

中國醫藥大學 藥學院
中國藥學研究所 博士論文

編號: ICPS-D57

指導教授：林文川 教授

以動物模式評估七種生藥之抗肝纖維化效能

Evaluation of efficacious anti-fibrotic activity of 7 kinds of
natural products in animal model

研究生：方焄蓮

Fang Hsun-Lang

中 華 民 國 96 年 7 月

目 錄

圖目錄.....	ii
表目錄.....	vii
略語表.....	x
謝辭.....	xii
中文摘要.....	1
英文摘要.....	6
第一章 緒論	11
第一節 研究背景及目的	11
第二節 肝硬化之成因	14
第三節 研究材料之相關文獻.....	28
第二章 橄欖油對四氯化碳誘導大鼠肝纖維化模式之影響.....	42
第三章 棕櫚油對四氯化碳誘導大鼠肝纖維化模式之影響.....	67
第四章 玉米油對四氯化碳誘導大鼠肝纖維化之影響.....	74
第五章 探討脂質過氧化產物對肝纖維化之影響.....	97
第六章 台灣金線連(<i>Anoectochilus formosanus</i>)之護肝作用評估.....	142
第七章 枳椇子 (<i>Hovenia dulcis</i>) 果實酒精萃取物對小鼠慢性肝纖維化 之影響.....	153
第八章 麴菌(<i>Aspergillus phoenicis</i>)發酵物對四氯化碳誘導肝纖維化模式 之影響.....	165
第九章 酵母菌(<i>Saccharomyces cerevisiae</i> YA03083)發酵物對大鼠誘導 四氯化碳肝纖維化之影響.....	180

第十章 酵母菌(<i>Saccharomyces cerevisia</i>)發酵物對 acetaminophen 及 bromobenzene 誘導急性肝纖維化模式之影響.....	198
第十一章 結論.....	219
第十二章 參考文獻.....	221



圖目錄

Fig 1. The enzymatic and non-enzymatic pathway of lipid peroxidation...	25
Fig 2. Effect of olive oil on hepatic hydroxyproline in CCl ₄ -treated rats...	56
Fig 3. Effect of olive oil on hepatic triglyceride in CCl ₄ -induced chronic hepatotoxicity.....	57
Fig 4. Effect of olive oil on hepatic malondialdehyde in CCl ₄ -treated rats..	58
Fig 5. Effect of olive oil on liver protein in CCl ₄ -induced chronic hepatotoxicity.....	59
Fig 6. Treatment with olive oil improved the histology and immunochemistry of CCl ₄ -treated rat liver. H.E. staining; Sirius red staining; and α -SMA staining.....	60
Fig 7. Effects of olive oil on hepatic mRNA expression of <i>LBP</i> , <i>CD14</i> , <i>TLR4</i> , <i>NF-κB</i> , <i>NADPH oxidase</i> , <i>collagen (α1)(I)</i> , <i>collagen (α1)(III)</i> and <i>TGF-β1</i> in CCl ₄ -treated rats.....	62
Fig 8. Effect of olive oil on the hepatic mRNA expressions of <i>LBP</i> , <i>CD14</i> , <i>TLR4</i> , <i>NF-κB</i> in CCl ₄ -treated rats.....	63
Fig 9. Effect of olive oil on the hepatic mRNA expressions of <i>NADPH oxidase</i> , <i>collagen (α1)(I)</i> , <i>collagen (α1)(III)</i> and <i>TGF-β1</i> in CCl ₄ - treated rats	64
Fig 10. Effect of olive oil on the protein expressions of LBP, NADPH oxidase, NF- κ B, collagen I and TGF- β 1 in CCl ₄ -treated rats	65
Fig 11. Effect of olive oil on the hepatic protein expressions of LBP, NADPH oxidase, NF- κ B, collagen I and TGF- β 1 in CCl ₄ -treated rats	66
Fig 12. Effect of corn oil on liver weight in CCl ₄ -treated rats.....	86
Fig 13. Effect of corn oil on hepatic hydroxyproline in CCl ₄ -treated rats...	87

Fig 14. Effect of corn oil on malondialdehyde in CCl ₄ -treated rats.....	88
Fig 15. Effect of corn oil on hepatic triglyceride (TG) in CCl ₄ -treated rats	89
Fig 16. Effect of corn oil on hepatic protein carbonyl in CCl ₄ -treated rat...	90
Fig 17. Effect of corn oil on hepatic 8-iso-PGF _{2α} in CCl ₄ -treated rats	91
Fig 18. Effect of corn oil on hepatic 15-keto-PGF _{2α} in CCl ₄ -treated rats	92
Fig 19. Effects of corn oil on hepatic mRNA expression of <i>CD36</i> , <i>UCP-2</i> and <i>GPAT</i> in CCl ₄ -treated rats.....	93
Fig 20. Histology and immunochemistry for treatment with corn oil improved CCl ₄ -treated rat liver.....	95
Fig 21. Effect of corn oil and / or CCl ₄ on ALT activities in rats..	116
Fig 22. Effect of corn oil and / or CCl ₄ on AST activities in rats	117
Fig 23. Effect of corn oil and / or CCl ₄ on albumin in rats	118
Fig 24. Effect of corn oil and / or CCl ₄ on plasma triglyceride in rats	119
Fig 25. Effect of corn oil and / or CCl ₄ on hepatic triglyceride in rats	120
Fig 26. Effect of corn oil and / or CCl ₄ on malondialdehyde in rats	121
Fig 27. The biologic effect of 8-iso-PGF _{2α} on corn oil and / or CCl ₄ treated rats	121
Fig 28. The biologic effect of 15-keto-PGF _{2α} on corn oil and / or CCl ₄ treated rats	123
Fig 29. Effect of corn oil and / or CCl ₄ on hydroxypoline in rats	124
Fig 30. Effect of corn oil and / or CCl ₄ on protein carbonyl in rats.....	125
Fig 31. The <i>collagen(α1)(I)</i> mRNA expression of corn oil and / or CCl ₄ in rats	126
Fig 32. The <i>TGF-β1</i> mRNA expression of corn oil and / or CCl ₄ in rats...	127
Fig 33. The <i>COX-2</i> mRNA expression of corn oil and / or CCl ₄ in rats....	128
Fig 34. The <i>MAT1A</i> mRNA expression of corn oil and / or CCl ₄ in rats...	129

Fig 35. The <i>MAT2A</i> mRNA expression of corn oil and / or CCl ₄ in rats....	130
Fig 36. The histology and immunochemistry staining result of corn oil and / or CCl ₄ treated rat liver.....	131
Fig 37. Effect of MDA on primary HSC viability induced by TGF-β1.....	132
Fig 38. Effect of 8-iso-PGF _{2α} on primary HSC viability induced by TGF- β1.....	133
Fig 39. Effect of 15-keto-PGF _{2α} on primary HSC viability induced by TGF- β1	134
Fig 40. Effect of TGF-β1 or MDA on primary HSC viability.....	135
Fig 41. Effect of TGF-β1 or 8-iso-PGF _{2α} on primary HSC viability.....	136
Fig 42. Effect of TGF-β1 or 15-keto-PGF _{2α} on primary HSC viability.....	137
Fig 43. The Western blot result of α-SMA expression of primary hepatic stellate cells.....	143
Fig 44. Confocal microscopic image of primary hepatic stellate cells.....	139
Fig 45. The Annexin-V staining for early apoptosis in primary hepatic stellate cell.....	140
Fig 46. The Annexin-V staining for early apoptosis in primary hepatic stellate cell.	
Fig 47. Effects of AFEF on hepatic mRNA expression of <i>MAT1A</i> , <i>collagen</i> <i>(α1)(I)</i> and <i>TGF-β1</i> in CCl ₄ -treated mice	151
Fig 48. Treatment with AFEF improved the histology of CCl ₄ -treated rat liver.....	152
Fig 49. RT-qPCR analysis of <i>collagen (α1)(I)</i> , <i>collagen (α1)(III)</i> , <i>MAT1A</i> and <i>MAT2A</i> in CCl ₄ -treated rat liver tissue.....	163
Fig 50. Treatment with EHD improved the histology of CCl ₄ -treated rat liver.....	164

Fig 51. Effect of FSAP on the hepatic mRNA expressions of <i>MAT2A</i> , <i>Collagen (α1)(I)</i> , and <i>Collagen (α1)(III)</i> in CCl ₄ -treated rats.....	176
Fig 52. Effect of FSAP on the hepatic mRNA expressions of <i>TGF-β1</i> , <i>TIMP-1</i> and <i>MMP-13</i> in CCl ₄ -treated rats.....	177
Fig 53. Treatment with FSAP improved the histology of CCl ₄ -treated rat liver.....	178
Fig 54. Effect of FSSC on the hepatic mRNA expression of <i>MAT1A</i> and <i>MAT2A</i> in CCl ₄ -treated rats.....	193
Fig 55. Effect of FSSC on the hepatic mRNA expression of <i>Collagen (α1)(I)</i> and <i>TGF-β1</i> in CCl ₄ -treated rats.....	194
Fig 56. Effect of FSSC on the hepatic mRNA expression of <i>MMP-13</i> and <i>TIMP-1</i> in CCl ₄ -treated rats.....	195
Fig 57. Liver histopathology of the study rats (HE stain).....	196
Fig 58. Liver histopathology of the study rats (Sirius Red stain)	197
Fig 59. Treatment with FSSC improved the histology of acetaminophen- treated rat liver.....	212
Fig 60. Treatment with FSSC improved the histology of bromobenzene- treated rat liver.....	218

表目錄

Table 1. Primer sequences for PCR amplification. (olive oil + CCl ₄)	55
Table 2. Effect of olive oil on CCl ₄ - induced fibrosis in rats	61
Table 3. Effect of palm oil on the activities of plasma ALT in CCl ₄ -treated rats	72
Table 4. Effect of palm oil on plasma triglycerin (TG) and albumin in CCl ₄ -treated rats	72
Table 5. Effect of palm oil on hepatic MDA and protein carbonyl in CCl ₄ -treated rats	73
Table 6. Effect of palm oil on hepatic hydroxyproline, triglycerin (TG) and protein in CCl ₄ -treated rats	73
Table 7. Primer sequences for PCR amplification. (corn oil + CCl ₄)	84
Table 8. Effect of Corn oil on the activities of plasma AST, ALT and albumin concentration in CCl ₄ -treated rats	85
Table 9. Effect of corn oil on the hepatic mRNA expressions of COX-2, collagen (α1)(I), TGF-β1, α-SMA, MAT2A, GPAT, CD36 and UCP in CCl ₄ -treated rats	94
Table 10. Effect of corn oil on the fatty change score of CCl ₄ -induced chronic liver damage in rats	96
Table 11. Primer sequences for PCR amplification. (corn oil and / or CCl ₄)	115
Table 12. Primer sequences for PCR amplification. (AFEF)	148
Table 13. Effect of AFEF on the activities of plasma ALT in CCl ₄ -treated mice at 3, 6 and 9 weeks	149
Table 14. Effect of AFEF on the hepatic hydroxyproline and malondialdehyde in CCl ₄ -treated mice	150

Table 15. Primer Sequences for PCR Amplification. (EHD).....	159
Table 16. Effect of EHD on the activities of plasma ALT and AST in CCl ₄ - treated mice.....	160
Table 17. Effect of EHD on the hepatic malondialdehyde and hydroxyproline in CCl ₄ -treated mice at 9 weeks	161
Table 18. The pathological score of CCl ₄ -induced chronic liver damage in mice	162
Table 19. Primer sequences for PCR amplification. (FSAP)	172
Table 20. Effect of FSAP on the activities of plasma AST and ALT in CCl ₄ - treated rats.....	173
Table 21. Effect of FSAP on weights of liver and spleen, and number of ascites in CCl ₄ -treated rats.....	174
Table 22. Effect of FSAP on hepatic protein, malondialdehyde and hydroxyproline in CCl ₄ -treated rats	175
Table 23. The pathological score of CCl ₄ -induced chronic liver damage in rats	179
Table 24. Primer sequences for PCR amplification. (FSSC).....	188
Table 25. Effect of FSSC on weight of liver and spleen and liver water content in CCl ₄ -treated rats	189
Table 26. Effect of FSSC on plasma ALT activity, albumin concentration and A/G ratio in CCl ₄ -treated rats	190
Table 27. Effect of FSSC on hepatic protein and malondialdehtde in CCl ₄ - treated rats.....	191
Table 28. Effect of FSSC on CCl ₄ -induced liver fibrosis in rats.....	192
Table 29. The effect of FSSC on the activities of AST and ALT in acetaminophen induced acute liver injury.....	207

Table 30. The effect of FSSC on hepatic protein and malodialdehyde (MDA) in acetaminophen induced acute liver injury.....	208
Table 31. The effect on FSSC on hepatic GSH and GSSG in acetaminophen induced acute liver injury.....	209
Table 32. The effect on FSSC on hepatic SOD and catalase in acetaminophen induced acute liver injury.....	210
Table 33. The effect on FSSC on hepatic GSH-Px, GSH-Rd and GSH-T in acetaminophen induced acute liver injury.....	211
Table 34. The effect on FSSC on the activities of plasma AST and ALT in bromobenzene induced acute liver injury.....	213
Table 35. The effect on FSSC on hepatic protein,MDA and GSH in bromobenzene induced acute liver injury.....	214
Table 36. The effect on FSSC on hepatic SOD and catalase in bromobenzene induced acute liver injury.....	215
Table 37. The effect on FSSC on hepatic GSH-Px, GSH-Rd and GSH-T in bromobenzene induced acute liver injury.....	216
Table 38. The effect on FSSC on hepatic GSH and GSSG in bromobenzene induced acute liver injury.....	217

略語表

AFEF: *Anoectochilus formosanus* effective fraction

ALT: Alanine aminotransferase

AST: Aspartate aminotransferase

CD14: Cluster of differentiation 14

CD36: CD36/fatty acid translocase

COX-2: cyclooxygenase-2

EHD: ethanolic extract of the fruit of *Hovenia dulcis*

FSAP: fermented substance from *Aspergillus phoenicis*

FSSC: fermented substance from *Saccharomyces cerevisiae*

GPAT: glycerol-3-phosphate acyltransferase

GSH: glutathione

GSH Px: glutathione peroxidase

GSH Rd: glutathione reductase

4-HNE: 4-hydroxynonenal

HSC: hepatic stellate cell

IL-6: Interleukin-6

IL-10: Interleukin-10

15-keto-PGF_{2α}: 15-keto-dihydro-PGF_{2α}

LBP: lipopolysaccharide binding protein

LPS: lipopolysaccharide

MAT: Methionine adenosyltransferase

MAT1A: methionine adenosyltransferase 1A

MAT2A: methionine adenosyltransferase 2A

MDA: malodialdehyde

MMP-13: matrix metalloproteinase-13

MUFA: Monounsaturated fatty acid

NADPH oxidase: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase

NF- κ B: nuclear factor κ B

PDGF: platelet derived growth factor

PPC: polyenylphosphatidylcholine

PUFA: polyunsaturated fatty acid

ROS: reactive oxygen stress

SAM: S-adenosylmethionine

α -SMA: α -smooth muscle actin

SOD: superoxide dismutase

TGF- β 1: transforming growth factor- β 1

TIMP-1: tissue inhibitor of metalloproteinase-1

TL4: Toll-like receptor 4

TNF- α : Tumor necrosis factor- α

UCP-2: uncoupling protein-2



謝辭

感謝恩師林文川教授，於在學期間的悉心指導與照顧，帶領我走過研究之路，走過期間的坎坎坷坷，領略了科學的深奧。在您的羽翼之下，我才能在實驗的世界中，自由的成長茁壯。沒有您，就沒有此篇論文的誕生，於此致上最深最誠摯的感謝。

口試審查期間承蒙教務長許朝添教授、中國藥學所的張永勳所長、彭文煌副教授和徐士蘭副教授、營養系的楊新玲教授和趙蓓敏副教授、台灣大學食品科技研究所的沈立言教授以及中興大學獸醫病理研究所廖俊旺副教授，對本論文之撥冗審查，惠與寶貴意見與指正，使本論文得以更臻完善，視野更加寬廣，僅此敬致最真誠之謝意。

感謝中國藥學所內謝明村教授、陳忠川教授、吳啟瑞助理教授等諸位師長之不吝指導，睿與新知，特此致謝。感謝藥理科啟蒙恩師蔡輝彥院長、陳玉芳主任，以及謝文聰副教授、譚思濼副教授、楊家欣助理教授、湯智昕助理教授以及柯毅文先生、林郁茲學姊、郭啟中學長，對實驗生涯的諸多幫助與關懷，給我更寬廣的視野，受益恩情永銘於心。

感謝謝長奇老師、謝文全老師、吳介信老師、柯育仁老師、邱雲棕老師、戴如淳組長、王文信先生、洪英程先生、盧敏吉老師、侯庭鏞老師、李孟修老師，您們總是適時提出最佳解決方案及指引，解答我的困惑，感恩之心，點滴印記。在此同時，感謝張曼釗、楊皓耀和蔡汎修同學，在學期間的諸多幫助及鼓勵，謝謝您們。

感謝實驗室夥伴：學姊施純青、學妹林維莉、徐致芬、劉錦芳、莊謹如、陳蓓瑜、楊麗嬋、蔡佳慈、涂慧珠、吳宛臻、劉鈺婷及學長

吳岳文、學弟蕭宏柏、蘇信瑋，對我的生活上及實驗上的諸多協助與關懷。以及學妹葉靜華、林怡均、黃容容，學弟陳厚志、潘俊旭、黃寬裕、陳堯宣、吳國任，您們總是在我危急之時，適時伸出援手，我的研究生涯及實驗才得以順利進行，在此致上最深的謝意。

感謝我親愛的好友們：呂加麗、蔡睿蘋、詹雅雯、尤紹懿、邱雅純、陳貴米、李俊鋒醫師、夏德椿醫師、葉聯舜醫師、林武周醫師、楊維宏醫師、蘇麗桂、李麗鳳、黃惠代、蔡玫芳、廖嘉辰醫師、林怡秀，謝謝你們陪我走過人生的高低起伏，您們佔據我生命中很重要的一部份，您們就像黑夜中的溫暖燭光，永遠照亮我的心，您們對我的好，永遠銘記我心。

親愛的 pete，亦師亦友的你，這些年您的支持與鼓勵，您的殷殷期盼，深植我心。沒有您，就沒有這段求學歷程。將永遠記得您所教導我的一切，也會記得如何欣賞生命的美景。

感謝最最摯愛的家人們，有您們的濃濃親情包圍著我，作為我的精神後盾，我才有勇氣不停的往前衝刺，僅以今日的這些小小成果，獻給您們。謝謝您們！

以動物模式評估七種生藥之抗肝纖維化效能

研究生 方焄蓮

中國醫藥大學藥學院 中國藥學所

摘 要

本研究選擇三種植物油—橄欖油(*olive oil, Olea europaea*)、棕櫚油(*palm oil, Elaeis guineensis*)及玉米油(*corn oil, Zea mays*)，兩種中草藥—台灣金線連(*Anoectochilus formosanus*)、枳椇子(*Hovenia dulcis*)，及兩種真菌類發酵物—酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)及麴菌(*Aspergillus phoenicis*)，使用四氯化碳誘發肝纖維化動物模式來評估其抗纖維化效果。在實驗過程中發現玉米油會加強四氯化碳誘發肝臟脂質過氧化程度，但卻不會加強肝臟纖維化，此與一般的認知不同，因此進一步以活體內及活體外的實驗，探討脂質過氧化產物在肝臟纖維化形成過程中的作用。

橄欖油的效果：橄欖油能降低四氯化碳所增加的大鼠肝臟脂質過氧化產物(*malondiladehyde, MDA*)和羥基脯胺酸(*hydroxyproline*)的量。病理組織的檢查，橄欖油會改善因四氯化碳所增加的肝纖維化和細胞壞死的情況。免疫組織化學分析，橄欖油能降低四氯化碳所增加的星狀細胞活化程度(星狀細胞活化時， α -smooth muscle actin (α -SMA)的表現會上升)。RT-PCR 的分析顯示，橄欖油能抑制四氯化碳引起肝臟發炎及纖維化相關基因如 *lipopolysaccharide binding protein (LBP)*、*CD14*、*Toll-like receptor 4*、*NADPH oxidase*、*nuclear factor-kappa beta (NF- κ B)*、*collagen (α 1)(I)*、*collagen (α 1)(III)*、*transforming growth factor β 1 (TGF- β 1)* 的 mRNA 表現基因表現。西方墨點法分析顯示，橄

欖油也能抑制四氯化碳引起肝臟 LBP、NADPH oxidase、NF- κ B、collagen I 及 TGF- β 1 蛋白的表現。本實驗結果顯示，橄欖油能降低四氯化碳所引起的大鼠肝臟纖維化，其可能的作用機轉有二：(一)橄欖油多酚成分的抗氧化能力減輕了氧化傷害；(二)橄欖油的油酸成分經由改變庫氏細胞內脂體的組成而抑制發炎路徑的活化。

棕櫚油的效果：棕櫚油對四氯化碳誘導大鼠肝肝纖維化程度沒有影響，但增加了血中及肝臟三酸甘油脂的含量。

玉米油的效果：玉米油對四氯化碳所增加的大鼠血漿 ALT 及 AST 活性、和低白蛋白濃度沒有影響。玉米油對四氯化碳所增加的大鼠肝臟羥基脯胺酸含量沒有影響。病理檢查及免疫組織化學分析(α -SMA)的結果也顯示玉米油對四氯化碳所引起的肝臟纖維化沒有影響。玉米油顯著增加四氯化碳所引起大鼠肝臟自由基型脂質過氧化產物 MDA 和 8-iso-PGF_{2 α} 的含量。但對酵素型脂質過氧化產物 15-keto-dihydro-PGF_{2 α} (15-keto-PGF_{2 α})含量沒有影響。玉米油明顯增加四氯化碳所引起的肝臟脂肪堆積。RT-PCR 的分析顯示，四氯化碳增加大鼠肝臟 *GPAT* (*glycerol-3-phosphate acyltransferase*)、*UCP-2* (*uncoupling protein 2*)的 mRNA 表現，對 *CD36* 的表現沒有影響。併用玉米油時明顯增加 *GPAT*及 *CD36*的 mRNA 表現，但對 *UCP-2*的 mRNA 表現沒有影響。本實驗結果顯示，富含長鏈多元不飽和脂肪酸的玉米油不會增加四氯化碳所引起酵素型脂質過氧化產物，即不會加重四氯化碳所引起的發炎反應，因此不會加重四氯化碳所引起的肝臟纖維化。

