

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

利用切除卵巢鼠之動物模式探討紅麴山藥對於停經後
骨質疏鬆症之影響

Study on *Monascus*-fermented dioscorea in ovariectomized
rat model of postmenopausal osteoporosis

張尚平

Shang-Ping Chang

指導教授：潘子明 博士

Advisor: Tzu-Ming Pan, Ph.D.

中華民國 99 年 7 月

July, 2010

謝辭

本篇論文能夠順利完成，首要感謝潘子明老師全程費心的指導，在起初我迷失方向時拉我一把，在實驗的過程中，給予用心的指導與建議，潘老師對我的恩德與研究的態度，著實令我感佩。我很感謝在實驗起初及中間過程中，給與我指導與協助的兩青學姊、保宏、小夫，還有小花、建利學長、大牛、阿包、德翰、小郭、稚婷、庭宏等學長及同學在動物實驗上的幫忙與協助，以及許多實驗室的學長姊、同學在我實驗進行中給予的協助與指導。在進行動物實驗的開始，由衷感謝郭宗甫老師熱心地給予技術上的指導與實驗器材上的支援，同時對於實驗架構給予許多的建議與指導，使我受益良多，郭老師熱心的指導及做研究的態度，著實令我感佩。在台大醫院核醫部進行 micro-CT 實驗的期間，十分感謝曾主任以及兩位學長的協助與建議，對我的實驗幫助很大。在因緣際會下，認識了林子閔學長，十分感謝學長對於實驗的方向給予莫大的指導與建議，並不厭其煩的幫忙我解決問題，子閔學長的熱心協助，讓我十分的感動，在此致上誠摯的謝意。在中原大學進行骨密度測定的期間，十分感謝蔡敬民老師及鄭秀卿老師的協助與指導，得以使我完成實驗上重要的一環，也要感國基姨丈辛苦的幫忙運送動物往返中原大學與台大。

我的家人親友永遠是我心靈上的避風港，在我感到煩悶、困頓、挫折的時候，家人總會給我不斷的鼓勵與精神上的支持，且提供我物質上的支持，使我能無後顧之憂的完成學業，在此致上最深的謝意！

從大學農經系跨領域至微生所就讀，是追求我的興趣，亦是我的一個目標，在這短短一年實踐的過程中，很辛苦，但達成的那一刻，全都是甜蜜。

縮寫表

- ALP (alkaline phosphatase): 鹼性磷酸酶
- ALT (aspartate aminotransferase): 天門冬胺酸轉胺酶
- AST (alanine aminotransferase): 丙胺酸轉胺酶
- BGP (bone-GLA-protein): 骨鈣胺酸蛋白
- BMC (bone mineral content): 骨礦物含量
- BMD (bone mineral density): 骨質密度
- BUN (blood urea nitrogen): 血中尿素氮
- CAT (catalase): 觸酶
- DEXA (dual energy x-ray absorptiometry): 雙能量 X 射線吸收儀
- DHEA (dehydroepiandrosterone): 去氫皮脂酮
- DPPH (α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl): 1,1-二苯基苦味肼基自由基
- ER (estrogen receptor): 雌激素受器
- E1 (estrone): 雌酮
- E2 (estradiol): 雌二醇
- GABA (γ -amino butyric acid): γ -胺基丁酸
- GSH-Px (glutathione peroxidase): 麩胱甘肽過氧化酶
- HDL (high density lipoprotein cholesterol): 高密度脂蛋白
- HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA): 羥甲基戊二酸輔酶 A
- HPLC (high performance liquid chromatography): 高效液相層析
- HRT (hormone replacement therapy): 賀爾蒙替代治療
- LDL (low density lipoprotein): 低密度脂蛋白
- Micro-CT (microcomputed tomography): 微型電腦斷層儀
- NADPH (reduced nicotinamide adenine dinucleotide): 還原態之菸鹼胺醯胺腺嘌呤雙核酸
- PDA (Potato dextrose agar): 馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基
- PTH (parathyroid hormone): 副甲狀腺激素
- RMD (red mold dioscorea): 紅麴山藥

SCFA (short chain fatty acid): 短鏈脂肪酸

SHBG (sex hormone-binding globulin): 性激素結合蛋白

SOD (superoxide dismutase): 超氧化歧化酶



中文摘要

本實驗利用切除卵巢鼠作為模擬停經後婦女的動物模式，分別利用不同劑量的山藥與紅麴山藥，及以大豆異黃酮做為正控制組分別餵食大鼠，觀察大鼠骨質的變化情況。Citrinin、monacolin K、monascin 及 ankaflavinc 的濃度分別為4.63 ppm、104.8 ppm、369 ppm、602.8 ppm。山藥及紅麴山藥不含異黃酮類及木質酚類植物雌激素，但皆含薯蕷皂苷配基 (diosgenin)，在紅麴山藥及山藥的含量分別為1.36 mg/g 及 0.68 mg/g。進行手術前後利用微型電腦斷層儀 (microcomputed tomography, micro-CT) 及雙能量 X 射線吸收儀 (dual energy x-ray absorptiometry, DEXA) 測定骨質狀況，結果顯示手術前各組骨質無明顯的差異，手術三個月後即誘導出骨質疏鬆症。接下來餵食樣品四週後，由 micro-CT 影像定量結果可知，各組的骨質狀況相對於 OVX 組皆有改善，尤以餵食紅麴山藥組 I. RMD 2X、II. RMD 2X 最為顯著。餵食大豆異黃酮組 (ISO) 之骨鹼性磷酸酶 (bone alkaline phosphatase, bone-ALP) 活性有較高的趨勢，而本實驗餵食的樣本 (山藥與紅麴山藥) 對於大鼠之活性無顯著的影響。由骨鈣素濃度測定結果可知，除了 I. dioscorea 1X 組之外，其餘各組之骨質合成作用相對於 OVX 組皆有改善。右股骨進行 micro-CT 3D 影像分析結果中，觀察出試驗組各組與 OVX 組比較，骨質皆有正向的改善，尤以 ISO、I. RMD 2X、II. RMD 2X 三組改善最為顯著。右股骨遠端骨小樑定量的結果中，餵食異黃酮組與餵食兩倍劑量的紅麴山藥組，骨質相較於 OVX 組有改善的趨勢，其中骨小樑厚度之分析結果具有顯著差異。在肝、腎血清指標及染色切片的安全性評估中，除了因切除卵巢引起的脂肪堆積，造成少數輕微至中度脂肪肝的情況之外，其他指標與檢驗皆為正常。

關鍵詞：切除卵巢鼠、骨質疏鬆症、植物雌激素、紅麴山藥、微型電腦斷層儀、雙能量 X 射線吸收儀

Abstract

This experiment established the ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis and used different dosage of dioscorea and red mold dioscorea as well as soy isoflavone as positive control to study the changing in rats' bones. The concentrations of citrinin, monacolin K, monascin, and ankaflavin in red mold dioscorea were 4.63 ppm, 104.8 ppm, 369 ppm, and 602.8 ppm, respectively. No phytoestrogens were found in neither red mold dioscorea nor dioscorea, except for diosgenin. The concentrations of diosgenin in red mold dioscorea and dioscorea were 1.36 mg/g and 0.68 mg/g, respectively. Before and after operation, micro-CT (microcomputed tomography) and DEXA (dual energy x-ray absorptiometry) were used to measure the bone mass condition. Results showed that bone conditions had no significant difference among groups before operation and osteoporosis was induced after operation for three months. After feeding samples for four weeks, the bone mass conditions of each group were improved in comparison with OVX group by the quantification of micro-CT images. I. RMD 2X · II. RMD 2X · II. RMD 2X these three groups showed remarkable improvement. The bone-ALP (bone alkaline phosphatase) activity was higher in the soy isoflavone feeded group (ISO) and other experimental groups feeded red mold dioscorea and dioscorea showed no significant influence in bone-ALP activity. In the analyzing results of osteocalcin concentrations, each group had better bone-formation condition than OVX group, except for I. dioscorea 1X. With micro-CT 3 D images each experimental group has positive changes of bone mass condition in comparison with OVX group, especially ISO · I. RMD 2X · II. RMD 2X these three groups. By the quantification of right distal femurs' trabecular bones, ISO · I. RMD 2X · II. RMD 2X these groups showed positive changes of bone mass condition in comparison with OVX group and showed statistically significance in the analyzing results of trabecular thickness. As to liver and kidney index in serum and histopathological examination, every index and examination were normal except for a few slight to moderate fatty change in livers causing by ovariectomized-induced fatty accumulation.

Key words: ovariectomized rat, osteoporosis, phytoestrogen, red mold dioscorea, micro-CT, DEXA

目錄

縮寫表	i
中文摘要	iii
Abstract	iv
表目錄	ix
圖目錄	x
第壹章 文獻回顧	1
一、紅麴特性簡	1
二、紅麴生產之二次代謝物及其功效	3
(一) 色素	3
(三) 膽固醇合成抑制劑 (monacolins)	5
(四) 降血壓物質 (GABA)	9
(五) 防癌物質	9
(六) 降血糖物質	9
(七) 麥角固醇	9
(八) 抗氧化物質-Dimerumic acid	10
(九) 長鏈脂肪酸之產生	10
(十) 抗疲勞功效	10
(十一) 護肝功能	11
(十二) 促進骨骼成長	11
三、山藥及其生理效用	12
(一) 山藥分佈	13
(二) 山藥種類	13
(三) 山藥成分	15
(四) 山藥之保健作用	16

四、紅麴以山藥作發酵基質之差異化與複合性功效.....	21
五、人體骨骼、組成及代謝之簡介.....	21
(一) 骨骼的組成.....	21
(二) 骨骼的代謝.....	22
(三) 營養對骨骼代謝的影響.....	23
(四) 雌激素對骨骼的影響.....	24
(一) 植物雌激素之種類與來源.....	27
(二) 植物雌激素之生理功能.....	35
第貳章 研究動機與目的.....	39
第參章 材料與方法.....	42
一、菌株之培養.....	42
(一) 試驗菌株：.....	42
(二) 培養基組成.....	42
二、儀器.....	43
(一) 固態培養相關設備.....	43
(二) 萃取及分析相關設備.....	43
(三) 骨質密度測定相關設備.....	43
三、藥品.....	44
(一) 標準品.....	44
(二) 培養基.....	44
(三) 其餘藥品、溶劑皆為試藥級.....	44
四、固態培養方法與條件.....	44
(一) 種菌之培養.....	44
(二) 固態培養.....	44
五、Monacolin K、monascin、ankaflavinc、citrinin 與植物雌激素分析方式	46

(一) Monacolin K、monascin、ankaflavinc 與 citrinin 分析方式.....	46
(二) 植物雌激素分析方式.....	48
六、紅麴山藥改善骨質疏鬆之評估.....	50
(一) 實驗動物之飼養.....	50
(二) 試驗物質與餵食劑量訂定.....	50
(三) 實驗動物之分組.....	53
(四) 骨質疏鬆模式大鼠之誘導.....	55
(五) 飼料之製備.....	55
(六) 骨質密度之測度.....	58
(七) 動物犧牲、採血及肝臟病理切片鏡檢.....	58
(八) 血液骨質生化指標 (biomarker) 之測定.....	59
七、生物統計分析方法.....	60
第肆章 結果與討論.....	61
一、Citrinin、Monacolin K、monascin、ankaflavinc 與植物雌激素之分析... 61	61
(一) 紅麴山藥中 citrinin 含量之分析.....	61
(二) Monacolin K、monascin 及 ankaflavinc 之分析.....	68
(三) 山藥與紅麴山藥之植物雌激素分析.....	73
二、動物攝食量以及體重紀錄.....	90
三、雙能量 X 射線吸收儀 (dual energy x-ray absorptiometry, DEXA).....	93
四、微型電腦斷層儀之骨質分析.....	97
(一) 餵食前骨質疏鬆動物模式之誘導.....	97
(二) 餵食樣品四週後骨質變化情況.....	104
五、血清骨質代謝指標分析.....	108
(一) 骨鹼性磷酸酶 (bone alkaline phosphatase, bone-ALP).....	108
(二) 骨鈣素 (osteocalcin).....	110

六、微型電腦斷層儀之股骨骨質分析	112
(一) 影像分析	112
(二) 右股骨遠端骨小樑定量	114
七、肝腎指數與病理切片分析	116
(一) 血清肝腎指數分析	116
(二) 肝、腎切片鏡檢	119
第伍章 結論	121
一、Citrinin、monacolin K、monascin、ankaflavinc 與植物雌激素之分析 ..	121
二、餵食樣品前後骨質的變化情況	121
三、未來展望	122



表目錄

表 2-1、根據山藥有效劑量定出餵食劑量.....	51
表 2-2、根據 diosgenin 有效劑量定出餵食劑量.....	52
表 2-3、各組飼料組成.....	57
表 4-1、Citrinin 標準品之 HPLC 分析結果.....	62
表 4-2、紅麴山藥樣品中 citrinin 之 HPLC 分析結果.....	63
表 4-3、Daidzein, genistein 及 formononetin 標準品之 HPLC 分析結果.....	74
表 4-4、Secoisolariciresinol 不同濃度標準品之 HPLC 分析結果.....	80
表 4-5、Diosgenin 不同濃度標準品之 HPLC 分析結果.....	84
表 4-6、紅麴山藥、山藥樣品中 diosgenin 之 HPLC 分析結果.....	85
表 4-7、切除卵巢前之 micro-CT 影像定量.....	100
表 4-8、切除卵巢三個月後之 micro-CT 影像定量.....	103
表 4-9、餵食四週後之 micro-CT 影像定量.....	107
表 4-7、骨小樑定量.....	115
表 4-8、血清肝指數.....	117
表 4-9、血清腎指數.....	118

圖目錄

圖 1-2、紅麴色素之結構.....	4
圖 1-3、3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA (HMG-CoA) 還原酶路徑.....	8
圖 1-4、控制破骨細胞與造骨細胞的賀爾蒙.....	25
圖 1-5、雌激素缺乏對骨質流失之影響.....	26
圖 1-6、黃豆中異黃酮的化學構造.....	29
圖 1-7、哺乳動物及植物中木質酚的化學構造.....	31
圖 1-8、苜蓿中兩種香豆素 coumestrol 與 4'-methoxycoumestrol 的結構.....	33
圖 1-9、雌激素 (estrogen) 與薯蕷皂苷配基 (diosgenin) 的化學構造.....	34
圖 2-1、本研究大綱與流程.....	41
圖 3-1、實驗動物分組.....	54
圖 4-1、Citrinin 之 HPLC 檢量曲線.....	64
圖 4-2、Citrinin 不同濃度標準品、紅麴山藥樣品之 HPLC 圖譜.....	67
圖 4-3、Monacolin K、monascin 及 ankaflavinc 標準品、紅麴山藥樣品之 HPLC 圖譜.....	69
圖 4-4、Monacolin K 之 檢量曲線.....	70
圖 4-5、Monascin 之 檢量曲線.....	71
圖 4-6、Ankaflavinc 之 檢量曲線.....	72
圖 4-7、Daidzein, genistein 及 formononetin 標準品、山藥樣品、紅麴山藥樣品之 HPLC 圖譜.....	76
圖 4-8、Genistein、daidzein、山藥樣品、紅麴山藥樣品全波段光譜.....	77
圖 4-9、Secoisolariciresinol 標準品、山藥及紅麴山藥樣品 HPLC 圖譜.....	81
圖 4-10、Diosgenin 之檢量曲線.....	86
圖 4-11、Diosgenin 標準品、紅麴山藥、山藥樣品之 HPLC 圖譜.....	88
圖 4-12、Diosgenin 標準品，紅麴山藥樣品及山藥樣品之全波段圖譜.....	89

圖 4-13、大鼠之平均體重.....	91
圖 4-14、大鼠之平均攝食量.....	92
圖 4-15、大鼠餵食前之髌關節骨密度.....	94
圖 4-16、大鼠餵食前股骨遠端骨密度.....	95
圖 4-17、大鼠餵食前之脛骨近端骨密度.....	96
圖 4-18、切除卵巢前大鼠之膝關節橫截面骨質狀況.....	98
圖 4-19、切除卵巢前大鼠之股骨遠端與脛骨近端縱切面骨質狀況.....	99
圖 4-20、切除卵巢三個月後大鼠之膝關節橫截面骨質狀況.....	101
圖 4-21、切除卵巢三個月後大鼠之股骨遠端與脛骨近端縱切面骨質狀況.....	102
圖 4-22、餵食樣品四週後大鼠之膝關節橫截面骨質狀況.....	105
圖 4-23、餵食樣品四週後大鼠之股骨遠端與脛骨近端縱切面骨質狀況.....	106
圖 4-24、大鼠血清中骨鹼性磷酸酶之活性.....	109
圖 4-25、大鼠血清中骨鈣素之濃度.....	111
圖 4-26、大鼠之股骨遠端之 micro-CT 3 D 影像分析.....	113

第壹章 文獻回顧

一、紅麴特性簡

紅麴菌 (*Monascus*) 為中國固有發酵菌種，而紅麴則是由紅麴菌和米混合發酵產生，傳統上紅麴被應用為釀酒原料、食品著色劑、肉品防腐及中藥材，在我國歷史上於飲食、醫藥上的應用已逾千年。紅麴菌廣泛存在於穀類、澱粉、新鮮牧草、泥土、魚乾、河川表面沈澱物及松樹根組織中。在歐洲視紅麴菌為腐敗菌；但在東亞地區，紅麴菌卻是傳統用於食品加工的微生物之一，且常被作為食品的天然色素來源或用於食品保存。

紅麴菌有橫隔菌絲 (septate hypha)，且可產生有性厚壁子囊 (ascus)，屬於真菌界 (Fungi) 中的子囊菌門 (Ascomycota)，子囊菌綱 (Ascomycetes)，不整子囊菌目 (Plectascales)，紅麴菌科 (Monascaceae)，紅麴菌屬 (*Monascus*)。紅麴菌為雌雄同體 (homothallic)，能以單一細胞之分生孢子 (one-celled conidia) 進行無性生殖或生產子囊果 (cleistothecium) 進行有性生殖 (林，1983；林，1995)。紅麴菌屬 (*Monascus*) 之研究是在 1884 年由法國學者 van Tieghem 為分離在馬鈴薯培養基上所發現之兩種真菌所建立的 (李，1997)。1983 年 Hawksworth 與 Pitt 依照不同培養基形態、菌株生長速度、閉囊果的顏色等將其劃分為 *M. polosus*, *M. purpureus* 與 *M. ruber*。

紅麴菌之生活史如圖 1-1 所示，紅麴菌為雌雄同體 (homothallic)，其營養菌絲呈不規則狀分歧，內有大型液泡、微小體、粒線體與隔膜結構，可藉由分生孢子 (conidium) 行無性生殖或產生子囊果行有性生殖。行有性生殖時，位於菌絲頂端之精子器 (antheridium) 會延長為一多核管狀細胞，雌性母細胞也同時分裂為受精毛 (trichogyne) 與造囊果 (ascogonium)，精子器之核藉受精毛移入造囊果而融合。結合後造囊果膨大發育，形成直徑約 20~40 μm 之子囊果，待成熟後子囊孢子會自子囊果裂口處釋出，再開始其新的生活史 (蘇等，1970)。

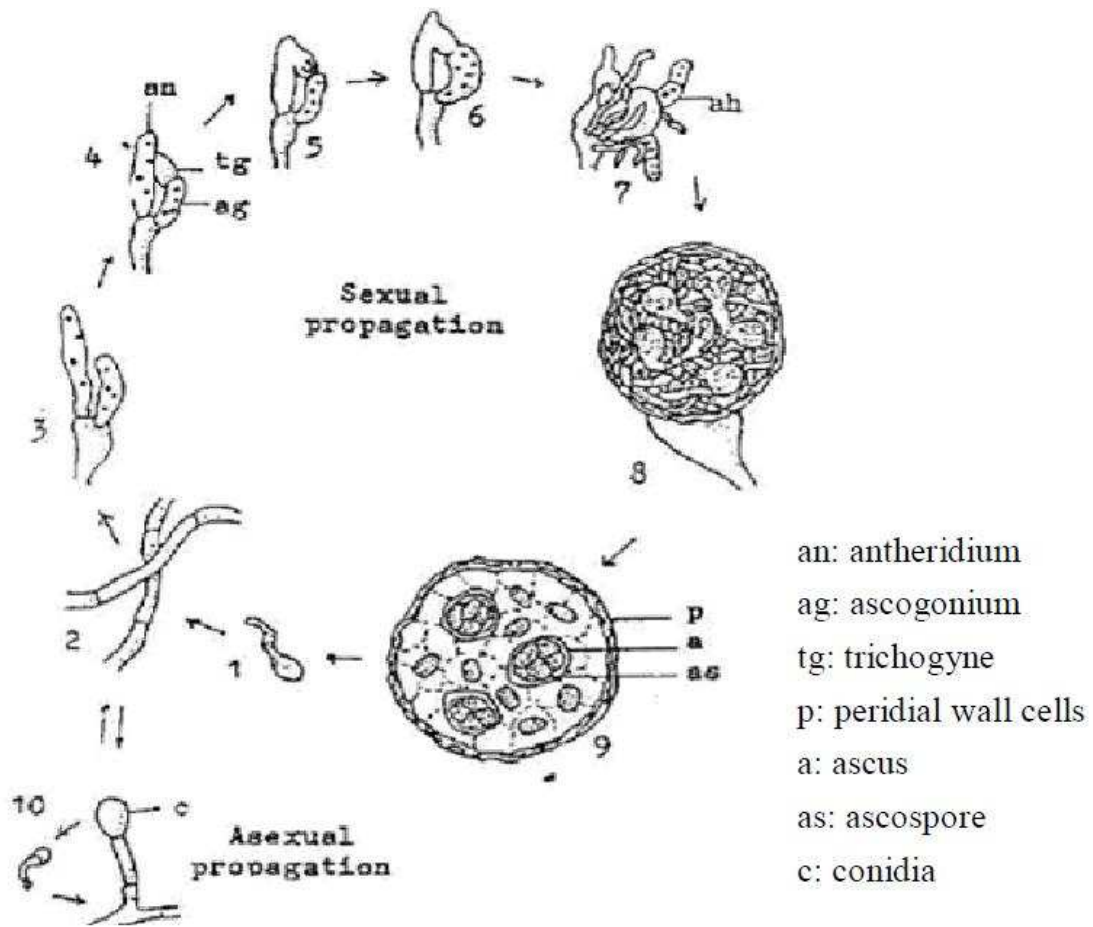


圖 1-1、紅麴菌之生活史 (蘇等, 1970)

Fig. 1-1. Life cycle of *Monascus* species

1, 2: 子囊孢子形成營養菌絲

3→7: 生殖器官之形成與造囊菌絲之發育

8, 9: 成熟之子囊果

10: 單一細胞分生孢子 (one cell conidia) 之無性生殖

二、紅麴生產之二次代謝物及其功效

(一) 色素

紅麴色素的研究很廣，目前已知有八種化學結構被確定出來 (圖 1-2)，可分為紅色素 (monascorubramine 及 rubropunctamine)、橘色素 (monascorubrin, rubropunctatin) 及黃色素 (ankaflavin, monascin, yellow II 及 xanthomonascin A) 三類。橘色素是經由一連串酵素反應合成，對胺基酸有高度親和力。當橘色素和胺基酸反應後，會生成水溶性的紅色素，而黃色素的詳細的形成機制尚未完全明瞭 (Juzlova *et al.*, 1996a; Blanc *et al.*, 1994)。在紅麴菌的培養過程中，生成的色素易和培養基質中的胺基酸分子反應，進而溶解於基質中 (Blanc *et al.*, 1994)。

紅麴色素在自然狀態下易受光、溫度及 pH 值影響。Fabre 等人對紅麴色素的安定性做探討時發現，在水溶液狀態時，紅色素對光及熱的敏感性較黃色素高，而抗氧化劑的存在可減少紅色素的褪色反應。由此可知，在紅麴菌所產生的色素中，紅色素較黃色素不安定。在實驗中，*Monascus ruber* 所產生的色素在中性或鹼性的環境下較安定；在肉製品的加工過程中，添加紅麴萃出物的香腸，在 4°C 真空保存 3 個月時，色素穩定性達 92-98%，且在食品官能品評時有較佳的風味及口感，認為可取代傳統肉製品之亞硝酸鹽或人工色素 (Fabre *et al.*, 1993)。而 (陳等, 1997) 亦得到類似之結果，經液體紅糟的浸漬，能賦予豬肉相當的紅色。長久以來，紅麴已被國人做為食品著色劑及香料使用，且多數中外學者的研究報告皆指出，紅麴色素的安全性極高，故可認為紅麴色素是很安全的食品添加物。另據日本專利 (專利公開特許公報 96532 號) 指出，以梔子 (gargenia) 之抽出物加入培養基中培養紅麴菌，可產生對光、熱穩定之黃、綠、藍色素。此外；*Monascus purpureus* 生產的色素已核准可用於食品 (Blanc *et al.*, 1994)。

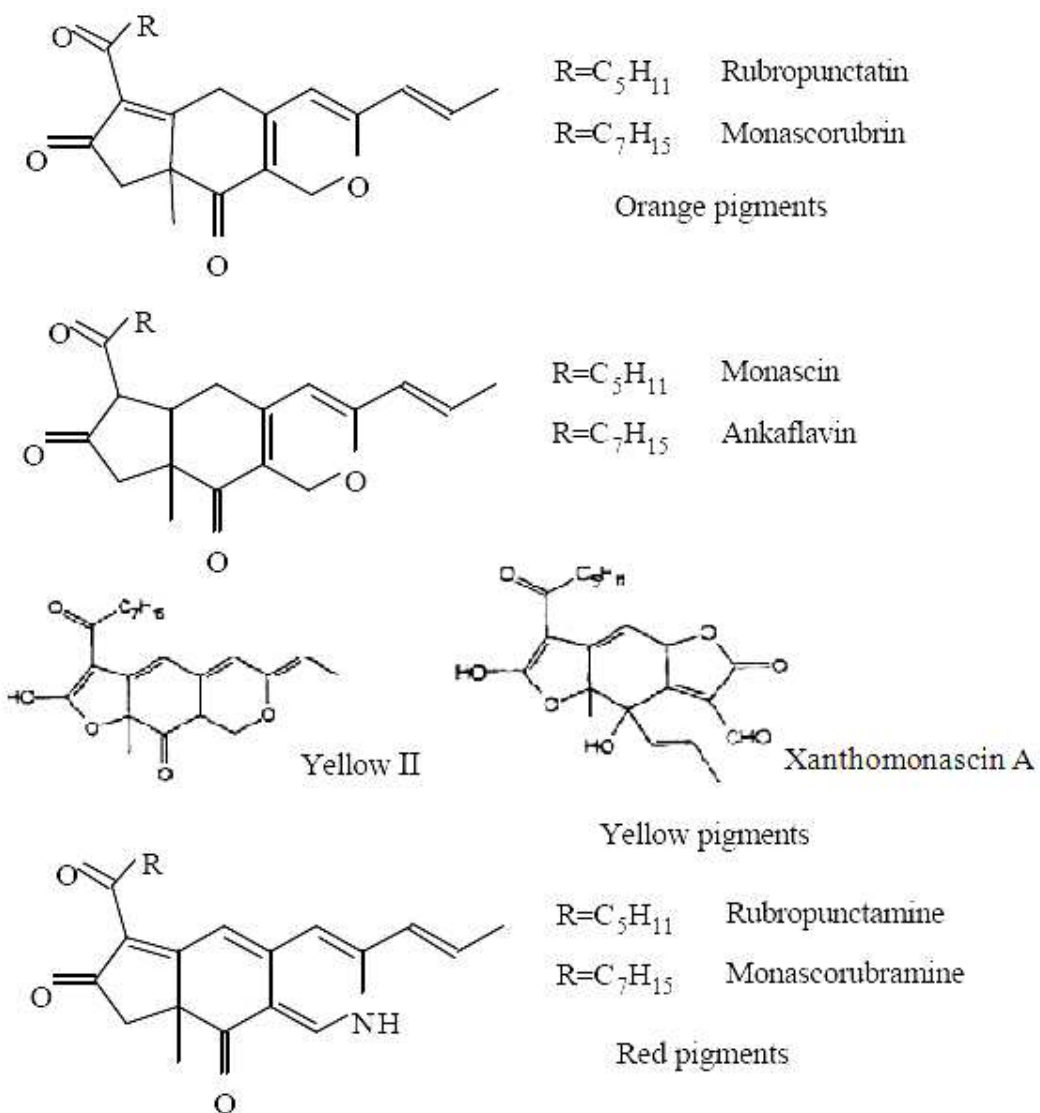


圖 1-2、紅麴色素之結構

Fig. 1-2. Structure of pigment produced by *Monascus* sp.

(二) 抗腐敗菌物質 (monascidin):

Monascus purpureus 於 1977 年首次被 Wong 及 Bau 等人報導具有抗菌效果，經學者研究，分離出 monascidin A 為主要的有效抗菌成分。Monascidin A 是一種較黃、橘、紅色素極性高，對神經有毒性的代謝產物，為對於 *Bacillus*, *Streptococcus* 與 *Pseudomonas* 等食品腐敗菌有抑制作用的狹效性抗生素 (Wong and Koehler, 1981)。

Blanc 等人於 1995 年利用氣相層析-質譜儀 (gas chromatography-mass, GC-MS)、核磁共振儀 (nuclear magnetic resonance, NMR)、紅外光譜儀 (infrared, IR) 等分析方法認定 monascidin A 就是 citrinin (Blanc *et al.*, 1995)。Monascidin A 的活性受培養條件所影響，Wong 與 Koehler (1981) 以 0.8% 的酵母萃出物及 10% 的葡萄糖作為培養基質振盪培養時，紅麴菌抗菌物質的產量較佳，同時菌絲內之紅麴色素亦較多，而 acetate 會抑制抗菌物質的生成，但此時色素的產量僅稍微受影響 (Wong and Koehler, 1981)。另外，由 *Monascus anka* 中分離得到一種新的抗菌物質，其結構類似 α, β -unsaturated γ -lactone 的衍生物稱之為 ankalactone。此一物質顯著抑制 *Escherichia coli* 及 *Bacillus subtilis* 的生長，但其抑菌效應比 monascorubin 或 rubropunctatin 低 (Nozaki *et al.*, 1991)。

(三) 膽固醇合成抑制劑 (monacolins)

Monacolin K 為紅麴菌及 *Aspergillus* 等絲狀真菌所產生之降膽固醇化合物，其別名包含了 lovastatin, mevinolin, mevacor, MK803, mevinacor 及 mevlor。遠藤在日本三共藥廠資助下，率先於分離自泰國發酵食品的粉紅紅麴菌 *Monascus ruber* 的培養液中找到 monacolin K (Endo *et al.*, 1979)。三共藥廠所用之生產菌株 *Monascus ruber* M-1005 在三角瓶培養下，monacolin 最終含量約為 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。由小型發酵槽嚴密控制培養條件時，產量可提高到 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，固態培養結果為 540 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。Merck 美國藥廠也從 *Aspergillus terreus* 之培養液中發現同一化合物 (Albert *et al.*, 1980)，以 mevinolin 的商品名上市，1991 年全美銷售額超過美金十

億元。

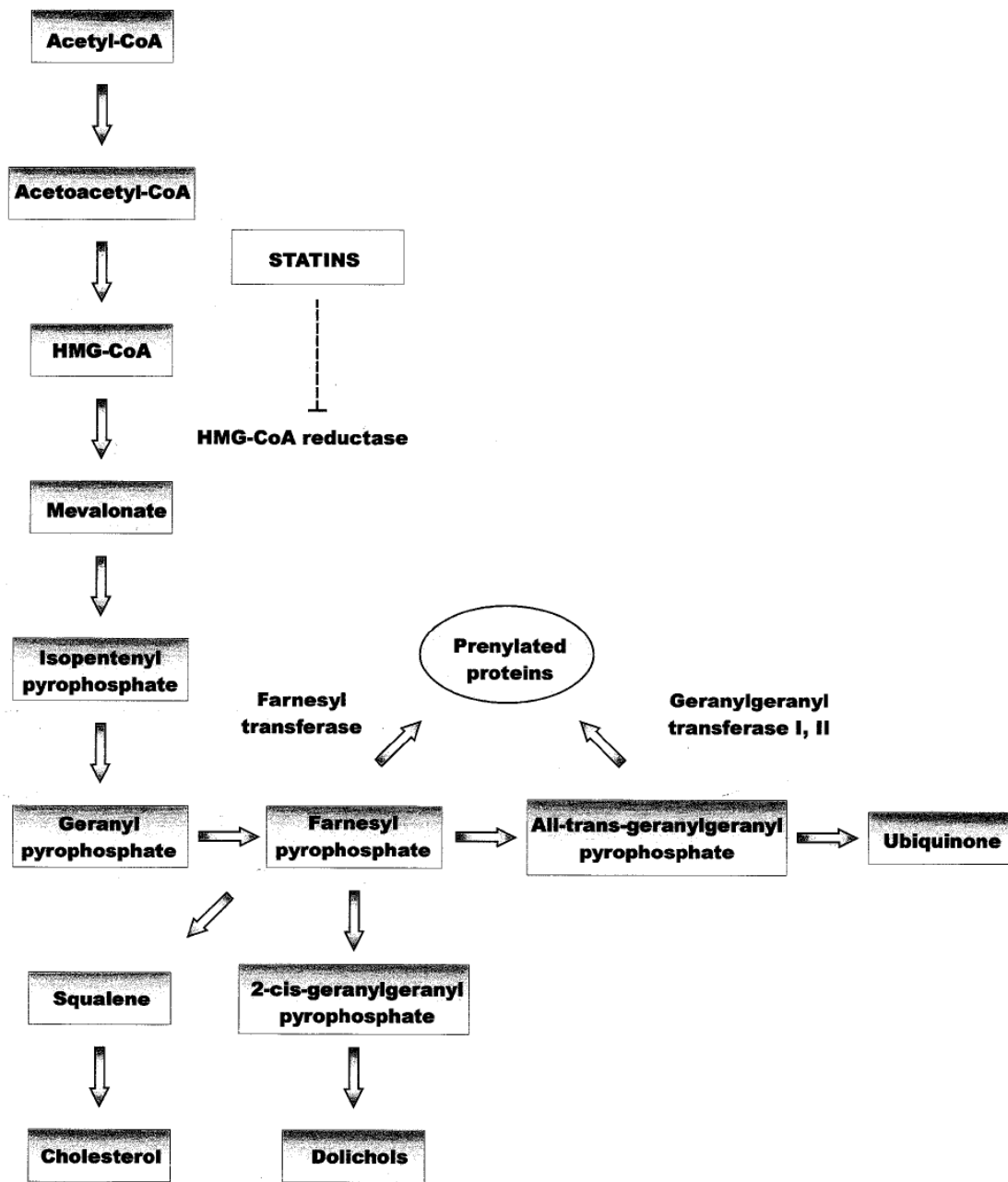
膽固醇是細胞膜的組成份，同時也是許多生物物質的前驅物，但如果血液中的膽固醇含量過高，容易造成動脈硬化及高血脂症。人體中的膽固醇主要是來自於飲食攝取（外源性）及肝臟生合成（內源性），其中又以內源性生合成途徑為人體膽固醇的最主要來源。3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA (HMG-CoA) reductase 是膽固醇合成步驟中的速率限制酵素，其作用是將 HMG-CoA 還原為 mevalonic acid (圖 1-3)。Monacolin K 具有 β -hydroxy- δ -lactone 的構造，可經體內的 carboxyesterases 催化水解開環，形成與 HMG-CoA 相似的酸式結構，對 HMG-CoA reductase 產生競爭性抑制作用，進而減少體內的膽固醇合成。細胞內的膽固醇下降會促使低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 受體增加，提高 LDL 代謝，達到降低血液中 LDL 濃度的效果 (Mahley and Innerarity, 1983; Endo and Hasumi, 1985)。除了膽固醇之外，多萜醇 (dolichol) 及泛醌 (ubiquinone) 也是 mevalonic acid 之下游產物；dolichol 參與醣蛋白的合成，ubiquinone 在粒線體中參與電子傳遞鏈。另一方面，mevalonic acid 亦參與多種蛋白質 (如 lamins, Ras 及 Rho) 之後轉譯修飾作用，使這些蛋白質能在正確的位置表現活性 (圖 1-3)。由於 statins 影響數種代謝路徑，因此呈現多元生理效應 (Jakobisiak and Golab, 2003)。

由於 monacolin K 和紅麴色素的合成代謝途徑有相互的關係，因此色素產能高的紅麴菌，其生產 monacolin K 的能力低，而產生 monacolin K 能力高的紅麴菌，其色素的產量則普遍偏低，且 monacolin K 的生成菌種偏向產生紅色色素 (Juzlova *et al.*, 1996a)。除了 monacolin K 外，紅麴菌尚可分離出一群和 monacolin K 具有相同基本結構的降膽固醇物質，monacolin L、X、J、4 α -5-dihydromonacolin L 及 3 α -hydroxy-3,5-dihydromonacolin L，但這些物質的降膽固醇能力較 monacolin K 差 (Endo and Hasumi, 1985; Kimura *et al.*, 1990; Juzlova *et al.*, 1996a)。

亦有報導指出，此種 statin 類藥物亦具有抗發炎、降低心臟病、中風、糖尿病、骨質疏鬆症及阿茲海默症等病之發病機率 (陳, 1999)。本研究室亦以動物模

式證實以 *Monascus purpureus* NTU 568 菌株生產之紅麴，有降低膽固醇之功效
(Lee *et al.*, 2006)。





(Jakobisiak and Golab, 2003)

圖 1-3、3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA (HMG-CoA) 還原酶路徑

Fig. 1-3. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA (HMG-CoA) reductase pathway.

