的影響，為改善呼吸道發炎的機制之一。

## 五、餵食CLN能回復氣喘模式小鼠肺組織 $ppar-\gamma$ 基因表現量

已知PPAR $\gamma$ 會表現在肺部上皮、內皮、平滑肌細胞及免疫細胞（肺泡巨噬細胞、嗜中性球、嗜伊紅性球、肥大細胞、T細胞），其ligands可能透過基因或非基因的方式抑制發炎性介質的表現。在體內及體外試驗中，都發現PPAR $\gamma$ 的活化劑能夠減緩呼吸道發炎反應，包括減少細胞激素及發炎介質的分泌(Genolet et al., 2004)。而PPAR $\gamma$ 的活化可減緩嗜伊紅性白血球聚集的呼吸道發炎，或許是調節免疫平衡的作用(Hammad et al., 2004)。曾有研究由氣管給予氣喘模式小鼠AdPPAR $\gamma$ (adenovirus carrying PPAR $\gamma$  cDNA)，能抑制IL-4與IL-5的表現，降低嗜伊紅性球聚集與減緩AHR(Lee, 2005; Lee, 2006)。顯示不論是給予PPAR活化劑或提升PPAR $\gamma$ 表現，都能減緩呼吸道發炎與AHR。

本實驗所選用樣品，山苦瓜、CLN與CLA在體外實驗都具有活化PPAR $\gamma$ 的作用。分析肺組織基因表現量，可以發現未致敏的PBS-oil組，在肺組織比致敏小鼠有較高的PPAR $\gamma$ 基因表現，顯示致敏會使肺組織中PPAR $\gamma$ 的表現下降，此可能與氣喘模式小鼠有嚴重的呼吸道發炎相關。而餵食CLN可以顯著的回復PPAR $\gamma$ mRNA基因表現量，推測CLN可能透過此機制而降低肺沖洗液中IL-4與IL-5，也減少嗜伊紅性球的浸潤與減緩AHR，改善呼吸道發炎的症狀。在Jaudszus的研究中(2008)，發現致敏前一週即開始餵食小鼠CLA，總共餵食五週，能有效減緩過敏性氣喘的症狀，而此作用可能是透過回復肺組織PPAR $\gamma$ 基因表現量，但本實驗中並未觀察到此作用，推測可能是在致敏後才開始餵食，或是只餵食CLA16天，而無法觀察到對肺組織PPAR $\gamma$ 表現量的影響。

## 六、Th17在氣喘模式小鼠中扮演的角色

IL-17是一個發炎前驅物質，在1995年首度被發現，主要由六個成員組成(IL-17A-F)，一般IL-17泛指IL-17A大小約為35 kDa(Fossiez et al.,1996)。之後將這類分泌IL-17的T細胞稱為輔助型T細胞-17(Th17)，而在氣喘及慢性肺阻塞病人唾液中，發現IL-17的表現量皆有上升且與呼吸道過度反應呈現正相關(Barczyk et al.,

2003)。IL-17在研究中指出主要為引起嗜中性白血球浸潤的呼吸道發炎，而非嗜伊紅性白血球(Hoshino et al., 1999)。在2008年的研究指出，由呼吸道注入的方式，直接給予OVA特異性的Th2與Th17細胞，Th17會加強Th2的免疫反應(Wakashin et al., 2008)，但在其他研究中，在吸入OVA刺激(challenge phase)前給予anti-IL-17單株抗體，結果卻加強了嗜伊紅性白血球的聚集；同樣地，若是給予的為rIL-17卻會減緩聚集的情況，作者推測IL-17可能減少了樹突細胞或其他細胞CCL17(TRAC)的表現，而具有降低嗜伊紅性白血球的聚集與發炎(Schnyder-Candrian et al., 2006)。因此，IL-17在OVA致敏小鼠的模式中，於致敏期間(sensitization phase)似乎為一個促進的角色；相對的在吸入OVA刺激期間，似乎為一個抑制的角色(Oboki et al., 2008)。在本實驗的結果中，未致敏的小鼠在肺沖洗液中與脾臟細胞所分泌的IL-17，皆顯著比致敏的小鼠高，顯示本實驗的致敏模式下，會降低IL-17的分泌，是否為產生嗜伊紅性白血球的聚集與呼吸道發炎原因之一，需要更進一步的研究去探討。



## 第四章 綜合討論與總結

### 第一節 綜合討論

#### 一、細胞模式與氣喘小鼠模式之比較

細胞模式與氣喘模式小鼠各種免疫指標結果整理如表2.1與表4.1，山苦瓜的EA萃物能抑制RAW264.7、初代腹腔細胞與樹突細胞的發炎介質TNF $\alpha$ 與IL-6分泌，顯示山苦瓜具有抗發炎的作用。在氣喘模式小鼠中，餵食山苦瓜顯著降低肺沖洗液中TNF $\alpha$ 、IL-6與IL-1 $\beta$ 含量，與細胞模式抗發炎作用有一致性。

在初代脾臟細胞的結果，給予山苦瓜EA或酒精萃物，會降低分泌IFN $\gamma$ 的能力。但對於致敏小鼠，餵食含有山苦瓜全果凍乾粉飼料，卻促進脾臟細胞分泌IFN $\gamma$ 。IFN $\gamma$ 可抑制Th2免疫反應，並降低過敏反應(Teixeira et al., 2005)；但也會活化巨噬細胞、嗜中性白血球等，釋放TNF $\alpha$ 等發炎介質引起發炎反應，顯示IFN $\gamma$ 參與Th1和Th2的平衡調控與發炎反應。過去本實驗室研究中，賜多利免疫奶粉純化蛋白(SMPC)在初代脾臟細胞促進IFN $\gamma$ 分泌，但在氣喘模式小鼠脾臟細胞分泌的影響相反(吳, 2007)，同樣為不一致的結果，但促進IFN $\gamma$ 分泌的山苦瓜與抑制的SMPC都能減緩小鼠過敏性氣喘的症狀。從過敏免疫來看IFN $\gamma$ 的角色，一方面促進Th1抑制Th2免疫，另一方面可能促進發炎反應的發生。餵食山苦瓜使小鼠免疫反應傾向Th1，而抑制過敏的Th2免疫，山苦瓜同時也具有抗發炎的作用，如：提升PPAR $\alpha$ 的基因表現，因此能改善呼吸道發炎與降低Th2過敏免疫反應。

