ƒ ‹ F | Œfia‹ ˙'e›ß• |–M^D‹ ª¤s›p e ƒ¤"G‡ł§i

⁄j¥ „«"C' ° s"°' °¤x"¢ °"«.. ƒ¡⁄§« ¥ ⁄ ¸¤ ´ ⁄§–· Q

›p e^ §¡G §O«‹ ›p e

›p e‰ ¸s„¡GNSC93-2320-B-038-029-

ıƒ · ¶¡¡G93 ƒ~08 ⁄°01 ⁄ Ø 94 ƒ~07 ⁄°31 ⁄Ø

ıƒ ‡ ƒ ¡G» O ¥´ ˙⁄j ˙« O • ¨¤t

›p e¥ D ø⁄¡HG• ¤ fl›°

ƒ ƒP¥ D ø⁄¡HG•¤‰ ~

›p e »P⁄H›ß¡G¶ –„„§ ı ¥«~

‡ł§i^ «‹¡G"°´†‡ł§i

‡ B ‡⁄ƒ¡¡G¥»›p e¥ i ⁄ ‰ ¶‹ d,

⁄⁄ ¥` Œ 94 ƒ~9 ⁄°9 ⁄Ø

中文摘要

本研究利用 Lieber-DeCarli 流質飲食模式，建立酒精性肝臟疾病之大白鼠動物模式。使用年齡相同之雄性與雌性 Wistar 品系大白鼠，根據 Lieber-DeCarli 模式，分別餵食對照或含有酒精的液體飼料，為期 12 週。將 40 隻大白鼠依照血漿中肝功能指數天門冬胺酸轉胺酶(aspartate aminotransferase, AST)與丙胺酸轉胺酶(alanine aminotransferase, ALT)之活性分成 4 組：雄性對照組(MC)、雄性酒精組(ME)、雌性對照組(FC)以及雌性酒精組(FE)，每組 10 隻。餵食酒精 12 週之後，結果顯示，長期餵食酒精會造成顯著的影響包括：提高血漿中 AST 與 ALT 之活性，增加血漿中總膽固醇(total cholesterol, TC)與腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor-α, TNF-α)之濃度，增加肝臟中三酸甘油酯(triglyceride, TG)與 TC 之含量，誘導肝臟中細胞色素 P450 2E1 (CYP2E1)蛋白質之表現，減少肝臟中還原型麩胱甘肽(glutathione, GSH)之含量，而且病理學上明顯有脂肪肝形成之情形。此外，相較於雄性組，雌性組大白鼠血漿中 AST 活性明顯升高，肝臟中 TG 與 TC 含量明顯增加，肝臟中 GSH 含量明顯減少，而且脂肪肝程度較嚴重。長期攝取酒精也會導致肝功能指標上升、脂質代謝異常、氧化壓力上升、抗氧化物質含量減少以及病理上造成肝損傷，其中又以雌性組所造成的影響更嚴重。

關鍵詞：酒精性肝臟疾病、性別、酒精液體飼料、脂質代謝、氧化壓力

英文摘要

This study was to establish the animal model of chronic alcoholic liver disease. In addition, effects of gender differences on the liver function tests, metabolic disorders and oxidative damage were also examined. Age-matched male and female Wistar rats were fed control or ethanol-containing liquid diets for 12 weeks following the Lieber-DeCarli model. According to both the plasma aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities, 40 rats were divided into four groups as follows: male control group (MC), male ethanol group (ME), female control group (FC), and female ethanol group (FE). After ethanol feeding for 12 weeks, the findings indicated significant main effects of ethanol consumption on elevated plasma AST and ALT activities; raised plasma total cholesterol (TC) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) concentrations; increased hepatic triglyceride (TG) and TC contents; induction of hepatic microsomal cytochrome P450 2E1 (CYP2E1); reduced hepatic glutathione (GSH) content and the formation of fatty liver; when compared to control group. Furthermore, the results also showed significant main effects of gender differences on elevated plasma AST activity; augmented hepatic TG and TC contents; reduced hepatic GSH content; decreased degree of fatty liver; when compared to male group. In conclusion, our results show that chronic ethanol administration induced a greater susceptibility to liver damage in female rats than in male rats.

Keywords: alcoholic liver disease, gender, ethanol-containing liquid diets, metabolic disorders, oxidative damage

目錄

中文摘要.....I

英文摘要.....II

目錄.....III

一、前言.....1

二、研究目的.....3

三、文獻探討.....4

(一)酒精性肝臟疾病形成之原因.....4
(二)內毒素(entodoxin)的致病機轉.....14
(三)內毒素在酒精性肝炎致病機轉中所扮演之角色.....15
(四) 不同性別在酒精性肝臟疾病方面之表現.....17
(五)酒精性肝臟疾病動物模式之建立.....17

四、研究方法.....19

(1)實驗材料與方法.....19
(2)動物犧牲.....22
(3)血液、肝臟以及小腸樣本之處理.....22
(4)分析方法.....22

五、結果.....26

六、討論.....29

（一）肝功能指數 AST、ALT 結果方面.....29
（二）膽固醇之變化.....29
（三）三酸甘油酯之變化.....29
（四）肝臟組織中抗氧化物質 GSH 之含量.....30
（五）肝臟中細胞色素 P450 2E1 (CYP2E1)表現量.....31
（六）血漿中 TNF-α之濃度方面.....32
（七）小腸組織病理切片之觀察.....32

（八）肝臟組織病理變化之觀察.....33
七、結論.....34
八、參考文獻.....35

圖表

表 一、酒精液體飼料對於大白鼠血漿中肝功能指數 AST 與 ALT 活性之影響 50
表 二、酒精液體飼料對於大白鼠血漿中三酸甘油酯和總膽固醇含量之影響 ...51
表 三、酒精液體飼料對於大白鼠肝臟中三酸甘油酯和總膽固醇含量之影響 ...52
表 四、酒精液體飼料對於大白鼠肝臟中抗氧化物質 GSH 含量之影響.....53
表 五、酒精液體飼料對於大白鼠血漿中 TNF-α含量之影響.....54
圖 一、餵食酒精之後，液體飼料(A)與大白鼠血液(B)中酒精濃度之變化 55
圖 二、酒精液體飼料對於大白鼠肝臟中微粒體 CYP2E1 蛋白質表現之影響 ..56
圖 三、酒精液體飼料對於大白鼠十二指腸病理切片結果之影響 57
圖 四、酒精液體飼料對於大白鼠肝臟病理切片結果之影響 58

一、前言

慢性酒精性肝臟疾病相關研究的重要性

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(Shepherd,1994)。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(Anand and Velez, 2000)。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(行政院衛生署, 2001)。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(Wall *et al.*, 1992)。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。

導致酒精性肝臟疾病的原因除了酒精單一因子外，源自腸道之內毒素在酒精性肝臟疾病形成與惡化的過程中，更是扮演重要的角色。文獻指出，在受到數種毒性物質如：四氯化碳、病毒或是酒精所導致的肝臟損傷形成過程中，格蘭氏陰性菌細胞壁的組成物內毒素或 LPS 是重要的調控因子。

根據臨床研究資料顯示，不同性別對於酒精性肝臟疾病之表現亦有所不同，即使女性所攝取的酒精量比男性少，女性卻是比男性更容易而且更快速形成酒精性肝臟疾病。真正的原因尚未十分清楚。有些研究則推測，性別差異所造成的酒精代謝能力不同可能是其中的原因之一。

因此，除了酒精與內毒素兩項變因之外，本研究也將性別納入考量，以深入瞭解哪些因子是造成不同性別在酒精性肝臟疾病形成過程中有所差異的原因。

二、研究目的

由於長期酒精攝取會導致內毒素血症與酒精性肝炎之發生，因此，本研究之原本構想擬以 Lieber 與 DeCarlie 之酒精性肝臟疾病的大白鼠動物模式為基礎，也就是以添加酒精的液體飼料，並合併內毒素之經口投予，觀察是否能夠誘導大白鼠慢性酒精性肝炎之發生。此外，在臨床上曾發現到女性較男性更容易而且更快速形成酒精性肝臟疾病。因此，除了酒精與內毒素兩項變因之外，本研究也將性別納入考量，以深入瞭解哪些因子是造成不同性別在酒精性肝臟疾病形成過程中有所差異的原因。但是在進行預備實驗之時，投與內毒素之過程遇到執行上的困難以及非預期之結果：(1)大白鼠對於口服內毒素之個體反應差異性太大，造成大白鼠死亡隻數增加，無法收集完整樣本；(2)以存活的大白鼠進行分析後發現，與單獨攝取酒精而沒有投與內毒素的大白鼠比較之下，小腸和肝臟病理切片並無顯著差異。由以上之原因，本研究轉向以性別因素為考量，繼續進行實驗，完成計畫。

三、文獻探討

(一)酒精性肝臟疾病形成之原因

1.酒精對於脂質代謝之影響

(1) 酒精代謝路徑

肝臟是酒精最主要的代謝場所，當人體攝取酒精性飲料之後，乙醇(ethanol)主要是經由細胞質中之酒精脫氫酶(alcohol dehydrogenase, ADH)代謝成乙醛(acetaldehyde)，如圖 II 所示。其他酵素如：位於內質網之細胞色素 P450 2E1(cytochrome P450 2E1, CYP2E1)、位於過氧化小體之過氧化氫酶(catalase, CAT)以及黃嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO)，也能夠將乙醇代謝成乙醛，乙醛則是可以再經由粒線體中之乙醛脫氫酶(acetaldehyde dehydrogenase, ALDH)將之代謝成乙酸(acetate)。

(2) 酒精造成脂質代謝異常之原因

根據研究顯示，長期攝取酒精會造成酒精性脂肪肝的形成。主要是因為在酒精代謝成乙醛的反應過程中，造成[NADH/NAD^+]比值的提高，使得正常的氧化還原平衡狀態遭到破壞，而趨向於還原的狀態。這會影響到數個代謝路徑的正常運作，進而造成脂質代謝方面的異常，例如：增加肝臟中脂質的合成作用(lipogenesis)、提高肝臟對於血液循環中脂肪的吸收能力、降低肝臟中脂蛋白之正常釋放以及提高周邊組織中脂肪的代謝等。此外，也有許多研究指出，長期攝取酒精會使粒線體中 cytochrome oxidase 的活性降低，導致能量的生成作用受阻，進而造成脂肪酸的氧化作用降低而儲存於肝細胞中(Cederbaum *et al.*, 1975; Matsuzaki and Lieber, 1977)。當不同來源的脂肪酸堆積於肝臟中，最後會再以三酸甘油酯(tirglyceride, TG)的型式儲存於肝臟中，進而形成脂肪肝。因此長期攝取酒精會影響脂質正常代謝而造成酒精性高脂血症以及酒精性脂肪肝等症狀

(Lieber, 1994)。

2. 酒精對於肝臟氧化傷害之影響

(1) 活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)生成量增加

在 1960 年代初期，第一次有研究報告指出 ROS 涉及酒精性肝臟疾病(alcoholic liver disease, ALD)之形成，同時也發現到酒精會促進脂質的過氧化(Diluzio, 1964)。酒精會誘導 ROS 的生成量增加而造成許多方面的細胞傷害，包括：氧化性蛋白質修飾作用而使酵素失去活性(Rouach *et al.*,1997)、促進抗氧化物質損耗(Fernandez-Checa *et al.*, 1987; Nordman *et al.*, 1992)以及造成粒線體功能異常(Cunningham *et al.*, 1990)，進而造成 ALD 之形成。體外研究結果也證實，急性與慢性酒精投予會加速肝細胞粒線體內 ROS 的生成量而造成肝細胞死亡(Bailey and Cunningham, 1998)。因此，直到目前為止，ROS 已經被認為是造成 ALD 的主要原因之一。

酒精會造成肝細胞中不同胞器內 ROS 的生成量增加，其作用機轉如下：

I. 微粒體(Microsome)

根據研究指出，長期攝取酒精會促進大白鼠肝臟中微粒體的 NADPH-cytochrome c reductase 活性提高而產生超氧自由基(superoxide anion, $O_2^{\cdot -}$)(Ekstrom *et al.*, 1986)。之後，$O_2^{\cdot -}$可以經由 SOD 代謝成過氧化氫(hydrogen peroxide, H_2O_2)，而 H_2O_2 則是可以經由 Haber-Weiss reaction 而產生氫氧自由基(hydroxyl radical, $OH^{\cdot}$) (Ingelman-Sundberg and Johansson, 1984)。此外，也有實驗發現到大白鼠肝臟的微粒體若是加入酒精，則可以偵測到另一種自由基 1-hydroxyethyl radical 的形成，而且此自由基的生成量與投予的酒精濃度有正相關(Reinke *et al.*, 1987)。

也有研究顯示長期攝取酒精所誘導的 CYP2E1 表現量增加，會提高 CYP2E1 與 NADPH-cytochrome c reductase 之間產生非耦合的反應，進而增加 ROS 的生成量，而且 ROS 的生成量也與 CYP2E1 的表現量成正相關(Ekstrom and Ingelman-Sundberg, 1989)。

II. 粒線體(Mitochondria)

在正常有氧的狀態下，肝細胞中 80%的氧是被粒線體所利用(Thayer and Rubin, 1982)，而其中約有 2%的氧會形成 ROS，尤其是 $O_2^{\bullet-}$和 H_2O_2 (Boveris and Chance, 1973)。因此，粒線體被認為是生理上 ROS 產生的重要來源之一。如圖 III 所示，在粒線體內，參與能量 ATP 形成的重要酵素之中，已知 NADH-ubiquinone reductase (complex 1)與 ubiquinone-cytochrome-*c* reductase (complex 3)是會產生 $O_2^{\bullet-}$與 H_2O_2 的位置(Chance *et al.*, 1979)。

在大白鼠以及狒狒的動物實驗中發現，長期攝取酒精會造成肝細胞中粒線體的外形與功能受到改變及影響(French *et al.*, 1983)，而在人體實驗中也有觀察到同樣的情形(Gorden, 1984)。可能是因為長期攝取酒精所造成 H_2O_2 和 $OH^{\bullet}$在粒線體中的生成量增加有關(Kukielka *et al.*, 1994)。體外實驗則是證實，急性酒精投予所產生的氧自由基會造成肝細胞粒線體膜電位下降，導致粒線體內能量生成作用受阻並使粒線體功能受損(Ishii *et al.*, 1997)。

III. 細胞質(Cytosol)

在細胞質中，XO 所參與的代謝途徑會產生自由基 $O_2^{\bullet-}$與 H_2O_2，如圖 IV 所示。先前的研究指出，酒精會提高 XO 活性，而促進 $O_2^{\bullet-}$與 H_2O_2 之形成(Feierman, 1985)。同樣地，體內實驗也發現到，酒精投予大白鼠會誘導肝臟中 XO 活性的上升，並增加肝臟中脂質過氧化作用(Kato *et al.*, 1990)。在體外肝細胞實驗中，則是證實酒精代謝過程中所造成的[NADH/NAD^+]比值上升，會使肝細胞中 Xanthine dehydrogenase (XD)轉變成氧化型式 XO，而導致肝細胞的毒性增加(Niknahad *et al.*, 1995)。因此，酒精所誘導的 XO 活性提高，會增加肝臟中自由基的生成量以及促進肝臟中脂質過氧化作用而造成肝損傷(Ishii *et al.*, 1997)。

