

SPF 雞胚蛋改善動脈硬化的分子作用機制

*¹褚俊傑、²鄭天浚、³張嘉祐、⁴林高章、⁵洪宸達、⁶楊淨婷、⁷鄭勝元、⁸蔡宛臻、⁹鄭嘉惠

^{1,3,4,5,6,7,8,9} 南台科技大學生物科技系(所)

² 嘉南藥理科技大學職業安全衛生系

² 奇美醫療財團法人奇美醫院 神經內科 職業醫學科 病歷資訊管理室

^{3,4} 奇美醫療財團法人奇美醫院 神經內科

*¹jjchuu@mail.stust.edu.tw, ²tjcheng@mail.chimei.org.tw, ³z4s@mail.stust.edu.tw, ⁴kaochang@mail.stust.edu.tw, ⁵m95h0219@stust.edu.tw, ⁶v6junichi0613@yahoo.com.tw, ⁷dog_gh26@hotmail.com, ⁸iamchen828@gmail.com, ⁹chia1119@gmail.com

摘要

心血管疾病 (Cardiovascular disease, CVD)的形成原因，主要是由於脂肪與膽固醇沉積，進而產生動脈粥狀硬化 (atherosclerosis)。形成的機轉主要由於血管內皮細胞及血管壁平滑肌細胞對傷害性刺激所引起一連串的發炎反應。近年來有研究指出，吃雞蛋對心血管系統有特殊的保護作用，尤其是新鮮的雞胚蛋(CEE)蛋白質含量較高，其所含氨基酸與必需脂肪酸的含量更接近人類需要，且脂肪與游離膽固醇含量相較於傳統雞蛋顯著較低。本研究選用自發性高血壓大鼠(spontaneously hypertensive rat; SHR)，透過餵食八週高膽固醇飼料的方式來建立一個動脈粥狀硬化的疾病動物模式。之後採用無特定病原(specific pathogen free, SPF)雞種所孵育的胚胎蛋(已受精且胚胎發育正常之 11 日齡之雞蛋)，經冷凍乾燥程序製成 SPF 雞胚蛋粉末，連續餵食 SHR 大鼠八週，進行心血管疾病風險評估指標。實驗結果發現，餵食已產生誘發性粥狀動脈硬化大鼠 SPF 雞胚蛋(CEE)組八週後(n=6)，可顯著降低血中 TG 的濃度、提高 HDL/LDL Ratio。特別是在投予 CEE 1, 4 與 8 週後，各時間點血中的高敏感度 C-反應蛋白(hs-CRP)都呈現顯著下降趨勢(p<0.05)。組織病理 HE 染色檢查顯示，投予 CEE 8 週後有明顯改善大鼠主動脈管壁增生與頸動脈內皮組織纖維化等病理徵狀。免疫組織化學染色(IHC)分析進一步顯示，CEE 組顯著降低大鼠頸動脈的轉化生長因子(TGF-β)的蛋白質表現(p<0.05)。

關鍵詞：雞胚蛋、粥狀動脈硬化、SHR 大鼠、高膽固醇飼料、免疫組織化學、轉化生長因子

Molecular Mechanisms of Action of Specific Pathogen-Free Chick Embryo Eggs for Atherosclerosis

*¹Jiuun-Jye Chuu, ²Tain-Junn Cheng, ³Chia-Yu Chang, ⁴Kao-Chang Lin, ⁵Chen-Ta Hung, ⁶Jing-Ting Yang, ⁷Sheng-yuan Jeng, ⁸Wan-Chen Tsai, ⁹Chia-Hui Cheng

^{1,3,4,5,6,7,8,9}Department of Biotechnology, Southern Taiwan University of Science and Technology

²Department of Occupational Safety, College of Environment, Chia Nan University of Pharmacy and Science

²Department of Medical Record and Information Management, Chi Mei Medical Center

^{3,4}.Department of Neurology, Chi Mei Medical Center

Abstract

Cardiovascular disease (CVD) is a class of chronic diseases that involve the heart or blood vessels (arteries and veins). Most CVD deaths are attributable to excess fat and cholesterol deposited on vascular walls, which causes atherosclerotic complications. We investigated the ameliorative effects and underlying mechanisms of

Received: July. 12, 2012; accepted: March, 2013.

Corresponding author: J.-J. Chuu



specific pathogen-free (SPF) chicken embryo eggs (CEE) on atherosclerosis. The cardiovascular disease risk assessment indicators of spontaneously hypertensive rats (SHRs) ($n = 6$) with high-fat diet (HFD)-induced atherosclerosis and treated with SPF CEE for 8 weeks were evaluated. Their HDL/LDL ratios had significantly increased, and their blood triglyceride concentrations had significantly decreased. Plasma high sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) levels significantly ($p < 0.05$) decreased after 1, 4, and 8 weeks of SPF CEE treatment. Histopathological examinations consistently indicated that 8 weeks of SPF CEE treatment significantly reduced the thickness of hyperplastic vascular walls and HFD-induced local fibrosis on aortic and carotid artery walls. Furthermore, immunohistochemical staining showed that SPF CEE treatment significantly ($p < 0.05$) inhibited the expression of transforming growth factor- β protein on the carotid artery walls of rats. We found that long-term (8 weeks) SPF CEE treatment attenuated the pathological effects of atherosclerosis. SPF CEE might provide a new raw material for developing functional foods to attenuate cardiovascular disease.

Keywords: Chick Embryonic Egg, Atherosclerosis, SHR Rat, High Fed Diet, Immunohistochemistry, Transforming growth Factor- β

壹、研究背景與動機

一、心血管疾病的定義及致病因子

心血管疾病 (Cardiovascular disease, CVD) 種類包括有冠狀動脈心臟病、心臟麻痺、心絞痛、心肌梗塞、心律不整、出血性心臟衰竭等，皆屬於多重致病機轉及因子的疾病。心血管疾病的致病因子是由多重內生與外源性危險因子交互作用而逐漸誘發病變，產生的主要原因，是由於脂肪與膽固醇沉積，最重要的病理變化為動脈硬化[1、2]。動脈硬化包括動脈壁的增厚與硬化，由於動脈內徑縮減導致通過血流量減少，而動脈壁增厚及硬化失去收縮及放鬆能力及部分彈力。若發生在腦動脈則造成腦中風，若發生在冠狀動脈則造成心肌梗塞。血漿脂質異常與氧化壓力 (Oxidative stress)是趨動動脈粥樣硬化最直接的危險因素，臨床檢驗與流行病學以血脂異常作為動脈粥樣硬化的評估指標：TC 偏高(≥ 250 mg/dl)、TG 偏高(> 200 mg/dl)、LDL-C 上升(≥ 200 mg/dl)及 HDL-C 偏低(< 35 mg/dl)[3]。在許多動物實驗均指出，膳食膽固醇的攝取會使血漿總膽固醇(total cholesterol,TC)上升，並使血漿中低密度脂蛋白(low density lipoprotein-cholesterol, LDL-TC)顆粒變大且數目增多，而提高了罹患心血管疾病之機率[4]。

二、卵磷脂對於膽固醇代謝

雞蛋含人體必需的多種氨基酸，與人體蛋白質組成相近。一個雞蛋(大約 50—60 克)約含 2500 毫克膽固醇，這些膽固醇與蛋白質結合在一起形成脂蛋白，其中就有大量的“好膽固醇”-高密度脂蛋白，它具有清除血管壁上膽固醇的作用，所以許多學者認為，吃雞蛋對心血管系統有特殊的保護作用。最新研究發現，雞蛋中的不飽和脂肪酸可以降低膽固醇，許多營養學家開始推薦用雞蛋來防治動脈粥樣硬化。一般雞蛋蛋黃中的脂質成份含 62%之三酸甘油酯、30.5%磷脂質(其中有 20.7%為卵磷脂)及 4.1%的膽固醇。蛋黃中的脂肪酸以單元不飽和脂肪酸居多佔 40-48%及含 14-20%的多元不飽和脂肪酸[5]。卵磷脂為細胞膜的主要成份，因能溶解血管壁的膽固醇，故可保持血管年輕、減低粥狀動脈硬化血管疾病之罹患率[6]。美國營養學家發現，雞蛋中的卵磷脂能顯著降低心血管病患之血清膽固醇，並證實卵磷脂是一種強有力的乳化劑，能使膽固醇和脂肪顆粒變得極細，乳化成懸浮於血液中的細微粒子，而不沈積於血管壁上，並能順利通過血管壁被細胞利用，從而減少血液中的膽固醇[7]。Clark 等提出食物中的卵磷脂(lecithin, phosphatidylcholine, PC)攝入體內後，會被消化分解成膽鹼(choline)及其他產物，choline 在吸收進入肝臟後可以促進肝臟合成卵磷脂[8]。Liu 等在研究中指出，當膳食含多量膽固醇時，除膽固醇會在肝臟堆積外，同時會促進肝臟三酸甘油酯的合成，使肝臟之膽固醇及三酸甘油酯之含量增加，形成膽固醇性脂肪肝。若膳食中除膽固醇外尚含磷脂質，則因磷脂質又可增強 lecithin-cholesterol acyltransferase(LCAT)之活性，



