

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

大豆蛋白水解物對於自發性高血壓大白鼠血壓及血管內皮
功能的影響

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2320-B-038-040-

執行期間：94年08月01日至95年07月31日

執行單位：臺北醫學大學保健營養學系

計畫主持人：陳俊榮

計畫參與人員：楊欣怡

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 10 月 12 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫

成果報告

期中進度報告

大豆蛋白水解物對於大白鼠血壓和 血管內皮功能的影響

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC94-2320-B-038-040

執行期間：2005 年 08 月 01 日至 2006 年 07 月 31 日

計畫主持人：陳俊榮

計畫參與人員：楊欣怡

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：臺北醫學大學保健營養學系

中 華 民 國 九 十 五 年 十 月

摘要

高血壓為人類最盛行的健康問題，也與心血管疾病、糖尿病等許多慢性疾病間具有相關性，若能在日常飲食中多加注意，應可達到預防和改善的效果。體內調節血壓的一個重要的機制就是腎素-血管收縮素系統 (RAS)，其中血管收縮素轉換酶 (angiotensin converting enzyme, ACE) 可將血管收縮素I作用生成血管收縮素II，長期暴露於高量的血管收縮素II會造成血壓升高且可能導致心臟和血管組織的發炎和肥大。本實驗將大豆蛋白以胃蛋白酶水解後進行透析；再將此水解產物添加於利用 L-NAME (N^ω-nitro-L-arginine methyl ester) 誘發高血壓和心腎血管系統病變的大白鼠，以觀察其對血壓和心血管系統的影響。結果發現投予 L-NAME 六週後確實會造成大白鼠血壓上升，而餵食實驗動物大豆蛋白水解物可改善血壓上升的情形。雖然各組間血漿 ACE 活性和 PAI-1 濃度並無顯著差異，但是餵食大豆蛋白水解物的實驗動物心臟和腎臟組織中 ACE 活性和 TNF- α 的濃度都顯著較低；血漿中肌酸酐的濃度也較低。同時我們也發現餵食大豆蛋白水解物的實驗動物週邊組織中脂質過氧化物 MDA 的濃度也較低。在組織病理分析結果中我們也一致的發現餵食大豆蛋白水解物的組別心臟和腎臟組織中發炎的情形也較不嚴重。由本實驗結果我們發現大豆蛋白水解物在體內可改善抑制 NO 所造成的高血壓，另外可能可以藉由抑制組織中 ACE 的活性，而減少組織產生過氧化和發炎肥大的情形，因此有助於避免高血壓的惡化。

關鍵字：大豆、蛋白質、血壓、ACE、PAI

Abstract

Hypertension is a common public problem in many countries and it is related to many chronic diseases. Management of eating habits may be effective in the prevention and retarding the development of hypertension. Renin-angiotensin system (RAS) plays an important role in the regulation of blood pressure *in vivo*. Angiotensin converting enzyme (ACE) can catalyze angiotensin I into angiotensin II and lead to an elevating of blood pressure by arteriole contraction. Long-term exposure to high level of angiotensin II can also lead to endothelium dysfunction and inflammation and hypertrophy of the heart and kidney. We added 1,3 and 5% of hydrophilic pepsin-digested soy protein hydrolysate (SPH) into diet of L-NAME –induced hypertensive rats. The SPH added did not affect food intake but retarded the development of hypertension and increases plasma NO_x concentration. Although no significant difference was found in plasma ACE activity, rats fed with SPH had lower heart, lung and kidney ACE activity and TNF- α concentration. Besides, malondialdehyde (MDA) levels in heart, aorta and kidney in rats fed with SPH were also lower than the control group. In pathohistological analysis, we found that the inflammation and hypertrophy of small arteries of heart and kidney in L-NAME treated rats was improved by feeding with SPH. These results suggested that SPH may have retarded L-NAME –induced hypertension and protect the cardiac and renal tissue from oxidative injuries and inflammation by its inhibition effect of tissue ACE activity.

Keywords : soy, protein, blood pressure, NO, ACE, PAI

目錄

摘要.....	II
ABSTRACT.....	III
目錄.....	IV
前言.....	1
研究目的.....	4
材料與方法.....	5
結果與討論.....	7
總結.....	9
參考文獻.....	9
圖一、攝取不同量 SPH 對以 L-NAME 誘發高血壓的大白鼠血壓的影響.....	12
圖二、攝取不同量 SPH 對以 L-NAME 誘發高血壓的大白鼠血漿血管收縮素轉換酶活性的影響.....	12
圖三、攝取不同量 SPH 對以 L-NAME 誘發高血壓的大白鼠心臟、主動脈、肺臟及腎臟血管收縮素轉換酶活性的影響.....	13
圖四、攝取不同量 SPH 對以 L-NAME 誘發高血壓的大白鼠心臟、主動脈、肺臟及腎臟 TNF- α 濃度的影響.....	13
圖五、攝取不同量 SPH 對以 L-NAME 誘發高血壓的大白鼠血漿、心臟及主動脈 PAI-1 濃度的影響.....	14
表一、各組飼料組成.....	14
表二、攝取不同量 SPH 對以 L-NAME 誘發高血壓的大白鼠血液和尿液生化分析值的影響.....	15
表三、攝取不同量 SPH 對以 L-NAME 誘發高血壓的大白鼠血漿和組織 NITRITE/NITRATE 濃度的影響.....	15
表四、攝取不同量 SPH 對以 L-NAME 誘發高血壓的大白鼠血和組織 SOD、CATALASE 活性及 MDA 濃度的影響.....	16

前言

根據 JNC VII 在 2003 年的最新定義，高血壓是指收縮壓高於或等於 140 mmHg 及/或舒張壓 (diastolic blood pressure, DBP) 高於或等於 90 mmHg；成人正常血壓值的定義則為收縮壓低於 120 mmHg，且舒張壓低於 80 mmHg (Chobanian et al., 2003)。高血壓一直以來都有隱形殺手的稱號，而長期、持續性的血壓上升，會使小動脈管壁變硬和變厚，造成心血管系統、腦部和腎臟等器官的病變，同時也會加速動脈粥狀硬化的形成 (Diet et al., 1996)；因此，如何有效的控制血壓升高，在心血管疾病的預防和治療上佔有相當重要的地位。

目前高血壓的治療方面，若能改善生活習慣並配合藥物治療，可有效地抑制血壓的上升，降低心血管疾病的死亡率。因此，除了降低飲食中脂質、鈉鹽之攝取，若能由飲食攝取或額外補充具抑制血壓上升功效之食品，對於預防高血壓和相關併發症的發生將有重大的影響性。常見的高血壓治療用藥物包括利尿劑、鈣離子通道抑制劑和腎上腺性受器抑制劑，但長期這些藥物容易造成患者有生理代謝和精神狀態異常的現象 (陳, 1996)。因此，近年來腎素-血管收縮素系統 (renin angiotensin system, RAS) 抑制劑如 Captopril、Enalapril 等血管收縮素轉化酶抑制劑 (angiotensin- converting enzyme inhibitor, ACEI) 和 Losartan 等 angiotensin II receptor blocker 在臨床治療上已漸漸地取代部分傳統的抗壓藥物 (Okunishi et al., 1991)。