CLN抑制初代腹腔細胞TNF $\alpha$ 與IL-6分泌，具有抗發炎潛力。在氣喘模式小鼠中，補充CLN在肺沖洗液中的TNF $\alpha$ 、IL-6與IL-1 $\beta$ 的含量，與OVA-oil組相比有較低，但統計無顯著差異。對於初代脾臟細胞的影響，CLN降低IFN $\gamma$ 與IL-4的分泌。在動物模式下，IFN $\gamma$ 與IL-4分泌並不影響，而會降低IL-13的分泌，但補充CLN可以降低肺沖洗液中的IL-4與IL-5的含量。顯示CLN不論是細胞模式與動物模式，都具有抑制Th2免疫反應的效用。

## 二、山苦瓜減緩過敏性氣喘的可能有效成份

餵食山苦瓜顯著的降低氣喘模式小鼠肺沖洗液中Th2細胞激素及發炎介質，減少細胞浸潤的情形，改善呼吸道發炎與AHR。CLN為山苦瓜中主要且特殊的脂肪酸，實驗結果也顯示每天餵食35 mg CLN，可以有效的降低肺沖洗液中IL-4與IL-5，減少嗜伊紅性白血球的浸潤，減緩AHR的發生。是否CLN為山苦瓜減緩過敏性氣喘的有效成份之一？根據研究指出，一公斤山苦瓜凍乾粉中約含 6 g 之 9c, 11t, 13t-CLN (Chuang et al., 2006)。推算本實驗中餵食5%山苦瓜凍乾粉飼料，每隻小鼠每天約吃1 mg的CLN，與35 mg相差甚多。本研究結果中餵食山苦瓜能降低肺組織中COX-2的基因表現，與提升PPAR $\alpha$ 基因表現量，而CLN的補充則是提升肺組織中PPAR $\gamma$ 的基因表現，兩者的作用機制似乎不相同。因此，推測山苦瓜當中還有其他活性成份能減緩過敏性氣喘。

在2008年的研究中指出，苦瓜當中含有幾種具有抗糖尿病活性的三萜類 (triterpenoids)，可促進脂肪細胞3T3-L1與肌肉細胞L6的葡萄糖汲取(Tan et al., 2008)。在本實驗室先前研究中，松杉靈芝三萜類顯著的抑制肥大細胞株釋放組織胺，並減緩氣喘模式小鼠的呼吸道發炎與過敏免疫反應(Chen et al., 2007)。此外，胡黃連(*Picrorhiza kurroa*)三萜類區分物，對於COX-2酵素活性具有抑制作用(Zhang et al., 2005)。萃取自柴胡且接有醣基之三萜類化合物，對於肥大細胞釋放組織胺能力，與抗原刺激後呼吸道收縮的情形，均有抑制的作用(Park et al., 2002)。一般而言，植物三萜類成份均被認為具有免疫調節的作用。

山苦瓜中的三萜類可能主要存在山苦瓜酒精萃物或水萃物中，在本實驗中，山苦瓜酒精萃物能顯著抑制巨噬細胞株發炎介質分泌，也降低初代腹腔細胞IL-6的分泌，具有抗發炎的潛力。推測山苦瓜中的三萜類或許為活性成份之一。除此之外，研究在找尋山苦瓜中活化PPAR $\gamma$ 的有效成份時，除了CLN之外，還分離出一些植物固醇具有活化PPAR $\gamma$ 效用(Chuang et al., 2006)，亦可能為有效成份之一。而這些三萜類與植物固醇是否具有減緩過敏性氣喘的效用，仍待進一步的探討。

### 三、CLN與CLA之比較

曾有研究指出，餵食大鼠9c, 11t, 13t-CLN，約有21%會在體內轉換為9c, 11t-CLA(Tsuzuki et al., 2006)，而CLA已有研究發表能降低氣喘模式小鼠呼吸道發炎(Jaudszus et al., 2008)。比較CLN和CLA對於氣喘模式小鼠的影響，兩者皆能降低呼吸道過度反應的發生，但以CLN較為顯著(CLN  $p < 0.01$ ; CLA  $p < 0.05$ )。此外CLN能減少肺沖洗液中IL-4與IL-5，以及嗜伊紅性白血球的數目，而CLA則降低血清中總IgE抗體的含量。CLN的補充能提升肺組織中PPAR $\gamma$ 的基因表現量，CLA則沒有此現象，而是發現會提升PPAR $\alpha$ 及IL-12p35基因表現量。顯示CLN與CLA可能是透過不同機制改善氣喘模式小鼠的症狀，以CLN較CLA更具有減緩過敏性氣喘的作用。因此，CLN抑制過敏性氣喘的作用，並非來自體內轉換為CLA的作用。

CLA主要存在於反芻動物的肉及乳製品中，c9, t11-CLA與t10, c12-CLA為食物中CLA主要異構物，而食物中CLA含量通常都小於1%(wt:wt)。因此，市售的CLA保健食品都是利用植物油(如：紅花籽油)或將不飽和脂肪酸利用鹼性異構化(alkali-isomerization)，形成具有生理活性的共軛亞麻油酸(Larsen et al., 2003; Gaullier et al., 2005)。相對於CLA，目前化學合成的9c, 11t, 13t-CLN較少且昂貴，但在一些植物種籽油中含量豐富，如：油桐籽油約含有67.7%、苦瓜籽油約56.2%(Takagi et al., 1981)，或許可直接利用種籽油做為CLN的來源，或將CLN單離出利用。雖然CLA已被許多研究證實具有降體脂、抗代謝症候群、抗發炎等保健功效，而目前大部份CLA保健食品，都為c9, t11-CLA與t10, c12-CLA以1:1比例的型式，近年有些研究提出，t10, c12-CLA具有抑制脂肪生成的作用(Hasin et al., 2007)，但可能伴隨著脂肪肝的形成與高胰島素血症的不利影響(Riserus et al., 2004; Benjamin et al., 2009)。綜合以上，CLN在本實驗中較CLA顯著的改善過敏性氣喘效果，且特定食物中含量豐富，亦不會有t10, c12-CLA的不利影響，有開發為減緩過敏性氣喘之保健食品的潛力。