使 nascent HDL 易形成 mature HDL，HDL 將組織多餘的膽固醇回收回肝臟中代謝，被攜至肝臟之膽固醇在肝臟可能形成膽酸，經腸肝循環排出體外[7]。

三、雞胚(胎)蛋的開發

近年來有研究指出，雞胚胎蛋(又名鳳胚蛋、剛化蛋、探花蛋、雞胚蛋，雛鳳明珠)其營養成份更富於普通雞蛋。胚胎雞蛋是指經過孵化而沒有變成小雞的雞蛋，民間認為雞胚蛋具有補氣之功效，常食用可使面色紅潤，食欲增加，身體強壯，並延緩衰老等[9]。但是，在市場上出售的雞胚蛋大多是用於孵化小雞的雞蛋，是因溫度、濕度不當或感染病菌而發育停止死於蛋殼內的雞胚蛋。相關研究更指出，死胚蛋裏幾乎 100%含有病菌。食用這種不新鮮的死胚蛋，不但營養價值不高，且容易發生中毒，引發痢疾、傷寒、肝炎等疾病[10]。無特定病原 SPF(specific pathogen free)雞，是指生長在屏障系統或隔離器中，體內無特定的致使雞群生病的病原微生物[11]。本實驗為探討 SPF 雞胚蛋對改善動脈粥樣硬化的影響，將以長期餵食實驗動物高膽固醇誘發動脈粥樣硬化模式，透過檢測血管疾病風險評估指標，如總膽固醇(total cholesterol, TC)、三酸甘油酯(triglyceride, TG)、高低密度脂蛋白比值(high and low-density lipoprotein ratio, HDL/LDL ratio)、C-反應蛋白(C-reactive protein, CRP)與組織病理(HE)/免疫化學染色法(TGF- β)分析，探討 SPF 雞胚蛋對於改善或減緩動脈粥樣硬化的作用。

貳、文獻回顧與研究目的

一、文獻回顧

(一)血漿脂質與心血管病變：血漿脂質的種類及特性

血漿脂質 (Plasma lipid) 包括膽固醇 (Cholesterol)、三酸甘油酯 (Triacylglycerol, TG) 亦稱為中性脂肪或磷脂質 (Phospholipids) 及游離脂肪酸 (Free fatty acid) 三種，這些血清脂肪不能直接溶於水，故需與載脂蛋白 (Apolipoprotein) 形成非共價鍵結合形式，成為親水性的脂蛋白，再溶解於血漿，隨血液循環而至身體各器官組織[12]。由肝臟細胞製造的稱為內源膽固醇，還有在食物中含有的稱為外源膽固醇，與心血管病變相關檢驗中，血膽固醇量是最重要的一個項目。

(1)脂蛋白的種類特性及代謝

人類的脂蛋白根據分子結構及密度可分為五種：乳糜微粒 (Chylomicron)、極低密度脂蛋白 (Very low-density lipoprotein, VLDL)、中密度脂蛋白 (Intermediate-density lipoprotein, IDL)、低密度脂蛋白 (Low-density lipoprotein, LDL)、高密度脂蛋白 (High-density lipoprotein, HDL)、及脂蛋白 (a) (Lipoprotein (a))[12]。其中乳糜微粒、LDL 及 VLDL 在血中濃度太高對人體有害，降低 LDL 過氧化則可預防動脈硬化[13]。LDL 含有大量膽固醇，約佔血漿總膽固醇的 60-70%，若清除代謝效率差則使血漿濃度過高，易滲入血管壁內形成動脈粥樣硬化 (Atherosclerosis)[14]。HDL 主要功能是將來自周邊組織的膽固醇輸送回肝臟，及自血管壁帶走滲入的膽固醇，具有清潔血管壁作用[15]。

(2)脂蛋白對血管的影響

LDL 由磷脂單層包膜包圍，中心為膽固醇或膽固醇脂，鑲嵌著脂蛋白 ApoB-100，LDL 脂蛋白受體 (Receptor) 會辨認 LDL 上的 ApoB-100 蛋白並與之結合。動脈硬化發生初期，血管內膜 (Intima) 失去功能使血管通透性改變，導致血液中大分子 LDL 非經由接受器進入細胞，而是藉擴散通過內膜連接進入內膜下層被長期氧化修飾成不溶解性的 oxLDL。oxLDL 會吸引大量巨噬細胞並且被吞噬，使巨噬細胞不易處理 oxLDL 而產生凝集結塊的現象，形成 LDL 堆積。LDL 被氧化修飾的過程會加速泡沫細胞形成並促進發炎反應，加速形成動脈硬化斑[14]。

(二)動脈粥狀硬化的形成

動脈粥樣硬化是一種發炎性血管疾病，形成的機轉十分複雜[14-16]，Ross and Glomset 則提出血管內皮損傷假說，認為這是血管內皮細胞及血管壁平滑肌細胞對傷害性刺激所產生的保護性反應，產生纖維



脂肪化合併發炎反應，最後將在血管內壁形成粥狀瘤腫 (Atheroma)，影響血液流動甚至造成阻塞，最後損傷則造成中型或大型動脈管腔變窄[14]。當病擴大大則形成粥樣腫 (Atheroma) 或粥樣斑塊 (Atheromatous plaque)，此時病灶外圍的內膜和纖維帽可能破裂產生斑塊內出血 (Intraplaque hemorrhage)、表面潰瘍 (Surface ulceration)、管腔內血栓形成 (Intraluminal thrombus formation) 及鈣化 (Calcification) [15,16]。以下為動脈粥樣硬化形成的作用因子：

1. 血管內皮損傷

血管內皮細胞附著分子 (Cellular adhesion molecules, CAMs) 在細胞受到發炎性細胞激素 (Inflammatory cytokines) 如白介素 (Interleukin-1, IL-1)、腫瘤壞死因子 (Tumor necrosis factor, TNF) 及干擾素 (Interferon)等刺激時會大量表現出來[17]，病理研究顯示動脈粥樣硬化斑上的 CAMs 數目較正常動脈多，推論血管內膜損傷和反覆修補形成斑塊及脂肪滲入導致粥樣病變 [18,19]。

2. 血管平滑肌細胞增生

血管平滑肌細胞 (Vascular smooth muscle cells, VSMCs) 增生是動脈粥樣硬化的主要特徵 [20]。平滑肌細胞與血管內皮細胞合成的血小板生長因子 (Platelet-derived growth factor, PDGF)，PDGF 與平滑肌細胞上的 PDGF 受體結合，刺激平滑肌細胞增生，PDGF 使平滑肌細胞增生的能力可用抗 PDGF 抗體所阻斷，證明 PDGF 的確參與誘導平滑肌細胞增生[21,22]。

3. 泡沫細胞滲入血管內膜

高血脂是造成動脈粥樣硬化主要原因，一般認為氧化態 LDL-C (Oxidized LDL-C, oxLDL-C) 被巨噬細胞吞入，形成充滿脂肪的泡沫細胞 (Foam cells)，滲入血管內膜為動脈粥樣硬化的開始。受到泡沫細胞所釋放的物質如 PDGF、fibroblast growth factor-2 (FGF-2) 和 transforming growth factor β (TGF- β)的刺激，構成血管壁中層的平滑肌細胞會往內層遷徙並增生 [23]。HDL-C 在體內有保護心血管系統的效果，附著在 HDL-C 上的對氧磷酯酶 (Paraoxonase, PON)可以水解氧化性低密度脂蛋白 (oxLDL) 上的過氧化磷脂質，能保護 LDL-C 免於被氧化[24-25]。

4. 血小板凝集與血管栓塞

當 LDL 被氧化後破壞血管壁進而發生炎症反應形成粥樣斑塊時，經血流衝擊並導致破裂，血小板與動脈硬化斑塊的粗糙邊緣磨損而釋出凝血物質，再經纖維蛋白原串聯血小板，啟動血液凝固系統形成血栓(Thrombus) 造成栓塞，會引起急性冠狀動脈症候群 (Acute coronary syndrome) 的發作，如心肌梗塞及缺血性中風。活化的血小板並且藉釋放出的發炎性介質，與血管壁平滑肌細胞、血管內皮細胞及巨噬細胞等產生互動，促進動脈粥樣硬化[26]。