RAS 在體內調節血壓的原理即為：當血流量減少時，可由腎臟分泌出腎素，腎素則會將由肝臟所分泌的血管收縮素原 (angiotensinogen, AOG) 轉變為變為血管收縮素 I (angiotensin I, Ag I)，此不具生理活性的 Ag I 再經由其他如血管壁、肺臟、心臟及腎臟等組織之 ACE 作用後，就可以產生具生理活性的血管收縮素 II (angiotensin II, Ag II)。Ag II 舊稱為 hypertensin 或 angiotenin，是體內強力的血管收縮劑之一，可造成小動脈收縮、心臟收縮壓和舒張壓的提高，並會刺激交感神經、促進腎上腺皮質素和抗利尿性荷爾蒙的分泌，而導致血壓上升 (丁, 1992)。其中對於 Ag II 之生成具關鍵性影響的 ACE 是一種非專一性的 dipeptidyl carboxypeptidase，它可將由十個胺基酸所組成不具生理活性的 Ag

I 中 C 末端的 His-Leu 水解游離，而形成由八個胺基酸構成的 Ag II；因此，如能有效地抑制 ACE 的作用，即可減少 Ag II 的生成，進而達到降低血壓的效果 (Cleland, 1993)。近年來亦有許多研究指出，體內除了主要循環系統外，部分重要器官和組織 (例如：腦、心臟、腎臟、血管、生殖器官等) 中亦具有 RAS，這些組織中的 RAS 可能與長期的血壓調控有著密切的相關性 (Morishita *et al.*, 1994)。在動物和人體實驗中都發現，隨著年齡的增加，心血管系統的構造型態和功能會因為適應老化傷害而有所調整，然而過量的 Ag II 在此維持體內平衡的機制中卻有負面的影響 (Gibbons, 1998)。Ag II 除了促使血管收縮、血壓增加之外，亦扮演著類似生長因子的角色，會促進血管壁異常增厚和細胞外基質蛋白質增生，因而容易造成組織肥大和纖維化，導致血管硬化和栓塞、左心室肥大、腎臟功能喪失等 (Levy *et al.*, 1988)。因此，許多學者認為若能有效地抑制 Ag II 的活性，或許就可以減少左心室肥大、鬱血性心臟病、心肌梗塞、動脈粥狀硬化及腎臟衰竭等慢性病的發生 (Pfeffer *et al.*, 1992; Borghi *et al.*, 1996)。另外，高血壓和動脈病變造成的栓塞是導致心肌缺血性症狀的原因，栓塞的形成主要與體內血栓形成和分解的系統失衡有關，其中相當重要的角色之一就是 PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-I)；t-PA (tissue plasminogen activator) 是血管內主要的 plasminogen activator，PAI-1 在體內則是 t-PA 的主要抑制劑。近期有很多研究發現 PAI-1 的表現與 RAS 間具有相關性，在體外實驗中發現 Ag II 會刺激內皮細胞和平滑肌細胞 PAI-1 的表現 (Vaughan *et al.*, 1995)。在 Katoh 等 (2000) 的研究中發現 ACEI 具有抑制 PAI-1 的特性；Mitsui 等 (1999) 的研究中以 SHR 為實驗動物也發現 ACE 抑制藥物 Imidapril 可藉由降低主動脈 PAI-1 表現而抑制血栓的形成。除了 PAI-1 以外，NO (nitric oxide) 功能異常也是高血壓血管疾病的危因之一，在 2004 年 Pereira 等人的研究中發現 Enalapril 可降低缺乏 NO 之自發性高血壓大白鼠 (Spontaneously Hypertensive Rat, SHR) 心臟和腎臟的結構損害。因此，有效的抑制 ACE 的活性對於血壓控制和心血管病變的預防是具有其重要性的。

食品中的蛋白質經過消化後，可以提供人體生長發育所需之胺基酸，但是近年來在生理與生化學的研究中顯示，蛋白質不僅是胺基酸的提供者，在經過

人體消化管消化或食品加工過程中之酵素水解後，可產生具有生理活性之胜肽片段，而對生命體生理有各種的影響。已有許多的研究證實：食品蛋白質經酵素水解後的產物中，有部分的胜肽片段具有抑制血壓上升和體內 RAS 活性之功效 (Yamamoto, 1997)。早在 1979 年 Oshima 等人即由食品蛋白質中分離出具有降低血壓功能之胜肽，將這類物質統稱為：血管收縮素轉換酶抑制劑 (ACE Inhibitors, ACEIs)。這些 ACEIs 的胺基酸序列和胜肽鏈長度不一，但其功能類似，它們可抑制 ACE 的活性，進而抑制 Ag II 的生成。甚至目前臨床治療上常見的一些抗高血壓藥物 (例如：captopril, lisinopril, analapril 及 quinapril 等)，也是這些短鏈胜肽的衍生物質；舉例來說，captopril 就是 Ala-Pro 的含硫衍生物。由食品中所分離出之 ACEI 效果雖不及化學藥品，但相對地也無任何副作用產生，故可被建議作為日常攝取的保健食品。因此，近年來有許多的研究針對各種食品蛋白質 (如乳製品、豆類製品、魚肉蛋白質及穀類蛋白質等) 投予 SHR 對其血壓的影響。例如在乳製品方面，牛乳經 *Lactobacillus helveticus* 和 *Saccharomyces cerevisiae* 發酵製成酸奶後，可產生 Val-Pro-Pro 和 Leu-Pro-Pro 等兩種具生理活性的三胜肽類，不論在動物 (Masuda *et al.*, 1996) 或人體實驗 (Hata *et al.*, 1996) 中皆展現良好的降血壓效果。在魚肉蛋白質方面，也有研究發現由沙丁魚 (Kawasaki *et al.*, 2000) 或鯉魚 (Fujita & Yoshikawa, 1999) 蛋白質水解物中分離出的短鏈胜肽具有抑制 ACE 活性和降低血壓的效果。