以動物實驗更深入的探討脂質過氧化產物對星狀細胞的影響，大鼠分別投與玉米油或四氯化碳，於投滿 2、4 和 8 週時各犧牲一批。

結果發現玉米油不會使肝臟的羥基脯胺酸含量增加，組織學的檢查也確認玉米油不會引起肝臟纖維化。玉米油僅增加大鼠肝臟自由基型脂質過氧化產物 MDA 和 8-iso-PGF_{2α} 的含量。但對酵素型脂質過氧化產物 15-keto-PGF_{2α} 含量沒有影響。反之，大鼠投與四氯化碳，第二週起肝臟的羥基脯胺酸含量增加，組織學的檢查也確認肝臟纖維化的產生，肝臟自由基型脂質過氧化產物 MDA 和 8-iso-PGF_{2α} 的含量，和酵素型脂質過氧化產物 15-keto-PGF_{2α} 含量皆明顯增加。在初代培養大鼠肝臟星狀細胞實驗中，使用雷射共軛焦分光光譜顯微鏡和 α -SMA 蛋白質的分析，顯示 MDA、8-iso-PGF_{2α}、15-keto-PGF_{2α} 等三種脂質過氧化產物單獨投與時，不會刺激星狀細胞活化。星狀細胞在小劑量 TGF- β 1 活化條件下，加入 MDA、8-iso-PGF_{2α} 或 15-keto-PGF_{2α}，都不會加強星狀細胞的活化。本實驗結果顯示，脂質過氧化產物如 MDA、8-iso-PGF_{2α} 和 15-keto-PGF_{2α} 不會直接引起星狀細胞活化。

台灣金線連的效果：使用台灣金線連有效分劃(含 kinsenoside 180 mg/g)，探討對四氯化碳誘導小鼠肝纖維化的效果。台灣金線連有效分劃能降低血漿中 ALT 活性、肝臟中脂質過氧化產物(MDA)和羥基脯胺酸的量。病理組織分析結果，也顯示金線連有效分劃能減輕四氯化碳的肝纖維化程度。RT-PCR 分析，金線連有效分劃能增加 *Methionine adenosyltransferase 1A (MAT1A)* 的表現，降低 *collagen(α 1)(I)* 和 *TGF- β 1* 的表現。本實驗結果顯示台灣金線連有效分劃可以減緩四氯化碳誘導之小鼠肝纖維化的發展。

枳椇子的效果：使用枳椇子酒精萃取物，探討對四氯化碳誘導小鼠肝纖維化的效果。枳椇子酒精萃取物降低血漿中 ALT 和 AST 的活

性、肝臟中脂質過氧化產物(MDA)和羥基脯氨酸的量。病理組織分析結果，也顯示枳椇子酒精萃取物能減輕四氯化碳的肝纖維化程度。RT-qPCR 分析，枳椇子會降低肝臟 *collagen (α1)(I)*、*collagen (α1)(III)*、*MAT2A* 的 mRNA 表現，增加 *MAT2A* 的表現。本實驗結果顯示，枳椇子酒精萃取物可以減緩四氯化碳誘導之小鼠肝纖維化的發展。

麴菌和酵母菌發酵物的效果：本研究使用四氯化碳誘導大鼠肝纖維化的模式評估。麴菌和酵母菌，均會降低因四氯化碳而增加的血漿中 ALT 和 AST 值，肝、脾臟重量，肝臟中脂質過氧化產物(MDA)和羥基脯氨酸的量。病理組織分析，均明顯減緩肝纖維化之情形。分析基因包括增加 *matrix metalloproteinase 13*，降低 *MAT2A*, *collagen (α1)(I)*, *collagen (α1)(III)*, *TGF-β1* 和 *tissue inhibitor of metalloproteinase 1* 的表現。結果顯示，麴菌、酵母菌發酵物能減緩四氯化碳誘發的肝纖維化程度，

酵母菌發酵物對小鼠急性肝損傷之效果：使用 acetaminophen 或 bromobenzene 誘發小鼠急性肝炎，血漿 AST 及 ALT 活性顯著上升，肝臟 glutathione 含量下降，肝臟 superoxide dismutase (SOD)、catalase、GSH-peroxidase (GSH-Px)、GSH-reductase (GSH-Rd)、GSH-transferase (GSH-T) 的活性下降。酵母菌發酵物的處理能降低血漿 AST、ALT 活性，增加肝臟 GSH 含量，對下降的酵素活性也有提升作用。本實驗顯示，含高含量麩胱甘肽的酵母菌發酵物投與後，確實可以增加肝臟麩胱甘肽含量而降低 acetaminophen 及 bromobenzene 的毒性。

結論：(一)台灣金線連、枳椇子和酵母菌、麴菌發酵物，以及橄欖油能減輕四氯化碳引起的動物肝纖維化。(二) 脂質過氧化產物，如 MDA、8-iso-PGF_{2α}和 15-keto-PGF_{2α}不會直接引起星狀細胞活化，也不會增強 TGF-β1 的星狀細胞活化作用。

關鍵詞：台灣金線連，枳椇子，酵母菌發酵物，麴菌發酵物，橄欖油，棕櫚油、玉米油，肝纖維化，脂質過氧化，星狀細胞



Evaluation of efficacious anti-fibrotic activity of 7 kinds of natural products in animal model

Hsun-Lang Fang

Institute of Chinese Pharmaceutical Sciences,
China Medical University College of Pharmacy

Abstract

We investigated the efficacy of 7 kinds of natural products on chemical-induced liver fibrosis in animal model. The purpose of this study was to investigate the hepatoprotective effects of olive oil, palm oil and corn oil, *Anoectochilus formosanus* effective fraction (AFEF), ethanolic extract of the fruit of *Hovenia dulcis* (EHD) and fermented substance from *Aspergillus phoenicis* (FSAP) or *Saccharomyces cerevisiae* (FSSC), via CCl₄-induced chronic liver damage animal model. One discovery has been made: corn oil enhanced the hepatic lipid peroxidation activity, but did not affect the liver fibrosis. Subsequently, we further re researched into the role of lipid peroxidation in liver fibrosis pathway by in vivo and in vitro study.

The results of plasma biochemistry data and hepatic hydroxyproline demonstrated that these natural medicines decreased liver fibrosis. The pathohistological and fibrogenic mRNA expression also confirmed these results. RT-PCR analysis showed that CCl₄ increased hepatic mRNA expressions of CD14, Toll-like receptor 4, NADPH oxidase, nuclear factor-kappa beta, collagen (α1)(I), collagen (α1)(III), transforming growth factor β1, lipopolysaccharide binding protein. These mRNA expressions could be decreased by olive oil treatment. In addition, Western blot analysis also supported these results. Olive oil treatment decreased hepatic levels of malondialdehyde and hydroxyproline induced by CCl₄. Histological evaluations

showed that olive oil could attenuate liver fibrosis, necrosis and expression of smooth muscle α -actin induced by CCl_4 . In this study, since non-virgin olive oil was used in this experiment, it is speculated that fatty acid of olive oil significantly reduced CCl_4 -induced hepatic fibrosis in rats.

Palm oil might tend to increase hepatic and plasma triglyceride indefinitely, but could not influence liver fibrosis in CCl_4 -induced liver injury model.

Corn oil did not affect the enhanced plasma ALT and AST activity and hypoalbuminemia caused by CCl_4 administration. Corn oil did not affect the enhanced hepatic hydroxyproline and MDA caused by CCl_4 administration. Histology examination with Sirius red stain also confirmed that corn oil did not affect the CCl_4 -induced liver fibrosis. Corn oil treatment markedly enhanced the hepatic MDA and 8-iso-PGF_{2 α} concentrations induced by CCl_4 , but not the hepatic 15-keto-dihydro-PGF_{2 α} (15-keto-PGF_{2 α}) content. Indeed, quantitative real-time RT-PCR analysis showed that hepatic GPAT (glycerol-3-phosphate acyltransferase) and UCP-2 (uncoupling protein 2) mRNA expression was increased by CCl_4 treatment, but not CD36. In this study, corn oil markedly increased hepatic *GPAT* and *CD36* expression, whereas hepatic *UCP-2* expression was not affected. In this study, the amount of enzymatic lipid peroxidation product and inflammatory states induced by CCl_4 were not affected by corn oil treatment. Corn oil enriches polyunsaturated fatty acids through non-enzymatic pathways to increase LPO products that cannot enhance liver fibrosis induced by CCl_4 .

We investigated the relationship of lipid peroxidation and hepatic stellate cell activation in vivo model. The Wistar rats were orally administered with CCl_4 and / or corn oil and killed in week 2, 4, 8. Corn oil did not affect the

enhanced liver fibrosis in hepatic hydroxyproline. Histology examination also confirmed these results. Corn oil enhanced the free radical lipid peroxidation product (MDA and 8-iso-PGF_{2α}), not enzymatic product (15-keto-PGF_{2α}). Therefore, CCl₄ enhanced the hepatic hydroxyproline of fibrosis marker until week 2. Histology examination also confirmed these liver fibrosis results in CCl₄ model. CCl₄ enhanced the free radical lipid peroxidation product (MDA, 8-iso-PGF_{2α}) and enzymatic product (15-keto-PGF_{2α}).

In vitro model, the treatment of lipid peroxidation product (MDA、8-iso-PGF_{2α}、15-keto-PGF_{2α}) did not directly induce hepatic stellate cell activation by the confocal and western blot analysis of α-SMA. These cells were activated by fibrogenic cytokines such as TGF-β1. Therefore, the high dose of lipid peroxidation product combined with TGF-β1-treated hepatic stellate cell has a bearing on the cause of hepatic stellate cell apoptosis and cells activation was not consequent. So, the product of lipid peroxidation did not directly induce hepatic stellate cell activation.

In this study, we initialized the hepatoprotective effect of *Anoectochilus formosanus* effective fraction (AFEF) and content kinsenoside 180 mg/g. Plasma GPT, hepatic levels of hydroxyproline and malondialdehyde were significantly lower in mice treated with AFEF compared to those treated with CCl₄ only. Liver pathology in the AFEF-treated mice was also improved. RT-PCR analysis showed that AFEF treatment increased the expression of *methionine adenosyltransferase 1A*, and decreased the expression of *collagen(α1)(I)* and *transforming growth factor-β1*. These results clearly demonstrated that the AFEF reduced the hepatic damage induced by CCl₄ in mice.

In the ethanolic extract of the fruit of *Hovenia dulcis* (EHD) results, the Plasma activities of GPT and GOT, and hepatic levels of malondialdehyde were significantly lowered in mice treated with EHD as compared to mice treated with CCl₄ only. Histological evaluation showed that EHD could attenuate the liver fibrosis and necrosis caused by CCl₄. RT-qPCR analysis also showed that EHD treatment decreased hepatic *collagen (α1)(I)* and *collagen (α1)(III)* mRNA expressions. Chronic CCl₄ treatment caused liver injuries in mice, characterized by an increase in hepatic *methionine adenosyltransferase (MAT)2A* gene expression, and decreased *MAT1A* gene expression. EHD significantly reduced the changes in *MAT* gene expression due to chronic CCl₄ treatment. These results clearly demonstrated the EHD could reduce hepatic injuries in mice induced by CCl₄.

In fermented substance from *Aspergillus phoenicis* (FSAP) or *Saccharomyces cerevisiae* (FSSC) results, the plasma ALT and AST, spleen weight, and hepatic levels of lipid peroxidation and hydroxyproline were significantly lower in the rats treated with FSAP or FSSC as compared to CCl₄ only. Liver pathology in the FSAP or FSSC - treated rats was also improved. mRNA expression analysis showed that FSAP or FSSC treatment increased the expression of *matrix metalloproteinase 13* and decreased the expression of *methionine adenosyltransferase 2A*, *collagen (α1)(I)*, *collagen (α1)(III)*, *transforming growth factor-β1*, and *tissue inhibitor of metalloproteinase 1*. These results clearly indicate that FSAP or FSSC partially reduced the liver fibrosis in rats induced by CCl₄.

The effect of *Saccharomyces cerevisiae* (FSSC) in mice induced acute liver injury by acetaminophen and bromobenzene, the plasma ALT

and AST was decreased, and hepatic levels of glutathione and activity of superoxide dismutase (SOD)、catalase、GSH-peroxidase (GSH-Px)、GSH-reductase (GSH-Rd)、GSH-transferase (GSH-T) were significantly increased in the mice treated with FSSC as compared to acetaminophen and bromobenzene only. These results clearly indicate that FSSC partially reduced the liver injury in mice induced by acetaminophen and bromobenzene.

In summary, (1) the five kinds of natural drugs, including the AFEF, EHD, FSAP, FSSC and olive oil, have hepatoprotective effect on liver fibrosis in animal model; (2) the product of lipid peroxidation did not directly induce hepatic stellate cell activation, and also not enhance the TGF- β 1 induced hepatic stellate cell activation.

Key words: *Anoectochilus formosanus*, *Hovenia dulcis*, fermented substance from *Aspergillus phoenicis*, fermented substance from *Saccharomyces cerevisiae*, olive oil, palm oil, corn oil, liver fibrosis, lipid peroxidation, hepatic stellate cell.

第一章 緒論

第一節 研究背景及目的

肝病是台灣盛行的疾病之一，B 型肝炎帶原者約有三百萬人，感染 C 型肝炎者約有四十萬人¹。慢性肝病及肝硬化每年都列入台灣十大死亡原因之一，每年大約有四、五千人因慢性肝病及肝硬化而死亡¹。所有慢性肝炎包含病毒性肝炎及酒精性肝炎皆會轉成肝纖維化進而轉成肝硬化，一般認為肝硬化是不可逆的，目前對於肝硬化尚沒有很好的治療藥物，僅能針對肝硬化產生的併發症處理，如用 β -阻斷劑降門脈高壓，用利尿劑改善腹水等²。因此抗肝硬化藥物或延緩肝硬化病程進展的保健食品研發是重要的課題。

肝纖維化是肝臟受損修復過程中，以膠原蛋白為主的細胞外間質大量沉積。近年來分生的研究，從提升膠原蛋白降解酶的活性，或誘發產生膠原蛋白的肝臟星狀細胞凋亡³，顯示可以使肝纖維化逆轉，因此使肝硬化回轉是有可能的⁴。雖然如此，目前在肝硬化藥物的研究，抗氧化及抗發炎作用還是受到相當重視，清除自由基及減少發炎細胞激素的釋放是可以減緩肝硬化的進展⁵。目前進入臨床試驗的肝硬化藥物多元不飽和磷脂膽鹼 (polyenylphosphatidylcholine, PPC)，其作用機轉即以抗氧化為主⁶，也能影響到肝臟星狀細胞^{7, 8}。天然物中存在很多具抗氧化及抗發炎的物質，由天然物中篩選抗肝硬化的藥物應是可行的，篩選的來源除植物之外，也應擴及微生物產物。

來自植物的食用油可區分為以單元不飽和脂肪酸為主的如橄欖油、多元不飽和脂肪酸為主的如玉米油、飽和脂肪酸為主的如棕櫚油等。橄欖油是來自於地中海的健康油，可以預防及減輕心血管方面的

疾病⁹，其所含的酚類化合物有很強的抗氧化作用¹⁰，所含的油酸影響發炎物質的釋放¹¹。然而橄欖油對慢性肝炎的相關研究卻很少。

長鏈多元不飽和脂肪酸容易受自由基攻擊，可視為具清除自由基作用。然而其產生的脂質過氧化產物，很多的動物實驗都認為與肝纖維化之間有密切的關係¹²。PPC 研發之初也曾擔心會對肝硬化不利⁵。許多報告指出肝硬化病人常出現多元長鏈不飽和脂肪酸缺乏的現象^{13, 14}，有報告指出補充多元不飽和脂肪酸對肝硬化是有助益的^{14, 15}。

攝取的油脂對肝硬化的影響，雖有一些流行病學的統計調查，但若期望慢性肝炎的病人能由日常的油脂的攝食來減緩肝硬化的進展，則在學理上的研究有待加強。因此本研究的第一部分，以動物實驗的模式比較了三種不同類型的脂肪油，即玉米油、橄欖油、棕櫚油對慢性肝炎的影響。在實驗過程中發現，多元不飽和脂肪酸產生的脂質過氧化產物對肝纖維化的影響與一般的認知不同，因此又設計了細胞實驗來印證在動物體內的發現。

微生物的結構簡單、營養要求低、易培養、生理類型多樣、生長繁殖速度快、容易積累中間代謝產物、容易進行人工變異等，因有這些優點，使開發微生物資源已經成為現代生技和醫藥產業的一個重要領域。財團法人食品工業研究所生物資源保存中心一直在進行微生物資源的開發，多年來累積相當的成果，透過與我們的研究，把這些資源的功效顯現出來，期能進一步開發成保健產品。

食品工業發展研究所提供給我們兩種材料，一是麴菌的發酵物，另一為酵母菌發酵物。已知麴菌的發酵物含有抑制膽固醇合成的成分，具降血脂作用，目前有多家廠商投入麴菌發酵的生產。麴菌發酵物除了含降膽固醇成分外，還含有相當的抗氧化作用成分。有研

究自麴菌發酵物發展類麩胱甘肽 (glutathione-like, GSH-like)的抗氧化物質¹⁶，食品工業發展研究所依類 SOD (superoxide dismutase-like, SOD-like)作用篩選出能產生高抗氧化物質的菌株，提供其發酵物供我們研究。

酵母菌早就被使用於食品及製藥業生產某些物質。利用酵母菌生產麩胱甘肽已有報導，食工所也篩選出麩胱甘肽高產量的菌種，提供我們此菌種的發酵物進行慢性肝炎的研究。麩胱甘肽進入腸道後應該會被分解成胺基酸，其產生功效或許與 acetylcysteine 一樣，是提供麩胱甘肽合成的前驅物質。由於 acetylcysteine 是 acetaminophen 肝中毒的解藥，因此在本研究也探討了此發酵物質對於 acetaminophen 及 bromobenzene 的急性肝毒性的效果。此兩個肝毒性物質都是因肝臟中麩胱甘肽的耗盡而產生毒性。

本研究室一直從事中草藥的研究，台灣金線連是研究重點。台灣金線連被稱為「藥王」或「藥虎」意指具有多樣的保健功效。台灣金線連的保肝作用已完成產學合作，相關的技術已轉移給廠商。在此過程中建立了台灣金線連保肝原料(*Anoectochilus formosanus* effective fraction, AFEF)的量產方法，也確立了有效成分金線連糖(kinsenoside)的品管方法。雖然如此 AFEF 的保肝機轉尚有未明的地方，本研究僅探討 AFEF 對四氯化碳慢性肝炎的作用，AFEF 的其他保肝作用途徑，或金線連糖的相關實驗，另有研究在進行。中藥枳椇子用於解酒¹⁷，相關文獻也指出對動物急、慢性肝炎有抑制作用^{18, 19}。在 AFEF 對小鼠四氯化碳慢性肝炎的研究，也同時進行枳椇子的作用探討。得到正面的效果，因此也進行相關作用機轉的分析。

所以本研究共進行了七種材料，包含了三種油、兩種菌類發酵物及兩種中草藥，的保肝作用探討，除了玉米油及棕櫚油外皆得到正面的效果。麴菌發酵物的毒性較高已停止研發。AFEF 及酵母菌發酵物已技轉給廠商，後續的相關研究仍然在進行。枳椇子作用明確，相關的成分已有文獻，市場上無法購得，若能克服此問題，具有研發成健康食品的潛力。橄欖油的有效性在預料中。由於 PPC 的有效性，預測玉米油也可能有效，但結果沒有，卻發現單純脂質過氧化產物可能不會引起肝纖維化，在這方面投入很多的心力，期望在肝硬化病理機轉的研究有點貢獻。

第二節 肝硬化之成因

造成肝損傷的原因包括：化學性傷害如毒物、藥物濫用，B、C 型肝炎病毒引起之肝炎，非酒精性脂肪肝炎和酒精過量引起的酒精性脂肪肝炎，這些原因都可能導致肝纖維化(hepatic fibrosis)、肝硬化(liver cirrhosis)的發生²⁰。當肝臟受到損傷時，會產生發炎反應，剛開始較輕微的損傷，可以藉由身體的免疫系統或肝細胞再生而恢復；若傷害持續存在，發炎反應一直持續，肝臟會進一步發展成肝纖維化²¹。肝纖維化為一可逆性過程，主要是細胞外間質沉積，此時停止對肝的傷害刺激，肝臟則能自行回復，所以肝纖維化也可以視為一種癒合的過程；但傷害一直持續，則會進一步轉變為肝硬化，則為不可逆過程，會產生粗大細胞外間質，聚集於肝細胞周圍，嚴重時會導致肝衰竭、肝癌甚至死亡²²。

一、肝臟構造

肝臟為人體最大腺體，位於腹腔上部右側，成人肝臟重約 1300 公克，為體內進行代謝、合成等重要工作，呈暗紅色表面平滑，其結構分為四葉。肝臟由肝動脈和肝門靜脈供應血流，肝動脈供應約 30% 的血液，另外 70% 的血液供應，是由肝門靜脈匯集腸胃道靜脈血至肝臟。肝動脈為肝細胞提供氧氣及營養，而門靜脈匯集消化系統來的養分，及藥物或其他有毒物質，送至肝臟處理代謝。外膽管、肝動脈及肝靜脈在肝細胞形成門三叉(portal triad)，來自肝動脈與門靜脈的血液混合後，經由門三叉流入竇狀隙(sinusoid)，再流入肝靜脈²³。

由門三叉開始，依照血流方向劃分成三個區域，接近肝門小靜脈的肝細胞稱為肝門靜脈周圍區(periportal)，又稱 zone 1；靠近終端肝小靜脈的肝細胞為肝靜脈周圍區(perivenous)，又稱 zone 3，介於兩者之間的區域稱為 zone 2。肝門靜脈周圍區因有較多血流供應，所以大多負責較消耗能量的反應，如膽固醇、蛋白質合成等；肝靜脈周圍區則主要是毒物分解、藥物代謝的功能²⁴。

肝臟細胞分為實質細胞(parenchymal cells)和非實質細胞(non-parenchymal cells)。實質細胞約佔總數的 80%，主要為肝細胞，外觀上為不規則多面體，有數個細胞核。另外還有非實質細胞，如星狀細胞(hepatic stellate cells)，存在於肝細胞與孔狀內皮細胞間隙間的迪氏腔(Disse's space)，主要功能為儲存油溶性維生素 A，並且會分泌細胞外間質(extracellular matrix)，如膠原蛋白等，負責維持肝臟之結構，當肝受到損傷時，星狀細胞會轉變為活化態，大量分泌細胞外間質，形成肝纖維化。庫氏細胞(kupffer cell)，也屬於非實質細胞，為存在於肝臟中的巨噬細胞，活化時會釋出細胞激素，促使肝纖維化病程發展²³。