5. 免疫系統及發炎作用

在發炎反應過程中，中性白血球可能釋出來自氧的游離基及蛋白水解酶等等物質損傷血管內皮細胞，活化血小板並使血小板凝集正常生理狀況時，心肌細胞、冠狀動脈內皮細胞及心內膜細胞會表現 eNOS 或 nNOS，eNOS 及 nNOS 可調控產生適量的 NO 以調節血管舒張、抑制血小板凝集、氣管的擴張與心肌收縮[28,29]。發炎產生的 NO 使細胞核因子抑制蛋白 I κ B (Inhibitory protein, I kappa B) 脫離 NF κ B (Nuclear factor-kappa B)，則使 NF κ B 具有活性，而轉錄產生的巨噬細胞若吃入過量 LDL 而無適當途徑釋放排除，則在動脈血管內形成硬塊[23, 27]。

(三) 動脈粥狀硬化的指標因子

1. 高敏感度 C-反應蛋白

高敏感度 C-反應蛋白(High sensitivity C-Reactive Protein, hs-CRP)是由肝臟細胞所產生的特殊蛋白，當外傷、局部缺血、發炎或感染時，損傷組織所產生的 hs-CRP 會急速增加[30]。CRP 藉由 interleukin-6 (IL-6) 和 interleukin-1 β (IL-1 β)所調控，hs-CRP 會隨著 interleukin-1 (IL-1)和 tumor necrosis factor- α (TNF- α)的增加而增加[31]。在人體主動脈內皮細胞，hs-CRP 會增加 IL-8 (interleukin-8)的釋放量，使單核白血球 (monocyte)黏著到內皮上[32-33]。hs-CRP 會增加內皮細胞黏著分子細胞內黏附分子-1 (Intracellular



adhesion molecule-1, ICAM-1)、血管細胞黏附分子-1 (Vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)、趨化激素(Chemokine) monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)、內皮白細胞黏附分子-1 (E-selectin) 或稱 E-選凝素, E-selectin 在發炎初期可介導白細胞與內皮細胞結合, 可直接引起動脈硬化[34,35]。Hs-CRP 在動脈硬化 (atherosclerosis)、心血管疾病(cardiovascular events)、心肌梗塞(myocardial infarction)扮演著一個風險性指標, 特別是 hs-CRP 對動脈硬化 (atherosclerosis)是獨立的風險因子[36]。

2. 轉化生長因子

轉化生長因子(transforming growth factor- β , TGF- β)是由多種細胞分泌的一類具有廣泛生物學效應的生長因子, 可以調控多種生理功能如細胞的生長、分化、凋亡、附著、移動和早期的胚胎發育等等, 對心血管系統有多種病理生理作用[37]。TGF- β 是由 2 條含有 112 個氨基酸的多肽鏈單體借助二硫鍵相連組成的分子量為 25 kD 的二聚體。迄今已發現 TGF- β 有 6 種異構體(TGF- β 1~6)[38]。歸納之前的研究而提出 TGF- β 是血液中避免動脈硬化的保護因子[39]如, (1) TGF- β 是抗發炎因子, 而長期的發炎反應是啟動動脈硬化最後階段的關鍵[40]。(2)血漿內含有高 TGF- β 的病患往往不會有心血管動脈硬化的傾向。但另一方面, TGF- β 在如腎臟等組織上會造成組織的纖維化現象, 如 TGF- β 在動脈硬化的很多因子上都有促進的作用, 包括增加基質蛋白質如 collagen、fibronectin 和 proteoglycan, 及抑制蛋白酶分解基質蛋白質的作用等[41]。TGF β 與 oxLDL 均會促使血液循環中的單核球附著於血管壁, 並移行至內皮細胞下空間, 經過活化及分化過程轉化為巨噬細胞(macrophage)。這些巨噬細胞會吞噬堆積在血管內膜(tunica intima)的 oxLDL, 而形成泡沫細胞(foam cell) 這些泡沫細胞的堆積, 會分泌多種細胞素, 更加促使單核球的附著、移行及轉化, 即是動脈硬化的表徵[33]。

二、研究目的

近年來許多學者認為, 吃雞蛋對心血管系統有特殊的保護作用。最新研究發現, 新鮮的雞胚蛋白質含量較高, 其蛋白質中所含氨基酸與必需脂肪酸的含量更接近人類需要, 且脂肪與游離膽固醇含量相較於傳統雞蛋顯著較低。特別是雞胚蛋中的牛磺酸含量比雞蛋增加了 21 倍, 維生素 E 含量比雞蛋增加了 100 倍[9]。鑒於雞蛋或雞胚蛋中的不飽和脂肪酸可以降低膽固醇, 許多營養學家開始推薦用雞蛋來防治動脈粥樣硬化。有鑑於此, 我們相信長期服用無特定病原(Specific-pathogen-free; SPF)雞的胚胎蛋(CEE)將對於動脈粥狀硬化有顯著改善的效果, 日後更可能有助於開發雞胚蛋成為改善心血管機能性食品的新素材。本研究選用自發性高血壓大鼠(spontaneously hypertensive rat; SHR), 透過餵食八週高膽固醇飼料的方式來建立一個動脈粥狀硬化的疾病動物模式。之後採用冷凍乾燥 SPF 雞胚蛋粉末, 觀察餵食八週間, 進行心血管疾病風險評估指標: 總膽固醇(total cholesterol, TC)、三酸甘油酯(triglyceride, TG)、高低密度脂蛋白比值(high and low-density lipoprotein ratio, HDL/LDL ratio)及 C-反應蛋白(C-reactive protein, CRP)。最後, 將大鼠犧牲, 進行主動脈與頸動脈的組織病理切片(H & E stain)和 TGF- β 免疫化學組織染色(IHC)分析。

參、研究方法

一、實驗材料

(一)實驗飼料與試劑

2%高膽固醇飼料、鼠科正常飼料 (Basal diet, Product Code 5755)、含 EDTA 採血管、hs-CRP(hs C-Reactive Protein)抗體、蘇木精(hematoxylin)、伊紅(eosin)、石蠟、福瑪林(Formaldehyde)、二甲苯(xylene)、乙醇(Ethanol)、封片膠、血糖儀、血糖試紙片、注射針頭。

(二)實驗動物

本實驗使用六週齡的雄性自發性高血壓大白鼠(spontaneously hypertensive rats; SHR), 飼養於奇美醫院實驗動物中心。大白鼠分別飼養於不銹鋼籠中, 自由取食及飲水。動物房溫度維持在 $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 相對溼



度 50-70%，以自動定時器控制光照週期，08:00~20:00 為光照期 (light period)，20:00~08:00 為黑暗期 (dark period)。

(三) 雞胚蛋來源：

本實驗所使用的 SPF 雞胚蛋來源均自行政院農業委員會家畜衛生試驗所檢定分所購得，SPF 雞飼養於正壓氣密式雞舍，每三個月實施飼養環境特定病原、雞血清抗體檢測，經公布成績，保持 SPF 之雞群，所生產之雞胚蛋。

(四) 雞胚蛋取得及製作：

1. 取SPF雞受精卵，匯集在13~15度之冷藏庫待其數量足夠。
2. 至於孵化箱孵化，適時篩選成胚卵，分別需孵化250小時。
3. 孵化250小時後，材料蛋在48~52℃溫水中浸泡5~8分鐘，急速加溫至100℃度以上至全熟為止(約13~18分鐘)。全熟後，起鍋浸泡於已備的冷水中，至完全冷卻(冷水為流動式)。
4. 棄殼後，切成小塊狀(約1~1.5公分)，進行冷凍乾燥後研成粉末。

二、實驗動物模式

(一) 粥狀動脈硬化大鼠動物模式：

本研究選用實驗動物為 6 週齡 SHR 雄性大鼠，實驗動物進入動物中心後先以正常飼料 (Basal diet, Product Code 5755) 餵食二週以適應環境，並隨機分為 3 組，每組 6 隻，組別分述如下：

1. 8週雄性SHR組+正常飼料—給予正常飼料並任其自由取食及飲水，共餵食16週。
2. 8週雄性SHR組+2%高膽固醇飼料—給予2%高膽固醇飼料並任其自由取食及飲水，共餵食16週。
3. 8週雄性SHR組+ 2%高膽固醇飼料+雞胚蛋粉末(CEE)—給予內含2%高膽固醇之飼料8 週後，再連續口服投予雞胚蛋(100mg/kg/day)粉末8週

(二) 實驗測量時間與相關分析方法：

每週測量及紀錄大鼠的體重，實驗期間依照各實驗測量需求時間點採取血液進行相關生化值分析及血清蛋白質分析(hs-CRP)，並於各設計時間點犧牲大鼠，取下主動脈與頸動脈血管段進行 HE 染色及 TGF-β 免疫化學組織染色(IHC)分析。