大豆 (*Glycine max*，黃豆) 為莢豆科一年生草本植物，蛋白質含量約為 35~40%，因其產量豐富且價格低廉，一直以來都廣泛地應用於各種加工食品，也是傳統東方飲食中重要的蛋白質來源。流行病學研究指出：攝取含大豆製品較多的傳統日式飲食的日本人，其冠狀動脈心臟病死亡率較慣於攝取西式飲食者低 (Kagan *et al.*, 1974)。近年來也有多項研究證實：以大豆蛋白取代動物性蛋白為飲食中的蛋白質來源時，可降低血清總膽固醇、低密度脂蛋白膽固醇及三酸甘油酯 (Anderson *et al.*, 1995)，在 Kanazawa 等的研究中也發現大豆蛋白質中具有某些特殊成分可藉由抑制 LDL 的氧化以預防動脈粥狀硬化的發生 (Kanazawa *et al.*, 1995)。因此，若能進一步證實大豆蛋白質在攝入體內後，經消化道酵素水解後的產物可以藉由抑制 RAS 的活性而達到控制血壓的目的，在心血管疾病的預防和膳食療養的飲食建議上將具有重要的地位。

大豆蛋白對血壓影響的相關研究方面，2000 年 Nevala 等人以自發性高血壓大白鼠為研究對象，比較飲食中以酪蛋白和大豆蛋白為蛋白質來源的影響，研究結果發現與酪蛋白相比，攝取大豆蛋白組的高血壓的發生率顯著較低，且此結果與性別並無相關，至於其影響機制則仍有待研究。此外，在多種發酵大豆製品（味噌、納豆等）中亦發現具有 ACEI 特性之胜肽片段，如 Shin 等 (2001) 由發酵大豆製品中純化出 His-His-Leu，並將之投予自發性高血壓大白鼠 (5 mg/kg body weight, iv)，在 10 分鐘後血壓即有顯著的下降；而 Wu 等 (2001) 投予自發性高血壓大白鼠每日每公斤體重 100 mg 之大豆蛋白 alcalase 水解產物，在一個月後亦可觀察到其血壓和血清鈉離子濃度有顯著地降低。

本研究室執行大豆蛋白對血壓和心血管疾病的影響的已有數年，1997 年我們即在體外實驗中發現大豆蛋白質酵素水解物具有抑制 ACE 之生理活性 (Chen et al., 1997)；2002 年發表的文獻中指出急性投與大豆蛋白水解胜肽可降低 SHR 血壓 (Chen et al., 2002)；在 2004 年發表的二篇文獻中亦指出投與大豆蛋白質水解物可顯著的抑制 SHR 高血壓的發生和週邊組織中 ACE 的活性 (Chen et al., 2004 ;Yang et al, 2004)。由以上相關文獻的回顧可知，已有許多研究都指出 ACE 抑制劑具有降低血壓並減少內皮系統傷害的功能，所以我們將進一步的以大豆蛋白水解物餵食以 L-NAME (L-arginine methyl ester) 抑制 NO 合成以誘發高血壓和心腎組織病變的大白鼠，觀察大豆蛋白水解物是否可在週邊組織中藉由其抑制 ACE 活性的生理活性，達到降低 PAI-1 表現和週邊組織傷害的效果。

研究目的

本研究藉由餵食實驗大白鼠 NOS 抑制劑 L-NAME，造成大白鼠血壓升高、心血管系統和腎臟組織病變，以觀察大豆蛋白水解物對於改善 NO 造成之高血壓及心、腎和血管系統構造功能的影響，觀察其是否能藉由抑制週邊組織中的 ACE 活性而減少組織過氧化和發炎的情形。

材料與方法

大豆蛋白水解物製備 將大豆分離蛋白 (Protein Technologies International, St Louise, MO, USA) 以 1N HCl 調整至 pH 2.0, 添加 0.3% (w/w) 胃蛋白酶混合均勻後於 37°C 進行 24 小時水解。24 小時後以 1 N NaOH 將溶液 pH 值調整至 7.0 後以 12,000xg 離心 20 分鐘, 所得上清部分之親水性蛋白質水解物溶液進一步冷凍乾燥後研磨成粉末即為本實驗之大豆蛋白水解物樣品 (SPH)。

實驗動物 由台大醫學院實驗動物中心購入 40 隻 Wistar 品系大白鼠, 飼育於個別隻不鏽鋼籠中, 環境溫度維持於 22±1°C、溼度 55±5%, 並有 12 小時明暗循環。動物以 AIN-93M 預養至 16 週齡時隨機分為四組, 實驗組飲食中以不同量之 SPH 取代酪蛋白作為蛋白質來源: 控制組 (CC)、實驗組 1 (E1, 1% SPH)、實驗組 2 (E2, 3% SPH) 及實驗組 3 (E3, 5% SPH); 所有動物飲食中皆添加 L-NAME (50mg/kg/day, N_ω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride, Fluka, Switzerland); 詳細飲食組成如表一所示。實驗為期六週, 實驗期間飲食和飲水採無限量供應, 每週紀錄實驗動物攝食量和體重。實驗末, 動物以 sodium pentobarbital 麻醉, 由腹腔抽取靜脈血放入含 heparin 之採血管, 離心後分別將血漿和紅血球保存於 -80°C 待分析。以生理食鹽水灌流後, 取心臟、主動脈及腎臟秤重並切取部分固定於福馬林中待進行病理組織分析; 其餘組織分割保存於 -80°C 待分析。

血壓測定 實驗初、第三和第六週以非觀血式血壓測定儀由尾部測量大白鼠血壓 (Model 179; Blood Pressure Analyzer IITC, Woodland Hills, CA, USA)。大白鼠禁食 12 小時後安置於固定器中使其情緒穩定, 連續測量三次讀值計算平均值。

血液生化分析

血漿中的總膽固醇、三酸甘油酯、高密度脂蛋白膽固醇、低密度脂蛋白膽固醇、麩胺酸草醋酸轉胺酶、麩胺酸丙酮酸轉胺酶、血糖、尿酸、白蛋白、尿素氮、肌酸酐、鈉、鉀、氯、磷及鈣的濃度以 Hitachi 7170 自動分析儀進行分析。

尿液分析

實驗末將各組大白鼠置於代謝籠中, 收集並紀錄 24 小時排尿量, 尿液中的蛋白質和肌酸酐濃度以 Hitachi 7170 自動分析儀進行分析。並以下列公式計算肌酸酐清除率: $CCr = (\text{尿中肌酸酐濃度} \times 24 \text{ 小時尿量}) \div (\text{血漿肌酸酐濃度} \times 1440)$ 。

ACE 活性測定 心臟、主動脈和腎臟組織以 400mM 之磷酸緩衝溶液 (pH 7.2, 含 340 mM sucrose、900 mM NaCl、protease inhibitor) 均質, 離心取上清

液。ACE 活性測定依據 Hernandez-Ledesma 等的方法(2003)，以 Hip-His-Leu 為受質，與血漿或組織均質液於 37°C 反應後，添加 1 N HCl 終止反應；以 ethyl acetate 萃取乾燥後，以蒸餾水溶解於 228 nm 下測量吸光值。組織均質液之蛋白質含量以 Lowry method 測定，組織均質液中的 ACE 活性以 IU/mg protein 表示。

