[PG9303-0539] DOH93-TD-F-113-010 (4.P)

計畫編號：DOH93-TD-F-113-010

行政院衛生署九十三年度科技研究計畫

護肝功能評估方法之建立—
酒精性與化學性肝損傷動物模式之比較

研 究 報 告

執行機構：台北醫學大學保健營養學系

計畫主持人：楊素卿

研究人員：黃啟彰、李亦品

執行期間： 93 年 1 月 1 日至 93 年 12 月 31 日

＊＊本研究報告僅供參考，不代表本署意見＊＊

目　　錄

目　次	頁 數
中文摘要	3
英文摘要(Abstract)	4
前言	5
材料與方法	16
結果	24
討論	27
結論與建議	29
參考文獻	30
表一、各組大白鼠初始體重、期末體重、每日體重增加量、肝重以及相對肝重	33
表二、實驗期間各組大白鼠血漿中肝功能指數 GOT 之活性	33
表三、實驗期間各組大白鼠血漿中肝功能指數 GPT 之活性	34
表四、實驗期間各組大白鼠血漿中三酸甘油酯之濃度	34
表五、實驗期間各組大白鼠血漿中總膽固醇之濃度	35
表六、實驗期間各組大白鼠血漿中低密度脂蛋白總膽固醇之濃度	35
表七、實驗期間各組大白鼠血漿中高密度脂蛋白總膽固醇之濃度	36
圖一、各組大白鼠肝臟組織外觀圖	37
圖二、各組大白鼠肝臟病理切片圖(H&E stain)	38
圖三、大白鼠肝臟病理切片圖(Masson stain)	39
圖四、大白鼠肝臟病理切片圖(Silver stain)	39

【中文摘要】

本研究的目的是要評估酒精性肝臟疾病與四氯化碳所誘導之肝損傷在動物模式中的差異性。依照體重進行分組，將 50 隻雄性 Wistar 大白鼠分作五組，每組 10 隻，包括：酒精餵食組(A)、酒精餵食組並補充 silymarin (200 mg/kg BW/day) (B)、對照組(C)、四氯化碳處理組(D)、四氯化碳處理組並補充 silymarin (200 mg/kg BW/day) (E)。D 組與 E 組皮下注射 0.75 mL/kg 之四氯化碳 (40%四氯化碳/橄欖油, *v/v*)，每星期一次，A、B、C 組則是以等量之橄欖油代替。實驗期進行 3 個月。我們的數據顯示，C 組實驗末體重與每日體重增加量皆顯著較其他四組增加。然而，肝重與相對肝重方面，C 組則是顯著較其他四組低。另外，D 組與 E 組血漿中 AST 與 ALT 活性於第 2、4、6、8、10 以及 12 週時，皆明顯較 C 組提高。當比較血漿中三酸甘油酯(TG)、總膽固醇(TC)以及高密度脂蛋白膽固醇(HDL-C)濃度時，D 組與 E 組的含量於第 2、4、6、8、10 以及 12 週時，皆明顯較 C 組減少。相反地，A 組與 B 組血漿中 TC 與 HDL-C 的濃度於 2、4、6、8、10 以及 12 週時，皆明顯較 C 組增加。此外，組織病理切片觀察顯示 A、B、D、E 四組肝臟中皆有脂肪堆積情形之發生。但是，肝臟纖維化則是只見於 D 組與 E 組的肝臟中。這些研究結果顯示，在此動物模式中，酒精性肝臟疾病與四氯化碳所誘導的肝損傷這兩種不同的肝傷害的確存在相當大的差異性。

關鍵字: 酒精性肝臟疾病、四氯化碳、動物模式、脂質代謝

【Abstract】

The purpose of this study was to evaluate the differences between alcoholic liver disease and carbon tetrachloride (CCl_4)-induced liver injuries in animal models. According to body weight, fifty adult male Wistar rats were divided into five groups: ethanol group (A), ethanol-feeding with silymarin supplementation (200 mg/kg BW/day) (B), control group (C), CCl_4 group (D), CCl_4-injection with silymarin supplementation (200 mg/kg BW/day) (E). Groups D and E were subcutaneously injected with 0.75 mL/kg BW of 40% carbon tetrachloride dissolved in olive oil once a week, while groups A, B, and C were injected with olive oil only. The experimental period was 3 months. Our data show that final body weight and daily body weight gain in group C were significantly increased than in other four groups. However, liver weight and relative liver weight in group C were decreased significantly than in others. Moreover, plasma AST and ALT activities in groups D and E were significantly higher than those in group C at weeks 2, 4, 6, 8, 10 and 12. When compared to plasma triglyceride (TG), total cholesterol (TC), and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) concentrations in group C, those of groups D and E were all significantly lower at weeks 2, 4, 6, 8, 10, and 12. On the contrary, plasma TC and HDL-C levels in groups A and B were significantly higher than those in group C at week 2, 4, 6, 8, 10, and 12. Furthermore, the apparent accumulation of fat within hepatocytes was observed in groups A, B, D, and E. But, liver fibrosis was only seen in group D and E. These results suggest that large differences between alcohol-induced liver disease and CCl_4-induced liver injuries in this animal model.

Key words: alcoholic liver disease、carbon tetrachloride、animal model、lipid metabolism

【前言】

(1)政策或法令依據

行政院衛生署從民國 88 年開始推動健康食品管理法至今已公佈多種保健功效評估草案,「護肝功能評估方法」即是其中的一項。目前公佈的「護肝功能評估方法」乃是針對化學性肝損傷的動物模式，至於其他因素引起的肝損傷，如酒精引起的肝臟損傷，則無法進行評估。

(2) 問題狀況或發展需求

<u>酒精性肝臟疾病之研究對於國人的重要性</u>

酒精濫用(alcohol abuse)、酒精依賴(alcohol dependence)以及其他酒精引起之健康問題是現代社會極具挑戰性及重要性之公共衛生健康課題(1)。長期攝取酒精之後，在人體內引起之生化以及病理學上之傷害是非常複雜的，而其中受影響最深的組織就是酒精代謝的主要組織—肝臟。長期攝取酒精所造成之肝臟損傷包括：脂肪肝、酒精性肝炎以及肝硬化等，若不即時治療更會引起肝癌。脂肪肝主要是因為肝臟中發生脂肪堆積的現象，而酒精性肝炎則是指肝細胞遭受破壞，引起肝臟廣泛發炎的現象。而酒精性肝炎更會使得患者容易受到病毒之侵入，而併發病毒性肝炎，其中又以酒精性肝炎併發 B 型及 C 型肝炎罹患率最高(2)。因發炎而死亡之肝臟細胞會形成結疤組織，結疤組織繼續形成就會造成肝硬化。另外，肝臟功能發

生異常會間接導致其他併發症，如：腎功能的衰退、心血管疾病以及中樞神經系統異常等。這些併發症將會提高病人因長期攝取酒精之死亡率。西方人之酒精性肝臟疾病患者比東方人多，因此對於因酒精所引起致之疾病的研究開始的比較早也比較多。相反地，東方人，尤其是台灣人，肝臟疾病大部分是肝炎病毒所引起的，而且國人飲酒量沒有西方人多，因此，病毒性肝炎之研究在台灣就比酒精性肝臟疾病來的重要。不過，台灣近二十年來，經濟發展快速，政府開放酒類飲料進口，國人接觸酒類機會增加，尤其是國人『乾杯式』的飲酒方式使得酒類之消費量快速增加，直到西元2000 年國人酒類消費量已達到 1975 年的十倍左右，而且酒精性肝臟疾病罹患率也相對提高(3)。在台灣地區，因 B 型及 C 型肝炎病毒所引起之慢性肝疾病罹患率很高的情況之下，當這些病毒性慢性肝炎病人攝取含有酒精成分之飲料後，肝臟疾病會快速惡化，增加併發症產生之機率，提高肝臟疾病之死亡率。另外，根據研究指出，東方人因遺傳因素，粒線體中乙醛脫氫酶(acetaldehyde dehydrogenase, ALDH)中之同功酶 ALDH2 產生突變機率較西方人高，所以東方人代謝乙醛能力較差，攝取酒精之後，乙醛容易堆積體內產生毒性，若長期攝取酒精，罹患酒精性肝臟疾病之機率較西方人高(4)。由此可知，雖然東方國家之酒類攝取量比西方國家少，但是東方人罹患酒精性肝臟疾病之機率不見得比西方人低。由以上可知，在 B 型

及C型等病毒性慢性肝炎罹患率高的台灣地區，更應該重視因酒精攝取所引起的肝臟疾病問題。

護肝功能保健食品之評估與規範

目前市面上標榜護肝功能的保健食品種類繁多，但目前通過保健功效評估的產品至92年8月為止只有以下三項(5)，如下表：

產品名稱	有效成分	保健功效
雙鶴極品靈芝	靈芝抽出物（三帖類、多醣體）	根據動物試驗結果，對四氯化碳誘發大鼠肝臟的損傷有下列功效： (1)可降低血清GOP、GPT值。 (2)可增加肝臟蛋白質含量。
如新華茂超級靈芝	靈芝萃取粉末（菌種名：Ganoderma lucidum）、靈芝孢子粉、明膠、水分	根據動物試驗結果，對四氯化碳誘發大鼠肝臟的損傷具有下列功效：可降低血清中GPT和GOT值。
維力康膠囊	甘草抽出物凍乾粉、明膠、乳糖、五味子抽出物凍乾粉、橘皮抽出物烘乾粉、蘆薈汁凍乾粉、DL-蛋胺酸、硬脂酸美、矽鋁酸鈉、二氧化鈦、食用黃色4號、食用黃色5號	根據動物試驗結果，對四氯化碳誘發大鼠肝臟損傷可能具有降低血清GOT、GPT值

由表可知，在說明有效成分時，必須說明是以何種方式誘導肝臟損傷，因此，肝損傷的誘導方式乃為其評估方法的重點之一。

護肝功能保健食品之問題點及需求

由上表也可以知道，至目前為止保健食品中，只有可以降低肝功能指標但是並沒有可以改善肝臟病理現象的產品，如：改善脂肪肝或肝炎等，推測可能與肝損傷誘導方式有關。根據文獻指出，高脂肪飲食或飲酒過量，初期時會造成脂肪浸潤，然後造成脂肪肝，此時尚為可逆階段，即時用藥

