RRPD89070048 (10.P)

行政院國家科學委員會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

計畫編號：NSC 88-2314-B-038-010
執行期限：87 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日
主持人：鄭心嫻　台北醫學院 保健營養學系

一、中文摘要

採用Wistar品系雄性大白鼠，以兩階段膠原蛋白酶的方式分離肝細胞，培養細胞4小時後進行下列三階段實驗。將β-胡蘿蔔素添加於培養液中，同時添加或不添加0.1 mM $FeCl_3$，培養12小時之後觀察細胞的生存力、脂質過氧化以及抗氧化酵素活性的改變，實驗中加入α-tocopherol、retinol、canthaxantnin或α-carotene以作比較。以lactate dehydrogenase leakage (LDH leakage)作為細胞生存力的指標；抗氧化酵素則以分析GSH代謝相關酵素：麩胱甘肽過氧化酶 (GSH peroxidase)、麩胱甘肽還原酶 (GSH reductase) 以及麩胱甘肽硫轉移酶(GSH S-transferase) 活性；以thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS)分析malondialdehyde (MDA) 生成。在不添加0.1mM $FeCl_3$情形下，β-胡蘿蔔素仍會降低抗氧化酵素活性，相同實驗以canthaxanthin、retinol或α-carotene代替β-胡蘿蔔素發現抗氧化酵素活性不受影響。研究顯示β-胡蘿蔔素對MDA生成沒有明顯的抑制效果。

關鍵詞：β-胡蘿蔔素、抗氧化酵素、大白鼠初代肝細胞、canthaxanthin

英文摘要

Primary rat hepatocytes were prepared from male, 8-week-old Wistar strain rats by two-step collagenase perfusion. The isolated cells were incubated in plating medium. After four-hour plating, the medium was removed and replaced by the same medium containing no fetal bovine serum (FBS). The effect of β-carotene were observed by measuring the activities of the antioxidative enzymes, cellular viabilibty and the lipid peroxidation. α -tocopherol, retinol, canthaxanthin or α-carotene were added in the medium by the same protocol in contrast with β -carotene. Lactate dehydrogense (LDH leakage) was analysed as index of cellular viability. GSH peroxidase, GSH reductase and GSH S-transferase were measured as indices of antioxidative enzymes. The analysis of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) is index of malondialdehyde (MDA) production.
Adding α-tocopherol or retinol into 0.1 mM $FeCl_3$ treated cells significantly increased cellular viability. Incorporating β-carotene into non $FeCl_3$ treated cells, the decrease of activities of antioxidative enzymes was revealed. When canthaxanthin, retinol or α-carotene were applied instead of β-carotene, the activities of antioxidative enzymes were not different from control group. The result indicates that the addition of β-carotene had no effect on inhibition of lipid peroxidation.

Key words : β-carotene , Antioxidative enzyme, Primary rat hepatocytes, canthaxanthin

二、緣由與目的

近年來關於自由基以及自由基所引起的傷害與疾病一直引起廣泛的討論，體內自由基的形成除了外在環境因素之外，身體的代謝或防禦過程中亦可產生自由基

(Fanton 與 Ward 1982)，此種自由基以氧為中心，稱為活性氧類 (reactive oxygen species, ROS)，ROS 可以攻擊生物細胞膜而引發脂質過氧化的鏈鎖反應。β-胡蘿蔔素屬於類胡蘿蔔素的一種，可由藻類、植物以及微生物經由光合作用形成，結構上是由 8 個 isoprenoid unit 所組成，自然界中多以全反式 (all-trans form)存在 (Pfander 1992)，為一種脂溶性、遇光以及熱不穩定的物質。許多研究指出，β-胡蘿蔔素能降低脂質過氧化的生成物 (Terao 1989, Jialal 1991, Bertram 1993)，但仍有部份研究未呈現統計上的差異，甚至呈現負面的作用。Alam 與 Alam (1983) 餵與老鼠 100 mg/Kg β-胡蘿蔔素，11 週後分析血液及肝臟的過氧化情形，發現β-胡蘿蔔素沒有顯著的抗氧化效果；Andersen 等 (1993) 給與雞不同劑量的β-胡蘿蔔素，18-23 天後取出肝並以 $FeSO_4$ 誘發氧化，發現高量的β-胡蘿蔔素使 MDA 的生成增加。此外，近年來的大型人體研究發現β-胡蘿蔔素增加肺癌發生率以及死亡率(ATBC study 1994, Omenn 等 1996)