IV. 過氧化小體

在酒精代謝過程中，有一部份可以經由過氧化小體中 CAT 所負責催化的氧化反應來進行。有研究報告提出，在肝灌流循環系統的體外實驗中，酒精經由

CAT 所代謝的反應必需要有 H_2O_2 的參與，而 H_2O_2 的主要來源，就是脂肪酸在過氧化小體中進行β-oxidation 所產生的 H_2O_2 (Handler and Thurman, 1988)。也有研究指出，在禁食狀態之下，酒精可以經由 CAT 進行代謝，可能是因為禁食會造成循環系統與肝臟中的脂肪酸濃度明顯上升，進而提高過氧化小體中β-oxidation 的反應，使得 H_2O_2 產量增加所導致(Thurman and Handler, 1989; Handler and Thurman, 1990)。根據這些研究，學者們進一步推論，在動物禁食狀態之下的肝臟中，過氧化小體β-oxidation 系統如果不是用來代謝酒精，則此系統所產生的 H_2O_2 有可能與 Fe^{2+} 作用，進而導致急性酒精投予所造成的過多自由基產生以及脂質過氧化發生，最後造成肝損傷。

V. 鐵所參與的角色

在 ROS 形成的過程中，鐵扮演著重要的角色，因為鐵會誘發並催化數個自由基生成的反應。最被廣泛瞭解的作用機制之一就是在 Haber-Weiss reaction 中，鐵會催化 $O_2^{\cdot-}$ 形成 OH^-。肝臟中若是有過多的鐵，則會導致肝臟的損傷，包括肝細胞的死亡。有些研究認為游離型式的鐵(也就是沒有和蛋白質結合的鐵)會促進自由基的生成，造成肝細胞氧化壓力的增加(Shaw, 1989; Sadrzadeh *et al.*, 1994)。大白鼠動物實驗也發現，肝臟中鐵的堆積會促進肝細胞產生細胞凋亡反應(Kato *et al.*, 1996)。在另一項動物實驗中也發現到，長期投予大白鼠過量的鐵，若是再投予酒精，則會更加促進肝臟中脂質過氧化的作用(Valenzuela *et al.*, 1983)。因此，推論長期攝取酒精或是急性投予酒精，游離型式鐵的增加或許會促進自由基的形成，導致肝臟更嚴重的脂質過氧化反應以及肝細胞死亡，而造成肝損傷(Ishii *et al.*, 1997; Nanji and Hiller-Sturmhofel, 1997)。

(2) 酒精導致氧化壓力(Oxidative stress)增加之原因

I. 酒精對於肝細胞中抗氧化物之影響

面對氧自由基與脂質過氧化的傷害，生物體內能夠藉由抗氧化防禦系統來保護細胞，使細胞免於受到氧化傷害的作用。此抗氧化防禦系統主要是藉由非酵素

性抗氧化物質以及酵素性抗氧化防禦系統的共同作用來對抗自由基所造成的氧化傷害。非酵素性抗氧化物質包含存在食物中的抗氧化營養素(如：維生素 E 與 C)以及存在體內的抗氧化物質(如：GSH)。至於抗氧化酵素防禦系統，則是包括：超氧化歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、過氧化氫酶(catalase, CAT)、麩胱甘肽過氧化酶(glutathione peroxidase, GPX)以及麩胱甘肽還原酶(glutathione peroxidase, GRD)。當抗氧化防禦系統無法與酒精所誘導的自由基產生達到平衡時，氧化壓力則是會進一步影響到細胞的完整性(Kurose *et al.*, 1996)。以下將針對急性或慢性酒精投予對於肝臟中抗氧化物質以及抗氧化酵素的影響作進一步探討。

i. 麩胱甘肽(Glutathione, GSH)

GSH 是體內相當重要的物質，不僅本身具有對抗自由基的能力，GSH 也負責參與抗氧化酵素 GPX 的作用以清除 H_2O_2，此外，GSH 也能夠提供 GSH S-transferase (GST)當作受質，與某些外來物質(xenobiotics)經過 P450 代謝過後的活性產物進行結合，以增加其水溶性而利於排出體外(Bump and Brown, 1990)。GSH 參與清除自由基之反應如下圖 V：

在細胞與動物實驗中，投予肝細胞酒精或是急性酒精中毒的大白鼠，其肝臟中 GSH 的含量皆會減少(Vina *et al.*, 1980; Speisky *et al.*, 1988; Zentella *et al.*, 1994)。此外，在不同動物實驗中也發現，長期攝取酒精也會導致動物肝臟中 GSH 含量顯著減少(Zidenberg-Cherr *et al.*, 1990; Hirano *et al.*, 1992,)。在臨床上，則是有研究指出，酗酒者血液中 GSH 含量顯著較正常人低(Loguercio *et al.*, 1996)。

酒精造成 GSH 量減少的原因包括，酒精代謝產物乙醛會與 GSH 形成附加物(adduct)而導致 GSH 含量減少(Vina *et al.*, 1980)。此外，也有可能是因為氧化性自由基生成量的增加，而促進 GSH 的氧化作用，造成 GSH 的耗損(Videla and Valenzuela, 1982)。另一個原因，則是 GSH 的合成作用受到酒精影響而下降而導致 GSH 量減少(Speisky *et al.*, 1985)。

ii. 維生素 E(α-Tocopherol)：

維生素 E 是生物體內相當重要的脂溶性抗氧化物質。在自然界中以α、β、γ和δ的型式存在，其中以δ-tocopherol 的抗氧化活性最高。由於環狀結構上第六個碳原子的 hydroxyl group (-OH)能夠提供電子而具有還原力，加上苯環結構具有電子共振的能力，使得維生素 E 被氧化後的產物相當穩定，因此維生素 E 是一個好的自由基捕捉劑。在生物體內，細胞與細胞胞器的膜上含有許多的不飽和脂肪酸，當受到自由基攻擊時，容易產生過氧化作用而使膜的完整性受到破壞，最後導致細胞死亡(謝明哲, 1998)。

根據一項報告指出，長期投予大白鼠酒精，會造成其肝臟中微粒體的[α-tocopheryl quinine/α-tocopherol]比值明顯提高，而造成α-tocopherol 的消耗，可能是因為酒精促進自由基的產生，而導致α-tocopherol 轉變成為α-tocopheryl quinone。此外，當大白鼠飼料中缺乏維生素 E 時，α-tocopherol 消耗的情形更加顯著(Kawase *et al.*, 1989)。另一項動物實驗結果則是發現，長期投予酒精會造成大白鼠血漿與肝臟中α-tocopherol 與γ-tocopherol 濃度或量的減少，而且這兩者減少的量與肝臟中脂質過氧化產物增加的量有顯著正相關性，顯示攝取酒精會使維生素 E 消耗量增加，而造成脂質過氧化的形成，尤其是維生素 E 缺乏的時候，肝臟更容易受到酒精所造成的氧化壓力傷害而導致更嚴重的脂質過氧化反應(Sadrzadeh *et al.*, 1994; NAnji *et al.*, 1994)。

iii. 抗氧化酵素(Antioxidant enzymes)

急性酒精投予大白鼠(2.3 g/kg, i.p.)會導致細胞質中超氧化岐化酶(copper/zinc superoxide dismutase, Cu/Zn-SOD)與過氧化氫酶(Catalase, CAT)活性降低(Ribiere *et al.*, 1985)。此外，在另一項動物實驗中，於飲水中添加 15%酒精，餵食 5 種不同品系的小鼠以及 1 種大白鼠，結果發現這些嚙齒類動物肝臟中的 CAT、SOD 以及 GPX 活性皆明顯下降(Schisler and Singh, 1989)。根據先前兩項研究報告結果，分別顯示過多的 $O_2^{\cdot E-}$會造成 CAT 失去活性(Kono and Fridovich, 1982)，而過多的 $O_2^{\cdot E-}$與 H_2O_2 則是會造成 Cu/Zn-SOD 失活(Sinet *et al.*, 1981)。同樣地，在長期餵食大白鼠酒精所導致的酒精性肝臟疾病動物模式中，也發現到

CAT、SOD 以及 GPX 這三種抗氧化酵素的蛋白質表現量與活性皆會減少與下降，使得氧化壓力上升而造成較嚴重的肝損傷(Polavarapu *et al.*, 1998)。因此，推論當酒精投予造成肝臟中產生過量的 $O_2^{\cdot-}$ 與 H_2O_2 時，有可能會導致肝臟中抗氧化酵素 CAT 與 SOD 活性降低，使得自由基的清除作用受阻，而導致更進一步的氧化傷害，如脂質過氧化。

II. 氧化壓力增加所造成之傷害

當有過多的 ROS 產生或是缺乏足夠的抗氧化物質以清除這些自由基時，則會使得氧化壓力上升，而造成細胞組成物包括：脂質、蛋白質、DNA 以及細胞內的胞器受到 ROS 的攻擊或是其產物的修飾作用(如：形成附加物，adduct)，這些物質都有可能會進一步直接導致肝細胞發生壞死或是促進與壞死相關的發炎反應，而造成肝傷害。因此，氧化壓力也被認為是造成酒精性肝臟疾病形成的重要因子。以下針對細胞內哪些部分容易受到酒精所誘導的氧化傷害作說明。

i. 脂質(Lipids)

一般而言，氧化壓力最主要的特徵就是會增加脂質過氧化作用。氧自由基會導致脂質過氧化而造成細胞內及其周圍的膜受到損傷。攝取酒精會造成脂質過氧化作用增加的原因，包括：促進 ROS 的生成以及/或是減少抗氧化物質(如：GSH 與維生素 E)的含量。脂質過氧化作用會導致細胞膜的完整性逐漸地被破壞，當細胞膜的完整性喪失之後，則會影響到細胞的功能，甚至造成細胞死亡。此外，當脂質過氧化發生在環繞於粒線體的膜時，則會阻礙 ATP 在這些胞器內的生成作用，使得 ATP 被耗盡而導致肝細胞發炎壞死。長期酒精投予會使自由基生成量增加，而促進肝臟中脂質過氧化作用之進行。因此，在急性或慢性酒精投予之下，通常會導致脂質過氧化反應，使脂質過氧化產物增加(Ishii *et al.*, 1997; Nanji and Hiller-Sturmhofel, 1997)。

ii. 蛋白質(Proteins)

許多研究證實細胞的蛋白質包括重要參與代謝作用的酵素，也都是自由基攻擊的目標。而且氧化壓力會造成脂質過氧化作用以及蛋白質合成作用受阻(Fraga

et al., 1989)。也有學者指出，酒精投予大白鼠所造成的脂質過氧化產物(malondialdehyde 以及 4-hydroxynonenal)會與蛋白質作用，導致血清中蛋白質附加物(protein adducts)濃度顯著增加(French *et al.*, 1993)。因此，在酒精性肝臟疾病中，蛋白質合成受抑制或是蛋白質受到之質過氧化產物的修飾作用，可能與自由基所造成細胞傷害有關。

iii. 粒線體(Mitochondria)

先前曾經提到長期酒精投予會使肝細胞中粒線體的自由基產生量增加。有一些研究報告指出，酒精投予所造成的氧化壓力會造成大白鼠肝細胞中粒線體的 GSH 含量減少，而導致粒線體功能異常(Garcia-Ruiz *et al.*, 1994 & 1995)。而且他們的研究結果也發現，長期投予大白鼠酒精之後，由於肝臟中不同位置所產生的氧化壓力不一樣，造成肝細胞受損的分佈位置也有所差異，特別是中央靜脈周圍的肝細胞，酒精所造成的粒線體功能受損較其他區域嚴重。

粒線體中含有抗氧化酵素超氧岐化酶(manganese superoxide dismutase, Mn-SOD)，故 $O_2^{\cdot-}$可以在 Mn-SOD 催化之下轉變成 H_2O_2，而 H_2O_2 則是可以再經由抗氧化酵素麩胱甘肽過氧化酶(glutathione peroxidase, GPX)的作用，代謝成 H_2O。但是，當急性酒精投予或是長期攝取酒精而造成自由基生成過量或是抗氧化物質 GSH 減少、抗氧化酵素活性降低時，則粒線體的結構與功能將會受到傷害(Ishii *et al.*, 1997)。此外，粒線體 ATP 合成受阻也會直接造成肝細胞產生壞死的情形(Nanji and Hiller-Sturmhofel, 1997)。因此，酒精所造成的粒線體傷害會進一步導致肝損傷之形成。

iv. 細胞內其他受影響的成分

在大白鼠肝細胞實驗中發現到，酒精代謝過程中所產生的自由基會造成 DNA 的斷裂(Rajasinghe *et al.*, 1990)。此外，也研究指出，酒精投予會促進黃麴毒素 aflatoxin B1 所造成的肝毒害，可能是因為酒精會促進脂質過氧化並造成 8,9-epoxide-aflatoxin B1 與 DNA 共價結合所導致(Wang *et al.*, 1990)。因此，DNA 受損可能是酒精造成的傷害以及致癌的結果。

3. 酒精代謝產物乙醛之毒性作用

乙醛是酒精代謝過程中，最主要的產物。除了攝食進入體內的酒精會代謝成乙醛之外，當位於體內腸道中的微生物過度增殖時，也會將食物中的醣類發酵而產生酒精和乙醛(Baraona *et al.*, 1986)。乙醛主要是在肝臟粒線體中被氧化後形成乙酸而代謝掉。有研究指出，長期攝取酒精之後，粒線體代謝乙醛的能力會下降，使得血液中有較高濃度的乙醛(Hasumura *et al.*, 1975)。儘管乙醛代謝會因為長期攝取酒精而下降，但是，酒精代謝成乙醛的反應速率卻不會因此而受影響。因為，另一個參與酒精代謝的酵素 CYP2E1 會受到長期攝取酒精所誘導而提高其活性，故造成體內乙醛的濃度反而會增加。所以，在長期餵食酒精的狒狒實驗中，都可以發現到血漿中乙醛濃度明顯的上升(Pikkarainen *et al.*, 1981)，而且在狒狒的肝靜脈血液中也可以偵測到乙醛濃度顯著地增加，這意謂著肝臟中有大量的乙醛被產生(Lieber *et al.*, 1989)。當乙醛處於較高濃度而堆積肝臟時，則會對肝臟造成傷害，其作用如下：

(1) 乙醛會促進脂質過氧化作用

乙醛造成脂質過氧化的原因之一，曾經被認為是乙醛會經由肝細胞內 XO 與 aldehyde oxidase 這兩種酵素作用而產生自由基所造成(Muller and Sies, 1982)。然而，後來的學者推翻此一說法，並且在大白鼠體內實驗中證實乙醛並不會被 XO 當作受質被進行代謝(Kato *et al.*, 1990)。主要是因為在體外肝臟灌流的實驗中，能夠讓乙醛的濃度提高到與 XO 反應，相較之下，體內乙醛的濃度較低，故無法達到 XO 作用的濃度。

另一個原因則是因為在餵食酒精大白鼠的實驗中，證實酒精代謝產物乙醛會和 cysteine 以及 GSH 鍵結，並抑制 GSH 的合成作用，使得 GSH 的轉換率顯著提高，而造成肝臟中 GSH 含量減少所導致(Speisky *et al.*, 1985; Lieber, 1988)。GSH 是體內相當重要的抗氧化物質，當肝臟中 GSH 含量減少時，將無法有效抑制酒精所誘導的氧化壓力，而造成脂質過氧化作用並導致肝損傷。