NO_x 測定

由於體內 NO 的半衰期較短，我們依據 Miranda 等的方法分析血漿和組織中的 NO 的代謝產物 nitrite (NO₂⁻) 和 nitrate (NO₃⁻) 含量來測定 NO 的含量。

SOD、Catalase 活性及 TBARS 測定 心臟、主動脈和腎臟組織以磷酸緩衝液均質後離心取上清液進行分析。紅血球以生理食鹽水清洗數次後，以磷酸緩衝液進行稀釋。紅血球和組織均質液 SOD 活性以市售試劑組分析 (Randox)，catalase 活性依據 Aebi 等 (1984) 的方法進行分析。血漿和組織液中之脂質過氧化物 MDA (malondialdehyde) 含量依據 TBARS 的方法測定 (Griesmacher et al., 1995)。

TNF- α 和 PAI-1 分析

心臟、主動脈和腎臟組織以含蛋白酶抑制劑之緩衝液均質，取血漿和組織均質液以市售 ELISA 試劑組分析 tumor necrosis factor- α (TNF- α , rat TNF-- α /TNFSF1A, R&D) 和 plasminogen activator inhibitor-1 (Zymutest rat-PAI-1 (antigen/activity), Hyphen BioMed) 含量。

病理組織分析

心臟、主動脈及腎臟組織浸泡於 10% 福馬林固定後，經脫水進行石蠟包埋，以蘇木紫-伊紅進行染色，由病理科醫師進行判讀。

統計分析 以 SAS 軟體進行統計 (the Statistical Analysis System, the SAS Institute, Inc.; Cary, NC. USA)，以 one-way ANOVA 和 Fisher's least significant difference test 分析。數據以 Mean \pm SEM 表示，當 $P < 0.05$ 時表示有統計差異。

結果與討論

實驗初經隨機分組後各組實驗動物體重無統計差異，實驗期間不同飲食對於實驗動物之每日攝食量亦無顯著影響（C, $18.09 \pm 0.47\text{g}$; E1, $18.59 \pm 0.98\text{g}$; E2, 18.09 ± 0.98 ; E3, $16.51 \pm 0.42\text{g}$ ）；第六週時體重測量的結果發現涉取六週不同的實驗飲食對實驗動物體重亦無顯著影響（C, $337.30 \pm 9.93\text{g}$; E1, $342.50 \pm 31.47\text{g}$; E2, 381.90 ± 25.36 ; E3, $328.10 \pm 21.00\text{g}$ ）。所以大豆蛋白水解物並不會因為影響實驗動物的攝食量而對實驗結果有所影響。

實驗末的血液和尿液生化數值分析結果如表二所示，各組實驗動物血漿中的總膽固醇、三酸甘油酯、高密度脂蛋白膽固醇、低密度脂蛋白膽固醇、麩胺酸草醋酸轉胺酶、麩胺酸丙酮酸轉胺酶、血糖、尿酸、白蛋白、尿素氮、鈉、鉀、氯、磷及鈣濃度都無顯著差異。血漿肌酸酐濃度方面，以分別攝取含 3% 和 5% SPH 的 E2 和 E3 組顯著低於控制組，但兩組間並沒有顯著的差異。在 24 小時排尿量和尿蛋白的分析方面，四組動物間沒有統計差異；在肌酸酐清除率方面，攝取含 SPH 飲食的大白鼠雖然有高於控制組的趨勢，但亦無統計上的差異。

NO 的含量分析如表三所示，E3 組血漿中 NO_x 的含量顯著高於其他三組，但在尿液和其他組織的分析中各組間都沒有顯著的差異。血壓分析的結果中（圖一），實驗初各組實驗動物收縮壓和舒張壓並沒有顯著差異，攝取含 L-NAME 的飲食後皆會造成血壓的上昇。在第六週時，攝取含 1%、3% 及 5% SPH 的實驗動物收縮壓顯著低於控制組；舒張壓方面則是攝取 3% 和 5% SPH 的組別顯著低於控制組。分析各組血漿中 ACE 的活性發現投予實驗動物 L-NAME 三週後即會造成 ACE 活性的上昇，但在第三週和六週時各組間血漿 ACE 活性並沒有統計上的差異（圖二）。然而，在組織 ACE 活性的分析中我們發現，E3 組心臟 ACE 活性顯著低於控制組，且與 E2 和 E1 組間無統計差異；E2 和 E3 組肺臟中的 ACE 活性也顯著低於控制組；E2 組腎臟中 ACE 活性顯著低於控制組且與 E3 組無統計差異；攝取含 SPH 飲食的實驗動物主動脈中 ACE 活性有較低的傾向但並沒有統計上的差異（圖三）。

圖四中顯示的是組織中 $\text{TNF-}\alpha$ 分析的結果，結果顯示 E3 組心臟和腎臟中 $\text{TNF-}\alpha$ 的濃度顯著低於控制組，且與 E2 和 E1 組無統計上的差異；E2 和 E3 組肺臟中 $\text{TNF-}\alpha$ 的濃度也顯著低於控制組，且與 E1 組無統計上的差異。血漿中脂質過氧化產物 MDA 的分析結果如表四所示，各組間並沒有統計上的差

異；但是 E3 組在心臟和主動脈中的 MDA 濃度都顯著低於控制組；E2 組腎臟中的 MDA 濃度也顯著低於控制組、且與 E3 組無統計上的差異。各組血漿和組織中 catalase 的活性皆沒有顯著差異，但是餵食 SPH 的大白鼠心臟中 SOD 的活性顯著低於控制組。

本研究中發現餵食以 L-NAME 誘發高血壓的大白鼠大豆蛋白水解物可改善實驗動物血壓惡化的情形，同時在實驗末我們發現餵食 5% SPH 實驗動物血漿中 NO_x 的濃度顯著高於其他三組，因此大豆蛋白水解物可能藉由直接或間接逆轉 L-NAME 對內皮系統 NO 合成的抑制作用，促進血管舒張而達到降低血壓的功能。在 ACE 活性的分析方面，雖然攝取大豆蛋白水解物在血漿和主動脈中 ACE 活性並沒有顯著影響，但是我們發現餵食 SPH 的實驗動物心臟中 ACE 的活性確實較低，且 TNF- α 的濃度也較低。有研究發現以 Enalapril 治療因 L-NAME 造成高血壓的 SD 大白鼠發現確實可以降低收縮壓和改善內皮功能的損害 (Colonna et al., 2005)。此外，投予大白鼠 L-NAME 會造成 ACE 大量堆積於心臟小血管壁內皮層中 (Kato et al., 2000) 且會造成心臟組織產生發炎反應 (Luvara et al., 1998)。雖然有研究指出抑制 ACE 的活性可能藉由 NO 途徑調節 PAI-1 的表現而對內皮功能有所影響 (Brown et al., 2006)，但在本實驗中我們發現各組間在血漿、主動脈和心臟組織中 PAI-1 的表現量卻沒有顯著差異。Suda 等人的研究中發現 (2004)，抑制小鼠體內的 eNOS 會造成冠狀血管組織中 ACE 表現量增加和小血管壁增厚，但是對於主動脈確沒有顯著的影響，且長期抑制 NO 合成對血管系統的影響可能與增加小動脈壓無關，而是與促使組織中 ACE 活性的增加而使 AT₁ 受體引發的一連串氧化反應有關。在本實驗中我們也發現餵食 SPH 的實驗動物心臟中 SOD 活性較低，且脂質過氧化物 MDA 的濃度也較低；在組織病理分析的結果中我們也同樣的發現餵食 SPH 的實驗動物比起控制組可改善心室和心中膈增厚的情形，並可改善心房部分的發炎和纖維化。