二、肝細胞

人體有許多重要的生合成反應都在肝細胞進行，包括醣類、脂質、蛋白質等營養的代謝、利用及儲存，固醇類激素、膽固醇、凝血因子、白蛋白的合成，膽汁、尿素之形成，藥物、毒素代謝，長鏈不飽和脂肪酸、磷脂質、脂蛋白、酮體等合成等²⁵。當肝臟受損時，許多功能會喪失，包括白蛋白和凝血因子的合成，藉由血液中白蛋白的含量和凝血時間的長短，可以偵測肝臟機能受損程度。

肝臟細胞進行許多重要的代謝合成反應，需要多種酶來輔助進行，如丙氨酸轉氨酶 (Alanine aminotransferase, ALT)、天門冬胺酸轉氨酶 (Aspartate aminotransferase, AST)，進行胺基酸代謝產生氨。甲硫胺酸腺苷基轉移酶 (Methionine adenosyltransferase, MAT)負責多數的肝臟甲基化反應等。

ALT，也是 GPT (Glutamyl pyruvic transaminase)，主要存在於肝臟；AST，也是 GOT (Glutamyl oxaloacetic transaminase)，存在於肝臟、心臟、骨骼肌。雖然 AST 不具肝臟專一性。當肝細胞受損，ALT 和 AST 會被釋放到血液中，因此偵測血中酵素活性，可以推知肝損傷的程度，這兩項生化值檢驗被認為是偵測肝功能損傷的重要指標。

MAT 主要負責第一步的硫化作用，使在肝臟的甲硫胺酸 (methionine)，轉換成 S-腺甲硫胺酸 (S-adenosylmethionine, SAM)^{26, 27}，SAM 是一個細胞代謝時重要的甲基傳遞者²⁸，負責肝臟 85%的甲基反應²⁹。例如合成麩胺胱肽 (glutathione, GSH)，此為內生性抗氧化防禦劑，或是輔助檸檬酸循環的進行。當肝臟受到傷害，MAT 也會受到影響而下降，增加了氧化傷害的程度³⁰，因此，MAT 是一個肝臟非常重要的酵素。

MAT 在哺乳動物組織中有兩種形式的蛋白質表現，一是 MAT I/III 和 MAT II，分別由兩種不同的基因控制：*MAT1A* 和 *MAT2A*。*MAT1A* 會在正常肝臟組織表現，維持細胞進行正常之代謝功能³¹。而 *MAT2A* 則是在剛出生時表現較高，隨年紀增長而消失，或進行分化作用時才會表現³²⁻³⁴。

當肝臟纖維化、肝硬化、肝癌發生時，*MAT1A* 因肝細胞受損，基因表現會下降，失去甲基傳遞者的作用，而 *MAT2A* 表現被啟動後，取代了 *MAT1A* 的代謝功能，抑制 SAM 的合成，進行細胞分化³⁵。所以，*MAT1A* 的基因會在正常肝臟表現，*MAT2A* 則是會在受損的肝臟表現，偵測 *MAT1A* 和 *MAT2A* 的變化可視為一種基因層次的肝損傷指標。

其他的肝損傷生化指標，還包括了膽紅素、鹼性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, ALP)、丙麩轉氨酵素 (γ -Glutamyl transpeptidase, γ -GT)、球蛋白(globulin)等。

肝臟網狀內皮系統可以處理廢棄紅血球，最終的代謝廢物是膽紅素，由肝細胞排出膽紅素至膽囊。如肝臟受損或膽汁鬱積時，膽紅素堆積於皮膚及黏膜，造成黃疸症狀，因此血漿中膽紅素生化值也是肝損傷指標之一²⁴。

鹼性磷酸酶，存在於肝臟、骨骼、胎盤等處，由肝臟排出至膽汁中，常被認為是膽道阻塞或膽道周圍組織病變的指標，另外在骨骼成長時，會大量表現，也是骨成長指標之一。丙麩轉氨酵素，是肝臟、膽汁中都存在的酵素，與胺基酸對細胞膜的通透運輸或 GSH 的利用有關，此指標主要與膽汁鬱積性肝病和酒精性肝病相關²⁰。

肝臟的網狀內皮細胞的作用是防禦外來物質的功能，保護肝臟不受由腸道來的外來細菌、內毒素等的侵襲，球蛋白(globulin)相當於一種抗體，當肝臟受到損傷的時候，肝臟的防禦能力會降低，血中球蛋白含量會增加，可以利用血中球蛋白的含量測定，就可以知道肝臟防禦系統受到損傷的程度²⁴。

脂肪酸以三酸甘油酯之形式送入肝細胞，再分解為脂肪酸及甘油，分解後會進入粒線體進行 β -氧化作用，之後進入檸檬酸循環產生能量。或再組成脂肪酸構成細胞膜上的磷脂質，或以三酸甘油酯形式儲存於肝臟。當肝臟受到損傷時，脂質代謝功能會降低，脂質會堆積在肝臟造成脂肪肝，因此脂肪肝也認為是肝臟損傷指標之一³⁶。

此外，因酒精濫用形成的脂肪肝，稱為酒精性脂肪肝(alcoholic fatty liver)，主要是因為酒精代謝成乙醛，破壞肝細胞所致³⁶。如攝取過多油脂，也會造成非酒精性脂肪肝，有可能發展成為非酒精性脂肪肝炎³⁶。當游離脂肪酸過多或極度飢餓時，則有可能自肝臟因快速氧化脂質，大量產生二氧化碳和酮體，此時呼吸會有丙酮氣味，可能演變成酸中毒²⁵。

關於脂肪代謝的基因包括 *uncoupling protein 2 (UCP-2)*、*glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT)* 和 *CD36/fatty acid translocase (CD36)* 等。UCPs 家族蛋白質位於細胞粒線體上，主要負責 ATP 合成時的質子轉換³⁷。脂肪酸大量進入形成脂肪肝時，UCP-2 蛋白會在肝細胞大量表現³⁸。GPAT 是三酸甘油酯合成之速率限制酶，所以偵測 GPAT 的量，即可推知三酸甘油酯的合成量³⁹。CD36 在脂質代謝過程中負責傳送脂肪酸，通常大量表現於脂肪組織、骨骼肌和心肌⁴⁰。藉由此三項基因的表現，可以推知脂肪代謝和脂肪肝的程度。

三、庫氏細胞

(1) 庫氏細胞

庫氏細胞，屬於肝臟的巨噬細胞，於 1876 年由 Kupffer 先生首度在肝臟的竇狀隙發現這些特化的內皮細胞，當時命名為 sternzellen(star cells)，但其他學者為區別庫氏細胞與星狀細胞，改稱呼為 kupffer cell (庫氏細胞)⁴¹。

大小約 15-20 μm 的不規則型態，細胞上有 70 nm 厚的絨毛外殼，有 15 nm 的莖膜，貼附於肝臟竇狀隙的內皮細胞上，約占肝臟非實質細胞總數的 35%，以肝門脈區數量較多⁴²。庫氏細胞能吞噬廢棄血球細胞，如紅血球和白血球，或細菌碎片、細菌內毒素⁴³⁻⁴⁵。庫氏細胞，與慢性肝臟疾病的發炎過程息息相關，包括外來毒素、酒精等引起之免疫反應、由 B、C 型肝炎病毒引發的免疫反應、肝臟的自體免疫反應⁴⁶。

(2) 脂體(lipid body)

脂體(lipid body)為一富含脂質的胞器，存在於多種細胞中，包括白血球(leukocytes)⁴⁷。脂體存在於細胞質中，外圍有單層磷脂質，內有不飽和脂肪酸、磷脂質、蛋白質、細胞激素等。其功能會因為脂質組成不同而改變⁴⁸。在白血球有較特別的功能，包括調節脂質代謝、控制發炎調節物的合成及分泌、對細菌碎片或細菌內毒素等產生免疫反應⁴⁸。庫氏細胞脂體內的花生四烯酸，被認為是一重要細胞內的發炎訊息傳遞者⁴⁹，及前列腺素前驅物⁵⁰。脂體會因為外在補充油脂的不同，而快速的改變和調節^{47, 51}，所以身體的發炎和免疫反應，會被飲食中的油脂所影響^{49, 50}。

(3) 庫氏細胞的活化

庫氏細胞面對外來毒物如四氯化碳、酒精或內毒素、病毒等傷害時，會釋放出 TNF- α (Tumor necrosis factor- α)、TGF- β 1 (Transforming growth factor- β 1)、IL-6 (Interleukin 6)、IL-10 (Interleukin 10)等細胞激素和發炎因子，同時周圍的自然殺手細胞、CD8+ T細胞也會釋出 INF- γ (Interferon- γ)，促使傷害進行⁵²。

LPS (lipopolysaccharide)是格蘭氏陰性菌的莢膜產生的毒素，會由腸道進入肝門脈血流，引起發炎反應⁵³。大鼠給予四氯化碳誘發肝纖維化的模式中，發現血清中有大量的 LPS 存在，會經由 LPS 路徑活化庫氏細胞^{54, 55}，LPS 會增加肝臟脂多糖結合蛋白 (lipopolysaccharide binding protein, LBP) 的合成⁵⁶，少量 LPS 需要與 LBP 結合，透過位於庫氏細胞膜上的 CD14/TLR4 複合蛋白轉移受體結合，如果是大量 LPS，可直接與 CD14/TLR4 結合⁵²，增加細胞核的 NF- κ B 活化，而促使庫氏細胞釋放 TNF- α ⁵⁷。TNF- α 會增加肝細胞粒線體的氧化壓力傷害，加重細胞受損程度⁵⁸。

最近的研究指出，庫氏細胞的活化與脂體的功能有密切關係，發炎物質刺激時，巨噬細胞會產生新的脂體，此時脂體負責前列腺素的合成和細胞激素的儲存，在整個發炎過程中，以訊息傳遞的方式，調節發炎物質的分泌，故脂體在發炎過程中，是很重要的調節者⁴⁸。LPS 與 LBP 結合，活化 CD14/TLR4 路徑後，巨噬細胞會合成新的脂體，分泌前列腺素 PGE2，而增加發炎反應⁴⁸。所以當 CD14/TLR4 表現受抑制時，脂體形成減少，而減輕發炎反應⁵⁹。

嗜中性球也與庫氏細胞活化有關，肝臟許多外來病原菌或細胞碎片，會附著在庫氏細胞表面，嗜中性球上的 CD11b/CD18 會與庫氏

細胞上的 CD54 對應結合，嗜中性球會吞噬並殺死外來菌體，嗜中性球在竇狀隙被庫氏細胞吞噬破壞，抑制嗜中性球釋放毒性代謝物，被吞噬後凋亡的嗜中性球，可能會向上調節庫氏細胞的前發炎反應，導致 TNF- α 、TGF- β 1、IL-1、IL-6、白三烯素 4 和前列腺素 PGE2 增加⁴²。

因此，庫氏細胞在肝損傷的角色是，當四氯化碳、酒精等毒性物質引發肝臟受損的過程中，受損肝細胞會引起發炎細胞如庫氏細胞活化，會釋出細胞激素，例如 TNF- α ，這些細胞激素會進一步活化發炎路徑，促使肝細胞釋出 TGF- β 1 活化星狀細胞，庫氏細胞等持續發炎，引起周圍肝細胞受損甚至死亡^{43, 45}。因此，阻斷庫氏細胞活化，被視為一種阻止肝臟纖維化病程進展的方式^{44, 60}。

四、星狀細胞(hepatic stellate cell, HSC)

肝臟星狀細胞，1951 年 Ito 學者在人類肝細胞切片中發現，有儲存脂肪滴的細胞⁶¹，1958 年 Suzuki 在迪氏腔發現外型似星狀的細胞⁶²，故而得名。星狀細胞約佔肝細胞總數的 5-8 %，與肝實質細胞的比例約 13:100，因為儲存維他命 A，故又稱 fat-storing cell、vitamine A rich cell 等等⁶³。因含有油滴，在波長 328 nm 時，會發出微綠自體螢光⁶⁴，利用此特性可以鑑別星狀細胞和與其相似的纖維母細胞之差別。

正常生理狀態下，星狀細胞多數處於靜止期(quiescent)狀態⁶⁵。星狀細胞負責細胞外間質的維持，分泌的物質包括膠原蛋白第一、三、四、五、七型，及結構醣蛋白(如：fibronectin、laminin 等)⁶³。

星狀細胞的生理反應，依序進展為(1)起始期 initiation (quiescent HSC) (2)活化期 perpetuation (activated HSC) (3)修復期 resolution

(apoptosis HSC)⁶⁶。當肝臟受到傷害，肝細胞受損，發炎細胞及內皮細胞釋出發炎因子，庫氏細胞活化。庫氏細胞及肝細胞釋出 TGF- β 1⁶⁷，直接刺激活化星狀細胞由靜止態轉變為活化態，如傷害持續進行，則星狀細胞會持續活化，發炎細胞和活化態的星狀細胞會聚集，主要分泌的細胞外間質為膠原蛋白第一及第三型，以第一型的量居多⁶⁶。但身體的自我調節機制(resolution)會促使星狀細胞凋亡，此時星狀細胞進入修復期，膠原蛋白也會漸漸被分解⁶⁶。

纖維化之程度可藉由膠原蛋白的量來調節，以合成及降解兩種作用來平衡細胞外間質含量⁶⁷。負責膠原蛋白降解的間質金屬結合蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)，MMP 作用對象非常專一，會分解膠原蛋白的有 MMP-1、2、3、7、9、13。人類的膠原蛋白第一型藉由 MMP-1 調節⁶⁷，大鼠的膠原蛋白第一型纖維由 MMP-13 調節⁶⁸。抑制膠原蛋白分解酶作用的是組織金屬蛋白酶抑制劑(tissue inhibitors of MMP, TIMP)，會促進膠原蛋白合成，加重肝纖維化，有 TIMP-1、TIMP-2 兩種，主要作用的是 TIMP-1⁶⁹。

纖維化病程中，肝臟膠原蛋白的合成和 TIMP-1 的活性上升，MMP 活性則是下降⁷⁰。所以，MMP-13 和 TIMP-1 兩者的互相調節作用，在纖維化過程，扮演相當重要之角色⁷¹。

活化態的星狀細胞骨架蛋白，主要是 desmin、 α -smooth muscle actin (α -SMA)，desmin 約 70 - 80%的星狀細胞會表現， α -SMA 則是所有活化態星狀細胞都會表現，但正常細胞不會有 desmin、 α -SMA 表現⁷²。 α -SMA 表現量為星狀細胞活化程度的主要指標⁶⁶。

星狀細胞是造成纖維化發展的主因，但也是解決纖維化的途徑之一，許多學者認為促使星狀細胞進行細胞凋亡，為治療肝纖維化方

法之一^{3, 73}。在四氯化碳及膽道結紮實驗模式下，回復期時可以見到星狀細胞凋亡^{4, 74}。活化態星狀細胞的凋亡，可被視為一種調控肝纖維化的方式，會促使膠原蛋白降解⁷⁵。

五、氧化壓力傷害

自由基為擁有單一電子或不成對電子，獨立存在的化學物質，如 $\text{CCl}_3 \cdot$ 、 $\text{OH} \cdot$ 或與脂質反應的 $\text{LOO} \cdot / \text{L} \cdot$ 。自由基的來源可能來自於自體氧化反應，毒性物質代謝後產物、紫外線、放射線等傷害，粒線體在電子傳遞鏈過程中會產生自由基。

肝臟活性氧分子(Reactive oxygen stress, ROS)來源，通常是由細胞粒線體呼吸作用的電子傳遞鏈產生，或是一些酶的作用產生，諸如 cytochrome P450 monooxygenase，和 NADPH oxidase⁷⁶。肝臟的 NADPH oxidase 可分為吞噬細胞型和非吞噬細胞型。

吞噬細胞型如庫氏細胞上的 NADPH oxidase，經由酒精代謝物、LPS、TNF- α 等刺激後，產生並釋放活性氧分子，引發前發炎反應，並讓肝細胞容易進行細胞凋亡⁷⁷。庫氏細胞吞噬細菌的同時，NADPH oxidase 釋放出活性氧分子，活性氧分子是具細胞毒性，可以殺死外來細菌。但過多的活性氧分子，如果不能被體內抗氧化系統清除，將會傷害正常的細胞⁷⁶。

星狀細胞上的 NADPH oxidase 是屬於非吞噬細胞型活化，星狀細胞是肝臟主要的纖維化細胞，NADPH oxidase 會被細胞激素如 angiotensin II、platelet derived growth factor (PDGF) 或 leptin 活化，釋出活性氧分子，會加重發炎或纖維化過程，可以被視為重要的調節者⁷⁶。

活性氧分子的產生是將氧分子轉變成超氧陰離子自由基($O_2 \cdot$)，經由超氧化歧化酵素轉變為 H_2O_2 ，在金屬離子如 2 價銅、鐵離子轉變為破壞力最強的氫氧自由基($OH \cdot$)，此自由基會攻擊細胞的 DNA，造成 DNA 斷裂；攻擊脂質，造成脂質過氧化；攻擊蛋白質，造成蛋白質 carbonyl 基團變異。活性氧分子對細胞造成的氧化壓力傷害(oxidative stress injury)，長久以來被認為與肝纖維化等肝損傷有密切關聯⁷⁸。

1. 脂質過氧化

脂質過氧化反應包括三個步驟(1)起始反應 (2)連鎖反應 (3)終止反應。起始反應因光線、金屬、助氧化劑 (prooxidant) 而刺激產生。起始自由基為氫氧自由基，脂質過氧化自由基的形式為 $R_1-CHO-R_2 \cdot$ ，此時易受攻擊處為不飽和脂肪酸的雙鍵旁 $\alpha-C$ 的位置，飽和脂肪酸的 $\beta-C$ 位置，形成新自由基，此時會裂解出揮發性產物，裂解為 R_1-CHO (乙醛產物)和 $R_2 \cdot$ (乙烷自由基)等⁷⁹。終止期會有聚合反應，變成 C-C 或 O-O 相接，變成環狀結構，最終有丙二醛 (malodialdehyde, MDA)、4-hydroxynonenal 等醛類產物。丙二醛是具代表性的脂質過氧化產物，較安定，可藉由 thiobarbituric acid 反應偵測，得知脂質過氧化程度⁸⁰。

如由花生四烯酸產生的脂質過氧化產物可分為(一)自由基氧化路徑產物是 8-iso-PGF_{2 α} ，不需酵素輔助。(二)發炎路徑產物是 15-keto-dihydro-PGF_{2 α} (15-keto-PGF_{2 α})，需要經環氧化酵素-2 (cyclooxygenase-2, COX-2)作用產生，所以稱為酵素路徑⁸¹。

當四氯化碳引發肝臟損傷，會產生脂質過氧化後的產物，包括丙二醛、8-iso-PGF_{2 α} 、15-keto-PGF_{2 α} 。其中丙二醛、8-iso-PGF_{2 α} 代表著氧化傷害產物，而 15-keto-PGF_{2 α} 代表著發炎路徑產物。這些脂質過氧

化產物一直被認為與肝損傷之間，有密不可分的關聯⁸²，更有文獻指出這些產物會直接活化星狀細胞^{12, 83}。

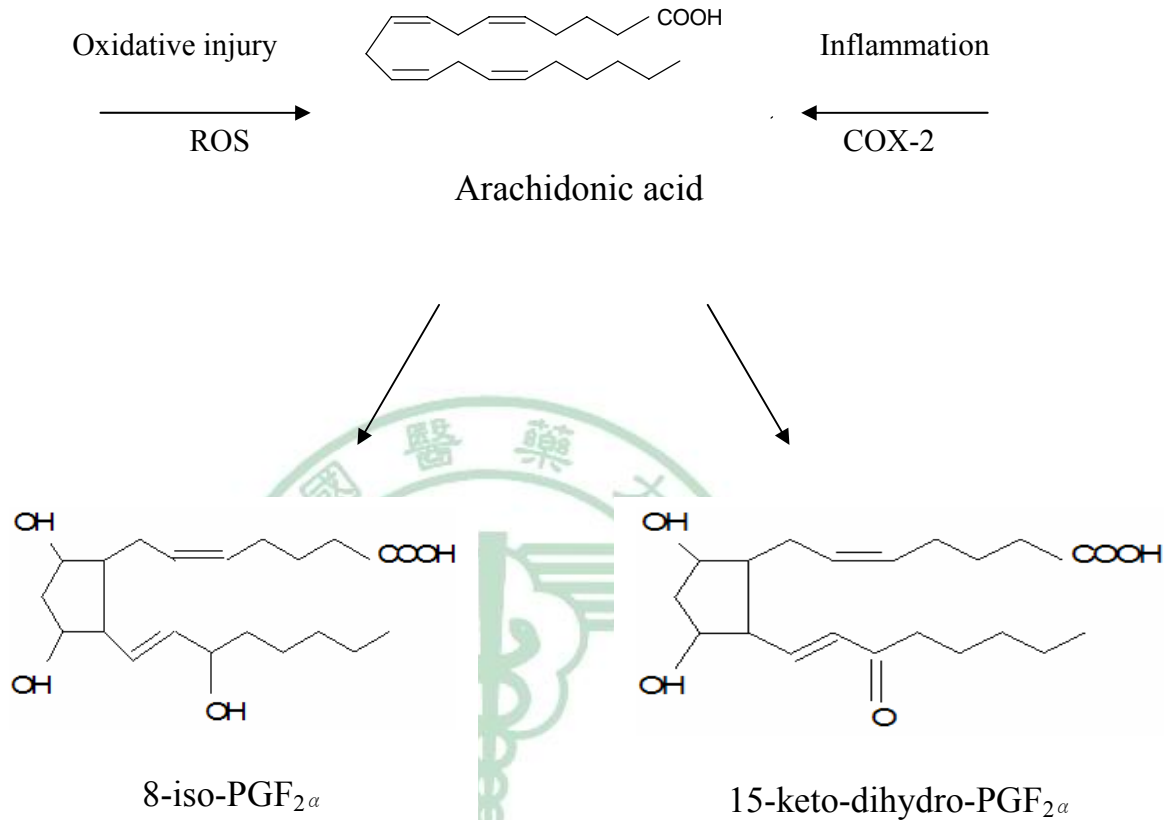


Fig 1. The enzymatic and non-enzymatic pathway of lipid peroxidation

Modeified from reference 82.