(2) 乙醛與蛋白質作用形成附加物(protein adducts)

蛋白質附加物之形成是乙醛造成毒性作用的另一個原因。乙醛會和肝臟中微粒體內的蛋白質形成共價結合，如：CYP2E1 (Nomura and Lieber, 1981; Behrens *et al.*, 1988)。此外，乙醛也會和一些運輸蛋白質形成共價結合，如：血紅素、白蛋白、以及脂蛋白(Stevens *et al.*, 1981; Donohue *et al.*, 1983; Wehr *et al.*, 1993)。此外，由於酵素本身就是蛋白質，有體外實驗結果顯示乙醛可能會間接地鍵結到酵素蛋白質的重要官能基團上而阻礙酵素之活性(Solomon, 1987)。然而，乙醛蛋白質附加物在酒精性肝臟疾病形成過程中究竟扮演何種角色。目前的研究則是認為，脂質過氧化化產物(malondialdehyde)與乙醛蛋白質附加物所形成的複和物(malondialdehyde- acetaldehyde adduct, MAA)具有誘發體內免疫反應的作用，而且 MAA 會造成促發炎反應(proinflammatory)之發生，另外 MAA 也具有促纖維化的作用(profibrogenic properties)，而這些作用都會造成更嚴重的酒精性肝傷害(Tuma, 2002)。

(3) 其他與乙醛相關之研究

在酒精代謝過程中，會受到酵素活性(如：ADH 與 ALDH)之影響，而造成酒精代謝上的不同。根據基因多型性的研究指出，調控這些酵素的基因會隨著個體、性別、種族而有不同的突變機率，造成不同的人，雖然喝相同量的酒精飲料，但是累積在體內的乙醛濃度卻不相同，所以有不同的喝酒症候，例如，喝酒後很快就呈現臉紅或噁心等不適應症狀，就表示乙醛產生的量較多，或者是乙醛被分解代謝的速率較慢所造成。根據研究指出，東方人因為遺傳基因的關係，使得 ALDH 之同功酶 ALDH2 產生突變機率較西方人高。所以東方人有較高的比率是帶有 ALDH2*2 型基因，造成代謝乙醛能力較差。故攝取酒精之後，乙醛容易堆積體內而產生毒性，若長期攝取酒精，則罹患酒精性肝臟疾病之機率較西方人高(Wall *et al.*, 1992)。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。因此，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。

4. 細胞激素(cytokine)與酒精性肝臟疾病之關係

細胞激素是體內的小分子物質，主要是免疫系統的細胞所分泌，用來作為聯繫其他免疫細胞與免疫系統外的細胞。有很多研究指出，細胞激素 TNF-α 與酒精肝臟疾病之形成有關，以下將說明兩者之間的關係。

在肝臟中，TNF-α主要是由 Kupffer cell 所製造。有一些研究結果發現，在酒精性肝炎患者以及長期投予大白鼠酒精所造成的肝病變，TNF-α的量分別在血漿與肝臟中都有顯著的增加，顯示 TNF-α 與酒精性肝損傷有密切之相關性(McClain *et al.*, 1993; Nanji *et al.*, 1994)。藉由體外細胞實驗，瞭解 TNF-(會先和位於細胞表面的接受體(receptor)結合，再進行細胞內的反應。在體內，有數種不同型式的 TNF-(接受體存在，而肝細胞所帶有的接受體，即使在 TNF-(濃度相當低情形下也能夠與 TNF-(作用，因此，肝細胞自然會對細胞激素相當敏感。根據研究指出，長期攝取酒精會使肝細胞上 TNF-(接受體的數目增加，造成肝細胞更容易與 TNF-(進行結合與作用(Deaciuc et al., 1995)。此外，肝細胞也帶有一種稱作 CD95 或是 Fas 的接受體，此接受體與 TNF-(接受體類似。此種接受體會和某些免疫細胞(即細胞毒殺型 T 細胞)表面所帶的特異性分子(即 Fas ligand)作用。當 Fas ligand 與 Fas 接受體作用後，會引發細胞內化學反應進行而導致細胞凋亡。在中度至重度的酒精性肝臟疾病患者肝臟中，偵測到有大量的細胞毒殺型 T 細胞浸潤(Chedid et al., 1993)，因此推測這些細胞也可能會經由 Fas ligand-Fas 的交互作用而導致這些患者體內的肝細胞產生凋亡作用而死亡(Nanji and Hiller-Sturmhofel, 1997)。

(二)內毒素(entodoxin)的致病機轉

內毒素(endotoxin)是格蘭氏陰性菌細胞壁外膜的一部分，其生理活性主要是和脂多醣(lipopolysaccharide, LPS)有關。LPS 是複雜的兩性分子，分子量大約 10 kDa，並且由三個區域 Lipid A、R 多醣類以及 O 多醣類所構成。其中，

Lipid A 與內毒素毒性有關，而多醣類(polysaccharide)的部分則是和免疫反應之產生有關。內毒素對於大部分哺乳類動物是有毒的，而且不管細菌的來源，所有內毒素在動物宿主中產生相同程度的生物性作用。注射活的或是死亡的格蘭氏陰性菌或經過純化的 LPS 到實驗動物體內，會導致非特異性病理生理反應，例如：發燒、白血球細胞數目的改變、瀰漫性血管內凝血(disseminated intravascular coagulation, DIC)、低血壓、休克以及死亡。死亡發生的快慢因內毒素的劑量、給予的方式以及動物的種類而不同。目前已知格蘭氏陰性菌溶解後，將 LPS 釋放進入血液，並與 LPS-binding protein (LBP) 鍵結，形成 LPS-LBP 複合物。LPS-LBP 複合物可以和單核球細胞與巨噬細胞上的 CD14 接受體互相作用而促進細胞激素的產生，包括 IL-1、IL-6、IL-8 以及 TNF-α等，而導致發炎反應之發生。

(三)內毒素在酒精性肝炎致病機轉中所扮演之角色

在受到數種毒性物質如：四氯化碳、病毒或是酒精所導致的肝臟損傷形成過程中，許多證據證實格蘭氏陰性菌細胞壁的組成物內毒素或 LPS 是重要的調控因子。在慢性酒精中毒患者方面，血漿中內毒素濃度通常會伴隨肝臟損傷的發生而上升(Fukui *et al.*, 1991)。此外，在胃插管灌食大白鼠的研究中，慢性酒精投予與血漿中內毒素濃度的提高以及肝損傷的發生有關(Nanji *et al.*, 1993)。另外，臨床研究也指出，血漿中內毒素的濃度與酒精性肝炎具有顯著的正相關(Parlesak *et al.*, 2000; Fujimoto *et al.*, 2000)。因此，人體與動物研究均顯示，在肝臟損傷的形成過程中酒精會誘導較高的血漿內毒素濃度。由此推測酒精可能會經由增加腸道對於內毒素穿透能力以及/或是促進在腸道中產生內毒素的微生物生長以提高血漿內毒素濃度。身體中內毒素濃度升高後，會誘導肝臟中的巨噬細胞 Kupffer cells 產生數種細胞激素，如：介白素-1(Interlukin-, IL-1), 介白素-6 (Interlukin-6, IL-6), 介白素-8 (Interlukin-8, IL-8)與腫瘤壞死因子(Tumor Necrosis Factor-α, TNF-α)等致發炎物質，進而造成肝臟細胞產生發炎現象。另

外，因長期酒精攝取所造成的高內毒素血症也會造成身體的非特異性免疫反應，例如：腸道中 IgA 濃度以及血漿中 IgA、IgG 以及 IgM 濃度顯著上升等現象，這也是造成酒精性肝炎的原因之一(Decker 1990)。另外，研究也發現，因內毒素所造成的免疫反應，也會使得 cytochrome P450 2E1 表現增加，血漿 NO 濃度上升，肝臟中還原型麩胱甘肽(reduced glutathione, GSH)降低，使得體內氧化壓力增加，造成過氧化脂質生成物過度產生(William and Barry, 1987; Rouach *et al.*, 1997)。這些脂質過氧化物也會刺激 Kupffer cells 分泌上述的發炎性細胞激素，因而造成肝臟細胞發炎。因此，導致酒精性肝臟疾病的原因除了酒精單一因子外，源自腸道之內毒素在酒精性肝臟疾病形成與惡化的過程中，更是扮演重要的角色。

近來的研究發現，罹患不同程度的酒精性肝臟疾病患者血液中 LPS 濃度皆顯著較正常人高(Fukui *et al.*, 1991)，其中又以急性酒精中毒所造成之酒精性肝炎的濃度最高(Urbaschek *et al.*, 2001)。造成酒精性肝臟疾病患者內毒素血症之可能原因包括：

(a)酒精攝取造成小腸細菌過度繁殖

研究結果發現，小腸中的厭氧菌與好氧菌數量方面，酗酒的人明顯高於正常受試者(Bode *et al.*, 1984)，顯示長期酒精攝取會造成腸道中的細菌過度繁殖。因此，長期酒精攝取有可能會造成腸道中細菌毒素，尤其是 LPS 的生成量增加，進而導致 LPS 自腸腔轉移到肝門血液或是淋巴液的機會提高。

(b)酒精攝取誘發腸胃道黏膜受損

在動物與人體試驗中發現攝取大量酒精除了會造成胃出血症狀外，腸道細胞間彼此以連結小體(desmosomes)與緊密連結(tight junctions)所形成的細胞屏障也會受到破壞，進一步使得少量的細菌、大分子物質以及某些毒性物質穿過腸道黏膜進入腸肝循環而影響到肝臟(Bode *et al.*, 1999; Laine and Weinstein, 1988)。

(c)酒精攝取造成腸道通透性增加

在腸道通透性試驗方面，使用不同分子量大小的聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)當作探針進行投予，結果發現酒精性肝臟疾病患者尿液中 PEG M_r

1,500、M_r 4,000 以及 M_r 10,000 含量皆顯著高於正常受試者，顯示酒精性肝臟疾病患者腸道通透性較正常人高，使得大分子物質容易通過腸道進入體內循環(Parlesak *et al.*, 2000)。

(四) 不同性別在酒精性肝臟疾病方面之表現

根據臨床研究資料顯示，不同性別對於酒精性肝臟疾病之表現亦有所不同，即使女性所攝取的酒精量比男性少，女性卻是比男性更容易而且更快速形成酒精性肝臟疾病(Ashley *et al.*, 1977; Loft *et al.*, 1987)。真正的原因尚未十分清楚。有些研究則推測，性別差異所造成的酒精代謝能力不同可能是其中的原因之一(Becker *et al.*, 1996; Schenker, 1997; Mezey *et al.*, 1998)。在大白鼠動物模式中也發現到，雌性大白鼠較雄性大白鼠更容易形成酒精性肝臟疾病(Iimuro *et al.*, 1997)。而其他以大白鼠所進行的研究則是認為雌激素(Estrogen) (Maher, 1998)與內毒素(Kono *et al.*, 2000; Nanji *et al.*, 2002) 是造成雌性大白鼠更容易罹患酒精性肝臟疾病之重要因素。至於更詳細的機轉則是需要進一步的研究加以探討。

(五)酒精性肝臟疾病動物模式之建立

在 1967 年，DeCarlie 與 Lieber 兩位學者曾經發表一項慢性酒精性肝臟疾病動物模式之研究(DeCarlie and Lieber, 1967)。該實驗方法主要是以 AIN-76 為基礎，設計出一項營養均衡而且等體積、等熱量之流質飲食，其中，酒精組所使用的酒精量佔總熱量 36%，對照組則是以等熱量的麥芽糖糊精(Maltodextrin)取代酒精所佔的熱量部分，並且以大白鼠作為實驗動物。由於此大白鼠動物模式經常被用來進行慢性酒精性肝臟疾病之相關研究，故在許多研究中被特稱為 Lieber-DeCarlie model。此方法之優點包括：動物容易取得、流質飲食容易製備、實驗期短，僅需 4 週即可誘發大白鼠形成慢性酒精性脂肪肝，而且動物能夠自

由進食，符合一般生理狀況。然而，**此動物模式之缺點有二：(1)所誘導的大白鼠酒精性脂肪肝與人類酒精性脂肪肝比較之下，大白鼠的肝臟脂肪堆積屬於小油滴型，而人類則是屬於大油滴的堆積方式。(2)無法誘發大白鼠發生慢性酒精性肝炎之發生，因此，無法使用此動物模式進行慢性酒精性肝炎、肝纖維化以及肝硬化之相關研究。**之後，該實驗室改用狒狒作為實驗動物模式，並且將酒精組的酒精含量提高為總熱量之 50%，約 1~2 年便可以觀察到肝臟纖維化之發生(Rubin and Lieber, 1973)。**然而，此動物模式中所使用的狒狒不易取得而且實驗期相當長，故甚少被其他研究者所採用。**

在 1993 年，另外一個研究團隊將他們早期針對大白鼠所建立"頸靜脈與胃部插管"的外科手術(Tsukamoto *et al.*, 1984)應用於酒精性肝臟疾病之相關研究領域上，而成為另一項酒精性肝臟疾病之動物模式，稱之為 Tsukamoto-French model (Tsukamoto and French, 1993)。此動物模式之優點包括：動物容易取得、實驗期短，僅需 4 週即可誘發大白鼠形成慢性酒精性肝炎，而且頸靜脈插管能夠方便於各時間點採集血液樣本、胃部插管則是能夠不斷地提供大白鼠固定量的酒精與其他營養素。**然而，許多其他學者認為此模式的缺點在於需要對大白鼠進行外科手術，其中除了手術器材不易取得、手術不易進行之外，長期胃插管的餵食方式也不符合經口攝食的正常途徑。**

因此，如何利用正常酒精攝取途徑(例如以口服的形式)，而且在簡單、容易執行、誘導期適當，且誘導成功率高的原則之下，建立類似人類長期攝取酒精所導致的慢性酒精性肝炎的動物模式對於酒精性肝臟疾病之臨床治療與預防是非常迫切需要的。

四、研究方法

本研究以酒精液體飼料以誘發大白鼠形成慢性酒精性肝炎，並利用下列五項與酒精性肝炎相關之指標，以綜合評估誘導之成效同時探討慢性酒精性肝炎之致病機轉：

(1)一般生化值測定

肝功能指數 AST、ALT 活性、血漿與肝臟中 TG 與 TC 之濃度。

(2)氧化壓力狀態測定

分析血漿中以及肝臟組織中抗氧化物質(glutathione, GSH)含量與 P450 2E1 表現量之變化。

(3)發炎反應與細胞激素分泌情形

分析血漿中 TNF-α濃度之變化。

(4)腸道免疫狀態與組織病理切片觀察

觀察小腸組織病理之變化。

(5)肝臟組織病理切片觀察

觀察肝臟組織病理之變化。

2. 研究方法與進行步驟

(1)實驗材料與方法

(a)實驗動物之飼養

利用雄性與雌性 Wistar 品系大白鼠各 20 隻，6 週齡、重約 120 g，購自國立台灣大學實驗動物繁殖及研究中心。飼養於台北醫學大學實驗動物中心，室溫 23 ± 2℃、相對濕度 55 ± 10%、12 小時明暗自動更替，大白鼠個別飼養於不銹鋼吊籠之中。