為了釐清β-胡蘿蔔素對體內抗氧化酵素的影響，本研究以初代肝細胞的培養模式，觀察β-胡蘿蔔素對細胞中抗氧化酵素 (GSH peroxidase, GSH reductase 及 GSH S-transferase) 活性以及細胞生存力影響。為了實驗的穩定性，進行β-胡蘿蔔素的實驗之前，先進行肝細胞正常培養條件之下的時間效應實驗 (Time course) 以及不同濃度之氧化誘導劑 ($FeCl_3$) 對細胞影響的實驗，以確定後續實驗中細胞的收集時間和氧化誘導劑的添加濃度。

三、結果

(一) 加入 0.1 mM $FeCl_3$ 同時添加 10^{-8}～10^{-5} Mβ-胡蘿蔔素之實驗

顯示 LDH leakage 的變化，添加 0.1mM $FeCl_3$ 同時添加不同濃度β-胡蘿蔔素之各組對 LDH leakage 沒有降低作用。顯示 GSH peroxidase、GSH reductase 及 GSH S-transferase 等酵素活性變化，與只添加 0.1mM $FeCl_3$ 組相比較，同時添加β-胡蘿蔔素之各組酵素活性均較低，且 10^{-8}～10^{-5}M 等不同組之間沒有差異。(未示出圖)

(二) 是否加入 0.1 mM $FeCl_3$ 之下添加 10^{-7} Mβ-胡蘿蔔素、α-carotene、canthaxanthin 及 retinol 之實驗

圖(一~五)顯示，各組 LDH leakage 值與控制組相比沒有統計差異。圖~顯示，添加β-胡蘿蔔素與添加 0.1mM $FeCl_3$ 均會降低酵素活性，在 GSH peroxidase 與 GSH reductase 等酵素活性發現，β-胡蘿蔔素組與控制組有統計上的差異 ($p<0.05$)，顯示在未添加 $FeCl_3$ 的情形下，β-carotene 本身就會降低酵素活性。α-carotene，canthaxanthin 及 retinol 等組與控制組沒有差異。

四、討論

本實驗為模擬鐵對人體所產生的傷害，故以 $FeCl_3$ 作為氧化誘導劑。在本研究中添加 $FeCl_3$ 於培養液，持續培養細胞 12 小時之後發現 LDH leakage 明顯上升，顯示細胞所受到的傷害比控制組大，故細胞的生存力下降。Sharma 等人 (1987) 將分離的肝細胞與鐵共同培養，2 小時後發現脂質過氧化的情形增加，細胞的生存力仍維持正常，當細胞持續培養 3-4 小時後發現脂質過氧化的情形持續增加且細胞的生存力降為控制組的 40% ，但加入螯合劑之後上述兩種情形均獲得改善。所以導致 LDH leakage 上升的原因可能是因為鐵所誘發的脂質過氧化反應 (如上

述) 導致細胞膜受損，或是鐵與脂質氫雙氧化物反應，產生有毒的裂解產物所致，當細胞膜受損後使原來存於細胞內的 LDH 流至培養液中，受損愈嚴重則滲出的酵素活性愈多。雖然如此，本實驗中 LDH leakage 並非隨 $FeCl_3$ 濃度的增加而呈現劑量反應。本研究發現 $FeCl_3$ 的加入使 GSH peroxidase 、以及 GSH S-transferase 活性下降，在 Garcia-Alfonso 等人(1996)的研究中，將 Vero monkey kidney cells 培養在含 iron (III) chloride 的培養液中，24 小時後分析抗氧化酵素活性，發現 GSH reductase 以及 GSH S-transferase 的活性下降，隨 iron (III) 濃度增加 (0.001~100 mM)下降情形越顯著，Garcia-Alfonso 等人的實驗結果與本研究相同，故推測鐵造成酵素的傷害而影響其活性。