抑制實驗大白鼠體內 NO 的合成確實會造成實驗動物血壓的上昇和腎臟組織的損害 (Baylis et al., 1992)，但是以 SHRSP 為動物模式的研究中卻發現同樣抑制體內 NO 的合成雖無法使血壓繼續上升，但是卻會造成血管和腎臟組織病變的情形更加惡化 (Chander et al., 1991)，這可能與 NO 在組織中所造成的局部影響有關。有研究顯示 ACE 抑制劑 captopril 可改善因高血壓或糖尿病造成的腎臟損害。在以 5/6 腎切除造成大白鼠慢性腎衰竭的研究中，我們發現親

水性大豆蛋白水解物為飲食約半量之蛋白質來源可降低血磷和血清尿素氮，並可改善蛋白尿的現象 (Chen et al., 2006)。在本研究中雖然我們並沒有發現餵食 SPH 的實驗動物蛋白尿和血漿中尿素氮和磷濃度與控制組有差異，但餵食 5% SPH 的組別確實可以有效降低血漿肌酸酐的濃度，此結果與使用 captopril 治療 NO 缺乏之高血壓大白鼠的結果一致 (Khattab et al., 2005)，所以大豆蛋白水解物的確可能具有保護腎絲球體避免其損害的功能。在 TNF- α 和 MDA 的分析結果中我們也發現餵食大白鼠大豆蛋白水解物確實可以腎臟中因抑制 NO 造成 TNF- α 和脂質過氧化物 MDA 濃度增加，同時在組織病理分析中我們也發現餵食大白鼠大豆蛋白水解物可改善腎絲球體間質發炎的情形，且對於減少腎臟組織中小動脈壁因抑制 NO 造成 hyperplastic 型態增厚的情形也具有有利的影響。因此可以推斷大豆蛋白水解物在腎臟中可能藉由抑制腎臟組織中的 ACE 活性而減少腎臟組織產生氧化壓力和發炎的情形，因此有助於保護腎臟避免腎功能受損，進而也可能藉此避免高血壓的情形更加惡化。

總結

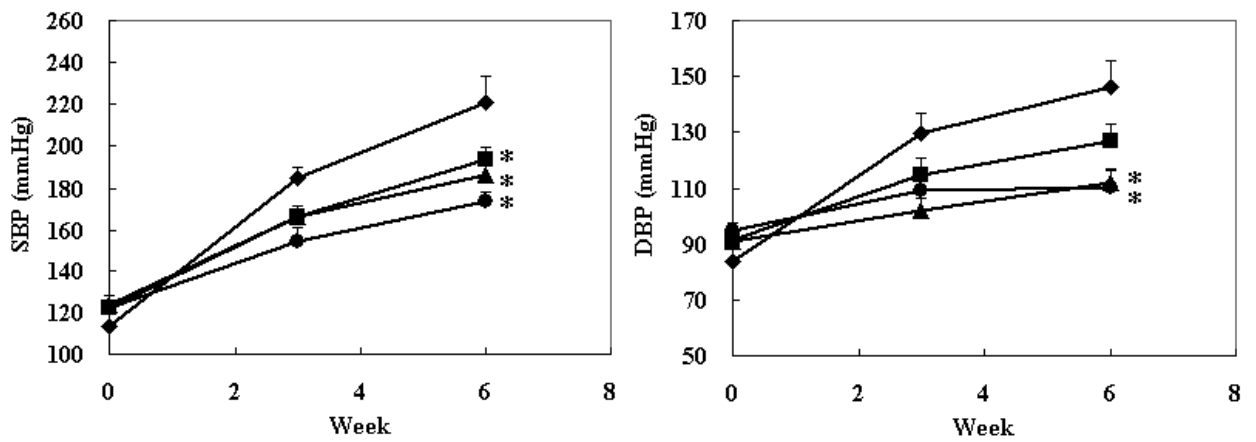
由本實驗的結果我們認為大豆蛋白水解物可改善體內因抑制 NO 所造成的血壓升高。且由於大豆蛋白水解物可抑制組織中 ACE 的活性，所以可能藉由此機制改善組織發炎和氧化壓力增加的情形，因此建議高血壓病患以大豆蛋白取代飲食中部份的蛋白質來源可能有助於改善因高血壓而併發之組織病變。

參考文獻

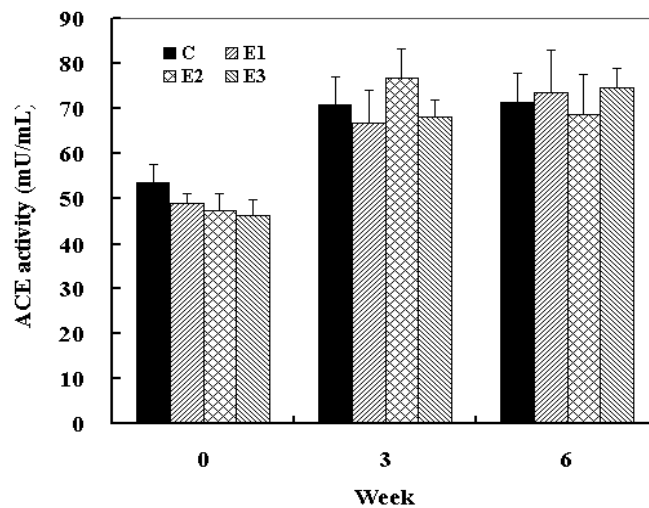
- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-6
- Anderson JW, Johnstone BM, and Cook-newell ME (1995) Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Eng J Med* 333:276-282
- Baylis C, Mitruka B and Deng A (1992) Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest* 90:278-81
- Brown NJ, Muldowney III JAS, Vaughan DE (2006) Endogenous NO regulates plasminogen activator inhibitor-1 during angiotensin converting enzyme inhibition. *Hypertension* 47:441-8
- Chander PN, O'Brien P and Stier CT (1991) N-nitro-L arginine markedly accelerates the development of malignant nephrosclerosis in stroke-prone SHR. *J Am Soc Nephrol* 2:501A
- Chen JR, Okada T, Muramoto K, Suetsuna K & Yang SC (2002) Identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from the peptic digest of soybean protein. *J Food Biochem* 26:543-4.
- Chen JR, Yang SC, Liu YL, Suetsuna K, and Shieh MJ (1997) Peptides with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in pepsin-digests of soybean broth. *Nutr Sci J* 22:435-444