#### 四、活化PPAR的食材具有減緩過敏性氣喘症狀之潛力

許多的研究都已證實化學合成的PPAR $\alpha$ 或 $\gamma$ 活化劑具有減緩過敏性氣喘的效用，如：PPAR $\alpha$ 活化劑Fenofibrate，能降低氣喘模式小鼠肺沖洗液中嗜伊紅性球數目，並減緩呼吸道發炎情形(Becker et al., 2006; Delayre-Orthez et al., 2005)。PPAR $\gamma$ 活化劑Ciglitazone，能減緩肺部呼吸道發炎與黏液堆積的現象(Mueller et al., 2003)，也能降低AHR、嗜伊紅性球聚集、Th2細胞激素及血清IgE(Honda et al., 2004)。雖然給予化學合成藥物能有效減緩過敏性氣喘，但亦可能伴隨著一些副作用發生。因此具有活化PPAR的食材，或許可代替藥物做為預防或改善過敏症狀之保健食品。

過去本研究室已發現具有改善呼吸道發炎與過敏免疫反應的食材中，松杉靈芝三菇類可能是透過PPAR $\gamma$ 的活化，抑制NF- $\kappa$ B轉錄活性，並抑制Th2細胞激素的生成(陳，2006)。山藥乙酸乙酯萃物與苜蓿芽乙酸乙酯萃物在OVA致敏小鼠中，都可降低呼吸道的發炎，能抑制Th2的過敏免疫反應，有效改善過敏性氣喘的症狀(羅，2006; 吳，2007)。而在細胞實驗中，此兩種食材萃物都已被證實具有活化PPAR $\alpha$ 與 $\gamma$ 的作用(陳，2007)，所以是否透過PPAR達到減緩過敏性氣喘仍待進一步探討。山苦瓜、CLN與CLA在體外實驗皆具有活化PPAR $\alpha$ 與 $\gamma$ 之效用，而本研究結果也顯示，在致敏小鼠中，餵食山苦瓜與CLA能有效提升肺組織中的PPAR $\alpha$ 基因表現量；CLN則是提升PPAR $\gamma$ ，三者皆能對體內PPAR的表現有影響，同時也能改善呼吸道發炎反應，降低過敏免疫反應的發生。因此，由過去的研究與本研究成果推測，能活化PPAR的食材，具有減緩過敏性氣喘症狀之潛力。

表2.1 山苦瓜各萃物、CLN與CLA對發炎與免疫反應的影響

樣品	RAW 264.7		初代腹腔細胞		EL4		初代脾臟細胞			BMDM			
	TNF $\alpha$	IL-6	TNF $\alpha$	IL-6	IL-2	IL-4	IL-2	IFN- $\gamma$	IL-4	IL-12	IL-10	TNF $\alpha$	IL-6
BGP-EA	↓	↓	--	↓	↓	↓	--	↓	--	↓	↓	↓	↓
BGP-Hex	↓	↓	--	--	--	--	↑	--	--	↓	↓	↓	↓
BGP-EtOH	↓	↓	--	↓	↓	↓	↓	↓	--	↓	--	↓	--
BGP-H <sub>2</sub> O	--	--	--	--	--	--	↑	--	↑	↓	--	↓	--
CLN	--	--	↓	↓	↓	--	--	↓	↓	↓	--	↓	--
CLA	--	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓

註：↑:促進分泌，↓：抑制分泌，單箭頭：p<0.05 灰色箭頭：0.05<p≤0.1

表4.1 餵食BGP、CLN與CLA對氣喘模式小鼠過敏免疫反應的影響

		OVA-BGP	OVA-CLN	OVA-CLA
AHR	50mg/mL	↓	↓	↓
BALF	Eosinophils	↓↓	↓	--
	Eotaxin	↓	--	--
	IL-4	↓	↓	--
	IL-5	↓↓	↓	--
	IL-13	↓↓	--	--
	TNF $\alpha$	↓	--	--
	IL-6	↓	--	--
	IL-1 $\beta$	↓	--	--
	PGE2	↓	--	--
肺組織基因	COX-2	↓	--	--
	PPAR $\alpha$	↑	--	↑
	PPAR $\gamma$	--	↑	--
	IL-12	--	--	↑
脾臟細胞	IFN- $\gamma$	↑	--	--
	IL-2	--	--	--
	IL-4	--	--	--
	IL-5	--	--	--
	IL-13	↓	↓	↓
血清抗體	總IgE	↓	--	↓
	OVA-IgE	--	--	--
	OVA-IgG <sub>1</sub>	↓	--	--
	OVA-IgG <sub>2a</sub>	--	--	↑

註：↑:促進分泌，↓：抑制分泌，雙鍵頭表示：p<0.01 單箭頭：p<0.05

灰色箭頭：0.05<p≤0.1

## 第二節 總結

山苦瓜與CLN在細胞模式中，能降低巨噬細胞及樹突細胞發炎介質的分泌，具有抗發炎之潛力。以過敏性氣喘小鼠模式，餵食山苦瓜或CLN共16天。山苦瓜具抑制過敏的免疫調節與降低呼吸道發炎，能抑制發炎性細胞聚集，減少Th2細胞激素及促發炎介質的分泌，而達到減緩肺呼吸阻力的效果。亦可發現山苦瓜能提升肺組織PPAR $\alpha$ 基因表現量，可能透過此降低發炎與過敏免疫反應，減少過敏性抗體IgE的生成。所含成份的CLN能抑制肺沖洗液中IL-4及IL-5，降低肺沖洗液中嗜伊紅性白血球的數目，並能減緩肺呼吸阻力，且顯著提升肺組織PPAR $\gamma$ 的表現量，可能透過此抑制了發炎反應的發生。對過敏體質的人來說，攝食山苦瓜或補充CLN應有助於降低呼吸道發炎與減緩過敏免疫反應。