(四) 降血壓物質 (GABA)

γ -氨基丁酸 (γ -amino butyric acid, GABA) 是中樞神經系統抑制性的神經傳導物質，其作用於兩個受體—GABA_A 及 GABA_B。GABA_A 在受刺激後會增加突觸後膜的氯離子傳導，抑制突觸後電位，麻痺末梢神經，刺激交感神經活動及刺激腎上腺分泌兒茶酚胺 (catecholamine)，加速較長效的降血壓作用。GABA_B 受刺激時則會抑制神經元的活動，但其伴隨的離子活動仍不清楚 (陳，1999)。GABA 是由 L-glutamate (L-Glu) 經 decarboxylation 作用而成。在患有先天性高血壓的老鼠的飼料中添加 0.2-0.3% 紅麴培養物，可使血壓由超過 200 mmHg 降至 180 mmHg 以下。日本 Gunze 公司以 *Monascus* IFO 4520 進行紅麴固態發酵生產「生米紅麴」與「米紅麴粉末」，兩產品 GABA 含量在 0.025-0.1% 之間 (陳，1999)。

(五) 防癌物質

紅麴橘色素 monascorubrin 及 rubropunctatin 具有活潑的 CO 基很容易與胺基作用，因此不但可治療胺血症 (ammoniemia) 且很可能是優良的防癌物質。此外；Yasukawa 等人(1994) 於老鼠的動物實驗中證實，經 12-o-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA) 兩階段誘導致發炎 (inflammatory) 的現象可利用 monascorubrin 抑制腫瘤的發生 (Yasukawa *et al.*, 1994)。

(六) 降血糖物質

1988 年玉田英明發現：兔子在進食添加 0.2-0.3% 紅麴培養物的飼料後半小時內血糖降低 23-33%，而在一小時之後的血糖量仍比對照組下降了 19-29%，不過其有效成分尚待進一步分析鑑定 (玉田，1988)。

(七) 麥角固醇

麥角固醇是維生素 D₂ 的前驅物，目前國內外麥角固醇生產侷限於酵母菌，而

據大陸學者陳松生等人 (1995) 發現紅麴菌屬 (*Monascus*) 中的許多菌株都能產生不同程度的麥角固醇，但產生的量與色素含量不成正比。

(八) 抗氧化物質-Dimerumic acid

紅麴的抗氧化能力於 1999 年被 Aniya 等人提出，Aniya 等人進一步純化紅麴抽出物得知其抗氧化能力的成分為 dimerumic acid。Dimerumic acid 在第一次被報導時指出其為一天然的 siderophore，與 Fe^{3+} 有高度親和力，具有抗氧化的功效 (Aniya *et al.*, 1999)。在低濃度時即具有較佳清除 α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) 自由基的能力，並減低活性氧 (active oxygen species)，如超氧陰離子 (superoxide anion, $\cdot\text{O}^{2-}$) 及氫氧自由基 (hydroxyl radical, $\cdot\text{OH}$) (Aniya *et al.*, 2000)。Dimerumic acid 具有對抗四氯化碳在肝臟中所產生的自由基。Taira 等人於 2002 年提出 dimerumic acid 的抗氧化機制，當含量在 20-200 μM 時可抑制老鼠肝臟微粒體的 NADPH (reduced nicotinamide adenine dinucleotide) 與 Fe^{2+} 依賴型脂質過氧化 (Fe^{2+} -dependent lipid peroxidation, LPO)。Dimerumic acid 可清除 $\cdot\text{OH}$ 、 $\cdot\text{O}^{2-}$ 、ferryl-Mb、peroxyl radical 與對 LPO 的抑制作用，其會提供一個電子給氧化物使本身氧化為 nitroxide radical (Taira *et al.*, 2002)。

(九) 長鏈脂肪酸之產生

Juzlova 等人 (1996b) 從紅麴變異的白化變異種中發現具有產生長鏈的脂肪酸的功能。脂肪酸的種類從 C_{14} - C_{24} 並經利用 GC-MS 確認，而其中在 39 種脂肪酸中有 22 種飽和脂肪酸 (包含 iso 及 anteiso)、14 種單烯酸 (monoenoic acid)、2 種二烯酸 (dienoic acid) 及 1 種 α -次亞麻油酸 (α -linolenic acid)。

(十) 抗疲勞功效

1999 年大陸學者以紅麴醱酵液來飼養小白鼠，以探討小白鼠之游泳耐力與常

壓耐缺氧能力試驗，其結果明顯改善小白鼠的有氧運動能力，減緩運動過程中血糖的下降，並促進運動耐力的提高；在耐缺氧能力試驗上也有提高的效果，在紅麴菌絲體及醱酵液中發現含有多量的天門冬胺酸 (aspartate, Asp)與鎂鹽可加速脂肪氧化以供給能量，節約醣原的消耗，延緩小白鼠疲勞的產生 (許等, 1999)。本研究亦證實以 *Monascus purpureus* NTU 803 生產之紅麴具有相同效果 (Wang *et al.*, 2006)。

(十一) 護肝功能

日本學者曾篩選包含 *Monascus* sp. 與 *Aspergillus* sp. 等 40 株黴菌，其中有 16 株具有較佳的抗氧化能力，再將這些菌株進行護肝功能的探討，發現其中 *M. anka* 可增加 glutathione-s-transferase 及 aspartate aminotransferase 活性，降低化學藥劑引起之肝損傷，具有保護肝臟的效果 (Aniya *et al.*, 1999)，亦有研究指出以 0.2~0.8 g 的紅麴餵食經誘導而引起高膽固醇血症的兔子，結果顯示，除了可降低動脈粥狀硬化的形成，亦可改善肝臟硬化與肝腫大 (hepatomegaly) 的程度 (Li *et al.*, 1998)。

(十二) 促進骨骼成長

在 1999 年，Havel 的研究報告中指出紅麴中所含的 monacolin K 成分和市售的 lovastatin 相同，但紅麴中含有其他微量的有效功能性成分，使得紅麴的降血脂效果比一般的 statin 類藥物更好。

骨誘導蛋白 (bone morphogenetic proteins, BMPs) 在修復骨折的過程中扮演調控骨原細胞分化 (osteogenic differentiation) 的重要角色 (Sakou, 1998)。1993 年 Wang 等人的研究指出，骨誘導蛋白-2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2) 促使多能幹細胞 (multipotential stem cell line) 分化為類造骨細胞 (osteoblast-like cells)。Mundy 等學者曾試著找出能誘導 BMP-2 基因表現的小分子化合物，經測

試 30,000 多種化合物後，最後鑑定出只有 statin 能夠專一性地增加 BMP-2 基因的表現 (Mundy *et al.*, 1999)。

近年來，有些文獻指出 statin 類藥物不但可以降低血脂濃度，更可以抑制破骨細胞的產生或是促進成骨細胞的分化 (Rogers *et al.*, 2000)，稱為 statin 類藥物的多效性 (pleiotropic effects)。在細胞實驗中，statin 類藥物在 MC3T3-E1 細胞中可以促進 BMP-2 的表現，促使造骨細胞的分化 (Maeda *et al.*, 2004)。Li (2003) 等人更指出 lovastatin 在小鼠的骨髓間質細胞中藉由抑制 PPAR- γ 2 等脂肪細胞的基因，同時促進 Cbfa1/Runx2 等造骨細胞的專一性基因，來達到抑制脂質合成 (adipogenic) 及刺激骨細胞分化的效果。

2006 年，Gutierrez 等人指出，將 12 週大的大鼠，以管餵的方式服用紅麴或是 lovastatin，為期 5 週，實驗結束後測量大鼠之骨密度，發現服用紅麴的大鼠，骨密度有明顯的提升，且較相對來說高劑量的 lovastatin 效果更好，之後亦在 *in vitro* 中得到相同的結果 (Gutierrez *et al.*, 2006)。

三、山藥及其生理效用

山藥 (*Dioscorea* spp.)，又名山薯、薯蕷、長薯、條薯、田薯、大薯、淮山等，英文名為 Yam，為薯蕷科 (Dioscoreaceae) 薯蕷屬 (*Dioscorea*) 多年生蔓性根莖類植物 (龔等, 1995)。山藥在我國被栽培與利用之歷史極早，如山海經、本草衍義、圖經本草、新修本草、本草綱目及齊民要術等本草古籍均有記載，甚至最早之本草藥典神農本草經還將山藥列為上品藥材，可供食用、藥用或保健用，並具有高產及富含營養之特色。其利用部位為塊莖 (擔根體; rhizome)，有止瀉、滋養強壯、促進消化及增強免疫等功效，為常用藥食兼併之生藥材料。此外於夏初，部分種類如 *D. batatas* 及 *D. bulbifera* 等可於莖節葉腋內著生小粒之珠芽，亦稱零餘子，成熟後易脫落且在地下發芽，可供利用為繁殖栽培或食用之材料。薯蕷屬植物除了是人們糧食中澱粉及蛋白質之重要來源外，在傳統醫藥方面，則為藥用植

物中相當被重視之一群 (劉等, 1995; 劉等, 1999; 劉等, 2000a)。

(一) 山藥分佈

山藥分佈極廣, 原產中國、日本及亞洲熱帶, 16 世紀後傳到美洲、歐洲及非洲。薯蕷屬植物在全世界超過 650 種, 其中約有 60 種可供食用, 大抵分佈於南北兩半球間, 而較集中於非洲、中南美洲及熱帶亞洲, 為一種富營養價值之國際性重要糧食作物 (曾等, 1994; 劉等, 1999; FAO, 1999)。依據 1999 年聯合國農糧組織 (FAO) 的調查資料, 全世界 1998 年山藥栽種面積約為 3.3×10^6 公頃, 年產量約為 30×10^6 公噸, 為熱帶地區生產值僅次於甘薯及樹薯之作物, 而其營養價值成分則有超過主要之根莖作物, 為國際性主要糧食作物之一 (FAO, 1999)。

臺灣山藥栽培品種共有 15 種及 4 變種, 栽培面積約為 500 公頃, 產地分佈於: 台北市士林、北投、陽明山; 台北縣瑞芳鎮及雙溪鄉、三芝鄉; 基隆市、南投縣名間鄉及竹山鎮; 桃園縣尖石鄉; 屏東恆春鎮; 花蓮縣壽豐鄉、吉安鄉等地 (張, 2001)。

(二) 山藥種類

山藥由於栽培歷史悠久, 許多種原又是由原產地之品種演變而來, 故種類眾多, 品系繁雜, 形態變異及生產力差異頗大, 目前全球之薯蕷屬植物約有 650 種, 分布於溫、熱帶地區者約 250 種 (賴等, 1999), 其中約 60 種可供食用。其中最具生產力的為 *D. alata* L., *D. esculenta* (Lour.) Burk., *D. rotundata* (L.) Poir., *D. cayenensis* Lam. 及 *D. bulbifera* L. 等 (劉等, 2000c)。

山藥之塊莖薯型變化多, 依其形狀主要可分為塊狀山藥及長形山藥兩種 (張等, 2001)。塊狀山藥包括 *D. alata*、*D. alata* var. *purpurea*、*D. esculenta*、*D. bulbifera*、*D. rotundata*、*D. cayenensis* 等, 其地下塊根變化性大, 呈圓型、紡錘型、掌型、罐狀、短棍棒型等。通常此類山藥莖蔓粗壯大, 葉片大形, 產量較高, 價格較低,

此類山藥如千里達山藥、巴西山藥、竹山紅薯、五峰紅薯、罐薯等。長形山藥：包括 *D. pseudojaponica*、*D. batatas*、*D. doryophora*、*D. japonica* 等，其地下塊根呈棍棒形，通常莖蔓較纖細，葉片較小形，葉片有長披針形，心臟形、戟形等，嗜口性佳，品質較優良，產量稍低，但售價較高，此類山藥有基隆山藥 (*D. pseudojaponica*)、懷山藥 (*D. batatas*)、恒春山藥 (*D. doryophora*) 等。

台灣較常見之山藥品種，多源自下列六種 (劉等, 2000c): 1. 大薯又稱田薯 (*D. alata*)，為本土性山藥植物分佈最廣者，現另栽培於非洲、東南亞、中南美洲及部分歐洲。2. 長薯又稱家山藥 (*D. batatas*)，原產大陸，較為耐寒，分布於台灣北部。3. 山薯又稱日本山藥 (*D. japonica*)，原產日本，分布於台灣北部，另栽培於大陸及東南亞一帶。4. 條薯又稱紫田薯 (*D. alata* L. var. *purpurea*)，現栽培於台灣中部。5. 恒春山藥又稱戟葉田薯 (*D. doryophora*)，原產於台灣恒春半島及屏東一帶。6. 基隆山藥 (*D. pseudojaponica*)：原產於台灣北部一帶。

我國之山藥栽培品種共有 15 種及 4 變種，均具有優質高產之特色，依其莖蔓形狀與塊莖肉色，可分為以下三種 (劉等, 2000c)：

1. 方莖白肉類

(1) 山藥台農1 號 (*Discorea alata* L.)

莖蔓四稜翼狀，葉片較大，塊莖圓形或橢圓形，褐皮白肉。

(2) 山藥台農2 號 (*Discorea alata* L.)

莖蔓四稜翼狀，葉片較大，塊莖中長柱形，褐皮白肉。

(3) 大汕一品系 (*Discorea alata* L.)

莖蔓四稜翼狀，葉片較大，塊莖塊狀或橢圓形，褐皮白肉。

(4) 大汕二品系 (*Discorea alata* L.)

莖蔓四稜翼狀，葉片較大，塊莖中長柱形，深褐皮白肉。

(5) 大汕三品系 (*Discorea alata* L.)

莖蔓四稜翼狀，葉片較大，塊莖中長柱形，深褐皮白肉。

(6) 中國長品系 (*Discorea alata* L.)

莖蔓四稜翼狀，葉片較大，塊莖長柱形，褐皮白肉。

(7) 二刺品系 (*Discorea alata* L.)

莖蔓四稜翼狀，葉片較大，塊莖細長柱形，褐皮白肉。

2. 圓莖白肉類

(1) 大陸淮山品系 (*Discorea batata* Dence)

莖蔓圓狀，葉片較小，塊莖細長柱形，褐皮白肉。

(2) 基隆品系 (*Discorea japonica* Thunb var *Pseudojaponica* (Hay.) Yamamoto)

莖蔓圓狀，葉片較小，塊莖細長柱形，褐皮白肉。

(3) 恆春品系 (*Discorea doryyophora* Hance)

莖蔓圓狀，葉片較小，塊莖細長柱形，淡褐皮白肉。

(4) 小葉壽豐品系 (花蓮 3 號) (*Discorea batata* Dence)

莖蔓圓狀，葉片較小，塊莖細長柱形，褐皮白肉。

(5) 青森品系 (*Discorea japonica* Thunb.)

莖蔓圓狀，葉片較小，塊莖細長柱形，淡褐皮白肉。

3. 紅肉類

(1) 紫玉血薯品系 (*Discorea alata* L. Var *purpurea* (Roxb.) M. Pouch.)

莖蔓四稜翼狀，葉柄二端及翼邊紫色，葉大，塊莖中長柱形，紫紅皮紫肉。

(2) 大紅品系 (*Discorea alata* L. var *purpurea* (Roxb.) M. Pouch.)

莖蔓四稜翼狀，葉柄二端及翼邊紫色，葉大，塊莖中長柱形。

(3) 名間長紅品系 (*Discorea alata* L. var *purpurea* (Roxb.) M. Pouch.)

莖蔓四稜翼狀，葉柄二端及翼邊紫色，葉大，塊莖中長柱形。

(三) 山藥成分

山藥塊莖一般成份隨品種不同及種植地區不同而有所差異 (Pall and Chen, 1988), 一般而言水分含量在 65-77%, 澱粉約佔乾重 75-84%, 粗蛋白在 6-8% 之間, 粗纖維為 1.2-1.8%, 粗灰份在 2.8-3.8% 之間 (Wanasundera and Ravindran, 1994; Wang and Lo, 1998)。台灣所產山藥品系眾多, 其成分含量會隨品種與種植地區不同而有所差異, 根據行政院衛生署台灣地區食品營養成分資料庫 (<http://www.doh.gov.tw/FoodAnalysis/ingredients.htm>), 一百克新鮮山藥含水量約為 65%~80%, 熱量約為 65~140 Kcal, 粗蛋白含量約為 1.7~4.8 克, 粗脂肪含量約為 0.1~0.2 克, 碳水化合物含量約為 14.0~29.1 克。

經加工後之山藥乾粉, 含量最豐者為醣類, 一般約含 70% 以上, 蛋白質含量亦頗高, 均達 10% 以上, 脂肪則在 0.5% 以下 (劉等, 2000), 山藥為主食類, 與其他根莖類植物相較, 可謂一高蛋白、低脂性食品 (盧, 2001)。

山藥除了可做為糧食中澱粉與蛋白質之重要供應源外, 尚含有維生素A、C、E、B₁、B₂ 及磷 (P)、鈣 (Ca)、鉀 (K)、鎂 (Mg)、硫 (S) 等礦物質和微量元素鐵 (Fe)、鋅 (Zn)、銻 (Rb)、銦 (Sr), 此外還含許多特殊成分, 像是膽鹼 (choline)、尿囊素 (allantoin)、醣蛋白 (高黏性複合多醣, glycoproteins)、黏液質 (mucin)、澱粉酵素 (diastase)、多酚氧化酵素 (polyphenol oxidase)、薯蕷皂苷配基 (diosgenin)、脂質、多種必需胺基酸及抗氧化酵素等成分 (劉等, 1995; 王等, 1999; 潘, 2000; Ibrahim, 1994; Wanasundera and Ravindran, 1994; Omonigho and Ikenebomeh, 2000)。

(四) 山藥之保健作用

1. 調整腸胃功能

先前學者指出山藥具有增加有益菌 *Bifidobacterium*、*Lactobacilli*, 減少有害菌 *Clostridium perfringens* 的趨勢, 可改變胃腸內菌叢 (microflora) 並提昇胃腸道機能 (吳, 2001)。楊王等人餵食 Balb/c 雄鼠 25% 或 50% 之民間長紅或基隆山藥, 三週後, 山藥組之小腸白胺酸胺基脞酵素 (leucine aminopeptidase) 及脂解酵

素 (lipase) 皆高於對照 (fiber-free) 組，且以紅藥組之脂解酵素最高，約高於等量基隆山藥組一倍以上 (楊王，2001)；另有研究發現，山藥可增加胃腸內有益菌叢，增加腸道消化酵素 trypsin 活性，提升腸胃道機能，且生熟食之效果相似 (廖，2003)。陳等人也發現，山藥水萃物可增加實驗動物之糞便及盲腸內容物中短鏈脂肪酸 (short chain fatty acid, SCFA) 濃度，改善結腸環境 (陳等，2003)。陳等人顯示，攝食山藥優酪乳的大白鼠其大、小腸長度較長，且具有較重之盲腸與盲腸內容物，並可提高盲腸中總短鏈脂肪酸的含量，顯著增加糞便量及糞便中乳酸菌與總厭氧菌的數量，降低糞便 pH 值與糞便葡萄糖醛酸酵素 (β -glucuronidase) 與黏液素酵素 (Mucinase) 之活性 (陳與林，2004)。另有研究指出，二十三位停經婦女食用山藥後，61% 排便較順暢、74% 增加排氣、22% 改善胃疾病 (鐘，2002)。山藥傳統上被認為健脾胃作用，大陸研究證實山藥可抑制小鼠胃排空及腸蠕動，並拮抗氯化乙醯膽鹼及氯化鉍所引起之迴腸強直性收縮、增強小腸吸收功能、抑制血清澱粉酶分泌，對膽汁分泌及胃液分泌無顯著影響 (李等，1994)。

2. 調節或增強免疫功能

體外試驗顯示，山藥具有誘生干擾素及增加 T 細胞數目之作用 (劉等，2000d)，山藥低分子甲醇粗萃物則具有促進腦神經及骨髓幹細胞生長及分化的細胞再生能力 (陳，2001)。體內動物實驗發現，山藥總多醣有明顯增強免疫調節作用，口服山藥多醣可提高 T 淋巴細胞的增殖能力、血清溶血素活性、增強小鼠血清中抗體 IgG 含量、IgA 的抗體免疫反應，並促進脾臟細胞增生，促進自然殺手細胞及吞噬細胞活性，在系統及黏膜免疫上具有免疫調節作用，即具有提高特異性細胞免疫和体液免疫功能 (陳，2001; 趙等，2002a; 方，2002)；山藥黏多醣可增加小鼠巨噬細胞和細胞激素 (cytokine) 的產生，例如腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor, TNF- α) (Choi and Hwang, 2002)；若餵食小鼠含 7% 山藥發酵乳之飼料四週後，也能增進脾臟細胞增生，並促進血清抗體 IgG 分泌 (方，2002)。

3. 具有抗氧化、抗衰老作用

山藥之固醇類萃取物可以增加血中去氫皮脂酮 (dehydroepiandrosterone, DHEA) 的量，但服食山藥添加物並不增加血中 DHEA 量，若每日攝取 85 mg 的 DHEA 可增高血中濃度達 100.3%，此二者皆可明顯降低脂質過氧化作用、增高 HDL 濃度、降低血中三酸甘油脂，故具明顯抗氧化活性而對血清脂質具穩定性 (Araghiniknam *et al.*, 1996)。

4. 抑制癌細胞

體外試驗發現，自 *Dioscorea coiletti* var. *hypoglauca* 所分離出三種已知之固醇類皂素 (steroidal saponins) 化合物：dioscin 之 prosapogenin A、dioscin 及 gracillin，皆對 K562 癌細胞株有細胞毒性活性 (Hu *et al.*, 1996)；由 *Dioscorea panthaica* 所得之 2 種新的固醇類皂素：dioscoresides C 和 dioscoresides D 對 A375、L929 癌細胞株具有細胞毒性，且呈現劑量效應關係 (Dong *et al.*, 2001)。山藥對 EB 病毒早期抗原具有強抑制活性 (薛等，1998)；以乳酸菌發酵之七堵山藥發酵液與淋巴癌細胞株 K562 反應 24 小時後，對於該品系細胞具有致死能力 (沈，2003)。山藥多醣 (≥ 150 mg/kg)，對 B16 黑色素瘤和肺癌均有顯著抑制效果，且以中等劑量 (150 mg/kg) 作用最佳 (趙等，2002b)。

5. 調節女性荷爾蒙及內分泌

山藥所含之 diosgenin，因其結構類似雌激素前驅物，而被認為可能有雌激素之作用。大陸學者以山藥複方配合西醫治療，可改善婦女更年期臨床症狀，且較單獨西醫治療更為有效 (張等，2001)；國內研究發現，以停經婦女為對象，山藥取代每日約 2/3 之主食 (約 390 g/天)，29 天後，其血清中雌激素 (Estrone)、DHEA、性激素結合蛋白 (sex hormone-binding globulin, SHBG) 濃度顯著上升，尿液雌激素代謝物 16 α -hydroxyestrone 排出量則顯著降低，表示山藥可調節女性荷爾蒙，由於在流病研究上已知 SHBG 濃度與乳癌發生率呈負相關，故山藥對停經

婦女在乳癌之預防上或許有所助益 (鐘, 2002)。

Diosgenin 在腸道會部分轉換為去氫皮脂酮 (dehydroepiandrosterone, DHEA), 此為體內雌激素、睪固酮的賀爾蒙前驅物質, 以調節內分泌及性功能 (Araghiniknam *et al.*, 1996)。山藥水煎液給小鼠管餵可增加前列腺、精囊腺的重量, 增強雄性激素作用 (Hu *et al.*, 1996)。

6. 具有抗菌活性

Dioscorea sylvatica 塊莖之皮萃取物具抗 *E. coli* 活性; *Dioscorea dregeana* 對綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 具抗菌活性。醇萃取物比水及 ethyl acetate 萃取物有較佳抗菌活性 (Aderiye *et al.*, 1996)。

7. 抗氧化作用

生物體於正常代謝過程中會產生活性氧與自由基, 而體內之抗氧化防禦系統, 抗氧化酵素及抗氧化物質會使體內氧化-抗氧化系統維持平衡。抗氧化酵素包括超氧化歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、觸酶 (catalase, CAT)、麩胱甘肽過氧化酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 等; 抗氧化物質則包括維生素 C、E、單寧、酚類化合物、類黃酮、多醣體等均與體內防禦機制及抗氧化狀態有關 (劉等, 2001; 劉等, 1999)。大陸研究證實, 山藥水溶性多醣具體外抗氧化作用 (何等, 1994), 國內潘等人發現, 山藥之甲醇萃取液在清除 DPPH 自由基能力、螯合亞鐵離子能力、還原能力及抑制共軛雙烯鍵生成能力均有顯著的抗氧化活性 (潘, 2003); 陳等人則發現, 山藥之冷、熱水抽出物也具有抑制亞麻油酸氧化的作用, 且抗氧化能力抽出物的濃度成正比 (陳等, 2001)。而由山藥 (*Dioscorea batatas*) 萃取之 dioscorin 及其水解產物均具有抗氧化能力 (Hou *et al.*, 2001; 劉, 2002); 另外, 山藥也具有抗氧化酵素活性, 亦含有維生素 C、E、單寧、酚酸、酚類化合物、類黃

酮、dioscorin 及礦物質等多種抗氧化劑 (劉等, 2000b), 且不同品系及不同加工處理的山藥, 其抗氧化力均有顯著差異 (徐, 2003; 潘, 2003), 但經過冷凍乾燥或熱風乾燥加工之山藥, 仍因含有抗氧化活性成分, 而具有抗氧化力 (施, 2003)。

8. 降血糖

傳統上以 *Dioscorea dumetorum* 用於治療糖尿病, 被證實具有效果 (Undie and Akubue, 1986)。薯蕷屬植物粗提物對禁食大鼠和兔子, 有降血糖作用, 能控制四氧嘧啶引起的高血糖。其乙醇提取物的水溶液部分與降血糖活性有關; 氣仿提取物能使飢餓的 Wistar 大鼠血糖升高。山藥多醣在甲醇-水 1:1 中之提取物能顯著降低小鼠血糖濃度。山藥複方對血糖也有明顯的作用。Iwu 等 (1990) 自 *D. dumetorum* 塊莖中分離出具有降血糖的 dihydrodioscorine、alkaloidumentorin 與 dioscoretine 等, 可供為輕、中型糖尿病之輔助藥材。

9. 降低血脂及膽固醇

以山藥提煉的澱粉餵食動脈粥樣硬化的小鼠, 能降低內脂質濃度, 同時降低主動脈和心臟的血糖濃度。對已飼餵過游離膽固醇和含有膽固醇食物的小鼠, 山藥能降低其膽固醇的濃度 (高等, 2002)。

10. 降血壓作用

由山藥台農 1 號塊莖儲存蛋白所純化之 dioscorin 為血管收縮素轉換酶 (angiotensin-converting enzyme) 抑制劑 (Hsu *et al.*, 2002); 體外試驗發現, 紫山藥也具有抑制血管收縮素轉換酶 (angiotensin-converting enzyme) 之功效, 體內試驗則顯示, 管餵自發性高血壓鼠紫山藥冬瓜混合水解液 (2 g/kg B.W.) 持續 28 天, 可使其血壓、血膽固醇及三酸甘油酯降低 (楊, 2003)。

四、紅麴以山藥作發酵基質之差異化與複合性功效

山藥化學成分與在來米近似，澱粉含量也接近。一般米所含澱粉中約 8~37% 為直鏈澱粉，而山藥直鏈澱粉含量最高達 35.63%，相較於樹薯、芋頭、甘藷及馬鈴薯有較高的直鏈澱粉含量（林，1999）。山藥的直鏈澱粉含量與在來米接近，足夠供給紅麴菌作為碳源，且其更含有高量類似膳食纖維的不溶性澱粉不會被紅麴菌所分解，經由攝食能夠控制糖尿病病情 (Baghurst *et al.*, 1996; Shukla, 1995)，降低血中總膽固醇與三酸甘油酯，有效減低血中及肝臟內脂質含量(Jenkins *et al.*, 1983)，改善心血管症狀。發酵後的紅麴山藥具有降血脂與抗氧化等複合性的保健功效，這也將提高紅麴產品的經濟價值與應用性。本研究室在先前之研究中發現，多數的紅麴菌株利用山藥作為固態培養基質時可生成較高量的 monacolin K，其生成量為以在來米為基質發酵所得紅麴米的 5 倍，高 monacolin K 含量的紅麴山藥將可提供更為有效的降血脂與抗氧化的效果。此外，若以山藥固態發酵，能延長山藥保存期限，解決山藥因為產季過短而產生的加工儲藏的問題。(Ejechi and Souzey, 1999; Omonigho and Ikenebomeh, 2000; Morse *et al.*, 2000)。

五、人體骨骼、組成及代謝之簡介 (行政院衛生署。2009。http://0rz.tw/164G7)

(一) 骨骼的組成

人體共有 206 塊骨骼，依外形可分為長骨、短骨、扁平骨和不規則骨等。骨骼的外層是「皮質骨」(cortical)，含有板層結構，其間含有細胞，因其結構緻密，又稱之為「緻密骨」(compact bone)；骨骼的內層則是「枝狀骨」，富含骨小樑(trabecular)，在骨小樑的表面則有「造骨細胞」(osteoblast) 和「破骨細胞」(osteoclast)，其像海綿狀，因此又稱為「海綿骨」(spongy bone)。體內約有 80% 的骨量屬於皮質骨，但身體各部位的骨骼所含皮質骨與海綿骨的比例並不相同，例如脊椎骨含有 50-75% 的海綿骨，而股骨則只有約 20% 是屬海綿骨，且主要是分布在兩端。

(二) 骨骼的代謝

由於海綿骨的表面積較大，所以骨骼的代謝速率較快，當骨骼因某因素而產生骨質流失時，主要的流失部位即在海綿骨，在一般的代謝情況下，每年約有 25% 的海綿骨被分解和更新，但只有約 3% 的皮質骨會被新陳代謝。這也是何以脊椎骨較易發生骨質疏鬆，造成身高變矮或駝背的原因；又由於股骨的海綿骨分布在兩端，因此年輕人骨質較緻密，若因撞擊而產生骨折時，常折斷在股骨的中央部位，但若已年老發生骨質流失之後，當跌倒而骨折時，則常發生在股骨的兩端，尤其股骨頸骨折 (femoral neck fracture)，尤其斷裂在與骨盤連接的位置，而很難醫治和恢復。

骨骼的成分可分為有機質與無機質。有機質部分包括了骨基質和細胞，骨基質中有 95% 是膠原蛋白，另 5% 的非膠原蛋白質對骨骼的礦物質化 (mineralization) 很重要，而細胞主要有造骨細胞、破骨細胞和骨細胞三種；無機質中主要有磷酸鈣，其他還有碳酸鹽、鈉、鎂、鉀、氟化物和氯化物等。

骨骼的細胞可分為造骨細胞 (osteoblast)、骨細胞 (osteocyte) 和破骨細胞 (osteoclast) 三種。其中之造骨細胞主要在進行膠原蛋白 (collagen) 和基質 (ground substances) 之形成，以及負責大部分之骨礦物質化 (bone mineralization)。然而當造骨細胞被骨間質 (bone matrix) 包圍，會逐漸縮小體積而變成骨細胞。在一般骨骼中，骨細胞含量穩定，其內之胞器 (organelles) 含量少，僅含少量之粒腺體 (mitochondria) 和高基氏體 (Gorgi apparatus)，代謝力不旺盛。破骨細胞較大、多核，且具多量的粒腺體和溶小體 (lysosome)，顯示其進行異化作用和骨骼回收的能力相當強；其細胞膜含有豐富的皺褶，具有電化學極化性，可使細胞膜之滲透壓改變，而得以攝入斷裂的膠原蛋白和羥基磷灰石 (hydroxyapatite)，並加以消化。

骨骼無論在成長期或成年期，一直不斷地由破骨細胞進行骨質分解，而由造骨細胞進行重造。當重造的速率大於分解時，則骨骼會變得較長、較寬或較緻密；而當分解速率大於重造時，則骨質就會逐漸流失 (bone loss) 而疏鬆。通常在成長期，骨骼主要會增長，而在青春末期時，長骨之骨垢 (epiphyses) 與骨幹 (diaphyses) 癒合在一起之後，大約再經 2-3 年，骨骼就不再增長，因此，身高也就不再增加了。但在此年齡之後，若營養狀態良好，也保持適當的抗阻力運動，則骨質的重

造仍然繼續維持大於骨質的分解，因此骨質的密度仍會持續增加。當生理狀態良好時，此現象可持續至 35-40 歲左右，而達一生中骨質量之最高點（peak bone mass），但過了 45 歲之後，尤其女性在剛停經後的連續 5 年，骨質之分解會明顯大於重造，以致造成骨質流失，骨質密度下降，嚴重時會引起骨質疏鬆症（osteoporosis）。

(三) 營養對骨骼代謝的影響

由於人體的骨骼並非是無生命現象的架子而已，而是終生不斷地分解與重造（remodeling），因此若只測量當時的密度，並不能真正了解骨骼新陳代謝的實際情況，而得以及時設法加以改善。骨質流失是一種無症候的生理現象，儘管骨質流失了 20-30%，甚至超過此數值，若無骨折，很難被察覺到。即使是測其骨質密度，則必須該密度已有明顯下降才能被察覺，而此時骨質已流失某相當程度了，很難補救。然而目前在臨床上還沒有適當簡易之骨骼新陳代謝的生化指標，以便及早診斷其骨骼的生理代謝（turnover）狀況。因此在營養生理上，能夠提供促進骨骼重造的營養素，亦常作為加強骨質密度的重要保健方法。

營養素之所以會被認為與骨質疏鬆症有關，主要是因骨骼構造中的有機質為蛋白質，而無機質為多種礦物鹽沈澱組成，因此如飲食中之某些營養素量不適當時，會影響骨骼代謝之平衡，而造成骨質流失。在所有的營養素中，通常鈣質被認為對骨骼的結構與代謝最為重要，也最是一般人所較易缺乏而影響到骨骼的健康。

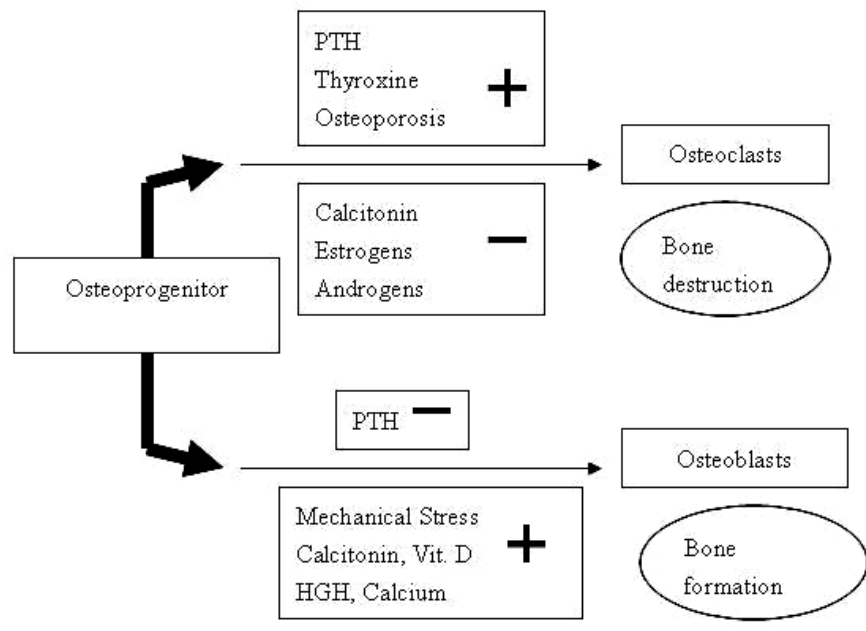
當飲食中鈣攝取量偏低時，身體會產生負鈣平衡。當血液中之鈣離子濃度偏低（ $<10\text{ mg/dL}$ ）時，會刺激增加副甲狀腺激素（parathyroid hormone, PTH）之分泌，而 PTH 可刺激腎臟內的活化使 1,25 dihydroxy vitamin D_3 轉變成具生理活性之 1,25 dihydroxyvitamin D_3 ，然後 PTH 和 1,25 dihydroxyvitamin D_3 共同改變了骨骼中羥基磷灰石（hydroxyapatite）的離子價，此現象導致磷酸鹽（orthophosphate）轉變成焦磷酸（pyrophosphate），以致 hydroxyapatite 變得易解離而排出鈣離子，來提升血液中鈣離子濃度，此生理現象稱為骨質耗損（bone resorption）。此生理機制雖能用來維持血液中鈣離子濃度的恆定，但亦造成骨質的流失，持續的流失會

導致骨質的疏鬆。體內負鈣平衡的發生，並不單是飲食中缺鈣才會發生，例如激素分泌的不正常或維生素 D 的缺乏等，都會導致骨鈣的負平衡，而引發骨質的疏鬆。

(四) 雌激素對骨骼的影響

骨質之新陳代謝 (bone turnover) 是一種串週而復始之 耗損 (吸收) 與再造 (合成) 週期，骨質之維持需要破骨細胞 (osteoclast) 與造骨細胞 (osteoblast) 作用達成平衡，如此才能維持骨質之密度與強度。而雌激素主要功能在刺激造骨細胞的活性，可造成骨骼的生長；另一方面，雌激素可抑制嗜骨細胞的活性，減少骨質破壞，如圖 1-4 所示。

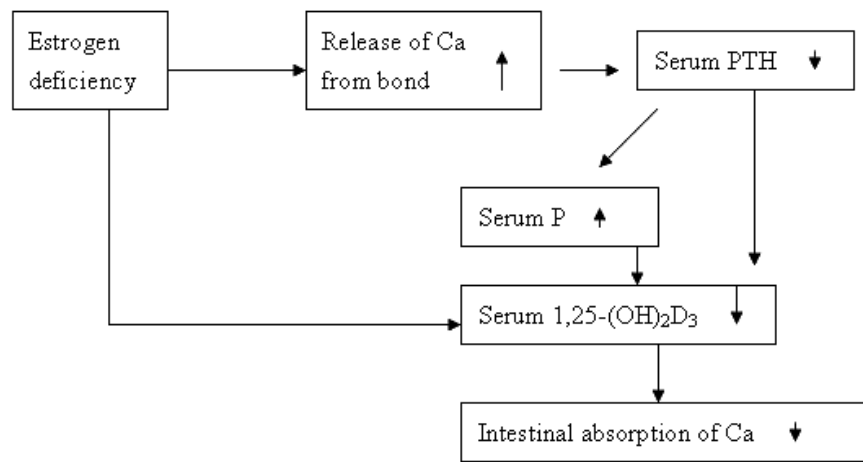
停經後雌激素缺乏 (postmenopausal estrogen deficiency) 是造成停經後骨質疏鬆最主要的原因。雌激素缺乏會直接促進骨質中鈣質的析出，此時血中副甲狀腺素 (PTH) 降低，另外，雌激素缺乏及 PTH 濃度降低導致血液中活性維生素 D [1,25-(OH)₂D₃] 濃度降低，最終使腸胃道鈣質的吸收減少，而影響骨質密度,如圖 1-5 所示。



(王，1999)

圖 1-4、控制破骨細胞與造骨細胞的賀爾蒙

Fig. 1-4. Hormones that can mediate the metabolism of osteocalst and osteoblast.



