行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

※※※

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

Preparation of NSC Project Reports

計畫編號：NSC－89－2320－B038－034

執行期限：89 年 8 月 1 日至 90 年 7 月 31 日

主持人：謝明哲 教授　　台北醫學大學保健營養學系

共同主持人：楊素卿 副教授　　台北醫學大學保健營養學系

計畫參與人員：黃啟彰 研究生　台北醫學大學保健營養學研究所

一、中文摘要

研究指出，因酗酒導致自由基過量生成與肝臟疾病的形成具有密切之關聯性。因此，理論上若是能夠利用抗氧化營養素減少因酒精攝取所產生的自由基，並藉以提高身體之抗氧化能力，則肝臟所受到的氧化性傷害也會減輕。基於此論點，本研究進行體外試驗，探討抗氧化營養素β-胡蘿蔔素和維生素 E 對於患有酒精性肝臟疾病大白鼠之初代肝細胞的生存能力以及抗氧化能力之改善效果。由體外實驗之結果顯示，β-胡蘿蔔素可以提高長期攝取酒精大白鼠之肝臟細胞之生存能力，並可提高麩胱甘肽還原酶及過氧化氫酶等抗氧化酵素活性。

關鍵詞：酒精性肝臟疾病、自由基、β-胡蘿蔔素、維生素 E

Abstract

Numerous studies indicated that excessive alcohol intake induced the mass production of free radicals in the body, which had been considered to be associated with alcoholic liver diseases. It is hypothesized that antioxidant nutrient supplementation may lower the formation of free radicals produced from excessive alcohol intake by means of enhancing the antioxidant ability in the body. Based on the hypothesis, this study was to investigate the influences of β-carotene and vitamin E on the cell viability and antioxidant ability of the isolated liver parechymal cell of rats with alcoholic liver diseases. These results demonstrate that b-carotene can increasecell viability, glutathione reductase and catalase activities in cultured hepatocytes from rats with alcohol liver diseasea.

Keywords: alcoholic liver diseases, free radicals, β-carotene, vitamin E

二、緣由與目的

肝臟是酒精代謝的主要場所，長期過度的酒精攝取會造成肝臟方面的傷害有慢性酒精中毒、脂肪肝、酒精性肝炎及肝硬化等。1980 年代以前，有關酒精之肝臟傷害的報告大部分都以討論有毒性代謝產物—乙醛為中心。但是，根據近年來的研究報告指出，酒精性肝臟疾病的形成亦與自由基有密切的關聯性(Porta, 1997)。體內代謝酒精的 MEOS 系統在代謝酒精的同時會產生活性氧類(reactive oxygen species, ROS)，尤其是超氧自由基($O_2^{\cdot -}$)和氫氧自由基($OH^{\cdot -}$)。因此，當大量酒精出現在體內時，自由基之生成也隨之增加，並危害身體組織(Ishii et al,1997)。另外，乙醛與細胞的結合物也會刺激中性白血球，使其生成大量的自由基攻擊肝細胞(William and Barry,1987)。不僅如此，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(Rouach et al, 1997)。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-胡蘿蔔素的濃度也會降低，而且降低的程度與其攝取的酒精量有密切的相關性(Kawase et al, 1989；Leo et al, 1993；Ahmed et al, 1994；Polavarapu et al, 1998)。

天然食物成分中含有多種的抗氧化成分，其中以β-胡蘿蔔素、維生素 E 的抗氧化成效在許多動物實驗以及臨床醫學實驗上都受到矚目與肯定，而且同時攝取時還具有相乘的效果(Gibaldi, 1996)。由於這些抗氧化成分均是身體必需的營養素，無任何藥物的副作用，因此在一般日常保健、

治療或預防各類自由基傷害疾病的成效是現在目前醫藥衛生研究與注目的焦點。Lieber 指出，理解肝臟中活性氧傷害，並利用抗氧化營養素來預防或治療酒精對肝臟的傷害，是酒精性肝臟疾病研究的新方向(Lieber,1997)。因此，本研究以患有酒精性肝臟疾病大白鼠之初代肝細胞為實驗模式，探討抗氧化營養素β-胡蘿蔔素和維生素 E 對於肝臟細胞之生存能力以及抗氧化能力之改善效果。

三、結果與討論

1. 酒精對於大白鼠肝功能的影響：

投予大白鼠酒精 3 個月之後，酒精組血漿中肝功能指數 GOT 與 GPT 的活性分別較對照組高 24%以及 44% ($P < 0.05$)，顯示酒精組肝臟受損的情形較對照組嚴重(表一)。此外，由肝臟病理切片圖可以明顯看到酒精組的肝臟有脂質堆積的情形(圖一)。