2. 抗氧化防禦系統

(1) 麩胱甘肽(glutathione, GSH)

麩胱甘肽是含有三個 amino acid 的胜肽組合而成，參與很多細胞功能，諸如抗自由基和其他毒物的傷害等⁸⁴。麩胱甘肽全名為 γ -glutamyl-cysteinyl-glycine，是含有三個胺基酸的胜肽組合而成，分別由 glutamate、cysteine、glycine 組成，存在哺乳動物肝臟、腎臟、腦、骨骼肌和紅血球。麩胱甘肽合成，第一步驟需要 γ -glutamylcysteine

synthetase，將 glutamate 和 cysteine 結合，此步驟為速率決定步驟，第二步驟為 glutathione synthetase 再將 glycine 接在 C-terminal 端，此二酵素均需要 ATP 輔助。

麩胱甘肽的生理功能很多，主要為清除由超氧歧化酶轉換超氧自由基而來的過氧化氫，可預防過氧化物的毒性，避免過氧化氫轉變成氫氧自由基(OH·)，產生更大的危害。利用本身當作受質，透過 glutathione peroxidase(GSH Px)氧化作用來移除過氧化氫，此時麩胱甘肽還原型(GSH)會變成麩胱甘肽氧化型(GSSG)，之後，再透過 glutathione reductase (GSH Rd)將 GSSG 轉換回 GSH，而成為一個循環，此反應進行時需要有硒(selenium)存在⁸⁵。

麩胱甘肽也參與解毒代謝，當有外來毒物時，透過 glutathione S-transferase 催化進行結合，增加外來毒物的水溶解能力，提高毒性代謝物的清除率，達到解毒之目的，故 glutathione S-transferase 的表現，亦與細胞清除毒物的能力成正比⁸⁵。

麩胱甘肽提供細胞硫氫基來源，維持細胞之正常代謝功能，亦藉由存在於細胞膜外的酵素 γ -glutamyl transpeptidase 及 dipeptidase 加以分解，來傳送半胱胺酸及其他胺基酸⁸⁶。雖屬內生性抗氧化系統，但因合成材料必須由外界供給，故也屬於抗氧化劑之一。

(2) 超氧化歧化酶 SOD (superoxide dismutase)

SOD 依所含金屬不同而分成三類：位於細胞質的 CuZn-SOD，位於粒線體的 Mn-SOD，位於細胞外的稱為 extracellular SOD (EC SOD)。屬於內生性抗氧化系統。SOD 將超氧自由基(O₂⁻·)催化為 H₂O₂ 和 O₂，再由過氧化氫分解酵素或麩胱甘肽分解為水和氧。

(3) 過氧化氫酵素 (catalase)

屬於內生性抗氧化系統，多存在於細胞內的過氧化體，中心的金屬離子為活性位置，如錳、鐵等，為四聚物構型，主要功能是藉由金屬離子與自由基之作用，將過多的過氧化氫轉換為水及氧分子，以減少過氧化氫之傷害。

(4) 抗氧化劑

其他如維他命 C、E 等，也是強力抗氧化劑⁸⁷。有研究指出在四氯化碳誘導小鼠急性纖維化模式下，比較四氯化碳的溶媒：玉米油添加或不添加維他命 E 之不同，發現含維他命 E 的玉米油組，所造成的四氯化碳傷害較輕微⁸⁸。許多生藥界中也有許多材料具有強效抗氧化力，值得開發為藥物，如台灣金線連⁸⁹、含多酚類之橄欖油¹⁰，麴菌、酵母菌之天然發酵物^{90,91}，含黃酮類之枳椇子¹⁷等。

3. 四氯化碳誘導之肝纖維化模式

四氯化碳誘導肝損傷模式，此模式為動物模式中最被廣泛使用的方法⁹²。藉由口服或是腹腔注射的給藥方式，應用於慢性或急性肝損傷的誘導模式。誘導初期或急性期，在組織學即可見明顯發炎及肝損傷現象；在 6-8 週後，組織會出現肝細胞壞死、變性，細胞失去界線融合，嚴重纖維化發生⁹³。

四氯化碳肝毒性機轉主要是藉由肝臟中 cytochrome P 450 系統中 CYP2E1 將四氯化碳代謝為 $\text{CCl}_3 \cdot$ 自由基 (trichloromethyl)，之後 $\text{CCl}_3 \cdot$ 自由基會更進一步與氧反應形成更具活性的 $\text{CCl}_3\text{OO} \cdot$ (trichloromethylperoxy) 破壞肝細胞⁹⁴，之後受損肝細胞釋出大量活性氧分子，攻擊細胞的 DNA、蛋白質、脂質等處，造成氧化壓力傷害，使細胞受損更加嚴重，肝細胞放出如 TGF- β 1、IL-1、IL-6 等發炎因

子，此時庫氏細胞活化，促使釋放 TNF- α 、TGF- β 1 等細胞激素，而促使肝臟纖維化病程的發展⁸³。TGF- β 1 則是直接活化星狀細胞，促使纖維化的進行⁹⁵。

四氯化碳肝損傷模式中，過多自由基引發脂質過氧化的連鎖反應，其會攻擊細胞膜磷脂質上的不飽和脂肪酸如油酸、亞麻仁油酸等受損，產生脂質過氧化產物，如丙二醛⁹⁴。四氯化碳毒性之影響範圍不只是細胞膜及粒線體，內質網也會受到影響，造成細胞功能喪失；此外細胞膜受損，亦會使得細胞內鈣流失而失去平衡，最終致使細胞死亡⁹⁶。

當四氯化碳等傷害肝細胞時，庫氏細胞會活化一些發炎媒介物和細胞激素⁴³⁻⁴⁵。所以，庫氏細胞的活化被認為是四氯化碳引發肝損傷過程中的重要因素。

第三節 研究材料之相關文獻

一、脂肪油

脂肪油又名脂質，存在於植物體內的高級脂肪酸的甘油酯類，主要由甘油及脂肪酸所組成，主要分布於植物種子中。依雙鍵之有無分為飽和油脂和不飽和油脂，不飽和油脂又依雙鍵之多寡而分，一個雙鍵稱為單元不飽和脂肪酸(Monounsaturated fatty acid, MUFA)，一個以上雙鍵稱為多元不飽和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)⁹⁷。

飽和脂肪酸室溫下為白色固體狀態，化學性質較安定，不易受加熱破壞，除一般動物油脂屬於此類外，植物油中之棕櫚油和椰子油亦屬此類油脂，較易升高血中膽固醇，對心血管疾病患者造成負擔⁹⁷。

單元不飽和脂肪酸室溫下則為液體，安定性比飽和脂肪酸稍差，但因會降低血中膽固醇，因此降低心血管疾病風險，代表性油脂為橄欖油、苦茶油、芝麻油等等⁹⁸。

多元不飽和油脂，因有較多雙鍵，所以較不安定，但為合成細胞膜磷脂質之主要成分，也具有降膽固醇之作用，代表性油脂為玉米油、黃豆油、深海魚油等等⁹⁷。

若依甲基旁的第一個雙鍵的位置區分，則稱之 ω ，分成 $\omega 3, 6, 9$ 等等。 $\omega 3$ 代表性油脂為次亞麻油酸、Docosahexaenoic acid (DHA)，多存在於魚、黃豆油、芥花油。 $\omega 6$ 代表性油脂為花生四烯酸、亞麻油酸，多存在於一般植物油中。 $\omega 9$ 代表性油脂為油酸，如橄欖油⁹⁸。

另外還有一種脂質形式為三酸甘油酯，分為中鏈及長鏈兩種。一般體內的三酸甘油酯，均為長鏈脂肪酸組合而成。而中鏈三酸甘油酯(medium chain triglycerin, MCT)，由中鏈脂肪酸組成，通常為 6 個碳到 12 個碳，其較不易造成脂肪堆積，不易在體內生成膽固醇和三酸甘油酯。因為不需要胰液、膽鹽消化，對肝硬化病人較不易造成負擔⁹⁹。

二、 脂肪油與肝硬化之關係

從 2005 年提出新的飲食建議中，建議一般大眾多攝取健康的植物油脂作為主要能量之來源，而且必須是健康的植物油脂，例如橄欖油、玉米油等等¹⁰⁰。而從健康照護的觀點來說，肝硬化的病人需要較多的能量來源，來修復受損之細胞¹⁰¹，高能量的油脂成為他們飲食中重要的一環¹⁰²。

而從許多學者的報告中指出肝硬化病人體內的多元長鏈不飽和脂肪酸的含量較低¹⁰³⁻¹⁰⁶。更深入探討多元長鏈不飽和脂肪酸與肝硬化

之間的關聯之後，發現多元長鏈不飽和脂肪酸與肝硬化的關係非常密切，是因為多元長鏈不飽和脂肪酸主要是在肝臟部分合成的。在肝硬化病人身上發現，血漿脂質中的多元長鏈不飽和脂肪酸濃度會降低，包括亞麻油酸、次亞麻油酸和花生四烯酸等^{106, 107}。在酒精性肝硬化的病人^{108, 109}，其他肝疾病患者¹¹⁰的紅血球細胞膜也發現相同的結果，花生四烯酸濃度會下降；血小板功能會改變¹¹¹。而多元長鏈不飽和脂肪酸是主要建構細胞結構的成分以及負責維持細胞功能¹³。

由於多元長鏈不飽和脂肪酸是屬於雙鍵較多的油脂，較容易產生脂質過氧化現象，是許多的文獻指出在肝臟纖維化的過程中，均可以偵測到較高的脂質過氧化程度，不管是利用丙二醛或是 4-hydroxynonenal 這兩種產物偵測都有相近的結果^{78, 112}。Cabre 學者在 1996 年指出，提供多元長鏈不飽和脂肪酸給肝硬化病人，會增加病人對脂質過氧化的敏感性¹³。Polavarapu 學者發表在大鼠餵食高劑量魚油和玉米油時，會加重脂質過氧化現象¹¹³。

許多文獻指出在肝硬化的病人身上，常會出現多元長鏈不飽和脂肪酸缺乏之現象^{13, 102, 114}。Okita 學者在日本地區所做的飲食調查中指出，對於已經肝硬化的病人，提供富含多元長鏈不飽和脂肪酸的食物，例如深海魚中所含的 DHA 或是花生四烯酸加上維他命 E，有助於降低肝性腦昏迷的比例^{14, 106}。血漿中的多元長鏈不飽和脂肪酸濃度降低，可能是增加肝硬化患者的肝性腦昏迷比例的重要因素¹⁰⁵。有學者提出，以多元長鏈不飽和脂肪酸以食物形式¹⁰⁶或以軟膠囊形式¹⁵補充肝硬化病人能量，對肝硬化是較好的選擇。

對肝硬化病人補充多元不飽和脂肪酸，一直有兩極化觀點¹¹⁵，因為長鏈多元不飽和脂肪酸易受自由基攻擊的特性，可能會對肝硬化

病人的回復期有負面的影響¹⁰²。所以需要更深入了解脂肪油與肝纖維化之關聯。

三、橄欖油之相關文獻

1. 齊墩果

橄欖油來自於齊墩果 (*Olea europaea* L.)¹¹⁶，俗稱洋橄欖，屬於木犀科 (Oleaceae)，以其果榨油而得之，稱橄欖油。洋橄欖在歐洲的使用相當頻繁，果實可以浸漬食用。橄欖油除可以食用外，亦可用來軟便通腸，或外用於滋潤乾性頭髮及頭皮、舒緩蟲咬、發癢及瘀傷，在化妝品添加物為滋潤劑用途¹¹⁷。

橄欖油共分兩類 5 個等級，分別是初榨(virgin olive oil)或是精煉(lampante olive oil 或 refined olive oil)兩類。

採收果實後第一道以機器冷壓初榨的橄欖油，不經任何化學處理，經過濾後的油脂，此時油品因含果實汁液而呈現金黃色，稱為初榨橄欖油(virgin olive oil)。又依含酸量分三種等級分別為特級(extra)為 0.1-1%，優質(fine)為 < 2%，普通(ordinary)為 < 3.3%。特級橄欖油，強調手工摘取，24 小時內洗淨，全程於 30°C 下壓製過濾而得，類似果汁，通常供新鮮食用，但因為未經任何化學處理，故容易變質，需儲存於深色瓶中。

壓榨第二次後的油脂，稱為二次油，通常會混合以溶解法取得之油脂，稱為精製油脂(lampante olive oil)，此時酸度必須小於 1.5%，又分兩種等級為橄欖油(olive oil)、精煉橄欖油(refined olive-pomace oil)。此二種橄欖油，均混合一定比例的精製油和初榨油。

但無論是初榨或是精煉此二大類橄欖油，均保有一樣的脂肪酸，含有的多酚類成分也很相近¹¹⁸。

2. 橄欖油之相關文獻

橄欖油為地中海食物常被使用的油脂¹¹⁹。果含脂肪 20%，含油酸 65~75%，棕櫚酸 10~15%，亞麻油酸 9~15%，維他命 E 5-25 mg/100g 等¹²⁰。

果實包含多種酚類化合物，例如酚酸 (phenyl acids)、類黃酮 (flavonoids) 等等¹²¹。橄欖所含多酚類具有很強的抗氧化作用^{10, 122}，清除自由基傷害¹²³；具有抗氧化作用，對許多疾病提供保護效果，如老化疾病、乳癌、結腸癌等⁹。橄欖油含有豐富的單元不飽和脂肪酸，只具有一個雙鍵，比多元不飽和脂肪酸更不易受自由基氧化的影響¹²⁴。

除了多酚類化合物的抗氧化作用外，亦有抗發炎¹²⁵及防止巨噬細胞活化之作用¹²⁶。身體補充油脂的不同，會改變庫氏細胞內的脂體之組成，因此降低身體的發炎和免疫反應^{49, 50}。橄欖油中的油酸成分所形成的脂體，會降低發炎過程，也會抑制嗜中性球的聚集，和減少了 PGE2、TNF- α 釋放¹¹。

在心血管方面，橄欖油所含的油酸，可維持血液中高低密度脂肪酸平衡，降低血液黏度，防止血栓形成，有效降低心血管疾病風險^{124, 127, 128}，也有抗動脈硬化以及抗發炎的效果¹²⁹。在 2004 年的飲食研究中，食用橄欖油會有較低的粥狀動脈硬化和冠狀心臟疾病發生率⁹。也因為含有較多單元不飽和脂肪酸，降低血中低密度膽固醇，而不影響高密度膽固醇¹³⁰。

3. 橄欖油與肝硬化之關聯

Fernandez 學者指出在 thioacetamide 誘發肝硬化的大鼠其肝硬化回復情況，補充單元不飽和脂肪酸比多元不飽和脂肪酸更好，病理學結果也印證了油酸有助於纖維化之回復^{131, 132}。在 thioacetamide 誘導肝纖維化模式下，比較橄欖油及葵花油對大鼠體內油脂代謝之影響，也發現橄欖油造成脂肪空泡堆積、纖維化情形較輕微¹³³。Szende 學者¹³⁴指出在四氯化碳誘導肝硬化模式中，比較使用不同油脂作為溶媒的影響，四氯化碳溶於橄欖油的肝毒性比玉米油、魚油、葵花油都低。

在 1999 年有學者認為橄欖油與玉米油、中鏈三酸甘油酯相比，較不會增加庫氏細胞的增生 (proliferation) 以及 NF- κ B 的活性¹³⁵。橄欖油內含多酚類抗氧化成分，在動物及人類體內，都有對抗氧化壓力之報告^{136, 137}。橄欖油萃取物在細胞實驗中也呈現出很高的抗氧化能力，如 DNA 及脂質的氧化程度之減輕¹³⁸。

四、玉米油之文獻考察

1. 玉蜀黍之文獻考察

玉米油 (corn oil, maize oil, Oleum Maydis)，來自禾本科 (Gramineae) 玉蜀黍種子胚芽 (*Zea mays* L.) 壓榨而得。南美原產，中國、日本、台灣均有栽種¹¹⁶。

在本草綱目中即有記載玉蜀黍，又名玉高粱，其種子稱玉蜀黍米，中藥性味為「味甘，平，無毒。」。米有調中開胃之效，根、葉，可治小便淋瀝砂石，夏秋取花柱曬乾稱番麥鬚、玉米鬚，具抗菌效果¹³⁹。

2. 玉米油之相關文獻

玉米油，主要含有 50% 的亞麻油酸，屬於多元長鏈不飽和脂肪酸，為花生四烯酸的合成材料，是細胞膜上磷脂質的重要組成材料。另外還含有油酸、棕櫚酸、硬脂酸等，用途有軟膏基劑、注射劑、食用等¹⁴⁰。

以含 1~10 % 玉米油的飼料餵食大鼠兩週，玉米油組的脂質過氧化產物會增加^{141, 142}。玉米油在酒精性損傷模式下，會增加脂質過氧化產物，促使肝臟細胞凋亡¹⁴³，增加 TGF- β 1 表現的結果¹⁴⁴。由 Donohue 學者所發表，在酒精性肝損傷的研究中，給予中鏈三酸甘油酯、棕櫚油、玉米油、魚油，結果玉米油與魚油的肝損傷程度大於其他油脂¹⁴⁵。

在 1986 年 Condie 學者利用小鼠餵食四氯化碳 90 天，劑量 12 ~ 1.2 mg / kg，比較四氯化碳溶於玉米油或是 tween 60 中的影響，結果發現玉米油組的肝臟損傷程度較大¹⁴⁶。玉米油比橄欖油、中鏈三酸甘油酯更會增加庫氏細胞的增生和 NF- κ B 的活性¹³⁵。

五、棕櫚油

1. 棕櫚

棕櫚油 (Palm oil) 來自油椰子或名油棕 (*Elaeis guineensis* Jacq.) 之果實，屬於棕櫚科 (Arecaceae)，原產於熱帶西非。植物特徵為幹單立，為老葉殘存的葉柄所包覆，葉大而數多，開展於幹頂成圓闊的樹冠，羽狀複葉，葉柄側緣多半有刺，花單性，雌雄同株異序。新鮮的橘紅色外果皮富含約 45 至 55% 油脂，可煉製優良的食用油，為油脂工業上的重要原料。棕櫚油內含有 50% 的飽和油脂，主要為棕櫚油酸 60%，

還有相當含量的油酸 40%與亞麻仁油酸。棕櫚油中含有兩個部分，一是液態部份佔 65-70%，融點 18-20°C，另外是固態硬脂，融點 48-50°C¹⁴⁷。

雖屬於飽和性油脂，但因含有不飽和生育醇，故有不影響動脈粥狀硬化、動脈血栓形成、抑制血小板聚集、降血壓之功效¹⁴⁸。但與玉米油、葵花油等相比較，會有較高的血中膽固醇值，另外也含高量的β-胡蘿蔔素(維他命 A 前驅物)¹⁴⁷。

2. 棕櫚油相關文獻

食用含 10% 棕櫚油食物，並不會對正常細胞產生影響，但若提高至 20%的高劑量棕櫚油會對肝細胞造成毒性，會使肝細胞變小，扭曲變形¹⁴⁷。在酒精性肝硬化病人中，紅血球細胞膜上的棕櫚油酸和硬脂酸、膽固醇會增加，但長鏈不飽和脂肪酸如亞麻仁油酸會減少¹⁰⁹。可能是因為脂肪合成功能受損，無法合成長鏈脂肪酸¹⁰⁸。在酒精性肝損傷中，餵以大鼠棕櫚油之後，發現其脂質過氧化程度較低，降低 TNF-α 和環氧化酵素-2 的表現¹⁴⁹。同樣在酒精性肝損傷情況下，比較棕櫚油與中鏈三酸甘油酯、玉米油和魚油之間，棕櫚油組形成的脂肪肝較嚴重，但並無如玉米油和魚油有細胞發炎、損傷之現象¹¹³。飽和性油脂在酒精性肝損傷模式中，引起的肝細胞凋亡和脂質過氧化，比玉米油和魚油更輕微¹⁴³。

肝細胞的細胞膜磷脂質上的生理活性位置(SN-1)，主要組成是硬脂酸和棕櫚油酸¹⁵⁰。在酒精性肝疾病及纖維化模式中，紅血球細胞膜

上的棕櫚酸和硬脂酸會增加，但是如果轉變成肝硬化，花生四烯酸和亞麻仁油酸的含量，也會隨之下降¹⁰⁹。

六、台灣金線連

金線連屬(*Anoectochilus*)之植物超過 35 種，大致分布於印度、喜馬拉雅山脈、東南亞各國、印尼、新喀里多尼亞以及夏威夷一帶。台灣自產金線連屬之植物有四種：一為 臺灣金線連(*Anoectochilus formosanus* Hayata)，二是單囊開唇蘭(*Anoectochilus inabai* Hayata)，第三種是高雄金線連(*Anoectochilus koshunensis* Hayata)，第四個為二囊開唇蘭(*Anoectochilus lanceolatus* Lindl)。台灣原生植物為台灣金線連和高雄金線連，以台灣金線連為主^{151, 152}。

台灣金線連，又名金線蕨龍、金線連、樹草連、黃花粘子蘭等，屬於蘭科(Orchidaceae)金線連屬之小型地生蘭，為一重要的台灣原生植物，分布於台灣全島海拔約 500-1500 公尺的闊葉林床¹⁵³⁻¹⁵⁵。其植物型態為全草高約 20-30 公分，主根肥厚，莖呈肉質匍匐圓筒狀，葉為互生，卵圓形，葉上有明顯中肋脈並鋪滿金色網狀支脈，葉背泛紅色，花成淡粉紅色¹¹⁶。台灣金線連味甘性涼，全草皆可入藥，其藥效十分廣泛，為台灣極珍貴民間藥材¹⁵⁶。台灣金線連因產量稀少，所以十分珍貴，但目前已經發展出組織栽培的方式，可大量培養，且此技術亦經由農業單位推廣中，但目前鮮品價格仍十分昂貴。

早期認為台灣金線連為滋養強壯劑，治肺病、遺精、遺漏、肺脾諸臟疾患，毒蛇咬傷等¹⁵⁶。成分中含有槲皮素(querletin)、二氫槲皮

素(dihydroquercetin)和特殊的金線連酮(kinsenoside)，這些成分都具有強抗氧化作用¹⁵⁷。我們的實驗也證實有很強的清除自由基的作用¹⁵⁸。