(王，1999)

圖 1-5、雌激素缺乏對骨質流失之影響

Fig. 1-5. Effects of estrogen deficiency on bone loss.

六、植物雌激素介紹

植物性雌激素 (phytoestrogens) 是雌激素替代品中最具潛力的食物成分，其定義為功能或構造類似卵巢分泌的雌激素或其代謝物的植物化合物，主要作用包括與雌激素受器 (estrogen receptors, ERs) 行競爭 (agonistic) 結合、部份競爭 (partial agonistic) 結合及拮抗性 (antagonistic) 結合等相互作用，其構造與雌二醇相似，特別是構造中兩個-OH 基之距離與雌二醇類似，故可與雌激素受器結合，影響雌激素活性，次要作用為調節女性排卵週期 (ovarian cycle)、動情期 (estrus)、起始增生期 (promotion of growth)、分化期 (differentiation)、胸腺和其他標的的器官或組織 (Whitten and Patisau, 2001; Kurzer and Xu, 1997; Mazur and Adlercreutz, 2000)。另外有些植物性雌激素本身無雌激素活性，需在食入後進一步代謝才具有活性的構造 (Borriello *et al.*, 1985; Rowland *et al.*, 2000)，故由外表構造不易判斷。

理想的植物性雌激素有以下功能 (Kuiper *et al.*, 1998; 許等, 2004): 1. 可提供停經後婦女雌激素活性，降低更年期熱潮紅、盜汗、心悸等症狀，及預防停經後心血管疾病、骨質疏鬆症等疾病的發生。但不促進乳癌或血栓的發生。2. 對原本具備足夠雌激素未停經的婦女，反而可以拮抗雌激素活性，而降低雌激素的致乳癌性。3. 對雌激素接受器 (estrogen receptor) β 親和力較強，可選擇性作用在心血管與骨骼，減少刺激乳房和子宮內膜，降低乳腺及相關癌症的發生率。

(一) 植物雌激素之種類與來源

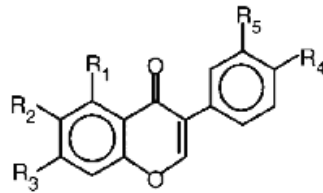
目前已知的植物性雌激素大致可分為異黃酮 (isoflavones)、木質酚 (lignans) 及香豆素 (coumestans) (Kurzer and Xu *et al.*, 1997)，其中研究較多且結果較明確的是異黃酮與木質酚。近年本土性的食品-山藥 (*Dioscorea* spp.) 也被認為可能存在雌激素活性成分物質-diosgenin (Higdon *et al.*, 2001; Aradhana *et al.*, 1992)，民國 89 年農委會更將山藥列為重點保健食品研究項目之一。

1. 異黃酮 (isoflavone)

主要包含 genistein、daidzein、biochanin A 和 formononetin。異黃酮 (isoflavone) 主要來源是黃豆 (Reinli and Block, 1996; Liggins *et al.*, 2000)，為亞洲地區最多人研

究的一种植物性雌激素，亞洲人如日本、台灣、韓國每人每日的攝取量約為 20-150 mg (Murkies *et al.*, 1998)。黃豆中異黃酮的化學結構如圖 1-6 所示 (Kurzer *et al.*, 1997)。Genistein 與 daidzein，結構似雌激素 (Setchell *et al.*, 1999)，其中 genistein 具雌激素活性，daidzein 本來並無雌激素活性，是在腸內經微生物作用才轉變為有雌激素活性的 equol，轉換率因人而異，也受其他食物影響，daidzein 比 genistein 少一個 OH 基，極性較 genistein 弱，研究中萃取黃豆蛋白所用溶劑的極性會影響含量，故不同黃豆蛋白產品的異黃酮含量或組成可能有很大的差異 (Rowland *et al.*, 2000)。

近年新興的植物-紅花苜蓿 (red clover) 亦含有天然的植物性雌激素，其具四種異黃酮：genistein、daidzein、biochanin A 和 formononetin，以 formononetin 和 biochanin A 所含的活性最高，而異黃酮雌激素的活性可能僅約真正雌激素的千分之一。根據美國農業部愛阿華州大學資料庫 USDA-Iowa State University Database on the Isoflavone Content of Foods 的測試報告資料顯示(<http://www.nalusda.gov/fnic/foodcomp/Data/isoflav/isoflav.html>)：每 100 g 的乾燥紅花苜蓿所含的活性異黃酮量 (formononetin 及 biochanin A) 最高達 2155 mg 以上。



Isoflavone	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Daidzein	H	H	OH	OH	H
Genistein	OH	H	OH	OH	H
Glycitein	H	OCH ₃	OH	OH	H
Daidzin	H	H	O-glucoside	OH	H
Genistin	OH	H	O-glucoside	OH	H
Glycitin	H	OCH ₃	O-glucoside	OH	H
Formononetin	H	H	OH	OCH ₃	H
Biochanin A	OH	H	OH	OCH ₃	H

(Kurzer *et al.*, 1997)

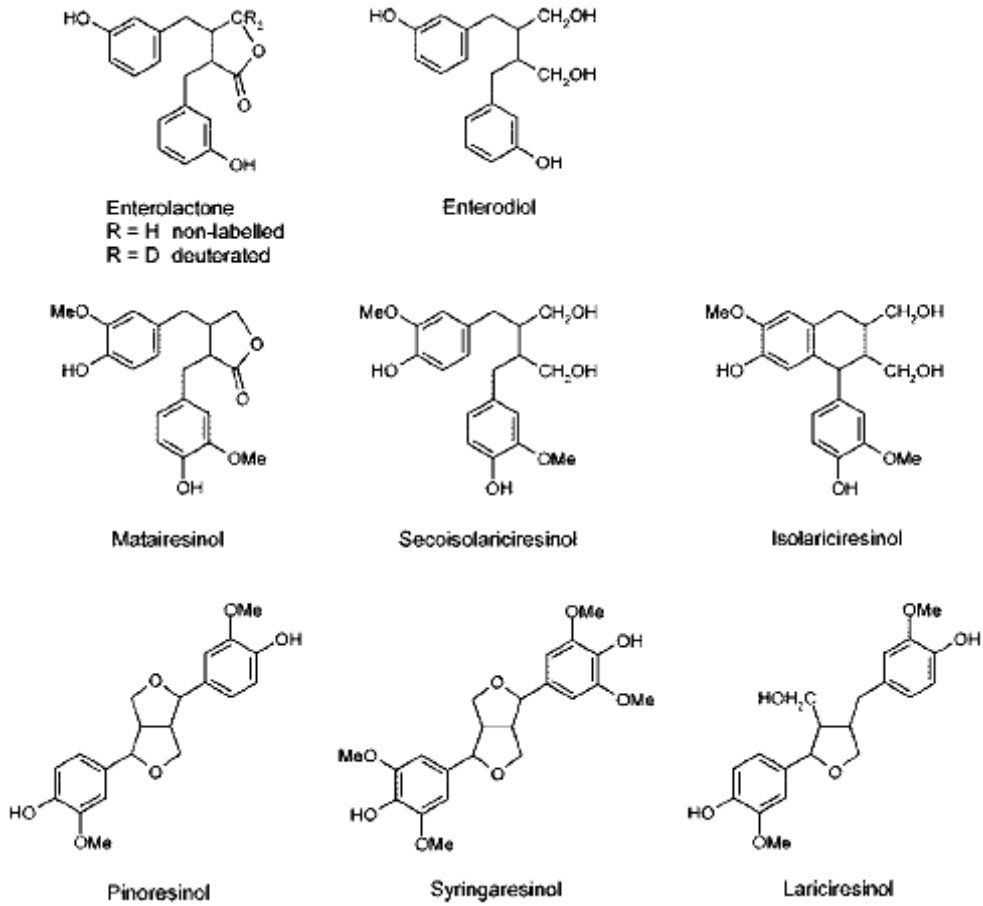
圖 1-6、黃豆中異黃酮的化學構造

Fig. 1-6. Chemical structures of the isoflavones found in soybeans.

2. 木質酚 (Lignan)

Lignan 主要食物來源是蔬果、高纖穀類和種子 (低於 10 $\mu\text{g/g}$)，lignans 含量最多的食物被認為是原種植於加拿大西方的 flaxseed (5-600 $\mu\text{g/g}$) (Tham *et al.*, 1998)，其可做成亞麻籽油 (flaxseed oil) 食用或以亞麻籽粉 (flaxseed flour) 添加於麵包類食品，芝麻 (sesame) 所含的 lignans 量也很高，約含 10 mg/g (Kamal-Eldin *et al.*, 1995)。木質酚的化學結構如圖 1-7 所示 (Begum *et al.*, 2004)。Flaxseed lignan 基本構造是 p-hydroxyphenyl propane 氧化聚合物，主要包含 secoisolariciresinol 與 matairesinol 的，要先經腸內微生物作用再轉變為 enterodiol 和 enterolactone 才有雌激素的活性 (Kurzer and Xu, 1997)。





(Begum *et al.*, 2004)

圖 1-7、哺乳動物及植物中木質酚的化學構造

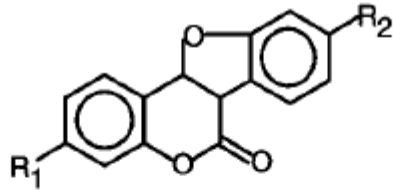
Fig. 1-7. Chemical structures of mammalian lignans and of the plant lignans.

3. 香豆素 (coumestans)

Coumestans 主要來自苜蓿與牧草，亦少量存在於黃豆芽和綠豆芽。Coumestans 包含 coumestrol 及 4'-methoxycoumestrol，其結構似異黃酮，如圖 1-8 (Kurzer and Xu, 1997)。研究顯示，由植物中分離出多種化合物中，僅有 coumestrol 與 4'-methoxycoumestrol 有刺激子宮的活性 (Murkies *et al.*, 1998)。

4. Diosgenin

山藥塊莖含有豐富的固醇類皂素，經水解去掉糖基的配醣體 (aglycone) 稱為薯蕷皂苷素或薯蕷皂苷配基 (diosgenin)，是山藥之主要活性成分，為固醇類皂苷素 (steroid saponins) 之一種 (劉等, 2000d)。diosgenin 之結構非常類似膽固醇、黃體素及睪固酮之前驅物質 (dehydroepiandrosterone, DHEA)，而目前固醇類皂素已證實可用來合成固醇類荷爾蒙、皮質類固醇和避孕藥等 (Chen and Wu, 1994)。在前人的動物實驗 (Higdon *et al.*, 2001) 指出 diosgenin 的確具有植物雌激素活性。1992 年 Rao 等學者 (Aradhana *et al.*, 1992) 在卵巢去除的小鼠皮下注射 diosgenin (20 及 40 mg/kg body weight) 15 天後，可促進小鼠乳腺的生長，因此認為 diosgenin 具雌激素活性。雌激素 (estrogen) 與 diosgenin 結構圖示於圖 1-9。



Coumestan	R₁	R₂
Coumestrol	OH	OH
4'-methoxycoumestrol	OH	OCH ₃

(Kurzer *et al.*, 1997)

圖 1-8、苜蓿中兩種香豆素 coumestrol 與 4'-methoxycoumestrol 的結構

Fig. 1-8. The structures of coumestrol and 4'-methoxycoumestrol, two estrogenic coumestans found in alfalfa.

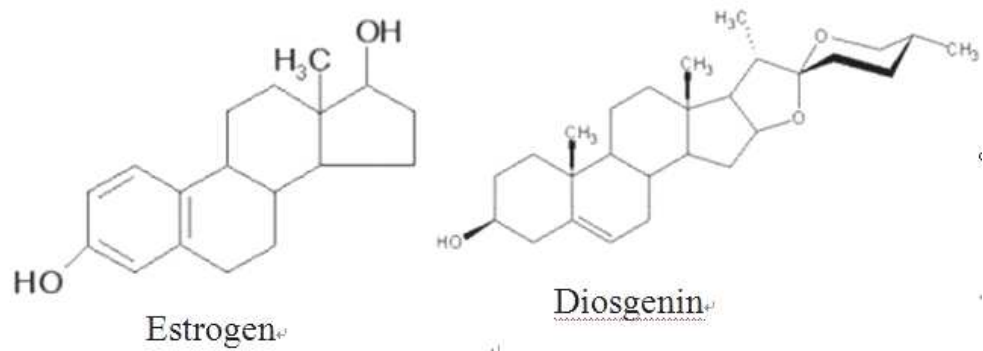


圖 1-9、雌激素 (estrogen) 與薯蕷皂苷配基 (diosgenin) 的化學構造

Fig. 1-9. The chemical structures of estrogen and diosgenin.

(二) 植物雌激素之生理功能

1. 更年期症狀 (menopausal symptoms)

停經 (menopause) 的定義是指婦女最後一次月經的時間，在此之前稱為停經前 (premenopause)，在此之後稱為停經後 (postmenopause)。停經後的婦女，女性賀爾蒙呈現缺乏的狀態，這種賀爾蒙的改變使得停經後婦女產生許多的臨床症狀，像是熱潮紅 (hot flush)、心悸 (palpitation)、失眠 (insomnia)、夜汗 (night sweats)、骨質疏鬆 (osteoporosis)、陰道萎縮 (vagina atrophy) 等，同時罹患動脈粥狀硬化及冠狀動脈心臟病的風險也提高。

過去學者的研究指出，異黃酮對於減緩熱潮紅的症狀有顯著的效果 (Han *et al.*, 2002; van de Weijer and Barentsen, 2002; Upmalis *et al.*, 2000; Washburn *et al.*, 1999; Albertazzi *et al.*, 1998; Murkies *et al.*, 1995)。日本女性 (5-10 %) 相對歐美女性 (70-80 %)，產生更年期的症狀較為輕微，可能於日常飲食中黃豆的攝取量較多有關 (Adlercreutz *et al.*, 1992)。山藥對於更年期症狀的影響，2001 年 Komesaroff 等學者研究山藥萃取物塗抹在皮膚 3 個月後，對熱潮紅稍有幫助，但與對照組無顯著差異 (Komesaroff *et al.*, 2001)。

先前研究發現 (Wilcox *et al.*, 1990)，給予停經婦女每天 45 克的黃豆粉兩週，再給予每天 10 克的紅花苜蓿二週，最後給予每天 25 克的亞麻籽兩週，共為期六週，發現可稍增加停經後婦女陰道細胞的成熟度。另外，1995 年 Baird 等人研究，每天給予停經婦女 165 mg 異黃酮為期四週，亦發現有類似的效果 (Baird *et al.*, 1995)。近年相關的研究顯示，有高膽固醇血症之更年期婦女每日攝取 40 g 亞麻籽 (flaxseed)，持續 2 個月，與對照組 (oral estrogen-progesterone 0.625 mg) 相較，同樣可改善輕微的停經症狀 (Lemay *et al.*, 2002)。2005 年 Hidalgo 等人給予 40 歲以上停經後婦女紅花苜蓿 (red clover) 補充劑 80 mg/day，實驗進行 3 個月，與安慰劑組相較，結果發現紅花苜蓿補充劑組也可明顯降低停經後症狀，且對陰道細胞有正面的影響 (Hidalgo *et al.*, 2005)。

2. 心血管疾病 (Cardiovascular disease)

2005 年 Wu 等人利用本土山藥製備的飲食給予 23 位停經婦女，約 390 g (取代一天 2/3 的主食類)，實驗進行 29 天，結果受試者血膽固醇顯著降低，且因脂質過氧化作用降低，使尿中 isoprostane 排出減少，LDL 於體外被 Cu^{2+} 氧化之延滯期 (Lag time) 顯著延長，血清 E1 (Estrone)、E2 (Estradiol) 和 SHBG (sex hormone-binding globulin) 濃度都顯著增加，顯示山藥攝取對停經後婦女之保健有所助益 (Wu *et al.*, 2005)。

1999 年，美國 Food and Drug Administration 提出每天食用 25 克大豆蛋白能降低心血管疾病的危險率。Anderson 等學者評估大豆蛋白與血清脂質關係顯示，每天平均攝取 47 克大豆蛋白，可降低總膽固醇 9%、LDL-膽固醇 13% 並且讓 HDL-膽固醇有上升的趨勢 (Anderson *et al.*, 1995)。

3. 乳癌 (Breast cancer)

雌激素主要有兩條不同的代謝路徑，分別由不同種類的 cytochrome P450 酵素催化，其一是在第 2 個碳位置上加氫氧基，所產生的 2-hydroxyestrone (2-OHE1) 無雌激素活性也無致癌性，另一則是第 16 個碳位置加上氫氧基，產生的 16 α -hydroxyestrone (16 α -OHE1) 會與雌激素受器結合，表現出雌激素活性，且具致癌性，已有流行病學研究建議將兩者比值當作乳癌危險性指標 (Kabat *et al.*, 1997)。

國內研究指出，針對停經後婦女施予賀爾蒙替代治療 (hormone replacement therapy, HRT)，每天補充 114 mg 異黃酮，一個月後發現會尿液中具致癌性之 16 α -OHE1 的濃度有降低的現象 (黃, 2000)。1999 年 Haggans 等人給予停經後婦女每天 0-10 g 亞麻籽，發現尿液雌激素代謝物 2-OHE1 及 2-OHE1 與 16 α -OHE1 的比例有劑量依存關係，因尿液中 16 α -OHE1 的濃度低，使致癌性降低 (Haggans *et al.*, 1999)。

在山藥方面，本土山藥製備的飲食 (取代一天三分之二的主食類) 給予停經婦

女，實驗進行 29 天，結果顯示尿液雌激素代謝物總量上升與具基因毒性的 16 α -OHE1 濃度下降，顯示山藥可增高雌激素的同時，乳癌發生的危險性也下降了，但目前機轉不明 (Wu *et al.*, 2005; 鐘，2002)。

(3) 骨質疏鬆症 (osteoporosis)

骨質疏鬆症，是一種多病因引起的異質性疾病。例如：雌性素 (estrogen) 缺乏、顛峰骨量的不足、副甲狀腺素 (parathyroid hormone) 的分泌、維生素 D 的攝取不足等 (楊，1997)。骨質疏鬆症是停經後婦女主要的更年期症狀 (menopausal symptoms) 之一，發生主因為破骨作用 (bone resorption) 過盛，而造骨作用 (bone formation) 相對上不足而導致。若選擇與 estrogen receptor β 親和力較強之植物性雌激素，可選擇性作用在骨骼與心血管上，而減少刺激乳房和子宮內膜的作用，不但可使因骨質疏鬆引起的骨折危險率降低外，更不會因動物性雌激素的補充而帶來癌症的危機 (Anonymous, 1997; Castelo-Branco *et al.*, 1999)。

體外細胞實驗相關研究中證實 genistein 可抑制小鼠破骨細胞 (osteoclast) 形成及增加骨質形成 (Gao and Yamaguchi, 1999; Yamaguchi and Gao, 1998a; Yamaguchi and Gao, 1998b)，daidzein 在 Osteoblastic MC3T3-E1 cells 中亦證實出有類似 genistein 之功效 (Sugimoto and Yamaguchi, 2000)。在動物 osteoclast-like 之骨髓細胞生成的研究中，發現 genistein (10⁻⁵ M) 具有和 estradiol (10⁻⁸ M) 相同抑制骨質流失的功效，但效能卻差了千分之一倍，可能與 genistein cAMP 訊號傳遞相關 (Gao and Yamaguchi, 1999)。

利用 μ CT (microcomputed tomography scanning) 和 DEXA (dual energy x-ray absorptiometry) 測定骨質的實驗中，發現卵巢去除雌鼠的動物實驗中，分別補充 genistein (0.7 mg/day) 與 estradiol (0.1 μ g/day) 2-4 週後，對股骨骨質皆有回復的效果 (Kabat *et al.*, 1997)。去除卵巢母鼠補充大豆蛋白及短時間餵食大豆蛋白飲食，對骨頭都有保護作用且可延緩骨質的流失現象 (Zambell *et al.*, 2003; Nishina

and Freedland, 1990; Illman *et al.*, 1993)。研究發現 genistein 預防骨質流失的機制是藉由減少破骨細胞 (osteoclast) 的活性，使 tartrate-resistant acid phosphatase 活性減少 (Ishimi *et al.*, 1999)。Higdon 等人的研究指出，將 DHEA (dehydroepiandrosterone)、diosgenin 及雌激素做成可長期輸送的 TCPL 錠，並植入切除卵巢小鼠的腹腔中，33 天後，卵巢切除小鼠都沒有因卵巢切除而造成體重增加、性器官萎縮和骨質疏鬆病變 (Higdon *et al.*, 2001)。

亞洲人的傳統飲食富含大豆及其製品，股骨發生骨折的發生率較白人來的低 (Ling *et al.*, 1996; Leu and Cooper *et al.*, 1996)。每天給予停經後婦女含有 90 mg 異黃酮的大豆蛋白 24 周，結果受試者腰椎骨礦物含量 (bone mineral content, BMC) 與骨質密度 (bone mineral density, BMD) 都顯著增加 (Potter *et al.*, 1998)。更年期婦女每天給予含 80.4 mg aglycone 異黃酮的黃豆蛋白 40 g 或小麥蛋白，6 個月後給予黃豆蛋白的婦女可減緩腰椎骨的骨質流失 (Alekel *et al.*, 2000)。Hsu 等人給予停經婦女每天 150 mg 異黃酮，6 個月後骨質密度與起始值相較無顯著差異，但無對照組，可能骨質密度沒降低已是正向結果 (Hsu *et al.*, 2001)。日本學者利用黃豆之酒精萃取物給予更年期婦女每天服用異黃酮 61.8 mg 和 37.8 mg，經過 4 週和 10 週後，就尿液中骨質分解的生化指標 (pyridinoline 與 deoxypyridinoline) 有顯著的降低 (Uesugi *et al.*, 2002; Yamori *et al.*, 2002)。義大利學者的實驗為給予更年期婦女異黃酮 (54 mg/day) 為期 1 年，與安慰劑組比較，血清中的骨質合成指標 (alkaline phosphatase 與 osteocalcin) 有上升的現象 (Morabito *et al.*, 2002)。

第貳章 研究動機與目的

停經後的婦女，女性賀爾蒙呈現缺乏的狀態，這種賀爾蒙的改變使得停經後婦女產生許多的臨床症狀，像是熱潮紅 (hot flush)、心悸 (palpitation)、失眠 (insomnia)、夜汗 (night sweats)、骨質疏鬆 (osteoporosis)、陰道萎縮 (vagina atrophy) 等，同時罹患動脈粥狀硬化及冠狀動脈心臟病的風險也提高。其中，骨質疏鬆症會影響全部的骨骼，使骨骼變的脆弱並增加骨折的可能性，通常骨質流失較迅速的位置是在臀部，脊椎以及手腕的部位，皮質骨和海棉骨的骨密度及骨量都會下降至原有的 50% 以下，但在未發生骨折以前不會有任何的症狀或是疼痛，因此亦稱為沉默的疾病。

紅麴中所含的 monacolin K 成分和市售的 lovastatin 沒有不同，且紅麴中含有其他微量的有效成分，使得紅麴降血脂效果比一般 statin 類藥物更好。Statin 類藥物不但可以降低血脂濃度，更可以抑制破骨細胞的產生或是促進成骨細胞的分化，先前動物實驗也指出，服用紅麴的大鼠，骨密度有明顯的提升，且較相對來說高劑量的 lovastatin 效果更好，之後亦在 *in vitro* 中得到相同的結果。

山藥塊莖含有豐富的固醇類皂素，經水解去掉糖基的配糖體 (aglycone) 稱為薯蕷皂苷素或薯蕷皂苷配基 (diosgenin)，是山藥之主要活性成分，為固醇類皂苷素 (steroid saponins) 之一種。diosgenin 之結構非常類似膽固醇、黃體素及睪固酮之前驅物質 (dehydroepiandrosterone, DHEA)，而目前固醇類皂素已證實可用來合成固醇類荷爾蒙、皮質類固醇和避孕藥等 (Chen and Wu *et al.*, 1994)。在前人的動物實驗指出 diosgenin 的確具有植物雌激素活性，而先前對於植物雌激素的相關研究，不論是細胞、動物或是人體實驗，都證明能有效保護骨頭並減少骨質流失。

山藥的直鏈澱粉含量與在來米接近，足夠供給紅麴菌作為碳源，且其更含有大量類似膳食纖維的不溶性澱粉不會被紅麴菌所分解，經由攝食能夠控制糖尿病病情，降低血中總膽固醇與三酸甘油酯，有效減低血中及肝臟內脂質含量，改善

心血管症狀。發酵後的紅麴山藥具有降血脂與抗氧化等複合性的保健功效，這也將提高紅麴產品的經濟價值與應用性。本研究室在先前之研究中發現，多數的紅麴菌株利用山藥作為固態培養基質時可生成較高量的 monacolin K，其生成量為以在來米為基質發酵所得紅麴米的 5 倍，高 monacolin K 含量的紅麴山藥將可提供較佳的骨質保護效果，另外，山藥本身所含的植物雌激素對骨質密度也有幫助，因此，紅麴山藥對於骨質密度的影響，是一個值得研究的主題。

本實驗利用切除卵巢鼠做為模擬停經後婦女的動物模式，分別利用不同劑量的山藥與紅麴山藥，及以大豆異黃酮做為正控制組分別餵食大鼠，觀察大鼠骨質的變化情況。餵食期間利用 micro-CT (microcomputed tomography scanning) 和 DEXA (dual energy x-ray absorptiometry) 來監控骨質的變化，待骨質密度產生變化後，進行犧牲，進一步取骨組織做解析度較高的 μ CT 測定，比較不同組別大鼠骨頭中骨小樑的分佈情形與數目，同時測定血液中骨質代謝的生化指標，了解是幫助骨質合成還是抑制骨質耗損的作用較強，圖 2-1 為本研究大綱與流程。

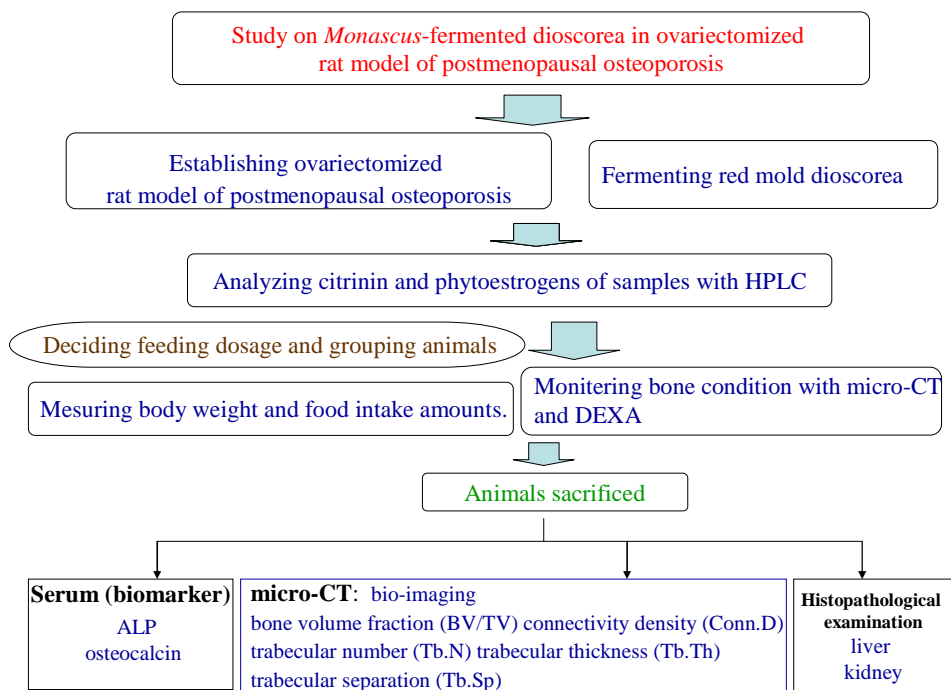


圖 2-1、本研究大綱與流程

Fig. 2-1. The scheme and flow chart of this study

第參章 材料與方法

一、菌株之培養

(一) 試驗菌株：

本研究之試驗菌株：

Monascus purpureus NTU 568 紅麴菌株由本研究室自行篩選得到，最適生長溫度在 25-35°C 之間，保存於 PDA 培養基中。

(二) 培養基組成

1. 菌株保存用培養基

Potato dextrose agar (PDA)	
Potato dextrose broth	24 g
Agar	15 g
Distilled water	1000 mL
	pH 5.1

2. 種菌培養基 (Hennerberg medium)

Glucose	100 g
Peptone	10 g
KNO ₃	2 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	2 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g
CaCl ₂	0.1 g
Distilled water	1000 mL
	pH 6.0

二、儀器

(一) 固態培養相關設備

1. 純水製造機 (ultrapure water system) (Millipore Co., Molsheim, France)
2. 恆溫振盪培養箱 (orbital incubator shaker) (Model 717, Hotech Co., Taipei, Taiwan)
3. 黴菌操作箱 (Kansin Co., Taipei, Taiwan)
4. 殺菌釜 (autoclave) (Model SS-320, Tomy Co., Tokyo, Japan)
5. pH meter (Model 6071, Jenco Co., San Diego, CA, USA)
6. 離心機 (Himac CR-21, Hitachi Co., Tokyo, Japan)

(二) 萃取及分析相關設備

1. 超音波洗淨器 (ultrasonic cleaner) (Model 690D, Crest Co., NY, USA)
2. HPLC 層析幫浦 (SCL-10Avp, Shimadzu Co., Tokyo, Japan)
3. HPLC 光電二極管陣列偵測器 (photodiode array detector) (SPD-M10Avp, Shimadzu Co., Tokyo, Japan)
4. HPLC 螢光偵測器 (fluorescence detector) (FL-1, Rainin Co., Wobum, MA, USA)
5. HPLC C₁₈ 層析管柱 (C₁₈ column) : Luna C₁₈ (2) column (Phenomenex, 150 x 4.6 mm I.D.; 5 µm particle size) equipped with a 2 cm LC-18 guard column (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
6. 水浴恆溫槽 (Water bath) (Model DB, Deng Yng Co., Taipei, Taiwan)
7. 均質機 (Model PRO 200, PRO Scientific Inc., Oxford, CT, USA)

(三) 骨質密度測定相關設備

1. Microcomputed tomography (µCT) (GE eXplore Vista DR PET/CT scanner, GE Co., Fairfield, CT, USA)
2. Microcomputed tomography (µCT) (SkyScan 1076, SKYSCAN, Kontich, Belgium)
3. Norland 骨密度偵測儀 (DEXA, Dual-Energy X-ray Absorptiometer, XR-26; Norland, Fort Atkinson, WI, USA)

三、藥品

(一) 標準品

Citrinin, diosgenin, daidzein, genistein, formononetin, secoisolariciresinol 等標準品均購自 Sigma 公司 (St. Louis, MO, USA)。

(二) 培養基

Yeast extract, peptone, PDA broth, bacto-agar 均購自 Difco 公司 (Franklin Lakes, NJ, USA)。

(三) 其餘藥品、溶劑皆為試藥級

四、固態培養方法與條件

(一) 種菌之培養

將紅麴菌株培養於 Potato Dextrose Agar (PDA) 培養基 5 天後，挖取約 1×1 cm 大小之菌塊，接種至含 60 mL 種菌培養基之 500 mL Hinton flask 中，於 30°C、110 rpm 振盪培養約 48 小時。在接種前觀察種菌液中菌體生長狀況，至少可觀察到菌絲球之狀態為標準。

(二) 固態培養

1. 培養基

本研究中，固態培養所使用之培養基為山藥。

2. 固態培養之步驟及條件 (蘇等, 1970)

秤取固態培養基質 500 g，清洗後浸水 6~8 小時。用棉布濾水後，置於麴布之上，鋪平在麴盤中，殺菌 (121°C，20~25 min)。再進行灑水 100 mL。進行第二次殺菌 (121°C，20 min)，並於冷卻後進行接菌。取種菌液接入固態基質中(5%)，並充分攪拌均勻。接種後操作管理如下：

第一天：接種 接種後用紗布包妥，置於 30°C 恆溫箱中，將固態基質集中於麴盤

之中央。

第二天：翻拌 菌絲急速繁殖，為防止品溫過度升高，適時給予翻拌，且視繁殖情況，將山藥厚度逐漸改薄，以控制保持紅麴菌之最適繁殖條件。

第三天：頭水 因紅麴菌急速繁殖，固態基質中之水分，除一部份溫度上升被蒸發外，大部分被繁殖所消耗，因此基質變成乾燥。為了使紅麴菌順利繁殖起見，需施行浸水，給予適當水分。此項操作稱為頭水。將麴盤內之半製品取出，浸於無菌水中 30 min，浸畢用紗布濾水 30 min。頭水後仍將半製品盛於麴盤內，並放入 30°C 恆溫箱培養。

第四天：次水 此時半製品變紅，繁殖最為旺盛，水分被紅麴菌繁殖及蒸發所消耗，故需實行第二次浸水，此項操作稱為次水。將半製品用紗布包妥，浸於無菌水中 20 秒鐘。

第五天：完水 為調節半製品使含適當水分，促進繁殖與菌絲之滲透，需施行第三次灑水，水量為 120 mL 每隔 12 hr 加一次，共加三次，此項操作稱為完水。

第六至九天：後熟 完水後漸進入後熟階段。此時需給予適當翻拌，約 10 小時翻拌一次。

第九天：收麴 將完成發酵後的紅麴發酵物於烘箱內乾燥 (45°C, 24 hr)，之後以磨豆機磨成粉末狀以進行分析。

3. 培養之狀況

以傳統麴盤進行培養，製作較小型之麴盤，長、寬、高各約 20 × 30 × 5 cm；培養時底層放置麴布包裹固態基質，此有利於翻麴，同時可以保持濕度；上層再蓋上一層麴布以隔絕外界之污染，同時並可保持發酵過程紅麴米的濕度。整個培養過程於開放式空間進行。

五、Monacolin K、monascin、ankaflavinc、citrinin 與植物雌激素分析方式

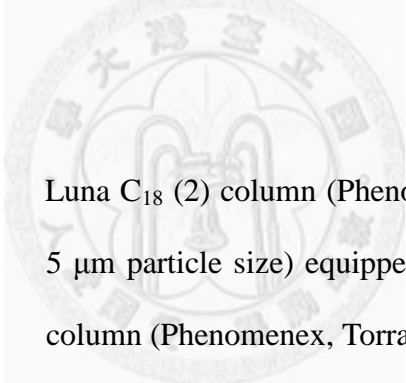
(一) Monacolin K、monascin、ankaflavinc 與 citrinin 分析方式 (Lee *et al.*, 2006)

1. Monacolin K、monascin、ankaflavinc 與 citrinin 之萃取

樣品稱取 0.5 g，加入 5 mL ethanol，於 70°C 水浴中加熱 0.5 hr 進行萃取，以 0.45 μm 濾膜過濾後進行高效液相層析 (high performance liquid chromatography, HPLC) 分析。

2. Monacolin K、monascin、ankaflavinc 與 citrinin 之測定

以 HPLC 測定 monacolin K、monascin、ankaflavinc 與 citrinin 之含量，並以其標準品製作標準檢量線，由檢量線以內差法求得濃度。HPLC 之操作條件如下表所示：



Column	Luna C ₁₈ (2) column (Phenomenex, 150 x 4.6 mm I.D.; 5 μm particle size) equipped with a 2 cm LC-18 guard column (Phenomenex, Torrance, CA, USA) A solvent: acetonitrile : triflouracetate (1000:0.5) B solvent: water : triflouracetate (1000:0.5)
Mobile phase	Gradient elution: A/B (51/49): 29 min A/B (80/20): 29.1-53 min A/B (51/49): 53.1-60 min
Flow rate	1 mL/min
UV detection	238 nm
Fluorescence detection	Excitation $\lambda_{\text{max}} = 330 \text{ nm}$ Emission $\lambda_{\text{max}} = 500 \text{ nm}$

(二) 植物雌激素分析方式

1. 異黃酮類 (isoflavone) (Lin *et al.*, 2005)

先前學者 (Lilian *et al.*, 2007) 曾於山藥中測出含 daidzein, genistein 及 formononetin 此三種異黃酮類植物雌激素，故選定 daidzein, genistein 及 formononetin 做測定與分析。

(1) Daidzein, genistein 及 formononetin 之萃取

樣品稱取 0.05 g，加入 1 mL 80% methanol，超音波震盪 30 min 後於 60°C 水浴中加熱進行萃取，以 15000 x g 離心 15 分鐘後取上清液，以 0.45 μ m 濾膜過濾後，進行 HPLC 分析。