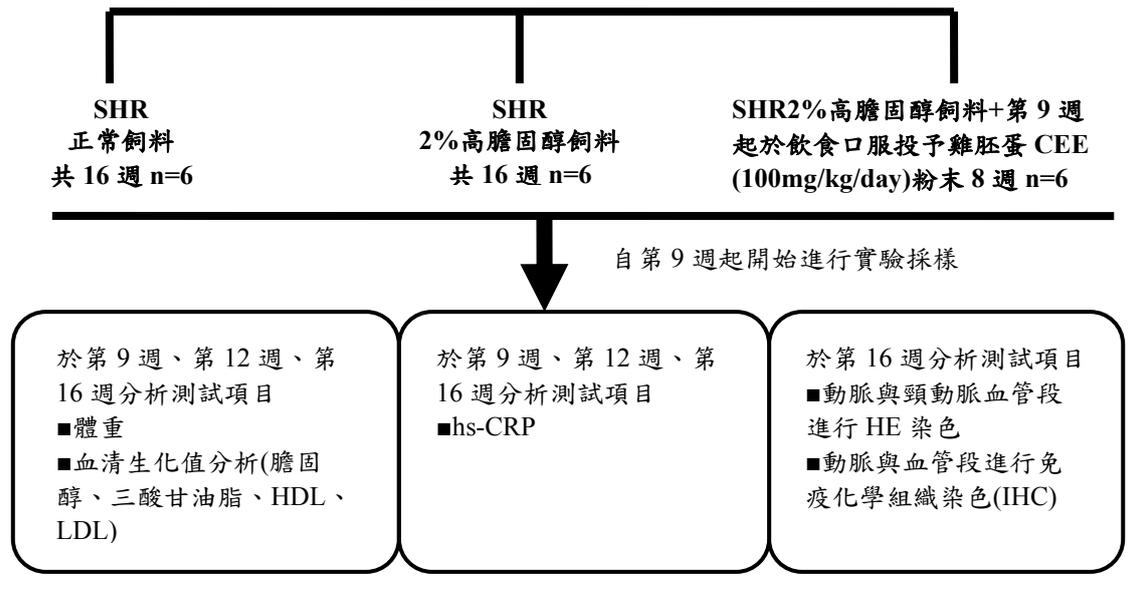


圖 1 實驗架構圖



1. 血液生化值測試

將上述 3 組實驗動物，採血進行相關生化值檢測。動物如不麻醉則需以保定器保定。將尾巴置於 40℃ 溫水中或以加熱燈照射 5 至 10 分鐘，使尾巴血管擴張。以 23 或 21G 的針頭由尾巴左右兩側之尾靜脈或腹側的尾動脈抽血，或僅以 21G 的蝴蝶針頭插入尾動脈中，確認有血液流出後再以採血管承接。採取約 0.5 ml 全血，經 5000 rpm 10 分鐘離心後，取 0.2 ml 血清以進行生化值實驗，血液生化值 (總膽固醇 TC、三酸甘油酯 TG、高密度脂蛋白 HDL 和低密度脂蛋白 LDL) 是由 Hitachi model 7600 automatic analyzer 以比色法原理測得。

2. 以酵素免疫分析法(ELISA)測試血液中相關蛋白

酵素免疫分析法(ELISA)為利用抗體的專一性去偵測抗原量的多寡，並以酵素為放大信息的標示，因此有相當高的靈敏度；因為使用固相擔體，故操作較為方便，同時可處理大量樣本。依設計時間點將上述五組實驗動物，採血進行相關生化值檢測。動物如不麻醉則需以保定器保定。將尾巴置於 40℃ 溫水中或以加熱燈照射 5 至 10 分鐘，使尾巴血管擴張，以 23 或 21G 的針頭由尾巴左右兩側之尾靜脈或腹側的尾動脈抽血，或僅以 21G 的蝴蝶針頭插入尾動脈中，確認有血液流出後再以採血管承接。採取約 0.5 ml 全血，經 5000 rpm 10 分鐘離心後，取 0.2 ml 血清以進行相關實驗。相關血清蛋白質(包含 hs-CRP)的測定採用 ELISA 的方法檢測，使用市售 kit，於每一測量槽中加入 25 μ l 的血清及標準品，50 μ l 結合溶液 (Conjugate solution) 於室溫中振盪培養 2 小時，之後每次以緩衝液沖洗 5 次，再加入 200 μ l Peroxidase substrate(TMB)室溫中培養 15 分鐘，加入 50 μ l 終止溶液 stop solution (1M H₂SO₄)終止反應振盪培養 5 秒，於波長 450 nm 的分光光度計中讀出吸光度，由吸光度與標準品的濃度曲線中計算濃度。

3. 主動脈與頸動脈 HE 染色

將上述 3 組實驗動物犧牲，犧牲前予以禁食隔夜 (16 小時)，當天用 CO₂ 將動物窒息，秤取動物體重，並迅速取出主動脈及頸動脈分別裝入已滅菌的 1.5 mL 離心管內，稱重後立即投入液態氮中，保存於 -70℃，供日後組織切片染色用。並取其主動脈及頸動脈血管段，以 HE 染色法辨別組織變化情形。將樣本以 10% 中性福馬林固定後，置於系列遞增的酒精中脫水，接著將酒精置換成二甲苯，最後以石臘浸潤包埋。石臘包埋後的樣本以滑動式切片機，每片 5 微米之厚度進行切片，之後將切片置於溫水浴中展平，並載於玻片上。將玻片置於 40℃ 烤盤過夜，幫助切片與玻片之黏著。之後再將含切片之玻片置於二甲苯與酒精中漸漸置換為水，進行脫臘的步驟，將脫臘後的標本置於蘇木紫染色液，染細胞核與胞質內嗜鹼性物質，染色 1~3 分鐘，取出切片以自來水緩緩沖洗 15 分鐘後，再將切片置於伊紅染色液，將細胞質基質與間質內膠原纖維染色，染色時間 5 秒，再經過不同濃度的酒精脫水，退染色，最後浸入 100% 酒精及二甲苯內澄清切片，即可以阿拉伯膠樹脂封片。

4. 免疫組織化學染色法 (Immunohistochemical Staging)

將蠟塊包埋(含主動脈及頸動脈)切片從 4℃ 冰箱取出之後置於室溫 10~20 分鐘回溫後，浸泡 xylene 5 分鐘兩次，接著以 EtOH 以 100%、95%、80%、70%、50% 依序遞減浸泡 5 分鐘，將樣本放入 antigen retrieval buffer (1 mM EDTA-NaOH, pH8; 配置 500 mM EDTA stock 中(調整 pH8.0 才能溶解)，燒杯口用保鮮膜封上 (防止水分蒸發)。95℃ 水浴槽加熱 90 分，再緩慢降至室溫 40 分鐘。倒出 antigen retrieval buffer，並用 1X 的 PBS 浸泡 5 分鐘。PBS wash, 5 分鐘兩次。將樣本泡入 3% 的 H₂O₂ 中 30 分鐘(常溫)，抑制內生性 peroxidase。再以 PBS 潤洗 5 分鐘兩次。將玻片平放，先以拭鏡紙將組織旁水珠擦乾，在以 PAP pen 將組織周圍圍起，滴上 fetal bovine serum 配置的 normal serum blocking solution 200 μ l/slide，置於濕潤盒中，1 小時將 blocking solution 吸去，加入 monoclonal Anti-mouse TGF- β ，於 4℃ 放置 12~16 小時。再以 PBS 潤洗 5 分鐘兩次後加入 Biotin-labeled secondary antibody (HRP conjugate)，置於濕潤盒中，靜置一小時後以 PBS 潤洗 5 分鐘兩次。將 DAB solution 適量滴於組織上進行呈色直到呈淡紅色後，放入二次水中中和，之後使用稀釋三倍之 hematoxylin 靜置一分鐘進行染核後再於二次水中浸泡 10 分鐘，於顯微鏡下進行觀察之後拍照，以顯微影像分析軟體 Image J (v1.46g) 進行各組主/頸動脈上 TGF- β 蛋白(brown labeled-cells)在 400X 視野內的量化統計。



5.數據統計及分析

本計畫所有數據使用 SigmaPlot 10.0 來進行數據處理、分析及繪圖。IHC 以 Image J (v1.46g)軟體進行各組主／頸動脈上 TGF- β 蛋白(brown labeled-cells)的顯微影像分析與量化統計。實驗結果數據統計之表示方式為平均值 \pm 標準誤差(mean \pm S.E.)。而樣本差異性使用 ANOVA 加上事後檢定(Scheffe 法)，計算出 P 值，*為 P 值小於 0.05，**為 P 值小於 0.005，***為 P 值小於 0.001，其統計意義為以控制組與各組作為對比；#為 P 值小於 0.05，##為 P 值小於 0.005，###為 P 值小於 0.001，其統計意義為以高膽固醇組與高膽固醇合併雞胚蛋組作為對比。P 值小於 0.05 時起即表示兩樣本在統計學上具有明顯差異。