(b)動物飼料之組成與配製

根據 Lieber-DeCarli 之方法(1976)，將實驗飼料分為兩種：佔總熱量 36%

之酒精流質飲食以及正常流質飲食。為了使兩種流質飲食達到等熱量，正常流質飲食以麥芽糖糊精(Maltodextrin)取代酒精所佔的熱量部分。實驗飼料組成如表一。

表一、實驗飼料組成

Component	Control	Ethanol
	Concentration [g/L(1000 kcal)]	
1. Casein	41.4	41.4
2. L-Cystine	0.5	0.5
3. DL-Methionine	0.3	0.3
4. Corn oil	8.5	8.5
5. Olive oil	28.4	28.4
6. Safflower oil	2.7	2.7
7. Choline bitartrate	0.53	0.53
8. Fiber	10.0	10.0
9. Xanthan gum	3.0	3.0
10. ICN:AIN-76 Vitamins	2.5	2.5
11. ICN:AIN-76 Minerals	2.6	2.6
12. Maltodextrin	115.2	25.6
13. Ethanol	---	50

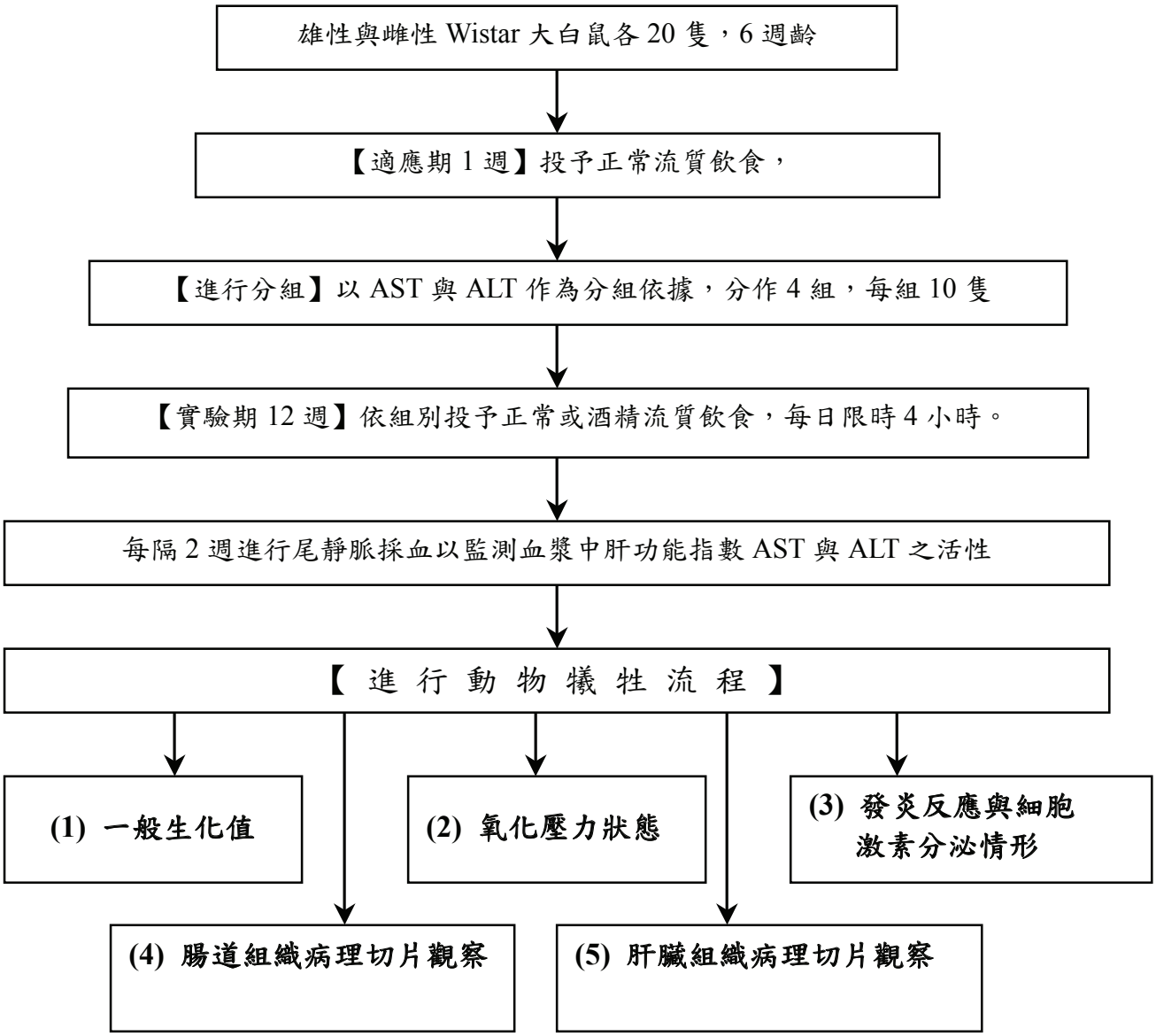
(c)動物飼料之投予方式

對照組以正常流質飲食之液體飼料飼養，而酒精組則是以酒精流質飲食投予，各組以等熱量之方式進行飼料投予。液體飼料擬以二次去離子水調配，每三天配製一次並保存於 4°C 冰箱中。於每日早上 8 點進行投予並於中午 12 點收回，記錄各組攝食量。此外，每週記錄體重一次。

(d)實驗動物之分組

所有大白鼠先以正常流質飲食預養一週後，進行尾靜脈抽血，並依血液生化值 AST 與 ALT 作為分組之依據，進行分組。將 40 隻大白鼠依照血漿中肝功能指數 AST 與 ALT 活性分成四組：雄性對照組(MC)、雄性酒精組(ME)、雌性對照組(FC)以及雌性酒精組(FE)，每組 10 隻。實驗期為 12 週。

(e)實驗流程及分析項目


雄性與雌性 Wistar 大白鼠各 20 隻，6 週齡
【適應期 1 週】投予正常流質飲食，
【進行分組】以 AST 與 ALT 作為分組依據，分作 4 組，每組 10 隻
【實驗期 12 週】依組別投予正常或酒精流質飲食，每日限時 4 小時。
每隔 2 週進行尾靜脈採血以監測血漿中肝功能指數 AST 與 ALT 之活性
【 進 行 動 物 犧 牲 流 程 】
(1) 一般生化值
(2) 氧化壓力狀態
(3) 發炎反應與細胞激素分泌情形
(4) 腸道組織病理切片觀察
(5) 肝臟組織病理切片觀察

(2)動物犧牲

每兩星期由尾靜脈抽取靜脈血，測定肝臟功能。實驗結束前一天收集尿液。實驗開始 8 週後，犧牲動物。由大白鼠腹大動脈抽取血液，收集於含肝素(heparin)或 EDTA 的試管中，收集之血液於 1200xg 4℃下離心 15 分鐘，收集血漿部分。腹大動脈抽血完畢後，以生理食鹽水從肝門靜脈灌入，進行肝臟灌流後，取出肝臟。最後，取出小腸組織。

(3)血液、肝臟以及小腸樣本之處理

擬收集於含肝素(heparin)或 EDTA 的試管中，於 1200 xg 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。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。另外，收集小腸組織的內容物，並保存小腸組織進行分析。

(4)分析方法

(a)一般生化值之分析

(i)肝功能指數 AST、ALT 之活性

血漿中 AST(aspartate aminotransferase)與 ALT(alanine aminotransferase)之活性擬參照 Lippi and Guidi (1970)的方法，以市售試劑組(TA-LQ, Iatron Laboratories Inc., Toyko, Japan)進行分析。取血漿 5 µL 至玻璃試管中，加入 AST 或 ALT 反應試劑 125 µL，震盪均勻後，於 37℃下水浴 30 分鐘，再加入 750 µL 反應終止液(0.1 N HCl)，於室溫下靜置 5 分鐘，最後以波長 570 nm 紀錄吸光值。將測定值代入標準檢定曲線即可求得 GOT 或 GPT 之活性。此外，由於酒精性肝炎患者血漿中 AST/ ALT ratio 通常大於 2，故 AST/ ALT ratio 也必須在結果中予以表示。

(ii)血漿與肝臟中 TG 與 TC 之濃度

血漿中三酸甘油酯(triglyceride, TG)之濃度擬以市售試劑組(Randox)測得。取血漿 5 µL 至玻璃試管中，加入反應劑 500µL 震盪均勻，於 37℃下水浴 5 分鐘，於波長 500 nm 下紀錄吸光值。將測定值代入標準檢定曲線即可求得血

漿中 TG 之濃度。

血漿中總膽固醇(total cholesterol, TC)之濃度擬以市售試劑組(Randox)測得。分析步驟同血漿中 TG 濃度部分所述。

肝臟中 TG 之濃度，擬以市售試劑組(Randox)測得。首先進行肝臟中 TG 之萃取，取 0.5 克的肝，加入 6 mL 萃取液〔chloroform/methanol= 2/1 (v/v)〕，使用組織均質機(polytron)將肝臟均質化，使用濾紙過濾肝臟均質液到 15 mL 塑膠離心管中；以萃取液定量至 10 mL，加入 2 mL 0.05% $CaCl_2$ 並震盪均勻，於 4℃、1,750 × g (3,000 rpm)條件下離心 3 分鐘。離心後，去除上層液，再以萃取液〔chloroform/methanol/water = 3/48/47 (v/v/v)〕定量至 12 mL 並震盪均勻，同樣於 4℃、1,750 × g 條件下離心 3 分鐘。離心後，去除上層液，先以 methanol 定量至 9 mL，再以萃取液〔chloroform / methanol = 2/1 (v/v)〕定量至 10 mL，並儲存於-20℃下保存，等待分析。分析當日，取肝臟萃取液 100 μL 至玻璃試管中，並置於真空乾燥箱中以抽乾去除有機溶劑。加入反應劑 500 μL 震盪均勻，於 37℃下水浴 5 分鐘，於波長 500 nm 下紀錄吸光值。將測定值代入標準檢定曲線即可求得肝臟中 TG 濃度。

肝臟中 TC 之濃度，擬以市售試劑組(Randox)測得。前處理、萃取方法以及分析步驟同肝臟中 TG 部分所述。

(b)氧化壓力狀態

(i)肝臟 GSH 之濃度

擬依據 Anderson 的方法，以市售試劑組(No. 354102, Calbiochem)測得(36)。將收集到的細胞液，於 4℃、3,000 rpm 條件下離心 10 分鐘，移除上清液 PBS，並加入 5% MPA 500μL，混勻後以超音波破膜機將細胞破膜；之後再離心 10,000 rpm、10 分鐘、4℃，取上清液以進行分析。分析時，取上清液 100μL，並加入 800μL 緩衝液(200mM potassium phosphate, 0.2mM DTPA, 0.025% LUBROL, pH7.8)，再依序加入 50μL 的反應液(12mM chromogenic reagent, 0.2N HCl)以及 50μL 30% NaOH 溶液，混合均勻後置於室溫下、暗處中作用 10 分鐘，以波長 400 nm 測其吸光值。另外，製備不同標準濃度之 GSH (0, 20, 40, 60, 80, 100μM)以求得標準曲線，再以內插法求得肝細胞中 GSH 之濃度。

(ii)肝臟中細胞色素 P450 2E1 (CYP2E1)表現量

大白鼠犧牲後，取下肝臟立即放入液態氮中急速冷凍，凍結後取出至-80°C 冷凍櫃中，至分析時再取出解凍。參考 Useugi 等人(2002)的方法，以西方點墨法(Western blottig)定量肝臟組織中 CYP2E1 的表現量。首先進行肝臟前處理，

取 0.5 克的肝，加入 1.5 mL 均質液(10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4,內含 150 mM potassium chloride 與 1mM EDTA 以及 0.25 M sucrose)，使用 polytron 將肝臟均質化，將組織均質液分裝至微量離心管，於 4°C、10,000 × g 條件下離心 30 分鐘，取上層液進行分析。擬使用的抗體為 Monoclonal anti-rat P450 2E1 (Oxford Biomedical Research, Inc)。

(c)發炎反應與細胞激素分泌情形

血漿中 TNF-α之濃度

TNF-α含量擬以 Rat TNF-α Eli-pair (Diaclone©)市售試劑組測定。其測定原理與為將血漿加入附有專一抗體的 well 中，再加入連接有 peroxidase 的二次抗體。經過 incubation 以及 washing 的步驟後，移除沒有結合上的抗體。最後再加入 peroxidase 受質作用呈色，於波長 450nm 下，以 ELISA 儀器測定吸光值。取 100贡L capture antibody 加入 10mL 的 coating buffer 後，分取 100贡L 到 96well 的培養皿。放於 4℃ 中 overnight。每個 well 再加上 250贡L 的 saturation buffer 於室溫下進行固定 2 小時後，用吸水紙弄乾後，開始進行測定。以 saturation buffer 標準品或細胞液進行稀釋後，取 100贡L 到 well 中，再加入 biotinylated detection anti-human TNF-脉溶液，於室溫下作用 3 小時。然後加入 100贡L HRP-Streptavidin Diluent Buffer 後，作用 20 分鐘，然後再加 1M 的 H_2SO_4 停止反應。於 450nm 下以 ELISA 儀器測定吸光值。

(d)腸道組織病理切片觀察

大白鼠犧牲後，取 12 指腸與小腸中段的部位，以縱剖的方式切取大小 0.5 cm × 0.5 cm 的組織，以大頭針將腸黏膜固定在珍珠板上，浸泡於 10%福馬林後，進行組織脫水、清洗、浸潤與包埋的步驟後，最後製成石蠟切片，進行 H&E stain，觀察 12 指腸與小腸中段部位的組織病理變化。

(e)肝臟組織病理切片觀察

實驗結束時，所有大白鼠均予以犧牲，剪下肝臟，為了避免觀察主觀上的偏差，所有的組織病理切片都是由最大右葉肝的同一位置切取大小 1 cm × 1 cm 的肝組織，浸泡於 10%福馬林後，將肝臟以橫切的方式，切成大小約 0.5 公分、厚度約 0.2 公分左右的樣品，進行組織脫水、清洗、浸潤與包埋的步驟後，最

後製成石蠟切片，進行 H&E stain，觀察肝臟組織病理變化。為了觀察慢性肝損傷時，肝細胞的受損、脂肪變性、壞死、纖維化等變化，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。至於病理切片結果的半定量分析方面，委請台北醫學大學附設醫院病理學科，在不清楚本實驗設計的情況下，對所有切片進行評分比較，最後再以統計分析方法進行各組差異性的分析。其評估方式之依據整理如下表(Ruwart et al., 1989; Joker et al., 1992; Gabriele, 1997)。酒精性肝炎組織病理學特徵包括：(1)發炎性壞死(steatohepatitis)；(2)在肝小葉內有明顯嗜中性多型核細胞(polymorphonuclear cell, PMN)浸潤，而且多發生在中央靜脈周圍，PMN 有聚集在壞死以及含有 Mallory's alcohol hyaline body 肝細胞周圍的傾向。

【肝臟組織病理評分表】

類　　別	評估項目	評分方式
H&E stain (hematoxylin and eosin stain)	肝細胞發炎程度	評估分數由"0"到"4"分，其中"0"表示沒有(absent)；"1"表示少量(trace)；"2"表示輕微(weak)；"3"表示中等程度(moderate)；"4"表示極嚴重(strong)。
	脂質變性	
	肝細胞壞死	
	膽管增生	
Silver stain Masson stain	纖維化	評估分數是由"0"到"4"分，其中"0"表示沒有膠原的增生；"1"表示有膠原的增生，但無 septal 之形成；"2"表示有膠原的增生，此外有 septum 之形成，但中隔彼此沒有交會；"3"表示有膠原的增生，有 septum 之形成，而且中隔彼此交會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。