(2) Daidzein, genistein 及 formononetin 之測定

以 HPLC 測定 daidzein, genistein 及 formononetin 之含量，並分別以 daidzein, genistein 及 formononetin 之標準品製作標準檢量線，由檢量線以內差法求得濃度。HPLC 之操作條件如下表所示：

Column	Luna C ₁₈ (2) column (Phenomenex, 150 x 4.6 mm I.D.; 5 μ m particle size) equipped with a 2 cm LC-18 guard column (Phenomenex, Torrance, CA, USA) A solvent: 0.1% acetic acid, pH 3.4 B solvent: 0.1% acetic acid:acetonitrile = 1:4
Mobile phase	Gradient elution: A/B (85/15) - A/B (55/45): 0-35 min A/B (0/100) - A/B (85/15): 30.1-38 min,
Flow rate	1 mL/min
Temperature	37°C
UV detection	240 nm

2. 木質酚類 (lignin) (Avula *et al.*, 2005)

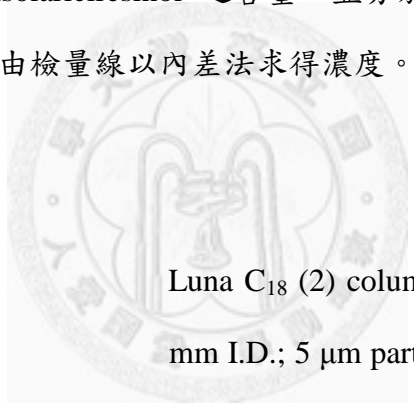
先前學者 (Lilian *et al.*, 2007) 曾於山藥中測出含 secoisolariciresinol 此種木質酚類植物雌激素，故選定 secoisolariciresinol 做 HPLC 分析。

(1) Secoisolariciresinol 之萃取

取 500 mg 的樣品在甲醇中以超音波震盪 20 分鐘，接著以 3300 xg 轉速離心 15 分鐘，以上步驟重覆三次。取上清液收集後，以甲醇調整至體積 10 mL，再取 5 mL 與等體積水充份混和後，最後以 0.45 μ m 濾膜進行過濾。

(2) Secoisolariciresinol 之測定

以 HPLC 測定 secoisolariciresinol 之含量，並分別以 secoisolariciresinol 之標準品製作標準檢量線，由檢量線以內差法求得濃度。HPLC 之操作條件如下表所示：



Column	Luna C ₁₈ (2) column (Phenomenex, 150 x 4.6 mm I.D.; 5 μ m particle size) equipped with a 2 cm LC-18 guard column (Phenomenex, Torrance, CA, USA) A solvent: water B solvent: acetonitrile C solvent: reagent alcohol
Mobile phase	Gradient elution: 50A/30B/20C: 0-15 min 50A/30B/20C to 20A/40B/40C: 15.1-25 min
Flow rate	1 mL/min
UV detection	215 nm

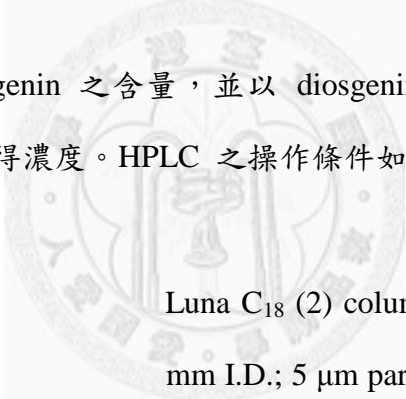
3. 薯蓣皂配基 (diosgenin) (Taylor *et al.*, 2000)

(1) Diosgenin 之萃取

取 10 克樣品，置入圓筒濾紙 (28 × 100 mm)，放入索氏萃取裝置 (Soxhlet extractor)，以 150 mL 甲醇於 85 °C 下迴流萃取 10 小時，萃取液減壓濃縮至乾，加入 2 N 硫酸 (以 70% 異丙醇溶液調配)，於 80 °C 中迴流 2 小時，再於 80 °C 放置 30 分鐘，藉以蒸去異丙醇，而後加入 20 mL 正己烷，進行劃分收集萃取三次，合併三次萃取之正己烷層，以 50 mL 水洗三次，經真空濃縮去除正己烷後，再以甲醇定容至 5 mL，最後以 0.45 μm 濾膜進行過濾行 HPLC 分析。

(2) Diosgenin 之測定

以 HPLC 測定 diosgenin 之含量，並以 diosgenin 之標準品製作標準檢量線，由檢量線以內差法求得濃度。HPLC 之操作條件如下表所示：



Column	Luna C ₁₈ (2) column (Phenomenex, 150 x 4.6 mm I.D.; 5 μm particle size) equipped with a 2 cm LC-18 guard column (Phenomenex, Torrance, CA, USA) A solvent: acetonitrile/water = 95/5 (v/v)
Mobile phase	Isocratic elution: A solvent: 0-25 min
Flow rate	1 mL/min
UV detection	203 nm

六、紅麴山藥改善骨質疏鬆之評估

(一) 實驗動物之飼養

本研究所採用之動物為購自樂思科生物科技股份有限公司 (BioLASCO Taiwan CO., Ltd.) 之 Sprague-Dawley 品系雌性大鼠共 72 隻，八週齡。飼養時控制相對溼度 60%，溫度控制於 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ，光照時間為 9:00~21:00 之 12 小時光照循環。

依規定控制動物室溫度、清潔及燈光調節，並保持安靜。應加飲水 (逆滲透水)；每 2 天換墊料一次；飼料需保持充足。

(二) 試驗物質與餵食劑量訂定

根據利用 HPLC 測定出山藥及紅麴山藥中雌激素的種類與含量，並參照文獻定出劑量標準。測定的植物雌激素有異黃酮類 (isoflavone)，包含 daidzein, genistein 及 formononetin；木質酚類 (lignin)，包含 secoisolariciresinol；薯蕷皂配基 (diosgenin)。

HPLC 測定出的結果顯示，山藥及紅麴山藥皆不含異黃酮類、木質酚類等成分，但皆含有 diosgenin，其中紅麴山藥 diosgenin 的含量為山藥的二倍，參照文獻之後，定出二部份餵食劑量標準。第一部份為參照餵食山藥改善骨質疏鬆之有效劑量 (750 mg/kg/day) (Chen *et al.*, 2008) (表 2-1)，第二部份為參照 diosgenin 具雌激素活性的有效劑量 (Aradhana *et al.*, 1992) (表 2-2)。

正控組為餵食大豆異黃酮，參考文獻之有效劑量為餵食 80 mg/kg/day 大豆濃縮物 (soy concentrate)，含有 34.8% 異黃酮 (isoflavone) (Picherit *et al.*, 2001)。本實驗餵食正控組之異黃酮購自市售之大豆異黃酮膠囊 (Soy Isoflavone, VSC Leader Source Products Co., Vancouver, BC, Canada)，含 40% 異黃酮，組成分為不含糖基 (aglycone) 之 genistein 與 daidzein。

表 2-1、根據山藥有效劑量定出餵食劑量

Table 2-1. Deciding the feeding dosage by the effective dosage of dioscorea.

	1 X	2 X
Feeding dosage of dioscorea (mg/kg/day)	750	1500
Feeding dosage of red mold dioscorea (mg/kg/day)	375	750
Diosgenin content (mg)	0.146	0.291

表 2-2、根據 diosgenin 有效劑量定出餵食劑量

Table 2-2. Deciding the feeding dosage by the effective dosage of diosgenin.

	1X	2X
Feeding dosage of diosgenin (mg/kg/day)	20 (effective dosage)	40
Feeding dosage of dioscorea (g/kg/day)	29.4	58.8
Feeding dosage of red mold dioscorea (g/kg/day)	14.7	29.4

(三) 實驗動物之分組

動物飼養至十二週齡時，進行偽手術或切除卵巢手術，根據山藥與紅麴山藥植物雌激素的分析結果，再進一步將切除卵巢的母鼠分為二部份，第 I 部份為參考文獻餵食山藥有效劑量分為 I. 山藥一倍劑量 (I. dioscorea 1X)、I. 紅麴山藥一倍劑量 (I. RMD 1X)、I. 紅麴山藥二倍劑量 (I. RMD 2X)。第 II 部份為參考文獻 diosgenin 具雌激素活性的有效劑量分為 II. 山藥一倍劑量 (II. dioscorea 1X)、II. 紅麴山藥一倍劑量 (II. RMD 1X)、II. 紅麴山藥二倍劑量 (II. RMD 2X)，再加上餵食一般飼料之切除卵巢組 (OVX)、餵食異黃酮之正控制組 (ISO) 及偽手術組 (sham) 共計九組 (圖 3-1)，每組八隻，均依體重隨機分配，使每組平均體重大約一致，餵食時間為四週。

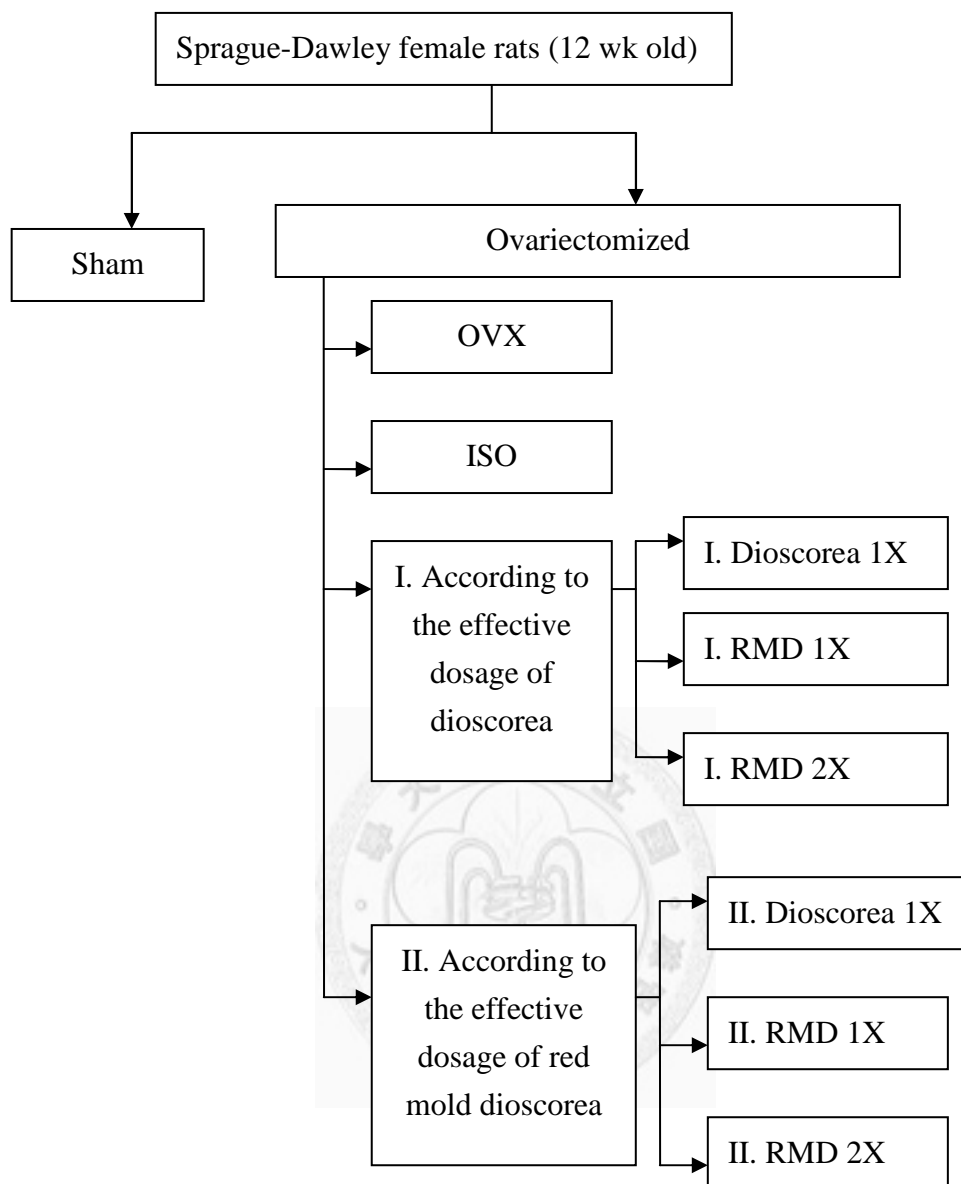


圖 3-1、實驗動物分組

Fig. 3-1. Experimental animal grouping

(四) 骨質疏鬆模式大鼠之誘導

母鼠 12 週齡大時，進行偽手術或去卵巢手術。將大鼠以 sodium pentobarbital (50 mg/kg) 腹腔注射進行麻醉，約 20 分鐘後，進行自背部或腹部之手術。手術前先備妥各種手術器械及用具 (包括大小剪刀、手術刀、鑷子、止血鉗、縫針、縫線及毛巾) 並進行滅菌消毒。

自背部進行手術之方法如下：先將大鼠背部剔毛，以碘酒消毒該處皮膚後背部朝上置放，以手在背部由後向前觸摸找到最低之肋骨，並延伸向上至中間脊椎位置，再用手術刀將大鼠該位置的皮層劃開之後，拉住皮層往一側移動，之後在肌肉層上劃一小切口，找到卵巢後，先將靠近卵巢的子宮角結紮處理，再除去卵巢，同法切除另一側之卵巢。待兩側卵巢切除完成後，以手術縫線、縫針縫合肌肉與皮膚切口，並於傷口塗以碘酒液及抗生素軟膏，再用紗布及彈性繃帶包覆後，將老鼠放入鋪有乾淨墊料及含飼料和飲用水之大鼠籠，保溫並觀察其術後情形，術後第一天即可恢復正常活動。

自腹部進行手術的方法如下：先將大鼠腹部剔毛，以碘酒消毒該處皮膚後腹部朝上置放於無菌操作臺中，以手術刀沿腹部中線劃開皮層，再劃開肌肉層，用手術器械將皮層與肌肉層往兩側拉開，找到一側卵巢後，先將靠近卵巢的子宮角結紮處理，再除去卵巢，同法切除另一側之卵巢。待兩側卵巢切除完成後，以手術縫線、縫針縫合肌肉與皮膚切口，並於傷口塗以碘酒液及抗生素軟膏，再用紗布及彈性繃帶包覆後，將老鼠放入鋪有乾淨墊料及含飼料和飲用水之大鼠籠，保溫並觀察其術後情形，術後第一天即可恢復正常活動。

(五) 飼料之製備

根據訂定出的山藥、紅麴山藥與異黃酮餵食標準，配合動物每日攝食量 (約為 50 g/(kg body · d)，推算出山藥、紅麴山藥與異黃酮的成分比例。將磨成粉末之山藥、紅麴山藥，以及異黃酮 (原為粉末態)，以推算出的比例與商業基礎飼料 (Purina

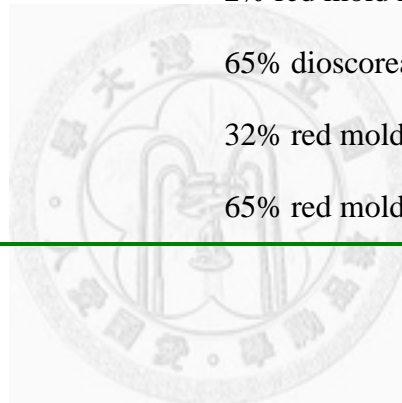
Lab Rodent Diet 5001, PMI, Richmond, IN, USA) 及預糊化澱粉 (dextrinized corn starch, ICN Biochemicals Co., Costa Mesa, CA, USA) (添加量為 13.2%) 利用攪拌機均勻混合，過程中添加適當比例的蒸餾水，使其黏稠程度似黏土後，將其平整壓製於四方鐵盤中，再均切成許多四方小塊，最後進行冷凍乾燥即得飼料成品，各組飼料組成如表 2-3 所示。



表 2-3、各組飼料組成

Table 2-3. Feed ingredient in each group

Group	Feed ingredient
Sham	100% Purina Lab Rodent Diet 5001
OVX	100% Purina Lab Rodent Diet 5001
ISO	0.06% isoflavone
I. dioscorea 1X	2% dioscorea
I. RMD 1X	1% red mold rice
I. RMD 2X	2% red mold rice
II. dioscorea 1X	65% dioscorea
II. RMD 1X	32% red mold rice
II. RMD 2X	65% red mold rice



(六) 骨質密度之測度

1. Microcomputed tomography (μ CT)

先利用 isoflurane (5%) 將動物進行氣麻後，置於 micro-CT 臺上，並利用自製之腿部固定器，將每隻動物之右腿放置角度控制大約一樣，掃描的過程中以 3% isoflurane 維持動物麻醉狀態。Micro-CT 系統之解析度為 60 μ m (40 kV, 300 μ A, 16 number of shocks)。掃描時間為 20 分鐘，之後利用系統之分析軟體，得到股骨遠端、脛骨近端的縱切面及橫切面圖片。動物犧牲之後，取右股骨浸泡於 4% paraformaldehyde 48 hr, 再換至 75% 酒精中進行保存，之後以較高解析度 (9 μ m) 之 μ CT 進行掃描，測定股骨遠端之骨小樑的數目與分佈情況。

以解析度 60 μ m 之 micro-CT 測定出之影像，進一步利用 PhotoImpact X3 進行影像處理，將圈選區域之黑白色調分離，再利用 IMAGEJ 計算白色面積佔圈選面積的比例。白色面積所佔比例愈高，代表骨質狀況愈佳。

2. Norland 骨密度偵測儀 (DEXA, Dual-Energy X-ray Absorptiometer)

進行測定前，將大鼠以 sodium pentobarbital (50 mg/kg) 腹腔注射進行麻醉後，放置於檢測台上進行掃描，之後利用系統之軟體分析右髌骨、右股骨遠端及右脛骨近端之骨密度，測量結果以 bone mineral density (BMD) (g/cm^2) 值表示，原理為利用具有兩種能量的射線穿透身體之後，系統將接受的信號傳送到電腦進行資料處理，計算骨礦物質含量 (bone mineral content, BMC)、面積 (area) 後推算出 BMD 值，精確度可達到 0.62%-1.3%。

(七) 動物犧牲、採血及肝臟病理切片鏡檢

1. 動物犧牲 (sacrifice) 法

禁食 12 小時後以二氧化碳窒息犧牲老鼠。確定老鼠無呼吸心跳開始準備解剖、抽血。

2. 抽血法

使鼠體仰臥腹面朝上，自下 (近尿道出口處附近) 沿中線向上剪開皮毛層，剪

至肋骨下方。再剪開肌肉層，於肋骨下方向左右各剪一刀，使腹腔整個暴露。勿剪破橫隔膜，以保持胸腔完整。將腸等臟器翻開並推向右側，使下腔靜脈露出，以鈍頭鑷子小心撕扯（或以棉花輕拭），除去包覆下腔靜脈血管之結締組織。將抽血管推到底後與下腔靜脈血管約成 20-30 度角，針頭插入血管中緩緩抽出血液，放入未加抗凝血劑之真空管靜置，待有明顯分層出現時，以 1,750 x g，離心 15 min，取其上層血清分裝入 eppendorf tube，於 -20°C 冷凍庫冷凍儲存，待日後分析。

3. 肝臟病理切片鏡檢：

動物犧牲後，將試驗組 (I. dioscorea 1X、I. RMD 1X、I. RMD 2X、II. dioscorea 1X、II. RMD 1X、II. RMD 2X)、切除卵巢組 (OVX)、正控制組 (ISO) 及偽手術 (sham) 之標的臟器 (肝臟、腎臟) 進行組織切片、染色及組織病理鏡檢。

(八) 血液骨質生化指標 (biomarker) 之測定

動物犧牲後，收集血漿或血清進行骨質之生化指標測定。

1. N-MID Osteocalcin

骨鈣素 (osteocalcin) 為骨基質中最重要非膠原蛋白物質，其為一種對骨骼有專一性的鈣結合蛋白，其作用需要維生素 K 的協助。骨鈣素由四十九個胺基酸組成，其分子量約為 5800 daltons。它由三個 γ -羧基谷胺酸基團 (bone-GLA-protein, BGP) 組成，骨骼合成時，骨鈣素由造骨細胞製造出來， γ -羧基谷胺酸基團的合成是靠維生素 K 的幫助並透過維生素 D₃ 的刺激。當骨鈣素由造骨細胞釋出來時，不但會合成骨基質而且會流至血液中，所以，血液中骨鈣素的濃度可視為一骨質合成指標。

有骨質流失症狀的病人，血液中能測出完整的骨鈣素 (amino acids 1-49) 與其大片段 N-MID 片段 (amino acids 1-43)，但骨鈣素當中第 43 與 44 個胺基酸間

會有斷裂，N-MID 片段就相對穩定，因此利用此片段即能測定出血液中骨鈣素的濃度，N-MID Osteocalcin 即為用來定量血漿中骨鈣素 N-MID 片段之商用 kit。

2. 骨鹼性磷酸酶 (bone alkaline phosphatase, bone-ALP)

Bone alkaline phosphatase (bone-ALP) 是一種醣蛋白 (tetrameric glycoprotein) 利用 corboxy-terminal glycan-phosphatidyl-inositol anchor 附著於骨細胞膜上，共有四種結構的同功酶：肝-骨骼-腎型、腸型、胎盤型及由生殖細胞而來的變異，此酵素存在於骨母細胞、肝細胞、白血球、腎臟、脾臟、胎盤、前列腺和小腸，而肝-骨骼-腎型是特別重要。在骨質代謝合成作用中，bone-ALP 經由磷酯酵素作用而釋出於血液循環中，所以 bone-ALP 可以作為骨質代謝中之生化指標，可反應出骨細胞的代謝狀態，並精確評估骨代謝狀態。對於骨質疏鬆症的病人而言，因骨質合成與流失作用是並存的，大量骨質流失乃在於合成與流失作用之失調。利用 bone-ALP 偵測骨質合成作用，亦可代表其流失之程度。

ALP 的升高可見於所有型式的膽汁滯留症，特別在阻塞性黃疸、骨骼系統的疾病亦會升高，例如 Paget's disease、副甲狀腺機能亢進、佝僂病、軟骨病、骨折和惡性腫瘤。小孩及青少年之 ALP 活性也會有明顯的上升，此乃因在迅速的骨骼生長後，造骨細胞的活性增加所導致。臨床上大部分的骨質疏鬆患者，大都發生於停經後女性，因為體內雌激素 E₂ 的缺乏，此外卵巢切除的病人亦然。ALP 即為用來定量血漿中 bone-ALP 之商用 kit。

七、生物統計分析方法

以 SPSS 系統之單因子變方分析 (one-way ANOVA) 進行統計處理，再以 Duncan's Multiple Range Test 作組間的差異性比較， $p < 0.05$ 表示具有顯著性差異。

第肆章 結果與討論

一、Citrinin、Monacolin K、monascin、ankaflavinc 與植物雌激素之分析

(一) 紅麴山藥中 citrinin 含量之分析

表 4-1 為 citrinin 標準品之 HPLC 分析結果，再根據 citrinin 之檢量曲線 (圖 4-1)，利用內插法求出紅麴山藥樣品中 citrinin 的濃度，分析三重複的結果分別為 4.32 ppm、4.53 ppm、5.03 ppm，平均濃度為 4.63 ppm (表 4-2)。圖 4-2 為 citrinin 標準品與紅麴山藥樣品之 HPLC 圖譜。



表 4-1、Citrinin 標準品之 HPLC 分析結果

Table 4-1. The HPLC analyzing results of citrinin standard

	Concentration (ppm)	Retention time (min)	Area
Standard 1	10	9.377	848561
Standard 2	5	9.717	346694
Standard 3	2.5	9.947	145887
Standard 4	1.25	9.727	64681
Standard 5	0.625	9.691	15163

表 4-2、紅麴山藥樣品中 citrinin 之 HPLC 分析結果

Table 4-2. The HPLC analyzing results of citrinin in red mold dioscorea samples

	Retention time (min)	Area	Concentration (ppm)
Sample 1	9.320	292332	4.32
Sample 2	9.343	309142	4.53
Sample 3	9.350	349520	5.03
平均濃度			4.63

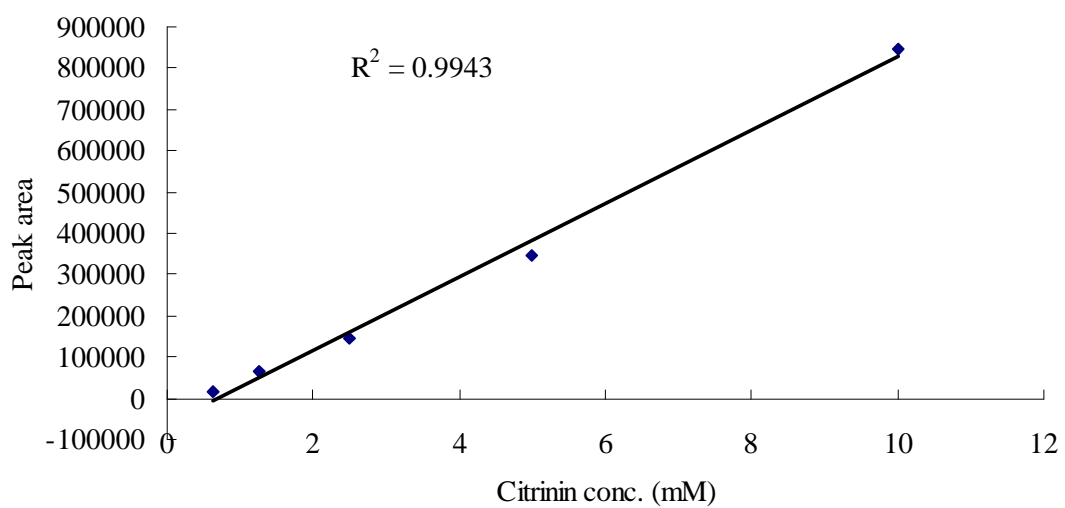
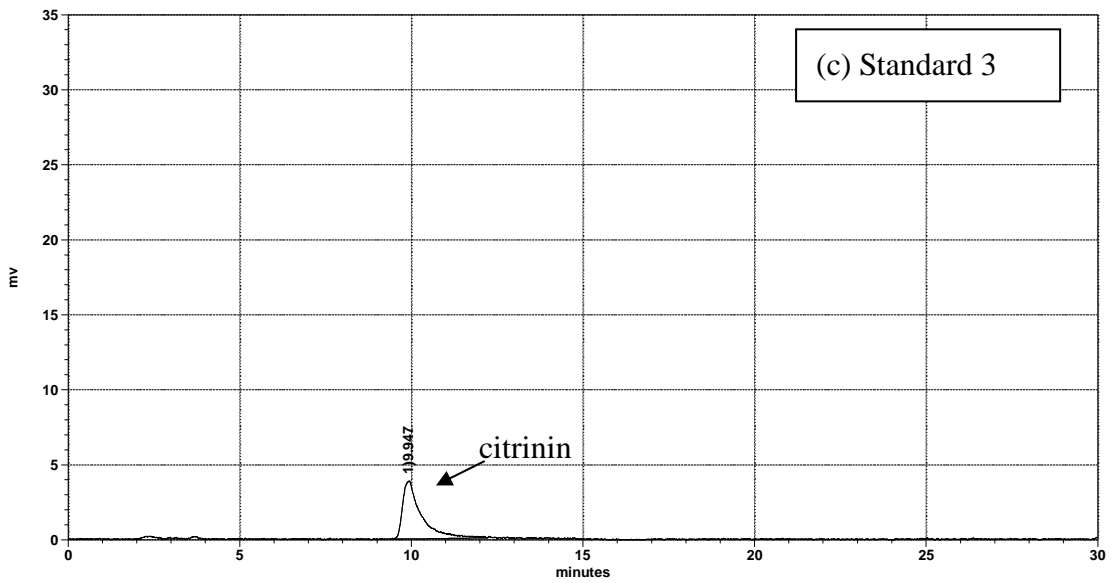
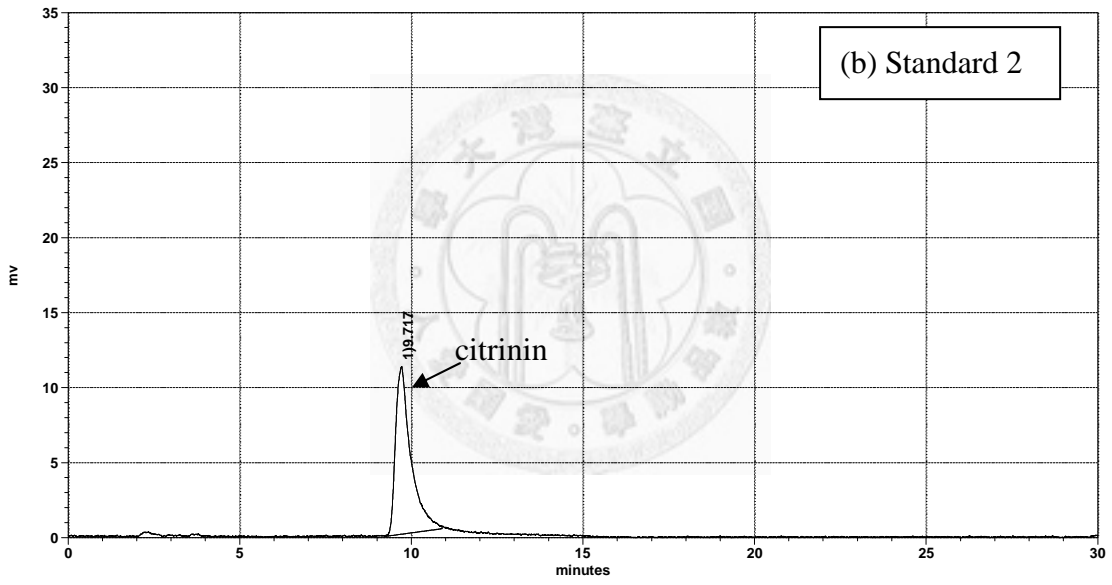
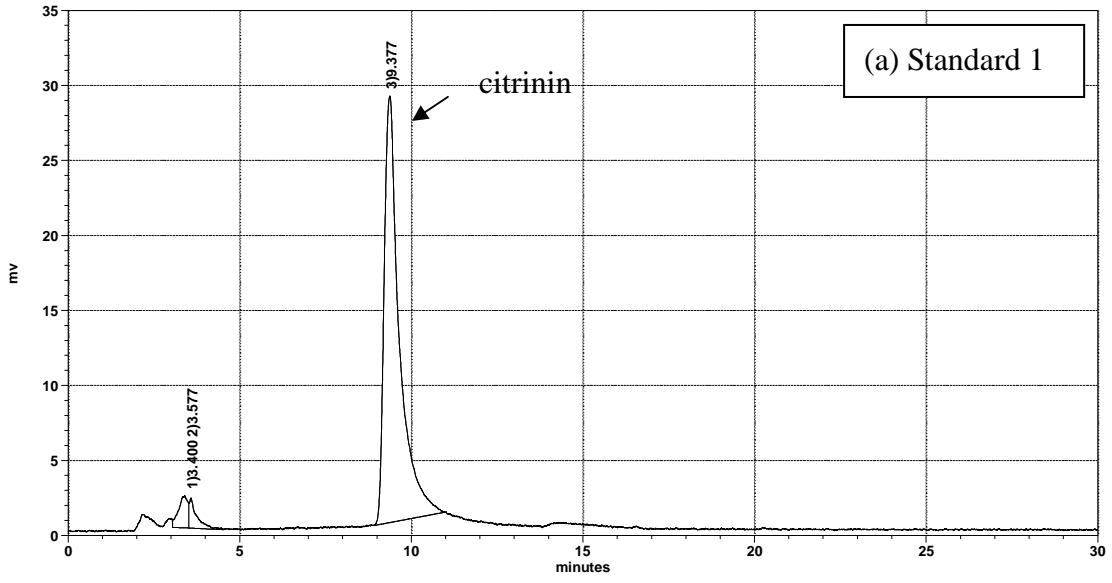
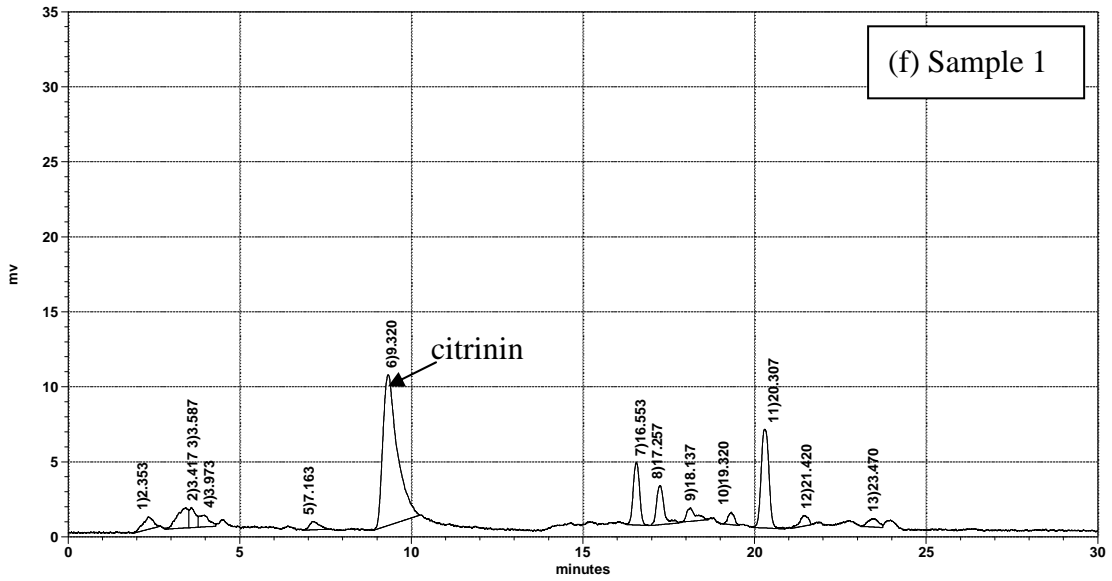
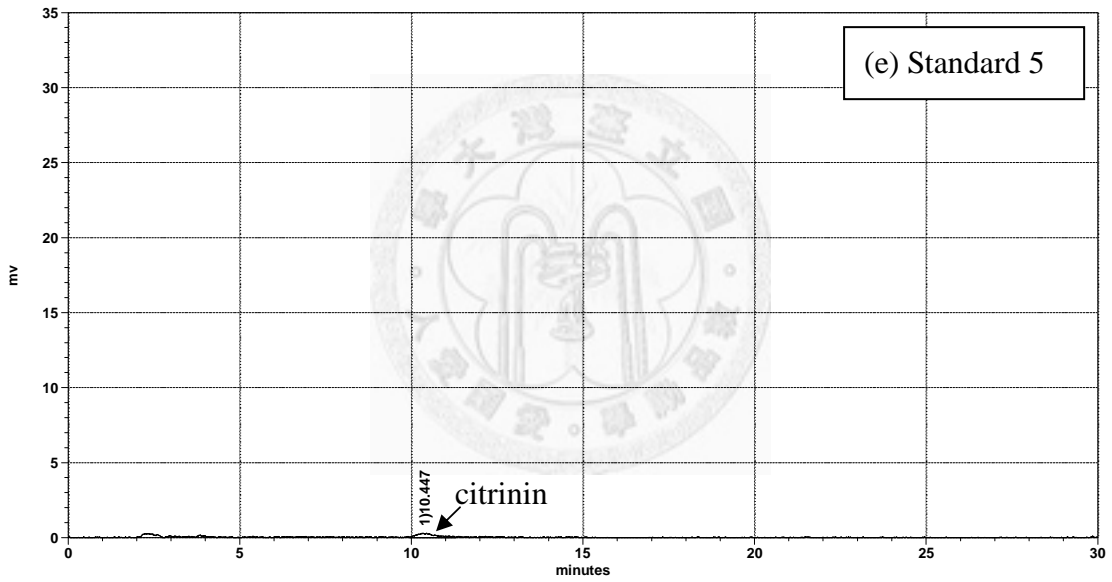
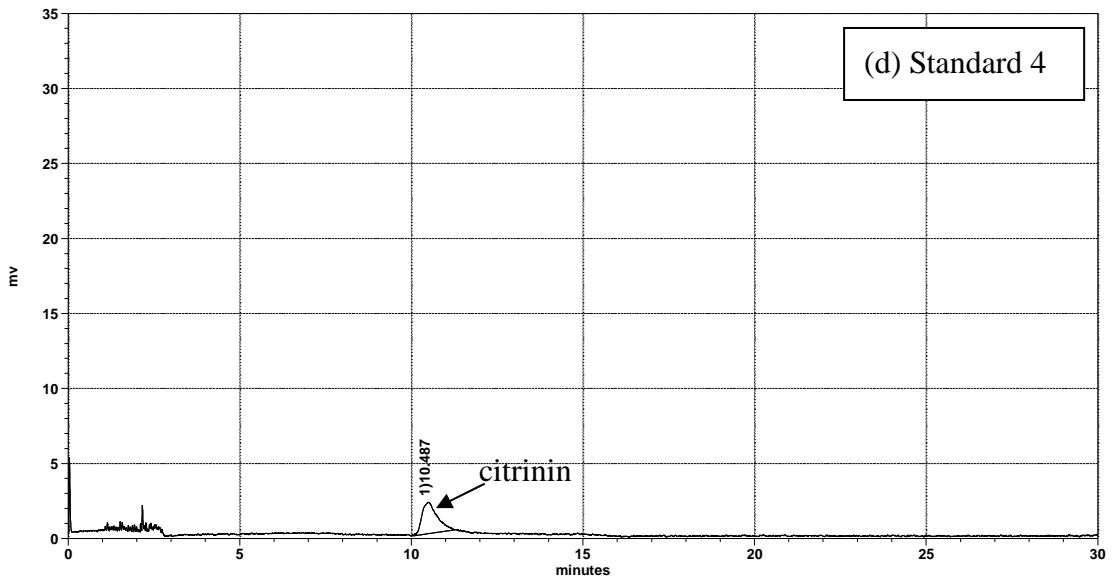


圖 4-1、Citrinin 之 HPLC 檢量曲線

Fig. 4-1. Standard curve of citrinin with HPLC





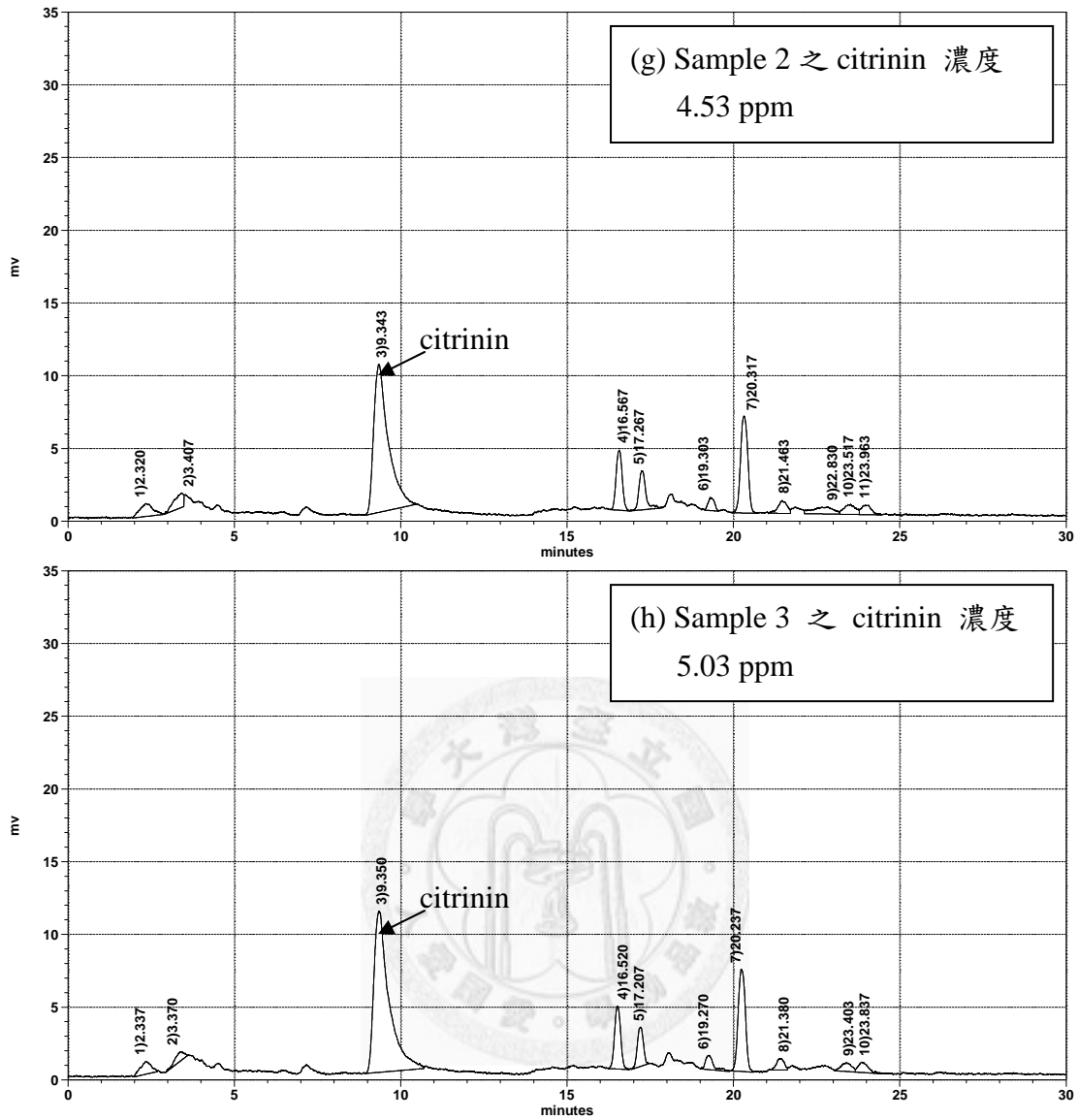


圖 4-2、(a)-(e) 為 citrinin 不同濃度標準品之 HPLC 圖譜。(f)-(h) 為紅麴山藥樣品之 HPLC 圖譜

Fig. 4-2. The HPLC chromatogram of citrinin standard at different concentrations (a)-(e). The HPLC chromatogram of red mold dioscorea samples (f)-(h).