肆、實驗結果討論

動脈硬化(arteriosclerosis)是指一組以動脈壁增厚、變硬和彈性減退為特徵的動脈硬化性疾病，其中動脈粥樣硬化(atherosclerosis, AS)是最常見的和最具有危害性的疾病。AS 是一種與血脂異常及血管壁成分改變有關的動脈疾病，動脈的內膜有類脂質的沉著，複合糖類的積聚，繼而纖維組織增生和鈣沉著，逐步發展形成動脈粥樣硬化性斑塊。粥狀硬化肇於血管壁的內皮細胞損傷，內皮細胞損傷會引起發炎反應產生並會開始表現黏著分子，循環中的白血球因黏著分子的牽引而靠近受損傷的內皮細胞部位，在黏著分子的幫助下較易穿透障壁進入血管壁間質[33]。當進入的單核球轉變為巨噬細胞時，已代表動脈硬化開始發生。巨噬細胞的表面會出現清除接受體(scavenger receptor)，此受體會促使巨噬細胞吞噬經修飾的低密度脂蛋白，這樣的過程使得巨噬細胞逐漸成為富含脂質的脂泡細胞。當癥塊內的發炎反應持續性地增強，巨噬細胞不斷地分泌蛋白分解酶，如：基質金屬蛋白分解酶(matrix metalloproteinases, MMPs)，這些蛋白分解酶會使得癥塊上的纖維帽軟化，因此癥塊就容易因血流衝激而破裂，最終將導致血栓的形成與心肌梗塞[42]。

雞胚蛋就是經過受精的雞蛋並且已經孵化到一定的程度，一般認為具有補氣，身體強壯，延緩衰老等功效。新鮮的雞胚蛋蛋白質含量較高，其蛋白質中所含氨基酸與必需脂肪酸的含量更接近人類需要，且脂肪與游離膽固醇含量相較於傳統雞蛋顯著較低。特別是雞胚在發育後期從蛋殼中吸收了部分鈣、磷、鐵等，可提供營養價值極高的無機鹽來源。相關研究已指出，雞胚蛋中的牛磺酸含量比雞蛋增加了 21 倍，維生素 E 含量比雞蛋增加了 100 倍[9]。然而，市場上出售的雞胚蛋大多是用於孵化小雞的雞蛋，是因溫度、濕度不當或感染病菌(沙門氏細菌和黴菌)而發育停止死於蛋殼內的雞胚蛋。這種死胚蛋中原來含有的蛋白質、脂肪、糖類、無機鹽及維生素等營養成分已全部或部分發生變化，絕大部分已被胚胎利用和消耗，所剩營養成分甚微。食用這種不新鮮的死胚蛋不但營養價值不高，且容易發生中毒，常會出現噁心、嘔吐，引發痢疾、傷寒、肝炎等疾病[5]。死雞胚蛋中還含有類固醇樣物質，會促使老人血壓增高，其激素成分會導致兒童的性早熟[9]。本研究 SPF(無特定病原 specific pathogen free, SPF)雞胚胎蛋，採購自家畜衛生試驗所動物用藥品檢定分所(ISO9001:2000 品管認證)所生產的 SPF 雞種(HYE 與 Hy-Line 等)，經 14 項疾病(如新城雞瘟、雞白血病、禽流感等)監測後，所得到的已受精且胚胎發育正常之 11 日齡之雞蛋(如圖 2)。



(a)孵化箱孵化250小時後的破殼後外觀 (b)加熱煮6小時至全熟後冷卻棄殼，切成1~1.5公分小塊狀

圖2 SPF雞受精卵(蛋)



目前已知動脈粥狀硬化的形成是由於動脈內脂肪堆積而產生癥塊沉積(plaque deposition)，當脂肪沉積在動脈管壁內側後，因動脈內皮細胞被刺激，歷經一連串發炎、增厚、變硬，最終逐漸阻塞動脈。一般大眾普遍認為高膽固醇(hypercholesterolemia)是造成動脈粥狀化的主要原因，約有 50%心臟病發作的病人其膽固醇數值是上升[43]。研究成果(圖 3)顯示，SHR 大鼠連續餵食 2%高膽固醇飼料 16 週後，血中總膽固醇(total cholesterol, TC)顯著增加($P<0.01$)，但三酸甘油酯(triglyceride, TG)並沒有明顯改變($P>0.05$)。高膽固醇飼料合併 SPF 雞胚蛋(CEE)連續 8 週可顯著抑制 TC 的含量($\#P<0.05$)，也不造成 TG 的含量的變化。相關研究也證實，雞胚蛋相較於雞蛋對增加動物體內血清甘油三酯是較不顯著[5]。先前的相關研究也指出，低密度脂蛋白含大量膽固醇 (佔血漿總膽固醇的 60-70 %)，具有趨動脈粥狀硬化特質，較容易穿透進入血管壁內。當其中脂質被氧化形成 oxLDL，而被穿透進入血管壁下方的巨噬細胞 (macrophages) 所吞食，形成泡沫細胞 (foam cells)，再經一連串變化而形成動脈粥狀硬化，因此目前認為 LDL 的氧化修飾是引發初期動脈粥狀硬化病變的最主要導因[14]。而高密度脂蛋白含較多量的磷脂質(約 30%)與較少量的膽固醇 (佔血漿總膽固醇的 20-30 %)從肝臟和小腸釋出進入血液循環後，從周邊組織移走多餘的膽固醇，因此具有可減少膽固醇在血管壁沈積的作用。我們的研究結果(圖 4)也發現，SHR 大鼠連續餵食 2%高膽固醇飼料 16 週後，血中血脂蛋白 HDL/LDL 比值顯著下降($P<0.005$)，當高膽固醇飼料合併 SPF 雞胚蛋(CEE)連續 8 週可明顯提高 HDL/LDL 比值($\#P<0.05$)。值得一提的是，血管內皮細胞的缺失(endothelial dysfunction)亦是導致動脈粥狀硬化的主要原因。越來越多的證據顯示，長期性的動脈內皮細胞損傷會導致發炎反應的發生，逐漸演變為癥塊形成、癥塊破裂、血栓現象，最後使患者發生心肌梗塞的徵狀[26]。因此，動脈內皮細胞損傷被認為是影響動脈粥狀化的重要因數。特別是低密度脂蛋白(LDL) 氧化後具有細胞毒性，會啟動血管內皮的發炎反應，因而吸引循環單核球細胞至發炎處，並穿過內皮細胞至血管內層內。單核球在此受刺激分化成巨噬細胞，而巨噬細胞會吞噬氧化的 LDL 並形成泡沫細胞，泡沫細胞死亡時釋出脂質，產生所謂的脂質核心。此時，脂質核心會接觸到血液，引發血液凝固而形成血栓或血塊，進一步造成動脈部份或完全阻塞。動脈狹窄、缺乏靈活性，會使得血液難以流動，因而形成動脈粥狀硬化斑塊。故血漿高密度脂蛋白膽固醇 (HDL-C) 或 HDL-C/LDL-C 的比率，則是導致動脈粥狀硬化疾病的負相關危險因數[23]。