Lawlor 及 O'Brien (1995) 的研究中指出高濃度的 β-胡蘿蔔素(10^{-5} M) 不具有抗氧化作用，反而會呈現 prooxidant 的效果，基於濃度可能導致的影響，故進行不同濃度之 β-胡蘿蔔素的實驗。研究發現同時添加 β-胡蘿蔔素與 0.1 mM $FeCl_3$ 的情形下使抗氧化酵素活性顯著下降，為了釐清此種結果是 β-胡蘿蔔素本身所造成或是因為 $FeCl_3$ 同時存在所造成，故進行沒有氧化誘導劑存在時加入 β-胡蘿蔔素的實驗，同時亦進行 α-carotene、canthaxanthin、retinol 的實驗作比較。結果 β-胡蘿蔔素組之抗氧化酵素活性下降，並在 GSH peroxidase 及 GSH reductase 呈現統計差異 ($p<0.05$)。α-carotene、canthaxanthin、retinol 等組與控制組沒有差異，其活性均比 β-胡蘿蔔素組高。顯示 β-胡蘿蔔素的確會影響抗氧化酵素的活性。推測在 $FeCl_3$ 的存在下同時加入 β-胡蘿蔔素使 GSH 代謝相關酵素活性更顯著下降的原因：1. 是否 β-胡蘿蔔素進入肝細胞之後轉變成 retinol 所產生的影響：由前述的實驗中，加入 retinol 之後抗氧化酵素的變化趨勢與 β-胡蘿蔔素組不同，所以推測轉變成 retinol 並非是影響因素；2. 是否 β-胡蘿蔔素加入之後產生保護效果：因而減低 GSH peroxidase、GSH reductase 以及 GSH S-transferase 的需要性，故抗氧化酵素活性下降。由前述不同濃度 $FeCl_3$ 的添加實驗中，發現抗氧化酵素活性呈現下降，由此推論，β-胡蘿蔔素的影響並非是一種減少活性損耗的效果；

Cabrini 等人在 1986 年的實驗，發現 β-胡蘿蔔素可以抑制微脂粒(liposome) 的自發性氧化，但加入 0.3 mM $FeCl_3$ 之後 β-胡蘿蔔素的保護效果消失，或許可藉由 Cabrini 等人的研究來支持推論。由於 Fe (II) 毒性比 Fe (III) 高(Garcia-Alfonoso 等 1996)，故推測此時鐵被 β-胡蘿蔔素還原後對細胞內的抗氧化酵素產生直接性的傷害。只添加 β-胡蘿蔔素 (未添加 $FeCl_3$) 的情形下仍使抗氧化酵素活性下降，其原因仍無法獲得合理的解釋，Wamer 等人(1993)的實驗中添加 β-胡蘿蔔素於 BALB/c3T3 培養液，發現 β-胡蘿蔔素多存在細胞膜，此外亦發現 β-胡蘿蔔素存於 crude nucli，是否因為 β-胡蘿蔔素的存在影響肝細胞膜的穩定性進而影響細胞內的反應，由於 β-胡蘿蔔素在細胞內的運送機制仍然沒有定論 (Gugger 與 Erdman 1996)，所以需由未來研究加以證實。

五、參考文獻

Alam, S. Q. & Alam, B. S. (1983) Lipid peroxidaion, α-tocopherol and retinoid levels in plasma and liver of rats fed diets containing β-carotene and 13-cis-retinoic acid. J. Nutr. 113：2608-2614.

Andersen, H. J., Chen, H., Pellett, L. J. & Tappel, A. L. (1993) Ferrous-iron-

induced oxidation in chicken liver slices as measured by hemichrome formation and thiobaribturic acid-reactive substances : effects of dietary vitamin E and β-carotene. Free Radical Biol. Med. 15 : 37-48.

Bertram, J. S. (1993) Cancer prevention by carotenoids. Ann. N. Y. Acd. Sci. 691 : 177-191.

The Alpha-tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group (1994) The effect of vitamin and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. N. Engl. J. Med. 330 : 1029-1035.

Cabrini, L., Pasquali, P., Tadolini, B., Sechi, A. M. & Landi, L. (1986) Antioxidant behaviour of ubiquinone and β-carotene incorporated in model membranes. Free. Radic. Res. Commun. 2 : 85-92.

Fanton, J. C. & Ward, P. A. (1982) Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte- dependent inflammatory reactions. AJP 107 : 397-413.