- Chen JR, Yang SC, Suetsuna K & Chao CJ (2004) Soybean protein-derived hydrolysate affects blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Food Biochem* 26:543-4.
- Chen ST, Yang HY, Huang HY, Peng SJ, and Chen JR (2006) Effects of various soya protein hydrolysates on lipid profile, blood pressure and renal function in five-sixths nephrectomized rats. *Br J Nutr* 96(3):435-41
- Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright Jr JT & Roccella EJ (2003) The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *JAMA* 289:2560-72
- Cleland JGF (1993) *The Clinician's Guide to ACE Inhibition*. Churchill Livingstone Inc. NY. p.37-75
- Colonna EDG, Rigamonti A, Fioretti S, Bonomo S, Manfredi B, Ferrario P, Bianchi M, Berti F, Muller EE and Rossoni G (2005) Angiotensin converting enzyme inhibition and angiotensin AT₁-receptor antagonism equally improve endothelial vasodilator function in L-NAME-induced hypertensive rats. *Eur J pharmacol* 516-253-9
- Diet F, Pratt RE, Berry GJ, Momose N, Gibbons GH, and Dzau VJ (1996) Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease. *Circulation* 94:2756-2767
- Griesmacher A, Kindhauser M, Andert SE, Schreiner W, Toma C, Knoebl P, Pietschmann P, Prager R, Schnack C, Scherthaner G (1995) Enhanced serum levels of thiobarbituric-acid-reactive substances in diabetes mellitus. *Am J Med* 98:469-75
- Fujita H and Yoshikawa M (1999) LKPNM: a prodrug-type ACE inhibitory peptide derived from fish protein. *Immunopharm* 44:123-127
- Hata Y, Yamamoto M, Ohni M, Nakajima K, Nakamura Y, and Takano T (1996) A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *Am J Clin Nutr* 64:767-771
- Hernandez-Ledesma B, Martin-Alvarez PJ, Pueyo E (2003) Assessment of the spectrophotometric method for determination of angiotensin-converting-enzyme activity: influence of the inhibition type. *J Agric Food Chem* 51:4175-9
- Kagan A, Harris BR, Winkelstein W, Johnson KG, Kato H, Syme G, Rhoads GG, Gay ML, Nichaman MZ, Hamilton HB, and Tillston J (1974) Epidemiologic studies of coronary heart disease and stroke in Japanese men living in Japan, Hawaii and California: demographic, physical, dietary and biochemical characteristics. *J Chronic Dis* 27:345-364
- Kanazawa T, Osanai T, Zhang XS, Uemura T, Yin X, Onodera K, Oike Y, and Ohkubo K (1995) Protective effects of soy protein on the peroxidizability of lipoproteins in cerebrovascular diseases. *J Nutr* 125:639-646
- Katoh M, Egashira K, Mitsui T, Takeshita A & Narita H (2000) Differential effects of imidapril and candesartan cilexetil on plasminogen activator inhibitor-1 expression induced by prolonged inhibition of nitric oxide synthesis in rat hearts. *J Cardiovasc Pharm* 35(6):932-6
- Katoh M, Egashira K, Mitsui T, Chishima S, Takeshita A & Narita H (2000) Angiotensin converting enzyme inhibitor prevents plasminogen activator inhibitor-1 expression in a rat model with cardiovascular remodeling induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *J Mol Cell Cardiol* 32:73-8
- Kawasaki T, Seki E, Osajima Yoshida M, Asada K, Matsui T, and Osajima Y (2000) Antihypertensive effect of Valyl-Tyrosine, a short chain peptide derived from sardine muscle hydrolyzate, on mild hypertensive subjects. *J Hum Hypertens* 14:519-523
- Khattab MM, Mostafa A and Al-Shabanah O (2005) Effects of captopril on cardiac and renal damage and metabolic alterations in the nitric oxide-deficient hypertensive rat. *Kidney Blood Press Res* 28:243-50
- Luvara G, Pueyo ME, Philippe M, Mandet C, Savoie F, Henrion D and Michel JB (1998) Chronic blockade of NO synthase activity induces a proinflammatory phenotype in the arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1408-16
- Levy BI, Michel JB, Salzmann JL, Azizi M, Poitevin P, Safar M, and Camilleri JP (1988) Effects of chronic inhibition of converting enzyme of mechanical and structural properties of arteries in rat