或改善飲食，肝臟疾病可以完成痊癒(6)。若脂肪肝現象沒有改善，更嚴重時就會造成肝臟細胞發炎，然後就會造成細胞壞死、纖維化，而造成肝硬化的現象。若肝臟有肝硬化的現象，藥物或其他保健的用品就很難發揮功效(6)。以四氯化碳誘導的肝損傷，是於用誘導動物產生肝臟硬化(cirrhosis)的方法，其投與方式以及劑量很多，目前的文獻也很難規範出一定的方法及劑量(詳細述於第(3)點)。另外，以本人研究室之經驗，實驗前必須先測試四氯化碳之劑量，否則在飼養期間會造成動物大量死亡的情形，死後觀察的結果，大多因肝硬化而致死。**因此，目前護肝功能評估方法中的問題點為化學性肝損傷通常會造成太嚴重的肝臟損傷，而造成測試產品發揮不了效用，況且測試物是食品成分並不是藥物，應站在預防的觀點，若能在其輕微的肝損傷造成前即時修護或預防，應更能突顯出保健食品的所扮演之角色。**

由以上可知，目前護肝功能評估方法急需完成以下幾個評估工作，建立更完整的評估方法：

(a)找出四氯化碳誘導肝損傷的適當給予劑量，修正並保留原有的化學性肝損傷模式。

(b)另尋可以誘導較輕微肝損傷的動物模式，而且此模式必須要類似於人類由於生活習慣或飲食不當所引起的肝臟疾病。

本研究針對以上兩點，整合國內外文獻，並根據本研究室經驗以及研究成果，提出酒精性大白鼠肝損傷模式，並於研究計劃中修正四氯化碳誘導肝損傷的劑量，將酒精性與化學性肝損傷做一有系統的比較。

(3) 國內外相關研究之文獻探討

酒精性肝損傷模式

(a) 誘導方式

酒精性肝損傷模式建立初期主要應用於研究人類的酒精性肝臟疾病，其誘導的動物模式主要有兩種，即 Lieber-DeCarli 酒精液體飼料以及 Tsukamoto-French 的酒精液體飼料胃插管的實驗模式。而目前則是以 Lieber-DeCarli 酒精液體飼料最常受到引用(7)。Lieber-DeCarli 酒精液體飼料乃是將酒精與動物所需的各類基本的營養素混合，再添加可使成分懸浮呈均一溶液的成分，使動物在攝取營養的同時也會攝取到酒精(12~18g/kg BW)。根據文獻指出，攝取酒精液體飼料約 3 週後動物就會產生脂肪肝現象，而 6 週後就會有肝炎的現象產生，肝臟疾病形成率 98%，而且不會造成動物死亡(8)。

(b) 誘導肝損傷之作用機轉

肝臟是酒精代謝的主要場所，可以代謝酒精的酵素系統有三種：(1)酒精脫氫酶(alcohol dehydrogenase)－乙醛脫氫酶(acetaldehyde

dehydrogenase)，(2)MEOS 系統(microsomal ethanol oxidizing system)以及(3)過氧化氫酶系統(catalase)，身體內之酒精代謝系統會先將酒精先轉變成乙醛(acetaldehyde)之後，再將乙醛轉變成醋酸。然後，醋酸進入三羧酸循環進行代謝，最後變成二氧化碳與水。酒精性肝臟疾病之形成原因，除了酒精及其有毒代謝產物—乙醛對肝臟所造成之直接毒性以外，許多營養生化因子與酒精性肝臟疾病之形成亦有密切的關聯性，包括肝細胞中氧化還原(redox)狀態之不平衡以及自由基形成等兩大因素(9)。肝細胞中氧化還原(redox)狀態之不平衡狀態就是指 **NADH／NAD^+的比值增加**，因為 NADH／NAD^+的比值增加會造成三羧酸循環中脫氫酵素，如：iso-citrate dehydrogenase、α-ketoglutarate dehydrogenase 等酵素之活性降低，造成整個循環之代謝活性降低。相反地，NADH／NAD^+的比值增加會使 acetyl CoA carboxylase 活性增加，促進 Acetyl CoA 轉變成 malonyl CoA，進而進入脂肪酸合成的生化反應。另外， NADH 之增加亦會使得 glycerophosphate dehydrogenase(GPDH)活性增加，促進 dihydroxyacetone phosphate(DHAP)轉變成 glycerol-3-phosphate(glycerol 3-P)，而 glycerol 3-P 因為可以提供脂質合成所需的 gycerol，其濃度升高則會促進脂質生成(10)。因此，長期的酒精攝取會使得脂質過度堆積於肝臟，**造成酒精性脂肪肝**。另外，根據近年來的研究報告指出，**酒精性肝臟疾病之形成與自由基有密切的關聯性**(11)。

身體之 MEOS 在代謝酒精時，會同時誘導 cytochrome P450 II E1 以及 xanthine oxidase pathway 產生活性氧類(reactive oxygen species, ROS)，尤其是超氧自由基(superoxide free radicals)及氫氧自由基(hydroxyl free radicals)(11)。因此在大量酒精出現於體內時，自由基之生成也隨之增加，危害身體組織(12)。另外，乙醛與細胞膜蛋白的結合物也會刺激嗜中性白血球，使其生成大量的自由基，攻擊肝細胞(13)。不僅如此，乙醛亦會與體內 SH 化合物結合，造成體內抗氧化物質—麩胱甘肽(GSH)濃度下降(13)。長期攝取酒精也會造成體內抗氧化酵素活性與抗氧化能力降低，使得脂質過氧化物大量產生，進而引起各種酒精性肝臟疾病(14-17)。酒精代謝相關的報告也指出，長期攝取酒精後，其血液以及肝細胞中的維生素 E、A 以及 β-胡蘿蔔素等抗氧化成分的濃度會降低(18-20)。

(c) 於肝臟疾病方面的應用

目前酒精誘導肝損傷之動物模式不只應用於酒精性肝臟疾病的研究，只要是提出藥物或食物成分之護肝功能評估的相關報告，大部分也都會利用酒精誘導肝臟損傷。例如：Lin 等人測試 *Arctium lappa Linne* 之護肝功能評估就使用酒精液體飼料加上低劑量四氯化碳腹腔注射的評估方式，並指出 *Arctium lappa Linne* 可以改善因酒精和四氯化碳所引起的 cytochrome P450 reductase 活性降低以及血中三酸甘油酯和脂質過氧化物增加的現象，

並且減輕脂肪肝以及肝臟發炎現象(21)。另外，Akimoto 等人在評估芝麻的護肝功能時，也同時利用液體酒精飼料以及低劑量四氯化碳氣體吸入的誘導肝臟損傷，結果發現芝麻可以降低脂肪肝的形成(22)。**但是，至目前為止，並沒有分開具體比較酒精性與化學性肝臟損傷之相關文獻。**

化學性肝損傷模式

(a)誘導方式

四氯化碳的投與方式有口服、皮下注射、腹腔注射以及氣體吸入等方式(23)。但是，因為動物對四氯化碳的感受性之差異非常大，常常會造成有些動物只有在肝臟組織中產生輕微的間隔，但是有些動物卻因肝硬化而死亡。McLean 等人指出，大白鼠腹腔注射四氯化碳(40% CCl_4 / olive oil , 2mL/kg BW)，每週兩次，結果發現第一週的死亡率達 30%，而且注射 10 次以後，5%大白鼠的肝臟只有輕微間隔產生，而其他大白鼠則產生嚴重的肝硬化(24)。另外也指出，若利用皮下注射，死亡率可降低至 5%，但是則要花單 20 週以上才能引起肝硬化(24)。Luster 等人在一篇 review 的文章中指出，化學性肝損傷動物模式以四氯化碳腹腔或皮下注射的方式最常被利用於模擬人類肝損傷模式，其劑量大約於 0.11~1.2g/kg BW 左右，大多將四氯化碳溶於 olive 或 corn oil 中，而動物中小白鼠對於四氯化碳敏感性較大白鼠高(25)。由此可知，相關文獻中，四氯化碳的投與方式以及其劑量範圍

差異性非常大。

(b)誘導肝損傷之作用機轉

四氯化碳引起肝損傷的主要機轉乃是，因為四氯化碳在體內由肝臟中的 cytochrome P450 代謝後會轉變成 $^{\cdot}CCl_3$，此自由基會造成 glutathione peroxidase 活性下降，使得身體抗氧化能力下降，並引起脂質過氧化物質的堆積(26)。因此，四氯化碳所引起的肝損傷也與肝臟中的藥物代謝系統以及氧化壓力有關。