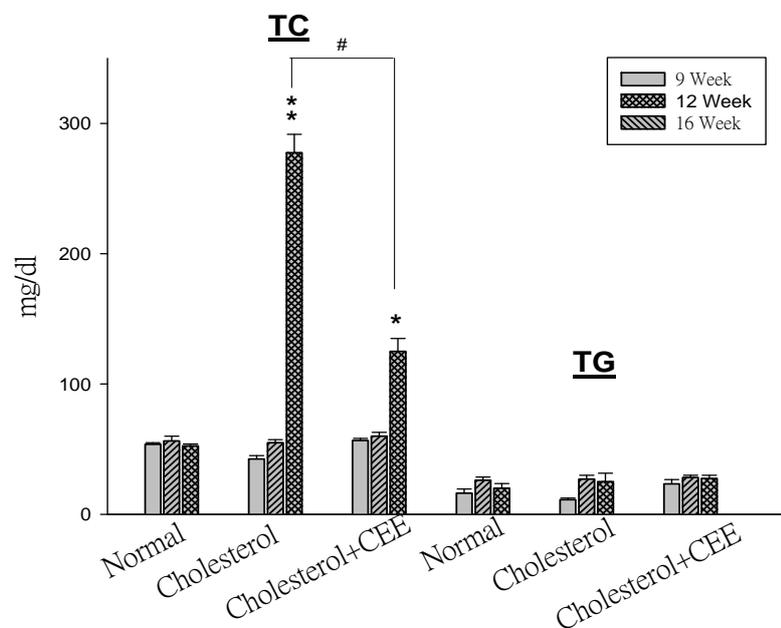


圖 3 血中總膽固醇(TC)&三酸甘油脂(TG)的變化



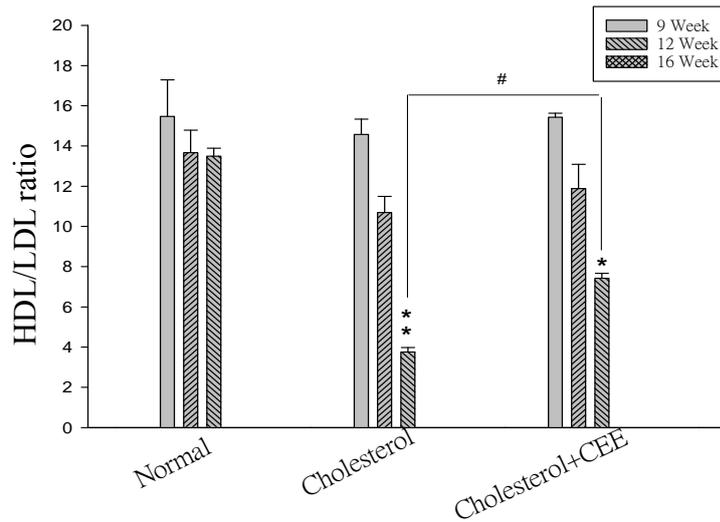


圖 4 血中血脂蛋白(HDL/LDL)的變化

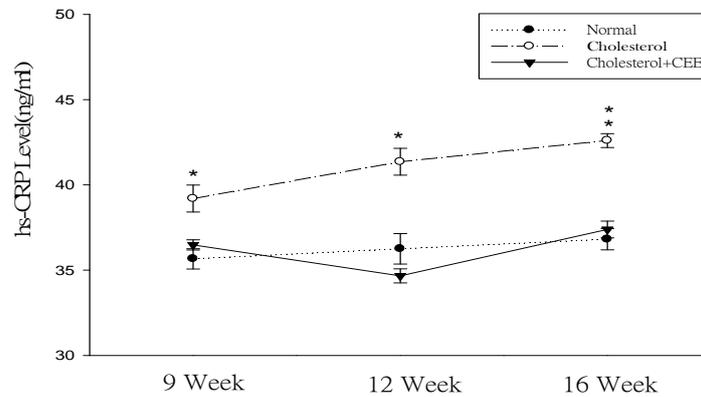


圖 5 血中 C-反應蛋白(hs-CRP)的變化

動脈硬化被認定是一種膽固醇堆積在血管壁的慢性發炎疾病，然而在急性時期反應(acute phase response)的生化途徑中，高敏感 C-反應蛋白(hs-CRP)是血漿中的一種 C 反應蛋白，為一種敏感非特異性炎症標誌物[36]。以往認為 hs-CRP 是經由發炎性細胞激素(如 IL-6)刺激在肝臟製造出來的，但近年來研究顯示其他組織，包括血管動脈硬化病灶內、平滑肌細胞、內皮細胞及脂肪細胞都會產生 hs-CRP。近年來已有很多流行病學臨床試驗證實 CRP 是診斷或預測動脈硬化和 CVD 的獨立因數，其預估能力甚至比包括 LDL-C 在內的傳統危險因數還重要[36]。根據許多動物和人體細胞研究，CRP 存在動脈硬化斑塊內，與氧化 LDL 結合，促進補體增加及單核細胞進入，使病灶進展。CRP 同時可以加強血管內皮粘附因數 VCAM-1，細胞間粘附因數 ICAM-1，單核細胞趨化蛋白 MCP-1 等功能，減少一氧化氮合成，使內皮素和內皮細胞、平滑肌細胞之細胞激素(cytokines)分泌增加，並活化凝血系統(如血漿蛋白原活化抑制劑(plasminogen activator inhibitor-1)，促進動脈粥狀硬化的形成[34,35]。本研究結果顯示，SHR 大鼠連續餵食 2%高膽固醇飼料 9(P<0.05), 12(P<0.05) 與 16 週(P<0.005)後，血中 hs-CRP 顯著提高，當高膽固醇飼料合併 SPF 雞胚蛋(CEE)連續 1(P>0.05), 4(P>0.05) 與 8 週(P>0.05)，可明顯降低 hs-CRP 的含量，甚至與對照組(正常飼料)的 hs-CRP 表現量接近(圖 5)。近年來已有研究指出，hs-CRP 的表現與冠狀動脈硬化病變程度有密切相關性，病理學研究證實，hs-CRP 在斑塊中沉積，隨著斑塊增大，沉積增多，在炎症細胞浸潤區域特別是壞死斑塊邊緣，hs-CRP 反應強烈[44]。特別是一些研究更顯示，hs-CRP 與頸動脈內膜中層厚度明顯相關，早期 hs-CRP 的顯著增高將造成日後治療上的困難度與復發率。臨床研究亦發現，儘管膽

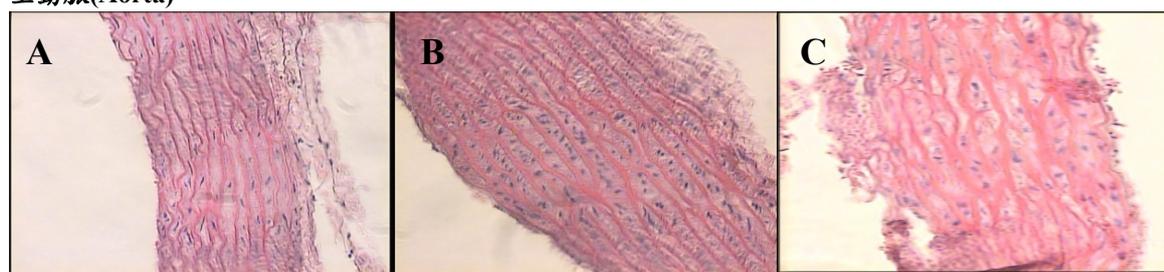


固醇與低密度脂蛋白數值正常，若高敏感 C 反應蛋白(hs-CRP)數值偏高，還是可能造成血管壁發炎，造成粥狀動脈硬化的風險性增加[45]。

當動脈粥狀硬化達到某種程度，會影響血管內腔的血流順暢，上自腹部下至雙腳就可能出現生理血液循環不良的症狀。如果粥狀硬化的斑塊(plaques)發生破裂，血液中的血小板會被激發(activated)，相互間大量聚集並附著於血管壁內皮層損傷部位而形成血栓(thrombus)，阻斷血流，此時稱為粥狀動脈栓塞症(Atherothrombosis)，臨床上會造成腦中風、意識昏迷、失明、耳聾、心肌梗塞、跛腳、下肢壞疽，甚至猝死[14]。本實驗H E染色與病理檢查結果顯示，SHR大鼠連續餵食2%高膽固醇飼料16週後，相較於對照組(圖6A與D)，大鼠主動脈(Aorta)與頸動脈(Carotid artery)皆呈現管徑增厚與管壁增生的情形(圖6B與E)。當高膽固醇飼料合併SPF雞胚蛋(CEE)連續8週後，則可明顯減少主動脈與頸動脈的管徑厚度與管壁內斑塊堆積等現象(圖6C與F)。當動脈粥狀硬化的初期因當血管壁受到oxLDL等因子刺激而受損時，血管內皮通透性會增加，造成大分子物質容易通過，在血管壁堆積。此時，血管壁所分泌的多種趨化因子如MCP-1(monocyte chemoattractant protein-1)、CSFs(colony-stimulating factors)和TGF β (transforming growth factor β)等與oxLDL均會促使血液循環中的單核球附著於血管壁，並移行至內皮細胞下空間，經過活化及分化過程轉化為巨噬細胞(macrophage)。這些巨噬細胞會吞噬堆積在血管內膜(tunica intima)的oxLDL，而形成泡沫細胞(foam cell)[37]。LDL-c過多而滲透到動脈內膜中，而動脈內膜會被刺激產生MCP-1，MCP-1與VCAM結合，使之吸引單核球到LDL-c聚積的地方，此時內膜產生IL-1和TGF- α 加劇發炎及促使內膜中產生MCP-1和VCAM，更多的單核球(IL-1等細胞素會促使單核球的附著及分化成巨噬細胞)被吸引至動脈內層使內層組織被破壞，即是動脈硬化的表徵[37]。