2. 體外投予β-胡蘿蔔素對於大白鼠初代肝細胞乳酸脫氫酶流失率的影響：

在細胞乳酸脫氫酶流失率方面，HE 組(長期攝取酒精組)顯著較 HC 組(對照組)高($P<0.05$)(表二)，而投予β-胡蘿蔔素則是可以明顯地改善此種情形(HE+B 組)。

3. 體外投予β-胡蘿蔔素對於大白鼠初代肝細胞脂質過氧化產物的影響：

在細胞脂質過氧化產物 MDA 濃度方面，四組間無顯著差異(表三)。

4. 體外投予β-胡蘿蔔素對於大白鼠初代肝細胞抗氧化酵素活性的影響：

如表四所示，抗氧化酵素 GPX 的活性，HE 組顯著較 HC 組降低($P<0.05$)，而投予β-胡蘿蔔素則是無法改善此種情形。抗氧化酵素 GRd 的活性，投予β-胡蘿蔔素則是可以顯著地提高此酵素活性($P<0.05$)。抗氧化酵素 CAT 的活性，HE 組顯著較 HC 組降低($P<0.05$)，而投予β-胡蘿蔔素則是可以顯著地提高此酵素活性($P<0.05$)。至於抗氧化酵素 SOD 活性方面，四組間則是無顯著差異。

5. 大白鼠初代肝細胞中β-胡蘿蔔素與 Retinol 的濃度：

如表五所示，體外投予β-胡蘿蔔素 10^{-6}M，於培養 24 小時後，細胞中β-胡蘿蔔素的含量有明顯地增加($P<0.05$)。另外，細胞中 Retinol 的含量也是有顯著增加的情形($P<0.05$)。本結果與 Wei 等人(1998)的研究結果相一致。

6. 培養液中β-胡蘿蔔素與 Retinol 的濃度：

如表六所示，體外投予β-胡蘿蔔素 10^{-6}M，於培養 24 小時後仍有β-胡蘿蔔素存在於培養液中。另外，HC+B 組培養液中 Retinol 的含量顯著較 HC 組高；同樣，HE+B 組也是顯著較 HE 組高($P<0.05$)。

四、計畫成果自評

在體外實驗方面，由於β-胡蘿蔔素相當難溶，因此在選擇溶劑上嘗試過以 THF 與 DMSO，雖然 THF 較 DMSO 更容易達到完全溶解的效果，然而，THF 對細胞的傷害較大，加上其氣味極為刺激，於實驗進行中易使實驗者產生極不舒服的感覺，故選用 DMSO 做為溶劑。

本研究結果顯示在體外實驗中，添加β-胡蘿蔔素可以增加細胞中維生素 A 的含量。故，在說明、解釋β-胡蘿蔔素在體外實驗所具有的保護作用，應考慮β-胡蘿蔔素具有 provitamin A 的能力。

另外，關於維生素 E 之實驗方面，由預備試驗的結果顯示，維生素 E 若以溶於 DMSO 的型式添加，在濃度 10^{-4}M、10^{-6}M 與 10^{-8}M 之下皆無顯著的結果。另外，粉末酒精的取得不易，加上酒精性肝臟疾病大白鼠的製作一次需耗時三個月，故製作成功的大白鼠隻數有限。因而本研究只針對β-胡蘿蔔素進行體外實驗。

五、參考文獻

Ahmed S, Leo MA, and Lieber CS(1994) Interaction between alcohol and beta-carotene in patients with alcoholic liver disease. American Journal of Clinical Nutration, 60(3)：430-436

Gibaldi M(1996) Antioxidant vitamins and health. Journal of Clinical Pharmacology 36(12)：1093-1099

Ishii H, Kurose I, and Kato S(1997) Pathogenesis of alcoholic liver disease with particular emphasis on oxidative stress. Journal of Gastroenterology & Hepatology, 12(9-10)：272-82

Kawase T, Kato S, and Lieber CS(1989) Lipid peroxidation and antioxidant defense system in rat liver after chronic ethanol feeding, Hepatology, 10(5)：815-821

Leo MA, Rosman AS, and Lieber CS(1993) Differential depletion of carotenoids and tocopherol in liver disease. Hepatology, 17(6)：977-986

Lieber CS(1997) Roles of oxidative stress and antioxidant therapy in alcoholic and nonalcoholic liver disease. Advances in Pharmacology, 38：601-628

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(5)：1317-1323

Porta EA(1997) Dietary modulation of oxidative stress in alcoholic liver disease in rats. Journal of Nutrition, 127(5 suppl)：912s-915s

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, Hepatology, 25(2)：351-355

Wei RR, Warmer WG, Lambert LA, and Kornhauser A.(1998) β-carotene Uptake and Effects on Intracellular Levels of Retinol In VitroNutrition and Cancer, 30(1), 59-63

表一 酒精投予對於血漿中 GOT 與 GPT 活性的影響

Table 1.Effect of alcohol on plasma GOT and GPT activities[1]

Group	GOT (Karrmen)	GPT (Karrmen)
Control	66 ± 10	18 ± 4
Ethanol	82 ± 1[a]	29 ± 5[a]

[1] Values expressed means ± SD (n=5).
[a] $P<0.05$ between control and ethanol groups.