(c)於肝臟疾病方面的應用

四氯化碳的肝損傷模式乃模擬人類之肝硬化疾病，應用於評估治療肝纖維化等肝臟疾病之藥物或食物成分之治療效果。但是，多數的文獻中並無一致的投與劑量及方式(23)。

<u>酒精性與化學性動物肝損傷模式之比較</u>

如同上述，因為目前並沒有具體比較酒精性與化學性肝臟損傷動物模式之相關文獻，以下根據酒精性或化學性肝損傷相關的個別文獻整合比較(7,8,23-27)。

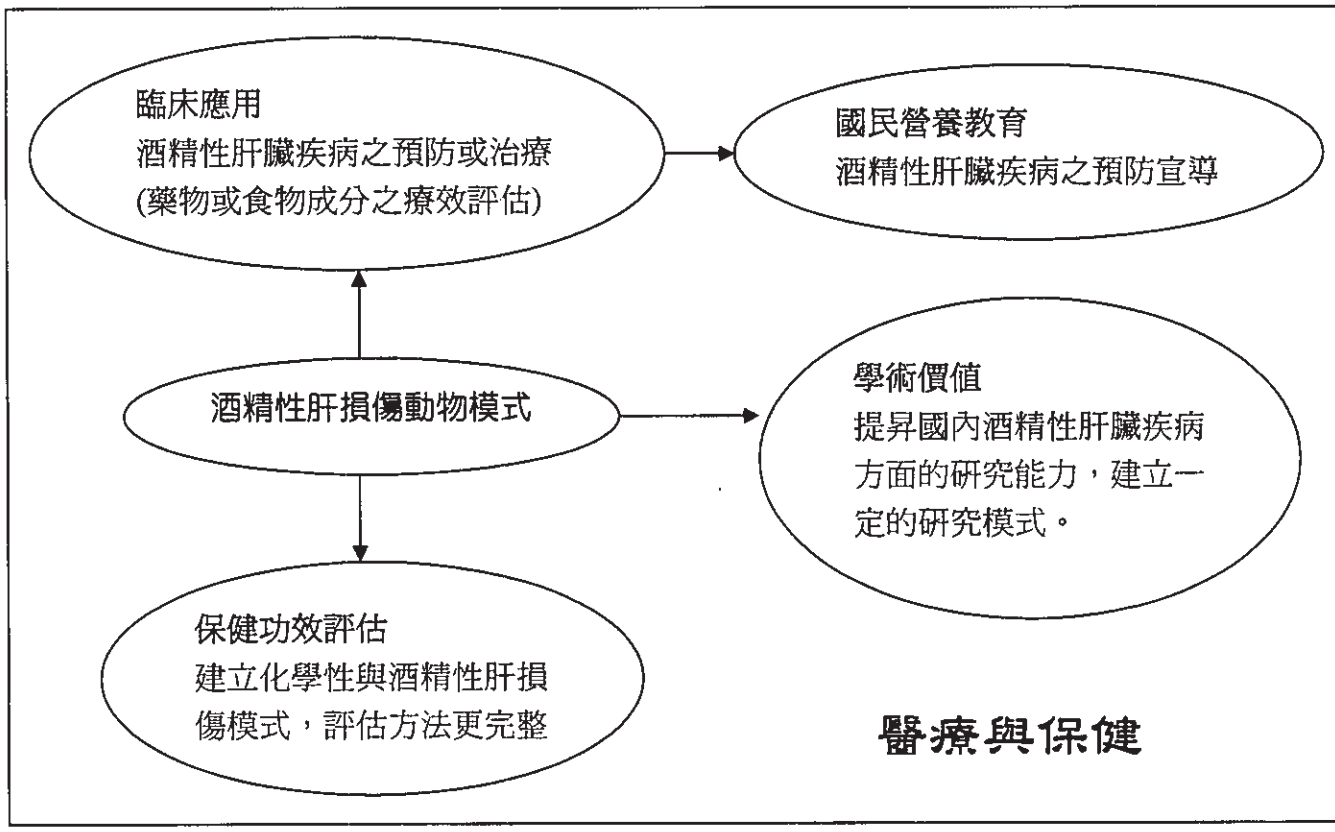
	酒精性肝損傷	化學性肝損傷(四氯化碳投與)
投與方式	口服(液體飼料或胃插管)	口服、皮下注射、腹腔注射以及吸入
劑量	12~18g/kg BW(每日攝取量)	0.11~1.2g/kg BW(1~2 次/週)
飼養週數	3~6 週	8 週~10 週
作用機轉	改變肝細胞氧化還原狀態	氧化壓力($^{\cdot}CCl_3$ free radical)

	氧化壓力(superoxide free radicals 及 hydroxyl free radicals)	
肝損傷程度	脂肪肝、肝炎以及輕微肝纖維化	重度脂肪變性、重度發炎、肝纖維化
與人類肝臟疾病的相似程度	酒精性脂肪肝屬於非特異性的大泡狀脂肪肝，有時會出現小泡狀，與人類相似。	(1) 膠原蛋白含量相似 (2) 屬於 type I 和 III 膠原蛋白之混合型肝硬化(人類是 type I 膠原蛋白含量較多) (3) 不會形成肝癌(人類會由肝硬化形成肝癌)
問題點	形成肝硬化需較長時間，或另外添加誘導劑。	動物個體差異性大，所誘導的肝損傷程度不一，且死亡率高

由以上的表可知，化學性以及酒精性兩種方式雖然都是肝損傷的誘導方式，但在其作用機轉以及肝損傷的程度而言，還是有其差異性。因此，建立化學性以及酒精性肝損傷之動物模式對於護肝功能評估而言是有其必要性的。

(4) 本計劃與醫療保健之相關性

本研究計劃提供「護肝功能評估」的另一種動物模式，有助於健康食品管理相關單位對於護肝健康食品的規範。本計劃與醫療保健之相關性圖示如下：


臨床應用
酒精性肝臟疾病之預防或治療
(藥物或食物成分之療效評估)
國民營養教育
酒精性肝臟疾病之預防宣導
酒精性肝損傷動物模式
學術價值
提昇國內酒精性肝臟疾病方面的研究能力，建立一定的研究模式。
保健功效評估
建立化學性與酒精性肝損傷模式，評估方法更完整
醫療與保健

【材料與方法】

(一)實驗動物之分組及飼養

1. 實驗動物之分組及飼養

擬使用 Wistar 系雄性大白鼠 50 隻，體重約 160~180g，分成對照組、酒精組、酒精＋silymarine 組、四氯化碳組以及四氯化碳＋silymarine 組等五組，每組 10 隻。實驗動物個別飼養於不銹鋼網製籠內，置於室溫 23±2°C ，濕度控制於 55±10%，12 小時明暗更替的飼育室內，每週紀錄體重二次。各組之飼養飼料以及肝損傷誘導方式如下表：

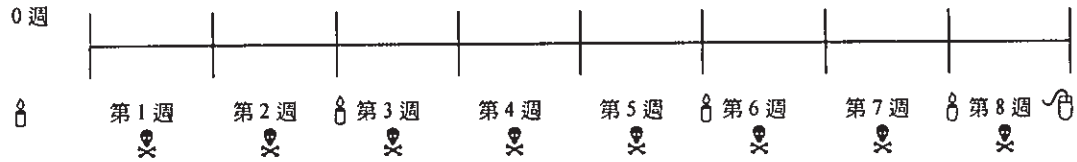
組別	飼料種類	肝損傷誘導方式
對照組	正常液體飼料	無
酒精組	含酒精之液體飼料(36%的熱量是由酒精所提供，即 1L 液體飼料中含有 50g 酒精)	酒精性
酒精＋silymarine 組	含酒精之液體飼料添加 silymarin(200mg/kg BW)	酒精性
四氯化碳組	正常液體飼料	化學性，每週腹腔注射四氯化碳一次(0.75mL 40% CCl_4 in olive oil/kg BW)(此劑量乃依照本實驗室執行護肝評估實驗時所測試出之最適注射量)
四氯化碳＋silymarine 組	正常液體飼料添加 silymarin(200mg/kg BW)	化學性，每週腹腔注射四氯化碳一次(0.75mL 40% CCl_4 in olive oil/kg BW)

依據 Lieber 等人之報告，本研究中的酒精液體飼料中 36%的熱量是由酒精(50g/L)所提供，其他成分包括 casein(41.4g/L)、corn oil(39.6g/L)、fiber(10g/L)、dextrin maltose(25.6g/L)以及 ICN:AIN-76 之維生素(2.5g/L)及礦

物質(2.6g/L)等。各組以等熱量的方式飼養，即攝取酒液體飼料的組別以自由攝取的方式供應，所攝取的毫升數於次日以相同熱量(isocaloric)的對照組飼料餵養攝取正常液體飼料的組別。正常液體飼料中是以 Dextrin maltose(115.2g/L)取代酒精的熱量。以上之液體飼料均添加 xanthane gum(3.0g/L)使液體飼料中之成分呈均勻懸浮狀後，以特製之 Ritcher drinking tube 餵養(7)。此種飲水瓶開口較大，不會引起液體飼料阻塞的問題，已在預備實驗中訂製多個，經測試後並無飼養方面的問題。因為液體飼料已含有水分，不另外供給飲水。

2. 實驗設計及流程

依照以上的方式飼養 8 週。於實驗開始前以及第 2、4、6 週由大白鼠尾靜脈抽血，並於第 8 週犧牲動物，由腹大動脈抽取血液。腹大動脈抽血完畢後，於肝臟最大右葉的同一位置割取 1 公分見方的組織，放入 10%的 formalin 中，做進一步的病理染色。之後，以生理食鹽水從肝門靜脈灌入，進行肝臟灌流後，取出肝臟。實驗流程如下：



尾靜脈採血
四氯化碳組以及四氯化碳＋silymarine 組注射四氯化碳
犧牲

(二)血液以及肝臟處理

血液收集於含肝素(heparin)或 EDTA 的試管中，收集之血液於 1200xg 4°C 下離心 15 分鐘，分離血漿與血球。取得的血漿分裝於 1.5 mL 離心管中。血球則再以 0.9%生理食鹽水清洗兩次，於 1200 xg 4°C 下離心 10 分鐘，再將血球分裝於 1.5 mL 離心管中。收集之血漿與血球，儲存於-80°C 下，並於兩週內儘快進行分析。犧牲動物取出的肝臟秤重後，將肝臟剪碎加入 4°C 的緩衝液(50 mM Tris/0.1 mM EDTA, pH 7.6)混和並均質化後，於 8000xg 4°C 下超高速離心 6 分鐘，分離肝臟細胞質部份，儲存於-20°C 下，供為以下的分析使用。

(三)分析項目及方法

1. 肝功能指標－血漿 GOT、GPT 活性值

利用市售試劑組(GOT/GPT, TA-E, Serotech)測量血漿中 GOT 與 GPT 的活性。

2. 紅血球中的抗氧化酵素活性

抗氧化酵素的測定包括：Superoxide dismutase(SOD)、Catalase、Glutathione peroxidase(GPx)、glutathione reductase(GRd)等。

(1)SOD 活性

取自全血離心過的 RBC，加入 4℃生理食鹽水清洗三次後，取 RBC 50μL 到 1.5 mL 離心管中，加入 200μL 去離子水(4℃)，混和後再加入 400μL EtOH / $CHCl_3$ (5/3, v/v)溶劑(4℃)，震盪均勻後，於 4℃、3,000 xg 條件下離心 10 分鐘，取上清液，依據 Nebot 等人的方法(28)，以市售試劑組(No. 574600, Calbiochem)測定 SOD 活性(unit/mg protein)。

(2)Catalase 活性

取自全血離心過的 RBC，加入 4℃生理食鹽水清洗三次後，取 RBC 50μL 到 1.5 mL 離心管中，加入 450μL potassium-phosphate buffer(K-P buffer) (4℃)，混和後再加入 400μL EtOH/$CHCl_3$(5/3, v/v)溶劑(4℃)，震盪均勻後，於 4℃、3,000 xg 條件下離心 10 分鐘，取上清液進行 10 μL，並加入 2.990μL 30%H_2O_2 K-P buffer 混勻後，於波長 240nm 下紀錄 3 分鐘內吸光值的變化。將測定值代入公式，求得肝細胞中 catalase 活性(unit/mg protein) (29)。