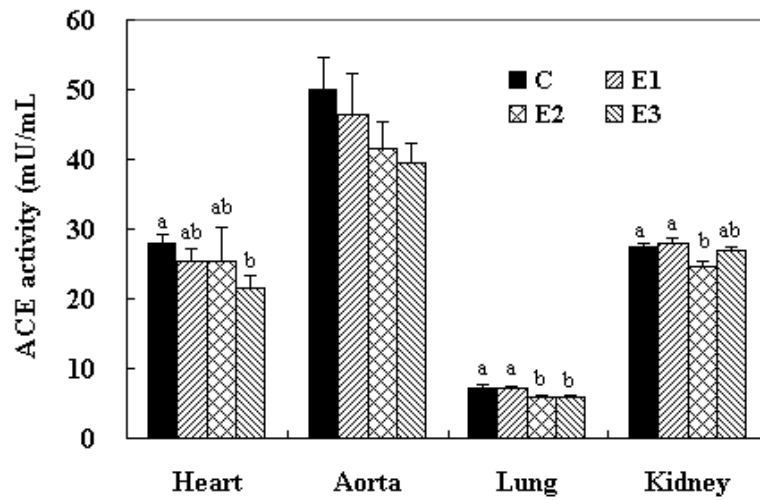
- renovascular hypertension. *Circ Res* 63:227-239
- Miranda KM, Espey MG, Wink DA (2001) A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 5:62-71
- Mitsui T, Chishima S, Odawara A, Ohtani (1999) A Imidapril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, inhibits thrombosis via reduction in aortic plasminogen activator inhibitor type-1 levels in spontaneously hypertensive rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 22(8):863-5
- Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, Lee W, Zhang L, Yu H, Kaneda Y, Ogihara T and Dzau VJ (1994) Evidence for direct local effect of angiotensin in vascular hypertrophy. In vivo gene transfer of angiotensin converting enzyme. *J Clin Invest* 94:978-984
- Nevala R, Vaskonen T, Vehniäinen J, Korpela R, and Vapaatalo H (2000) Soy based diet attenuates the development of hypertension when compared to casein based diet in spontaneously hypertensive rat. *Life Sci* 66(2):115-124
- Okunishi H, Kawamoto T, Kurobe Y, Oka Y, Ishii K, Tanaka T, Miyazaki M (1991) Pathogenetic role of vascular angiotensin-converting enzyme in the spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Pharm Phys* 18(9):649-59
- Oshima G, Shimabukuro H, and Nagasawa K (1979) Peptide inhibitors of angiotensin I-converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase. *Biochim Biophys Acta* 566:128-137
- Pereira LMM, Bezerra DG, Machado DL & Mandarim-de-Lacerda CA (2004) Enalapril attenuates cardiorenal damage in nitric-oxide-deficient spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci* 106:337-43
- Pfeffer MA, Braunwald E, Moyé L, Basta L, Brown EJ, Jr, Cuddy TE, Davis BR, Geltman EM, Goldman S, and Flaker GC (1992) Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 327:669-677
- Shin ZI, Yu R, Park SA, Chung DK, Ahn CW, Nam HS, Kim KS, and Lee HJ (2001) His-His-Leu, an angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide derived from Korean soybean paste, exerts antihypertensive activity in vivo. *J Agric Food Chem* 49:3004-3009
- Suda O, Tsutsui M, Morishita T, Tasaki H, Ueno S, Nalkata S, Tsujimoto T, Toyohira Y, Hayashida Y, Sasaguri Y, Ueta Y, Nakashima Y and Yanagihara N (2004) Asymmetric dimethylarginine produces vascular lesions in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Arterioscle Thromb Vasc Biol* 24:1682-8
- Vaughan DE, Lazos SA & Tong K (1995) Angiotensin II regulates the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured endothelial cells. A potential link between the renin-angiotensin system and thrombosis. *Journal of Clinical Investigation* 95(3):995-1001
- Wu J and Ding X (2001) Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem* 49:501-506
- Yamamoto N (1997) Antihypertensive peptide derived from food proteins. *Biopoly* 43:129-134
- Yamamoto S, Toida I and Iwai K (1989) Re-examination of spectrophotometric assay for serum angiotensin-converting enzyme. *Nippon Kyobu Shikkann Shi* 18:297-301
- Yang HY, Yang SC, Chen JR, Tzeng YH & Han BC (2004) Soybean protein hydrolysate prevents the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Br J Nutr* 92:507-12
- 丁予安 (1992) 高血壓之治病機轉。內科學誌 3:110-119
- 陳培瑛 (1996) 使用抗高血壓藥物於老年患者之效率與危險性。藥學雜誌 12(3):49-54



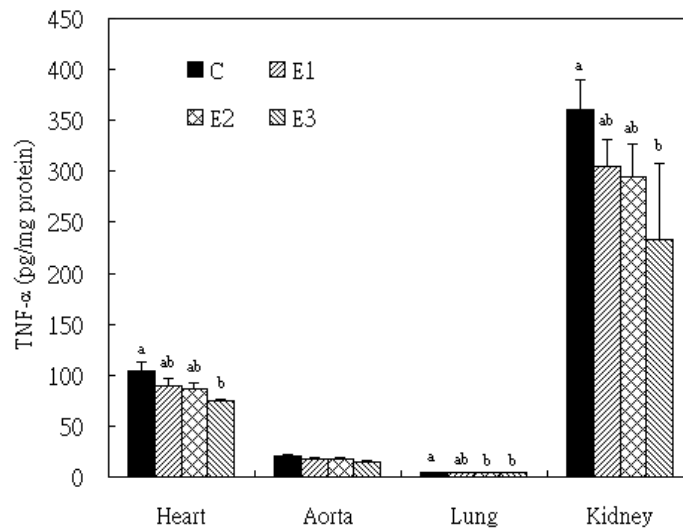
圖一、攝取不同量 SPH 對以 L-NAME 誘發高血壓的大白鼠血壓的影響
 數據以平均值±標準差表示。*表示與 Group C 有顯著差異 ($P < 0.05$)。
 ◆=Group C ■=Group E1 ▲=Group E2 ●=Group E3



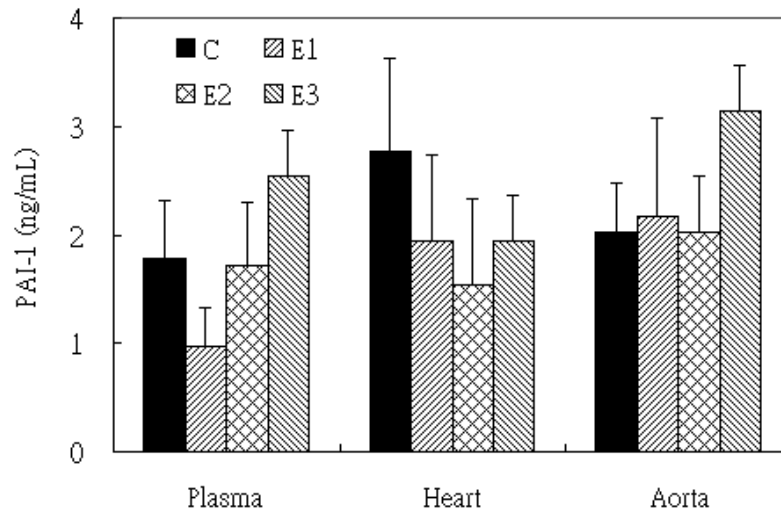
圖二、攝取不同量 SPH 對以 L-NAME 誘發高血壓的大白鼠血漿血管收縮素轉換酶活性的影響
 數據以平均值±標準差表示。



圖三、攝取不同量 SPH 對以 L-NAME 誘發高血壓的大白鼠心臟、主動脈、肺臟及腎臟血管收縮素轉換酶活性的影響
數據以平均值±標準差表示。^{a,b}表示具有統計上的差異 ($P < 0.05$)。



圖四、攝取不同量 SPH 對以 L-NAME 誘發高血壓的大白鼠心臟、主動脈、肺臟及腎臟 TNF- α 濃度的影響
數據以平均值±標準差表示。^{a,b}表示具有統計上的差異 ($P < 0.05$)



圖五、攝取不同量 SPH 對以 L-NAME 誘發高血壓的大白鼠血漿、心臟及主動脈 PAI-1 濃度的影響

數據以平均值±標準差表示

表一、各組飼料組成 (g/kg)

Ingredient*	C	E1	E2	E3
Corn starch	460	460	460	460
Dextrin	150	150	150	150
Casein	140	130	110	90
SPH	0	10	30	50
Sucrose	100	100	100	100
Soybean oil	40	40	40	40
Fiber	50	50	50	50
Mineral mix	37.5	37.5	37.5	37.5
Vitamin mix	10	10	10	10
Methionine	10	10	10	10
Choline	2.5	2.5	2.5	2.5

*Casein (high-N), cellulose (non-nutritive bulk), mineral mixture (AIN-93M) and vitamin mixture (AIN-93M) were obtained from the ICN Biochemicals (Aurora, OH, USA). Maize starch was from the Samyang Genex (Seoul, Korea). Soybean oil and sucrose were from the Taiwan Sugar Corporation.