Garcia-Alfonso, C., Lopez-Barea, J., Sanz, G. & Repetto. M. (1996) Changes in antioxidative activities induced by Fe (II) and Fe (III) in culture vero cells. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 30 : 431-436.

Jialal, I., Norkus, E. P., Cristol, L. & Grundy, S. M. (1991) β-carotene inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. Biochim. Biophy. Acta. 1086 : 134-138.

Lawlor, S. M. & O'Brien, N. M. (1995) Modulation of oxidative stress by β-carotene in chicken embryo fibroblasts. Br. J. Nutr. 73 : 841-850.

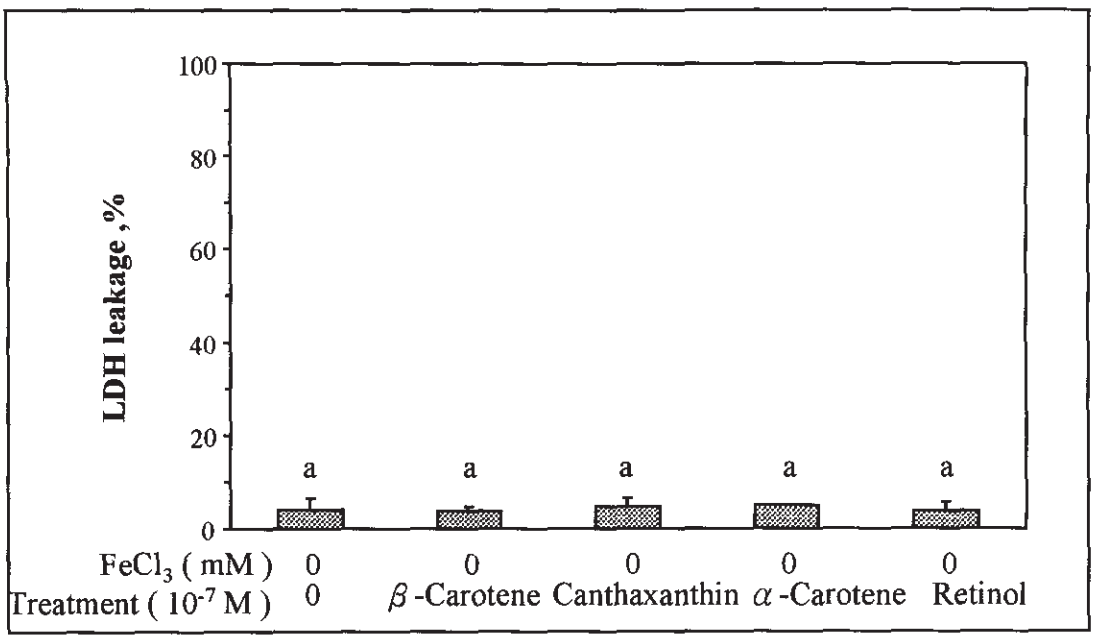
Omenn, G. S., Goodman, G. E., Thornquist, M. D., Balmes, J., Cullen, M. R., Glass, A., Keogh, J. P., Meyskens, F. L., Valanis, B., Williams J. H., Barnhart, S. & Hammar, S. (1996) Effect of a combination of beta carotene and vitamin A in lung cancer and cardiovascular disease. N. Engl. J. Med. 334 : 1150-1155.

Pfander, H. (1992) Carotenoids : an overview. Methods Enzymol. 213 : 3- 13.

Sharma, B. K., Dalton, N. T., Smanik, P. A. & Bacon, B. R. (1987) Effects of iron chelators in vitro on isolated iron-loaded hepatocytes. Hepatology 7 : 1045.