台灣金線連的金線連糖(kinsenoside)，由杜氏等人分離出¹⁵⁹，本實驗室研究證實金線連糖對 streptozotocin 誘發的高血糖大鼠具有降血糖和降血中膽固醇和三酸甘油酯之作用¹⁶⁰。杜氏等人也發現台灣金線連水萃取物也有降血脂的效果¹⁶¹。

台灣金線連粗萃物能降低四氯化碳及 acetaminophen 引起之大鼠急性肝炎¹⁶²。本實驗室的研究也指出台灣金線連水萃物改善四氯化碳和二甲基亞硝胺(dimethylnitrosamine)引起的慢性肝炎^{163, 164}。在四氯化碳誘導肝損傷模式的實驗，證實金線連糖為主要保肝的有效成分¹⁶⁵。

台灣金線連水萃物在體外實驗中能增強小鼠吞噬細胞的吞噬作用¹⁶⁶，本實驗室研究指出台灣金線連多醣分劃能活化 RAW264.7 巨噬細胞的吞噬作用及釋放出 nitric oxide、IL-2、 γ -干擾素等¹⁶⁷。

我們實驗室證實台灣金線連水萃物餵食四週可促使腸道益菌生長¹⁶⁸，也發現大鼠餵食台灣金線連水萃取物四週，也會明顯增加腸道乳酸桿菌¹⁶⁹。

台灣金線連具多種藥理作用，還包括抗骨質疏鬆¹⁷⁰、抗發炎¹⁶²、抗疲勞¹⁷¹、抗癌^{172, 173}。

八、枳椇子

枳椇子(*Hovenia dulcis* Thunb.)，為傳統中藥，為急性酒精中毒解毒劑，止吐和緩瀉劑¹⁷。枳椇屬於鼠李科(Rhamnaceae)，屬於落葉喬木，原產河北、福建、廣東，冬季採果，晒乾，壓碎果實，篩出種

子，稱為枳椇子，或別名金鈎木、龍爪、酸棗、金果樹¹¹⁶。本草綱目記載：枳椇，治熱病消渴、煩渴、解酒、嘔吐、發熱等症狀¹⁷⁴。

果實內成分包含有七種類黃酮(flavonoids)，(+)-ampelopsin、laricetrin、myricetin、gallocatechin 和 hovenitins I, II, III¹⁷。枳椇子內含酚類化合物，具有自由基清除能力以及神經保護作用¹⁷⁵。藥理學研究結果顯示枳椇子果實能降低急性酒精毒性¹⁷⁶和糖尿病鼠的血糖值¹⁷⁷。Yoshikawa 學者等人¹⁷指出在大鼠實驗中，hovenitin 和 (+)-ampelopsin 兩項成分會出現抑制因酒精而產生的肌肉放鬆作用。此外，hovenitin I 在小鼠 D-galactosamine / LPS 或 四氯化碳模式的肝損傷有保護作用¹⁷。Hase 等人以大鼠四氯化碳模式和小鼠 D-galactosamine / LPS 模式證實，枳椇子內的(+)-ampelopsin 具有肝保護作用¹⁹。Liu 等人發表，在四氯化碳誘導六週之大鼠，枳椇子萃取物明顯抑制肝臟組織的 TIMP-1 的表現，加速膠原蛋白之降解¹⁸。

九、真菌發酵物

(1) 真菌的特性

真菌的類別繁多，仍有一些共有的特徵可歸納如下：所有的真菌均具有完整的細胞核，即為真核性生物，但相對於其它真核性的動、植物而言，其細胞核極小，所含的核苷酸含量亦較低。真菌以腐生、寄生或共生的形式來獲得營養¹⁷⁸。

(2) 真菌的種類

真菌分成接合菌綱、子囊菌綱、擔子菌綱、未知菌綱(不完全真菌)。接合菌綱藉由接合孢子進行有性生殖，也同時由氣生孢子囊進行

無性生殖；所產生的年輕菌絲，是不具隔膜的。此類真菌包括根霉菌屬、毛霉菌屬等等。子囊菌屬透過子囊，產生子囊孢子，以進行有性生殖。釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)，即屬於此類菌株。擔子菌會產生大量而複雜的子實體，用以支持會產生孢子以進行有性生殖的構造。此類包括蕈類、毒菌類。未知菌屬通常藉以分生孢子的形成而進行無性生殖，此類菌株包括青霉菌屬、麴霉菌屬(*Aspergillus*)等等¹⁷⁹。

3. 真菌的應用

真菌經常以食物的姿態出現，例如豆腐乳、紅糟、木耳、金針菇、香菇、銀耳湯、饅頭、茯苓糕、酒釀、醬油、黃酒、味噌、麵包等等，均是真菌或由真菌加工過的食物¹⁸⁰。

真菌也廣泛用在醫療用途，固有中藥內常用的藥用真菌，主要包括靈芝、樟芝、冬蟲夏草、茯苓、香菇、銀耳、木耳等等。西方醫療中廣泛應用的抗生素，如青黴素，即是由黴菌中提煉而成，能抑制細菌的生長良好功效¹⁸⁰。

4. 麴菌屬

麴菌屬於真菌門(Fungi)、子囊菌綱(Ascomycetes)、麴霉菌科(Aspergillaceae)、麴菌屬(*Aspergillus*)，屬於腐生菌類，富糖化酵素，常用來發酵豆醬、醬油、酒精、青黴素等抗生素等多種用途¹¹⁶。

本草綱目之釋名記載：麴者以米、麥包裹而成，故字從麥、從米，會意也。亦稱酒母，氣味甘、溫、無毒，主治消食積、酒積、止痢，平胃氣等¹⁷⁴。

麴菌屬，菌絲體分枝並具有橫隔，分生孢子自分化的菌絲上直

立長出。麴黴菌具有分解有機物質的能力，在釀造等工業中得到廣泛應用，例如應用於釀酒的糖化菌具有液化，糖化澱粉，同時還有蔗糖轉化、麥芽糖酵素、乳糖酵素等；有些菌能產生較強的酸性蛋白酵素，用來分解蛋白質或用作食品消化劑。黑麴菌所產生的果膠酵素，常用於果汁澄清，用於柑橘類罐頭去苦味或防止白色沉澱產生。葡萄糖氧化酵素，則用於食品的脫糖和除氧。麴菌能產生延胡索酸、乳酸、琥珀酸等多種有機酸，其中草醯乙酸和乙醯輔酶 A 通過縮合成為檸檬酸。在食品工業中應用較多的麴菌屬，有黃麴菌、米麴菌和黑麴菌等。這些麴菌可以用來製作中國的傳統食品，如醬油、豆醬、白酒、黃酒等¹⁸⁰。

發酵微生物被視為一項重要的天然抗氧化物質的來源。有許多天然抗氧化物來自各種食物的。*Aspergillus* 屬常被用來發酵方式生產大量的抗氧化物質^{91, 181}。麴菌(*Aspergillus phoenicis*)發酵物(FASP)，為類 SOD 物質，具有強抗氧化力，能消除活性氧分子，減少自由基的氧化壓力傷害。

5. 酵母菌屬特性

酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)，屬於真菌門(Fungi)、子囊菌綱(Ascomycetes)、酵母科(Saccharomycetaceae)、酵母菌屬(*Saccharomyces*)。酵母細胞多為單細胞，有球形、卵圓形、圓柱形、檸檬形、梨形等。酵母菌是單個球形至卵圓形，無性生殖以出芽方式產生個體，有性生殖是在圓形的子囊中，形成 8 個卵圓形的子囊孢子¹⁷⁹。

在特定條件下某些菌種形成延長的細胞長鏈，形狀與黴菌菌絲相似，稱為假菌絲。利用酵母的菌體或酵母的發酵作用能製造酒類、

饅頭、麵包、單細胞蛋白等多種食品。酵母細胞中含有蛋白質、碳水化合物、脂肪、維生素、酵素和無機鹽等。其中蛋白質含量一般為51~55%，組成此蛋白質的氨基酸有13種以上，營養價值高且易於消化吸收，維生素含量也很豐富，因此酵母是良好的蛋白質來源¹⁷⁹。

酵母菌常用來以發酵方式大量生產天然抗氧化物質^{16, 90}。酵母菌發酵物(FSSC)，則主要是類麩胱甘肽物質。麩胱甘肽被認為有強的抗氧化活性，可以幫助毒物代謝⁸⁶，分解活性氧分子的傷害產物，如過氧化氫、丙二醛¹⁸²。酵母菌常被使用來生產大量的麩胱甘肽¹⁸³。



第二章 橄欖油對四氯化碳誘導大鼠肝纖維化模式之影響

前言

橄欖油是來自於齊敦果(*Olea europaea* L., Oleaceae)的果實壓製而成，是地中海地區常被使用的油脂¹¹⁹。其被認為具有抗氧化、抗發炎、降低心血管風險等之健康油脂¹²⁴。但對肝病的益處，鮮有研究。

對 thioacetamide 誘發肝硬化的大鼠，其肝硬化的回復，補充單元不飽和脂肪酸比多元不飽和脂肪酸的效果好^{131, 132}。在四氯化碳誘導大鼠肝硬化模式中，比較四氯化碳溶於不同溶媒的作用，以溶於橄欖油的毒性比玉米油、魚油、葵花油都低¹³⁴。這些結果顯示橄欖油對肝纖維化病程有正面的影響。本研究之目的在於釐清橄欖油是否會減輕四氯化碳所引發的肝硬化，並解明其相關作用機轉。使用的橄欖油為精煉橄欖油，主要是為避免一些雜質的干擾，且有文獻指出初榨與精煉橄欖油之間的酚類化合物含量相近¹¹⁸。

材料與方法

一、試藥

1. Roche, Germany : Alanine aminotransferase (ALT) , triglyceride
2. Sigma-Aldrich, USA : hydroxyproline , NaOH , H₂SO₄ , p-dimethylamino-benzaldehyde , triton 100 , sodium dodecyl sulfate (SDS) , 2-thiobarbituric acid , Sirius Red , 3-3'-diaminobenidine (DAB) , chloroform , isopropanol , tris base , Bradford reagent
3. Wako, Japan : n-butanol , pyridine , acetic acid , Methanol , H₂O₂
4. BioGenex, USA : α -smooth muscle actin (α -SMA)

5. Santa-Cruz, USA : lipopolysaccharide binding protein (LBP) , NADPH oxidase , NF- κ B , collagen I 和 TGF- β 1 一級抗體 , anti-mouse 、 anti-goat 、 anti-rabbit 二級抗體
6. Invitrogen, USA : trizol 試劑
7. Fermentas, Canada : MMLV RT 套組 、 PCR Master Mix 套組 、 Ethidium Bromide (EtBr)
8. Promega, USA : Agarose gel
9. Perkin Elmer, USA : 冷光試劑 (Western Lighting)
10. Osaka, Japan : CCl₄
11. Fluka, Switzerland : 橄欖油
12. Intron, Korea : 蛋白質萃取試劑
13. Amresco, USA : 40% Acrylamide/bis-acrylamide (37.5:1) , Ammonium persulfate (APS) , N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)

二、動物

使用 Wistar 雄性大鼠，體重 250-300 公克，購自國家實驗動物繁殖及研究中心。飼養環境維持 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ，相對溼度 $55 \pm 5\%$ ，光照為 12 小時亮 12 小時暗(早上七點亮，下午七點暗)的環境，自由飲水及攝食。

三、四氯化碳誘導之慢性肝毒性

大鼠每週兩次經口服投與四氯化碳(20%，以橄欖油稀釋)，每公斤體重投予 2 ml 體積，持續 8 週。將動物分成四組，其中三組以四氯化碳誘導肝纖維化，每天分別經口投予橄欖油(2 ml/kg 或 10 ml/kg 體重)，及一次水。另外，控制組每日投與一次水及每周兩次投與四氯化

碳之溶媒橄欖油。每周秤體重一次，以作為給予實驗物質之依據。四氯化碳與實驗物質投予時間，相隔 5 小時以上。投藥滿八週犧牲時，快速取下肝臟，浸泡於冰冷生理食鹽水中，洗淨擦乾水分後，以肝臟最大葉分成五大部分，第一部份浸泡於 10% 中性福馬林中，供病理切片用，第二部份供測定羥基脯胺酸，第三和第四部份冰存於 -80°C ，以供後續實驗使用，第五部份保存於液態氮環境，供蛋白質以及 RNA 之分析。

四、肝臟羥基脯胺酸含量測定

秤取 0.5 公克新鮮肝臟組織，以 100°C 12 小時烘乾，加 5 ml 6N HCl 100°C 加熱 16 小時，加以水解。待冷卻後，取樣品 1 ml 離心 9100 g，30 分鐘。羥基脯胺酸含量測定，依照 Neuman 和 Logan¹⁸⁴ 的方法。取 0.2 ml 羥基脯胺酸標準品或水解後上清液，以 1N NaOH 中和水解產物，每管分別加入 1 ml CuSO_4 ，1 ml 2.5N NaOH，1 ml H_2O_2 震盪後靜置反應 5 分鐘， 80°C 加熱 5 分鐘，以去除多餘過氧化物。冷卻後加入 4 ml 3N H_2SO_4 、2 ml p-dimethylaminobenzaldehyde 劇烈震盪混合均勻後，於 70°C 水浴 16 分鐘，冷卻後，以分光光度計 540 nm 測定反應後產物吸光值。以羥基脯胺酸為標準品，含量以 $\mu\text{g/g}$ 組織重表示。

五、肝臟三酸甘油酯含量測定

參考 Danno 等人¹⁸⁵ 的方法，經適當修改後進行，取新鮮肝臟組織 0.1 公克，加入 1 ml 95% 酒精，以均質機均質化之後，冰上靜置 30 分鐘，以 5000 g、 4°C 、離心 5 分鐘，取上清液 200 μl ，置於 55°C 乾熱器，以氮氣吹乾，乾燥後，加入 40 μl 95% 酒精溶解，加入 960 μl methanol / triton 100 (1:1)，以市售三酸甘油酯試劑測試。單位表示以 $\mu\text{g/g}$ tissue 表示。

六、肝臟脂質過氧化產物測定 (Lipid peroxidation product)

肝臟脂質過氧化測定，參考 Ohkawa 等人¹⁸⁶ 的方法。秤取肝臟組織 0.5 公克，加入 5 ml 的 1.15% KCl 溶液，以均質機均質化後，取 0.1 ml 的均漿，依序加入 0.2 ml sodium dodecyl sulfate (8.1%)、1.5 ml acetic acid (20%)、1.5 ml 2-thiobarbituric acid (0.8%)，再以一次水調整體積為 4 ml，以 95°C 水浴 1 小時，待冷卻後，加入 4 ml n-butanol/pyridine 混合液 (15:1, v/v)，劇烈震盪混合均勻後，以 4000 g 離心 10 分鐘，取有機層以分光光度計於 532 nm 測量吸光值。肝組織的脂質過氧化以 nmol malondialdehyde (MDA)/mg protein 表示。同時依照 Coomassie Blue 蛋白質定量法，測定肝組織蛋白質含量，以胎牛血清(Bovine derum akbumin)蛋白為標準品¹⁸⁷。

七、病理檢驗

肝臟組織浸泡於福馬林液固定後，脫水後進行石蠟包埋，以切片機切成 4 μm 之肝組織薄片。進行蘇木青及伊紅染色 (Hematoxylin & Eosin stain, H.E. stain) 及天狼星紅染色 (Sirius Red stain, S.R. stain)，以便評估肝臟組織病變和纖維化程度。

H.E. stain 的步驟為，將切片 60°C 烘乾 30 分鐘後，待涼，進行以 xylene 脫蠟、復水步驟(依序為 100%, 95%, 75% 酒精)，H.E. stain 則先染蘇木青 10 秒，置於流動水清洗 10 分鐘，再染伊紅 30 秒，進行脫水步驟(依序為 70%, 95%, 100% 酒精)，之後封片。

S.R. stain 的步驟則是進行烘片、脫蠟、復水，之後以天狼星紅染 1 小時，以 1% 醋酸溶液清洗至背景至淡黃色，之後進行脫水、封片步驟即可。

參考 Honda 的作法¹⁸⁸ 進行 α -SMA 免疫化學染色，藉以評估星狀細胞活化程度。進行烘片、復水步驟之後，以 5% 脫脂奶粉阻斷非特异性反應 1 小時，以磷酸鹽緩衝液清洗 3 次，每次 5 分鐘，之後與一級抗體 α -SMA 在 4°C 反應 16 小時，以磷酸鹽緩衝液清洗 3 次，每次 5 分鐘，和小鼠來源之二級抗體室溫反應一小時，再利用免疫偵測套組及 3-3'-diaminobenzidine 反應呈色，脫水、封片後，以光學顯微鏡觀察即可。

肝纖維化判斷採取 Ruwart 等人¹⁸⁹ 的半定量分析方法，評估分數由 0 至 4 分五個等級，0 代表正常肝組織，沒有任何肝纖維化；1 代表有少量膠原蛋白增生，但沒有形成中隔，(在中央靜脈區或門脈區有放射性纖維增生)；2 代表在中央靜脈或門脈區二者間，形成不完全的中隔(此二中隔間，彼此沒有交會)；3 代表形成完全的中隔，彼此交會相連，並將肝實質分隔成許多節片段，但此中隔很薄；4 代表形成完全中隔，且中隔變厚，為完整之肝硬化病變。

八、mRNA 表現分析

(1) RNA 萃取

取 0.1 公克的肝組織加入 1 ml trizol 試劑，使組織粉碎均質化，於 3700 g、4°C 條件離心 10 分鐘。取上清液加入 0.2 ml 氯仿 (chloroform) 萃取 RNA，劇烈震盪 15 秒後，靜置於冰上 3 分鐘，於 4°C、14700 g 離心 15 分鐘，取上清液加入 0.5 ml 異丙醇 (isopropanol) 使 RNA 沉澱，輕微上下震搖後，靜置於冰上 10 分鐘，於 4°C、14700 g 離心 10 分鐘，倒掉上清液，留下沉澱物，再加入 75% 酒精後，靜置於 -30°C 冰箱 30 分鐘。於 4°C、9100 g 離心 5 分鐘，再倒掉上清液，加

入適量 DEPC 水將 RNA 溶解，於波長 260 nm 測定吸光值，計算 RNA 濃度。

(2) 合成 cDNA

cDNA 的製備主要是採用 M-MuLV Reverse transcriptase (first-strand cDNA synthesis)。使用 M-MuLV RT 套組，取 1 µg mRNA 加入 1 µl oligo (dT)¹⁸ primer，10 µl DEPC 水，再加入 4 µl 5X MMLV RT buffer、2 µl MMLV RT、2 µl 10 mM dNTP，混合後於 37°C 反應 60 分鐘。

(3) 聚合酵素反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)

利用 PCR Master Mix 套組，將特定 cDNA 量化。取去離子水 9.5 µl、PCR Master Mix 12.5 µl、10 mM 引子(primer) 各 1µl、cDNA 1 µl，依照不同引子設定不同的溫度及時間條件。

(4) 確認 DNA 結果

取 5 µl cDNA 產物，加入 1 µl 6X DNA loading dye，以 2% 洋菜膠 (Agarose gel)，事先混合 Ethidium Bromide，50V、50 分鐘為條件跑膠，在暗箱以紫外光照射，並拍攝為數位檔案，以影像分析軟體 (AlphaDigi Doc 1201) 分析，每一樣品的基因表現，均會除以每一樣品的 *GAPDH* 表現值作為校正，比值為目標基因/*GAPDH*，再以控制組表現為基準值，分析組別間的表現差異。

分析基因為 *lipopolysaccharide binding protein (LBP)*, *cluster of differentiation 14 (CD14)*, *Toll-like receptor-4 (TLR4)*, *nuclear factor κB (NF-κB)*, *NADPH oxidase*, *collagen (α1)(I)*, *collagen (α1)(III)* 和 *transforming growth factor-β1 (TGF-β1)*，引子如表一所述。

九、西方墨點法 (Western Blotting)

(1) 蛋白質萃取

取新鮮組織 0.1 公克加入蛋白質萃取試劑，將組織磨碎，置於冰上 30 分鐘，以 10000 g 4°C 離心 10 分鐘，取出上清液即可。

(2) 蛋白質定量

以胎牛血清蛋白為蛋白質標準品，稀釋為 0，5，10，25，50，100 µg/ml，內含 200 µl Bradford 試劑，以波長 595 nm 測定吸光值，求出標準曲線。蛋白質樣品以此檢量線計算濃度，並乘上稀釋倍數，求得原始實際蛋白質濃度。

(3) 變性電泳 (SDS-PAGE)

組成 (2 片膠量)	下層膠 (12.5% Separation gel)	上層膠 (5% Stacking gel)
DDW	2.15 ml	3.65 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.1 ml	-
0.5 M Tris (pH 6.8)	-	625µl
10% SDS	3.125 ml	625µl
40% Acrylamide/Bis (39:1)	75 µl	50µl
10% Ammonium persulfate (APS)	37.5 µl	50µl
TEMED	3.75 µl	5µl

待上下膠體鑄好之後，將樣品與樣品緩衝液混合後總體積為 10 µl，蛋白質量調為 50 µg/10µl，100°C 加熱 5 分鐘後，待冷卻，即可將樣品和 5 µl 分子量樣品(maker) 分別注入樣品槽中。以 150V 跑 1 小時。

(4) 轉漬 (transfer)

將海綿、3M 濾紙在轉漬緩衝液內浸濕，PVDF 轉漬膜以甲醇潤濕 15 秒，再浸泡於轉漬緩衝液，依序放上海棉、濾紙、膠片、PVDF 轉漬膜、濾紙、海綿組成類似三明治結構，小心去除氣泡，放入轉漬夾，以 50V，300mA，1 小時為條件，進行蛋白質轉漬步驟。