參考文獻

- 吳繼恆 (2007) 具影響干擾素 $\gamma$ 分泌的食材對OVA致敏BALB/c小鼠免疫反應的影響 國立臺灣大學微生物與生化學研究所 碩士論文
- 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 國立臺灣大學微生物與生化學研究所 博士論文
- 莊佳穎(2004)山苦瓜活化過氧化體增殖劑活化受器 PPARs 之成分分離與鑑定 國立臺灣大學微生物與生化學研究所 碩士論文
- 陳妙齡 (2006) 松杉靈芝對過敏免疫反應之調節研究 國立臺灣大學微生物與生化學研究所 博士論文
- 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 國立臺灣大學微生物與生化學研究所 碩士論文
- 康智雄 (2009) 影響3T3-L1細胞株分泌細胞激素之食材對高油飲食小鼠的免疫調節作用 國立臺灣大學微生物與生化學研究所 碩士論文
- 羅文音 (2006) 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 國立臺灣大學微生物與生化學研究所 碩士論文
- Agrawal, A., Lingappa, J., Leppla, S. H., Agrawal, S., Jabbar, A., Quinn, C., et al. (2003). Impairment of dendritic cells and adaptive immunity by anthrax lethal toxin. *Nature*, 424(6946), 329-334.
- Agrawal, S., Agrawal, A., Doughty, B., Gerwitz, A., Blenis, J., Van Dyke, T., et al. (2003). Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J Immunol*, 171(10), 4984-4989.
- Akbari, O., Freeman, G. J., Meyer, E. H., Greenfield, E. A., Chang, T. T., Sharpe, A. H., et al. (2002). Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med*, 8(9), 1024-1032.
- Albers, R., van der Wielen, R. P., Brink, E. J., Hendriks, H. F., Dorovska-Taran, V. N., & Mohede, I. C. (2003). Effects of cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA) isomers on immune function in healthy men. *Eur J Clin Nutr*, 57(4), 595-603.
- Angeli, V., Hammad, H., Staels, B., Capron, M., Lambrecht, B. N., & Trottein, F. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits the migration

- of dendritic cells: consequences for the immune response. *J Immunol*, 170(10), 5295-5301.
- Azuma, Y., Shinohara, M., Wang, P. L., & Ohura, K. (2001). 15-Deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2) inhibits IL-10 and IL-12 production by macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 283(2), 344-346.
- Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673), 245-252.
- Barczyk, A., Pierzchala, W., & Sozanska, E. (2003). Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine. *Respir Med*, 97(6), 726-733.
- Barnes, P. J. (1997). Molecular mechanisms of glucocorticoid action in asthma. *Pulm Pharmacol Ther*, 10(1), 3-19.
- Barnes, P. J. (2008). Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol*, 8(3), 183-192.
- Beasley, R., Crane, J., Lai, C. K., & Pearce, N. (2000). Prevalence and etiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 105(2 Pt 2), S466-472.
- Becker, J., Delayre-Orthez, C., Frossard, N., & Pons, F. (2006). Regulation of inflammation by PPARs: a future approach to treat lung inflammatory diseases? *Fundam Clin Pharmacol*, 20(5), 429-447.
- Beeh, K. M., Beier, J., Kornmann, O., Meier, C., Taeumer, T., & Buhl, R. (2003). A single nasal allergen challenge increases induced sputum inflammatory markers in non-asthmatic subjects with seasonal allergic rhinitis: correlation with plasma interleukin-5. *Clin Exp Allergy*, 33(4), 475-482.
- Bellinghausen, I., Brand, U., Steinbrink, K., Enk, A. H., Knop, J., & Saloga, J. (2001). Inhibition of human allergic T-cell responses by IL-10-treated dendritic cells: differences from hydrocortisone-treated dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol*, 108(2), 242-249.
- Benjamin, S., & Spener, F. (2009). Conjugated linoleic acids as functional food: an insight into their health benefits. *Nutr Metab (Lond)*, 6, 36.
- Betz, M., & Fox, B. S. (1991). Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J Immunol*, 146(1), 108-113.
- Bharadwaj, A. S., Bewtra, A. K., & Agrawal, D. K. (2007). Dendritic cells in allergic airway inflammation. *Can J Physiol Pharmacol*, 85(7), 686-699.
- Birrell, M. A., Patel, H. J., McCluskie, K., Wong, S., Leonard, T., Yacoub, M. H., et al. (2004). PPAR-gamma agonists as therapy for diseases involving airway

- neutrophilia. *Eur Respir J*, 24(1), 18-23.
- Blackburn, M. R., Lee, C. G., Young, H. W., Zhu, Z., Chunn, J. L., Kang, M. J., et al. (2003). Adenosine mediates IL-13-induced inflammation and remodeling in the lung and interacts in an IL-13-adenosine amplification pathway. *J Clin Invest*, 112(3), 332-344.
- Booth, B. W., Adler, K. B., Bonner, J. C., Tournier, F., & Martin, L. D. (2001). Interleukin-13 induces proliferation of human airway epithelial cells in vitro via a mechanism mediated by transforming growth factor-alpha. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 25(6), 739-743.
- Braissant, O., Fougère, F., Scotto, C., Dauca, M., & Wahli, W. (1996). Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*, 137(1), 354-366.
- Brewer, J. M., Conacher, M., Satoskar, A., Bluethmann, H., & Alexander, J. (1996). In interleukin-4-deficient mice, alum not only generates T helper 1 responses equivalent to Freund's complete adjuvant, but continues to induce T helper 2 cytokine production. *Eur J Immunol*, 26(9), 2062-2066.
- Chao, C. Y., & Huang, C. J. (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(6 Pt 2), 782-791.
- Chen, M. L., & Lin, B. F. (2007). Effects of triterpenoid-rich extracts of *Ganoderma tsugae* on airway hyperreactivity and Th2 responses in vivo. *Int Arch Allergy Immunol*, 143(1), 21-30.
- Cheng, W. L., Lii, C. K., Chen, H. W., Lin, T. H., & Liu, K. L. (2004). Contribution of conjugated linoleic acid to the suppression of inflammatory responses through the regulation of the NF-kappaB pathway. *J Agric Food Chem*, 52(1), 71-78.
- Chinetti, G., Fruchart, J. C., & Staels, B. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res*, 49(10), 497-505.
- Chuang, C. Y., Hsu, C., Chao, C. Y., Wein, Y. S., Kuo, Y. H., & Huang, C. J. (2006). Fractionation and identification of 9c, 11t, 13t-conjugated linolenic acid as an activator of PPARalpha in bitter melon (*Momordica charantia* L.). *J Biomed Sci*, 13(6), 763-772.
- Chung, S. W., Kang, B. Y., & Kim, T. S. (2003). Inhibition of interleukin-4 production