(4)統計分析

以 Statistical Analysis System (SAS)軟體執行數據統計分析工作。所有數值以 Mean ± SD 表示，$p < 0.05$ 具有統計上意義。以三因子變異數分析法(three-way ANOVA)進行變異數分析，並以 Fisher's test 比較組間差異。

五、結果

餵食酒精之後，流質飼料(A)與大白鼠血液(B)中酒精濃度之變化，如圖一所顯示。首先，在整個餵食酒精的兩小時期間，針對餵養瓶中所剩餘的液體飼料進行酒精濃度的監測，可以發現到在餵食期間酒精濃度都介於 45~50 g/L 之間，顯示液體飼料中所含的酒精濃度，在此餵養瓶中並不會因為時間增加而快速地蒸發減少。另外，由大白鼠血液中的酒精濃度可以發現到，在餵食之後，血液中的酒精濃度在 12 小時內都是維持在 200 mg/dL 以上。

(a)一般生化值之分析

(i)肝功能指數 AST、ALT 之活性

如表一所示，不同性別大白鼠長期餵食對照或酒精液體飼料對於實驗初與實驗末血漿中肝功能指數 AST 與 ALT 活性之影響。首先，在實驗初始的 AST 與 ALT 活性方面，MC 與 ME 組或者是 FC 與 FE 組之間均無差異；但是針對不同性別部分做比較時，則是發現到 FC 與 FE 組實驗初始的 ALT 活性分別比 MC 與 ME 組顯著低 14% (P<0.05)，而且雌性組初始的 AST 與 ALT 活性均顯著比雄性組低(P=0.0133)。另外，在實驗結束之後，ME 組血漿中 AST 與 ALT 活性分別比 MC 組顯著上升 58%與 92%(P<0.05)；同樣地，FE 組血漿中 AST 與 ALT 活性則是分別比 FC 組顯著上升 61%與 188% (P<0.05)；而且酒精攝取組也會明顯地造成 AST (P=0.0010)與 ALT (P=0.0001)之活性上升。另外，在不同性別方面，FE 組 AST 與 ALT 活性分別比 ME 組的顯著上升 35%與 30% (P<0.05)，而且雌性組的 AST 活性也會顯著比雄性組上升(P=0.0001)。

(ii) 血漿與肝臟中 TG 與 TC 之濃度

血漿中 TG 與 TC 之濃度如表二所示。在血漿 TG 濃度，MC 與 ME 組或者是 FC 與 FE 組之間均無差異；但是針對不同性別部分做比較時，則是發現到 FC 與 FE 組分別比 MC 與 ME 組明顯減少 43%與 47% (P<0.05)，而且雌性組的 TG

濃度也顯著較雄性組減少(P=0.0133)。在血漿 TC 濃度部分，ME 與 FE 組分別比 MC 與 FC 組顯著增加 36%與 45% (P<0.05)；而且，酒精攝取組的 TC 濃度也會顯著比對照組增加(P<0.0001)。而表三顯示不同性別大白鼠長期餵食對照或酒精液體飼料對於肝臟中 TG 與 TC 含量之影響。首先，在 TG 含量方面，ME 與 FE 組分別比 MC 與 FC 組顯著增加 197%與 226% (P<0.05)；而且酒精攝取組肝臟中的 TG 含量也會比對照組明顯增加(P<0.0001)。此外，就不同性別而言，FE 組的 TG 含量比 ME 組顯著增加 28% (P<0.05)；而且雌性組的 TG 含量也是明顯地比雄性組增加(P=0.0283)。同樣地，在肝臟中 TC 含量方面，ME 與 FE 組分別比 MC 與 FC 組顯著增加 27%與 58% (P<0.05)；而且酒精攝取組肝臟中 TC 的含量也是顯著地比對照組增加(P<0.0001)。另外，在不同性別方面，FE 組肝臟中的 TC 含量明顯比 ME 組增加 36% (P<0.05)；而且雌性組的 TC 含量也比雄性組的顯著增加(P=0.0038)。

(b)氧化壓力狀態

(i) 肝臟組織中抗氧化物質 GSH 之含量

肝臟組織中抗氧化物質 GSH 之含量如表四所示。ME 與 FE 組的含量分別比 MC 與 FC 組的顯著減少 36%與 30% (P<0.05)；而且酒精攝取組的含量也明顯比對照組減少(P=0.0001)。針對不同性別進行比較，則是發現到 FC 組的含量顯著較 MC 組的少 24% (P<0.05)；而且雌性組的含量也是比雄性組的明顯較少 (P=0.0172)。

(ii) 肝臟中細胞色素 P450 2E1 (CYP2E1)表現量

圖二顯示不同性別大白鼠長期餵食對照或酒精液體飼料對於肝臟中微粒體 CYP2E1蛋白質表現之影響。由此圖可以明顯地看到CYP2E1的蛋白質表現在ME組與FE組中有受到誘導而表現；相反地，在MC與FC組則是沒有被偵測到。

(c)發炎反應與細胞激素分泌情形

血漿中 TNF-α之濃度

血漿中 endotoxin 與 IL-1、IL-6、IL-8 之濃度未測。表五表示血漿中 TNF-α 之濃度，ME 與 FE 組分別比 MC 與 FC 組顯著增加 158%與 228% (P<0.05)；而且酒精攝取組的濃度也比對照組顯著增加(P<0.0001)。

(d)組織病理切片觀察

圖三顯示不同性別大白鼠長期餵食對照或酒精液體飼料對於十二指腸病理切片結果之影響。A、B、C以及D分別代表MC、ME、FC以及FE組的結果。由此圖可以觀察到四組的十二指腸黏膜細胞皆相當完整，因此並未受到明顯地破壞而造成損傷。

(e)肝臟組織病理切片觀察

圖四顯示不同性別大白鼠長期餵食對照或酒精液體飼料對於肝臟病理切片結果之影響。A、B、C 以及 D 分別代表 MC、ME、FC 以及 FE 組的結果。由此圖可以清楚地觀察到 ME 與 FE 組這兩個酒精攝取的組別都有脂肪堆積的情形，而且 FE 組的脂肪變性比 ME 組更嚴重。

六、討論

（一）肝功能指數 AST、ALT 結果方面

血漿中 AST 與 ALT 兩者都是肝損傷的指標項目，兩者的異常升高與慢性酒精中毒有關， 因此，兩者可以用來作為辨別酒精性肝臟疾病與非酒精性肝臟疾病之參考。在本研究中，相較於同性別的對照組，長期酒精投予都會造成血漿中 AST 與 ALT 之活性顯著地上升，而且雌性組的升高情形也比雄性組的更明顯。

（二）膽固醇之變化

於本研究中，不論雄性或雌性大白鼠，攝取酒精造成 TC 濃度顯著地比對照組增加。根據 Latour 等人的研究報告指出，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(Latour *et al.*, 1999)。

雌性酒精組肝臟中 TC 含量比雄性組顯著更多。造成膽固醇累積在肝臟中之原因，與長期攝取酒精會增加細胞內膽固醇的合成(Visioli *et al.*, 1998)以及降低膽固醇代謝成膽酸的速率(Lakshmanan and Veech, 1977)等因素有關。

（三）三酸甘油酯之變化

在肝臟中 TG 含量方面，也是一樣的結果。造成肝臟中 TG 含量增加之原因包括：肝細胞中脂肪酸β-oxidation 作用受抑制，使得脂肪酸無法進行代謝分解而形成 TG。此外，肝臟從血液中得到的游離脂肪酸，也會受到酒精代謝之影響而無法進行代謝而形成 TG。因此，不同來源的脂肪酸堆積於肝臟中後，會以 TG 的型式儲存於肝臟中，而造成脂肪堆積的情形(Lieber, 1994)。此外，我們的結果也發現，雌性酒精組大白鼠肝臟中，TG 堆積之情形比雄性組嚴重。根據 Grimbert 等人的實驗結果顯示，懷孕末期的小鼠肝細胞中脂肪酸 β-oxidation 與 TCA cycle

的作用會下降，導致肝細胞中游離脂肪酸含量增加，如果注射雌二醇(estrodiol)給予這些懷孕小鼠，則會誘發懷孕小鼠發生急性脂肪性肝之形成，故推測過高的雌激素可能會影響脂肪酸 β-oxidation 而導致細胞內脂肪之堆積(Grimbert et al., 1993)。故，我們推論雌激素可能是造成雌性酒精組大白鼠肝臟脂質堆積情形較嚴重之原因。

由此可知，長期攝取酒精會造成肝臟中 TC 與 TG 之堆積，導致酒精性脂肪肝之形成，其中又以雌性比雄性脂肪肝情形更加嚴重。

（四）肝臟組織中抗氧化物質 GSH 之含量

GSH可以參與抗氧化酵素GPX之作用以清除過多之自由基(如：H_2O_2與$OH^{\bullet}$)。GSH也可以熬合金屬離子(如：Cu^{+})藉以阻斷自由基之形成(Hanna and Mason, 1992)。此外，如文獻回顧所述，GSH也參與肝臟中許多重要的代謝路徑，幫助外來物質之正常代謝。因此，GSH對於生命體而言是相當重要的。GSH是由glutamic acid、cysteine、glycine三個胺基酸所組成的，而且GSH是細胞內提供thiol基團之主要來源(Sastre *et al.*, 1996)。GSH除了走重新合成路徑(*de novo*)，將這三種氨基酸合成GSH之外，GSH也能夠藉由GRD的作用將氧化型式的GSSG，轉變成為2個分子的GSH。因此，藉由GSH、GSSG之含量以及[GSH/GSSG]比值這三個項目，就能夠判斷GSH整體之變化。

在本研究結果中，長期攝取酒精所造成的氧化壓力，會導致體內肝臟中 GSH 含量明顯減少。其中又以雌性大白鼠的 GSH 含量明顯比雄性組減少與降低。根據這些結果顯示，我們推論，長期攝取酒精會造成組織中抗氧化物質 GSH 耗盡，其機轉至少有一部份是因為酒精會藉由阻礙 GSSG 轉變成為 GSH 所造成。

雖然在文獻回顧中曾經提到，酒精代謝產物乙醛會與 GSH 形成附加物(adduct)而導致 GSH 含量減少(Vina *et al.*, 1980)。但是，有研究指出，乙醛並不容易和 GSH 形成穩定的鍵結(Kera *et al.*, 1985)，而是當乙醛處於超過生理濃度之情形下，才會與 GSH 有明顯的附加物形成(Speisky *et al.*, 1988)。根據不同動物實

驗模式的研究結果顯示，長期攝取酒精所導致的氧化壓力，會導致肝臟中 GSH 含量顯著減少(Zidenberg-Cherr *et al.*, 1990; Hirano *et al.*, 1992)。另外，有研究指出，酗酒者血液中 GSH 含量顯著較正常人減少，且參與 GSH 合成的酵素 glutathione synthetase 活性亦顯著降低(Loguercio *et al*., 1997)，因此，長期攝取酒精可能會導致 glutathione synthetase 活性降低，使 GSH 合成作用受抑制而減少。也有一些研究學者曾經指出，慢性酒精投予並不會影響到肝臟中 GSH 的含量，然而也有別的學者發現肝臟中 GSH 含量會受到影響而增加或減少。這些文章中最互相矛盾之處在於長期酒精投予對肝臟中 GSH 含量所造成的影響，有可能歸因於酒精投予時間的長短和營養所造成的影響或者是日夜週期的差異(Ishii *et al.*, 1997)。

（五）肝臟中細胞色素 P450 2E1 (CYP2E1)表現量

根據早期的研究發現，在大白鼠與兔子的肝臟微粒體中，屬於 P450 superfamily 的 CYP2E1，特別會受到酒精等小分子的誘導作用而表現(Teschke *et al.*, 1977; Koop *et al.*, 1982)，在人體也證實 CYP2E1 會特異性地受到酒精所誘導(Nelson et al., 1993)。在慢性與過度飲酒的人身上，CYP2E1 會受到誘發而造成這些人對於酒精的代謝速率加快(metabolic tolerance) (Salaspuro and Lieber, 1979)。在本研究中我們也再次確認長期餵食酒精的大白鼠，無論雄性或雌性，其肝臟中的微粒體都有明顯偵測到此一蛋白質的表現。CYP2E1 除了具有代謝酒精作用之外，有許多的研究文獻指出，CYP2E1 的誘導作用會造成氧化壓力上升，因此與酒精性肝臟疾病的形成有密切之相關性(Lieber, 2004)。酒精若是經由 CYP2E1 代謝則會產生更具活性的 ROS。由於 ROS 在化學上以及電位上均不穩定，而且會很快地與構成細胞重要的他分子如：脂質、蛋白質以及 DNA 作用，造成這些分子受到氧化作用而影響其正常功用。例如，ROS 會與圍繞在細胞膜上的脂質作用，而造成脂質過氧化反應，使得細胞膜完整性受損，造成肝細胞死亡(Ishii *et al.*, 2003)。而且在大白鼠實驗中也發現到，透過抑制 CYP2E1 的作用，可以防止酒精所造成的肝損傷(Gouillon *et al.*, 2000)。

（六）血漿中 TNF-α之濃度方面

在另一項動物實驗中，同樣地使用 Lieber-Decarli 模式的酒精液體飼料餵食雄性與雌性大白鼠為期八週，其結果顯示，餵食酒精組大白鼠肝臟中 TNF-α之含量會比對照組明顯增加，進而導致肝臟中有更多的肝細胞走向細胞凋亡造成肝損傷，其中有以雌性組大白鼠肝臟中 TNF-α含量與肝細胞細胞凋亡增加之情形較雄性組更顯著(Colantoni et al., 2003)。在本次實驗中，我們也偵測到餵食酒精組大白鼠血漿中 TNF-α濃度明顯比對照組增加。雖然雌性酒精組的 TNF-α濃度有比雄性酒精組的高，但是並不顯著。因此，我們推測可能是因為偵測細胞激素的位置於血漿或組織原位(in situ)的不同所導致。目前許多偵測細胞激素的文獻指出，偵測組織中的細胞激素產生量比偵測全身性(systemic)更重要，也更能反映目標組織正處於何種病理過程(Das et al., 2005)。

（七）小腸組織病理切片之觀察

根據 Zucoloto 等人的研究指出，大白鼠經過空腸前端切除手術之後，餵食酒精液體飼料 1 個月之後，發現其空腸的細胞數目、負責吸收養分的腸細胞高度以及位於底部的 crypt cell 數目，皆顯著減少(Zucoloto *et al.*, 1996)。但是，也有研究指出，依照 Lieber-Decarli 模式餵食大白鼠酒精液體飼料 35 天之後，其小腸病理切片觀察結果顯示與正常組之間並無差異(Tamai *et al.*, 2002)。在本研究中，酒精組與對照組的十二指腸上皮組織並無明顯變化。推測由於 Lieber-Decarli 模式中含較低濃度的酒精(5%, wt/vol)，所以並不會造成一些病理方面的變化，例如：小腸黏膜的糜爛或是喪失上皮組織的細胞等症灶。