(3)GPx 活性

取自全血離心過的 RBC，加入 4℃生理食鹽水清洗三次後，取 RBC 50μL 到 1.5 mL 離心管中，加入 200μl 去離子水(4℃)，震盪混勻後，於 4℃、8,500 xg 條件下離心 10 分鐘，並取上清液，以市售試劑組(No. 354104, Calbiochem)測定。分別取 70μL 上清液、350μL 反應液(0.2mM NADPH)、350μL 緩衝液(50mM Tris-HCl, 5mM EDTA, pH7.6)以及 350μL 試劑(0.22 mM tert-Butyl Hydroperoxide)依序加入混勻後，於波長 340 nm 下紀錄 3 分

鐘內吸光值的變化。將測定值代入公式，求得 GPX 活性(mU/mg protein)(30)。

(4)GRd 活性

依 Goldberg 與 Spooner 之方法。抗氧化酵素 GSH-Rd 活性用市售試劑組(GR2368，Randox)測得(31)。40 μL 檢體與 1000 μL 反應受質(2.2 mM 氧化的麩胱甘肽於 100 mM potassium phosphate, pH 7.3/0.5 mM EDTA 溶液)混和均勻，加入 200 μL NADPH(0.17 mM)，於 37°C 波長 340 nm 下掃瞄 5 分鐘，GSH-Rd 活性(unit/L)以($4983 \times \triangle A_{340\ nm}$/min)求得，最後其活性以 mU/mg protein 表示之。

3. 抗氧化狀態

擬測量血漿中以及肝臟中的維生素 E 含量、紅血球以及肝臟中的還原型麩胱甘肽(reduced glutathione, GSH)含量。

(1)血漿中以及肝臟中的維生素 E 含量

擬採用 Lederman 等人測定血漿中以及肝臟中的維生素 E 含量(32)。HPLC 系統之條件為 Jasco 980-PU Intelligent HPLC Pump；Jasco 950-AS Intelligent Sampler；Jasco 975-UV Intelligent UV/Vis Detector；Jasco 920-PF Intelligent Fluorescence Detector。分析軟體為訊華 SISC(色層分析儀數據處理系統)，分析管柱為 RP-18E endcapped (5 μm)，移動相為 methanol：

toluene = 3 :1，流速為 1 mL/min，以螢光偵測器於 excitation—288 nm 及 emission—340 nm 波長下測量維生素 E 之濃度。

(2) 紅血球以及肝臟中的 GSH 含量

取自全血離心過的 RBC，加入 4℃生理食鹽水清洗三次，取 RBC 50μL 到 1.5 mL 離心管中，加入 4℃的 6% MPA 200μl 震盪混合均勻後，於 3,000 xg、4℃條件下離心 10 分鐘，取上清液，擬利用依據 Anderson 的方法(33)，以市售試劑組(No. 354102, Calbiochem)測定紅血球中 GSH 含量。另外，取 0.5 克的肝，加入 2mL 4℃、5% MPA 溶液，使用組織均質機(polytron)將肝臟均質化，取肝臟均質液到 1.5 mL 離心管中，於 4℃、3,000 xg 條件下離心 10 分鐘。取出上清液分析 GSH 含量。分析方法同紅血球部分。

4. 脂質過氧化物含量

擬測量血漿中以及肝臟中的脂質過氧化物 malondialdehyde(MDA)含量。擬以市售試劑組(No. 437634, Calbiochem)測定血漿中 MDA 含量。另外，取 0.5 克的肝，加入 2mL 4℃、50 mM 的 Tris-HCl 溶液，使用組織均質機(polytron)將肝臟均質化，取肝臟均質液到 1.5 mL 離心管中，於 4℃、8,500 xg 條件下離心 10 分鐘，取上清液以市售試劑組分析 MDA 含量。

5. 血脂質含量

擬測量血漿中三酸甘油酯(triglyceride, TG)、總膽固醇(total cholesterol, TC)、低密度以及高密度脂蛋白膽固醇(LDL-C、HDL-C)含量。另外，亦擬測量肝臟中的 TG 以及膽固醇含量。

TG 則擬利用市售三酸甘油酯測定試劑組(Glycerol-3-phosphate oxidase-para-aminophenazone (GPO-PAP)method, Randox laboratories Ltd. Co.)分析。而 TC 擬利用市售膽固醇分析試劑組(Enzymatic endpoint method, Randox laboratories Ltd. Co.)，另外，血漿 LDL-C 及 HDL-C 濃度則擬利用市售血漿脂蛋白膽固醇試劑組(Enzymatic endpoint method, Randox laboratories Ltd.Co.) 測定。肝臟部分則擬利用前述之肝臟樣本處理中所述之方式處理後，依照上述血漿中之測定法分析肝臟中 TG 與膽固醇的含量。

6. 總蛋白質含量

以上所有利用蛋白質含量校正的數據均擬利用 Bio-Rad Protein Assay Kits 分析樣本中之蛋白質含量。Coomassie Brilliant blue 試劑會與蛋白質結合產生藍色反應，再以分光光度計(Hitachi U-2000 Spectrophotometer)測定 546nm 之吸光值，並以 BSA(bovine serum albumin)作為標準品，利用內插法計算樣品中蛋白質含量。

7. 肝臟病理切片之變化

除了 HE stain (hematoxylin and eosin stain)以外，為了觀察慢性肝損傷，包括：肝細胞脂質變性、壞死、纖維化等變化，另進行網狀纖維及膠原纖維的特殊染色，即 Masson stain 以及 Reticulum silver stain。病理組織部分由病理學科醫師進行評定。針對慢性肝損傷，針對肝細胞發炎的程度、脂質變性、肝細胞壞死及膽管增生等部分予以半定量分析。評估分數是由"0"到"4"分，其中"0"代表沒有(absent)；"1"代表少量(trace)；"2"分代表輕微(weak)；"3"分代表中等程度(moderate)；"4"分代表極嚴重(strong)。而對肝纖維化的半定量分析，將肝纖維化區分為以下五個等級："0"分代表正常肝組織、沒有任何肝纖維化；"1"分代表有膠原的增生，但沒有形成中隔(在中央靜脈或門脈區有放射狀纖維增生)；"2"分代表在中央靜脈和門脈區二者間，形成不完全的中隔(此中隔彼此沒有交會)；"3"分代表形成完整的中隔，中間彼此交會，並將肝實質分割成許多節片斷，但此中隔尚很薄；"4"分代表形成完全的中隔，且中隔變厚，亦即完全的肝硬化。

(四)統計分析

採用 SAS 電腦統計套裝軟體進行 two way ANOVA (one way analysis of variance)分析。實驗數據均以 mean±SD 表示，以 $p<0.05$ 代表具有統計上之意義。

【結果】

本次研究報告針對五組大白鼠，分別為：酒精組(A)、酒精補充 silymarine 組(B)、對照組(C)、四氯化碳組(D)以及四氯化碳補充 silymarine 組(E)，各項分析所得之結果敘述如下。

1. 體重與肝臟重之相關變化

實驗期間各組大白鼠初始體重、期末體重、每日體重增加量以及大白鼠犧牲後所秤得之肝臟總重量與經過計算後所得之相對肝重如表一所示。

於實驗初期，各組的大白鼠平均體重皆無差異。在實驗末期，餵食酒精的 A 組與 B 組以及注射四氯化碳的 D 組與 E 組之體重，皆明顯較對照組 C 組顯著下降($P<0.05$)。至於每日體重增加量，也是一樣的情形，對照組 C 組明顯較餵食酒精的 A 組與 B 組以及注射四氯化碳的 D 組與 E 組增加($P<0.05$)。

在肝臟重量部分，可以明顯地發現到單一餵食酒精的 A 組與注射四氯化碳的 D 組與 E 組顯著較對照組增加($P<0.05$)。至於，相對肝重部分，則是以對照組的平均數值明顯較其他四組低($P<0.05$)。顯示，餵食酒精或是注射四氯化碳皆會造成肝臟腫大的情形。

2. 肝功能指標－血漿 GOT、GPT 活性值

如表二與表三所示，各組大白鼠血漿中肝功能指數 AST 與 ALT 活性於實驗初期第 0 週皆無顯著差異。然而在實驗期第 2、4、6、8、10 以及 12 週時，餵食酒精組無論有無補充 silymarin，A 組與 B 組血漿中 GOT 與 GPT 活性皆較對照組(C)提高。至於注射四氯化碳組，無論有無補充 silymarin，隨著實驗期的進行，D 組與 E 組血漿中 GOT 與 GPT 活性則是皆顯著較 A、

B 以及 C 三組顯著提升($P<0.05$)。實驗期 12 週結束時，D 組與 E 組血漿中 GOT 與 GPT 活性分別較對照組顯著提高 12 倍與 17 倍以及 38 與 57 倍 ($P<0.05$)。

由肝功能指數結果顯示，在為期 12 週的實驗期間，注射四氯化碳會比餵食酒精更容易造成大白鼠急性肝損傷，而且長期注射四氯化碳將比長期餵食酒精的方式誘導更嚴重的肝損傷，甚至於造成無可回復的肝硬化。

3. 血脂質含量之變化

於實驗初期，各組血漿中 TG、TC、LDL-C 以及 HDL-C 的濃度皆無顯著差異(表四、表五、表六與表七)。

於實驗進行期間，可以發現到注射四氯化碳的組別(D 組與 E 組)其血漿中 TG、TC 以及 HDL-C 濃度皆顯著較其他三組減少($P<0.05$)。相反地，餵食酒精的組別(A 組與 B 組)，血漿中 TC 與 HDL-C 的濃度皆顯著較其他三組增加($P<0.05$)。

4. 紅血球以及肝臟中的抗氧化酵素活性

由表八得知，除了 SOD 之外，實驗末各組紅血球中抗氧化酵素 GPX、GRD 以及 CAT 之活性皆無顯著差異。推測可能是因為酒精與四氯化碳進入大白鼠體內後主要由肝臟進行代謝，因此對紅血球所造之氧化傷害較小，且紅血球之半衰期較長，故各組紅血球中抗氧化酵素活性皆沒有顯著差異。