(二) Monacolin K、monascin 及 ankaflavinc 之分析

圖 4-3 為 monacolin K、monascin 及 ankaflavinc 標準品與紅麴山藥樣品之 HPLC 分析結果，再根據 monacolin K、monascin 及 ankaflavinc 之檢量曲線 (圖 4-4、圖 4-5、圖 4-6)，利用內插法求出紅麴山藥樣品中 monacolin K、monascin 及 ankaflavinc 的濃度，結果分別為 104.8 ppm、369 ppm、602.8 ppm。



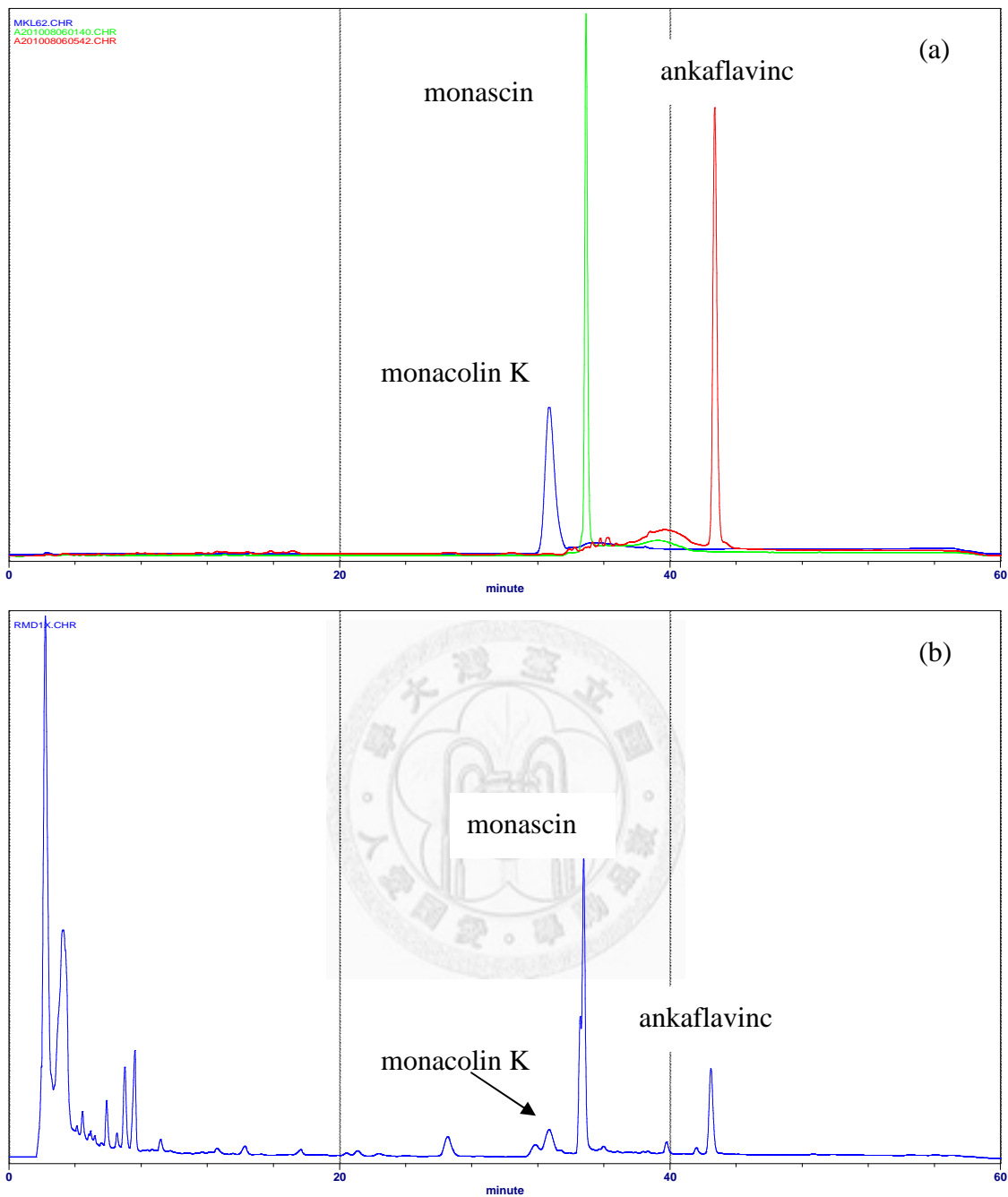


圖 4-3、(a) 圖為 monacolin K、monascin 及 ankaflavinc 標準品之 HPLC 圖譜。
 (b) 圖為紅麴山藥樣品之 HPLC 圖譜

Fig. 4-3. The HPLC chromatogram of monacolin K, monascin, and ankaflavinc standards (a). The HPLC chromatogram of the red mold dioscorea sample (b).

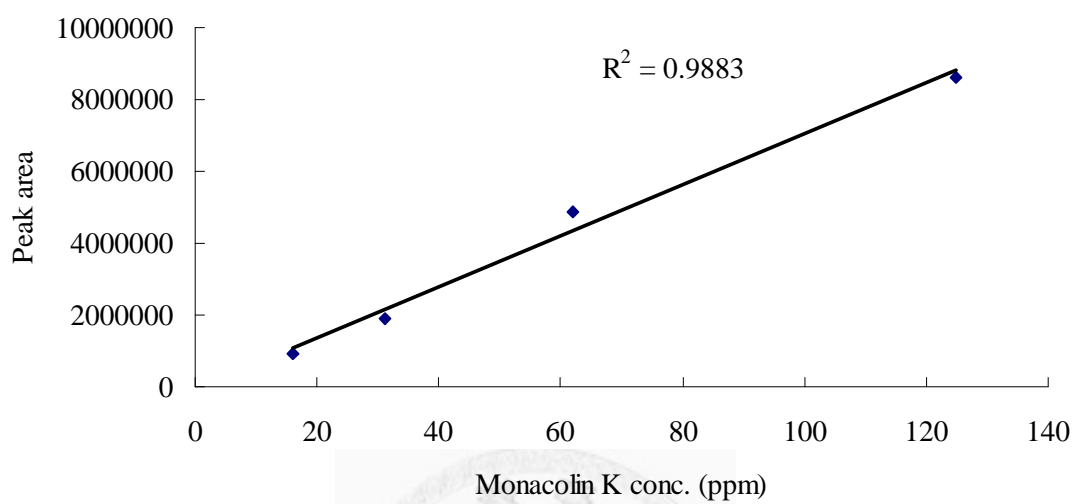


圖 4-4、Monacolin K 之 檢量曲線

Fig. 4-4. Standard curve of monacolin K with HPLC

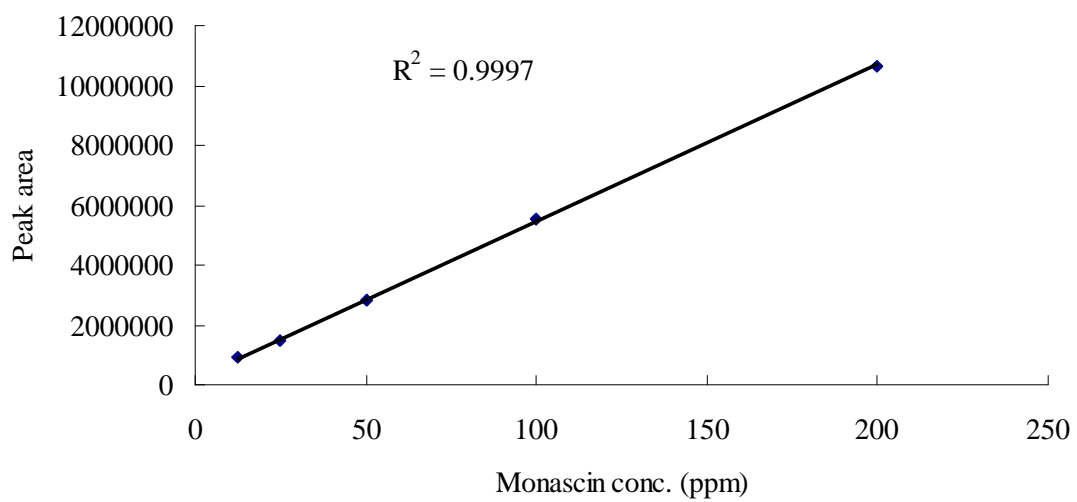


圖 4-5、Monascin 之 檢量曲線

Fig. 4-5. Standard curve of monascin with HPLC

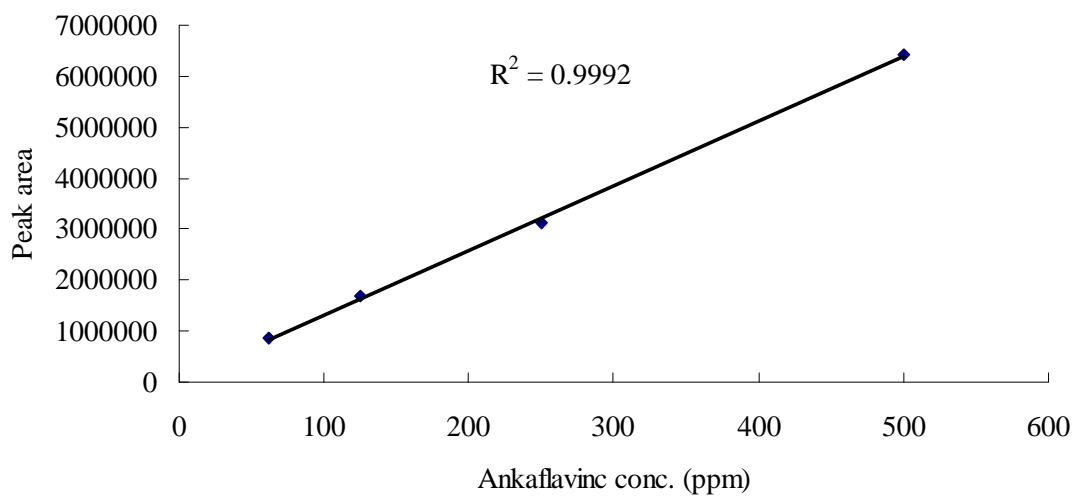


圖 4-6、Ankaflavinc 之 檢量曲線

Fig. 4-6. Standard curve of ankaflavinc with HPLC

(三) 山藥與紅麴山藥之植物雌激素分析

1. 異黃酮類 (isoflavone) 之分析結果

首先利用此三種植物雌激素之標準品，取低濃度做定性分析 (表 4-3)。圖 4-7 為標準品與山藥及紅麴山藥樣品之 HPLC 圖譜。

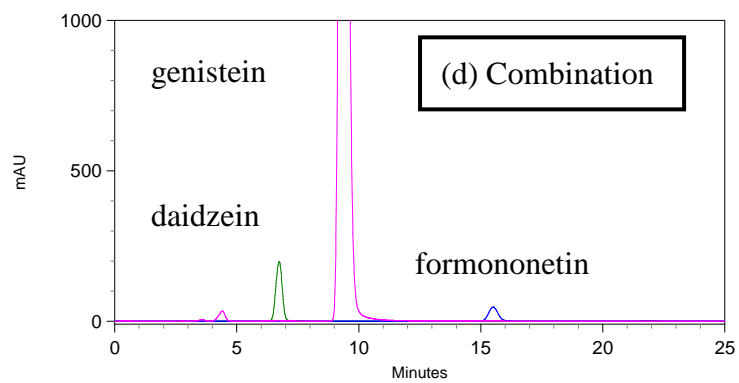
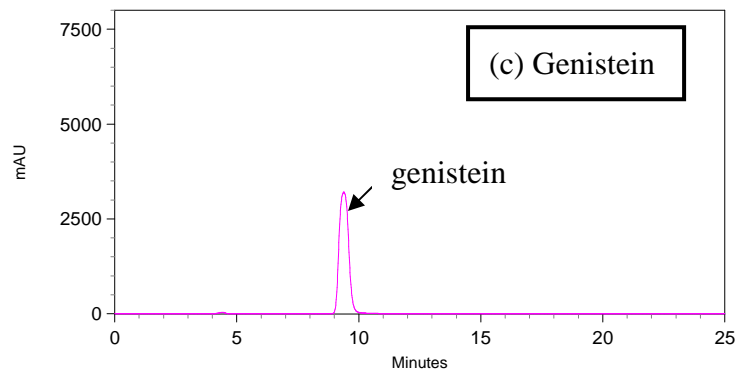
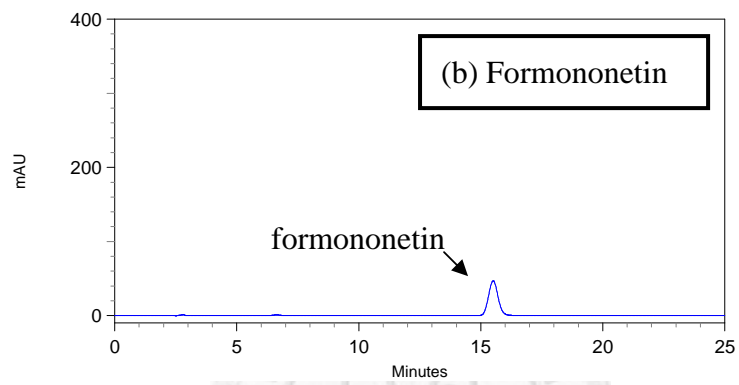
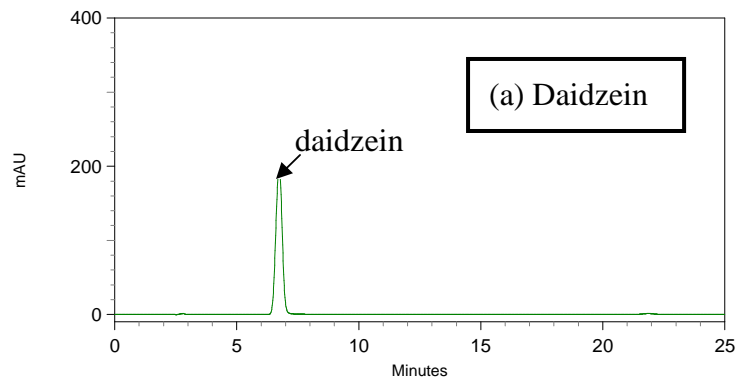
根據 HPLC 之分析結果，山藥與紅麴山藥皆無偵測到異黃酮類雌激素，但觀察山藥與紅麴山藥之 HPLC 圖譜，發現八至九分鐘之間皆有一吸收峰，因接近於 daidzein 與 genistein 標準品之吸收峰位置，故進一步做出該吸收波峰的全波段光譜，並跟 daidzein 與 genistein 標準品全波段光譜 (圖 4-8) 做比對，比對結果顯示樣品不含 daidzein 或 genistein，因此推論山藥與紅麴山藥中無異黃酮類植物雌激素。



表 4-3、Daidzein, genistein 及 formononetin 標準品之 HPLC 分析結果

Table 4-3. The HPLC analyzing results of daidzein, genistein and formononetin standards

	Concentration (mM)	Retention time (min)	Area
daidzein	0.077	6.055	3648447
formononetin	0.026	15.509	1275422
genistein	0.011	9.387	87146244



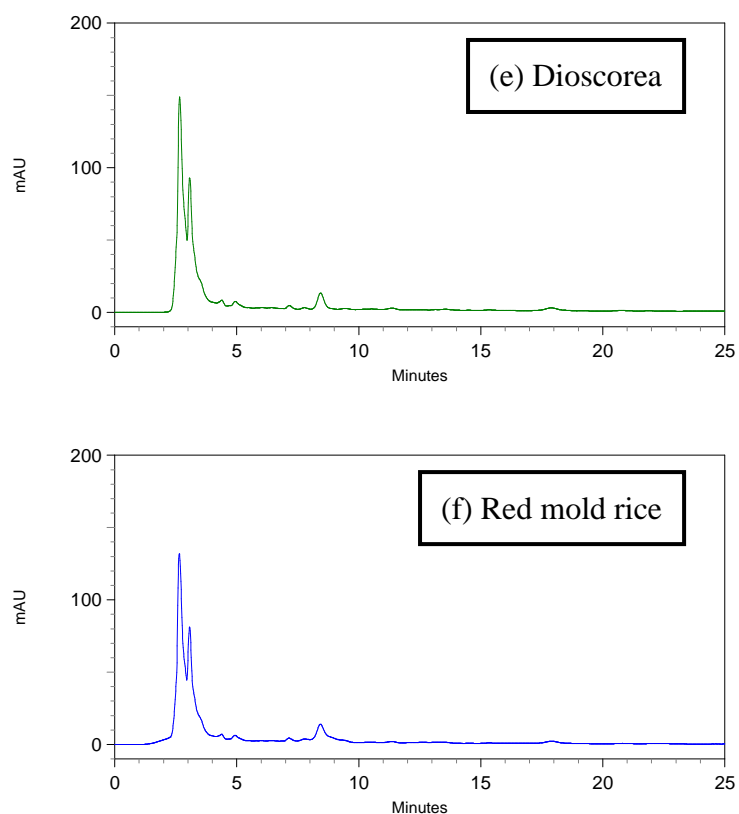


圖 4-7、(a)-(c) 分別為 daidzein, genistein 及 formononetin 標準品之 HPLC 圖譜，(d) 為將三種物質之圖譜合而為一，(e) 為山藥樣品圖譜，(f) 為紅麴山藥樣品圖譜

Fig. 4-7. The HPLC graph of daidzein, genistein and formononetin standards (a)-(c), respectively. Combination of the three chromatogram (d). The HPLC chromatogram of dioscorea sample (e). The HPLC graph of red mold dioscorea sample (f).

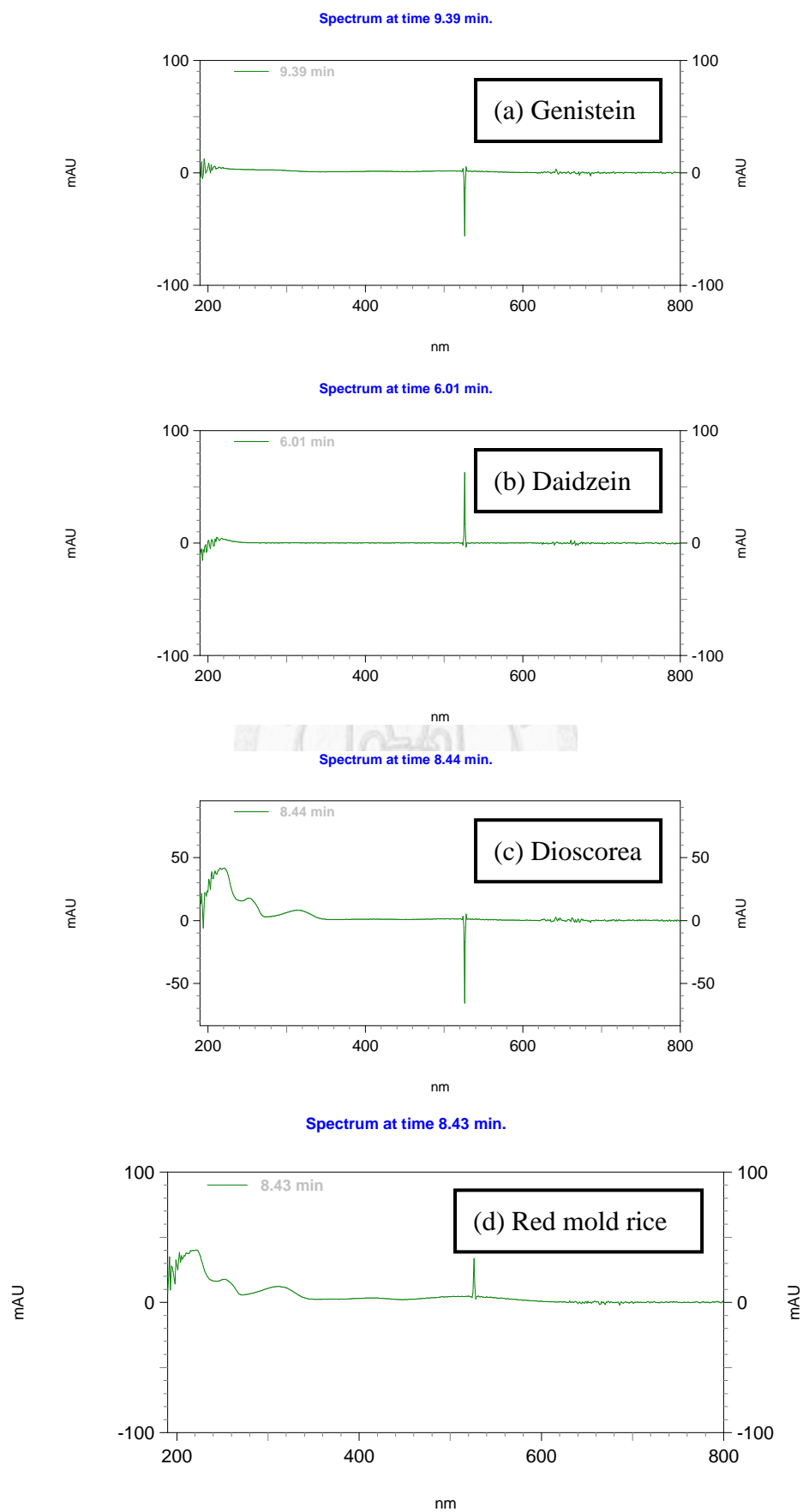


圖 4-8、(a)-(d) 分別為 genistein、daidzein、山藥樣品、紅麴山藥樣品全波段光譜

Fig. 4-8. The HPLC spectrum of genistein, daidzein, dioscorea sample and red mold dioscorea sample (a)-(d), respectively.



2. 木質酚類 (lignin) 之分析結果

首先利用 secoisolariciresinol 不同濃度的標準品做 HPLC 分析 (表 4-4)，再與山藥及紅麴山藥的樣品之 HPLC 分析結果做比對，根據 HPLC 的圖譜 (圖 4-9)，發現山藥及紅麴山藥中不含 secoisolariciresinol 類植物雌激素。



表 4-4、Secoisolariciresinol 不同濃度標準品之 HPLC 分析結果

Table 4-4. The HPLC analyzing results of secoisolariciresinol standard at different concentrations.

	Concentration (mM)	Retention time (min)	Area
Sec 1	0.085	3.819	1869852
Sec 2	0.17	3.819	3311198
Sec 3	0.34	3.819	5916348
Sec 4	0.68	3.819	11788431
Sec 5	1.36	3.808	19522931

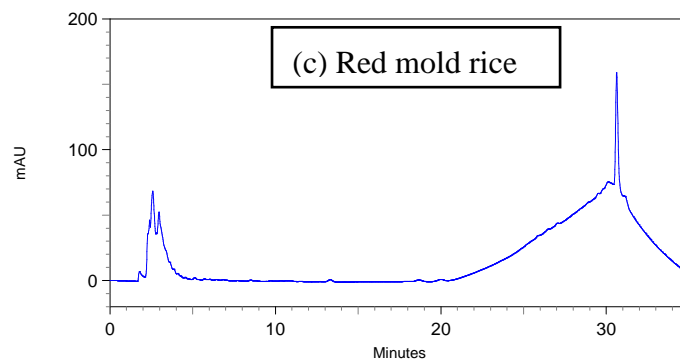
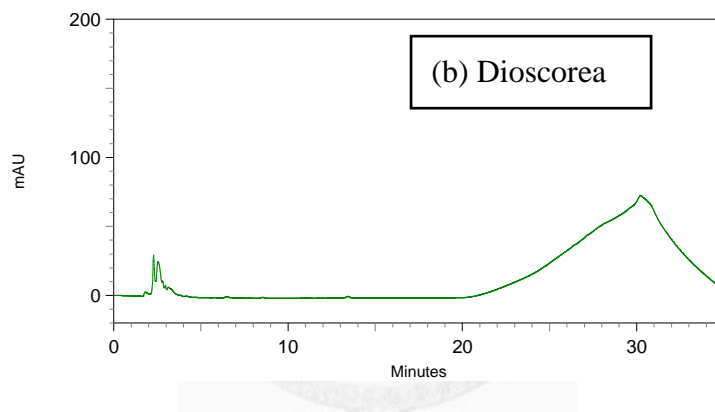
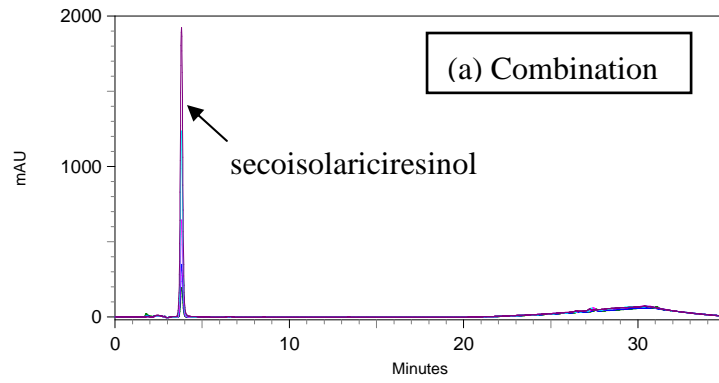


圖 4-9、(a) 為 secoisolariciresinol 五種不同濃度標準品圖譜合而為一，(b)、(c) 分別為山藥及紅麴山藥樣品之 HPLC 圖譜

Fig. 4-9. (a) Combination of the five standards' chromatograms at different concentrations (a). The HPLC chromatograms of dioscorea sample and red mold dioscorea sample (b) 、(c), respectively



3. 薯蕷皂配基 (diosgenin) 之分析結果

表 4-5 與 表 4-6 分別為 diosgenin 標準品與紅麴山藥、山藥樣品 HPLC 之分析結果，再根據 diosgenin 之檢量曲線 (圖 4-10)，利用內插法求出紅麴山藥樣品及山藥中 diosgenin 的濃度。其中紅麴山藥樣品原始濃度超出檢量曲線之線性範圍，故稀釋五倍處理後再進行測定。做出標準品與紅麴山藥、山藥樣品之 HPLC 圖譜 (圖 4-11) 後，發現紅麴山藥、山藥樣品中 diosgenin 之滯留時間與標準品比較起來似乎有延遲的現象，故再進一步做出標準品與紅麴山藥、山藥樣品該吸收波峰之全波段光譜 (圖 4-12)，經過比對之後，紅麴山藥與山藥樣品皆與標準品的圖譜吻合，故推論紅麴山藥與山藥樣品確實含有 diosgenin。

紅麴山藥進行三重複試驗得到的結果分別為 1.06 mM、1.30 mM、1.57 mM，平均濃度為 1.31 mM，換算成原始濃度 6.55 mM。山藥樣品進行二重複的結果分別為 3.67 mM、2.89 mM，平均濃度為 3.25 mM。根據此結果可進一步推算出每克紅麴山藥含有 1.36 毫克的 diosgenin;每克山藥含有 0.68 毫克的 diosgenin，故紅麴山藥中 diosgenin 的含量為山藥的二倍。

因山藥塊莖含有豐富含糖基 (glycoside) 之薯蕷皂苷素，須經水解去掉糖基的配醣體 (aglycone) 才是 diosgenin，可能山藥經紅麴發酵過程中，加強去掉糖基 (deglycosylation) 之作用，使得最終 diosgenin 量提高。

表 4-5、Diosgenin 不同濃度標準品之 HPLC 分析結果

Table 4-5. The HPLC analyzing results of diosgenin standard at different concentrations

	Concentration (mM)	Retention time (min)	Area
Dio 1	0.375	18.411	1856767
Dio 2	0.75	18.347	3407372
Dio 3	1.5	18.293	6390034
Dio 4	3	18.336	11614034
Dio 5	6	18.379	20955759

表 4-6、紅麴山藥、山藥樣品中 diosgenin 之 HPLC 分析結果

Table 4-6. The HPLC analyzing results of diosgenin in red mold dioscorea and dioscorea samples

	Retention time (min)	Area	Concentration (mM)
RMD1	19.200	4671374	1.06
RMD2	19.392	5578418	1.30
RMD3	19.317	6634825	1.57
Dioscorea 1	19.040	13704983	3.67
Dioscorea 2	19.200	11241099	2.89

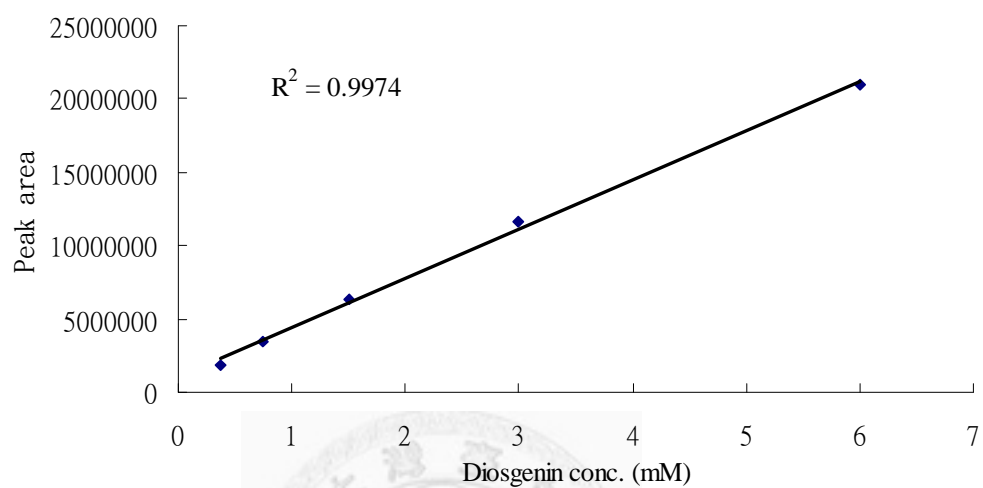
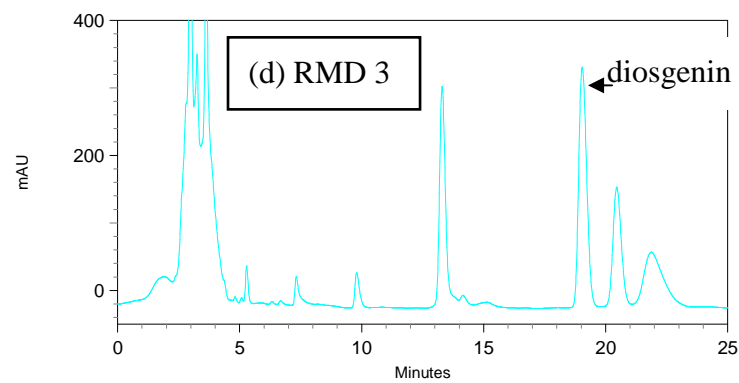
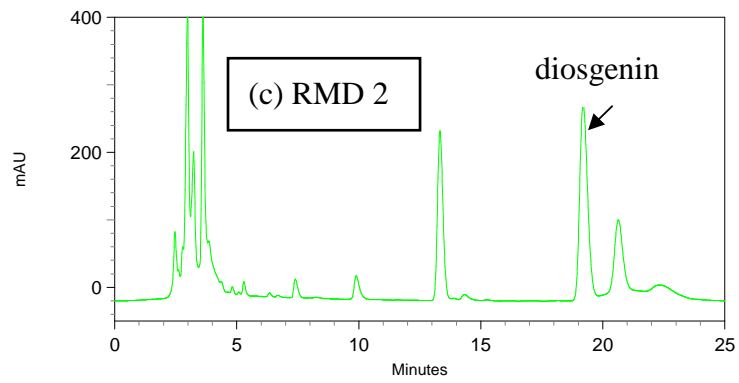
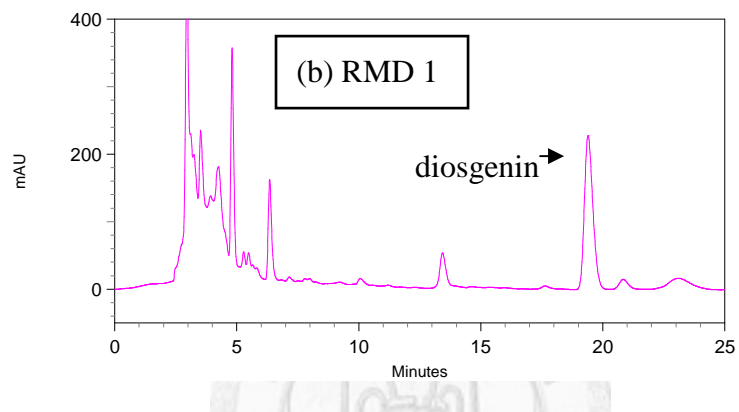
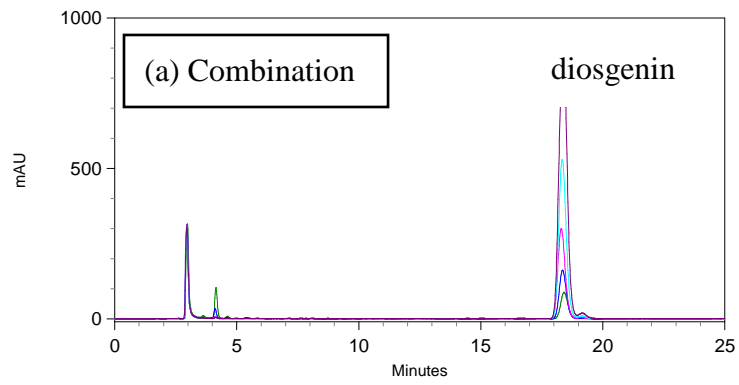


圖 4-10、Diosgenin 之檢量曲線

Fig. 4-10. Standard curve of diosgenin with HPLC.