（八）肝臟組織病理變化之觀察

配合肝臟病理切片之結果，也可以清楚地觀察到雌性組大白鼠的肝臟，受到

酒精所誘導之傷害是更嚴重的。根據文獻報告指出，女性對於酒精所造成之酒精性肝臟疾病比男性更容易產生。在一項動物實驗中，依照 Lieber-Decarli 模式餵食雄性與雌性大白鼠酒精液體飼料，實驗進行八週之後發現，雌性大白鼠酒精性肝損傷的情形比雄性嚴重(Colantoni *et al.*, 2003)。根據早期與近期的流行病學研究結果指出，相較於男性，儘管女性的酒精攝取量較少、飲酒史持續時間較短，仍然會形成酒精性肝臟疾病(Ashley *et al.*, 1977; Becker *et al.*, 1996)。同樣地，在一些國外的臨床研究中，也有相同的發現(Krasner *et al.*, 1977; Morgan and Sherlock, 1977; Gavaler, 1982)。甚至有一些研究認為，女性每日飲酒量低於 2 drinks [1 drink = 2 瓶啤酒(beer, 12 oz) = 1 小杯葡萄酒(wine, 5 oz) = 1 口烈酒(spirit, 1.5 oz)]就會有形成肝硬化之危險，男性則是每日至少需要 4 drinks 才會(Ashley *et al.*, 1977; Loft *et al.*, 1987; Frezza *et al.*, 1990; Thomasson, 1995; Taylor *et al.*, 1996; Kovacs and Messingham, 2002)。

究竟導致女性比男性更容易形成酒精性肝傷害的致病機轉為何?目前有許多的研究正在釐清此項性別所造成的差異性，並且認為荷爾蒙可能是最大的原因。因此，有一些動物實驗，使用卵巢切除手術或是藉由投予荷爾蒙接受體的拮抗劑(receptor antagonist)，證明在雌性大白鼠體內，雌激素(estrogen)的存在會導肝臟中的 Kupffer cells 更容易受到酒精所導致的內毒素血症影響，而促進 Kupffer cells 表現更多的 CD14，進而產生更多量的促發炎細胞激素 TNF-α，而導致較嚴重的肝損傷(Yin *et al.*, 2000)。所以，雌激素可能是造成女性比男性更容易因為攝取酒精而導致肝傷害的主因。

七、結論

利用酒精液體飼料會導致大白鼠肝功能指標上升、脂質代謝異常、氧化壓力上升、抗氧化物質含量減少以及肝臟病理上造成肝損傷，其中又以雌性組所造成的影響更嚴重。因此，未來可以考慮以雌性動物建立酒精性肝臟疾病研究之實驗動物模式。

八、參考文獻

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

Ashley MJ, Olin JS, Le Riche WH, Kornaczewski A, Schmidt W, and Rankin JG (1977) Morbidity in alcoholics: evidence for accelerated development of physical disease in women. Arch Intern Med 137: 883–887.

Astiz ME, Rackow EC, Still JG, Howell ST, Cato A, Von Eschen KB, Ulrich JT, Rudbach JA, McMahon G, and Vargas R (1995) Pretreatment of normal humans with monophosphoryl lipid A induces tolerance to endotoxin: A prospective, double-blind, randomized, controlled trial. Crit Care Med 23: 9-17.

Bailey SM and Cunningham CC (1998) Acute and chronic ethanol increases reactive oxygen species generation and decreases viability in fresh, isolated rat hepatocytes. Hepatology 28: 1318-1326.

Baraona E, Julkunen R, Tannenbaum L and Lieber CS (1986) Role of intestinal bacterial overgrowth in ethanol production and metabolism in rats. Gastroenterology 90: 103-110.

Behrens UJ, Hoerner M, Lasker JM and Lieber CS (1988) Formation of acetaldehyde adducts with ethanol-inducible P450IIE1 *in vivo*. Biochem Biophys Res Commun 154: 584-590.

Becker U, Deis A, Sorensen TIA, Gronback M, Borch-Johnsen K, Muller CF, Schnohr P, and Jensen G (1996) Prediction of risk of liver disease by alcohol intake, sex and age: a prospective population study. Hepatology 23: 1025–1029.

Bode JC, Bode C, Heidelbach R, Durr HK, and Martini GA (1984) Jejunal microflora in patients with chronic alcohol abuse. HepatoGastroenterology 31: 30-34.

Boveris A and Chance B (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. Biochem J 134: 707-716.

Bump EA and Brown JM (1990) Role of glutathione in the radiation response of mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. Pharmacol Ther 47: 117-136.

Campo GM, Avenoso A, Campo S, Ferlazzo AM, Altavilla D, and Calatroni A (2003) Efficacy of treatment with glycosaminoglycans on experimental collagen-induced arthritis in rats. Arthritis Res Ther, Jan 2003; 5: R122-131.

Cederbaum AI, Lieber CS, Toth A, Beattie DS and Rubin E (1975) Effects of chronic ethanol ingestion on fatty acid oxidation by hepatic mitochondria. J Bio Chem 250: 5122-5129.

Chance B, Sies H and Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol Rev 59: 527-605.

Chedid A, Mendenhall CL, Moritz TE, French SW, Chen TS, Morgan TR, Roselle GA, Nemchausky BA, Tamburro CH, Schiff ER, Mcclain CJ, Marsano LS, Allen JI; Samanta A, Weesner RE, Henderson WG and Veterans Affairs Cooperative Study Group 275 (1993)

Colantoni A, Idilman R, De Maria N, La Paglia N, Belmonte J, Wezeman F, Emanuele N, Van Thiel DH, Kovacs EJ and Emanuele MA (2003) Hepatic apoptosis and proliferation in male and female rats fed alcohol: role of cytokines. Alcohol Clin Exp Res 27: 1184-1189.

Cunningham CC, Coleman WB and Spach PI (1990) The effects of chronic ethanol consumption on hepatic mitochondrial energy metabolism. Alcohol Alcohol 25: 127-136.

Das S, Santra A, Lahiri S and Guha Mazumder DN (2005) Implications of oxidative stress and hepatic cytokine (TNF-alpha and IL-6) response in the pathogenesis of hepatic collagenesis in chronic arsenic toxicity. Toxicol Appl Pharmacol. 204: 18-26.

Deaciuc IV, D'SouzA NB and Spitzer JJ (1995) Tumor necrosis factor-alpha cell-surface receptors of liver parenchymal and nonparenchymal cells during

acute and chronic alcohol administration to rats. Alcohol Clin Exp Res 19: 332-338.

Decker K (1990) Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). Eur J Biochem 192: 245-261.

Deitch EA (1989) Simple intestinal obstruction causes bacterial translocation in man. Arch Surg 124: 699-701.

Diluzio NR (1964) Prevention of the acute ethanol-induced fatty liver by the simultaneous administration of antioxidants. Life Sci 3: 113-119.

Donohue TM Jr, Tuma DJ and Sorrell MF (1983) Acetaldehyde adducts with proteins: binding of [14C]acetaldehyde to serum albumin. Arch Biochem Biophys 220: 239-246.

Ekstrom G and Ingelman-Sundberg M (1989) Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol-inducible cytochrome P-450 (P-450IIE1). Biochem Pharmacol 38: 1313-1319.

Enomoto N, Schemmer P, Ikejima K, Takei Y, Sato N, Brenner DA, and Thurman RG (2001) Long-term alcohol exposure changes sensitivity of rat Kupffer cells to lipopolysaccharide. Alcohol Clin Exp Res 25: 1360-1367.

Feierman DE, Winston GW and Cederbaum AI (1985) Ethanol oxidation by hydroxyl radicals: role of iron chelates, superoxide, and hydrogen peroxide. Alcohol Clin Exp Res 9: 95-102.

Felver ME, Mezey E, McGuire M, Mitchell MC, Herlong HF, Veech GA, and Veech RL (1990) Plasma tumor necrosis factor alpha predicts decreased long-term survival in severe alcoholic hepatitis. Alcohol Clin Exp Res 14: 255-259.

Fernandez-Checa JC, Ookhtens M and Kaplowitz N (1987) Effect of chronic ethanol feeding on rat hepatocytic glutathione: compartmentation, efflux, and

response to incubation with ethanol. J Clin Invest 80: 57-62.

Fraga CG, Zamora R and Tappel AL (1989) Damage to protein synthesis concurrent with lipid peroxidation in rat liver slices: effect of halogenated compounds, peroxides, and vitamin E1. Arch Biochem Biophys 270: 84-91.

French SW, Wong K, Jui L, Albano E, Hagbjork AL and Ingelman-Sundberg M (1993) Effect of ethanol on cytochrome P450 2E1 (CYP2E1), lipid peroxidation, and serum protein adduct formation in relation to liver pathology pathogenesis. Exp Mol Pathol 58: 61-75.

French SW, Ruebner BH, Mezey E, Tamura T and Halsted CH (1983) Effect of chronic ethanol feeding on hepatic mitochondria in the monkey. Hepatology 3: 34-40.

Frezza M, di Padova C, Pozzato G, Terpin M, Baraona E and Lieber CS (1990) High blood alcohol levels in women. The role of decreased gastric alcohol dehydrogenase activity and first-pass metabolism. N Engl J Med 322: 95-99.

Fukui H, Brauner B, Bode JC, and Bode C (1991) Plasma endotoxin concentrations in patients with alcoholic and non-alcoholic liver disease: reevaluation with an improved chromogenic assay. J Hepatol 12: 162-169.

Gabriele B (1997) Silymarin retards collagen accumulation in early and advanced biliary fibrosis secondary to complete bile duct obliteration in rats. Hepatology 26: 643-649.

Garcia-Ruiz C, Morales A, Ballesta A, Rodes J, Kaplowitz N and Fernandez-Checa JC (1994) Effect of chronic ethanol feeding on glutathione and functional integrity of mitochondria in periportal and perivenous rat hepatocytes. J Clin Invest. 94: 193-201.

Gavaler JS (1982) Sex-related differences in ethanol-induced liver disease: artifactual or real? Alcohol Clin Exp Res 6: 186-196.

Gordon ER (1984) Alcohol-induced mitochondrial changes in the liver. Recent Dev

Alcohol 2: 143-158.

Gouillon Z, Lucas D, Li J, Hagbjork AL, French BA, Fu P, Fang C, Ingelman-Sundberg M, Donohue TM Jr and French SW (2000) Inhibition of ethanol-induced liver disease in the intragastric feeding rat model by chlormethiazole. Proc Soc Exp Biol Med 224: 302-308.

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, and Tannenbaum J (1982) Anal Biochem 126: 131-138.

Grimbert S, Fromenty B, Fisch C, Letteron P, Berson A, Durand-Schneider AM, Feldmann G and Pessayre D (1993) Decreased mitochondrial oxidation of fatty acids in pregnant mice: possible relevance to development of acute fatty liver of pregnancy. Hepatology 17: 628-637.

Handler JA and Thurman RG (1988) Catalase-dependent ethanol oxidation in perfused rat liver. Requirement for fatty-acid-stimulated H_2O_2 production by peroxisomes. Eur J Biochem 176: 477-484.

Handler JA and Thurman RG (1990) Redox interactions between catalase and alcohol dehydrogenase pathways of ethanol metabolism in the perfused rat liver. J Biol Chem 265: 1510-1515.

Hanna PM and Mason RP (1992) Direct evidence for inhibition of free radical formation from Cu(I) and hydrogen peroxide by glutathione and other potential ligands using the EPR spin-trapping technique. Arch Biochem Biophys 295: 205-213.

Hasumura Y, Teschke R and Lieber CS (1975) Acetaldehyde oxidation by hepatic mitochondria: decrease after chronic ethanol consumption. Science 189: 727-729.

Hirano T, Kaplowitz N, Tsukamoto H, Kamimura S and Fernandez-Checa JC (1992) Hepatic mitochondrial glutathione depletion and progression of experimental alcoholic liver disease in rats. Hepatology 16: 1423-1427.

Iimuro Y, Frankenberg MV, Arteel GE, Bradford BU, Wall CA, And Thurman RG (1997) Female rats exhibit greater susceptibility to early alcohol-induced liver injury than males. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 272: G1186-Gl194.

Ingelman-Sundberg M and Johansson I (1984) Mechanisms of hydroxyl radical formation and ethanol oxidation by ethanol-inducible and other forms of rabbit liver microsomal cytochromes P-450. J Biol Chem 259: 6447-6458.

Ishii H, Adachi M, Fernandez-Checa JC, Cederbaum AI, Deaciuc IV and Nanji AA (2003) Role of apoptosis in alcoholic liver injury. Alcohol Clin Exp Res 27: 1207-1212.

Ishii H, Kurose I and Kato S (1997) Pathogenesis of alcoholic liver disease with particular emphasis on oxidative stress. J Gastroenterol Hepatol 12: S272-282.

Joker AM, Dijkhuis FWJ, Boes A, Hardonk MJ and Grond J (1992) Immunohistochemical study of extracellular matrix in acute galactosamine hepatitis in rats. Hepatology 15: 423-431.

Kato S, Kawase T, Alderman J, Inatomi N and Lieber CS (1990) Role of xanthine oxidase in ethanol-induced lipid peroxidation in rats. Gastroenterology 98: 203-210.

Kato J, Kobune M, Kohgo Y, Sugawara N, Hisai H, Nakamura T, Sakamaki S, Sawada N and Niitsu Y (1996) Hepatic iron deprivation prevents spontaneous development of fulminant hepatitis and liver cancer in Long-Evans Cinnamon rats. J Clin Invest 98: 923-929.

Kawase T, Kato S and Lieber CS (1989) Lipid peroxidation and antioxidant defense systems in rat liver after chronic ethanol feeding. Hepatology 10: 815-821.

Kera Y, Kiriyama T and Komura S (1985) Conjugation of acetaldehyde with cysteinylglycine, the first metabolite in glutathione breakdown by gamma-glutamyltranspeptidase. Agents Actions 17: 48-52.

Kono Y and Fridovich I (1982) Superoxide radical inhibits catalase. J Biol Chem 257: 5751-5754.

Kono H, Wheeler MD, Rusyn I, Lin M, Seabra V, Rivera CA, Bradford BU, Forman DT, and Thurman RG (2000) Gender differences in early alcohol-induced liver injury: role of CD14, NF-κB, and TNF-α. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 278: G652–G661.

Koop DR, Morgan ET, Tarr GE and Coon MJ (1982) Purification and characterization of a unique isozyme of cytochrome P-450 from liver microsomes of ethanol-treated rabbits. J Biol Chem 257: 8472-8480.

Krasner N, Davis M, Portmann B and Williams R (1977) Changing pattern of alcoholic liver disease in Great Britain: relation to sex and signs of autoimmunity. Br Med J 1: 1497-1500.

Kukielka E, Dicker E and Cederbaum AI (1994) Increased production of reactive oxygen species by rat liver mitochondria after chronic ethanol treatment. Arch Biochem Biophys 309: 377-386.

Kurose I, Higuchi H, Kato S, Miura S and Ishii H (1996) Ethanol-induced oxidative stress in the liver. Alcohol Clin Exp Res 20: 77A-85A.

Laine L and Weinstein WM (1988) Histology of alcoholic hemorrhagic "gastritis": a prospective evaluation. Gastroenterology 94: 1254-1262.