- in CD4<sup>+</sup> T cells by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) ligands: involvement of physical association between PPAR-gamma and the nuclear factor of activated T cells transcription factor. *Mol Pharmacol*, 64(5), 1169-1179.
- Corry, D. B., & Kheradmand, F. (1999). Induction and regulation of the IgE response. *Nature*, 402(6760 Suppl), B18-23.
- Daynes, R. A., & Jones, D. C. (2002). Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*, 2(10), 748-759.
- de Jong, D. (2005). Molecular pathogenesis of follicular lymphoma: a cross talk of genetic and immunologic factors. *J Clin Oncol*, 23(26), 6358-6363.
- De Smedt, T., Van Mechelen, M., De Becker, G., Urbain, J., Leo, O., & Moser, M. (1997). Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol*, 27(5), 1229-1235.
- Delerive, P., De Bosscher, K., Besnard, S., Vanden Berghe, W., Peters, J. M., Gonzalez, F. J., et al. (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. *J Biol Chem*, 274(45), 32048-32054.
- Dent, L. A., Strath, M., Mellor, A. L., & Sanderson, C. J. (1990). Eosinophilia in transgenic mice expressing interleukin 5. *J Exp Med*, 172(5), 1425-1431.
- Dhar, P., Ghosh, S., & Bhattacharyya, D. K. (1999). Dietary effects of conjugated octadecatrienoic fatty acid (9 cis, 11 trans, 13 trans) levels on blood lipids and nonenzymatic in vitro lipid peroxidation in rats. *Lipids*, 34(2), 109-114.
- Duez, H., Chao, Y. S., Hernandez, M., Torpier, G., Poulain, P., Mundt, S., et al. (2002). Reduction of atherosclerosis by the peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist fenofibrate in mice. *J Biol Chem*, 277(50), 48051-48057.
- Elser, B., Lohoff, M., Kock, S., Giaisi, M., Kirchhoff, S., Krammer, P. H., et al. (2002). IFN-gamma represses IL-4 expression via IRF-1 and IRF-2. *Immunity*, 17(6), 703-712.
- Fossiez, F., Djossou, O., Chomarat, P., Flores-Romo, L., Ait-Yahia, S., Maat, C., et al. (1996). T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med*, 183(6), 2593-2603.
- Gauchat, J. F., Lebman, D. A., Coffman, R. L., Gascan, H., & de Vries, J. E. (1990). Structure and expression of germline epsilon transcripts in human B cells induced by interleukin 4 to switch to IgE production. *J Exp Med*, 172(2), 463-473.

- Gaullier, J. M., Halse, J., Hoye, K., Kristiansen, K., Fagertun, H., Vik, H., et al. (2005). Supplementation with conjugated linoleic acid for 24 months is well tolerated by and reduces body fat mass in healthy, overweight humans. *J Nutr*, *135*(4), 778-784.
- Gelman, L., & Auwerx, J. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors: mediators of a fast food impact on gene regulation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, *2*(4), 307-312.
- Genovese, T., Mazzon, E., Di Paola, R., Cannavo, G., Muia, C., Bramanti, P., et al. (2005). Role of endogenous ligands for the peroxisome proliferators activated receptors alpha in the secondary damage in experimental spinal cord trauma. *Exp Neurol*, *194*(1), 267-278.
- Ghisletti, S., Huang, W., Ogawa, S., Pascual, G., Lin, M. E., Willson, T. M., et al. (2007). Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPARgamma. *Mol Cell*, *25*(1), 57-70.
- Goetzl, E. J., An, S., & Smith, W. L. (1995). Specificity of expression and effects of eicosanoid mediators in normal physiology and human diseases. *FASEB J*, *9*(11), 1051-1058.
- Hammad, H., de Heer, H. J., Soullie, T., Angeli, V., Trottein, F., Hoogsteden, H. C., et al. (2004). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in dendritic cells inhibits the development of eosinophilic airway inflammation in a mouse model of asthma. *Am J Pathol*, *164*(1), 263-271.
- Hasbold, J., Lyons, A. B., Kehry, M. R., & Hodgkin, P. D. (1998). Cell division number regulates IgG1 and IgE switching of B cells following stimulation by CD40 ligand and IL-4. *Eur J Immunol*, *28*(3), 1040-1051.
- Hasin, A., Griinari, J. M., Williams, J. E., Shahin, A. M., McGuire, M. A., & McGuire, M. K. (2007). Consumption of c9,t11-18:2 or t10,c12-18:2 enriched dietary supplements does not influence milk macronutrients in healthy, lactating women. *Lipids*, *42*(9), 835-843.
- Hofstra, C. L., Van Ark, I., Hofman, G., Kool, M., Nijkamp, F. P., & Van Oosterhout, A. J. (1998). Prevention of Th2-like cell responses by coadministration of IL-12 and IL-18 is associated with inhibition of antigen-induced airway hyperresponsiveness, eosinophilia, and serum IgE levels. *J Immunol*, *161*(9), 5054-5060.
- Holgate, S. T. (2000). Inflammatory and structural changes in the airways of patients