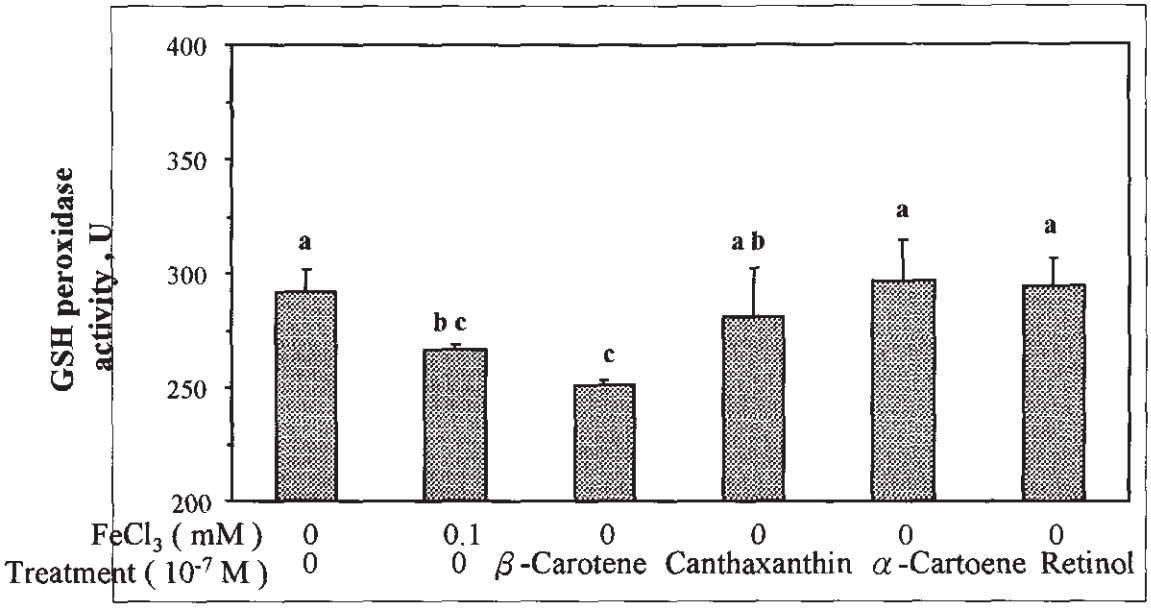
Terao, J. (1989) Antioxidant activity of β-carotene-related carotenoids in solution. Lipids 24(7) : 659-661.

Wamer, W.G., Wei, R. R., Matusik, J. E., Kornhauser, A & Dunkel, V. C. (1993) β-carotene uptake, metabolism, and distribution in BALB/c 3T3 cells. Nutr. Cancer 19 : 31-41.



圖一 不同處理條件下對大白鼠初代肝細胞中 LDH leakage 的影響.

Fig 1 Effect of various treated condition on LDH leakage in primary rat hepatocytes.
Hepatocytes were cultured with 10^{-7} M β-carotenen , canthaxanthin , α-carotene or retinol for 12 hr.
Values are expressed as mean $\pm$ SD of triplicate culture dishes.
Values with different supercripts of letters are significantly different from one another at $p<0.05$.



圖二 不同處理條件下對大白鼠初代肝細胞中 GSH peroxidase 活性的影響.

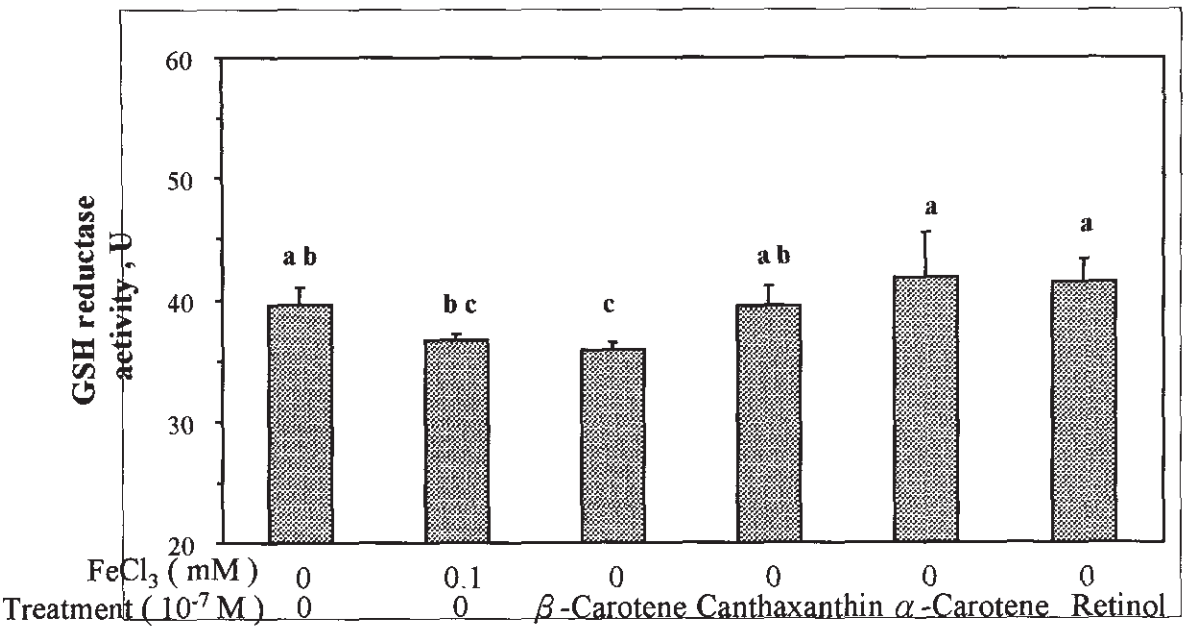
Fig 2 Effect of various treated condition on GSH reductase activity in primary rat hepatocytes.