表二、攝取不同量 SPH 對以 L-NAME 誘發高血壓的大白鼠血液和尿液生化分析值的影響

	C	E1	E2	E3
<u>Plasma</u>				
Alb (g/dL)	3.90 ± 0.08	4.14 ± 0.10	4.26 ± 0.09	3.90 ± 0.21
TC (mg/dL)	65.00 ± 5.88	72.63 ± 7.22	61.00 ± 9.21	80.29 ± 9.34
TG (mg/dL)	24.29 ± 2.74	34.38 ± 6.45	31.00 ± 5.10	28.86 ± 6.41
HDL-C (mg/dL)	48.8 ± 6.03	50.75 ± 5.72	46.57 ± 8.04	62.57 ± 8.04
LDL-C (mg/dL)	8.86 ± 0.86	10.63 ± 1.30	8.29 ± 1.21	10.43 ± 1.01
LDL-C/HDL-C	0.22 ± 0.04	0.21 ± 0.02	0.20 ± 0.03	0.18 ± 0.02
GOT (IU/L)	89.43 ± 3.54	114.38 ± 17.31	116.00 ± 19.84	102.86 ± 9.27
GPT (IU/L)	24.86 ± 1.96	35.64 ± 5.68	46.57 ± 14.88	48.50 ± 8.52
BS (mg/dL)	165.71 ± 5.60	148.75 ± 5.84	179.71 ± 14.09	167.29 ± 22.65
UA (mg/dL)	1.50 ± 0.14	1.66 ± 0.17	1.53 ± 0.21	1.64 ± 0.13
Cr (mg/dL)	1.20 ± 0.06 ^a	1.20 ± 0.21 ^a	0.86 ± 0.13 ^b	0.83 ± 0.14 ^b
BUN (mg/dL)	34.63 ± 6.38	31.43 ± 7.67	39.76 ± 11.60	25.88 ± 7.00
Na (meq/L)	133.57 ± 2.60	142.38 ± 2.60	141.43 ± 1.67	137.71 ± 2.26
K (meq/L)	5.86 ± 0.34	6.54 ± 0.87	5.39 ± 0.35	4.90 ± 0.19
Cl (meq/L)	84.57 ± 4.13	90.13 ± 3.79	92.57 ± 2.88	83.71 ± 3.45
P (mg/dL)	6.23 ± 0.25	8.76 ± 1.41	6.69 ± 0.76	9.70 ± 0.89
Ca (mg/dL)	10.07 ± 0.12	10.70 ± 0.32	10.60 ± 0.18	10.64 ± 0.39
<u>Urine</u>				
24h volume (mL)	31.38 ± 6.98	33.88 ± 6.18	43.63 ± 4.56	29.63 ± 4.00
Protein (mg/d)	35.18 ± 8.09	36.58 ± 13.77	75.48 ± 30.44	53.12 ± 19.57
CCr (ml/min)	0.92 ± 0.08	1.18 ± 0.35	1.85 ± 0.38	1.57 ± 0.35

Alb, albumin; TC, total cholesterol; TG, triglycerides; HDL, high-density-lipoprotein; LDL, low-density-lipoprotein; GOT, glutamyl oxaloacetic transaminase; GPT, glutamyl pyruvic transaminase; BS, blood sugar; UA, uric acid; Na, sodium; K, potassium; Cl, chloride; P, phosphorous; Ca, calcium; Cr, creatinine; UN, urea nitrogen; CCr, creatinine clearance

^{a,b} Significant differences ($P < 0.05$). Values are expressed as Mean ± SEM.

表三、攝取不同量 SPH 對以 L-NAME 誘發高血壓的大白鼠血漿和組織 nitrite/nitrate 濃度的影響

	C	E1	E2	E3
Plasma (μM/mL)	123.82 ± 4.45 ^b	114.29 ± 13.75 ^b	151.27 ± 20.52 ^b	289.27 ± 52.53 ^a
Urine (μM/mL)	79.93 ± 6.52	110.36 ± 13.00	85.97 ± 6.20	82.70 ± 5.53
Heart (μM/mg protein)	4.46 ± 0.43	4.54 ± 0.54	5.85 ± 0.65	5.93 ± 0.47
Aorta (μM/mg protein)	22.00 ± 9.19	14.47 ± 2.58	18.25 ± 3.02	13.56 ± 1.20
Kidney (μM/mg protein)	8.43 ± 1.07 ^b	8.86 ± 1.86 ^{ab}	9.70 ± 1.06 ^{ab}	13.37 ± 1.53 ^a

^{a,b} Significant differences ($P < 0.05$). Values are expressed as Mean ± SEM.

表四、攝取不同量 SPH 對以 L-NAME 誘發高血壓的大白鼠血和組織 SOD、catalase 活性及 MDA 濃度的影響

	C	E1	E2	E3
SOD (U/mg protein)				
RBC	1.47 ± 0.13	2.51 ± 0.29	1.68 ± 0.29	1.78 ± 0.15
Heart	9.64 ± 0.50 ^a	7.77 ± 0.64 ^b	7.85 ± 0.53 ^{ab}	6.55 ± 0.31 ^b
Aorta	11.01 ± 0.98	9.68 ± 1.12	9.81 ± 0.75	9.82 ± 0.84
Kidney	38.25 ± 9.62	35.16 ± 4.18	40.20 ± 3.84	37.98 ± 4.07
Catalase (U/mg protein)				
RBC	96.56 ± 16.44	109.13 ± 14.96	106.07 ± 11.62	130.66 ± 17.36
Heart	13.61 ± 1.63	14.25 ± 3.60	9.62 ± 0.93	10.05 ± 0.90
Aorta	49.00 ± 5.21	46.73 ± 6.22	35.01 ± 2.89	45.90 ± 4.00
Kidney	375.79 ± 39.05	471.77 ± 65.19	381.48 ± 72.27	328.35 ± 23.26
MDA (μM/mg protein)				
Plasma	6.45 ± 1.07	5.41 ± 0.87	7.01 ± 0.51	5.27 ± 0.80
Heart	0.91 ± 0.06 ^a	0.86 ± 0.05 ^{ab}	0.64 ± 0.04 ^{ab}	0.77 ± 0.06 ^b
Aorta	1.27 ± 0.08 ^a	0.89 ± 0.09 ^b	1.20 ± 0.17 ^{ab}	0.84 ± 0.06 ^b
Kidney	1.55 ± 0.05 ^a	1.55 ± 0.08 ^a	1.15 ± 0.02 ^b	1.41 ± 0.09 ^{ab}

^{a,b} Significant differences ($P < 0.05$). Values are expressed as Mean ± SEM.