- with asthma. *Respir Med*, 94 Suppl D, S3-6.
- Holgate, S. T., & Peters-Golden, M. (2003). Introduction: the anti-inflammatory role of cysteinyl leukotriene receptor antagonists in asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 111(1 Suppl), S1-4.
- Honda, K., Marquillies, P., Capron, M., & Dombrowicz, D. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is expressed in airways and inhibits features of airway remodeling in a mouse asthma model. *J Allergy Clin Immunol*, 113(5), 882-888.
- Hoshino, H., Lotvall, J., Skoogh, B. E., & Linden, A. (1999). Neutrophil recruitment by interleukin-17 into rat airways in vivo. Role of tachykinins. *Am J Respir Crit Care Med*, 159(5 Pt 1), 1423-1428.
- Hsu, C. Y., Liu, H. E., Sheu, F. Y., Leu, S. J., Chiang, B. L., Hsiao, G., et al. (2010). Synergistic therapeutic effects of combined adenovirus-mediated interleukin-10 and interleukin-12 gene therapy on airway inflammation in asthmatic mice. *J Gene Med*, 12(1), 11-21.
- Huang, C. J., & Wu, M. C. (2002). Differential effects of foods traditionally regarded as 'heating' and 'cooling' on prostaglandin E(2) production by a macrophage cell line. *J Biomed Sci*, 9(6 Pt 2), 596-606.
- Huang, J. L. (2005). Asthma severity and genetics in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*, 38(3), 158-163.
- Huang, J. T., Welch, J. S., Ricote, M., Binder, C. J., Willson, T. M., Kelly, C., et al. (1999). Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature*, 400(6742), 378-382.
- Ishibashi, M., Egashira, K., Hiasa, K., Inoue, S., Ni, W., Zhao, Q., et al. (2002). Antiinflammatory and antiarteriosclerotic effects of pioglitazone. *Hypertension*, 40(5), 687-693.
- Jaffar, Z., Sivakuru, T., & Roberts, K. (2004). CD4+CD25+ T cells regulate airway eosinophilic inflammation by modulating the Th2 cell phenotype. *J Immunol*, 172(6), 3842-3849.
- Jaudszus, A., Krokowski, M., Mockel, P., Darcan, Y., Avagyan, A., Matricardi, P., et al. (2008). Cis-9,trans-11-conjugated linoleic acid inhibits allergic sensitization and airway inflammation via a PPARgamma-related mechanism in mice. *J Nutr*, 138(7), 1336-1342.
- Jiang, C., Ting, A. T., & Seed, B. (1998). PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*, 391(6662), 82-86.

- Jones, D. C., Ding, X., & Daynes, R. A. (2002). Nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) is expressed in resting murine lymphocytes. The PPARalpha in T and B lymphocytes is both transactivation and transrepression competent. *J Biol Chem*, 277(9), 6838-6845.
- Koba, K., Akahoshi, A., Yamasaki, M., Tanaka, K., Yamada, K., Iwata, T., et al. (2002). Dietary conjugated linolenic acid in relation to CLA differently modifies body fat mass and serum and liver lipid levels in rats. *Lipids*, 37(4), 343-350.
- Kobori, M., Nakayama, H., Fukushima, K., Ohnishi-Kameyama, M., Ono, H., Fukushima, T., et al. (2008). Bitter melon suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses. *J Agric Food Chem*, 56(11), 4004-4011.
- Kohno, H., Suzuki, R., Noguchi, R., Hosokawa, M., Miyashita, K., & Tanaka, T. (2002). Dietary conjugated linolenic acid inhibits azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Jpn J Cancer Res*, 93(2), 133-142.
- Lambrecht, B. N., De Veerman, M., Coyle, A. J., Gutierrez-Ramos, J. C., Thielemans, K., & Pauwels, R. A. (2000). Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. *J Clin Invest*, 106(4), 551-559.
- Lambrecht, B. N., & Hammad, H. (2003). The other cells in asthma: dendritic cell and epithelial cell crosstalk. *Curr Opin Pulm Med*, 9(1), 34-41.
- Lambrecht, B. N., Salomon, B., Klatzmann, D., & Pauwels, R. A. (1998). Dendritic cells are required for the development of chronic eosinophilic airway inflammation in response to inhaled antigen in sensitized mice. *J Immunol*, 160(8), 4090-4097.
- Larche, M. (2007). Regulatory T cells in allergy and asthma. *Chest*, 132(3), 1007-1014.
- Larsen, T. M., Toubro, S., & Astrup, A. (2003). Efficacy and safety of dietary supplements containing CLA for the treatment of obesity: evidence from animal and human studies. *J Lipid Res*, 44(12), 2234-2241.
- Lee, H., & Agrawal, G. (2003). Suppression of stimulated Brillouin scattering in optical fibers using fiber Bragg gratings. *Opt Express*, 11(25), 3467-3472.
- Lee, J. W., Bajwa, P. J., Carson, M. J., Jeske, D. R., Cong, Y., Elson, C. O., et al. (2007). Fenofibrate represses interleukin-17 and interferon-gamma expression and improves colitis in interleukin-10-deficient mice. *Gastroenterology*, 133(1), 108-123.
- Lee, K. S., Kim, S. R., Park, S. J., Park, H. S., Min, K. H., Jin, S. M., et al. (2006). Peroxisome proliferator activated receptor-gamma modulates reactive oxygen

- species generation and activation of nuclear factor-kappaB and hypoxia-inducible factor 1alpha in allergic airway disease of mice. *J Allergy Clin Immunol*, 118(1), 120-127.
- Lee, K. S., Park, S. J., Hwang, P. H., Yi, H. K., Song, C. H., Chai, O. H., et al. (2005). PPAR-gamma modulates allergic inflammation through up-regulation of PTEN. *FASEB J*, 19(8), 1033-1035.
- Levine, S. J., & Wenzel, S. E. (2010). Narrative review: the role of Th2 immune pathway modulation in the treatment of severe asthma and its phenotypes. *Ann Intern Med*, 152(4), 232-237.
- Linden, A. (2001). Role of interleukin-17 and the neutrophil in asthma. *Int Arch Allergy Immunol*, 126(3), 179-184.
- Liu, L., Rich, B. E., Inobe, J., Chen, W., & Weiner, H. L. (1998). Induction of Th2 cell differentiation in the primary immune response: dendritic cells isolated from adherent cell culture treated with IL-10 prime naive CD4+ T cells to secrete IL-4. *Int Immunol*, 10(8), 1017-1026.
- Luongo, D., Bergamo, P., & Rossi, M. (2003). Effects of conjugated linoleic acid on growth and cytokine expression in Jurkat T cells. *Immunol Lett*, 90(2-3), 195-201.
- Marone, G. (1998). Asthma: recent advances. *Immunol Today*, 19(1), 5-9.
- Matsukura, S., Stellato, C., Georas, S. N., Casolaro, V., Plitt, J. R., Miura, K., et al. (2001). Interleukin-13 upregulates eotaxin expression in airway epithelial cells by a STAT6-dependent mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 24(6), 755-761.
- Menzies-Gow, A., & Robinson, D. S. (2002). Eosinophils, eosinophilic cytokines (interleukin-5), and antieosinophilic therapy in asthma. *Curr Opin Pulm Med*, 8(1), 33-38.
- Molet, S., Hamid, Q., Davoine, F., Nutku, E., Taha, R., Page, N., et al. (2001). IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol*, 108(3), 430-438.
- Mueller, C., Weaver, V., Vanden Heuvel, J. P., August, A., & Cantorna, M. T. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands attenuate immunological symptoms of experimental allergic asthma. *Arch Biochem Biophys*, 418(2), 186-196.
- Mukherjee, R., Jow, L., Noonan, D., & McDonnell, D. P. (1994). Human and rat

- peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) demonstrate similar tissue distribution but different responsiveness to PPAR activators. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 51(3-4), 157-166.
- Nadel, J. A., & Busse, W. W. (1998). Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 157(4 Pt 2), S130-138.
- Novelli, F., D'Elia, M. M., Bernabei, P., Ozmen, L., Rigamonti, L., Almerigogna, F., et al. (1997). Expression and role in apoptosis of the alpha- and beta-chains of the IFN-gamma receptor on human Th1 and Th2 clones. *J Immunol*, 159(1), 206-213.
- Oboki, K., Ohno, T., Saito, H., & Nakae, S. (2008). Th17 and allergy. *Allergol Int*, 57(2), 121-134.
- Park, K. H., Park, J., Koh, D., & Lim, Y. (2002). Effect of saikosaponin-A, a triterpenoid glycoside, isolated from *Bupleurum falcatum* on experimental allergic asthma. *Phytother Res*, 16(4), 359-363.
- Prause, O., Laan, M., Lotvall, J., & Linden, A. (2003). Pharmacological modulation of interleukin-17-induced GCP-2-, GRO-alpha- and interleukin-8 release in human bronchial epithelial cells. *Eur J Pharmacol*, 462(1-3), 193-198.
- Reider, N., Reider, D., Ebner, S., Holzmann, S., Herold, M., Fritsch, P., et al. (2002). Dendritic cells contribute to the development of atopy by an insufficiency in IL-12 production. *J Allergy Clin Immunol*, 109(1), 89-95.
- Ringseis, R., Muller, A., Herter, C., Gahler, S., Steinhart, H., & Eder, K. (2006). CLA isomers inhibit TNFalpha-induced eicosanoid release from human vascular smooth muscle cells via a PPARgamma ligand-like action. *Biochim Biophys Acta*, 1760(2), 290-300.
- Riserus, U., Vessby, B., Arner, P., & Zethelius, B. (2004). Supplementation with trans-10-cis-12-conjugated linoleic acid induces hyperproinsulinaemia in obese men: close association with impaired insulin sensitivity. *Diabetologia*, 47(6), 1016-1019.
- Robinson, J. H., Chapman, C. J., Loveland, B. E., & Jordan, R. K. (1992). T-cell tolerance induced in nude mice grafted with thymic epithelium. *Immunology*, 75(2), 318-324.
- Rockwell, C. E., & Kaminski, N. E. (2004). A cyclooxygenase metabolite of anandamide causes inhibition of interleukin-2 secretion in murine splenocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, 311(2), 683-690.
- Roper, R. L., Brown, D. M., & Phipps, R. P. (1995). Prostaglandin E2 promotes B

- lymphocyte Ig isotype switching to IgE. *J Immunol*, 154(1), 162-170.
- Rothenberg, M. E., & Hogan, S. P. (2006). The eosinophil. *Annu Rev Immunol*, 24, 147-174.
- Sarmishtha, D., Chaiti, G., Sukta, D. (2003) Natural dietary agents can protect against DMBA genotoxicity in lymphocytes as revealed by single cell gel electrophoresis assay. *Teratog Carcinog Mutagen*. (1),71-8.
- Schmidt-Weber, C. B., Akdis, M., & Akdis, C. A. (2007). TH17 cells in the big picture of immunology. *J Allergy Clin Immunol*, 120(2), 247-254.
- Schnyder-Candrian, S., Togbe, D., Couillin, I., Mercier, I., Brombacher, F., Quesniaux, V., et al. (2006). Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *J Exp Med*, 203(12), 2715-2725.
- Sieling, P. A., Wang, X. H., Gately, M. K., Oliveros, J. L., McHugh, T., Barnes, P. F., et al. (1994). IL-12 regulates T helper type 1 cytokine responses in human infectious disease. *J Immunol*, 153(8), 3639-3647.
- Stock, P., Akbari, O., Berry, G., Freeman, G. J., Dekruyff, R. H., & Umetsu, D. T. (2004). Induction of T helper type 1-like regulatory cells that express Foxp3 and protect against airway hyper-reactivity. *Nat Immunol*, 5(11), 1149-1156.
- Straus, D. S., & Glass, C. K. (2007). Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. *Trends Immunol*, 28(12), 551-558.
- Sunyer, J., Anto, J. M., Sabria, J., Roca, J., Morell, F., Rodriguez-Roisin, R., et al. (1995). Relationship between serum IgE and airway responsiveness in adults with asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 95(3), 699-706.
- Suzuki, R., Noguchi, R., Ota, T., Abe, M., Miyashita, K., & Kawada, T. (2001). Cytotoxic effect of conjugated trienoic fatty acids on mouse tumor and human monocytic leukemia cells. *Lipids*, 36(5), 477-482.
- Swain, S. L., Weinberg, A. D., English, M., & Huston, G. (1990). IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol*, 145(11), 3796-3806.
- Takagi, T., Itabashi, Y. (1981) Occurrence of mixtures of geometrical isomers of conjugated octadecatrienoic acids in some seed oils: analysis by open-tubular gas liquid chromatography and high performance liquid chromatography. *Lipids*. (16),546-51
- Tan, M. J., Ye, J. M., Turner, N., Hohnen-Behrens, C., Ke, C. Q., Tang, C. P., et al. (2008). Antidiabetic activities of triterpenoids isolated from bitter melon