Hepatocytes were cultured with or without 0.1 mM $FeCl_3$ and 10^{-7} M β-carotenen , canthaxanthin , α-carotene or retinol for 12 hr.

Values are expressed as mean $\pm$ SD of triplicate culture dishes.

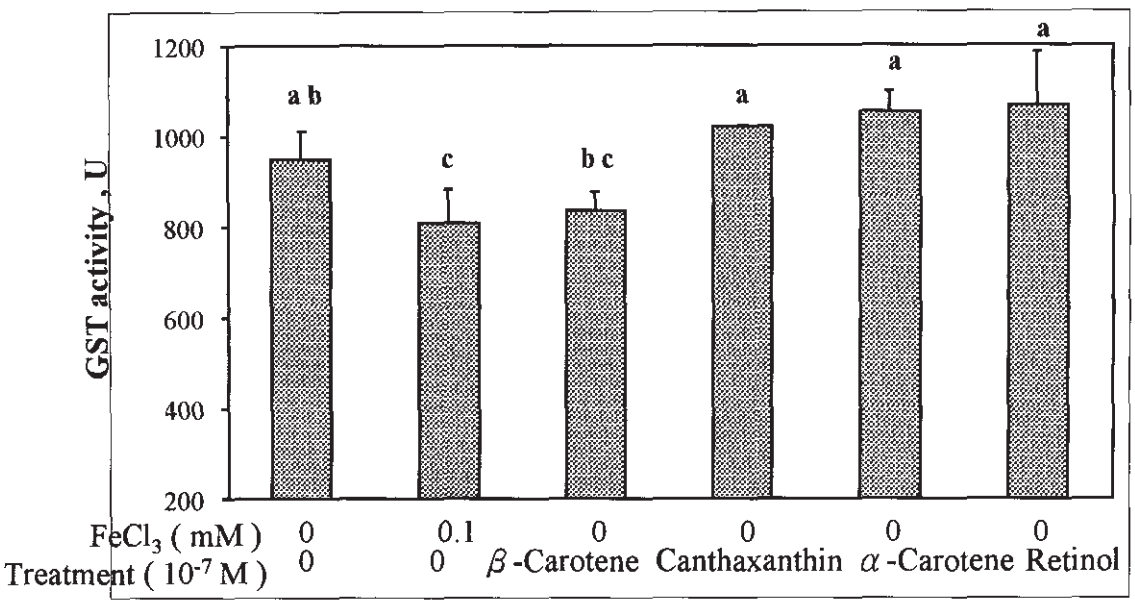
Values with different supercripts of letters are significantly different from one another at $p<0.05$.

The unit of GSH peroxidase activity is expressed as : NADPH oxidized/min/mg cytosoic protein



圖三 不同處理條件下對大白鼠初代肝細胞中 GSH reductase 活性的影響.

Fig 3 Effect of various treated condition on GSH reductase activity in primary rat hepatocytes.
Hepatocytes were cultured with or without 0.1 mM $FeCl_3$ and 10^{-7} M β-carotenen , canthaxanthin , α-carotene or retinol for 12 hr.
Values are expressed as mean $\pm$ SD of triplicate culture dishes.
Values with different supercripts of letters are significantly different from one another at $p<0.05$.
The unit of GSH reductase activity is expressed as : NADPH oxidized/min/mg cytosoic protein



圖四　股 不同處理條件下對大白鼠初代肝細胞中 GSH S-transferase 活性的影響.