將轉漬膜浸泡於 5% 脫脂奶 (溶於 0.1% tween 20 / TBS 緩衝液) 室溫進行阻斷非特異性反應步驟 1 小時，以 0.1% tween 20 / TBS 緩衝液清洗 5 分鐘共 3 次。取封口袋放入 2 ml 2% 脫脂奶(溶於 0.1% tween 20 / TBS 緩衝液)含一級抗體 1:2000 lipopolysaccharide binding protein (LBP)，NADPH oxidase，nuclear factor κ B (NF- κ B)，collagen I 和 transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)。室溫進行 90 分鐘。以 0.1% tween 20 / TBS 緩衝液清洗 5 分鐘共 3 次，取封口袋放入 2 ml 2% 脫脂奶(溶於 0.1% tween 20 / TBS)含二級抗體 anti-goat (LBP，NADPH oxidase，collagen I 和 TGF- β 1 用)，anti-rabbit (NF- κ B 用) 或 anti-mouse (β -actin 用) IgG 1:2000，室溫進行 90 分鐘，以 0.1% tween 20 / TBS 清洗 5 分鐘共 3 次，以 TBS 緩衝液清洗 5 分鐘 1 次，進行壓片。將轉漬膜浸泡於冷光試劑中 1 分鐘，以柯達底片進行感光，感光時間依照檢體而定，之後放進顯影劑顯影約 1-3 分鐘，清水沖洗 1 分鐘，放入定影劑 3 分鐘，清水沖洗即可。底片晾乾後，以影像分析軟體分析即可。每個樣品的蛋白質表現，均除以樣品本身的 β -actin 值，比值為目標蛋白質/ β -actin，再以控制組表現為基準值，分析組別間的蛋白質表現差異。

十、統計方法

數據結果以平均值 (mean) \pm 標準偏差 (standard deviation, SD) 表示, 各組與對照組間的數據以單因子變異數分析 (One-way analysis of variance, One-way ANOVA) 方法分析, 並進行 Dunnett 測試。病理切片評估數據以 Kruskal-Wallis non-parametric test 加上 Mann-Whitney *U*-test 測試。以 *P* 值小於 0.05 表示在統計學上具有顯著差異。

結果

一、肝臟羥基脯胺酸、三酸甘油酯含量、脂質過氧化產物和蛋白質含量

四氯化碳誘導大鼠肝纖維化, 分別在肝臟的羥基脯胺酸 (圖二)、三酸甘油酯 (圖三) 和脂質過氧化產物含量 (圖四) 與控制組相比, 分別增加 87.7%、46.6%、172.0%。蛋白質含量 (圖五) 則是下降 40.5%。給予橄欖油高劑量 (10 ml/kg), 與四氯化碳組相比, 肝臟羥基脯胺酸、三酸甘油酯、脂質過氧化產物含量, 分別降低 24.0%、27.1% 和 31.8%。蛋白質含量則是增加了 55.5%。

二、肝臟組織切片染色及免疫化學染色結果

四氯化碳處理的大鼠肝臟呈現大區域細胞壞死、廣泛的單核細胞浸潤及纖維結締組織增生形成偽小葉。橄欖油高劑量組 (10 ml/kg) 明顯改善肝臟受損的情況 (圖六之左第一列)。藉由天狼星紅染色分析肝臟纖維結締組織擴展和膠原蛋白沉積, 判斷四氯化碳引發的肝纖維化程度 (圖六之中間列), 經量化評估後, 橄欖油高劑量組的纖維化程度明顯比四氯化碳組輕微 (表二)。肝纖維化時, 星狀細胞活化, 使 α -SMA

表現大量增加，可藉由免疫化學染色結果，得知星狀細胞活化情形(圖六之右第一列)，橄欖油高劑量組的 α -SMA 表現明顯低於四氯化碳組。

三、*LBP*、*CD14*、*TLR4*、*NADPH oxidase*、*NF- κ B*、*collagen (α 1)(I)*、*collagen (α 1)(III)* 和 *TGF- β 1* 肝臟組織 mRNA 表現分析

肝臟 *LBP*、*CD14*、*TLR4*、*NADPH oxidase*、*NF- κ B*、*collagen (α 1)(I)*、*collagen (α 1)(III)* 和 *TGF- β 1* 的 RT-PCR 結果如圖七所示。*LBP*、*CD14*、*TLR4* 和 *NF- κ B* 的 PCR 量化結果，顯示四氯化碳組的表現明顯高於控制組(圖八)。*LBP*、*CD14*、*TLR4*、*NADPH oxidase* 和 *NF- κ B* 的 mRNA 表現，四氯化碳組分別高出控制組 150%、40%、150%、40% 和 80%。橄欖油高劑量組(10 ml/kg) 的 mRNA 表現，與四氯化碳組相比分別降低了 70%、21.4%、32%、21.4% 和 33.3%。

collagen (α 1)(I)、*collagen (α 1)(III)* 和 *TGF- β 1* mRNA 表現的量化結果，如圖九所示，控制組均有較低的表現。四氯化碳組的 *collagen (α 1)(I)*、*collagen (α 1)(III)* 和 *TGF- β 1* mRNA 表現，分別比控制組高出 50%、40% 和 60%，橄欖油高劑量組的 mRNA 表現，相較於四氯化碳組分別降低約 27%、40% 和 25%。

四、肝臟組織的蛋白質表現

圖十為肝臟 *LBP*、*NADPH oxidase*、*NF- κ B*、*collagen I* 和 *TGF- β 1* 的蛋白質表現結果。量化結果如圖十一所示，四氯化碳組高出控制組的表現，依序分別是 200%、90%、140%、50% 和 50%。*NADPH oxidase* 和 *NF- κ B* 的蛋白質表現，橄欖油低、高劑量組 (2、10 ml/kg) 與四氯化碳組相比，分別降低 37%、53% 以及 50%、58%。*LBP*、

collagen I 和 TGF- β 1 的蛋白質表現，橄欖油高劑量組與四氯化碳組相比，分別降低了 60%、27% 和 20%。

討論

本實驗研究結果顯示，橄欖油能抑制四氯化碳誘導的大鼠肝纖維化，橄欖油抑制庫氏細胞的活化及抗氧化的作用，在抗纖維化過程中扮演重要角色。

庫氏細胞的活化，受到兩種機制的調控，第一個機制是四氯化碳在肝臟代謝後產生的 $\text{CCl}_3 \cdot$ 自由基，此自由基會與氧分子結合，產生更具破壞性的 $\text{CCl}_3\text{OO} \cdot$ 自由基，此外由受損細胞釋放出的大量活性氧分子，會使肝細胞受損更加嚴重，受損後的細胞會釋出發炎因子，以活化庫氏細胞¹⁹⁰。

第二個機制是經由 LPS 活化庫氏細胞路徑，由腸道來的 LPS 會促使肝臟合成 LBP⁵⁶，小量 LPS 需與 LBP 結合，大量 LPS 直接透過位於細胞膜上的 CD14/TLR4 複合蛋白，將訊息傳遞至細胞核⁵²，誘發 NF- κ B 活化，促使 TNF- α 和前列腺素 PGE2 等釋放，增加發炎反應^{48, 57}。

脂體(lipid body)為一富含脂質的胞器，功能包括調節脂質代謝、控制發炎調節物質的合成及分泌⁴⁸。LPS 於巨噬細胞誘發脂體發炎反應，主要是透過 TLR4 而來¹⁹¹，所以當 CD14/TLR4 表現受抑制時，脂體形成也會減少，減輕了發炎反應⁵⁹。

庫氏細胞脂體內的花生四烯酸，被認為是一重要細胞內的發炎訊息傳遞者⁴⁹，及前列腺素前驅物⁵⁰。飲食中油脂會快速的改變和調節脂體的組成，因此降低身體的發炎反應⁵⁰。橄欖油會降低嗜中性球的聚

集，以及減少脂體的產生，降低前列腺素 E2、白三烯素 B4、TNF- α 的產生，減少整體的發炎現象¹¹。

LPS 刺激庫氏細胞的同時，NADPH oxidase 會釋放出活性氧分子，如果庫氏細胞過度活化，會因此增加氧化壓力傷害。從我們的結果中，四氯化碳組會增加肝臟 LBP 的蛋白質和 mRNA 表現。而給橄欖油組別則會減緩此項表現。肝臟 *CD14*、*TLR4*、*NF- κ B* 和 *NADPH oxidase* 基因表現亦會因四氯化碳而增加，橄欖油的投與會降低這些基因的表現。*NF- κ B* 和 *NADPH oxidase* 的蛋白質分析，也印證了相同的結果。此結果顯示橄欖油能抑制活化的庫氏細胞，進而降低氧化壓力傷害。

脂質過氧化一直被認為與肝纖維化有密切關聯⁸²。本研究結果顯示橄欖油明顯抑制因四氯化碳誘發的脂質過氧化程度，其抑制脂質過氧化的可能原因如下：橄欖油不易形成發炎性脂體，因此降低了發炎反應的進行，氧化壓力傷害也隨之降低，因此降低脂質過氧化¹¹。此外，橄欖油所含有的多酚類化合物，具有抗氧化能力，能清除因四氯化碳誘發的活性氧分子，抑制脂質過氧化程度。

肝纖維化是透過星狀細胞活化後，大量分泌細胞外間質累積聚集的結果，主要是膠原蛋白第一型及第三型¹⁹²，膠原蛋白中有特殊一胺基酸成分為羥基脯胺酸，可以用來推知膠原蛋白含量及肝臟纖維化程度²³。在大鼠的四氯化碳誘發肝纖維化模式中，會發現肝中羥基脯胺酸含量增加和膠原蛋白第一型、第三型的基因大量表現。給予橄欖油後，羥基脯胺酸含量和膠原蛋白第一型、第三型的基因表現都大幅降低。膠原蛋白第一型的蛋白質分析結果，也得到相似的結果。從組織

學和天狼星紅染色的病理學分析上，橄欖油的確降低了四氯化碳引發的肝纖維化現象。

TGF- β 1 為促纖維化細胞激素，會直接活化庫氏細胞及星狀細胞，促使細胞外間質蛋白增生^{193, 194}，肝纖維化病人及肝纖維化模式中，常見 TGF- β 1 基因表現增加¹⁹⁵⁻¹⁹⁷。橄欖油會降低因四氯化碳所增加的肝臟 TGF- β 1 的基因表現。 α -SMA 的免疫化學染色結果，也證實了橄欖油組的星狀細胞活化情況較四氯化碳組輕微。從病理學上結果的判斷，支持了橄欖油會減緩四氯化碳肝纖維化嚴重程度的結果。

四氯化碳因破壞肝臟的脂質代謝功能，因而造成脂肪空泡，形成脂肪肝⁹⁴，四氯化碳組的肝臟三酸甘油酯，則有明顯增加，而橄欖油高劑量組則有顯著降低肝臟三酸甘油酯含量的情形。當肝臟受損，肝臟中蛋白質合成量亦會降低²³，本研究結果亦指出四氯化碳組的肝臟蛋白質量與控制組相比有明顯降低，高劑量橄欖油組的肝臟蛋白質含量則明顯比四氯化碳組增加。此項結果顯示橄欖油對脂肪肝及肝臟功能受損方面，有正面的作用。

結論，四氯化碳誘導的化學性肝損傷，合併投與橄欖油是有助於緩解肝纖維化的病變，可能機制有二：一是橄欖油多酚的抗氧化能力減輕了氧化傷害；二是橄欖油抑制庫氏細胞內脂體的產生和發炎路徑的活化機制。

Table 1. Primer sequences for PCR amplification. (olive oil + CCl₄)

mRNA	Primer sequence	Length (bp)
<i>LBP</i>	Sense 5' ACA CAC ACA CAC ACA CAC ACA C'3	317
	Antisense 5' TGA ACA ACA GTC CGA TGA GCG 3	
<i>CD14</i>	Sense 5' ATC CCA GTC GGA GGC GTA TAA C3'	319
	Antisense 5' AGC ACC GAT GGA CAA CTT TCA G3'	
<i>TLR4</i>	Sense 5' TGC TGC CAA CAT CAT CCA3'	304
	Antisense 5' TTT TCC ATC CAA CAG GGC TTT T3'	
<i>NF-κB</i>	Sense 5' TGC AGC GAT TCC GAA ACC AG3'	286
	Antisense 5' AAA TGG CAG TCC AGA GCA GTG3'	
<i>NADPH oxidase</i>	Sense 5' AAG TCA TCC CCG CAA CTG TTC 3'	236
	Antisense 5' CCC GCT TCC TCA TCT GCA ATT C 3'	
<i>Collagen (α1)(I)</i>	Sense 5' CGA CTA AGT TGG AGG GAA CGG TC3'	319
	Antisense 5' TGG CAT GTT GCT AGG CAC GAC3'	
<i>Collagen (α1) (III)</i>	Sense 5' CGA GGT GAC AGA GGT GAA AGA 3'	336
	Antisense 5' AAC CCA GTA TTC TCC GCT CTT 3'	
<i>TGF-β1</i>	Sense 5' TAT AGC AAC AAT TCC TGG CG3'	162
	Antisense 5' TGC TGT CAC AGG AGC AGT G 3'	
<i>GAPDH</i>	Sense 5' TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA 3'	76
	Antisense 5' CCT GCT TCA CCA CCT TCT TGA 3'	

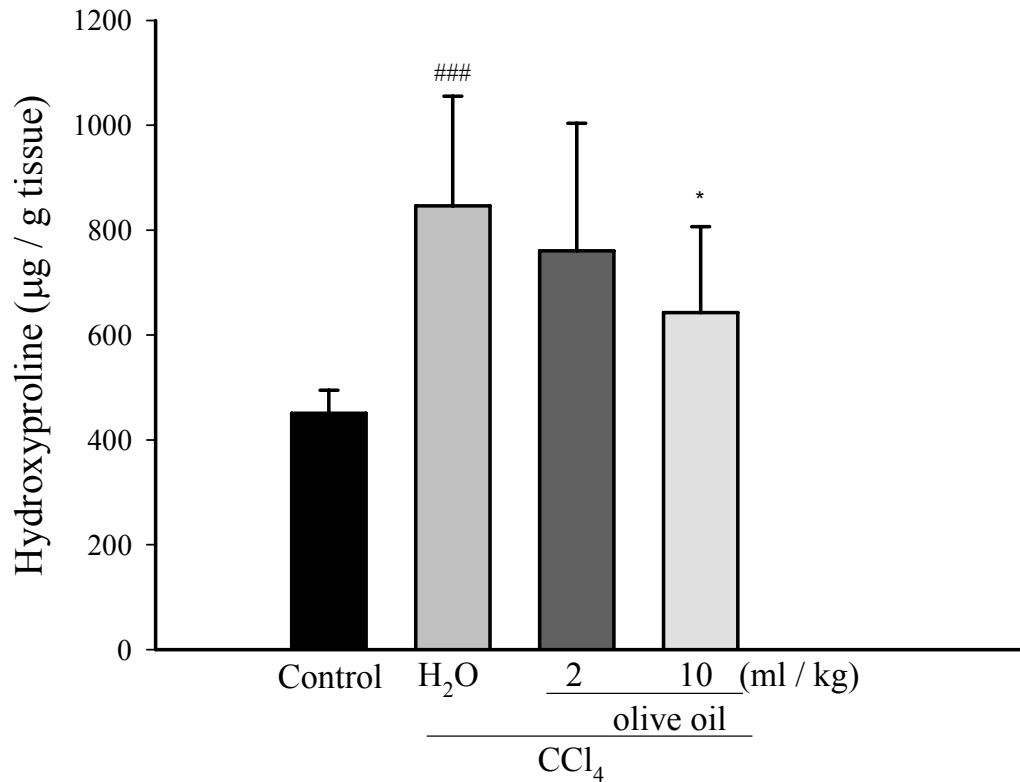


Fig 2. Effect of olive oil on hepatic hydroxyproline in CCl₄-treated rats

Liver fibrosis was induced by oral administration of 2 ml/kg CCl₄ (20%) twice a week for 8 weeks. Animals received CCl₄ with distilled water (10 ml/kg, p.o., daily) or corn oil (2 and 10 ml/kg, p.o., daily) throughout the whole experimental period. After experimental, the rat liver was collected for hydroxyproline measure. Values are mean ± S.D. (n=8). ###*P* < 0.001 compared with control group. **P* < 0.05 compared with CCl₄ + H₂O group.

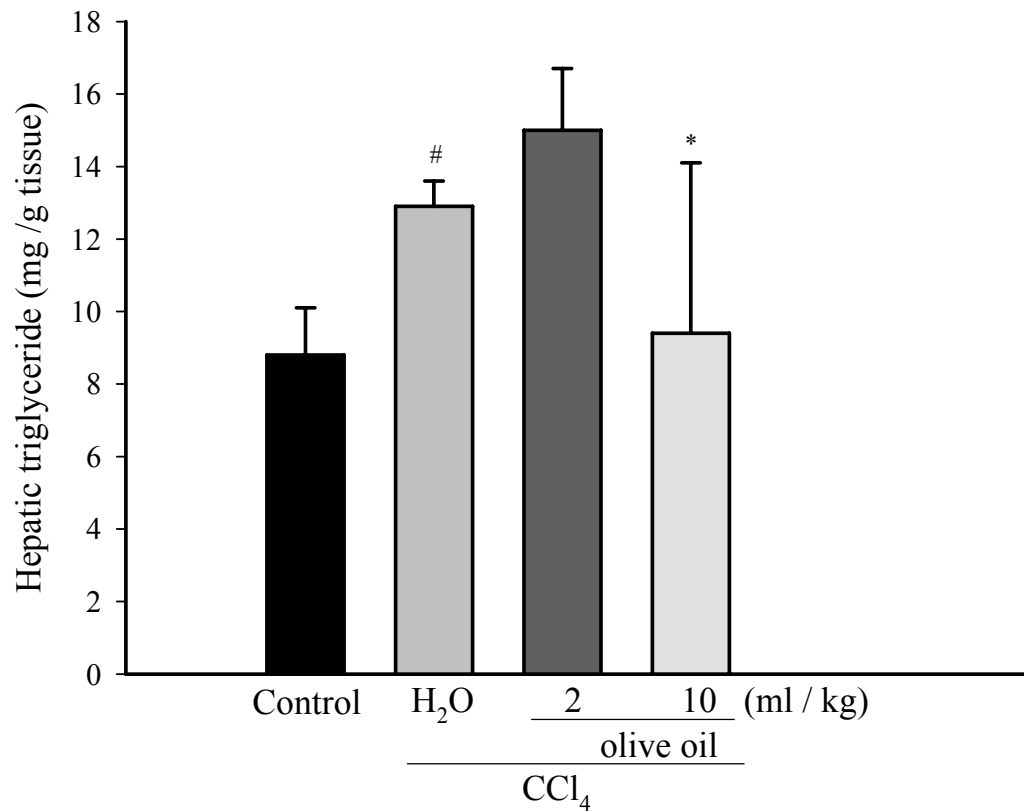


Fig 3. Effect of olive oil on hepatic triglyceride in CCl₄-induced chronic hepatotoxicity.

Liver fibrosis was induced by oral administration of 2 ml/kg CCl₄ (20%) twice a week for 8 weeks. Animals received CCl₄ with distilled water (10 ml/kg, p.o., daily) or corn oil (2 and 10 ml/kg, p.o., daily) throughout the whole experimental period. After experimental, the rat liver was collected for hepatic triglyceride measure. Values are mean ± S.D. (n=8). [#] *P* < 0.05 compared with control group. ^{*} *P* < 0.05 compared with CCl₄ + H₂O group.

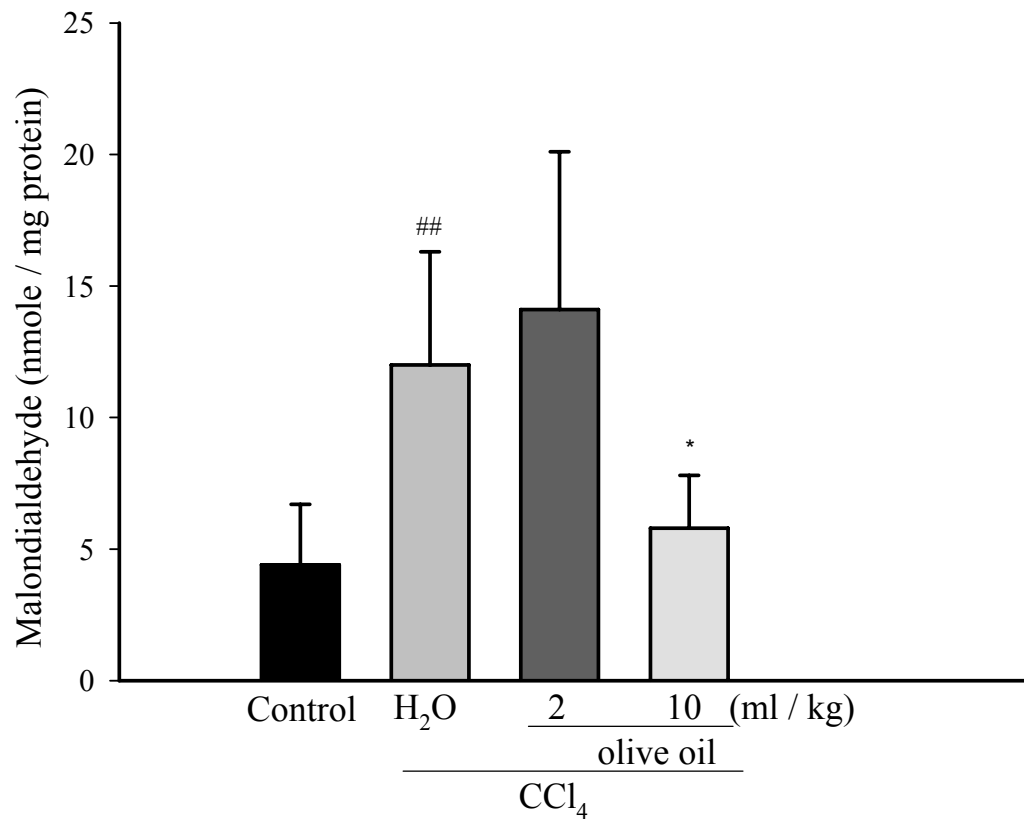


Fig 4. Effect of olive oil on hepatic malondialdehyde in CCl₄-treated rats.

Liver fibrosis was induced by oral administration of 2 ml/kg CCl₄ (20%) twice a week for 8 weeks. Animals received CCl₄ with distilled water (10 ml/kg, p.o., daily) or corn oil (2 and 10 ml/kg, p.o., daily) throughout the whole experimental period. After experimental, the rat liver was collected for hepatic malondialdehyde measure. Values are mean \pm S.D. (n=8). ## $P < 0.01$ compared with control group. * $P < 0.05$ compared with CCl₄ + H₂O group.