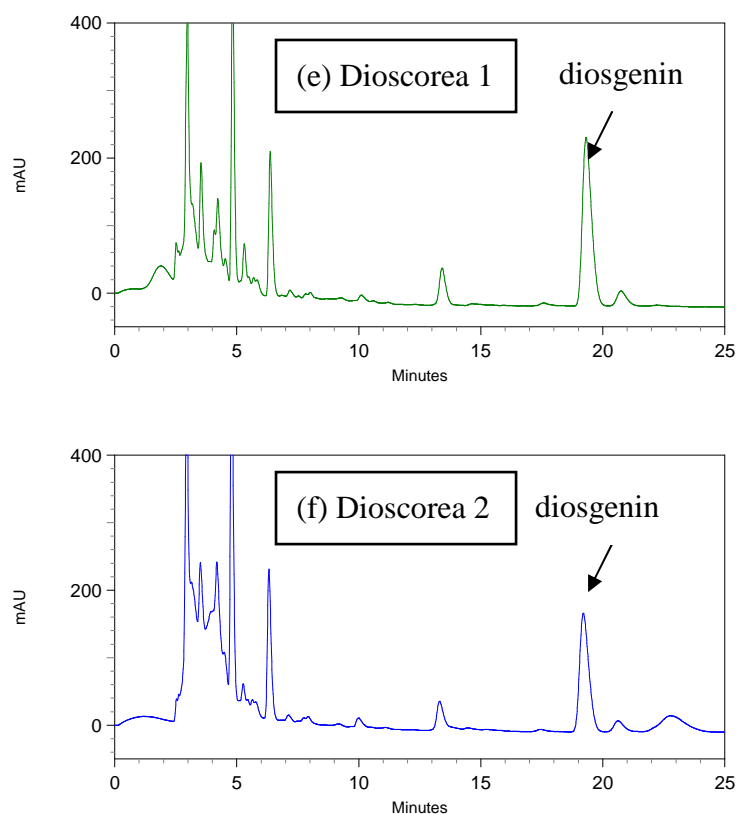


圖 4-11、(a) 為 diosgenin 五種不同濃度的標準品之圖譜合而為一，(b)-(d) 為紅麴山藥樣品之圖譜，(e)、(f) 為山藥樣品之圖譜

Fig. 4-11. Five HPLC chromatograms of diosgenin standard at different concentrations are combined (a). The HPLC chromatogram of red mold dioscorea samples (b)-(d). The HPLC chromatogram of dioscorea samples (e)、(f)

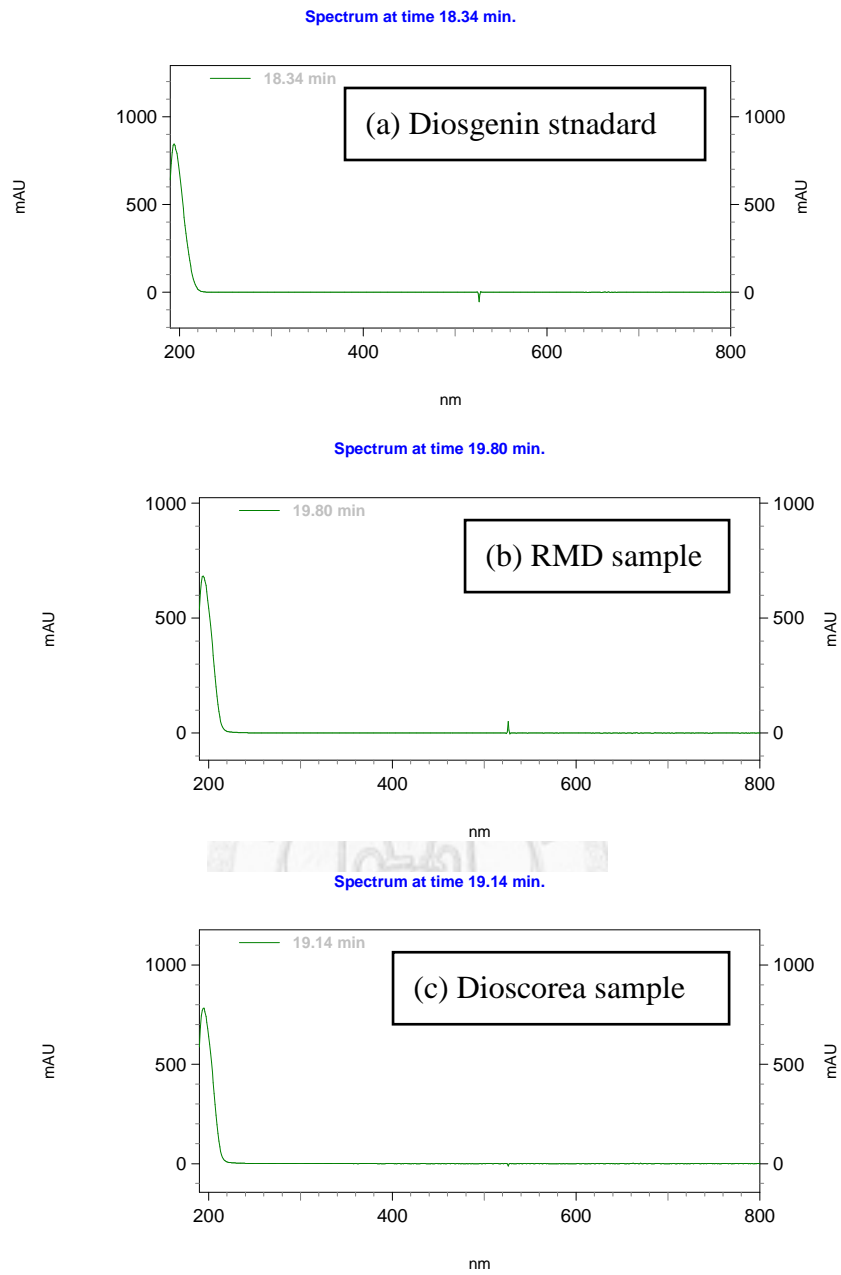


圖 4-12、(a)、(b)、(c) 分別為 diosgenin 標準品，紅麴山藥樣品及山藥樣品之全波段圖譜

Fig. 4-12. The HPLC spectrum of diosgenin standard, red mold dioscorea sample, and dioscorea sample (a)、(b)、(c), respectively

二、動物攝食量以及體重紀錄

圖 4-13、圖 4-14 分別為飼養期間大鼠之平均體重與攝食量的變化紀錄。由結果得知試驗組 (I. dioscorea 1X、I. RMD 1X、I. RMD 2X、II. dioscorea 1X、II. RMD 1X、II. RMD 2X)、切除卵巢組 (OVX)、正控制組 (ISO) 的平均體重相對於偽手術 (sham) 組皆有顯著性差異 ($p < 0.05$)，此與先前模擬停經婦女之動物模式相關研究結果一致 (Scott *et al.*, 2000; Cason *et al.*, 2000; Yin *et al.*, 2004)，且餵食山藥、紅麴山藥或大豆異黃酮皆不影響此體重變化的趨勢。在平均攝食量的變化紀錄中，發現攝食量與體重增加量有依存關係。



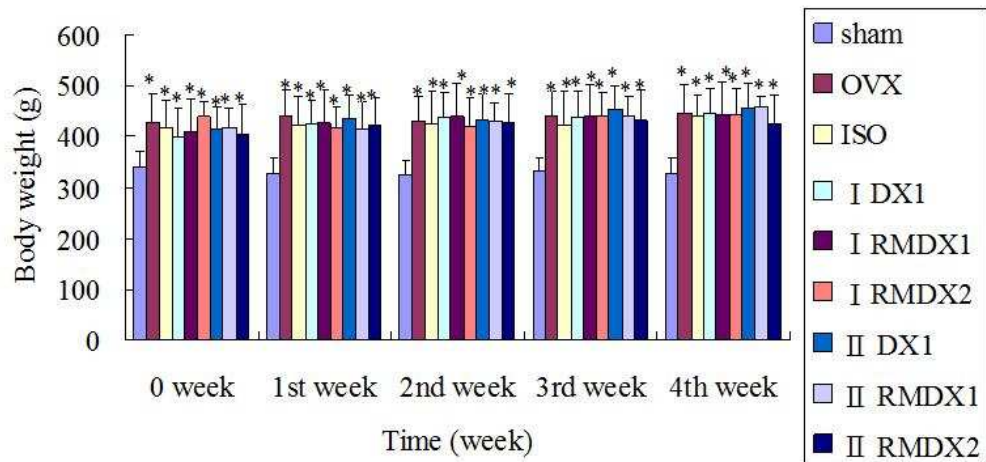


圖 4-13、大鼠之平均體重 (* $p < 0.05$ 代表與 sham 組比較具顯著差異)

Fig. 4-13. The average body weight of rats. (* $p < 0.05$ is significantly different in comparison with sham)

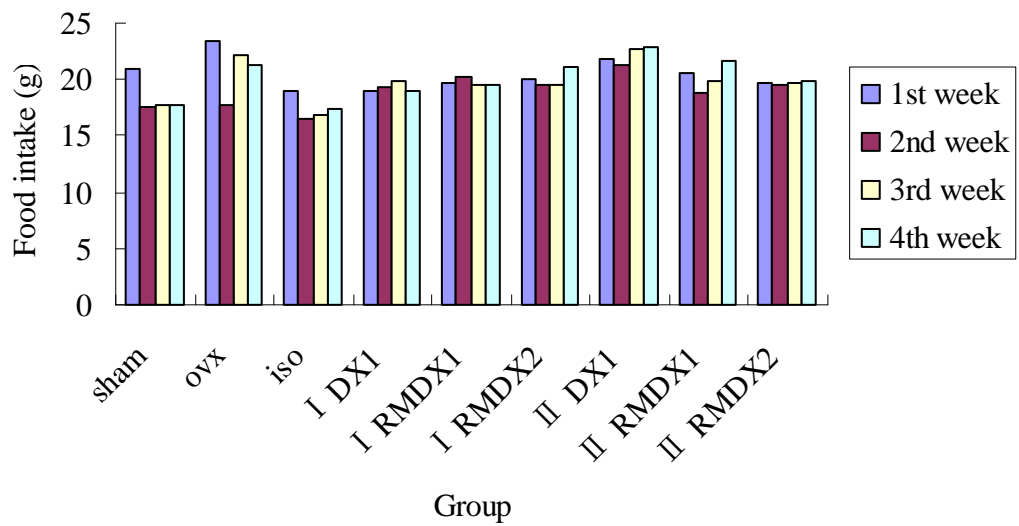
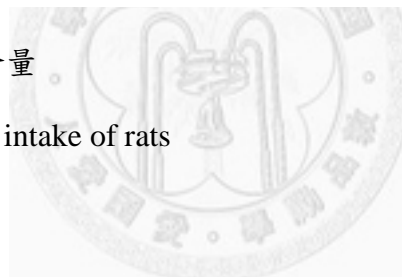


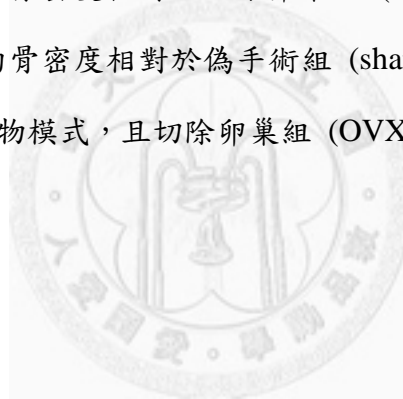
圖 4-14、大鼠之平均攝食量

Fig. 4-14. The average feed intake of rats



三、雙能量 X 射線吸收儀 (dual energy x-ray absorptiometry, DEXA)

圖 4-15、圖 4-16 及圖 4-17 分別為餵食第 0 週時，大鼠右腿之髖關節、脛骨近端及股骨遠端之骨密度測量結果。在髖關節 (hip joint) 骨密度的測量結果中，發現除了正控制組 (ISO) 與 I. RMD 2X 兩組外，其餘試驗組皆與切除卵巢組 (OVX) 無顯著差異，但正控制組 (ISO) 與各試驗組的骨密度相對於偽手術組 (sham) 皆顯著較低 ($p < 0.05$)。從股骨遠端 (distal femur) 的骨密度測量結果中發現，正控制組 (ISO) 與各試驗組的骨密度相對於切除卵巢組 (OVX) 無顯著差異，但相對於偽手術組 (sham) 皆顯著較低 ($p < 0.05$)。脛骨近端 (proximal tibia) 的骨密度測量結果顯示，除了 I. RMD 1X、II. D 1X、II. RMD 2X 三組之外，其餘正控制組 (ISO) 與試驗組的骨密度相對於切除卵巢組 (OVX) 無顯著差異，但正控制組 (ISO) 與各試驗組的骨密度相對於偽手術組 (sham) 皆顯著較低 ($p < 0.05$)。顯示已誘導出骨質疏鬆動物模式，且切除卵巢組 (OVX)、正控制組 (ISO) 與各試驗組的骨密度大約一致。



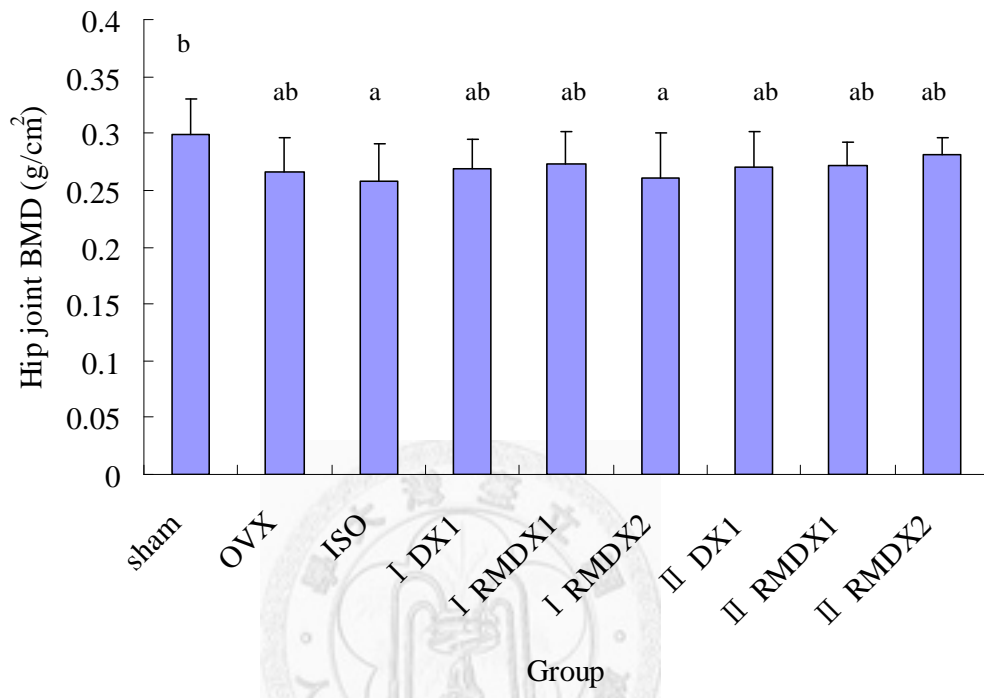


圖 4-15、大鼠餵食前之髖關節骨密度

Fig. 4-15. The hip joint BMD of rats before feeding.

Columns with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

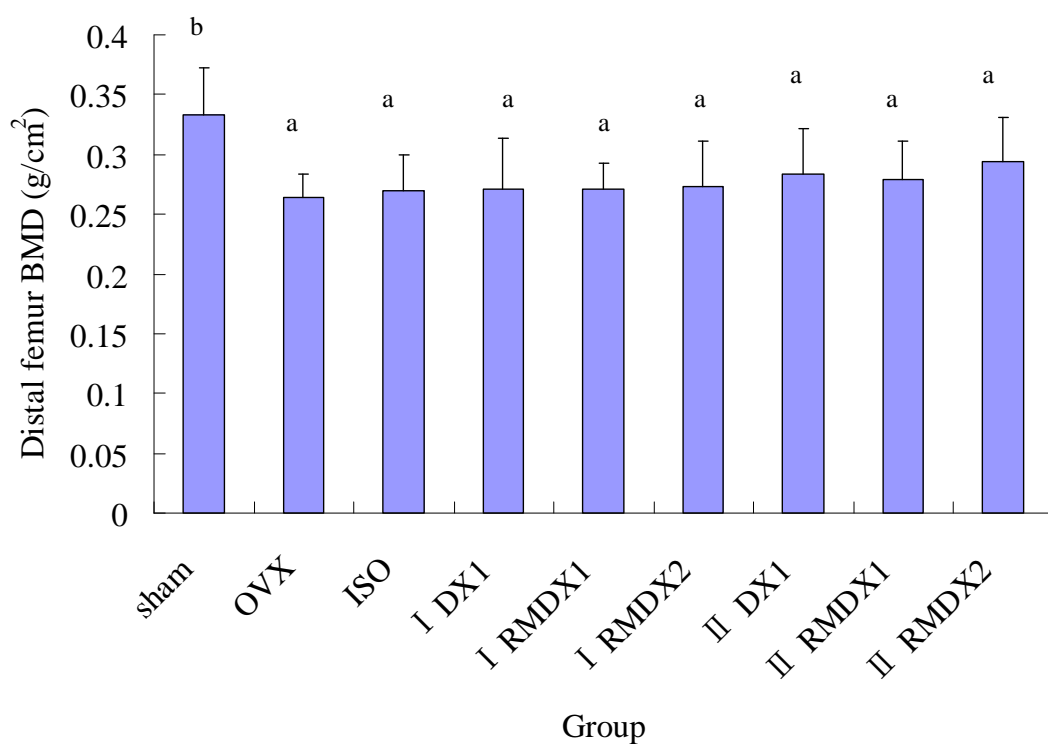


圖 4-16、大鼠餵食前股骨遠端骨密度

Fig. 4-16. The distal femur BMD of rats before feeding

Columns with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

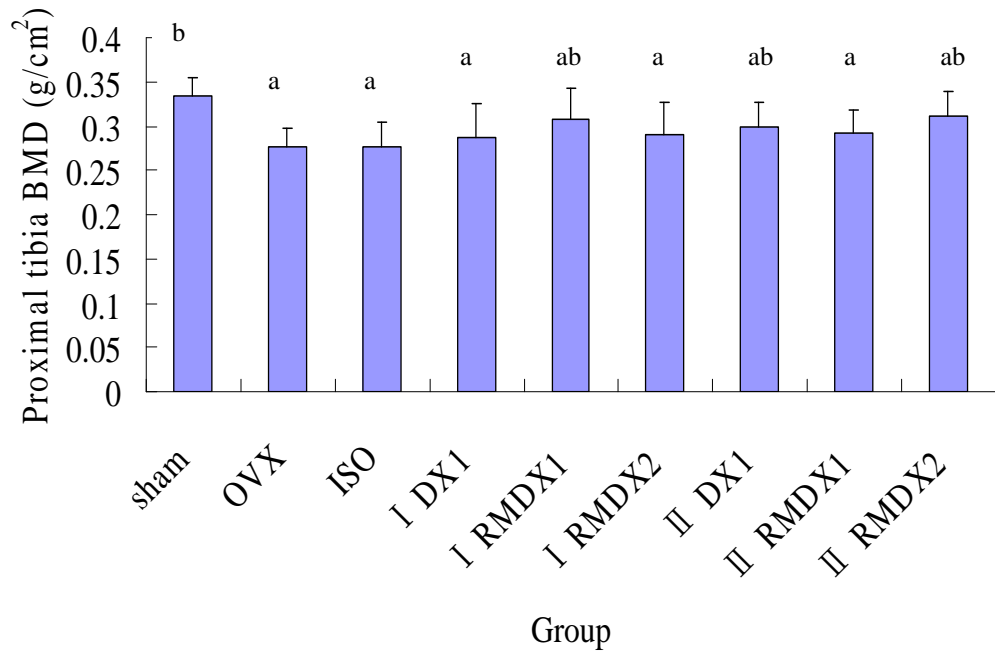


圖 4-17、大鼠餵食前之脛骨近端骨密度

Fig. 4-17. The proximal tibia BMD of rats before feeding

Columns with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

四、微型電腦斷層儀之骨質分析

(一) 餵食前骨質疏鬆動物模式之誘導

圖 4-18 與 圖 4-19 為大鼠進行卵巢切除前 μ CT 骨質分析結果，其中圖 4-18 為大鼠右膝關節橫截面骨質狀況，圖 4-19 為右股骨遠端與右脛骨近端縱切面骨質狀況，表 4-7 為圖 4-18 及圖 4-19 之影像定量結果。由 μ CT 之影像定量結果得知，右膝關節橫截面之白色區域面積約佔 23%-29%，右股骨遠端之白色區域面積約佔 60%-68%，顯示切除卵巢前各組的骨質狀況大約一致。

圖 4-20 與 圖 4-21 為大鼠進行卵巢切除三個月後 μ CT 骨質分析結果，其中圖 4-20 為大鼠右膝關節橫截面骨質狀況，圖 4-21 為右股骨遠端與右脛骨近端縱切面骨質狀況，表 4-8 為圖 4-18 及圖 4-19 之影像定量結果。根據右膝關節及右股骨遠端影像定量結果顯示，切除卵巢組 (OVX) 之白色區域面積與偽手術組 (sham) 約有 20% 的差距，而切除卵巢組 (OVX)、正控制組 (ISO)、試驗組 (I. dioscorea 1X、I. RMD 1X、I. RMD 2X、II. dioscorea 1X、II. RMD 1X、II. RMD 2X) 之白色區域面積約介於 47%-50%，顯示骨質狀況大約一致，且已誘導出骨質疏鬆的動物模式。

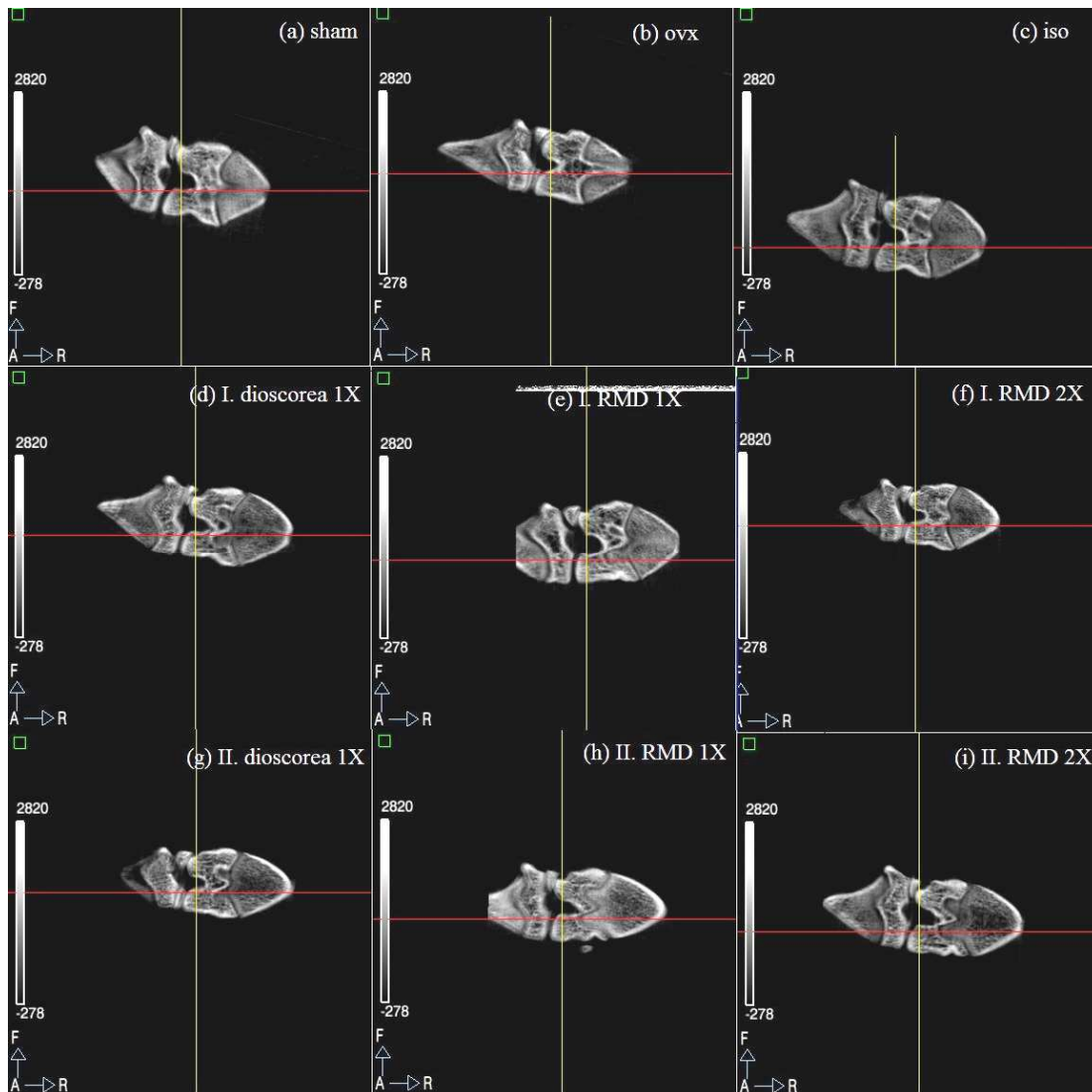


圖 4-18、切除卵巢前大鼠之膝關節橫截面骨質狀況。(a)-(i) 分別為 sham、OVX、ISO、I. dioscorea 1X、I. RMD 1X、I. RMD 2X、II. dioscorea 1X、II. RMD 1X、II. RMD 2X 之膝關節橫截面骨質狀況

Fig. 4-18. The cross-section view of the rats' knee before ovariectomized. The cross-section view of the rats' knee of sham、OVX、ISO、I. dioscorea 1X、I. RMD 1X、I. RMD 2X、II. dioscorea 1X、II. RMD 1X、II. RMD 2X (a)-(i), respectively.

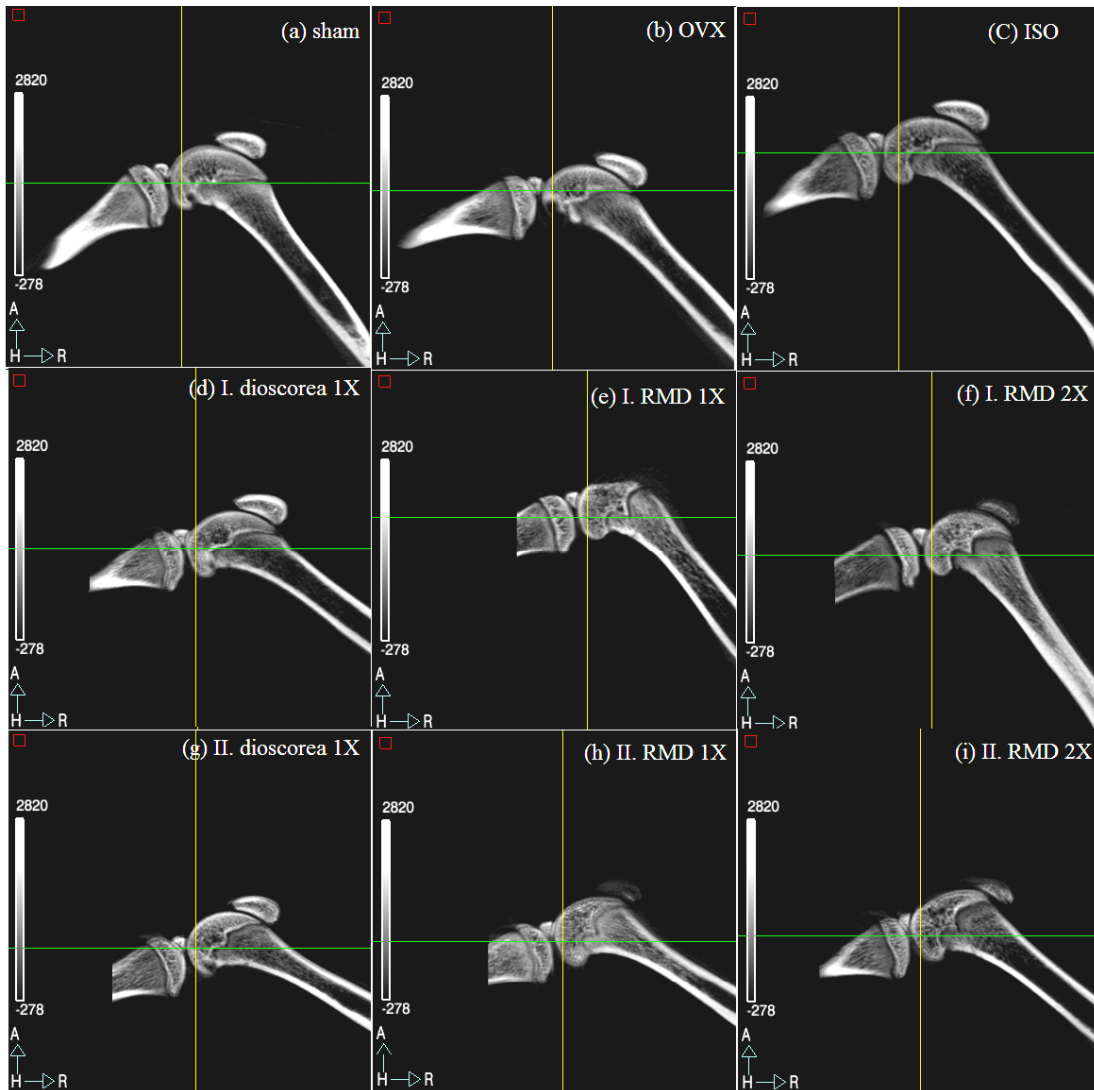


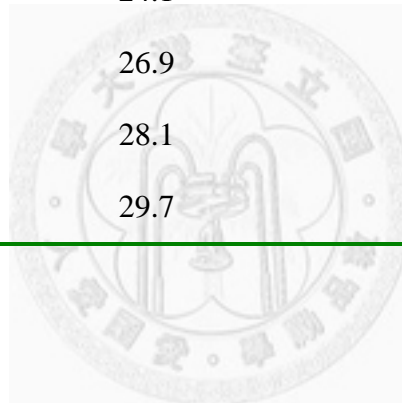
圖 4-19、切除卵巢前大鼠之股骨遠端與脛骨近端縱切面骨質狀況。(a)-(i) 分別為 sham、OVX、ISO、I. dioscorea 1X、I. RMD 1X、I. RMD 2X、II. dioscorea 1X、II. RMD 1X、II. RMD 2X 之股骨遠端與脛骨近端縱切面骨質狀況

Fig. 4-19. The longitudinal section view of the rats' distal femur and proximal tibia before ovariectomized. The longitudinal section view of the rats' distal femur and proximal tibia of sham、OVX、ISO、I. dioscorea 1X、I. RMD 1X、I. RMD 2X、II. dioscorea 1X、II. RMD 1X、II. RMD 2X (a)-(i), respectively

表 4-7、切除卵巢前之 micro-CT 影像定量

Table 4-7. Quantification of micro-CT images before ovariectomized

	White color fraction of knee (%)	White color fraction of distal femur (%)
sham	29.6	65.8
OVX	26.3	61.7
ISO	29.1	60.3
I. dioscorea 1X	29.7	60.7
I. RMD 1X	29.6	67.2
I. RMD 2X	24.1	62.5
II. dioscorea 1X	26.9	60.5
II. RMD 1X	28.1	68.3
II. RMD 2X	29.7	60.6



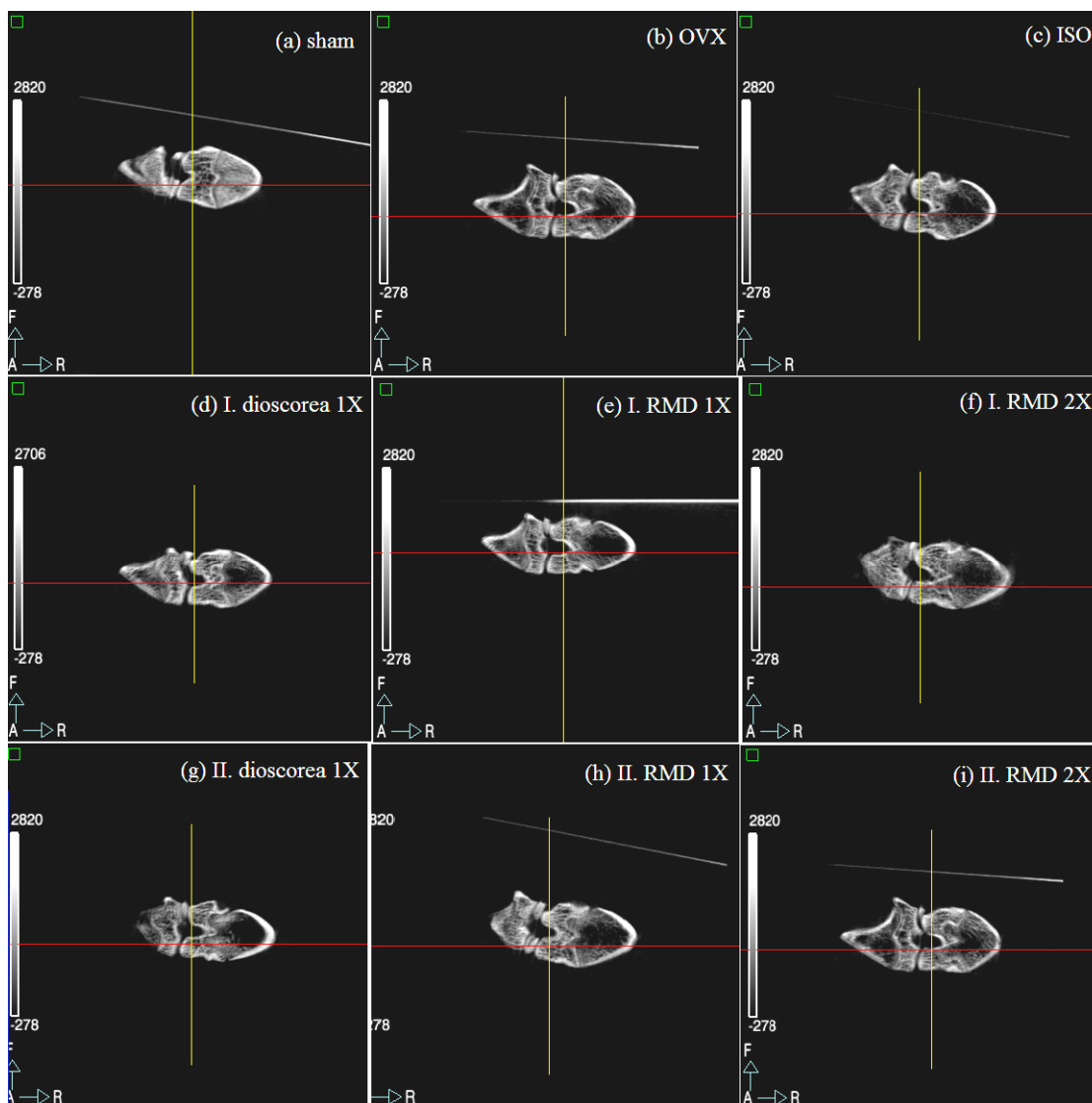


圖 4-20、切除卵巢三個月後大鼠之膝關節橫截面骨質狀況。(a)-(i) 分別為 sham、OVX、ISO、I. dioscorea 1X、I. RMD 1X、I. RMD 2X、II. dioscorea 1X、II. RMD 1X、II. RMD 2X 之膝關節橫截面骨質狀況

Fig. 4-20. The cross-section view of the rats' knee after ovariectomized for three months. The cross-section view of the rats' knee of sham、OVX、ISO、I. dioscorea 1X、I. RMD 1X、I. RMD 2X、II. dioscorea 1X、II. RMD 1X、II. RMD 2X (a)-(i), respectively

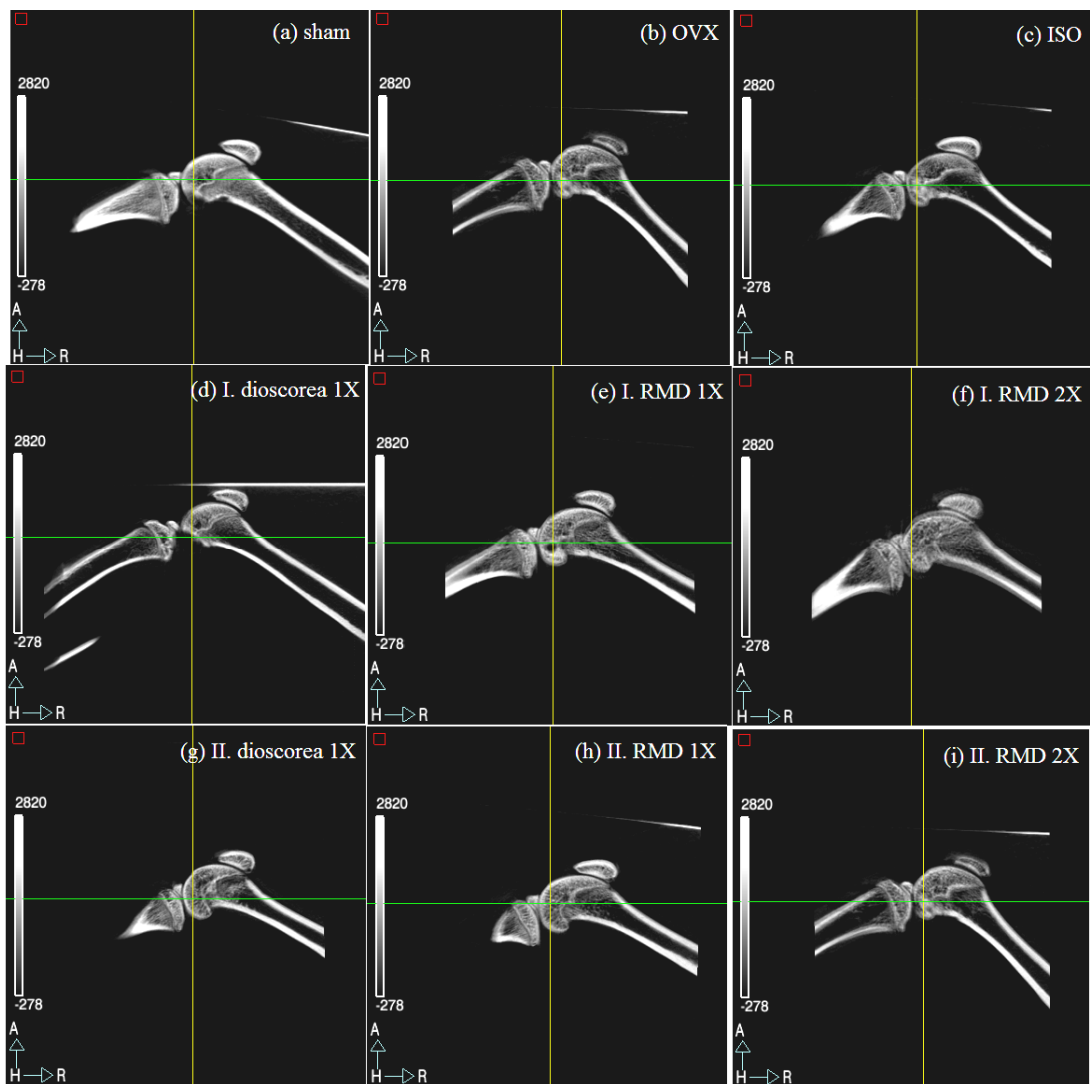


圖 4-21、切除卵巢三個月後大鼠之股骨遠端與脛骨近端縱切面骨質狀況。(a)-(i) 分別為 sham、OVX、ISO、I. dioscorea 1X、I. RMD 1X、I. RMD 2X、II. dioscorea 1X、II. RMD 1X、II. RMD 2X 之股骨遠端與脛骨近端縱切面骨質狀況

Fig. 4-21. The longitudinal section view of the rats' distal femur and proximal tibia after ovariectomized for three months. The longitudinal section view of the rats' distal femur and proximal tibia of sham、OVX、ISO、I. dioscorea 1X、I. RMD 1X、I. RMD 2X、II. dioscorea 1X、II. RMD 1X、II. RMD 2X (a)-(i), respectively.