Lakshmanan MR and Veech RL (1977) Short- and long-term effects of ethanol administration in vivo on rat liver HMG-CoA reductase and cholesterol 7alpha-hydroxylase activities. J Lipid Res 18:325-330.

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

Lieber CS (1988) Metabolic effects of acetaldehyde. Biochem Soc Trans 16:

241-247.

Lieber CS, Baraona E, Hernandez-Munoz R, Kubota S, Sato N, Kawano S, Matsumura T and Inatomi N (1989) Impaired oxygen utilization. A new mechanism for the hepatotoxicity of ethanol in sub-human primates. J Clin Invest 83: 1682-1690.

Lieber CS (1994) Hepatic and metabolic effects of ethanol: pathogenesis and prevention. Ann Med 26:325-330.

Lieber CS (2004) The discovery of the microsomal ethanol oxidizing system and its physiologic and pathologic role. Drug Metab Rev 36: 511-529.

Lippi U and Guidi G (1970) A new colorimetric ultramicromethod for serum glutamic-oxalacetic and glutamic-pyruvic transaminase determination. Clin Chim Acta 28: 431-437.

Loft S, Olesen K, and Dossing M (1987) Increased susceptibility to liver disease in relation to alcohol consumption in women. Scand J Gastroenterol 22: 1251–1256.

Loguercio C, Piscopo P, Guerriero C, De Girolamo V, Disalvo D and Del Vecchio Blanco C (1996) Effect of alcohol abuse and glutathione administration on the circulating levels of glutathione and on antipyrine metabolism in patients with alcoholic liver cirrhosis. Scand J Clin Lab Invest 56: 441-447.

Maher JJ (1998) How does estrogen enhance endotoxin sensitivity? Let me count the ways. Hepatology 28: 1720–1721.

Maier A, Bode C, Fritz P, Bode JC (1999) Effects of chronic alcohol abuse on duodenal mononuclear cells in man. Dig Dis Sci 44: 691-696.

Marshall JC, Walker PM, Foster DM, Harris D, Ribeiro M, Paice J, Romaschin AD, and Derzko AN (2002) Measurement of endotoxin activity in critically ill patients using whole blood neutrophil dependent chemiluminescence. Crit Care 6: 342-348.

Matsuzaki S and Lieber CS (1977) Increased susceptibility of hepatic mitochondria to the toxicity of acetaldehyde after chronic ethanol consumption. Biochem Biophys Res Commun 75: 1059-1065.

McClain C, Hill D, Schmidt J, and Diehl AM (1993) Cytokines and alcoholic liver disease. Semin Liver Dis 13: 170-182.

Mezey E, Kalman CJ, Kiehl AM, Mitchell MP, and Herlong LF (1998) Alcohol and dietary intake in the development of chronic pancreatitis and liver disease in alcoholism. Am J Clin Nutr 48: 148–155.

Morgan MY and Sherlock S (1977) Sex-related differences among 100 patients with alcoholic liver disease. Br Med J 1: 939-941.

Muller A and Sies H (1983) Ethane release during metabolism of aldehydes and monoamines in perfused rat liver. Eur J Biochem 134: 599-602.

Nanji AA, Khwaja S and Sadrzadeh SM (1994) Eicosanoid production in experimental alcoholic liver disease is related to vitamin E levels and lipid peroxidation. Mol Cell Biochem 140: 85-89.

Nanji AA and Hiller-Sturmhofel S (1997) Apoptosis and necrosis: Two types of cell death in alcoholic liver disease. Alcohol Health Res World 21: 325-330.

Nanji AA, Jokelainen K, Fotouhinia M, Rahemtulla A, Thomas P, Tipoe GI, Su GI, and Dannenberg AJ (2002) Increased severity of alcoholic liver injury in female rats: role of oxidative stress, endotoxin, and chemokines. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 281: G1348–G1356.

Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC and Gotoh O (1993) The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. DNA Cell Biol 12: 1-51.

Niknahad H, Khan S and O'Brien PJ (1995) Hepatocyte injury resulting from the inhibition of mitochondrial respiration at low oxygen concentrations involves

reductive stress and oxygen activation. Chem Biol Interact 98: 27-44.

Nomura F and Lieber CS (1981) Binding of acetaldehyde to rat liver microsomes: enhancement after chronic alcohol consumption. Biochem Biophys Res Commun 100: 131-137.

Nordmann R, Ribiere C and Rouach H (1992) Implication of free radical mechanisms in ethanol-induced cellular injury. Free Rad Biol Med 12: 219-240.

Parlesak A, Schafer C, Schutz T, Bode JC, and Bode C (2000) Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease. J Hepatol 32: 742-777.

Pikkarainen PH, Gordon ER, Lebsack ME and Lieber CS (1981) Determinants of plasma free acetaldehyde levels during the oxidation of ethanol: effects of chronic ethanol feeding. Biochem Pharmacol 30: 799-802.

Polavarapu R, Spitz DR, Sim JE, Follansbee MH, Oberley LW, Rahemtulla A and Nanji AA (1998) 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. Hepatology 27: 1317-1323.

Rajasinghe H, Jayatilleke E and Shaw S (1990) DNA cleavage during ethanol metabolism: role of superoxide radicals and catalytic iron. Life Sci 47: 807-814.

Reinke LA, Lai EK, DuBose CM and McCay PB (1987) Reactive free radical generation *in vivo* in heart and liver of ethanol-fed rats: correlation with radical formation *in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A 84: 9223-9227.

Rouach H, Fataccioli V, Gentil M, French SW, Morimoto M and Nordmann R (1997) Effect of chronic ethanol feeding on lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver pathology. Hepatol 25: 351-355.

Ruwart MJ, Wilkinson KF, Rush BD, Vidmar TJ, Peters KM, Henley KS, Appelman

HD, Kim KY, Schuppan D, and Hahn EG (1989) The integrated value of serum procollagen III peptide over time predicts hepatic hydroxyproline content and stainable collagen in a model of dietary cirrhosis in the rat. Hepatology 10: 801-806.

Saadia R, Schein M, MacFarlane C, and Boffard KD (1990) Gut barrier function and the surgeon. Br J Surg 77: 487-492.

Sadrzadeh SM, Nanji AA and Price PL (1994) The oral iron chelator, 1,2-dimethyl-3-hydroxypyrid-4-one reduces hepatic-free iron, lipid peroxidation and fat accumulation in chronically ethanol-fed rats. J Pharmacol Exp Ther 269: 632-636.

Salaspuro MP and Lieber CS (1979) Metabolic consequences of chronic alcohol consumption: attenuation of hepatic redox changes despite enhanced capacity to eliminate ethanol. Curr Alcohol 5: 109-118.

Sastre J, Pallardo FV, Pla R, Pellin A, Juan G, O'Connor JE, Estrela JM, Miquel J and Vina J (1996) Aging of the liver: age-associated mitochondrial damage in intact hepatocytes. Hepatology 24: 1199-1205.

Schisler NJ and Singh SM (1989) Effect of ethanol *in vivo* on enzymes which detoxify oxygen free radicals. Free Radic Biol Med 7: 117-123.

Schenker S (1997) Medical consequences of alcohol abuse: is gender a factor? Alcohol Clin Exp Res 21: 179–181.

Sedman PC, Macfie J, Sagar P, Mitchell CJ, May J, Mancey-Jones B, and Johnstone D (1994) The prevalence of gut translocation in humans. Gastroenterology 107: 643-649.

Shaw S (1989) Lipid peroxidation, iron mobilization and radical generation induced by alcohol. Free Radic Biol Med 7: 541-547.

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

Sinet PM, Garber P and Jerome H (1981) Inactivation of human CuZn superoxide dismutase during exposure to superoxide radical and hydrogen peroxide. Bull Eur Physiopathol Respir 17: 91-99.

Solomon LR (1987) Evidence for the generation of transaminase inhibitor(s) during ethanol metabolism by rat liver homogenates: a potential mechanism for alcohol toxicity. Biochem Med Metab Biol 38: 9-18.

Speisky H, MacDonald A, Giles G, Orrego H and Israel Y (1985) Increased loss and decreased synthesis of hepatic glutathione after acute ethanol administration. Turnover studies. Biochem J 225: 565-572.

Speisky H, Kera Y, Penttila KE, Israel Y and Lindros KO (1988) Depletion of hepatic glutathione by ethanol occurs independently of ethanol metabolism. Alcohol Clin Exp Res 12: 224-228.

Stevens VJ, Fantl WJ, Newman CB, Sims RV, Cerami A and Peterson CM (1981) Acetaldehyde adducts with hemoglobin. J Clin Invest 67: 361-369.

Swank GM and Deitch EA (1996) Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes. World J Surg 20: 411-417.

Tamai H, Horie Y, Kato S, Yokoyama H, and Ishii H (2002) Long-term ethanol feeding enhances susceptibility of the liver to orally administered lipopolysaccharides in rats. Alcohol Clin Exp Res 26:75S-80S.

Tamai H, Kato S, Horie Y, Ohki E, Yokoyama H, and Ishii H (2000) Effect of acute ethanol administration on the intestinal absorption of endotoxin in rats. Alcohol Clin Exp Res 24: 390-394.

Taylor JL, Dolhert N, Friedman L, Mumenthaler M and Yesavage JA (1996) Alcohol elimination and simulator performance of male and female aviators: a preliminary report. Aviat Space Environ Med 67: 407-413.

Teschke R, Matsuzaki S, Ohnishi K, DeCarli LM and Lieber CS (1977) Microsomal ethanol oxidizing system (MEOS): current status of its

characterization and its role. Alcohol Clin Exp Res 1: 7-15.

Thayer WS and Rubin E (1982) Antimycin inhibition as a probe of mitochondrial function in isolated rat hepatocytes: effect of chronic ethanol consumption. Biochim Biophys Acta 721: 328-335.

Thomasson HR (1995) Gender differences in alcohol metabolism. Physiological responses to ethanol. Recent Dev Alcohol 12: 163-179.

Thurman RG and Handler JA (1989) New perspectives in catalase-dependent ethanol metabolism. Drug Metab Rev 20: 679-688.

Tobias PS and Ulevitch RJ (1993) Lipopolysaccharide binding protein and CD14 in LPS dependent macrophage activation. Immunobiology. 187: 227-232.

Tuma DJ (2002) Role of malondialdehyde-acetaldehyde adducts in liver injury. Free Radic Biol Med 32: 303-308.

Uesugi T, Froh M, Arteel GE, Bradford BU, Wheeler MD, Gäbele E, Isayama F and Thurman RG (2002) Role of lipopolysaccharide-binding protein in early alcohol-Induced liver injury in mice. J Immunol 168: 2963-2969.

Urbaschek R, McCuskey RS, Rudi V, Becker KP, Stickel F, Urbaschek B, and Seitz HK (2001) Endotoxin, endotoxin- neutralizing-capacity, sCD14, sICAM-1, and cytokines in patients with various degrees of alcoholic liver disease. Alcohol Clin Exp Res 25: 261-268.

Valenzuela A, Fernandez V and Videla LA (1983) Hepatic and biliary levels of glutathione and lipid peroxides following iron overload in the rat: effect of simultaneous ethanol administration. Toxicol Appl Pharmacol 70: 87-95.

Videla LA and Valenzuela A (1982) Alcohol ingestion, liver glutathione and lipoperoxidation: metabolic interrelations and pathological implications. Life Sci 31: 2395-2407.

Vina J, Estrela JM, Guerri C and Romero FJ (1980) Effect of ethanol on glutathione concentration in isolated hepatocytes. Biochem J 188: 549-552.

Visioli F, Monti S, Colombo C and Galli C (1998) Ethanol enhances cholesterol synthesis and secretion in human hepatomal cells. Alcohol 15:299-303.

Wall TL, Thomasson HR, Schuckit MA and Ehlers CL (1992) Subjects feelings of alcohol intoxication in Asians with genetic variation of ALDH2 alleles, Alcohol Clin Exp Res, 16: 991-995.

Wang CJ, Wang SW, Shiah HS and Lin JK (1990) Effect of ethanol on hepatotoxicity and hepatic DNA-binding of aflatoxin B1 in rats. Biochem Pharmacol. 40: 715-721.

Wehr H, Rodo M, Lieber CS and Baraona E (1993) Acetaldehyde adducts and autoantibodies against VLDL and LDL in alcoholics. J Lipid Res 34: 1237-1244.

William AJ and Barry RE (1987) Free radical generation by neutrophils: a potential mechanism of cellular injury in acute alcoholic hepatitis.Gut 28: 1157-1161

Yin M, Ikejima K, Wheeler MD, Bradford BU, Seabra V, Forman DT, Sato N and Thurman RG (2000) Estrogen is involved in early alcohol-induced liver injury in a rat enteral feeding model. Hepatology 31: 117-123.

Zentella de Pina M, Corona S, Rocha-Hernandez AE, Saldana Balmori Y, Cabrera G and Pina E (1994) Restoration by piroxicam of liver glutathione levels decreased by acute ethanol intoxication. Life Sci 54: 1433-1439.

Zidenberg-Cherr S, Halsted CH, Olin KL, Reisenauer AM and Keen CL (1990) The effect of chronic alcoholic ingestion on free radical defense in the miniature pig. J Nutr 120: 213-217.

Zucoloto S, Braulio VB, Santos GC, Ramalho FS, Scandar MP, de Freitas O and de Oliveira JA (1996) Effect of chronic ethanol consumption on the activities of residual small bowel brush-border enzymes after proximal jejunum resection in the rat. Alcohol Clin Exp Res. 20: 152-155.

行政院衛生署，國人每年酒類消費量之統計, 2001.

謝明哲、胡淼琳、楊素卿、陳俊榮、徐成金、陳明汝 (1998) 維生素。實用營養學。p. 160-179。

表 一、酒精液體飼料對於大白鼠血漿中肝功能指數 AST 與 ALT 活性之影響 [1-4]

Table 1. Effects of ethanol-containing liquid diet on initial and final plasma AST and ALT activities in rats [1-4]

Groups	MC	ME	FC	FE	ANOVA		
					Ethanol	Gender	Ethanol ×Gender
At beginning of experiment							
AST (U/L)	86±3	87±2	81±2	82±2	NS	0.0286	NS
ALT (U/L)	28±1[b]	28±1[b]	24±1[a]	24±1[a]	NS	0.0003	NS
At termination of experiment							
AST (U/L)	95±10[a]	150±12[b]	126±8[ab]	203±16[c]	0.0001	0.0010	NS
ALT (U/L)	38±3[a]	73±5[b]	33±1[a]	95±13[c]	0.0001	NS	NS

[1] Four groups were designed as follows: male control group (MC), male ethanol group (ME), female control group (FC), and female ethanol group (FE). [2] Data are mean±SEM (n=10). [3] Values in the same row with different superscripts are significantly different (P<0.05). [4] Analyzed by two-way ANOVA; NS, no significant difference. AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase.