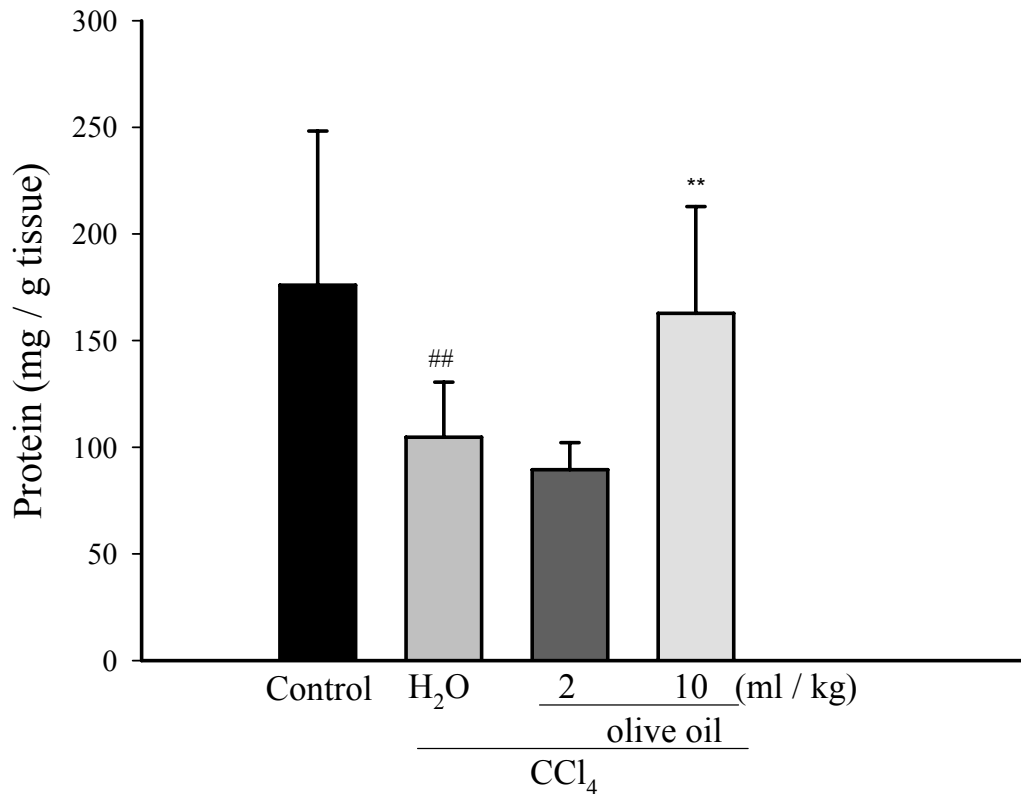


Fig 5. Effect of olive oil on liver protein in CCl₄-induced chronic hepatotoxicity.

Liver fibrosis was induced by oral administration of 2 ml/kg CCl₄ (20%) twice a week for 8 weeks. Animals received CCl₄ with distilled water (10 ml/kg, p.o., daily) or corn oil (2 and 10 ml/kg, p.o., daily) throughout the whole experimental period. After experimental, the rat liver was collected for hepatic protein measure. Values are mean ± S.D. (n=8). ## *P* < 0.01 compared with control group. ***P* < 0.01 compared with CCl₄ + H₂O group.

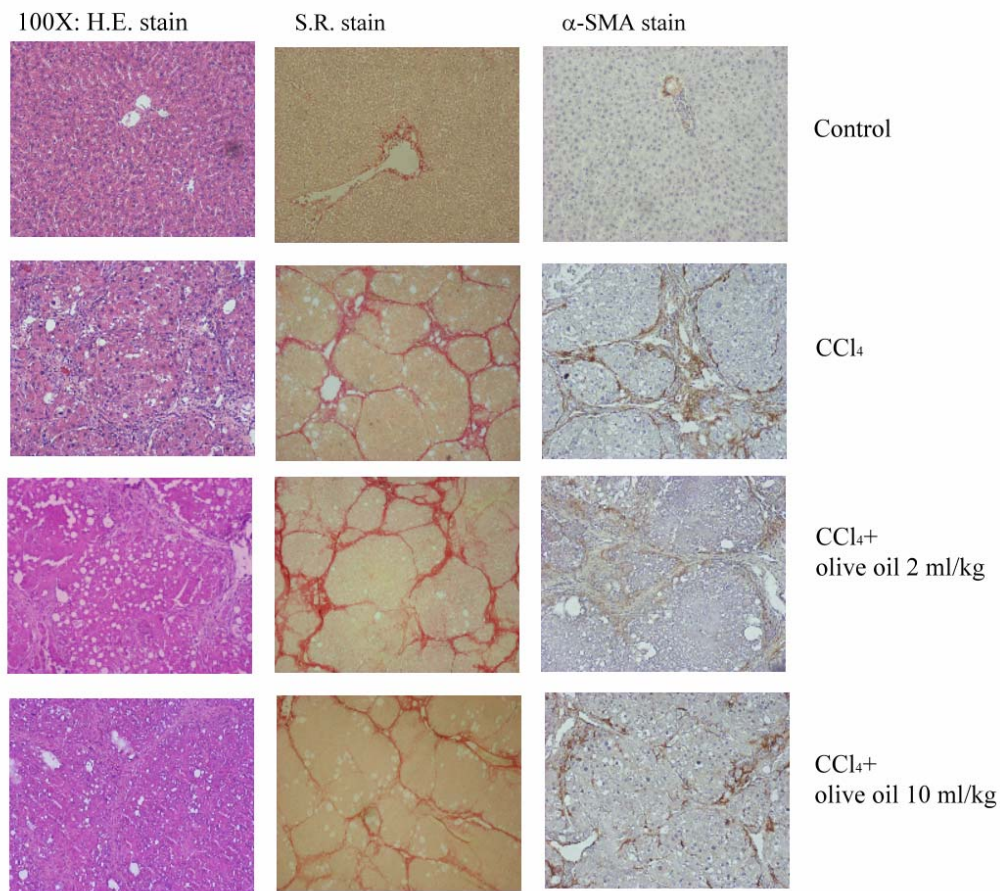


Fig 6. Treatment with olive oil improved the histology and immunochemistry of CCl₄-treated rat liver. H.E. staining; Sirius red staining; and α -SMA staining.

The 1st left hand column were H.E. staining; the 2nd and 3rd left hand columns were Sirius red staining and α -SMA staining respectively. The first cell was a control group, the second cell was CCl₄ + H₂O group, the third cell was CCl₄ + olive oil (2 ml/kg) group and the fourth cell were CCl₄ + olive oil (10 ml/kg) group.

Table 2. Effect of olive oil on CCl₄- induced fibrosis in rats

Treatments	Dose (ml/kg)	Score of hepatic fibrosis					Average
		0	1	2	3	4	
Control	--	10	0	0	0	0	0
CCl ₄ + H ₂ O	--	0	0	1	7	2	3.4
CCl ₄ + olive oil	2	0	0	1	8	1	3.1
	10	0	0	2	7	1	2.7**

** $p < 0.01$ compared with CCl₄ + H₂O group.



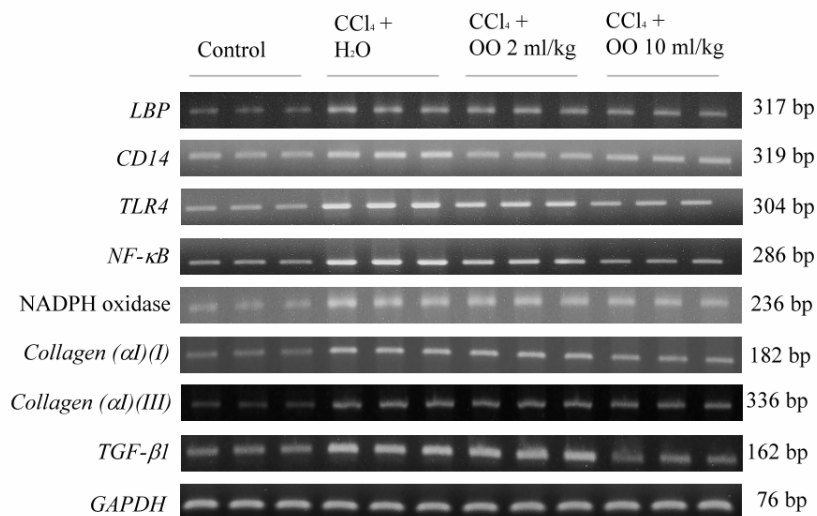


Fig 7. Effects of olive oil on hepatic mRNA expression of *LBP*, *CD14*, *TLR4*, *NF-κB*, *NADPH oxidase*, *collagen (α1)(I)*, *collagen (α1)(III)* and *TGF-β1* in CCl₄-treated rats. OO: olive oil

Liver fibrosis was induced by oral administration of 2 ml/kg CCl₄ (20%) twice a week for 8 weeks. Animals received CCl₄ with distilled water (10 ml/kg, p.o., daily) or corn oil (2 and 10 ml/kg, p.o., daily) throughout the whole experimental period. After experimental, the rat liver was collected for hepatic mRNA analysis.

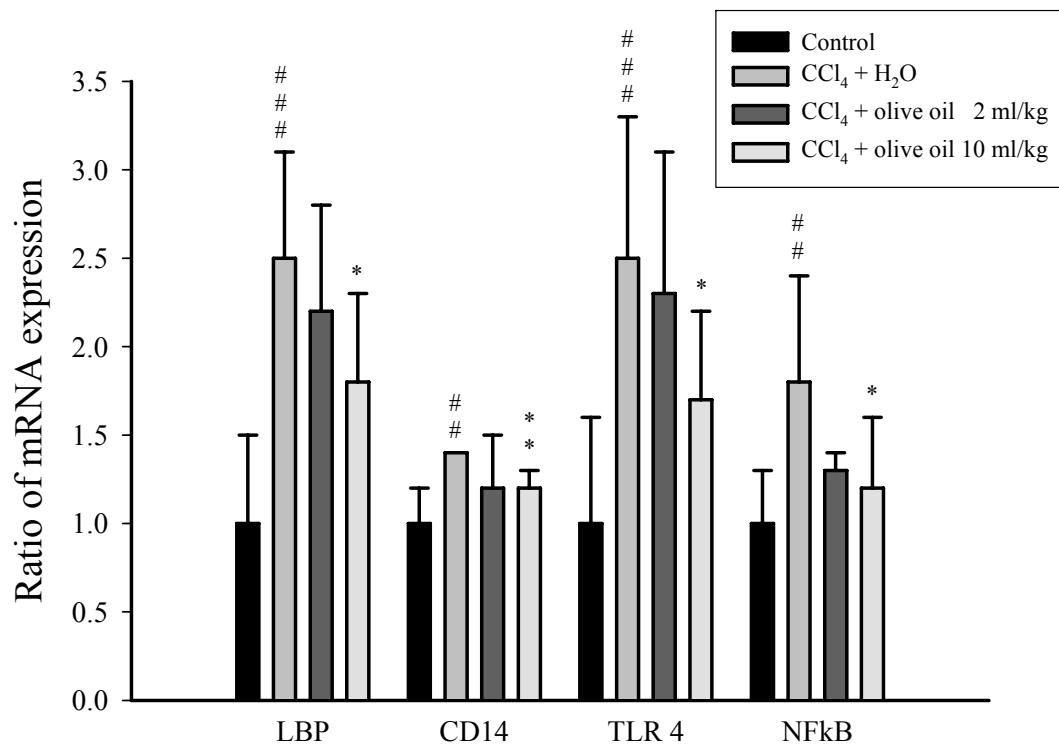


Fig 8. Effect of olive oil on the hepatic mRNA expressions of *LBP*, *CD14*, *TLR4*, *NF-κB* in *CCl₄*-treated rats.

Liver fibrosis was induced by oral administration of 2 ml/kg *CCl₄* (20%) twice a week for 8 weeks. Animals received *CCl₄* with distilled water (10 ml/kg, p.o., daily) or corn oil (2 and 10 ml/kg, p.o., daily) throughout the whole experimental period. After experimental, the rat liver was collected for hepatic mRNA analysis. Values are mean ± S.D. (n=8). ^{###} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$ compared with control group. ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ compared with *CCl₄* + *H₂O* group.

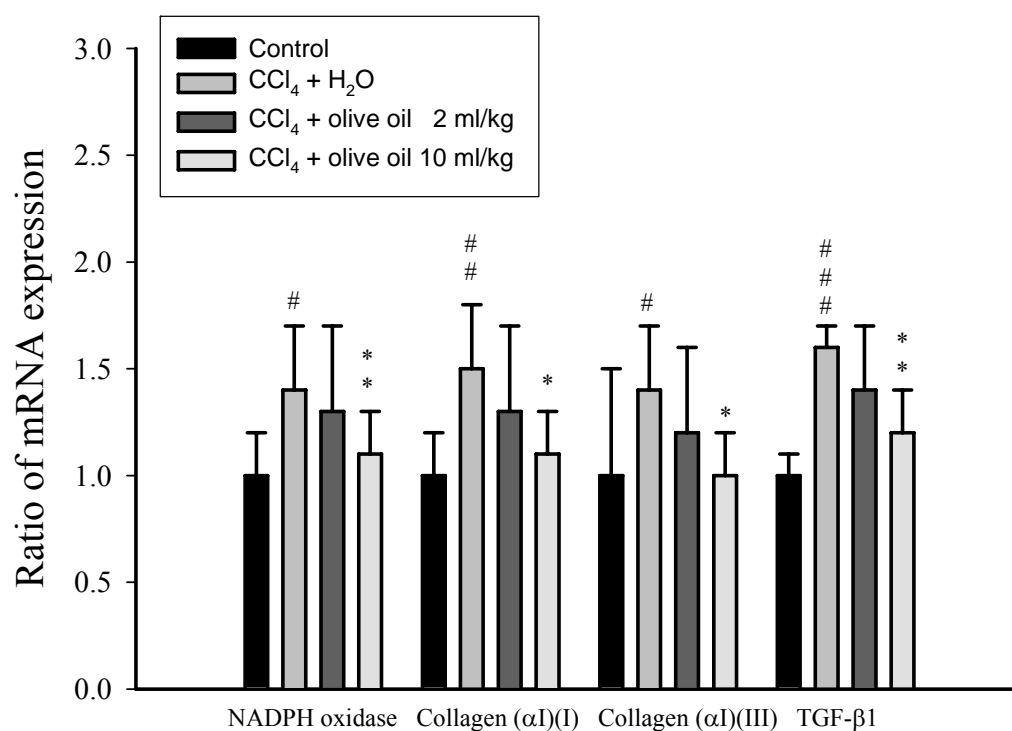


Fig 9. Effect of olive oil on the hepatic mRNA expressions of *NADPH oxidase*, *collagen (α1)(I)*, *collagen (α1)(III)* and *TGF-β1* in CCl₄-treated rats.

Liver fibrosis was induced by oral administration of 2 ml/kg CCl₄ (20%) twice a week for 8 weeks. Animals received CCl₄ with distilled water (10 ml/kg, p.o., daily) or corn oil (2 and 10 ml/kg, p.o., daily) throughout the whole experimental period. Values are mean ± S.D. (n=8). [#]*P* < 0.05, ^{##} *P* < 0.01, ^{###} *P* < 0.001 compared with control group. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 compared with CCl₄ + H₂O group.

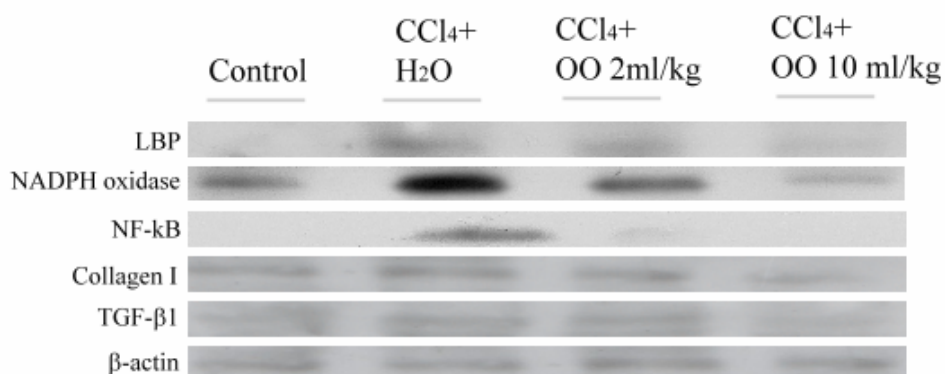


Fig 10. Effect of olive oil on the protein expressions of LBP, NADPH oxidase, NF-κB, collagen I and TGF-β1 in CCl₄-treated rats.

OO: olive oil

Liver fibrosis was induced by oral administration of 2 ml/kg CCl₄ (20%) twice a week for 8 weeks. Animals received CCl₄ with distilled water (10 ml/kg, p.o., daily) or corn oil (2 and 10 ml/kg, p.o., daily) throughout the whole experimental period. After experimental, the rat liver was collected for hepatic protein analysis.

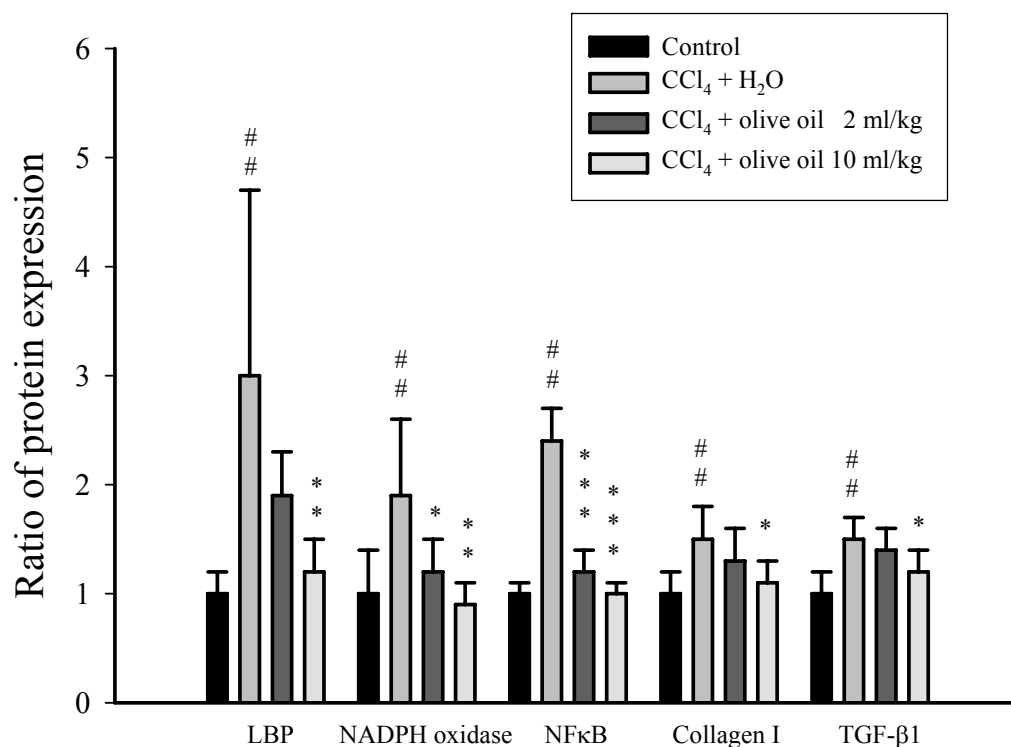


Fig 11. Effect of olive oil on the hepatic protein expressions of LBP, NADPH oxidase, NF-κB, collagen I and TGF-β1 in CCl₄-treated rats. Liver fibrosis was induced by oral administration of 2 ml/kg CCl₄ (20%) twice a week for 8 weeks. Animals received CCl₄ with distilled water (10 ml/kg, p.o., daily) or corn oil (2 and 10 ml/kg, p.o., daily) throughout the whole experimental period. After experimental, the rat liver was collected for hepatic protein analysis. Values are mean ± S.D. (n=8). ^{##} $P < 0.01$ compared with control group. ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, $P < 0.001$ compared with CCl₄ + H₂O group.