肝臟中抗氧化酵素活性如表九所顯示，首先，在 GPX、SOD 與 CAT 活性方面，D 組與 E 組皆顯著較 C 組顯著降低($p<0.05$)。先前有研究結果指出，

四氯化碳所產生的自由基不但會抑制蛋白質之合成，更會抑制特定酵素之活性，而造成肝臟中抗氧化酵素 GPX 活性下降(Szymonik-Lesiuk et al., 2003)，至於 SOD 與 CAT 活性降低的原因，我們推測可能是長期投予四氯化碳會抑制肝臟中 SDO 與 CAT 蛋白質的合成而使此兩酵素的活性降低所導致。此外，在肝臟中 GRD 活性方面，只有 D 組單獨注射四氯化碳組的 GRD 活性顯著較對照組 C 組下降約 40% ($p<0.05$)。其於各組則是無顯著差異。推測可能是因為四氯化碳所產生的自由基會直接造成 GRD 蛋白質合成減少而使活性失活，因而使肝臟中 GRD 的活性下降。

6. 抗氧化物質 GSH 與脂質過氧化物 MDA 之濃度

紅血球中抗氧化物質 GSH 濃度方面(表十)，單獨投予酒精組 A 組以及有注射四氯化碳的 D 組與 E 組皆顯著較對照組 C 組減少($p<0.05$)。肝臟中抗氧化物質 GSH 濃度方面，只有單獨注射四氯化碳的 D 組顯著較對照組 C 組減少 31% ($p<0.05$)，補充 silymarin 後，E 組則是較 D 組顯著增加 28% ($p<0.05$)，至於投予酒精的兩組 A 組與 B 組則是無顯著差異。

在血漿中 MDA 濃度方面(表十)，注射四氯化碳的 D 組與 E 組分別顯著較 C 組增加 55%與 47% ($p<0.05$)，至於投予酒精的 A 組與 B 組則是只有比 C 組有增加的情形。此外，肝臟中 MDA 濃度方面，A 組與 B 組以及 D 組與 E 組皆分別較 C 組增加 0.87、0.60 以及 1.49 與 1.33 倍($p<0.05$)。

由 GSH 與 MDA 兩項結果顯示，相較於對照組 C 組，注射四氯化碳的 D 組與 E 組對於大白鼠抗氧化物質之減少以及脂質過氧化物質之增加的情形皆顯著較餵食酒精組大白鼠更加嚴重。

7. 肝臟外觀以及組織病理切片之變化

各組大白鼠肝臟經過生理食鹽水進行灌流，將肝臟組織中的血液沖堤乾淨之後，其外觀如圖一所示。可以觀察到相較於 C 組對照組正常肝的大小尺寸、形狀與顏色，A 組與 B 組的肝有稍微漲大且色澤較淺的外貌。至於 D 組與 E 組的肝臟則是可以明顯觀察到肝腫大以及脂肪肝的情形。

在肝臟組織病理切片部分，首先從 H&E 染色來說明。如圖二所示，C 組大白鼠肝臟切片觀察顯示正常，A 組與 B 組大白鼠的肝臟切片則是有廣泛或局部脂肪滴堆積的情形發生。至於 D 組大白鼠肝臟切片除了發現到有大顆粒脂肪滴堆積之外，並觀察到有明顯的纖維化發生。同樣地，E 組大白鼠肝臟也可以觀察到大顆粒和小顆粒脂肪滴之堆積，而且產生部分纖維化的情形。

為了觀察慢性肝損傷時，肝臟纖維化之變化，除了將肝組織做 H&E stain 之外，還做網狀纖維及膠原纖維的特殊染色(Reiticulin silver stain & Masson stain)，以便評估肝纖維化程度。經由 Masson 與 Silver 兩種染色之觀察，發現 D 組大白鼠肝臟有明顯膠原增生(圖三與圖四)。

綜合肝功能指數與肝臟病理切片之觀察，A 組與 B 組大白鼠實驗末血漿中 GOT 與 GPT 活性皆較 A 組提高，顯示長期攝取酒精會造成大白鼠肝功能受損並形成酒精性脂肪肝。此外，D 組與 E 組大白鼠血漿中 GOT 與 GPT 活性均顯著較 A 組提高數十倍，顯示長期投予四氯化碳除了會造成肝臟發生脂肪堆積情形之外，也會對肝臟造成更進一步地傷害，而導致肝臟纖維化。

【討論】

肝功能指數方面，酒精組血漿中 GOT 與 GPT 活性較對照組提高，顯示長期攝取酒精會造成大白鼠肝功能受損(34)。此外，皮下注射四氯化碳的組別其血漿 GOT 與 GPT 活性皆顯著較對照組提高數十倍，顯示四氯化碳誘導的模式會造成更嚴重的肝損傷。此外，無論是餵食酒精組或是注射四氯化碳組，在飲食中添加 silymarin 後，並沒有發現到血漿中 GOT 與 GPT 活性有顯著下降的情形，甚至還較無補充 silymarin 組的數值有提高之情形。結果顯示 silymarin 不具有護肝的效果，因此，將 silymarin 當作正對照組是值得商榷的。同樣地情形也可以從肝臟病理切片圖得到證實。

皮下注射四氯化碳的組別其血漿中三酸甘油酯(TG)濃度在實驗期間皆顯著較對照組減少，這是相當值得注意的一點。由先前的研究指出，皮下注射四氯化碳一小時之後，也就是在肝臟中四氯化碳所代謝生成之毒物濃度最高時，利用電子顯微鏡可以觀察到肝臟中的內質網受到四氯化碳所破壞，而內質網為合成蛋白質之主要場所，因此造成肝臟製造極低密度脂蛋白(very low-density lipoprotein; VLDL)之能力下降，使得肝臟中的三酸甘油酯無法正常被運送到血漿而堆積在肝臟中(35)。此外，Seakins 及 Robinson 等人更進一步提出，四氯化碳的毒性會促使肝臟生成三酸甘油酯，故三酸甘油酯在肝臟中累積的情形更為嚴重。另外，Recknagel (1967)則指出四氯

化碳所造成之肝損傷會破壞肝臟中之粒腺體，而造成其β-oxidation 的功能喪失，肝臟中之脂質無法正常代謝，這也是造成肝臟中三酸甘油酯堆積的原因(36)。同樣地情形也可以發現到，注射四氯化會造成血漿中總膽固醇濃度顯著減少，因此，推測可能是因為肝臟中膽固醇釋放能力受影響而導致實驗期間注射四氯化碳的組別血漿中 TC 濃度顯著較其他三組低的原因。

有研究指出長期攝取酒精會造成血漿中 TC 濃度上升，主要原因包括：血漿中 LDL-C 濃度增加以及酒精促使腸道對膽固醇吸收能力提高所導致等(37)。同樣地，本研究結果也發現，實驗期間餵食酒精組別血漿中 TC 濃度皆顯著較其他三組增加(表五)。

至於血漿中 LDL-C 濃度則是沒有明顯變化的情形(表六)。許多報告指出，適量攝取酒精能夠提高人體血漿中 HDL-C 濃度(38,39)，同樣地在本研究中，實驗期間酒精組的 HDL-C 濃度皆顯著較其他三組增加(表七)。

【結論與建議】

相較於保健功效評估方法中護肝功能評估方法之化學性損傷動物模式，在本研究中所採用的四氯化碳劑量與注射頻率均比先前的建議量為佳，不會在短期內(2 週至 4 週)造成大白鼠肝臟無可回復性的肝硬化，而較為嚴重的纖維化則是發生在第 12 週。此外，本研究所進行的長期酒精投予實驗，則是可以達到慢性酒精性肝損傷的目標，其所造成的肝傷害亦較四氯化碳注射更為輕微。最後，在評估 silymarine 對於兩種肝損傷的改善效果上，無論是血液生化值或是肝臟病理切片圖所得到的結果均顯示，silymarine 並不具有護肝的功效，因此將 silymarin 當作正對照組(positive control)是值得商榷的。因此，尋找更適當的對照補充劑也是目前迫切需要的工作。

【參考文獻】

(1) Shepherd J: Violent crime: the role of alcohol and new approaches to the prevention of injury, *Alcohol Alcohol* 1994;29: 5-10.

(2) Anand BS. Velez M.: Influence of chronic alcohol abuse on hepatitis C virus replication, *Digestive Dis* 2000;18:168-71.

(3) 行政院衛生署，國人每年酒類消費量之統計， 2001。

(4) Wall TL, Thomasson HR, Schuckit MA, Ehlers CL: Subjects feelings of alcohol intoxication in Asians with genetic variation of ALDH2 alleles, Alcohol Clin Exp Res 1992;16: 991-5.

(5) 行政院衛生署，保健食品通過案資料，2003 年 8 月。

(6) Lieber CS: Prevention and treatment of liver fibrosis based on pathogenesis, *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23: 944-9.

(7) Lieber CS, DeCarli LM: Animal models of chronic ethanol toxicity. *Methods Enzymol* 1994;233: 585-94.

(8) Hall PM, Lieber CS, DeCarli LM, French SW, Lindros FKO, Järveläinen H, Bode C, Parlesak A, Bode JC: Models of Alcoholic liver disease in Rodent: a critical evaluation. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25: 254S-61S.

(9) Lieber CS: Alcohol and the liver: metabolism of ethanol, metabolic effects and pathogenesis of injury. *Acta Med Scand Suppl* 1985;703:11-55.

(10) Groff JL, Gropper SS, Hunt SM: Advanced nutrition and human metabolsim. 2nd ed., West Publishing Company, 1995.

(11) Lieber CS: Alcohol and the liver: 1994 update. *Gastroenterol* 1994;106:1085-105.

(12) Porta EA: Dietary modulation of oxidative stress in alcoholic liver disease in rats. *J Nutr* 1997;127:912S-15S.

(13) Oh SI, Kim C, Chun HJ, Park SC: Chronic ethanol consumption affects glutathione status in rat liver. *J Nutr* 1998;128:758-63.

(14) Ishii H, Kurose I, Kato S: Pathogenesis of alcoholic liver disease with particular emphasis on oxidative stress. *J Gastroenterol Hepatol* 1997;12:272-82.

(15) William AJ, Barry RE: Free radical generation by neutrophils: a potential mechanism of cellular injury in acute alcoholic hepatitis. *Gut* 1987;28:1157-61.