表 二、酒精液體飼料對於實驗末血漿中三酸甘油酯以及總膽固醇含量之影響 [1-4]

Table 2. Effects of ethanol-containing liquid diet on plasma triglycerol and total cholesterol concentrations in rats[1-4]

Groups	MC	ME	FC	FE	ANOVA		
					Ethanol	Gender	Ethanol ×Gender
TG (mg/dL)	23.7±1.8[b]	21.2±3.2[b]	13.6±0.6[a]	13.4±1.5[a]	NS	<0.0001	NS
TC (mg/dL)	76±4[a]	103±6[b]	75±4[a]	109±5[b]	<0.0001	NS	NS

[1-4] Details as same as in table 1. TG: triglyceride; TC: total cholesterol

表 三、酒精液體飼料對於肝臟中三酸甘油酯以及總膽固醇含量之影響 [1-4]

Table 3. Effects of ethanol-containing diet on hepatic TG and TC levels in rats [1-4]

Groups	MC	ME	FC	FE	ANOVA		
					Ethanol	Gender	Ethanol ×Gender
TG (mg/g of liver)	36±6[a]	107±8[b]	42±4[a]	137±11[c]	<0.0001	0.0283	NS
TC (mg/g of liver)	11±1[a]	14±1[b]	12±1[a]	19±1[c]	<0.0001	0.0038	0.0322

[1-4] Details as same as in table 1. TG: triglyceride; TC: total cholesterol.

表 四、酒精液體飼料對於大白鼠肝臟中抗氧化物質 GSH 含量之影響 [1-4]

Table 4. Effects of ethanol-containing liquid diet on the hepatic GSH level in rats[1-4]

Groups	MC	ME	FC	FE	ANOVA		
					Ethanol	Gender	Ethanol ×Gender
hepaticGSH (nmole/mg protein)	5.5±0.5^{c}	3.5±0.4^{ab}	4.1±0.4^{b}	2.9±0.1^{a}	0.0001	0.0172	NS

[1-4] Details as same as in table 1. GSH: reduced glutathione.

表 五、酒精液體飼料對於大白鼠血漿中 TNF-α濃度之影響 [1-4]

Table 5. Effects of ethanol-containing liquid diet on plasma TNF-α in rats[1-4]

Groups	MC	ME	FC	FE	ANOVA		
					Ethanol	Gender	Ethanol ×Gender
TNF-α (pg/mL)	21.3±4.1[a]	55.0±10.0[b]	19.9±3.3[a]	65.2±9.2[b]	<0.0001	NS	NS

[1-4] Details as same as in table 1. TNF-α: tumor necrosis factor alpha.

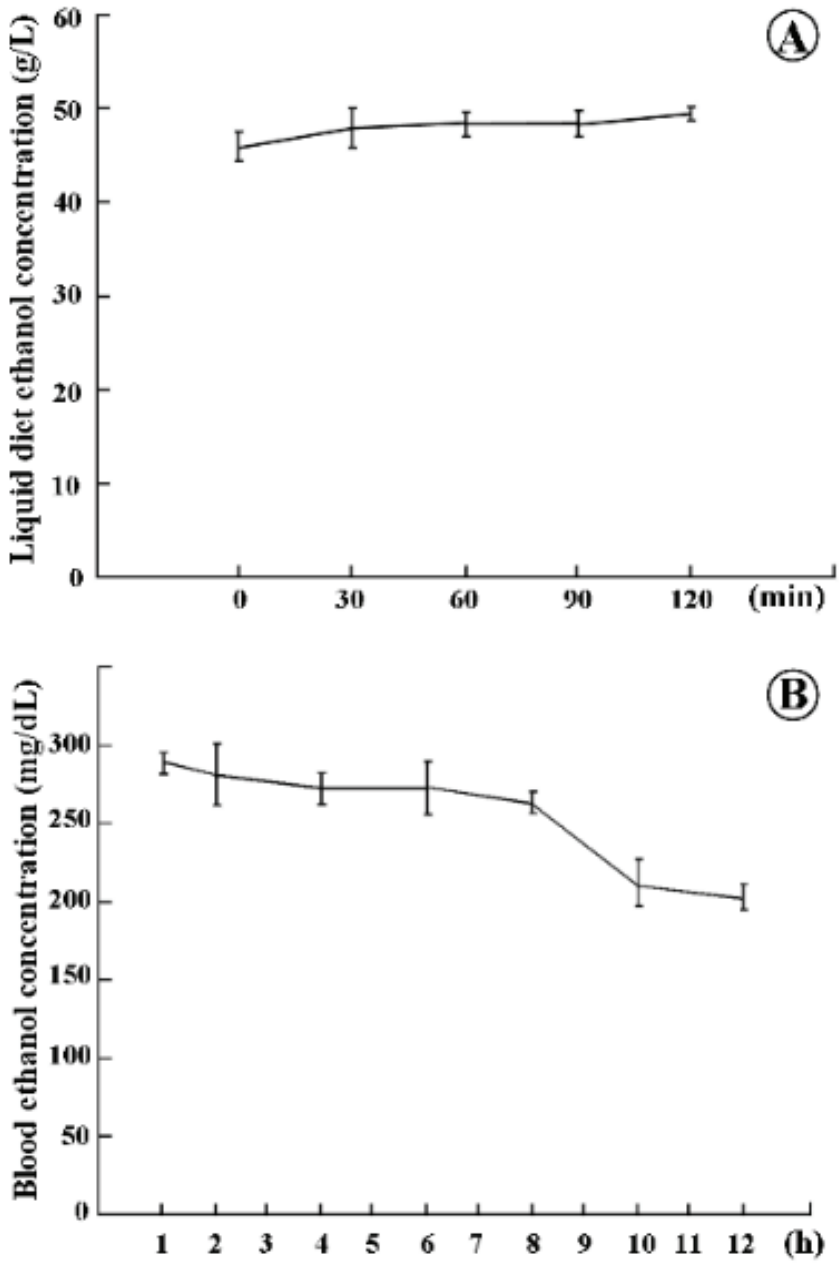


圖 一、餵食酒精之後，液體飼料(A)與大白鼠血液(B)中酒精濃度之變化

Figure 1. Changes in the ethanol concentrations of liquid diet (A) and blood (B) after ethanol feeding. Data are expressed as mean±SE (*n*=10).

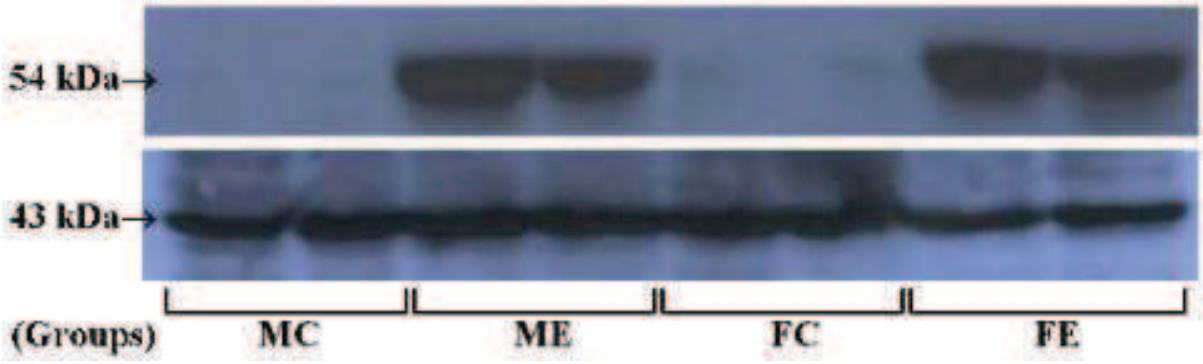


圖 二、酒精液體飼料對於大白鼠肝臟中微粒體 CYP2E1 蛋白質表現之影響

Figure 2. Effects of ethanol-containing diet on Western blot of hepatic microsomal CYP2E1 in rats. The induction of CYP2E1 due to chronic ethanol administration both in male and female rats. Each lane represents an individual rat liver. The indicated apparent molecular masses of CYP2E1 and actin (internal control) were 54 and 43 kDa, respectively.

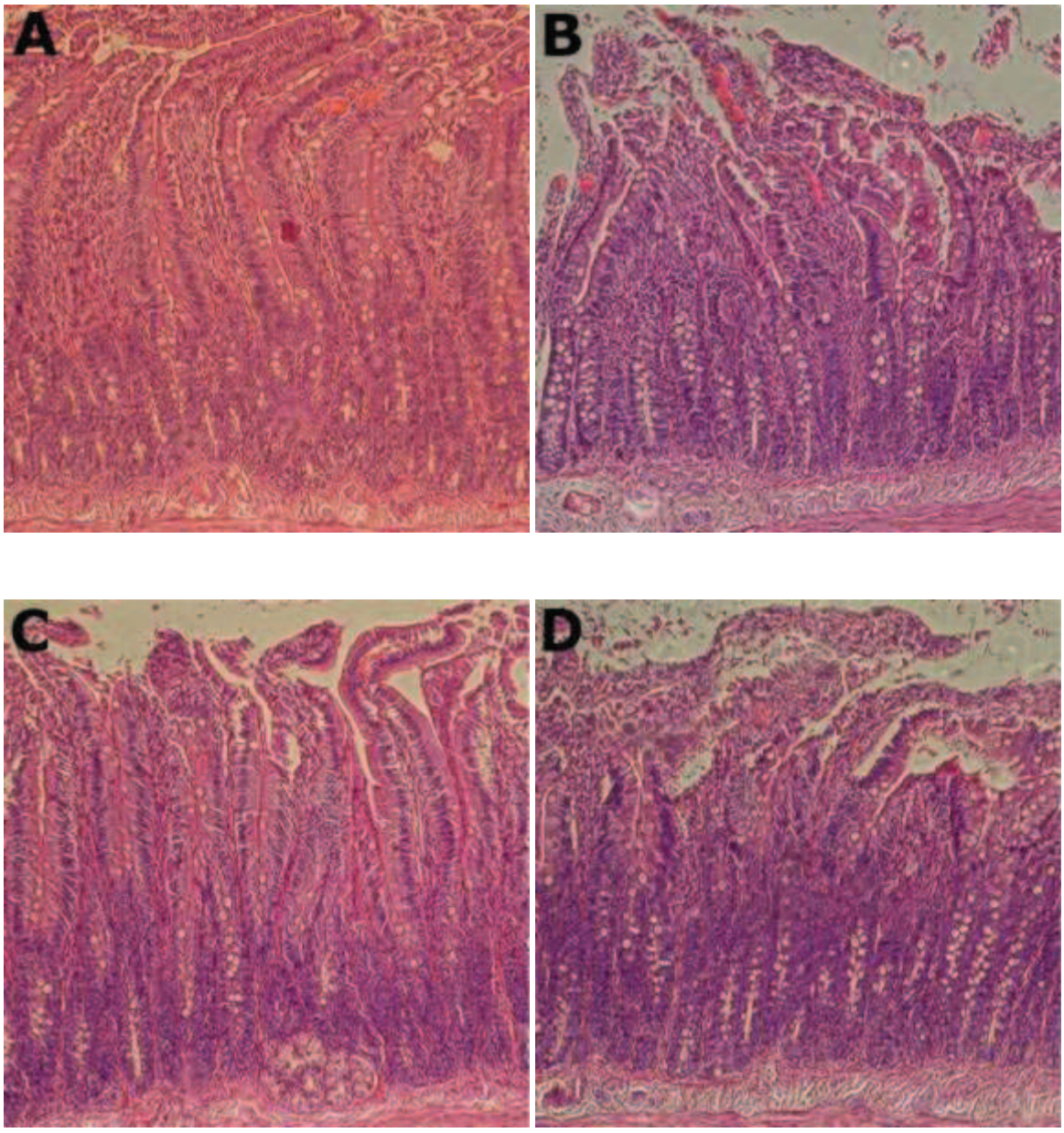


圖 三、酒精液體飼料對於大白鼠十二指腸病理切片結果之影響

Figure 3. Effects of ethanol-containing diet on histological examinations of specimens from the duodenum in rats. (A: group MC; B: group ME; C: group FC; D: group FE. H&E stain, ×100)

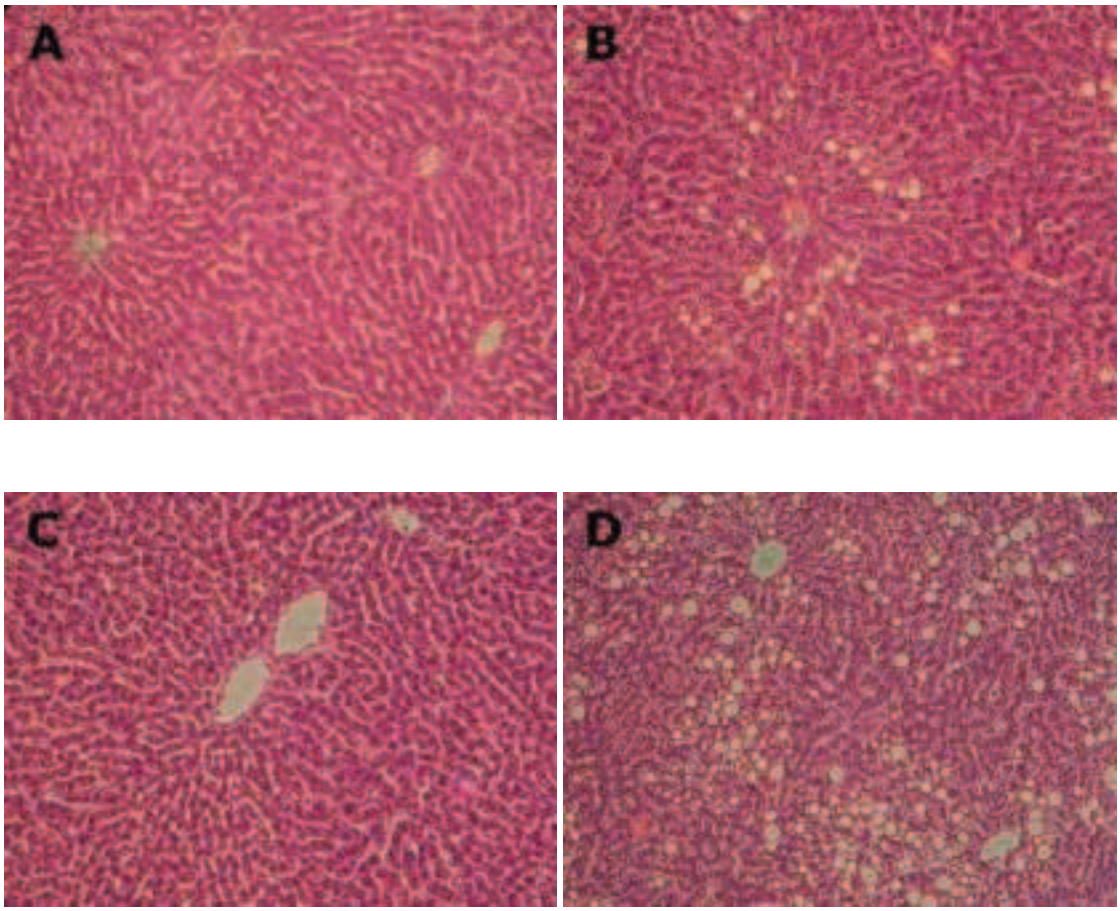


圖 四、酒精液體飼料對於大白鼠肝臟病理切片之影響

Figure 4. Effects of ethanol-containing diet on histological examinations of specimens from the liver in rats. Livers from group MC (A), ME (B), FC (C), and FE (D) are shown. Sections of the liver from rats fed control diet for 12 wk show normal histology with no evidence of pathologic change (A and C). Fat accumulation in female ethanol-fed rats was panlobular (D), but it was seen in pericentral areas in male ethanol-fed rats (B). (H&E stain, magnification: ×200).