表二 投予 β-胡蘿蔔素對於大白鼠初代肝細胞乳酸脫氫酶流失率的影響[1]

Table 2. Effect of β-carotene on lactate dehydrogenase (LDH) leakage in primary rat hepatocytes[1].

Group[2]	LDH (%)
HC	41 ± 2[a]
HC+B	43 ± 1[a]
HE	69 ± 9[b]
HE+B	40 ± 4[a]

[1] Data are means ± SD (n=3).
[2] Hepatocytes from control group (HC) were cultured in the medium without β-carotene, and from ethanol group were cultured in the medium without (HE) or with β-carotene (HE+B).
Different superscript([a,b]) indicate significant differences($P<0.05$) between the groups.

表三 β-胡蘿蔔素對於大白鼠初代肝細胞中脂質過氧化產物 MDA 濃度的影響[1]

Table 3. Effect of β-carotene on lipid peroxide (MDA) in primary rat hepatocytes[1].

Group[2]	MDA (μM)
HC	6.21 ± 0.20
HC+B	5.32 ± 0.68
HE	6.21 ± 0.36
HE+B	5.71 ± 1.29

[1] Data are means ± SD (n=3).
[2] Details as same as in table 2.

表四 β-胡蘿蔔素對於大白鼠初代肝細胞中抗氧化酵素活性的影響[1]

Table 4. Effect of β-carotene on antioxidant enzymes activity in primary rat hepatocytes[1].

Group[2]	GPX (mU/mg protein)	GRd (mU/mg protein)	CAT (Kunits/mg protein)	SOD (units/mg)
HC	42.97 ± 8.63 [c]	5.90 ± 1.53 [a]	724 ± 52 [b]	0.06 ± 0.02
HC+B	39.26 ± 15.63 [bc]	5.98 ± 0.53 [a]	842 ± 17 [b]	0.06 ± 0.02
HE	19.95 ± 3.70 [ab]	5.52 ± 0.80 [a]	500 ± 177 [a]	0.04 ± 0.01
HE+B	19.58 ± 10.00 [a]	9.52 ± 1.09 [b]	803 ± 93 [b]	0.06 ± 0.05

[1] Data are means ± SD (n=3).

[2] Details as same as in table 2.

Different superscript([a,b,c]) indicate significant differences($P<0.05$) among the groups.

表五 大白鼠初代肝細胞中β-胡蘿蔔素與維生素 A 的濃度[1]

Table 5. β-carotene content of primary rat hepatocytes in each group[1].

Group[2]	β-carotene (nmoles/10^7cells)	Retinol (10^{-10}moles/10^7cells)
HC	0	5.32 ± 0.34 [a]
HC+B	5.96 ± 0.82	7.50 ± 0.31 [b]
HE	0	5.32 ± 0.15 [a]
HE+B	5.49 ± 0.58	6.20 ± 0.71 [b]

[1] Data are means ± SD (n=3).

[2] Details as same as in table 2.

Different superscript([a,b]) indicate significant differences($P<0.05$) between the groups.

表六 培養液中β-胡蘿蔔素與維生素 A 的濃度[1]

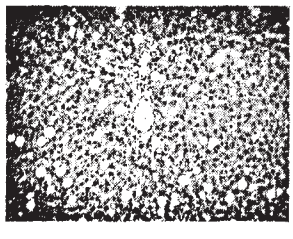
Table 6. β-carotene content of medium in each group[1].

Group[2]	β-carotene (10^{-10}moles /ml)	Retinol (nmoles/ml)
HC	0	8.85 ± 0.81 [b]
HC+B	2.46 ± 0.49	9.88 ± 0.31 [c]
HE	0	7.59 ± 0.98 [a]
HE+B	2.25 ± 0.40	8.68 ± 0.30 [b]

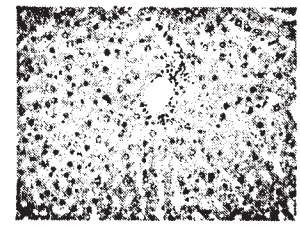
[1] Data are means ± SD (n=3).

[2] Details as same as in table 2.

Different superscript([a,b,c]) indicate significant differences($P<0.05$) among the groups.



A



B

圖一 肝臟病理切片圖

Fig. 1. A, Section of the liver from a rat fed ethanol for 3 months shows the presence of macrovesicular and microvesicular fat accumulation. (H&E, magnification × 100) B, Section of the liver from a rat fed control diet for 3 month shows normal histology with no evidence of pathologic change.(H&E, magnification × 150)