表 4-8、切除卵巢三個月後之 micro-CT 影像定量

Table 4-8. Quantification of micro-CT images after ovariectomized for three months

	White color fraction of knee (%)	White color fraction of distal femur (%)
sham	70.9	65.6
OVX	53.3	48.6
ISO	48.6	46.6
I. dioscorea 1X	54.5	47
I. RMD 1X	50.4	48.9
I. RMD 2X	52.4	50.3
II. dioscorea 1X	49	49.7
II. RMD 1X	50.6	47.3
II. RMD 2X	56	47.4

(二) 餵食樣品四週後骨質變化情況

餵食樣品四週後，進行 micro-CT 測定以監控骨質變化情況。圖 4-22 與圖 4-23 為大鼠進行餵食樣品四週後 μ CT 骨質分析結果，其中圖 4-22 為大鼠右膝關節橫截面骨質狀況，圖 4-23 為右股骨遠端與右脛骨近端縱切面骨質狀況。

表 4-9 為圖 4-22 及圖 4-23 之影像定量結果。由膝關節之 μ CT 影像定量結果得知，切除卵巢組 (OVX) 之白色區域面積與偽手術組 (sham) 約有 20% 的差距，I. RMD 2X、II. RMD 2X 相較於切除卵巢組 (OVX) 分別有 13% 及 14% 的提升，其餘各組相較於切除卵巢組 (OVX) 約有 5% 的提升。

在右股骨遠端的影像定量結果中，切除卵巢組 (OVX) 之白色區域面積與偽手術組 (sham) 約有 20% 的差距，II. RMD 1X、II. RMD 2X 二組相較於切除卵巢組 (OVX) 約有 10% 的提升，其餘各組相較於切除卵巢組 (OVX) 約有 5% 的提升。

由右膝關節及右股骨遠端 micro-CT 影像定量結果可知，餵食樣品四週後各組的骨質狀況相對於 OVX 組皆有改善，尤以餵食紅麴山藥組 I. RMD 2X、II. RMD 2X、II. RMD 2X 最為顯著。本實驗在餵食劑量的訂定上以 diosgenin 的含量作為標準，在山藥與紅麴山藥固定 diosgenin 劑量的條件下，紅麴山藥對於骨質疏鬆的改善效果比山藥來得好，且在右膝關節影像定量結果中呈現劑量關係。

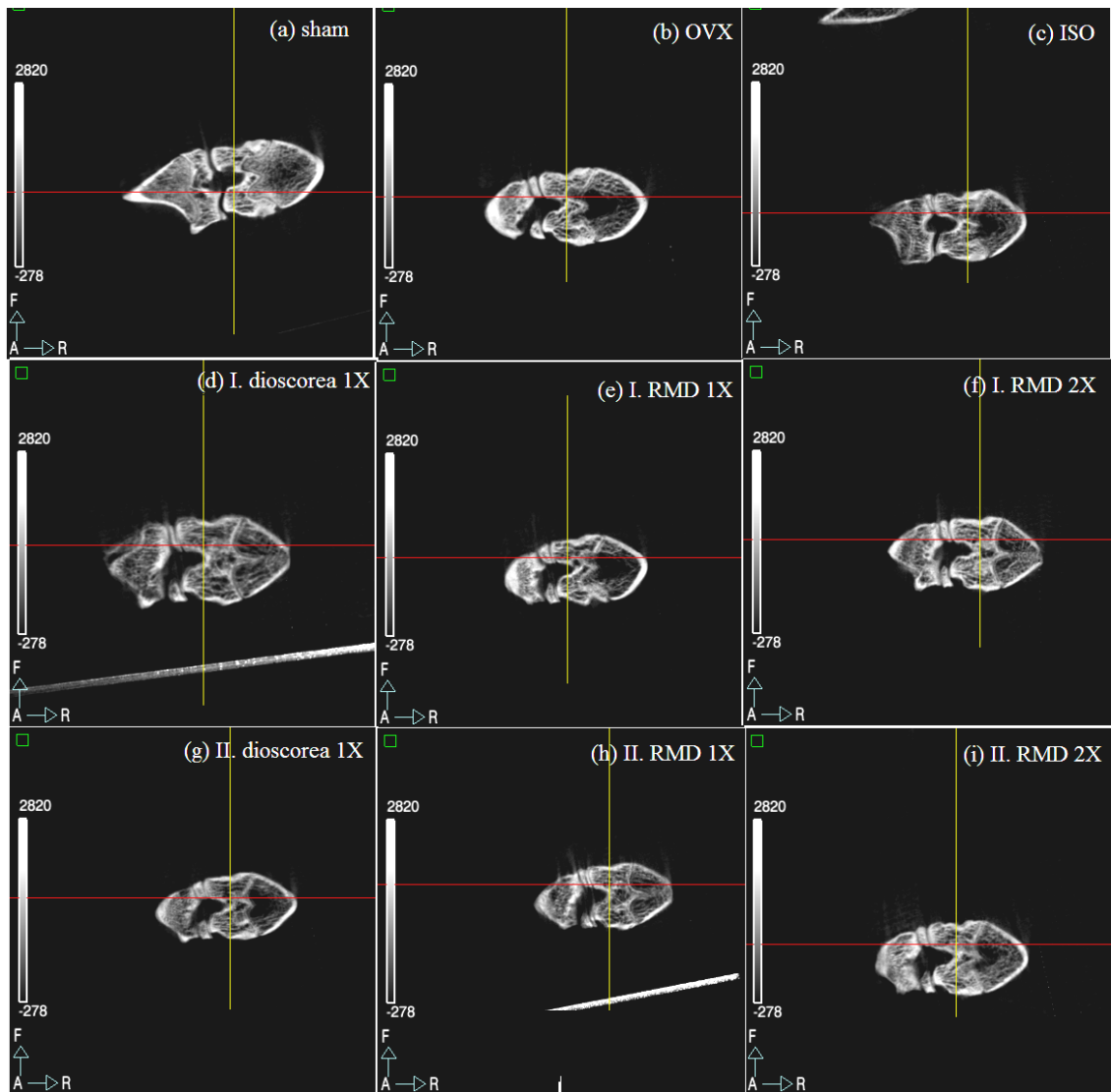


圖 4-22、餵食樣品四週後大鼠之膝關節橫截面骨質狀況。(a)-(i) 分別為 sham、OVX、ISO、I. dioscorea 1X、I. RMD 1X、I. RMD 2X、II. dioscorea 1X、II. RMD 1X、II. RMD 2X 之膝關節橫截面骨質狀況

Fig. 4-22. The cross-section view of the rats' knee after feeding samples for 4 weeks. The cross-section view of the rats' knee of sham、OVX、ISO、I. dioscorea 1X、I. RMD 1X、I. RMD 2X、II. dioscorea 1X、II. RMD 1X、II. RMD 2X (a)-(i), respectively

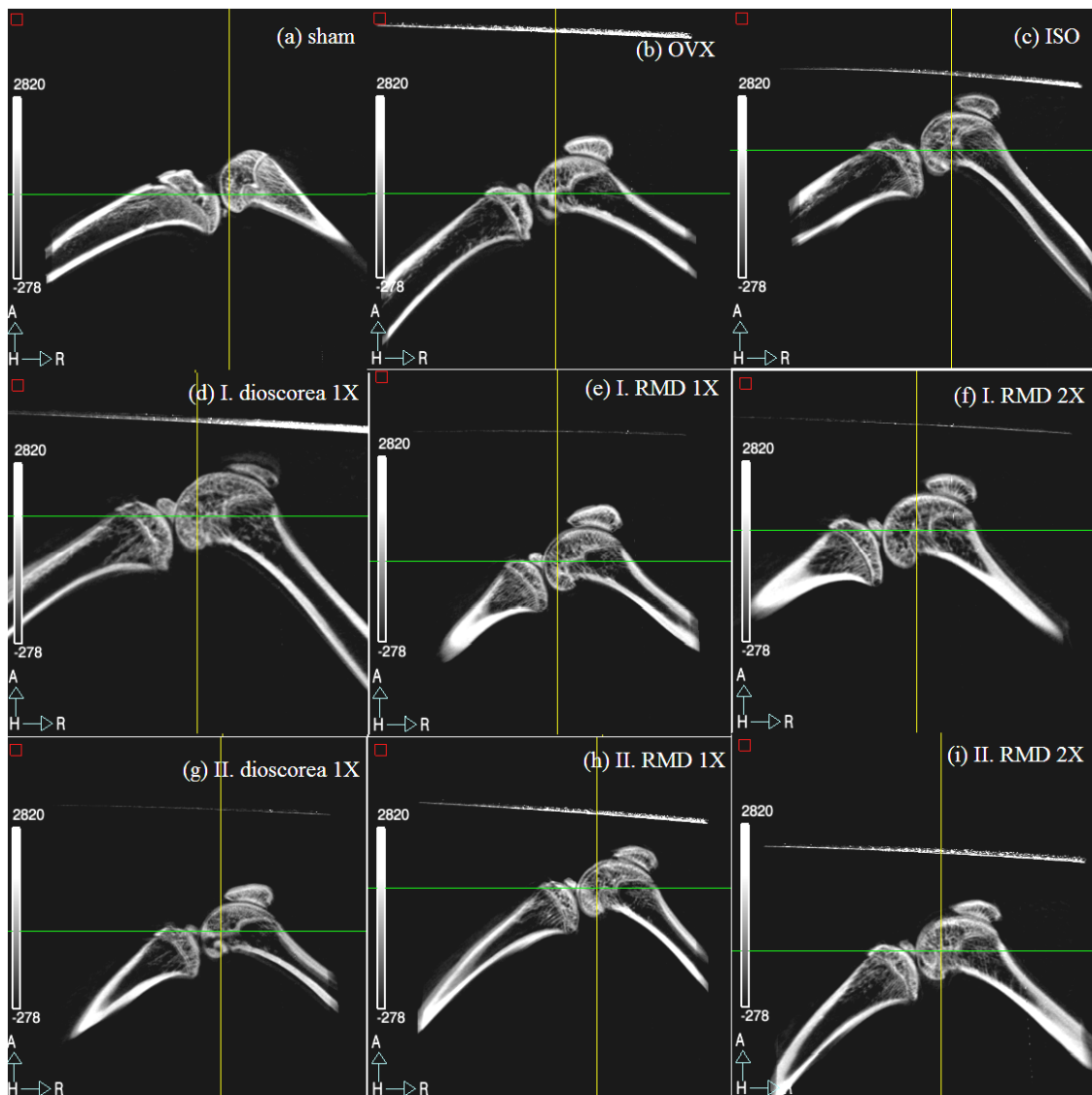


圖 4-23、餵食樣品四週後大鼠之股骨遠端與脛骨近端縱切面骨質狀況。(a)-(i) 分別為 sham、OVX、ISO、I. dioscorea 1X、I. RMD 1X、I. RMD 2X、II. dioscorea 1X、II. RMD 1X、II. RMD 2X 之股骨遠端與脛骨近端縱切面骨質狀況

Fig. 4-23. The longitudinal section view of the rats' distal femur and proximal tibia after feeding samples for 4 weeks. The longitudinal section view of the rats' distal femur and proximal tibia of sham、OVX、ISO、I. dioscorea 1X、I. RMD 1X、I. RMD 2X、II. dioscorea 1X、II. RMD 1X、II. RMD 2X (a)-(i), respectively

表 4-9、餵食四週後之 micro-CT 影像定量

Table 4-9. Quantification of micro-CT images after feeding for four weeks

	White color fraction of knee (%)	White color fraction of distal femur (%)
sham	66.2	67.4
OVX	48.3	47.5
ISO	54.1	52.8
I. dioscorea 1X	55.5	50.1
I. RMD 1X	55.7	51.2
I. RMD 2X	61.3	53.7
II. dioscorea 1X	51.2	50.1
II. RMD 1X	55.1	56.4
II. RMD 2X	62.3	55.5

五、血清骨質代謝指標分析

(一) 骨鹼性磷酸酶 (bone alkaline phosphatase, bone-ALP)

在骨質代謝的合成作用中，bone-ALP 經由磷酯酵素作用而釋出於血液循環中，所以 bone-ALP 可以作為骨質代謝中之生化指標，可反應出骨細胞的代謝狀態。圖 4-24 為偽手術組 (sham)、切除卵巢組 (OVX)、正控制組 (ISO) 及試驗組 (I. dioscorea 1X、I. RMD 1X、I. RMD 2X、II. dioscorea 1X、II. RMD 1X、II. RMD 2X) 之 bone-ALP 活性測定結果。

由結果得知切除卵巢組 (OVX) 之 bone-ALP 活性較偽手術組 (sham) 具有顯著性的提高 ($p < 0.05$)，試驗組中除了 I. RMD 1X 組 bone-ALP 活性與除卵巢組 (OVX) 無顯著差異外，其餘各組 bone-ALP 活性皆比 OVX 低，且除 II. RMD 2X 組外，組間並無顯著差異。但飼食大豆異黃酮之正控制組 (ISO) 與 OVX 相較有顯著較高的趨勢 ($p < 0.05$)，參照先前的研究，國內學者曾利用測定造骨細胞分化及成熟期所表現的鹼性磷酸鹽酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性之方法，發現 genistein、daidzein、biochanin A 三種異黃酮於 10^{-6} M 之藥物濃度下，均可促進造骨細胞之前趨細胞之增生並分化為成熟的造骨細胞，並促進成熟造骨細胞之骨生成作用 (吳克威，2004)。以大豆萃取物 (含 genistin, 1,462 mg/kg; genistein, 25.1 mg/kg; daidzin, 590 mg/kg; and daidzein, 11.3. mg/kg) 飼食切除卵巢母鼠 35 天後，測定血清 ALP 之活性，發現飼食大豆萃取物組比攝食正常飼料之切除卵巢母鼠的血清 ALP 活性來得高 (Arjmandi *et al.*, 1998)，因此本研究大豆異黃酮組 (ISO) 之實驗結果與先前研究的結果一致，而本實驗飼食的樣本 (山藥與紅麴山藥) 對於大鼠血清 bone-ALP 之活性並無顯著的影響。

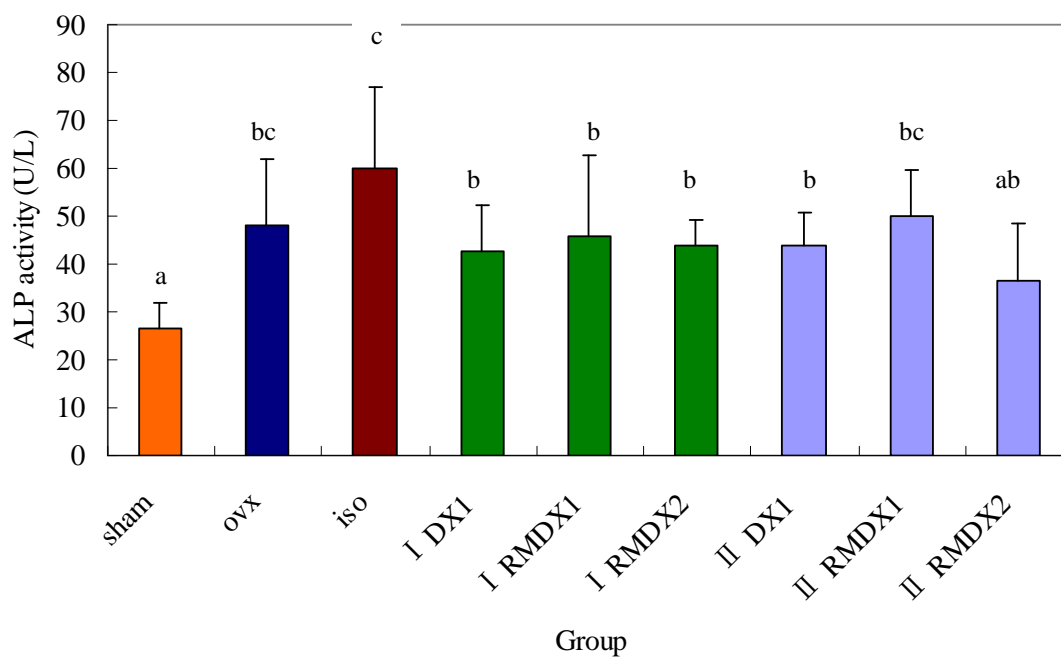


圖 4-24、大鼠血清中骨鹼性磷酸酶之活性

Fig. 4-24. The serum bone alkaline phosphatase (bone-ALP) activity of rats

Columns with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

(二) 骨鈣素 (osteocalcin)

骨鈣素由三個 γ -羧基谷胺酸基團 (bone-GLA-protein, BGP) 組成，骨骼合成時，由造骨細胞製造出來， γ -羧基谷胺酸基團的合成是靠維生素 K 的幫助並透過維生素 D₃ 的刺激。當骨鈣素由造骨細胞釋出來時，不但會合成骨基質而且會流至血液中，所以，由血液中骨鈣素的濃度可以看出骨質進行合成的情況。圖 4-25 為偽手術組 (sham)、切除卵巢組 (OVX)、正控制組 (ISO) 及試驗組 (I. dioscorea 1X、I. RMD 1X、I. RMD 2X、II. dioscorea 1X、II. RMD 1X、II. RMD 2X) 之血清骨鈣素濃度測定結果。

由結果得知，OVX 組之骨鈣素濃度較 sham 組有顯著的提高 ($p < 0.05$)，其餘各組除了 I. dioscorea 1X 骨鈣素濃度與 OVX 組無顯著差異之外，其餘各組骨鈣素濃度皆較 OVX 組有顯著提高 ($p < 0.05$)，但組間並無顯著差異。

餵食樣品四週後，由骨鈣素濃度測定結果可知，除了 I. dioscorea 1X 組之外，其餘各組之骨質合成作用相對於 OVX 組皆有改善，且發現第一部份餵食紅麴山藥組 I. RMD 2X、I. RMD 2X 有劑量關係，此結果與 micro-CT 影像定量結果一致，但在第二部份餵食山藥與紅麴山藥組間無顯著差異，且紅麴山藥組間亦無觀察到劑量關係，推測此結果是因本部份實驗之樣品 (山藥與紅麴山藥) 劑量較高，約達大鼠每日攝食量之 30%-65%，可能樣品中的有效成份對於骨鈣素濃度之影響已達一極限所致。

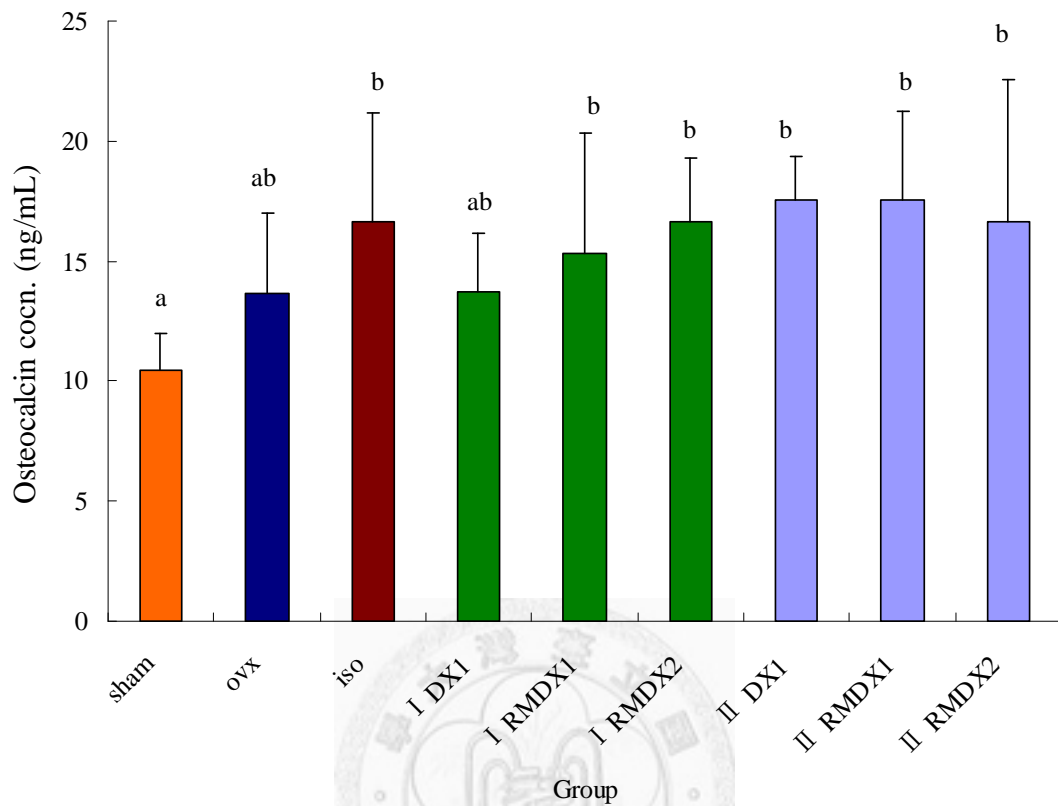


圖 4-25、大鼠血清中骨鈣素之濃度

Fig. 4-25. The serum osteocalcin concentrations of rats

Columns with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

六、微型電腦斷層儀之股骨骨質分析

(一) 影像分析

動物犧牲後，取右股骨進行較高解析度之 micro-CT 骨質變化分析。圖 4-26 為 μ CT 之股骨遠端 3D 影像分析結果，從分析結果可看出，sahm 組的骨質狀況最為緻密良好，OVX 組的骨質疏鬆狀況最為顯著，在試驗組中 ISO、I. RMD 2X、II. RMD 2X 等三組相較於 OVX 組的骨質情況有較顯著的正向改善。



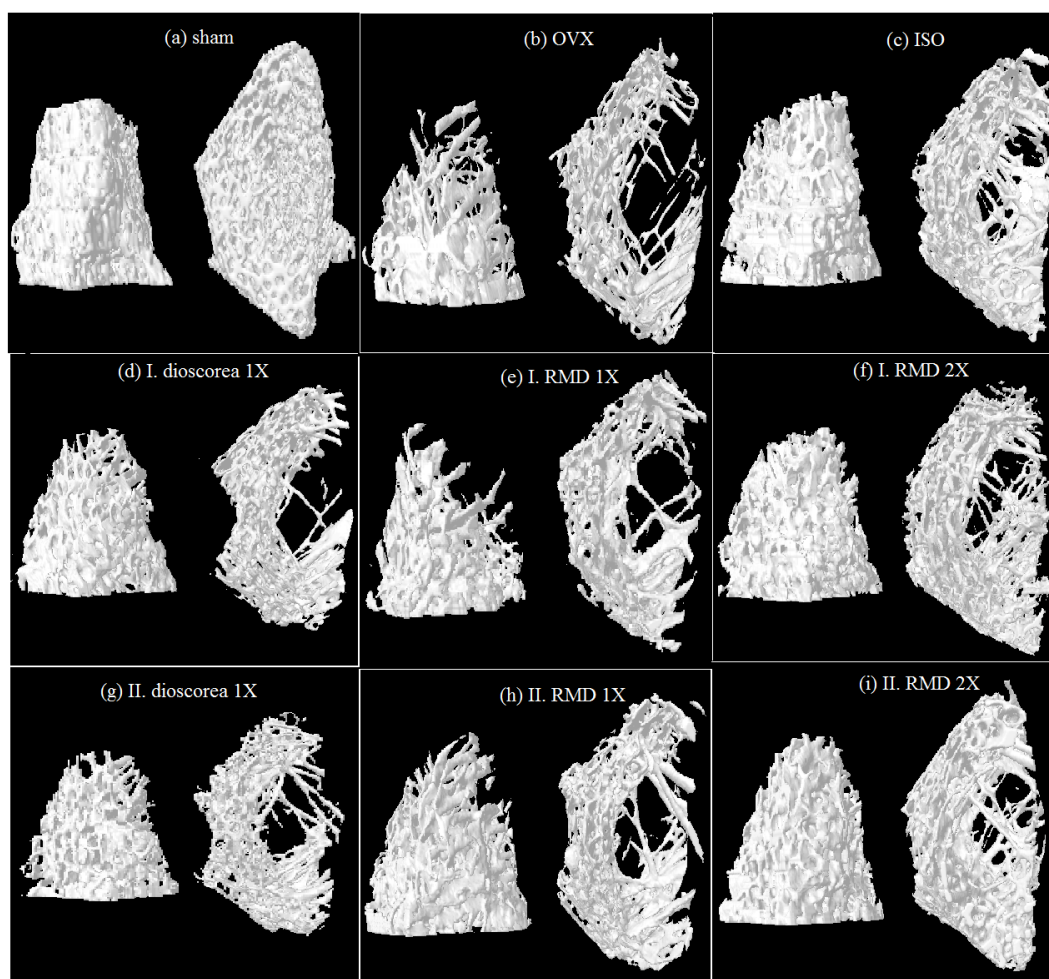


圖 4-26、大鼠之股骨遠端之 micro-CT 3 D 影像分析。(a)-(i) 分別為 sham、OVX、ISO、I. dioscorea 1X、I. RMD 1X、I. RMD 2X、II. dioscorea 1X、II. RMD 1X、II. RMD 2X 之股骨遠端 micro-CT 3 D 影像分析

Fig. 4-26. The analyzing results of rats' distal femur with micro-CT 3 D images. The analyzing results of rats' distal femur with micro-CT 3 D images of sham、OVX、ISO、I. dioscorea 1X、I. RMD 1X、I. RMD 2X、II. dioscorea 1X、II. RMD 1X、II. RMD 2X (a)-(i), respectively

(二) 右股骨遠端骨小樑定量

利用 micro-CT 進行右股骨遠端骨小樑定量，可得到 bone volume fraction (bone volume/tissue volume)、trabecular number、trabecular thickness、trabecular separation 等分析結果。其中 Bone volume fraction 為骨小樑所佔的體積比例，骨小樑比例愈高，骨質愈好。Trabecular number 為骨小樑的數目，骨小樑數目愈多，骨質愈好。Trabecular thickness 為骨小樑厚度，骨小樑愈厚，骨質愈好。Trabecular separation 為骨小樑散佈情形，骨小樑的平均間距愈短，代表分佈愈緊密，骨質愈好。

在 Bone volume fraction 的分析結果中，ISO、I. RMD 2X、II. RMD 2X 等三組骨小樑體積比例皆比 OVX 組來得高，但未達統計上顯著差異。Trabecular thickness 之分析結果顯示，ISO、I. RMD 2X、II. RMD 2X 等三組骨小樑厚度皆較 OVX 組有顯著提升 ($p < 0.05$)。Trabecular separation 分析結果顯示，ISO、I. dioscorea 1X、I. RMD 2X、II. dioscorea 1X、II. RMD 2X 骨小樑散佈情況皆較 OVX 來得密集，但未達統計上顯著差異。從 Trabecular number 的分析結果可知，ISO、I. RMD 2X、II. RMD 2X 等三組骨小樑的數目皆較 OVX 組來得多，但未達統計上顯著差異。

右股骨遠端骨小樑定量的結果中，餵食異黃酮組、與餵食兩倍劑量的紅麴山藥組，骨質相較於 OVX 組有改善的趨勢，其中 trabecular thickness 之分析結果具有顯著差異，右股骨 micro-CT 之偵測結果與 micro-CT 影像定量、骨鈣素濃度的分析結果符合。Bone volume fraction、trabecular number、trabecular separation 分析結果中能看出骨質改善的趨勢，但未達統計顯著的差異，推測與餵食時間有關，若能將餵食時間拉長四週以上，有可能可進一步達到顯著差異的效果。

表 4-7、骨小樑定量

Table 4-7. Quantification of trabecular bones

Group	BV/TV (%)	Trabecular thickness (mm)	Trabecular separation (mm)	Trabecular number (1/mm)
sham	34.00±4.71 ^b	0.11±0.01 ^a	0.22±0.04 ^a	3.22±0.38 ^b
OVX	17.43±8.00 ^a	0.11±0.01 ^{ab}	0.63±0.22 ^b	1.57±0.76 ^a
ISO	20.82±14.30 ^a	0.12±0.01 ^b	0.56±0.19 ^b	1.73±1.03 ^a
I. dioscorea 1X	16.67±5.78 ^a	0.12±0.01 ^{ab}	0.62±0.15 ^b	1.43±0.37 ^a
I. RMD 1X	14.53±2.93 ^a	0.11±0.01 ^{ab}	0.64±0.15 ^b	1.30±0.23 ^a
I. RMD 2X	19.71±5.88 ^a	0.11±0.01 ^{ab}	0.48±0.16 ^b	1.77±0.60 ^a
II. dioscorea 1X	16.90±5.60 ^a	0.12±0.01 ^b	0.57±0.13 ^b	1.43±0.43 ^a
II. RMD 1X	16.09±7.85 ^a	0.11±0.01 ^{ab}	0.65±0.20 ^b	1.46±0.69 ^a
II. RMD 2X	24.27±18.05 ^a	0.12±0.02 ^b	0.55±0.29 ^b	1.99±1.24 ^a

Data are presented as means ± SD. Mean values within each column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

七、肝腎指數與病理切片分析

(一) 血清肝腎指數分析

1. 血清肝指數分析

OVX 組之 ALT 值較 sham 組來得高，但無顯著差異 ($p > 0.05$)。試驗組除了 I. dioscorea 1X 之 ALT 值較 OVX 組來得高，但無顯著差異 ($p > 0.05$)，其餘各組皆比 OVX 之 ALT 值來得低。在 AST 值方面，試驗組皆比 sham 組與 OVX 組來得低 (表 4-7)。

2. 血清腎指數分析

在 BUN 與 creatinine 分析上，各組間數值皆接近且無顯著差異 ($p > 0.05$) (表 4-8)。

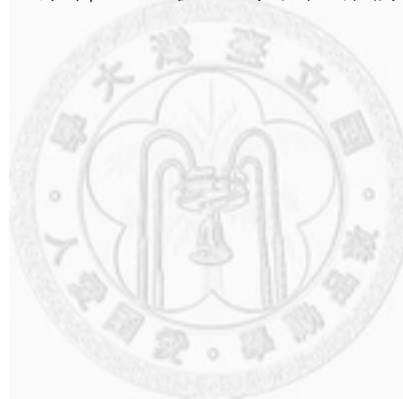


表 4-8、血清肝指數

Table 4-8. The liver index in serum

Group	ALT (U/L)	AST (U/L)
Sham	89.00 ± 27.04	56.50 ± 35.79
OVX	97.37 ± 12.69	55.50 ± 14.99
ISO	80.50 ± 24.80	47.16 ± 18.99
I. dioscorea 1X	107.57 ± 39.74	48.42 ± 13.99
I. RMD 1X	95.37 ± 28.21	45.87 ± 14.35
I. RMD 2X	87.00 ± 16.86	44.87 ± 13.08
II. dioscorea 1X	88.50 ± 16.12	41.62 ± 19.98
II. RMD 1X	90.42 ± 21.64	40.42 ± 19.21
II. RMD 2X	80.28 ± 10.51	32.14 ± 7.17

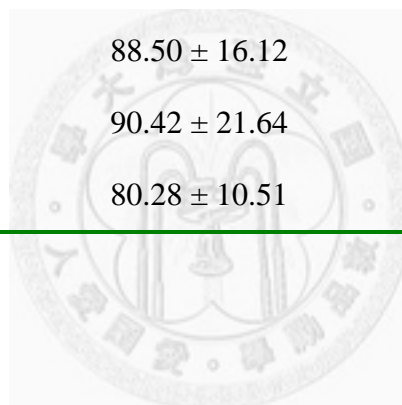


表 4-9、血清腎指數

Table 4-9. The kidney index in serum

Group	BUN (mg/mL)	Creatinine (mg/mL)
Sham	15.77 ± 1.83	0.49 ± 0.03
OVX	15.41 ± 1.55	0.49 ± 0.07
ISO	15.48 ± 2.13	0.46 ± 0.03
I. dioscorea 1X	15.47 ± 2.51	0.54 ± 0.05
I. RMD 1X	14.51 ± 2.11	0.52 ± 0.09
I. RMD 2X	14.60 ± 1.37	0.49 ± 0.04
II. dioscorea 1X	14.13 ± 1.34	0.50 ± 0.05
II. RMD 1X	15.00 ± 2.97	0.51 ± 0.08
II. RMD 2X	13.31 ± 1.90	0.55 ± 0.06

(二) 肝、腎切片鏡檢

由腎切片病理分析的結果，各組皆無發生異常的現象。由肝切片病理分析結果發現，在試驗組中有少數大鼠呈現輕度至中度脂肪肝的現象，此現象與切除卵巢後所產生的脂肪堆積有關，與體重監測的結果一致。病理分析結果如圖 4-27 所示。



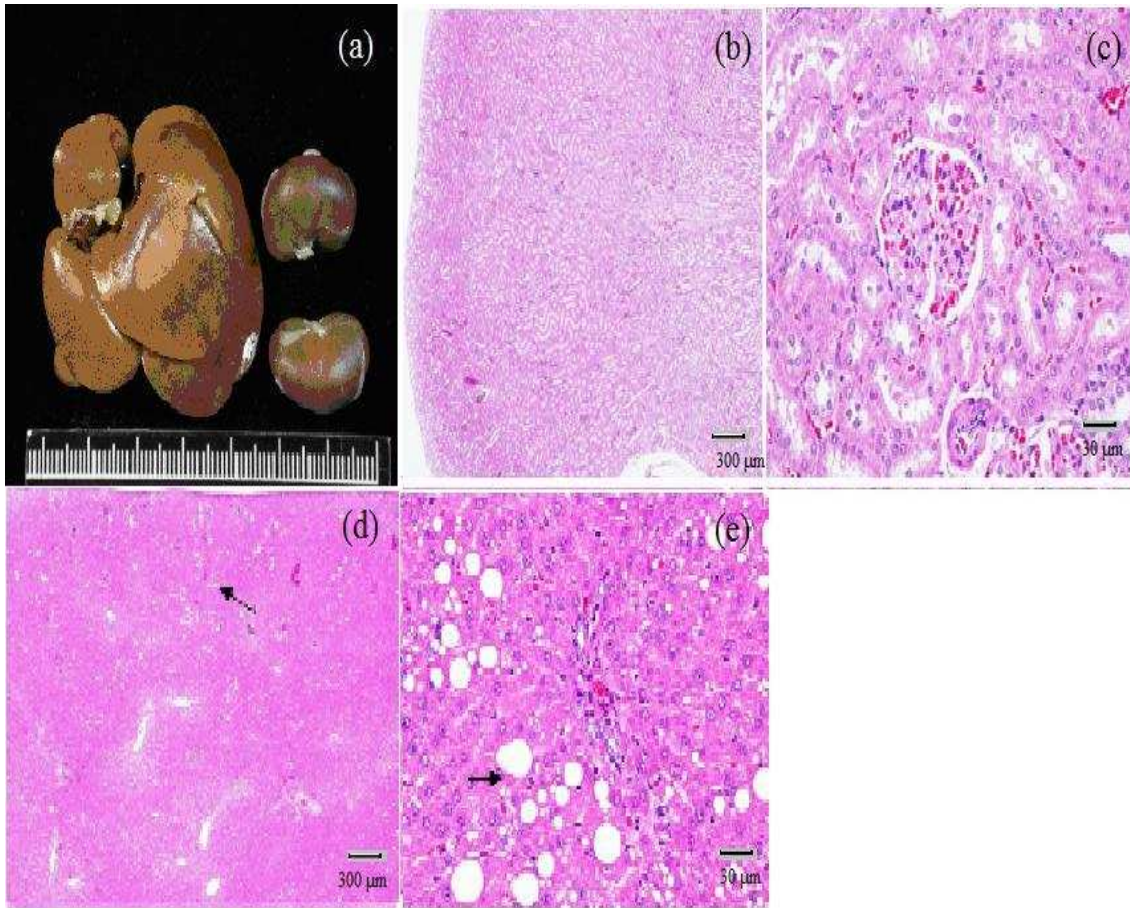


圖 4-27、肝腎組織病理分析結果。(a) 為肝腎之外觀。(b)、(c) 為腎臟分別由 40 倍率及 400 倍率顯微鏡觀察下之組織結構。(d)、(e) 為肝臟分別由 40 倍率及 400 倍率顯微鏡觀察下之組織結構，指出部份顯示脂肪有輕微改變的情形。