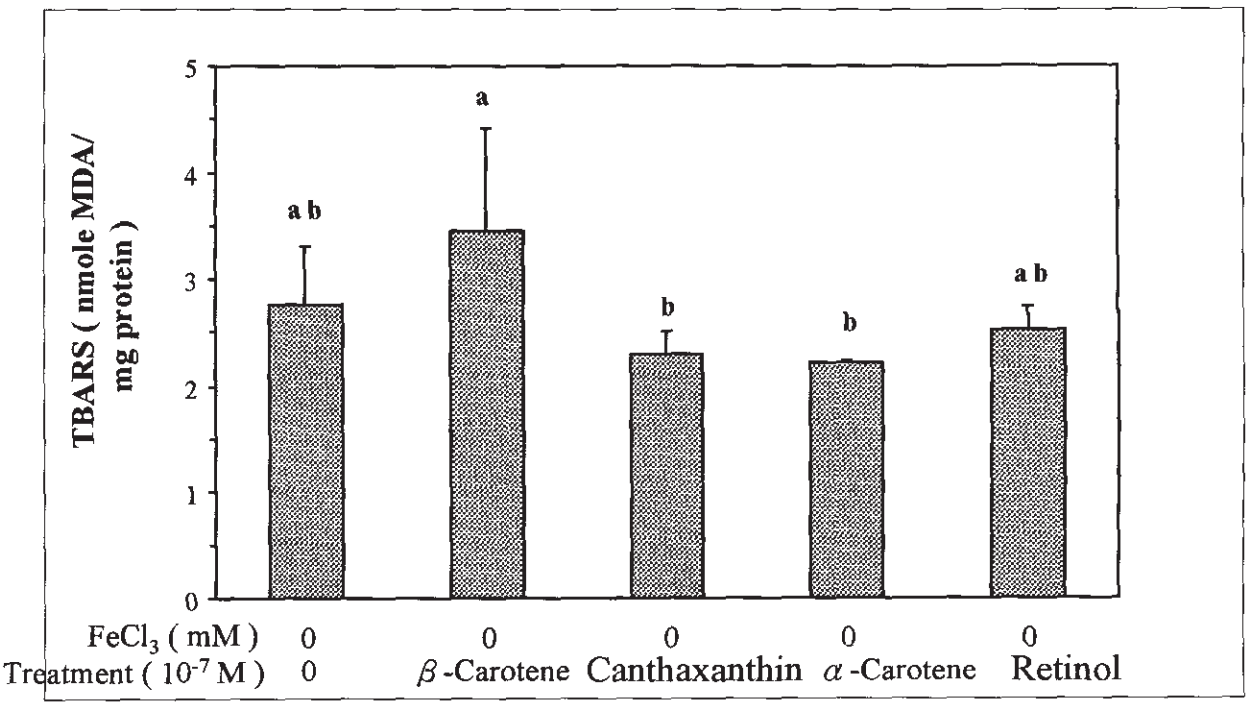
Fig 4　Effect of various treated condition on GSH S-transferase activity in primary rat hepatocytes.

Hepatocytes were cultured with or without 0.1 mM $FeCl_3$ and 10^{-7} M β-carotenen , canthaxanthin , α-carotene or retinol for 12 hr.

Values are expressed as mean $\pm$ SD of triplicate culture dishes.

Values with different supercripts of letters are significantly different from one another at $p<0.05$.

The unit of GSH S-transferase activity is expressed as : CDNB conjugated formed/min/mg cytosoic protein



圖五　不同處理條件下對大白鼠初代肝細胞中脂質過氧化的影響.

Fig 5　Effect of various treated condition on thiobarbituric acid-reactive substances production in primary rat hepatocytes. Hepatocytes were cultured with or without 0.1 mM $FeCl_3$ and 10^{-7} M β-carotenen , canthaxanthin , α-carotene or retinol for 12 hr.
Values are expressed as mean $\pm$ SD of triplicate culture dishes.
Values with different supercripts of letters are significantly different from one another at $p<0.05$.