(16) Rouach H, Fataccioli V, Gentil M, French SW, Morimoto M, Nordmann R: Effect of chronic ethanol feeding on lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver

pathology. *Hepatol* 1997;25:351-5.

(17) Kawase T, Kato S, Lieber CS: Lipid peroxidation and antioxidant defense system in rat liver after chronic etanol feeding. *Hepatol* 1989;10:815-21.

(18) Leo MA, Rosman AS, Lieber CS: Differential depletion of carotenoids and tocopherol in liver disease. *Hepatol* 1993;17:977-86.

(19) Ahmed S, Leo MA, Lieber CS: Interaction between alcohol and beta-carotene in patients with alcoholic liver disease. *Am J Clin Nutr* 1994;60:430-6.

(20) Polavarapu R, Spitz DR, Sim JE, Follansbee MH, Oberley LW, Rahemtulla A, Nanji AA: Increased lipid peroxidation and impaired antioxidant enzyme function is associated with pathological liver injury in experimental alcoholic liver disease in rats fed diets high in corn oil and fish oil. *Hepatol* 1998; 27:1317-23.

(21) Lin SC, Lin CH, Lin CC, Lin YH, Chen CF. Chen IC, Wang LY: Hepatoprotective effects of *Arctium lappa* Linne on liver injuries induced by chronic ethanol consumption and potentiated by carbon tetrachloride. *J Biomed Sci* 2002;9: 401-9.

(22) Hall PM, Plummer JL, Ilsley AH, Ahern MJ, Cmielewski PL, Williams RA: The pathology of liver injury induced by the chronic administration of alcohol and 'low-does' carbon tetrachloride in Porton rats. *J Gastroenterol Hepato* 1994;9:250-6.

(23) Tamayo PR: Is the Cirrohosis of the liver experimentally produced by CCl_4 and an adequate model of human cirrhosis? *Helatplogy* 1985,3:112-20.

(24) McLean EK, Mclean AEM, Sutton PM: Instant cirrhosis. Br J Exp Path 1969; 50: 502-6.

(25) Luster MI, Simeonova PP, Gallucci RM, Matheson JM, Yucesoy B: Immunotoxicology: role of inflammation in chemical-induced hepatotoxicity. Int J Immunopharmacol 2000;22: 1143-7.

(26) Connor HD, Thurman RG, Chen G, Poyer JL, Janzen EG, Mason RP: Clarifiaction of the relatonship between free radical spin trapping and carbon tetrachloride metabolism in microsomal system. *Free Radic Biol Med* 1998;24:1364-8.

(27) Baggenstoss AH, Soloway RD, Summerskill WHJ, Schoenfield LJ: Chronic active liver disease: the range of histologic lesions, their response to treatment, and evoluation. *Hum pathol* 1972;3: 183-98.

(28) Nebot CS: Spectrophotometric assay of superoxide disumutase activity based on the activated autoxidation of a tetracyclic catechol. *Analyt Biochem* 1993;214:442-51.

(29) Lück H: Catalase. In: Methods of enzymatic analysis (Bergmeyer HV, ed.) p885. Academic Press, Inc., New York, New York, 1963.

(30) Paglia DE, Valentine WN: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158-69.

(31) Goldberg DM and Spooner RJ. Glutathione reductase. In:Methods of Enzymatic Analysis, 3rd, Academic Press, Inc., New York, New York, 3:258-265, 1983.

(32) Lederman JD, Overton KM, Hofmann NE, Moore BJ., Thornton J, Erdman JW: Ferrets(Mustela putoius furo) inefficiently convert β-carotene to vitamin A. *J Nutr* 1998; 128:271-9.

(33) Anderson ME: Enzymatic and chemical methods for the determination of glutathione; In: Glutathione: chemical, biochemical and medical aspects. (A) 339-65, 1989.

(34) Navder KP, Baraona E, Lieber CS: Polyenylphosphatidylcholine attenuates alcohol-induced fatty liver and hyperlipidemia in rats. *J Nutr* 1997;127:1800-1806.

(35) Seakins A and Robinson DS: The effect of the administration of carbon tetrachloride on the formation of plasma lipoproteins in the rat. *Biochem J* 1963;86:401-407.

(36) Recknagel RO: Carbon tetrachloride hepatotoxicity. Pharmacol review 1967;19:145-208.

(37) Latour MA, Patterson BW, Kitchens RT, Ostlund RE Jr, Hopkins D, Schonfeld G: Effects of alcohol and cholesterol feeding on lipoprotein metabolism and cholesterol absorption in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:598-604.

(38) Nishiwaki M, Ishikawa T, Ito T, Shige H, Tomiyasu K, Nakajima K, Kondo K, Hashimoto H, Saitoh K, Manabe M: Effects of alcohol on lipoprotein lipase, hepatic lipase, cholesteryl ester transfer protein, and lecithin:cholesterol acyltransferase in high-density lipoprotein cholesterol elevation. *Atherosclerosis* 1994;111:99-109.

(39) Frohlich JJ: Effects of alcohol on plasma lipoprotein metabolism. *Clin Chim Acta* 1996;246:39-49.

表一、各組大白鼠初始體重、期末體重、每日體重增加量、肝重以及相對肝重[1-3]

Table 1. Initial body weight, final body weight, daily body weight gain, liver weight, and relative liver weight of rats in each group[1-3].

Group	Initial B.W. (g)	Final B.W. (g)	Daily B.W. gain (g)	Liver weight (g)	Relative liver weight (%)
A	279 ± 13	464 ± 29 ^{a}	2.1 ± 0.1 ^{ab}	15.0 ± 2.8 ^{b}	3.2 ± 0.4 ^{c}
B	279 ± 14	463 ± 34 ^{a}	2.0 ± 0.2 ^{a}	11.8 ± 0.8 ^{a}	2.6 ± 0.0 ^{b}
C	279 ± 14	499 ± 23 ^{b}	2.4 ± 0.1 ^{c}	11.2 ± 0.8 ^{a}	2.2 ± 0.1 ^{a}
D	279 ± 14	473 ± 15 ^{a}	2.1 ± 0.1 ^{b}	18.4 ± 2.1 ^{c}	3.9 ± 0.3 ^{d}
E	278 ± 15	461 ± 24 ^{a}	2.0 ± 0.1 ^{a}	17.2 ± 1.5 ^{c}	3.7 ± 0.2 ^{d}

[1] Data are means±SD (n=10). Values with different letters significantly differ at P<0.05.

[2] Group A: ethanol group; group B: ethanol feeding with silymarin supplementation (200 mg/kg BW/day); group C: control group; group D: CCl_4 group; group E: CCl_4 injection with silymarin supplementation (200 mg/kg BW/day). Groups D and E were subcutaneously injected with 0.75 mL/kg BW of 40% carbon tetrachloride dissolved in olive oil once a week, while groups A, B, and C were injected with olive oil only.

[3] Relative liver weight: (liver weight/body weight) × 100%.

表二、實驗期間各組大白鼠血漿中肝功能指數 GOT 之活性[1-2]

Table 2. Plasma GOT activities of rats in each group during the different experimental periods.[1-2]

Group	Week 0	Week 2	Week 4	Week 6	Week 8	Week 10	Week 12
				AST (U/L)			
A	74 ± 7	75 ± 9 ^{a}	81 ± 11 ^{ab}	91 ± 13 ^{ab}	85 ± 5 ^{ab}	84 ± 12 ^{a}	87 ± 14 ^{a}
B	75 ± 8	82 ± 12 ^{a}	82 ± 11 ^{ab}	101 ± 17 ^{ab}	97 ± 25 ^{abc}	95 ± 18 ^{a}	109 ± 63 ^{a}
C	78 ± 7	56 ± 5 ^{a}	57 ± 5 ^{a}	68 ± 8 ^{a}	61 ± 7 ^{a}	62 ± 7 ^{a}	63 ± 6 ^{a}
D	77 ± 8	359±435 ^{ab}	106 ± 53 ^{b}	172 ± 160 ^{c}	133 ± 99 ^{c}	219 ± 138 ^{b}	803 ± 752 ^{b}
E	73 ± 6	613±734 ^{b}	122 ± 87 ^{b}	148 ± 92 ^{bc}	113 ± 34 ^{bc}	180 ± 116 ^{b}	1129 ± 1057 ^{b}

[1] Data are means±SD (n=10). Values with different letters significantly differ at P<0.05.

[2] Details as same as in Table 1.

表三、實驗期間各組大白鼠血漿中肝功能指數 GPT 之活性[1-2]

Table 3. Plasma GPT activities of rats in each group during the different experimental periods.[1-2]

Group	Week 0	Week 2	Week 4	Week 6	Week 8	Week 10	Week 12
				ALT (U/L)			
A	24 ± 3	35 ± 6 ^{a}	35 ± 3 ^{ab}	38 ± 4 ^{a}	35 ± 5 ^{a}	34 ± 3 ^{a}	34 ± 8 ^{a}
B	24 ± 4	38 ± 8 ^{a}	40 ± 7 ^{ab}	47 ± 13 ^{a}	46 ± 8 ^{a}	35 ± 6 ^{a}	42 ± 20 ^{a}
C	23 ± 3	20 ± 2 ^{a}	25 ± 2 ^{a}	25 ± 4 ^{a}	26 ± 3 ^{a}	23 ± 4 ^{a}	22 ± 3 ^{a}
D	22 ± 3	198 ± 206 ^{b}	58 ± 34 ^{bc}	170 ± 279 ^{b}	174 ± 236 ^{b}	262 ± 213 ^{b}	855 ± 826 ^{b}
E	23 ± 3	226 ± 265 ^{b}	80 ± 71 ^{c}	107 ± 76 ^{ab}	118 ± 70 ^{ab}	231 ± 212 ^{b}	1287 ± 1355 ^{b}

[1] Data are means±SD (n=10). Values with different letters significantly differ at P<0.05.

[2] Details as same as in Table 1.