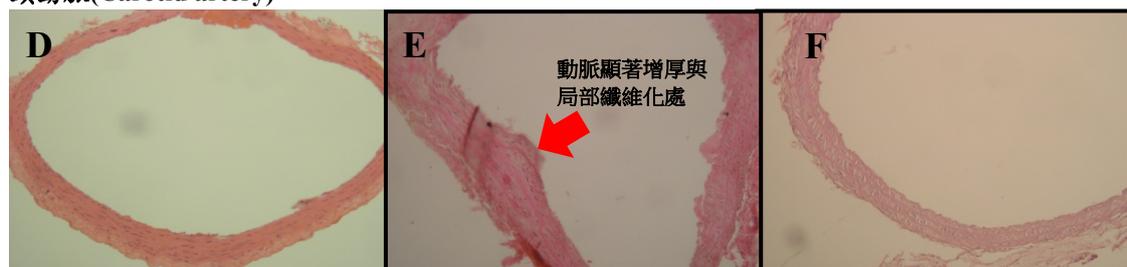
透過免疫組織化學染色(IHC)與影像分析系統偵測，我們的結果顯示連續餵食2%高膽固醇飼料16週，相較於對照組(正常飼料)，大鼠主/頸動脈上的轉化生長因子(TGF- β)的表現量皆明顯增加(圖7A與C)。當高膽固醇飼料合併SPF雞胚蛋(CEE)連續8週後，可發現頸動脈上的TGF- β 的表現量(褐色斑塊)顯著受抑制($P < 0.005$) (圖7D)，但主動脈上的TGF- β 並沒有明顯減少(圖7B)。先前已有研究報導指出，在高脂血症的情況下，血清中的TGF- β (TGF- β 1、 β 2、 β 3)雖然提高許多，但終究不引起大鼠動脈粥樣斑的形成。而實驗家兔組僅6週時間則100%的動物的主動脈血管和心內血管形成了明顯的粥樣斑，且兔血清中的TGF- β s濃度並不比實驗組大鼠來的高[46]。根據前人等研究發現，對食物誘導的動脈粥樣硬化早期病變的敏感性，是由於它們氧化修飾低密度脂蛋白(oxLDL)形成的差異，而HDL能防止LDL的氧化修飾。

主動脈(Aorta)



(a)空白對照組(Normal)-主動脈(X300) (b)誘導組(Cholesterol)-主動脈(X300) (c)改善組(Cholesterol + CEE)-主動脈(X300)

頸動脈(Carotid artery)



(d)空白對照組(Normal)-頸動脈(X100) (e)誘導組(Cholesterol)-頸動脈(X100) (f)改善組(Cholesterol + CEE)-頸動脈(X100)

圖6 大鼠主動脈/頸動脈的HE染色與病理檢查

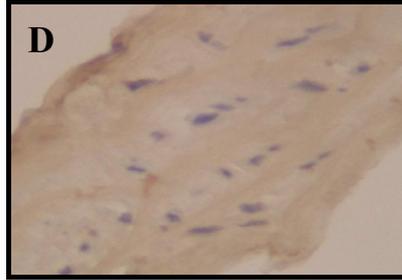
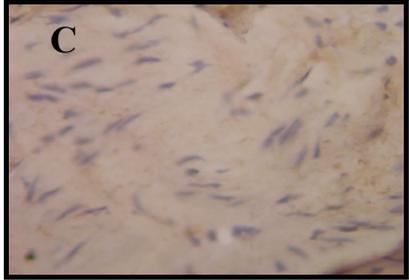


主動脈(Aorta)

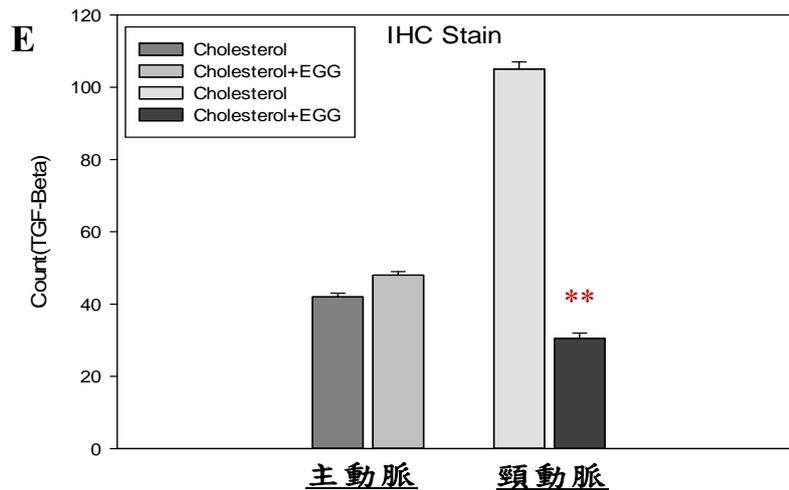


(a)誘導組(Cholesterol)-主動脈(X600) (b)改善組(Cholesterol + CEE) -主動脈(X600)

頸動脈 (Carotid artery)



(c)誘導組(Cholesterol)-頸動脈(X600) (d)改善組(Cholesterol + CEE)-頸動脈(X600)



(e)以 Image J (v1.46g)軟體進行各組主/頸動脈上 TGF-β 蛋白(brown labeled-cells)的顯微影像分析與量化統計

圖 7 大鼠主/頸動脈上的轉化生長因子(TGF-β)的表現

透過免疫組織化學染色(IHC)與影像分析系統偵測,我們的結果顯示連續餵食 2%高膽固醇飼料 16 週,相較於對照組(正常飼料),大鼠主/頸動脈上的轉化生長因子(TGF-β)的表現量皆明顯增加(圖 7A 與 C)。當高膽固醇飼料合併 SPF 雞胚蛋(CEE)連續 8 週後,可發現頸動脈上的 TGF-β 的表現量(褐色斑塊)顯著受抑制($P < 0.005$) (圖 7D),但主動脈上的 TGF-β 並沒有明顯減少(圖 7B)。先前已有研究報導指出,在高脂血症的情況下,血清中的 TGF-β (TGF-β1、β2、β3)雖然提高許多,但終究不引起大鼠動脈粥樣斑的形成。而實驗家兔組僅 6 週時間則 100%的動物的主動脈血管和心內血管形成了明顯的粥樣斑,且兔血清中的 TGF-βs 濃度並不比實驗組大鼠來的高[46]。根據前人等研究發現,對食物誘導的動脈粥樣硬化早期病變的敏感性,是由於它們氧化修飾低密度脂蛋白(oxLDL)形成的差異,而 HDL 能防止 LDL 的氧化修飾。大鼠隨著餵養高膽固醇時間的延長其血中的 HDL 也隨著增高,這可能與其不易發生動脈粥樣硬化早期病變有關。但是家兔血 HDL 並不隨血總膽固醇的升高而增高或增加不明顯,因此其血管內皮細胞極易受到



oxLDL 的損害而形成動脈硬化的早期病變[46]。雖然本次實驗我們特別選用了 SHR 大鼠而不採用上述實驗的 SD 大鼠或 Wister 大鼠，因此我們仍能發現大鼠主動脈(Aorta)與頸動脈(Carotid artery)皆呈現管徑增厚與管壁增生的情形，且發現了主/頸動脈上，特別是頸動脈上的 TGF- β 增加最為顯著。我們的研究結果中發現，高膽固醇對頸動脈所造成 TGF- β 的大量表現，可能在血管內皮細胞損傷後的炎症增生反應過程中發生。在炎症性纖維化的發生過程中，在蛋白裂解酶的作用下，存在于正常細胞中的無活性 TGF- β 轉變為有活性 TGF- β ，並隨病變的進展而增加。這些活化的 TGF- β 能趨化單核細胞、促進成纖維細胞的增生、移動和合成膠原及纖維粘連蛋白，後者又能抑制膠原的降解，對纖維化的發生發展起關鍵的作用[36]。這部分我們也可從 H E 染色與病理檢查結果證實，連續餵食 2%高膽固醇飼料 16 週後大鼠頸動脈相較於主動脈，更亦於受到 oxLDL 的傷害，而呈現出更顯著的局部斑塊擴增現象。

伍、結論

本研究選用自發性高血壓 SHR 大鼠，乃希望透過餵食八週高膽固醇飼料的方式來建立一個動脈粥狀硬化的疾病動物模式與心血管疾病風險評估指標。實驗結果顯示，餵食已產生誘發性粥狀動脈硬化大鼠 SPF 雞胚蛋(CEE)組八週後，可顯著降低血中三酸甘油酯(triglyceride, TG)的濃度、提高高/低密度脂蛋白比值(HDL/LDL Ratio)。特別是在投予 SPF 雞胚蛋(CEE) 1, 4 與 8 週後，各時間點血中的高敏感度 C-反應蛋白(high sensitive C-reactive protein, hs-CRP)都呈現顯著下降趨勢。組織病理 HE 染色檢查指出，投予 SPF 雞胚蛋(CEE) 8 週後有明顯改善大鼠主動脈管壁增生與頸動脈的局部纖維化等病理徵狀。免疫組織化學染色(IHC)分析進一步顯示，SPF 雞胚蛋(CEE)組顯著降低大鼠頸動脈的轉化生長因數(transforming growth factor- β , TGF- β)的蛋白質表現。