- associated with activation of the AMPK pathway. *Chem Biol*, 15(3), 263-273.
- Tanaka, T., Kohno, H., Yoshitani, S., Takashima, S., Okumura, A., Murakami, A., et al. (2001). Ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma inhibit chemically induced colitis and formation of aberrant crypt foci in rats. *Cancer Res*, 61(6), 2424-2428.
- Teixeira, L. K., Fonseca, B. P., Barboza, B. A., & Viola, J. P. (2005). The role of interferon-gamma on immune and allergic responses. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100 Suppl 1, 137-144.
- Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R. A., Budavari, A. I., & Spiegelman, B. M. (1994). mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev*, 8(10), 1224-1234.
- Trifilieff, A., Bench, A., Hanley, M., Bayley, D., Campbell, E., & Whittaker, P. (2003). PPAR-alpha and -gamma but not -delta agonists inhibit airway inflammation in a murine model of asthma: in vitro evidence for an NF-kappaB-independent effect. *Br J Pharmacol*, 139(1), 163-171.
- Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, 3(2), 133-146.
- Tsuzuki, T., Kawakami, Y., Abe, R., Nakagawa, K., Koba, K., Imamura, J., et al. (2006). Conjugated linolenic acid is slowly absorbed in rat intestine, but quickly converted to conjugated linoleic acid. *J Nutr*, 136(8), 2153-2159.
- Ueki, S., Matsuwaki, Y., Kayaba, H., Oyamada, H., Kanda, A., Usami, A., et al. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates eosinophil functions: a new therapeutic target for allergic airway inflammation. *Int Arch Allergy Immunol*, 134 Suppl 1, 30-36.
- van der Pouw Kraan, T. C., Boeijs, L. C., de Groot, E. R., Stapel, S. O., Snijders, A., Kapsenberg, M. L., et al. (1997). Reduced production of IL-12 and IL-12-dependent IFN-gamma release in patients with allergic asthma. *J Immunol*, 158(11), 5560-5565.
- van Scott, M. R., Justice, J. P., Bradfield, J. F., Enright, E., Sigounas, A., & Sur, S. (2000). IL-10 reduces Th2 cytokine production and eosinophilia but augments airway reactivity in allergic mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 278(4), L667-674.
- Vermaelen, K. Y., Carro-Muino, I., Lambrecht, B. N., & Pauwels, R. A. (2001). Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. *J Exp Med*, 193(1), 51-60.

- Vuillermin, P. J., Robertson, C. F., & South, M. (2007). Parent-initiated oral corticosteroid therapy for intermittent wheezing illnesses in children: systematic review. *J Paediatr Child Health*, 43(6), 438-442.
- Wakashin, H., Hirose, K., Maezawa, Y., Kagami, S., Suto, A., Watanabe, N., et al. (2008). IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice. *Am J Respir Crit Care Med*, 178(10), 1023-1032.
- Walker, C., Bode, E., Boer, L., Hansel, T. T., Blaser, K., & Virchow, J. C., Jr. (1992). Allergic and nonallergic asthmatics have distinct patterns of T-cell activation and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis*, 146(1), 109-115.
- Wan, Y. Y., & Flavell, R. A. (2007). 'Yin-Yang' functions of transforming growth factor-beta and T regulatory cells in immune regulation. *Immunol Rev*, 220, 199-213.
- Wang, A. C., Dai, X., Luu, B., & Conrad, D. J. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma regulates airway epithelial cell activation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 24(6), 688-693.
- Woerly, G., Honda, K., Loyens, M., Papin, J. P., Auwerx, J., Staels, B., et al. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma down-regulate allergic inflammation and eosinophil activation. *J Exp Med*, 198(3), 411-421.
- Woolcock, A. J., & Peat, J. K. (1997). Evidence for the increase in asthma worldwide. *Ciba Found Symp*, 206, 122-134; discussion 134-129, 157-129.
- Yang, M., & Cook, M. E. (2003). Dietary conjugated linoleic acid decreased cachexia, macrophage tumor necrosis factor-alpha production, and modifies splenocyte cytokines production. *Exp Biol Med (Maywood)*, 228(1), 51-58.
- Yang, W., Rachez, C., & Freedman, L. P. (2000). Discrete roles for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor in recruiting nuclear receptor coactivators. *Mol Cell Biol*, 20(21), 8008-8017.
- Yang, X., Wang, S., Fan, Y., & Han, X. (2000). IL-10 deficiency prevents IL-5 overproduction and eosinophilic inflammation in a murine model of asthma-like reaction. *Eur J Immunol*, 30(2), 382-391.
- Ye, Y. L., Lee, Y. L., Chuang, Z. J., Lai, H. J., Chen, C. C., Tao, M. H., et al. (2004). Dendritic cells modulated by cytokine-expressing adenoviruses alleviate eosinophilia and airway hyperresponsiveness in an animal model of asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 114(1), 88-96.
- Yu, Y., Correll, P. H., & Vanden Heuvel, J. P. (2002). Conjugated linoleic acid

decreases production of pro-inflammatory products in macrophages: evidence for a PPAR gamma-dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta*, 1581(3), 89-99.

Zamamiri-Davis, F., Lu, Y., Thompson, J. T., Prabhu, K. S., Reddy, P. V., Sordillo, L. M., et al. (2002). Nuclear factor-kappaB mediates over-expression of cyclooxygenase-2 during activation of RAW 264.7 macrophages in selenium deficiency. *Free Radic Biol Med*, 32(9), 890-897.

Zhang, Y., Dewitt, D. L., Murugesan, S., & Nair, M. G. (2005). Cyclooxygenase-2 enzyme inhibitory triterpenoids from *Picrorhiza kurroa* seeds. *Life Sci*, 77(25), 3222-3230.

Zhao, L. L., Linden, A., Sjostrand, M., Cui, Z. H., Lotvall, J., & Jordana, M. (2000). IL-12 regulates bone marrow eosinophilia and airway eotaxin levels induced by airway allergen exposure. *Allergy*, 55(8), 749-756.