Fig. 4-23. Histopathological findings of kidney and liver. The appearance of liver and kidney (a). Kidney architectures under microscope with 40 X and 400 X (b)、(c), respectively. Liver architectures under microscope with 40 X and 400 X (d)、(e), respectively. Portal area showed slight fatty change

第五章 結論

一、Citricin、monacolin K、monascin、ankaflavinc與植物雌激素之分析

根據 HPLC 之分析結果，本實驗發酵紅麴山藥 citricin 之濃度為 4.63 ppm。monacolin K、monascin 及 ankaflavinc 的濃度分別為 104.8 ppm、369 ppm、602.8 ppm。山藥與紅麴山藥中皆無偵測到異黃酮類、木質酚類植物雌激素，但皆有偵測到薯蕷皂苷素 (diosgenin)，在紅麴山藥中的含量為 1.36 mg/g，在山藥中的含量為 0.68 mg/g。

根據 FDA 體表面積劑量換算標準 (<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm078932.pdf>)，將動物劑量換算為人類劑量得山藥之有效劑量為 4.7 g/kg/day;紅麴山藥有效劑量為 2.4 g/kg/day。

二、餵食樣品前後骨質的變化情況

本實驗利用切除卵巢鼠來誘導骨質疏鬆症。進行切除卵巢手術前後，利用微型電腦斷層儀 (microcomputed tomography, micro-CT) 及雙能量 X 射線吸收儀 (dual energy x-ray absorptiometry, DEXA) 測定骨質狀況。micro-CT 影像定量與 DEXA 的偵測結果顯示，手術前各組骨質無明顯的差異，手術三個月後 sham 組與 OVX 組之骨質已有顯著差異，但 OVX 組與其他各組之骨質狀況無顯著差異。

餵食樣品四週後，利用 micro-CT 進行骨質監測，由 micro-CT 影像定量結果可知，餵食樣品四週後各組的骨質狀況相對於 OVX 組皆有改善，尤以餵食紅麴山藥組 I. RMD 2X、II. RMD 2X、II. RMD 2X 最為顯著。

動物犧牲後，進一步測定血清中骨質的代謝指標，在骨鹼性磷酸酶 (bone alkaline phosphatase, bone-ALP) 的分析結果中，切除卵巢組 (OVX) 之 bone-ALP 活性較偽手術組 (sham) 具有顯著性的提高 ($p < 0.05$)，大豆異黃酮組 (ISO) 之骨鹼性磷酸酶活性較 OVX 組有顯著提高，此結果與先前研究的結果一致 (Arjmandi *et al.*, 1998; 吳克威, 2004)，而本實驗餵食的樣本 (山藥與紅麴山藥) 對於大鼠血

清 bone-ALP 之活性並無顯著的影響。由骨鈣素濃度測定結果可知，除了 I. dioscorea 1X 組之外，其餘各組之骨質合成作用相對於 OVX 組皆有改善。

動物犧牲後，取右股骨進行 micro-CT 的偵測，由 3D 影像分析結果中，觀察出試驗組各組與 OVX 組比較起來，骨質皆有正向的改善，尤以 ISO、I. RMD 2X、II. RMD 2X 三組改善最為顯著。右股骨遠端骨小樑定量的結果中，餵食異黃酮組、與餵食兩倍劑量的紅麴山藥組，骨質相較於 OVX 組有改善的趨勢，其中 trabecular thickness 之分析結果具有顯著差異，右股骨之 micro-CT 偵測結果與 micro-CT 影像定量、骨鈣素濃度的分析結果符合。

三、未來展望

本實驗在餵食劑量的訂定上以 diosgenin 的含量作為標準，在山藥與紅麴山藥固定 diosgenin 劑量的條件下，紅麴山藥對於骨質疏鬆的改善效果比山藥來得好，此結果可能與先前研究指出紅麴中改善骨質疏鬆之有效成份 monacolin K 有關 (Rogers *et al.*, 2000)，且由骨鈣素濃度與右股骨遠端之 micro-CT 測定結果，發現第二部份實驗的紅麴山藥組對於骨質疏鬆的改善效果皆比第一部份來得好，但第二部份實驗之劑量較高，約達大鼠每日攝食量之 30%-65%，故往後實驗，可利用本實驗結果，同時參照 monacolin K 與植物雌激素的含量後進行餵食劑量之訂定，找出一較為適當的有效劑量，而不必餵食如本實驗第二部份如此高的劑量，另外，餵食時間可再拉長，觀察長期下，紅麴山藥對於骨質疏鬆是否有更顯著的改善效果。

參考文獻

- 王馨世。1999。女性生殖生理與內分泌學。合記圖書出版社。台北，台灣，中華民國。
- 方銘志。2002。山藥多醣體之免疫調節機能探討。國立海洋大學食品科學系碩士論文。
- 玉田英明。1988。紅麴各種調味料之應用。食品及科學。July: 96-99。
- 行政院衛生署。2009。<http://Orz.tw/164G7>。
- 行政院衛生署台灣地區食品營養成分資料庫。2010。
<http://www.doh.gov.tw/FoodAnalysis/ingredients.htm>
- 李昭蓉。1997。漫談紅麴菌。食品工業月刊。29: 86-89。
- 李樹英、陳家暢、苗利軍、梁侖軍、王學超。1994。山藥健脾胃作用的研究。中國藥理與臨床雜誌。1: 19-21。
- 吳克威。2004。探討異黃酮素對造骨細胞與蝕骨細胞之生長、分化及生理活性之影響。私立高雄醫學大學生物化學研究所碩士論文。
- 吳麗容。2001。台灣與日本產山藥的生食與熟食對小白鼠胃腸道功能及抗氧化作用的影響。中山醫學院營養科學系碩士論文。
- 沈嘉琪。2003。山藥乳酸發酵液之抗氧化性和抗致突變性及對動物細胞生理活性之影響。國立海洋大學食品科學系碩士論文。
- 何書英、詹彤、王淑如。1994。山藥水溶性多糖的化學及体外抗氧化活性。中國藥科大學學報。25: 369-372。
- 林坤山。1999。根莖類澱粉顆粒對 α -amylase 感受性之探討。私立靜宜大學食品營養學系食品科學組碩士論文。
- 林俊義、盧煌勝、劉新裕。1998。1998 山藥之生產與食譜。行政院農業委員會農業試驗所編印。台中，台灣，中華民國。

- 林讚鋒。1983。紅麴菌的鑑定及實用分類法。製酒科技專論彙論，5: 104-113。
- 林讚峰。1995。紅麴菌培養工藝及紅麴應用之演進。製酒科技專論彙編。17: 156-168。
- 施芳宜。2003。冷凍乾燥與熱風乾燥對山藥抗氧化物質的影響。大葉大學食品工程學系碩士論文。
- 徐慶琳。2003。山藥粉之特性及產品開發之研究。國立嘉義大學食品科學系碩士論文。
- 高美丁、黃延君、張碧霞。2002。不同品種山藥對脂質代謝之影響。保健植物產品開發與藥理機能性研討會。
- 許紅峰、毛寧、黃諺諺、馬宏。1999。紅麴黴菌絲體及發酵濾液抗疲勞作用之研究。中國體育科技 35: 50-52。
- 許淳森、周輝政、王崇安、吳文惠。2004。植物性雌激素與停經後婦女保健。中華民國營養學會雜誌。29: 1-11。
- 陳松生、毛寧、陳哲超。1995。紅麴黴的麥角固醇研究。食品與發酵工業 6:18-23。
- 陳明造、林坤炳、郭秀蘭與曾穎玉。1997。豬肉在紅麴菌、乳酸菌和酵母菌等培養液浸漬期間色澤、TBA 及VBN 的變化。中華農學會報 181: 68-75。
- 陳彥霖。1999。紅麴與高血壓。科學與技術，32: 54-59。
- 陳詩詩。2001。以免疫調節及細胞再生觀點探討山藥生物活性之研究。國立陽明大學生物藥學系碩士論文。
- 陳曉鈴、林慧如。2004。本土山藥水萃取物之脂質及腸道生理功能評估。中華民國營養學會第三十屆年會。
- 張珍田。2001。山藥的種類與保健功能。靜宜食營簡訊。13: 2-7。
- 張華、張淑芳、李國鵬。2001。中西醫結合治療婦女更年期綜合症 206 例。陝西中醫。22: 659。
- 楊王嘉穗、王澤正、張珍田、王正新、陳曉鈴。2001。民間長紅及基隆山藥對血

脂及腸道生理之影響。中華保健食品學會。

楊榮森。1997。骨質疏鬆症一病因，診斷和治療。合記圖書出版社。台北，台灣，中華民國。

楊秀婷。2003。蔬果萃取液對抑制血管收縮素轉換酶之研究。屏東科技大學食品科學系碩士論文。

趙國華、王渾、李志孝、陳宗道。2002a。山藥多糖的免疫調節作用。營養學報。24：187-188。

趙國華、李志孝、陳宗道。2002b。山藥多糖 PDRS-I 的結構分析及抗腫瘤活性。藥學學報。38: 37-41。

廖翊君。2003。山藥對於小白鼠腸胃道菌叢及消化酵素的影響。中山醫學大學營養科學研究所碩士論文。

曾慶瀛、余哲仁、劉新裕。1994。粉末山藥之製備及其貯藏期間品質變化之研究。中華生質能源學會會誌。13: 92-101。

黃秋薇。2000。異黃酮對荷爾蒙補充治療之停經婦女血脂與脂蛋白及尿液雌激素代謝物的影響。國立台灣師範大學家政教育研究所碩士論文。

盧訓。2001。山藥之營養價值及其加工用途介紹。食品資訊。186: 68-71。

陳冠福、陳長堅、姚賢宗、江孟燦。2001。山藥冷、熱水抽出物抑制亞麻油酸氧化能力之探討。台灣保健食品學會。

劉新裕、王昭月、徐原田、宋麗梅。1995。本省山藥之研究。中醫藥雜誌。6: 111-126。

劉新裕、張同吳、林義恭、王昭月。2000a。優良保健植物-山藥。農業世界雜誌。197: 41-45。

劉新裕、張同吳、林義恭、王昭月。2000b。優良保健植物山藥之開發與利用。行政院農業委員會農業試驗所編印。台中，台灣，中華民國。

劉新裕、盧煌勝、林俊義。2000c。2000 年山藥之生產與藥膳利用。1-21。行政院農業委員會農業試驗所特刊第 93 號。台中，台灣，中華民國。

- 劉新裕、林義恭、賴瑞聲、王昭月。2000d。保健植物山藥之安全性與機能性。農業世界。208: 50-56。
- 劉新裕、賴瑞聲、林義恭、陳淑芬、羅慧齡、王昭月、高瑞隆。2001。山藥之生產潛力與抗氧化酵素活性之比較。中華農業研究。50: 40-58。
- 劉新裕、張同吳、林義恭、陳淑芬、王昭月、朱戡良、王順成。1999。山藥之品種特性、生產潛力、物化性質與抗氧化研究。中華農業研究。48: 1-22。
- 劉燕雯。2002。山藥塊莖儲藏性蛋白質及其水解產物之抗氧化活性研究。台北醫學院生藥學系碩士論文。
- 潘嘉如。2000。山藥水解液之製備。國立中興大學食品科學系碩士學位論文。
- 潘書毓。2003。台灣產山藥之酚類含量及抗氧化特性與加工的影響。中國文化大學生活應用科學系碩士論文。
- 賴宏亮、鄧秀玟、劉新裕、許博文。1999。山藥藥材鑑別之研究。藥物食品分析。7: 313-325。
- 薛穎、宋曙輝、陳杭。1998。苦瓜等 91 種食用植物抗促癌作用的研究。營養學報。20: 219-223。
- 鐘晨日。2002。停經婦女攝取山藥對血脂、抗氧化能力與性激素的影響。國立臺灣師範大學人類發展與家庭學系碩士論文。
- 蘇遠志、陳文亮、方鴻源、翁浩慶與王文祥。1970。紅麴菌 (*Monascus anka*) 之菌學研究。中國農業化學會誌。8: 45-58。
- 龔財立、姜金龍、劉新裕、黃鵬。1995。臺灣農家要覽。豐年社出版。台北。台灣。中華民國。
- Aderiyé, B.I., Ogundana S. K., and Emerole G.O. 1996. Antifungal properties of yam (*Dioscorea alata*) peel extract. Folia Microbiol. 41: 407-412.
- Adlercreutz, H., Hamalainen, E., Gorbach, S., and Goldin, B. 1992. Dietary phyto-oestrogens and the menopause in Japan. Lancet. 339: 1233.
- Albert, A.W., Chen, J., and Springer, J. 1980. Mevinolin: a highly potent competitive

inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc Natl Acad Sci USA*. 77: 3957-3961.

Albertazzi, P., Pansini, F., Bonaccorsi, G., Zanotti, L., Forini, E., and De Aloysio, D. 1998. The effect of dietary soy supplementation on hot flushes. *Obstet Gynecol* 91: 6-11.

Alekel, D.L., Germain, A.S., Peterson, C.T., Hanson, K.B., Stewart, J.W., and Toda, T. 2000. Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. *Am J Clin Nutr*. 72: 844-852.

Anderson, J.W., Johnstone, B.M., and Cook-Newell, M.E. 1995. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med*. 333: 276-282.

Aniya, Y., Ohtani, I. I., Higa, T., Miyagi C., Gibo, H., Shimabukuro, M., Nakanish, H., and Taira, J. 2000. Dimeric acid as an antioxidant of the mold: *Monascus anka*. *Free Radi Boil Medic*. 28: 999-1004.

Aniya, Y., Yokomakura, T., Yonamine, M., Shimada, K., Nagamine, T., Shimabukuro, M., and Gibo, H. 1999. Screening of antioxidant action of various molds and protection of *Monascus anka* against experimentally induced liver injuries of rats. *Gen Pharmacol*. 32: 225-231.

Anonymous. 1997. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer *Lancet*. 350: 1047-1059.

Aradhana, Rao, A.R., and Kale, R.K. 1992. Diosgenin-a growth stimulator of mammary gland of ovariectomized mouse. *Indian J Exp Biol*. 30: 367-370.

Araghiniknam M., Chung S., Nelson-White T., Eskelson C., Watson R. R. 1996. Antioxidant activity of dioscorea and dehydroepiandrosterone (DHEA) in older humans. *Bacteriol*. 79: 609-616.

- Arjmandi, B.H., Birnbaum, R., Goyal, N.V., Getlinger, M.J., Juma, S., Alekel, L., Hasler, C.M., Drum, M.L., Hollis, B.W., and Kukreja, S.C. 1998. Bone-sparing effect of soy protein in ovarian hormone-deficient rats is related to its isoflavone content. *Am J Clin Nutr.* 68: 1364S-1368S.
- Avula, B., Choi, Y-W., Srinivas, P. V., Kha., I. A. 1997. Quantitative determination of lignan constituents from *Schisandra chinensis* by liquid chromatography. *Chromatographia.* 61: 515–518.
- Baghurst, P.A., Baghurst, K. I., and Record, S.J. 1996. Dietary fiber, non-starch polysaccharides and resistant starch a review. *Food Australia.* 48: S1- S35.
- Baird, D.D., Umbach, D.M., Lansdell, L., Hughes, C.L., Setchell, K.D., Weinberg, C.R., Haney, A.F., Wilcox, A.J., and McLachlan, J.A. 1995. Dietary intervention study to assess estrogenicity of dietary soy among postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 80: 1685-1690.
- Begum, A.N., Nicolle, C., Mila, I., Lapierre, C., Nagano, K., Fukushima, K., Heinonen, S.M., Adlercreutz, H., Remesy, C., and Scalbert, A. 2004. Dietary lignins are precursors of mammalian lignans in rats. *J Nutr.* 134: 120-127.
- Blanc, P.J., Loret, M.O., Santerre, A. L., Pareilleux, A., Prome, D., Prome, J.C., Laussac, J.P. and Goma, G. 1994. Pigments of *Monascus*, *J. Food Sci.* 59: 862-865.
- Blanc, P. J., Laussac, J.P., Lebars, J., Lebars, P., Loret, M. O., Pareilleux, A., Prome, D., Prome, J.C., Santerre, A.L., and Goma, G. 1995. Characterization of monascidin-a from *monascus* as citrinin. *Int. J. Food Microbiol.* 27: 201-213.
- Borriello, S.P., Setchell, K.D., Axelson, M., and Lawson, A.M. 1985. Production and metabolism of lignans by the human faecal flora. *J Appl Bacteriol* 58: 37-43.
- Cason, Z., Benghuzzi, H., Tucci, M., Scott, A., and England, B. 2000. Assessment of endometrial function during sustained delivery of estradiol and estradiol plus

progesterone in ovariectomized rats. *Biomed Sci Instrum.* 36: 221-226.

- Castelo-Branco, C., Figueras, F., Sanjuan, A., Vicente, J.J., Martinez, de Osaba, M.J., Pons, F., Balasch, J., and Vanrell, J.A. 1999. Long-term compliance with estrogenreplacement therapy in surgical postmenopausal women: benefits to bone and analysis of factors associated with discontinuation. *Menopause.* 6: 307-311.
- Chen, Jian-Hong, James Wu, Shih-Shyn, Lin, Hsiao-Che, Wu, Shey-Lin, Wang, Wen-Fu, Huang, Shu-Kuei, and Ho, Ying-Jui. 2008. Dioscorea improves the morphometric and mechanical properties of bone in ovariectomised rats. *J Sci Food Agric.* 88: 2700–2706
- Chen, Y. and Wu, Y. 1994. Progress in research and manufacturing of steroidal saponins in China. *J. Herb Spic Med Plant.* 2: 59-70.
- Choi, E.M. and Hwang, J.K. 2002. Enhancement of oxidative response and cytokine production by yam mucopolysaccharide in murine peritoneal macrophage. *Fitoterapia.* 73: 629-637.
- Dong, M., Feng, X.Z., Wu, L.J., Wang, B.X. and Ikejima, T. 2001. Two new steroidal saponins from the rhizomes of *Dioscorea panthaica* and their cytotoxic activity. *Planta Med.* 67: 853-857.
- Ejechi, B.O., and Souzey, J.A. 1999. Inhibition of biodeterioration of yam tuber *Dioscorea torundata* Poir in storage with phenolic extract of *Acalypha hispida* Burm. f. leaves. *J Stored Prod Res.* 35: 127-134.
- Endo, A. 1979. Monacolin-K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species. *J Antibiot.* 32: 852-854.
- Endo, A., and Hasumi, K. 1985. Dihyromonacolin L and monacolin X, new metabolites those inhibit cholesterol biosynthesis. *J. Antibiot.* 38: 321-327.
- Fabre, C.E., Santerre, A.L., Loret, M.O., Baberian, R., Pareilleux, A., Goma, G., and Blanc, P.J. 1993. Production and food applications of the red pigments of

Monascus ruber. J Food Sci 58: 1099-1102.

Food and Agriculture Organization (FAO). 1999. Yams. FAO Quarterly Bulletin of Statistics. 12: 44

Gao, Y.H., and Yamaguchi, M. 1999. Inhibitory effect of genistein on osteoclast-like cell formation in mouse marrow cultures. Biochem Pharmacol. 58: 767-772.

Gutierrez, G.E., Mundy, B., Rossini, G., Garrett, I.R., Chen, S.T., Mundy, G.R. 2006. Red yeast rice stimulates bone formation in rats. Nutr Res. 26: 124-129.

Haggans, C.J., Hutchins, A.M., Olson, B.A., Thomas, W., Martini, M.C., and Slavin, J.L. 1999. Effect of flaxseed consumption on urinary estrogen metabolites in postmenopausal women. Nutr Cancer. 33: 188-195.

Han, K.K., Soares, J.M., Jr., Haidar, M.A., de Lima, G.R., and Baracat, E.C. 2002. Benefits of soy isoflavone therapeutic regimen on menopausal symptoms. Obstet Gynecol. 99: 389-394.

Hidalgo, L.A., Chedraui, P.A., Morocho, N., Ross, S., and San Miguel, G. 2005. The effect of red clover isoflavones on menopausal symptoms, lipids and vaginal cytology in menopausal women: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. Gynecol Endocrinol. 21: 257-264.

Higdon, K., Scott, A., Tucci, M., Benghuzzi, H., Tsao, A., Puckett, A., Cason, Z., and Hughes, J. 2001. Biomed Sci Instrum. 37: 281-286.

Hou, W.C., Lee, M.H., Chen, H.J., Liang, W.L., Han, C.H., Liu, Y.W., and Lin Y.H. 2001. Antioxidant activities of dioscorin, the storage protein of yam (*Dioscorea batatas Decne*) tuber. J Agric Food Chem. 49: 56-60.

Hsu, F.L., Lin, Y.H., Lee M.H., Lin C.L. and Hou W.C. 2002. Both dioscorin, the tuber storage protein of yam (*Dioscorea alata* cv. Tainong No. 1) and its peptic hydrolysates exhibited angiotensin converting enzyme inhibitory activities. J Agric Food Chem. 50: 6109-6113.

- Hsu, C.S., Shen, W.W., Hsueh, Y.M., and Yeh, S.L. 2001. Soy isoflavone supplementation in postmenopausal women. Effects on plasma lipids, antioxidant enzyme activities and bone density. *J Reprod Med.* 46: 221-226.
- Hu, K., Dong, A., Yao, X., Kobayashi, H. and Iwasaki, S. 1996. Antineoplastic agents; I. Three spirostanol glycosides from rhizomes of *Dioscorea collettii* var. *hypoglauca*. *Planta Med.* 62: 573-575.
- Ibrahim, N. 1994. Trace metals in tropical yam species: *Dioscorea* spp. *Food Chem.* 51: 5-6.
- Illman, R.J., Storer, G.B., and Topping, D.L. 1993. White wheat flour lowers plasma cholesterol and increases cecal steroids relative to whole wheat flour, wheat bran and wheat pollard in rats. *J Nutr.* 123: 1094-1100.
- Ishimi, Y., Miyaura, C., Ohmura, M., Onoe, Y., Sato, T., Uchiyama, Y., Ito, M., Wang, X., Suda, T., and Ikegami, S. 1999. Selective effects of genistein, a soybean isoflavone, on B-lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency. *Endocrinology.* 140: 1893-1900.
- Iwu, M.M., Okunji, C.O., Ohiaeri, G.O., Akah, P., Corley, D., Tempesta, M.S. 1990. Hypoglycaemic activity of dioscoretine from tubers of *Dioscorea dumetorum* in normal and alloxan diabetic rabbits. *Planta. Med.* 56: 264-267.
- Jakobisiak, M., and Golab, J. 2003. Potential antitumor effects of statins (Review). *Int. J. Oncol.* 23: 1055-1069.
- Jenkins, D., Wolever, T., Jenkins, A., Thorne, M., Lee, R., Musky, J., Reichert, R., and Wong, G. 1983. The glycaemic index of foods tested in diabetic patients: A new basis for carbohydrate exchange favouring the use of legumes. *Diabetologia.* 24: 257.
- Juzlova, P., Martinkova, L. and Kren, V. 1996a. Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: a review. *J. Ind. Microbiol.*, 16: 163-170.

- Juzlova, P., Rezanka, T., Martinkova, L., and Kren V. 1996b. Long-chain fatty acids from *Monascus purpureus*. *Phytochemistry*. 43: 151-153.
- Kabat, G.C., Chang, C.J., Sparano, J.A., Sepkovie, D.W., Hu, X.P., Khalil, A., Rosenblatt, R., and Bradlow, H.L. 1997. Urinary estrogen metabolites and breast cancer: a case-control study. *Canc Epidemiol Biomarkers Prev*. 6: 505-509.
- Kamal-Eldin, A., Pettersson, D., and Appelqvist, L.A. 1995. Sesamin (a compound from sesame oil) increases tocopherol levels in rats fed ad libitum. *Lipids*. 30: 499-505.
- Kimura, K., Komagata, D., Murakawa, S., and Endo, A. 1990. Biosynthesis of monacolins: conversion of monacolin J to monacolin K (mevinolin). *J. Antibiot*. 44: 1621-1622.
- Komesaroff, P.A., Black, C.V., Cable, V., and Sudhir, K. 2001. Effects of wild yam extract on menopausal symptoms, lipids and sex hormones in healthy menopausal women. *Climacteric*. 4:144-150.
- Kurzer, M.S. and Xu, X. 1997. Dietary phytoestrogens. *Annu Rev Nutr* 17: 353-381.
- Kuiper, G.G., Lemmen J.G., Carlsson B., Corton, J.C., Safe, S.H., Vander Saag, P.T., van der Burg, B., and Gustafsson, J.A. 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*. 139: 4252-4263.
- Lee, C.L., Tsai, T.Y., Wang, J.J., Pan, T. M. 2006. *In vivo* hypolipidemic effects and safety of low dosage *Monascus* powder in a hamster model of hyperlipidemia, *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 70: 533-540
- Lee, C.L., Wang, J.J., Pan, T.M. 2006. Synchronous analysis method for detection of citrinin and the lactone and acid forms of monacolin K in red mold rice. *J AOAC Int*. 89: 669-677.
- Lemay, A., Dodin, S., Kadri, N., Jacques, H., and Forest, J.C. 2002. Flaxseed dietary supplement versus hormone replacement therapy in hypercholesterolemic

- menopausal women. *Obstet Gynecol.* 100: 495-504.
- Leu, E.M., and Cooper, C. 1996. The epidemiology of osteoporosis. The oriental perspective in a world context. *Clin Orthop.* 323: 65-74.
- Li, C.L., Zhu, Y., Wang, Y.Y., Zhu, J.S., Chang, J., and Kritchevsky, D. 1998. *Monascus purpureus*-fermented rice (red yeast rice): A natural food product that lowers blood cholesterol in animal models of hypercholesterolemia. *Nutr. Res.* 18: 71-81.
- Li, X., Cui, Q., Kao, C., Wang, G. J., Balian, G. 2003. Lovastatin inhibits adipogenic and stimulates osteogenic differentiation by suppressing PPAR γ 2 and increasing Cbfa1/Runx2 expression in bone marrow mesenchymal cell cultures. *Bone.* 33 : 652-659.
- Liggins, J., Bluck, L.J., Runswick, S., Atkinson, C., Coward, W.A., and Bingham, S.A. 2000. Daidzein and genistein contents of vegetables. *Br J Nutr.* 84: 717-725.
- Lin, S.J., Lay, H. L., Wu, S. T., and Thseng, F. S. 2005. Contents of certain isoflavones in *Glycine dolichocarpa*, *G. tabacina* and *G. tomentella* collected in Taiwan. *J Food Drug Anal.* 13: 260-266.
- Ling, X., Lu, A., Zhao, X., Chen, X., and Cummings, S.R. 1996. Very low rates of hip fracture in Beijing, People's Republic of China the Beijing Osteoporosis Project. *Am J Epidemiol.* 144: 901-907.
- Maeda, T., Matsunuma, A., Kurahashi, I., Yanagawa, T., Yoshida, H., and Horiuchi, N. 2004. Induction of osteoblast differentiation indices by statins in MC3T3-E1 cells. *J Cell Biochem.* 92: 458-471.
- Mahley, R.W., and Innerarity, T.L. 1983. Lipoprotein receptors and cholesterol homeostasis. *Biochem Biophys Acta.* 737: 197-222.
- Mazur, W., and Adlercreutz, H. 2000. Overview of naturally occurring endocrine-active substances in the human diet in relation to human health. *Nutrition.* 16: 654-658.

- Morabito, N., Crisafulli, A., Vergara, C., Gaudio, A., Lasco, A., Frisina, N., D'Anna, R., Corrado, F., Pizzoleo, M.A., Cincotta, M. 2002. Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind placebo-controlled study. *J Bone Miner Res.* 17: 1904-1912.
- Morse, O., Acholo, M., Mcnamara, N., and Oliver, R. 2000. Control of storage insects as a means of limiting yam tuber fungal rots. *J Stored Pro Res.* 36: 37-45.
- Mundy, G., Garrett, R., Harris, S., Chan, J., Chen, D., Rossini, G., Boyce, B., Zhao, M., and Gutierrez, G. 1999. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science.* 286: 1946-1949
- Murkies, A.L., Wilcox, G., and Davis, S.R. 1998. Phytoestrogens. *J Clin Endocrinol Metab.* 83: 297-303.
- Murkies, A.L., Lombard, C., Strauss, B.J., Wilcox, G., Burger, H.G., and Morton, M.S. 1995. Dietary flour supplementation decrease postmenopausal hot flushes: effect of soy and wheat. *Maturitas.* 21: 189-195.
- Nishina, P.M., and Freedland, R.A. 1990. Effects of propionate on lipid biosynthesis in isolated rat hepatocytes. *J Nutr.* 120: 668-673.
- Nozaki, H., Date, S., Kondo, H., Kiyohara, H., Takaoad, T., and Nakayama, M. 1991. Ankalactone, a new α,β -unsaturated γ -lactone from *Monascus anka*. *Agri Biol Chem.* 55: 899-900.
- Omonigho, S.E. and Ikenebomeh, M.J. 2000. Effect of temperature treatment on the chemical composition of pounded white yam during storage. *Food Chemsitry.* 71: 215-220.
- Omonigho, S.E., and Ikenebomeh, M.J. 2000. Effects of different preservative treatments on the chemical changes of pounded white yam (*Dioscorea rotundata*) in storage at 28.2°C. *Food Chem.* 68: 201-209.

- Pall, R.E., and Chen, N.J. 1988. Compositional change in yam bean during storage. *Hortscience*. 23: 194-196.
- Picherit, C., Bennetau-Pelissero, C., Chanteranne, B., Lebecque, P., Davicco, M.J., Barlet, J.P., and Coxam, V. 2001. Soybean isoflavones dose-dependently reduce bone turnover but do not reverse established osteopenia in adult ovariectomized rats. *J Nutr*. 131: 723-728.
- Potter, S.M., Baum, J.A., Teng, H., Stillman, R.J., Shay, N.F., and Erdman, J.W., Jr. 1998. Soy protein and isoflavone: their effects on blood and bone density in postmenopausal woman. *Am J Clin Nutr*. 68: 1375S-1379S.
- Reinli, K and Block, G. 1996. Phytoestrogen content of foods-a compendium of literature values. *Nutr Cancer*. 26: 123-148.
- Rowland, I.R., Wiseman, H., Sanders, T.A., Adlercreutz, H., and Bowey, E.A. 2000. Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora. *Nutr Cancer* 36:27-32.
- Rogers, M. J. 2000. Statins: lower lipids and better bones ? *Nature Medicine*. 6 : 21-23.
- Sakou, T. 1998. Bone morphogenetic proteins: From basic studies to clinical approaches. *Bone*. 22:591-603.
- Scott, A., Higdon, K., Benghuzzi, H., Tucci, M., Cason, Z., England, B., Tsao, A., and Hughes, J. 2000. TCPL drug delivery system: the effects of synthetic DHEA and Diosgenin using an ovariectomized rat model. *Biomed Sci Instrum*. 36: 171-176.
- Setchell, K.D., and Cassidy, A. 1999. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr*. 129: 758S-767S.
- Shukla, T.P. 1995. Enzyme-resistant starch: A new specialty food ingredient. *Cereal Foods World*. 40: 882-883.

- Sugimoto E and Yamaguchi M. 2000. Stimulatory effect of daidzein in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochem Pharmacol.* 59: 471-475.
- Taira, J., Miyagi, C., and Aniya, Y. 2002. Dimerumic acid as an antioxidant from the mold, *Monascus anka*: the inhibition mechanisms against lipid peroxidation and heme protein-mediated oxidation. *Biochem Pharmacol Mar.* 63: 1019-1026.
- Taylor, W.G., Elder, J.L., Chang, P. R. and Richards, K.W. 2000. Microdetermination of diosgenin from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds. *J. Agric. Food Chem.* 48: 5206-5210.
- Tham, D.M., Gardner, C.D., and Haskell, W.L. 1998. Potential health benefits of dietary phytoestrogen: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. *J Clin Endocrinol Metab.* 83: 2223-2235.
- Thompson, L.U., Boucher, B.A., Cotterchio, M., Kreiger, N., and Liu, Z. 2007. Dietary phytoestrogens, including isoflavones, lignans, and coumestrol, in nonvitamin, nonmineral supplements commonly consumed by women in Canada. *Nurt Canc.* 59: 176-184.
- Uesugi, T., Fukui, Y., and Yamori, Y. 2002. Beneficial effects of soybean isoflavone supplementation on bone metabolism and serum lipids in postmenopausal Japanese women: a four-week study. *J Am Coll Nutr.* 21:97-102.
- United States Department of Agriculture-Iowa State University Database on the Isoflavone Content of Foods. 2010. <http://www.nalusda.gov/fnic/foodcomp/Data/isoflav/isoflav.html>
- Undie, A.S., and Akubue, P.I. 1986. Pharmacological evaluation of *Dioscorea dumetorum* tuber used in traditional antidiabetic therapy. *J Ethnopharmacology.* 15: 133-44.
- Upmalis, D.H., Lobo, R., Bradley, L., Warren, M., Cone, F.L., and Lamia, C.A. 2000. Vasomotor symptom relief by soy isoflavone extract tablets in postmenopausal

- women: a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Menopause*. 7: 236-242.
- van de Weijer, P.H., and Barentsen, R. 2002. Isoflavones from red clover (Promensil) significantly reduce menopausal hot flush symptoms compared with placebo. *Maturitas*. 42: 187-193.
- Wanasundera, J.P.D., Ravindran G. 1994. Nutritional assessment of yam (*Dioscorea alata*) tubers. *Plant Foods Hum Nutr*. 46: 33-39.
- Wang, E.A., Israel, D.I., Kelly, S., and Luxenberg, D.P. 1993. Bone morphogenetic protein-2 causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells. *Growth factors*. 9: 57-71.
- Wang, N.Y and Lo, T.B. 1968. Studies on thin layer chromatography of steroidal sapogenins and preliminary report of sapogenin fraction of Formosan *Dioscorea*. *Chin. Chem. Soc. J.* 1: 30-38.
- Wang, J.J., Shieh, M. J., Kuo, S. L., Lee, C.L., and Pan, T.M. 2006. Effect of red Mold rice on antifatigue and exercise-related changes in lipid peroxidation in endurance exercise. *Appl Microbial Biotechnol*. 70: 247-253.
- Washburn, S., Burke, G.L., Morgan, T., and Anthony, M. 1999. Effect of soy protein supplementation on serum lipoproteins, blood pressure, and menopausal symptoms in perimenopausal women. *Menopause*. 6: 7-13.
- Whitten, P.L., and Patisau, I H.B. 2001. Cross-species and interassay comparisons of phytoestrogen action. *Environ Health Perspect*. 109: 5-20.
- Wilcox, G., Wahlqvist, M.L., Burger, H.G., and Medley, G. 1990. Oestrogenic effects of plant foods in postmenopausal women. *Br Med J*. 301: 905-906.
- Wong, H.C., and Bau, Y.S. 1977. Pigmentation and antibacterial activity of fast neutron-ray and x-ray-induced strains of *Monascus purpureus* Went. *Plant Physiol*. 60: 578-581.

- Wong, H.C., and Koehler, P.E. 1981. Production and isolation of an antibiotic from *Monascus purpureus* and its relationship to pigment production. *J. Food Sci.* 46: 589-592.
- Wu, W.H., Liu, L.Y., Chung, C.J., Jou, H.J., and Wang, T.A. 2005. Estrogenic effect of yam ingestion in healthy postmenopausal women. *J Am Coll Nutr.* 24: 235-243.
- Yamaguchi, M., and Gao, Y.H. 1998a. Inhibitory effect of genistein on bone resorption in tissue culture. *Biochem Pharmacol.* 55: 71-76.
- Yamaguchi, M., and Gao, Y.M. 1998b. Potent effect of zinc acexamate on bone components in the femoral-metaphyseal tissues of elderly female rats. *Gen Pharmacol.* 30: 423-427.
- Yamori, Y., Moriguchi, E.H., Teramoto, T., Miura, A., Fukui, Y., Honda, K.I., Fukui, M., Nara, Y., Taira, K., and Moriguchi, Y. 2002. Soybean isoflavones reduce postmenopausal bone resorption in female Japanese immigrants in Brazil: a ten-week study. *J Am Coll Nutr.* 21: 560-563.
- Yasukawa, K., M. Takahashi, S. Natori, M. Yamazaki, M. Takeuchi, M. Takido. 1994. Azaphilones inhibit tumor promotion by 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Oncology.* 45: 108-112.
- Yin, J., Tezuka, Y., Kouda, K., Tran, Q.L., Miyahara, T., Chen, Y., and Kadota, S. 2004. Antiosteoporotic activity of the water extract of *Dioscorea spongiosa*. *Biol Pharmaceut Bull.* 27: 583-586.
- Zambell, K.L., Fitch, M.D., and Fleming, S.E. 2003. Acetate and butyrate are the major substrates for de novo lipogenesis in rat colonic epithelial cells. *J Nutr.* 133: 3509-3515