表四、實驗期間各組大白鼠血漿中三酸甘油酯之濃度[1-2]

Table 4. Plasma triglyceride concentrations of rats in each group during the different experimental periods.[1-2]

Group	Week 0	Week 2	Week 4	Week 6	Week 8	Week 10	Week 12
				TG (mg/dL)			
A	53 ± 15	87 ± 25 ^{c}	97 ± 43 ^{b}	63 ± 16 ^{b}	59 ± 8 ^{b}	70 ± 24 ^{b}	39 ± 15 ^{c}
B	46 ± 16	74 ± 20 ^{bc}	97 ± 25 ^{b}	67 ± 19 ^{bc}	62 ± 13 ^{b}	59 ± 12 ^{b}	36 ± 5 ^{bc}
C	50 ± 15	69 ± 17 ^{b}	96 ± 18 ^{b}	76 ± 16 ^{c}	65 ± 14 ^{b}	84 ± 11 ^{c}	51 ± 6 ^{d}
D	50 ± 20	30 ± 7 ^{a}	53 ± 20 ^{a}	36 ± 10 ^{a}	28 ± 6 ^{a}	32 ± 11 ^{a}	24 ± 4 ^{a}
E	52 ± 15	29 ± 6 ^{a}	43 ± 11 ^{a}	27 ± 4 ^{a}	28 ± 6 ^{a}	27 ± 5 ^{a}	30 ± 8 ^{ab}

[1] Data are means±SD (n=10). Values with different letters significantly differ at P<0.05.

表五、實驗期間各組大白鼠血漿中總膽固醇之濃度[1-2]

Table 5. Plasma total cholesterol concentrations of rats in each group during the different experimental periods.[1-2]

Group	Week 0	Week 2	Week 4	Week 6	Week 8	Week 10	Week 12
				TC (mg/dL)			
A	40 ± 8	47 ± 6^{c}	43 ± 4^{b}	40 ± 4^{c}	37 ± 3^{c}	42 ± 3^{c}	36 ± 6^{d}
B	38 ± 9	49 ± 6^{c}	47 ± 3^{c}	45 ± 6^{d}	44 ± 5^{d}	43 ± 6^{c}	38 ± 5^{d}
C	41 ± 8	37 ± 6^{b}	42 ± 6^{b}	30 ± 6^{b}	31 ± 6^{b}	29 ± 6^{b}	26 ± 5^{c}
D	41 ± 11	24 ± 5^{a}	26 ± 3^{a}	19 ± 3^{a}	21 ± 4^{a}	17 ± 2^{a}	15 ± 4^{a}
E	41 ± 10	28 ± 4^{a}	30 ± 5^{a}	22 ± 5^{a}	25 ± 5^{a}	18 ± 3^{a}	21 ± 6^{b}

[1] Data are means±SD (n=10). Values with different letters significantly differ at P<0.05.

[2] Details as same as in Table 1.

表六、實驗期間各組大白鼠血漿中低密度脂蛋白總膽固醇之濃度[1-2]

Table 6. Plasma low-density lipoprotein cholesterol concentrations of rats in each group during the different experimental periods.[1-2]

Group	Week 0	Week 2	Week 4	Week 6	Week 8	Week 10	Week 12
				LDL-C (mg/dL)			
A	10 ± 4	6 ± 1	8 ± 1^{bc}	9 ± 1^{b}	6 ± 1^{a}	7 ± 1^{b}	8 ± 1
B	10 ± 3	7 ± 2	7 ± 2^{b}	9 ± 2^{b}	8 ± 4^{b}	8 ± 2^{b}	8 ± 2
C	11 ± 3	6 ± 1	9 ± 2^{c}	5 ± 1^{a}	6 ± 2^{a}	6 ± 1^{ab}	6 ± 1
D	11 ± 5	7 ± 3	5 ± 1^{a}	5 ± 1^{a}	5 ± 1^{a}	5 ± 1^{a}	6 ± 3
E	10 ± 3	7 ± 3	6 ± 1^{a}	5 ± 1^{a}	5 ± 1^{a}	7 ± 5^{ab}	8 ± 4

[1] Data are means±SD (n=10). Values with different letters significantly differ at P<0.05.

表七、實驗期間各組大白鼠血漿中高密度脂蛋白總膽固醇之濃度[1-2]

Table 7. Plasma high-density lipoprotein cholesterol concentrations of rats in each group during the different experimental periods.[1-2]

Group	Week 0	Week 2	Week 4	Week 6	Week 8	Week 10	Week 12
				HDL-C (mg/dL)			
A	32 ± 5	39 ± 4^{c}	36 ± 3^{b}	35 ± 3^{c}	33 ± 2^{c}	35 ± 2^{c}	32 ± 5^{c}
B	30 ± 6	42 ± 4^{c}	39 ± 3^{c}	37 ± 5^{c}	38 ± 3^{d}	37 ± 5^{c}	34 ± 4^{c}
C	29 ± 4	30 ± 4^{b}	34 ± 4^{b}	28 ± 7^{b}	27 ± 5^{b}	27 ± 4^{b}	25 ± 4^{b}
D	32 ± 5	19 ± 2^{a}	24 ± 2^{a}	19 ± 3^{a}	20 ± 3^{a}	18 ± 3^{a}	15 ± 1^{a}
E	31 ± 5	20 ± 3^{a}	27 ± 4^{a}	19 ± 2^{a}	21 ± 3^{a}	19 ± 3^{a}	16 ± 3^{a}

[1] Data are means±SD (n=10). Values with different letters significantly differ at P<0.05.

[2] Details as same as in Table 1.

表八、實驗末各組大白鼠紅血球 GPX、GRD、SOD 以及 CAT 之活性[1]

Table 8. Antioxidant enzymes GPX, GRD, SOD, and CAT activities in erythrocytes of rats in each group.[1-2]

Group[2]	GPX (U/mg protein)	GRD (mU/mg protein)	SOD (U/mg protein)	CAT (U/mg protein)
A	860 ± 338	21.2 ± 13.9	14.2 ± 4.1^{a}	122 ± 48
B	850 ± 346	17.4 ± 5.8	14.5 ± 4.5^{ab}	118 ± 21
C	956 ± 365	25.1 ± 21.9	20.1 ± 9.0^{b}	145 ± 81
D	802 ± 379	15.7 ± 8.6	13.2 ± 6.4^{a}	138 ± 36
E	903 ± 363	21.8 ± 10.0	14.5 ± 6.5^{ab}	138 ± 40

[1] Data are means±SD (n=10). Values with different letters significantly differ at P<0.05.

[2] Details as same as in Table 1.

表九、實驗末各組大白鼠肝臟中 GPX、GRD、SOD 以及 CAT 之活性 [1]

Table 9. Hepatic antioxidant enzymes GPX, GRD, SOD, and CAT activities of rats in each group. [1-2]

Group[2]	GPX (U/mg protein)	GRD (mU/mg protein)	SOD (U/mg protein)	CAT (U/mg protein)
A	2267 ± 585^{bc}	2077 ± 591^{ab}	78.4 ± 13.4^{abc}	193 ± 34^{ab}
B	2663 ± 1026^{cd}	2106 ± 1139^{ab}	80.1 ± 9.3^{bc}	202 ± 35^{ab}
C	3282 ± 887^{d}	2461 ± 520^{b}	86.5 ± 20.3^{c}	235 ± 63^{b}
D	1453 ± 297^{a}	1472 ± 651^{a}	66.5 ± 11.7^{a}	162 ± 34^{a}
E	1991 ± 565^{ab}	2066 ± 911^{ab}	73.8 ± 12.3^{ab}	191 ± 75^{ab}

[1] Data are means±SD (n=10). Values with different letters significantly differ at P<0.05.

[2] Details as same as in Table 1.

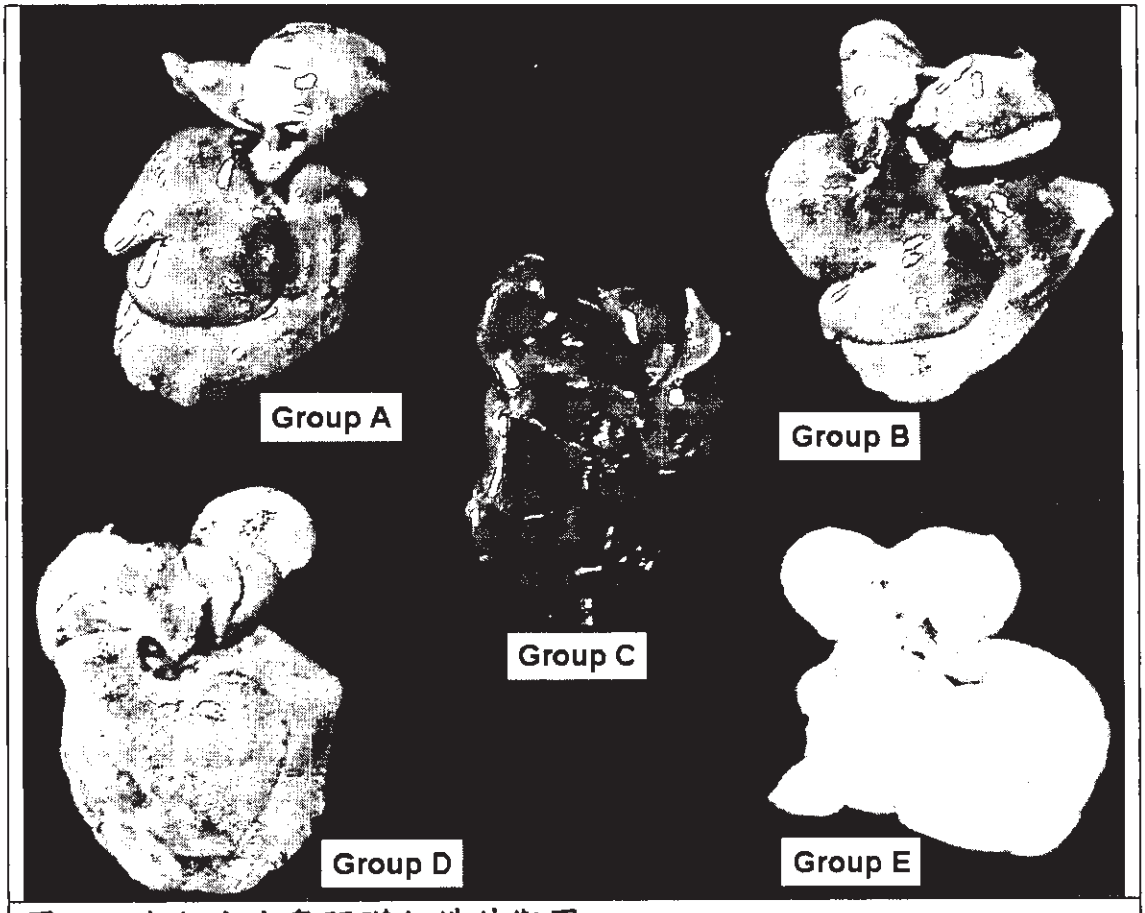
表十、實驗末紅血球與肝臟中 GSH 之濃度以及血漿與肝臟中 MDA 之濃度 [1-2]