致謝

本論文的完成要由衷感謝行政院國家科學委員會補助大專學生參與專題研究計畫(NSC 98-2815-C-218-060-B)的經費補助。

參考文獻

- [1] U. Goldbourt, S. Yaari, & J. H. Medalie. (1997). Isolated Low HDL Cholesterol As a Risk Factor for Coronary Heart Disease Mortality, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 17(1), 107-113.
- [2] M. L. Slaterry, D.R. Jacobs, Jr., & M.Z. Nichaman. (1989). Leisure time physical activity and coronary heart disease death, The US Railroad Study, *Circulation*, 79(2), 304-311.
- [3] D. Miura, Y. Miura, & K. Yagasaki. (2003). Hypolipidemic action of dietary resveratrol, a phytoalexin in grapes and red wine, in hepatoma-bearing rats, *Life Sci*, 73(11), 1393-1400.
- [4] S. M. Grundy, & M.A. Denke. (1990). Dietary influences on serum lipids and lipoproteins, *J. Lipid Res.*, 31(7), 1149-1172.
- [5] E. M. Cruickshank. (1934). Studies in fat metabolism in the fowl: The composition of the egg fat and depot fat of the fowl as affected by the ingestion of large amounts of different fats, *Biochem J*, 28(3), 965-977.
- [6] S. Dayton, L. M. Pearce, S. Hashimoto, J. W. Dixon, & U. Tomiyasu. (1969). A Controlled Clinical Trial of a Diet High in Unsaturated Fat in Preventing Complications of Atherosclerosis, *Circulation*. 40:II-1
- [7] C. H. Liu, M.T. Huang, & P.C. Huang. (1995). Sources of triacylglycerol accumulation in livers of rats fed a cholesterol-supplemented diet, *Lipids*, 30(6), 527-531.
- [8] S. B. Clark, V. E. Clark, & D. M. Small. (1981). Effects of lecithin ingestion on plasma and lymph lipoproteins of normo- and hyperlipemic rats, *Am J Physiol*, 241(5), G422-430.



- [9] 高彥祥(1986)。雞胚蛋營養效價的研究。天津科技大學學報, 1986年2期。
- [10] C. C. Dauer. (1961). 1960 summary of disease outbreaks and a 10-year resume, *Public Health Rep. October* 70(10), 915-922
- [11] 許迪, 孔利佳與彭佳林(2008)。SPF 動物的使用管理探討, *中華臨床醫學雜誌*, 9(2), 6-7。
- [12] C. Sandholzer, E. Boerwinkle, N. Saha, M. C. Tong, & G. Utermann. (1992). Apolipoprotein(a) phenotypes, Lp(a) concentration and plasma lipid levels in relation to coronary heart disease in a Chinese population: evidence for the role of the apo(a) gene in coronary heart disease, *J Clin invest*, 89(3), 1040-1046.
- [13] S. Cernea, N. Hancu, & I. Raz. (2003). Diet and coronary heart disease in diabetes, *Acta Diabetologica*, 40(2), S389-400.
- [14] H. C. Stary, et al. (1995). A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, *American Heart Association. Circulation*, 92(5), 1355-1374.
- [15] N. T. Mulvihill, & J. B. Foley. (2002). Inflammation in acute coronary syndromes. *Heart*, 87(3), 201-204.
- [16] R. Ross. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s, *Nature*, 362(6423), 801-809.
- [17] T. A. Springer. (1990). Adhesion receptors of the immune system, *Nature*, 346(6283), 425-434.
- [18] M. I. Cybulsky, & M. A. Gimbrone, Jr. (1991). Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis, *Science*, 251(4995), 788-791.
- [19] R. Ross, (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease, *N Engl J Med*, 340(2), 115-126.
- [20] R. Ross, & J.A. Glomset, (1976). The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts), *N Engl J Med*, 295(8), 420-425.
- [21] M. Braun, et al. (1995). Modulation of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 on human coronary smooth muscle cells by cytokines, *J Mol Cell Cardiol*, 27(12), 2571-2579.
- [22] B. A. Khaw, et al. (1996). Radionuclide imaging of the synthetic smooth muscle cell phenotype in experimental atherosclerotic lesions, *Trends Cardiovasc Med*, 6(7), 226-232.
- [23] D. Steinberg, et al. (1989). Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity, *N Engl J Med*, 320(14), 915-24.
- [24] A. R. Tall. (1990). Plasma high density lipoproteins. Metabolism and relationship to atherogenesis, *J Clin Invest*, 86(2), 379-384.
- [25] M. I. Mackness, B. Mackness, & P. N. Durrington. (2002). Paraoxonase and coronary heart disease, *Atheroscler Suppl*, 3(4), 49-55.
- [26] R. Ross. (1995). Cell biology of atherosclerosis, *Annu Rev Physiol*, 57, 791-804.
- [27] A. Santos-Silva, et al. (1995). Altered erythrocyte membrane band 3 profile as a marker in patients at risk for cardiovascular disease, *Atherosclerosis*, 116(2), 199-209.
- [28] Y. Wang, et al., (2002). Ischemic preconditioning upregulates inducible nitric oxide synthase in cardiac myocyte, *J Mol Cell Cardiol*, 34(1), 5-15.
- [29] Y. Agmon, B. K. Khandheria, A. J. Tajik, J. B. Seward, J. D. Sicks, & A. J. Fought, et. al, (2004). Inflammation, infection, and aortic valve sclerosis: Insights from the Olmsted County (Minnesota) population, *Atherosclerosis*, 174(2), 337-342.
- [30] J. R. Gamble, Y. Khew-Goodall, & M. A. Vadas. (1993). Transforming growth factor- β inhibits E-selectin expression on human endothelial cells, *J. Immunol.* 150, 4494-4503.



- [31] Z. Mallat, A. Gojova, C. Marchiol-Fournigault, B. Esposito, C. Kamate, R. Merval, D. Fradelizi, & A. Tedgui. (2001). Inhibition of transforming growth factor- β signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice, *Circ. Res.*, 89, 930-934.
- [32] M. M. Hull, I. Ormsby, A. B. Kier, S. Pawlowski, R. J. Diebold, M. Yin, R. Allen, et al. (1992). Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 2 gene results in multifocal inflammatory disease, *Nature*, 359, 693-699.
- [33] M. P. Vallety, et al., (2002). Endothelial expression of intercellular adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1 is suppressed by postbypass plasma containing increased soluble intercellular adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1, *J Thorac Cardiovasc Surg*, 124(4), 758-767.
- [34] M. J. Davies, J. L. Gordon, A. J. Gearing, R. Pigott, N. Woolf, D. Katz, A. Kyriakopoulos, (1993). The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis, *J Pathol.*, Nov 171(3), 223-229.
- [35] L. M. Biasucci, et al., (2000). Inflammation and acute coronary syndromes, *Herz*, 25(2), 108-112.
- [36] C. Zhu, D. Ying, D. Zhou, J. Mi, W. Zhang, Q. Chang, L. Li. (2005). Expression of TGF- β 1 in smooth muscle cells regulates endothelial progenitor cells migration and differentiation, *J Surg Res.*, 125(2), 151-156.
- [37] F. Verrecchia & A. Mauviel. (2007) Transforming growth factor-beta and fibrosis, *World J Gastroenterol*. 107, 3056-3062
- [38] J. C. Metcalfe, D. J. Grainger. (1995). Transforming growth factor- β and the protection from cardiovascular injury hypothesis, *Biochem Soc Trans*, 23, 403-406
- [39] M. O. Li, Y. Y. Wan, S. Sanjabi, A. K. Robertson, & R. A. Flavell. (2006). Transforming growth factor-beta regulation of immune responses, *Annu. Rev. Immunol.* 24, 99-146.
- [40] R. G. Wells. (2000). Fibrogenesis. V. TGF-beta signaling pathways, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 279, G845-50.
- [41] D. T. Price, & J. Loscalzo, (1999). Cellular adhesion molecules and atherogenesis, *Am J Med.*, 107, 85-97.
- [42] L. Broxmeyer. (2004). Heart disease: the greatest 'risk' factor of them all. *Med Hypotheses*, 62, 773-779.
- [43] S. Oparil, & A. Oberman. (1999). Nontraditional cardiovascular risk factors, *Am J Med Sci*, 317(3): 193-207.
- [44] P. M. Ridker. (2003) Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation*, 107, 363-369.
- [45] Z. Bozóky, L. Balogh, D. Máthé, L. Fülöp, & G. A. Jánoki. (2006). Evaluation of rat and rabbit sera lipoproteins in experimentally induced hyperlipidemia by analytical ultracentrifugation, *J Eur Bio*, 35, 205-213.