Table 10. GSH concentrations in erythrocytes and liver and the MDA concentrations in plasma and liver of rats in each group. [1-2]

Group[2]	GSH (μM)		MDA (μM)	
	Erythrocytes	Liver	Plasma	Liver
A	105 ± 20^{b}	199 ± 53^{b}	9.1 ± 1.9^{ab}	8.4 ± 1.6^{b}
B	112 ± 12^{bc}	219 ± 75^{b}	8.8 ± 0.9^{ab}	7.2 ± 0.8^{b}
C	123 ± 6^{c}	263 ± 90^{b}	6.6 ± 1.4^{a}	4.5 ± 0.9^{a}
D	85 ± 22^{a}	131 ± 19^{a}	10.2 ± 2.6^{b}	11.2 ± 2.4^{b}
E	109 ± 39^{b}	199 ± 64^{ab}	9.7 ± 1.7^{b}	10.5 ± 3.0^{b}

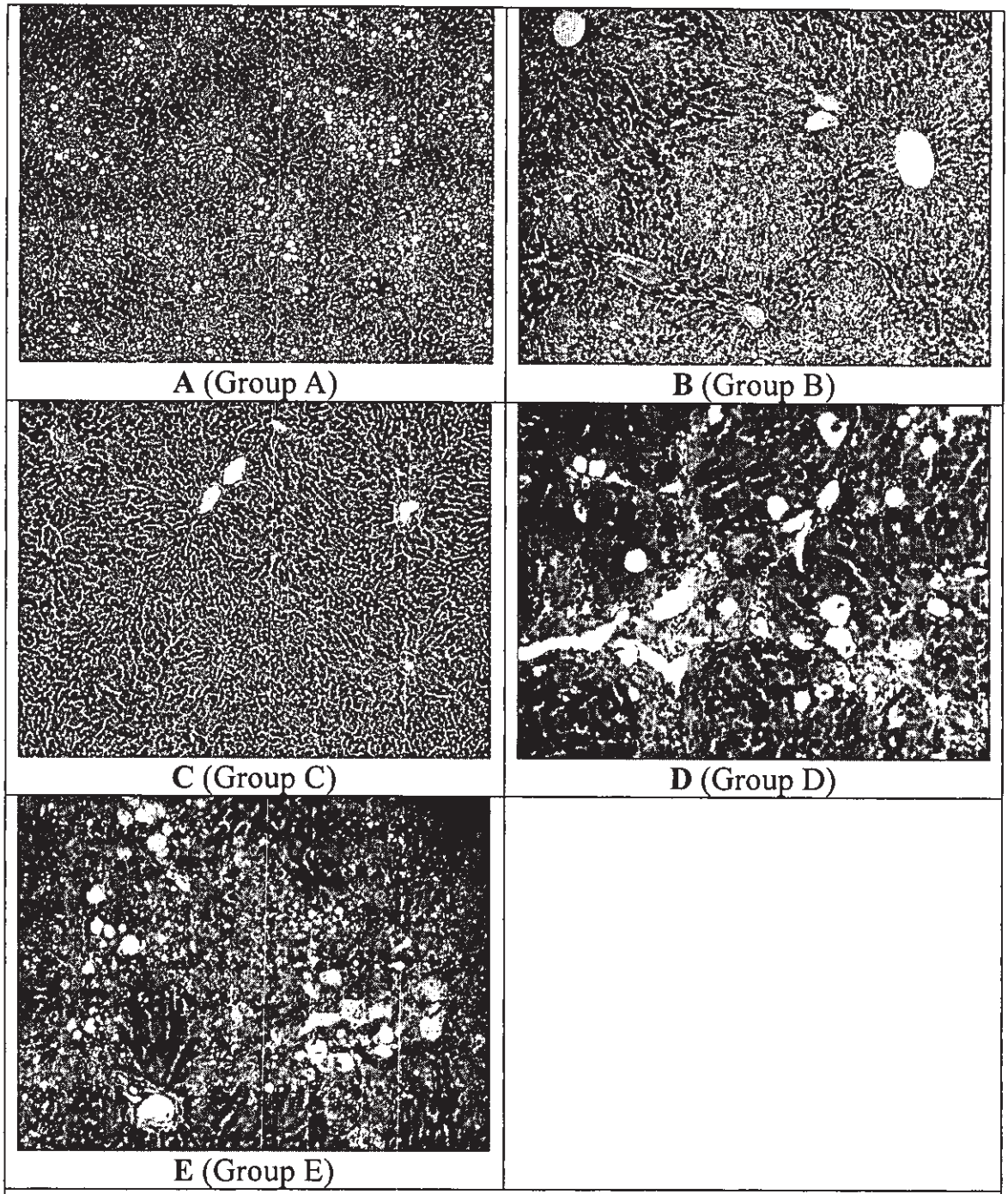
[1] Data are means±SD (n=10). Values with different letters significantly differ at P<0.05.

[2] Details as same as in Table 1.



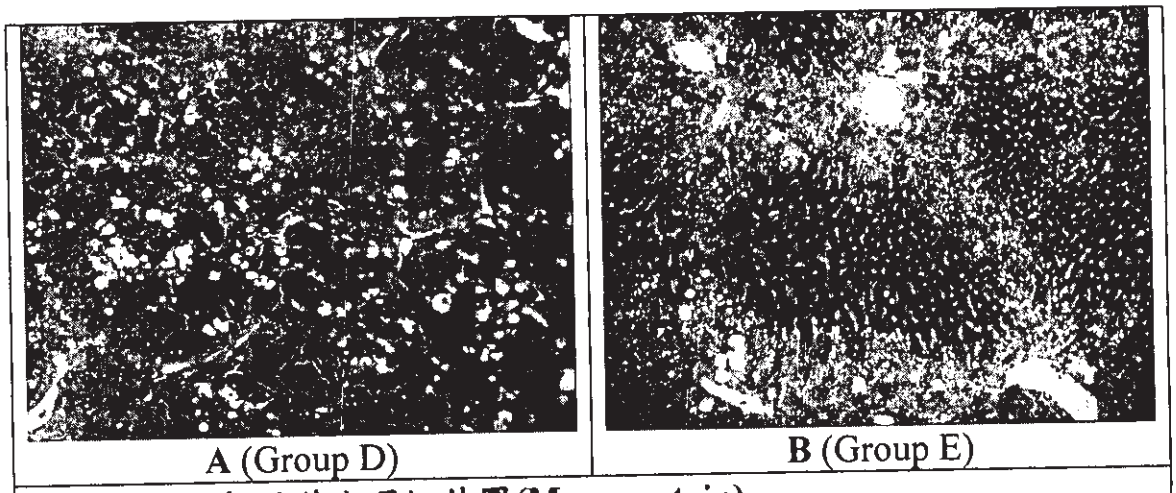
圖一、各組大白鼠肝臟組織外觀圖

Fig. 1 The gross specimens are from livers in group A , B , C , D and E. Note the obviously different outlooks among each group.



圖二、各組大白鼠肝臟病理切片圖(H&E stain)

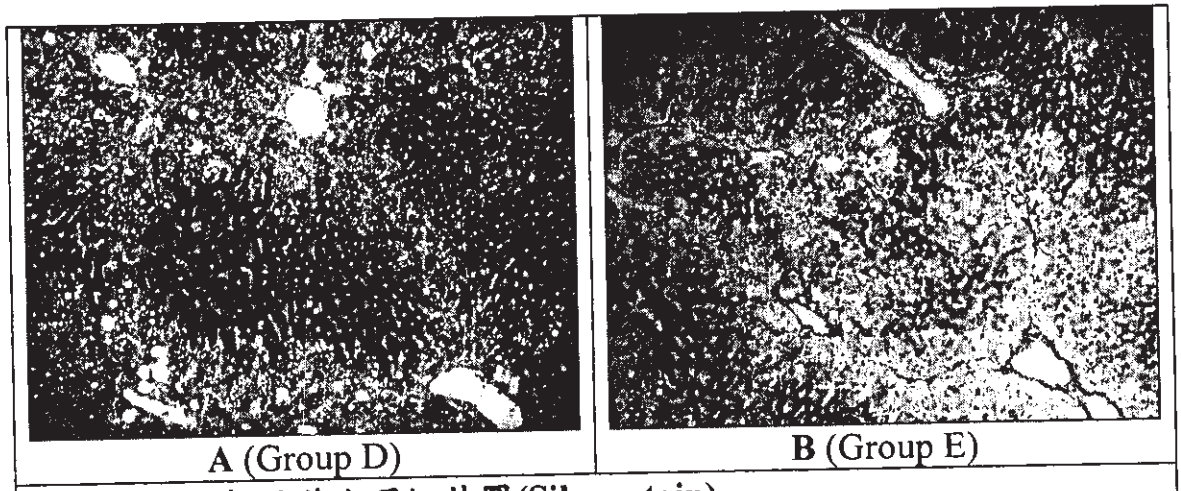
Fig. 2 A) Section of the liver from group A shows the presence of fat accumulation. B) Section of the liver from group B also shows the presence of fat accumulation. C) Section of the liver from group C shows normal histology with no evidence of pathologic change. D) Section of the liver from group D shows obviously fibrosis histology. E) Section of the liver from group E shows slightly fibrosis histology. (H&E stain, magnification:×100)



A (Group D)　　B (Group E)

圖三、大白鼠肝臟病理切片圖(Masson stain)

Fig. 3 A) Section of the liver from group D shows obviously fibrosis histology. B) Section of the liver from group E shows slightly fibrosis histology. (Masson stain, magnification: ×100).



A (Group D)　　B (Group E)

圖四、大白鼠肝臟病理切片圖(Silver stain)

Fig. 4 A) Section of the liver from group D shows obviously fibrosis histology. B) Section of the liver from group E shows slightly fibrosis histology. (Sliver stain, magnification: ×100).