第三章 棕櫚油對四氯化碳誘導肝纖維化模式之影響

前言

棕櫚油 (Palm oil) 來自油椰子或名油棕 (*Elaeis guineensis*) 之果實，屬於棕櫚科 (Arecaceae)，主要成分為 60% 棕櫚油酸。雖然棕櫚油屬於飽合脂肪酸，但因含有不飽和生育醇，所以與其他動物性飽和油脂相比，較不影響動脈粥狀硬化、血栓形成、抑制血小板聚集、降血壓¹⁴⁸。在酒精性肝損傷的實驗，棕櫚油生成的脂質過氧化產物比玉米油、魚油較低¹⁴⁵。在酒精性肝損傷模式中，比較棕櫚油與中鏈三酸甘油酯、玉米油和魚油的影響，棕櫚油造成的脂肪肝較嚴重，但是沒有如玉米油和魚油有細胞發炎或損傷的現象¹¹³。

由以上文獻得知，棕櫚油對酒精性肝損傷之影響比其他油脂輕微，但棕櫚油對四氯化碳肝損傷之影響，並不清楚。藉由本研究釐清飽和性油脂棕櫚油對四氯化碳誘導大鼠肝損傷模式的影響。

材料與方法

一、材料

1. Furka, Switzerland：棕櫚油
2. Roche, Germany：Alanine aminotransferase (ALT)，triglycerin，albumin
3. Sigma-Aldrich, USA: 2，4－Dinitrophenylhydrazine (DNPH)，HCl，guanidine HCl，乙酸乙酯

二、動物

使用 Wistar 雄性大鼠，體重 250-300 公克，購自國家實驗動物繁殖及研究中心。飼養環境維持 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ，相對溼度 $55 \pm 5\%$ ，光照為

12 小時亮 12 小時暗(早上七點亮，下午七點暗)的環境，自由飲水及攝食。

三、四氯化碳誘導之慢性肝毒性

大鼠誘導四氯化碳模式如第二章所述，每天分別以口服投予棕櫚油 2 ml/kg 或 10 ml/kg 體重，持續八週，四氯化碳投與滿一、四週將老鼠麻醉後，由尾動脈採血，滿八週犧牲時，血液及肝臟處理的方式，如第二章所述。

四、血液生化值檢驗

四氯化碳投與滿一、四、八週收集之血液，以常溫 2000 g 離心 10 分鐘(Jouan BR4i, Franch)，血漿以自動生化儀(Cobas Mira Plus, Rotkreuz, Switzerland)測定，項目為 Alanine aminotransferase (ALT)。四氯化碳投與滿八週加測三酸甘油酯、albumin。

五、肝臟羥基脯胺酸含量、蛋白質含量測定

實驗步驟如第二章所述。

六、肝臟脂質過氧化產物

實驗步驟如第二章所述。

七、肝臟 protein carbonyl 含量測定

參考 Reznick 和 Packer¹⁹⁸ 以及 Levine¹⁹⁹ 的方法經適當修改後進行，取新鮮肝臟組織 0.1 公克，加入 1 ml 磷酸鹽緩衝液，均勻磨碎之後，以 6000 g、4°C、離心 10 分鐘，取上清液 200 μ l，加入 800 μ l 10 mM DNPH/2.5 M HCl，在黑暗中靜置 1 小時，每隔 15 分鐘劇烈震盪一次，加入 20% trichloroacetaldehyde 1 ml，冰上靜置 10 分鐘，之後以 5000 g 離心 5 分鐘，倒掉上清液，以 95%酒精及乙酸乙酯 (1:1) 混合液沖洗 3 次，測之前加 6 M Guanidine HCl 800 μ l，以 335-370 nm 每

隔 2 nm 測一次吸光值，選取最高吸光數值。同時依照 Coomassie Blue 蛋白質定量法，測定肝組織蛋白質含量，以牛血漿蛋白為標準品¹⁸⁷。單位以 nmol / mg protein 表示。

八、統計方法

數據結果以平均值 (mean) ± 標準偏差 (standard deviation, SD) 表示，統計方式如前所述。以 *P* 值小於 0.05 表示在統計學上具有顯著差異。

結果

一、血液中 ALT 酵素、三酸甘油酯、白蛋白含量

四氯化碳投與後滿第一、四、八週的血漿 ALT 活性(表三)，與控制組相比，有明顯增加。投與棕櫚油組高劑量組(10 ml/kg)，第一、四週與四氯化碳組相比，血漿 ALT 活性明顯增加，但到了第八週則無明顯影響。

第八週血漿中三酸甘油酯、白蛋白含量，如表四所示。四氯化碳組與控制組的三酸甘油酯無明顯差異，棕櫚油高劑量組的血漿三酸甘油酯含量，高於四氯化碳組約 2 倍。四氯化碳組的血漿白蛋白明顯低於控制組，棕櫚油組與四氯化碳組相比無明顯差異。

二、肝臟羥基脯胺酸含量、蛋白質含量

肝臟中羥基脯胺酸及蛋白質含量，如表六所示。四氯化碳誘導大鼠肝纖維化，羥基脯胺酸含量與控制組相比，上升約一倍，有明顯差異，合併投與棕櫚油組，羥基脯胺酸的含量與四氯化碳組相比並無明顯影響。

肝臟中蛋白質含量，四氯化碳組與控制組相比，明顯降低約 24.1%。棕櫚油組與四氯化碳組相較則無明顯影響。

三、肝臟脂質過氧化產物含量、肝臟 protein carbonyl 含量測定

如表五所示，四氯化碳組的脂質過氧化含量、肝臟 protein carbonyl 含量與控制組相比，增加 173.8%、41.0%。棕櫚油組低劑量(2 ml/kg)及高劑量組(10 ml/kg)與四氯化碳組相比，均無明顯差異。

討論

本實驗研究結果顯示，棕櫚油對四氯化碳誘導的大鼠肝纖維化並無明顯影響。

肝臟受損時，肝臟中的 ALT 才會釋放出至血液中，因此血漿中 ALT 生化值，代表肝臟損傷程度。四氯化碳投與滿一、四、八週血漿結果看來，四氯化碳組與控制組相比，有明顯增高，棕櫚油組在第一、第四週時，與四氯化碳組相比有明顯增加，但是第八週時，則無明顯影響。原因可能是初期造成四氯化碳損傷之時，投與飽和性油脂棕櫚油，受損肝臟無法負荷，因此發炎情況較嚴重。到了四氯化碳受損末期，可能是因為大鼠對棕櫚油產生了適應性，所以棕櫚油對肝損傷的影響變弱。

肝臟受損時，白蛋白合成量會降低，因此藉由血液中白蛋白含量，可以得知肝臟機能受損之程度。血漿中白蛋白值，四氯化碳組與控制組相比，有明顯的降低。棕櫚油對因四氯化碳而降低的血中白蛋白濃度無明顯影響，顯示棕櫚油對於四氯化碳造成之肝臟白蛋白合成機能下降，沒有影響。當肝臟受損時，肝臟中蛋白質合成量亦會降低

²³，四氯化碳組與控制組相比明顯降低。但是棕櫚油組對四氯化碳降低的蛋白質含量並無影響，顯示棕櫚油對於蛋白質合成沒有影響。

脂質過氧化與肝纖維化有密切關聯⁸²。棕櫚油含有具抗氧化能力的β-胡蘿蔔素，高劑量組有降低脂質過氧化程度的趨勢，減緩氧化壓力的傷害，但無明顯差異。活性氧分子會形成protein carbonyl，四氯化碳組之protein carbonyl含量與控制組相比，有明顯增高，但是棕櫚油對因四氯化碳而升高的protein carbonyl並無影響。此兩項結果顯示，棕櫚油不能降低四氯化碳誘發之自由基傷害。

羥基脯氨酸為膠原蛋白中一特有的胺基酸成分，可以用來推知膠原蛋白含量及肝臟纖維化程度²³。在肝纖維化模式中，肝臟內羥基脯氨酸含量會大量表現。給予棕櫚油後，羥基脯氨酸含量並無影響，顯示棕櫚油對於四氯化碳引發的肝纖維化沒有改善效用。

四氯化碳組血漿中的三酸甘油酯與控制組相比，無明顯影響，而棕櫚油高劑量組則是明顯增加，可能是因為棕櫚油是飽和油脂，會增加血中三酸甘油酯的量。

由以上數據得知，飽和性植物油脂棕櫚油對於四氯化碳誘導之大鼠肝損傷模式，並無明顯影響。

Table 3. Effect of palm oil on the activities of plasma ALT in CCl₄-treated rats.

Drugs	Treatment dose (ml/kg)	ALT (U / L)		
		Week 1	Week 4	Week8
Control	--	41.1 ± 1.3	40.5 ± 2.6	42.5 ± 2.4
CCl ₄ + H ₂ O	--	171.2 ± 5.8 ^{###}	1040.0 ± 103.3 [#]	1986.8 ± 423.3 ^{###}
CCl ₄ + palm oil	2	189.3 ± 23.2	1134.0 ± 129.3	1560.4 ± 306.3
CCl ₄ + palm oil	10	314.9 ± 41.9 ^{**}	2341.2 ± 475.8 ^{**}	1416.8 ± 219.5

All values were mean ± S.D. (n = 10). ^{###}*P* < 0.001 as compared with control group. ^{**}*P* < 0.01 as compared with CCl₄ + H₂O group.

Table 4. Effect of palm oil on plasma triglycerin (TG) and albumin in CCl₄-treated rats.

Drugs	Treatment dose (ml/kg)	TG in plasma (mg / dL)	Albumin (g / dL)
		Control	--
CCl ₄ + H ₂ O	--	43.6 ± 4.7	2.7 ± 0.1 ^{###}
CCl ₄ + palm oil	2	75.3 ± 11.6	2.8 ± 0.1
CCl ₄ + palm oil	10	82.8 ± 12.7 [*]	2.5 ± 0.1

All values were mean ± S.D. (n = 10). ^{###}*P* < 0.001 as compared with control group.

^{*}*P* < 0.05 as compared with CCl₄ + H₂O group.

Table 5. Effect of palm oil on hepatic MDA and protein carbonyl in CCl₄-treated rats.

Drugs	Treatment dose (ml/kg)	LPO (MDA nmol / mg protein)	Protein carbonyl content (nmol / mg protein)
Control	--	4.2 ± 1.3	7.8 ± 1.1
CCl ₄ + H ₂ O	--	11.5 ± 2.0 [#]	11.0 ± 0.6 [#]
CCl ₄ + palm oil	2	17.9 ± 1.1	9.1 ± 0.7
CCl ₄ + palm oil	10	7.2 ± 2.2	11.9 ± 1.0

All values were mean ± S.D. (n = 10). [#]*P* < 0.05 as compared with control group.

Table 6. Effect of palm oil on hepatic hydroxyproline, triglyceride (TG) and protein in CCl₄-treated rats.

Drugs	Treatment dose (ml/kg)	Hydroxyproline (µg / g)	TG in Liver (mg / g)	Protein (ug/ml/g tissue)
Control	--	430.1 ± 55.8	9.0 ± 0.8	125.4 ± 4.4
CCl ₄ + H ₂ O	--	858.2 ± 66.8 ^{####}	16.6 ± 1.3 ^{####}	95.2 ± 3.3 ^{####}
CCl ₄ + palm oil	2	918.4 ± 36.9	22.2 ± 0.5 ^{***}	81.4 ± 6.6
CCl ₄ + palm oil	10	927.1 ± 46.4	19.9 ± 0.9 [*]	86.9 ± 4.4

All values were mean ± S.D. (n = 10). ^{####}*P* < 0.001 as compared with control group. ^{*}*P* < 0.05, ^{***}*P* < 0.001 as compared with CCl₄ + H₂O group.

第四章 玉米油對四氯化碳誘導肝纖維化之影響

前言

玉米油(corn oil)來自禾本科 (Gramineae)玉米種子胚芽 (*Zea mays*)，主要含有亞麻油酸 50%¹⁴⁰。

許多文獻指出在肝硬化的病人身上，常會出現多元長鏈不飽和脂肪酸缺乏之現象^{13, 102, 114}，此缺乏可能導致肝硬化患者產生肝性腦昏迷¹⁰⁵。提供富含魚油或是花生四烯酸加上維他命 E，有助於降低肝性腦昏迷的比例^{14, 106}。有研究認為多元長鏈不飽和脂肪酸以食物形式¹⁰⁶或以軟膠囊形式¹⁵補充肝硬化病人能量，對肝硬化是較好的選擇。

但是，對肝硬化病人補充多元不飽和脂肪酸，卻一直有爭議存在¹¹⁵。因為長鏈多元不飽和脂肪酸較容易過氧化的特性，可能會對肝硬化病人，產生不良的影響¹⁰²。動物實驗也有類似的結果。玉米油在酒精性損傷模式下，會增加脂質過氧化產物，促使肝臟細胞凋亡¹⁴³，增加 transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)表現的結果¹⁴⁴。在酒精性肝損傷模式¹⁴⁵，或四氯化碳模式下¹⁴⁶，玉米油的肝損傷程度大於其他油脂。玉米油也會增加庫氏細胞的分化，和 nuclear factor κ B (NF- κ B)的活性¹³⁵。

也因為如此兩極化的論述，需要更深入了解多元長鏈不飽和脂肪酸與肝纖維化之關聯，所以選用玉米油為多元長鏈不飽和脂肪酸的代表性油脂，探討玉米油對於大鼠的四氯化碳誘發肝纖維化模式之影響。由於玉米油和四氯化碳均會造成脂肪肝^{94, 200}，因此也同時探討玉米油是否會加重四氯化碳引起的脂肪肝。

材料與方法

一、材料

1. Sigma-Aldrich, USA：玉米油
2. Stressgen, USA：8-iso-PGF_{2α} 免疫化學套組
3. Cayman, USA：15-keto-dihydro-PGF_{2α} (15-keto- PGF_{2α})免疫化學套組

二、動物

使用 Wistar 雄性大鼠，體重 250-300 公克，購自國家實驗動物繁殖及研究中心。飼養環境維持 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ，相對溼度 $55 \pm 5\%$ ，光照為 12 小時亮 12 小時暗(早上七點亮，下午七點暗)的環境，自由飲水及攝食。

三、四氯化碳誘導之慢性肝毒性

大鼠誘導四氯化碳模式如第二章所述，每天分別以口服投予玉米油 2 ml/kg 或 10 ml/kg 體重，血液及肝臟處理的方式，如第二章所述。

四、血液生化值檢驗

第八週犧牲時收集之血液處理，如第三章所述，測試項目為 Alanine aminotransferase (ALT)、Aspartate aminotransferase (AST)、albumin。

五、肝臟重量測定

犧牲時，迅速取下肝臟，洗淨血液後，秤取肝全重。

六、肝臟羥基脯胺酸含量測定

實驗步驟如第二章所述。

七、肝中三酸甘油酯含量

實驗步驟如第二章所述。

八、肝中 protein carbonyl 含量測試

實驗步驟如第三章所述。

九、肝臟脂質過氧化產物測定

實驗步驟如第二章所述。

十、肝臟中 8-iso-PGF_{2α} 含量分析

利用 8-iso-PGF_{2α} 免疫化學套組偵測，取 1 毫克肝臟組織，加入 1 ml 2N NaOH 磨碎，45°C 水浴 2 小時，加入等體積 2N HCl，800 g 離心 5 分鐘，取上清液冰凍於 -20°C 備用。依序加入不同濃度標準品或是稀釋後樣品，加入一級抗體、二級抗體及呈色試劑，以吸光度 405 nm 讀取，以 8-iso-PGF_{2α} 標準品，回歸出標準曲線，推算樣品濃度。同時依照 Coomassie Blue 蛋白質定量法，測定肝組織蛋白質含量，以牛血漿蛋白為標準品¹⁸⁷。單位表示以 pg/mg protein 表示。

十一、肝臟中 15-keto-PGF_{2α} 含量偵測

利用 15-keto-PGF_{2α} 免疫化學套組偵測，取 1 公克肝臟組織，加入 1 ml 磷酸鹽緩衝液磨碎，800 g 離心 5 分鐘，取上清液儲存於 -20°C 備用。依序加入不同濃度標準品或是稀釋後樣品，加入一級抗體、二級抗體及呈色試劑，以吸光度 412 nm 讀取，以 15-keto-PGF_{2α} 標準品，回歸出標準曲線，推算樣品濃度，肝組織蛋白質含量測定如前段所述，單位表示以 pg/mg protein 表示。

十二、mRNA 表現分析

實驗步驟如第二章所述。分析基因為 *cyclooxygenase-2 (COX-2)*，*collagen (α1)(I)*，*transforming growth factor β1 (TGF-β1)*，*α-smooth*

muscle actin(α -SMA) , *glycerol-3-phosphate acyltransferase* (GPAT) ,
CD36/fatty acid translocase (CD36)和 *uncoupling protein 2* (UCP-2) , 詳
細引子如表七所列。

十三、病理檢驗

病理組織處理方式，如第二章所述。進行蘇木青及伊紅染色
(Hematoxylin 和 Eosin stain) 及天狼星紅染色 (Sirius Red stain) ，以
便評估肝臟組織病變及肝纖維化程度。 α -SMA 免疫化學染色，實驗步
驟如第二章所述，藉以評估星狀細胞活化程度。結果判讀如第二章所
述。

脂肪肝的判讀依照脂肪病變的程度，自 0 至 4 級，共區分為五
個等級，0 = 為沒有影響(not detected) ，1 = 輕微變化(mild) ，2 = 中度變
化(moderate) ，3 = 嚴重變化(strong) ，4 = 非常嚴重的變化(very strong
change)²⁰¹。

十四、統計方法

數據結果以平均值 (mean) \pm 標準偏差 (standard deviation;
SD) 表示，統計方式如前所述。以 *P* 值小於 0.05 表示在統計學上具有
顯著差異。

結果

一、血漿中 ALT、AST 活性和 albumin 濃度

血漿中 ALT 活性、AST 活性和 albumin 含量(如表八) ，四氯化碳
誘導大鼠的血漿 ALT、AST 的生化值與控制組相比，有明顯升高。投
與玉米油組與四氯化碳組相比，無明顯影響。四氯化碳誘導大鼠的

albumin 生化值與控制組相比，則是明顯降低。投與玉米油組與四氯化碳組相比，無明顯影響。

二、肝臟重量

如圖十二所示，四氯化碳誘導大鼠的肝重量與控制組相比，有明顯增加。合併玉米油組與四氯化碳組相比，並無明顯影響。

三、肝臟羥基脯胺酸含量

四氯化碳誘導大鼠肝纖維化，肝臟羥基脯胺酸含量(圖十三)與控制組相比，增加 115.3%，有明顯差異。合併投與玉米油組與四氯化碳組相比，並無明顯影響。

四、肝臟脂質過氧化含量

在肝臟脂質過氧化含量方面，如圖十四所示，四氯化碳組與控制組相比，增加 297.1%，玉米油 2、10 m/kg 組比四氯化碳組分別高出 131.9% 和 248.1%。

五、肝臟三酸甘油酯含量

在肝臟三酸甘油酯含量方面，如圖十五所示，四氯化碳組與控制組相比，增加 43.8%，而玉米油 2、10 m/kg 組則比四氯化碳組分別高出 71.4% 和 103.8%。

六、肝臟 protein carbonyl 含量

在 protein carbonyl 含量(圖十六)，四氯化碳組與控制組相比，增加 41.2%。玉米油 2、10 m/kg 組比四氯化碳組分別降低 52.1% 和 53.5%。

七、肝臟 8-iso-PGF_{2α} 含量

肝臟 8-iso-PGF_{2α} 含量(圖十七)，四氯化碳組與控制組相比，增加約 5 倍，而玉米油組高劑量組則比四氯化碳組高出 43.1%。

八、肝臟 15-keto-PGF_{2α}含量

肝臟 15-keto-PGF_{2α}含量(圖十八)，四氯化碳組與控制組相比，增加 2.8 倍，而玉米油組的處理對此沒有影響。

九、肝臟組織 mRNA 表現

肝臟組織的 mRNA 的量化結果，如表九所示，RT-PCR 分析顯示四氯化碳組的 *COX-2*、*collagen(α1)(I)*、*TGF-β1*、*α-SMA* 和 *MAT2A* 表現分別高於控制組 220%、210%、140%、150% 和 210%。而玉米油的合併投與不會影響這些基因的表現。

肝臟 *GPAT*、*UCP-2*、*CD36* 的 mRNA 表現結果，如圖十九所示。四氯化碳組的 *GPAT* mRNA 表現高於控制組 120%，合併玉米油 (2、10 ml/kg) 之後，分別高出四氯化碳組 25% 和 66.7%。四氯化碳組的 *UCP-2* mRNA 表現，高於控制組 310%，合併玉米油之後，並沒有明顯影響。四氯化碳的投與並沒有影響肝臟 *CD36* mRNA 的表現。但合併玉米油 (2、10 ml/kg) 之後，則分別高於四氯化碳組 245% 和 427%。

十、病理學結果

如圖二十所示，圖二十左第一列為 H.E. 染色，經四氯化碳處理的大鼠肝臟會呈現脂肪堆積、細胞壞死、廣泛的單核球浸潤。而在玉米油合併投與後，明顯增加肝臟脂肪堆積的情形，但對細胞壞死的情形卻沒有加重。纖維化之評估量化後結果，如表十所示。天狼星紅染色可以幫助判斷纖維擴展和膠原蛋白聚集的程度，得知肝臟纖維化的程度(圖二十左二列)。四氯化碳組的纖維化程度比控制組明顯嚴重，但合併玉米油組則無顯著影響。可藉由免疫化學染色評估 α -SMA 的表

現，肝纖維化時，星狀細胞活化，使 α -SMA 表現大量增加 (圖二十左三列)。

討論

四氯化碳誘導肝纖維化模式下，玉米油的投與增加了脂質過氧化產物、脂肪肝，但對四氯化碳所誘導的肝纖維化並不會加重。所以，脂質過氧化產物不能全然反映肝臟損傷的程度。

在篩選抗纖維化、抗氧化藥物的肝硬化實驗模式中，四氯化碳誘發肝損傷會有大量脂質過氧化產物，可分為(一)自由基氧化路徑產物是丙二醛(malondialdehyde, MDA) 和 8-iso-PGF_{2 α} ，不需酵素輔助。(二)發炎路徑產物是 15-keto-dihydro-PGF_{2 α} (15-keto-PGF_{2 α})，需要經環氧化酵素-2 (cyclooxygenase-2, COX-2)作用產生，所以稱為酵素路徑⁸¹。因此 MDA、8-iso-PGF_{2 α} 代表著氧化傷害產物，而 15-keto-PGF_{2 α} 代表著發炎路徑產物。給予四氯化碳會使酵素型發炎和非酵素型的自由基脂質過氧化兩種路徑都活化^{202, 203}。

在本研究，肝臟的 MDA、8-iso-PGF_{2 α} 和 15-keto-PGF_{2 α} 濃度，都會因為四氯化碳的投與而增加，支持了在四氯化碳的致傷害機轉中，氧化壓力路徑和發炎路徑都會被活化的觀點。COX-2 mRNA 的基因表現，也證實了四氯化碳的投與，會增加發炎路徑的活化。肝臟丙二醛和 8-iso-PGF_{2 α} 的濃度，會因玉米油和四氯化碳的合併投與而大幅增加，但是對肝臟的 15-keto-PGF_{2 α} 和 COX-2 mRNA 的表現，卻沒有影響。從以上結果得知，因四氯化碳傷害而活化的發炎反應，不會因為玉米油的合併投與而增加。玉米油中有 62%是屬於多元長鏈不飽和脂肪酸，因為含兩個以上雙鍵，易受自由基攻擊，也較容易產生脂質過

氧化產物，此研究中偵測到合併玉米油組會有較高的脂質過化產物，可能都只是自由基攻擊的產物，沒有影響發炎路徑的產物。

蛋白質的自由基傷害偵測，可藉由 protein carbonyl 含量得知⁷⁸。protein carbonyl 含量會因為四氯化碳的投與而加重，此部分結果與其他學者發表的相似²⁰⁴。但合併玉米油投與之後，四氯化碳誘導產生的 protein carbonyl 含量則明顯降低。這可能因為玉米油含有大量多元不飽和脂肪酸，易受自由基攻擊，故而可以消耗大多數的自由基，因此減少了自由基對蛋白質的傷害。

與先前實驗相同，大鼠四氯化碳誘導肝纖維化，使肝臟羥基脯胺酸含量和 collagen ($\alpha 1$)(I) mRNA 表現會明顯增加，但是合併玉米油並未對肝臟羥基脯胺酸含量和 collagen ($\alpha 1$)(I) mRNA 表現造成影響。從病理切片和天狼星紅結果，也證實了四氯化碳誘發肝纖維化的效果，不受玉米油的影響。

TGF- $\beta 1$ 為促纖維化細胞激素，會直接活化庫氏細胞及星狀細胞，促使細胞外間質蛋白增生^{193, 194}，肝纖維化病人及肝纖維化模式中，常見 TGF- $\beta 1$ 基因表現增加¹⁹⁵⁻¹⁹⁷。肝臟纖維化的過程中，星狀細胞被活化後，會促使膠原蛋白合成¹⁹²。星狀細胞活化時，由靜止態轉變為活化態，會分泌細胞骨架蛋白 α -SMA¹⁹²。四氯化碳會增加肝臟 TGF- $\beta 1$ 和 α -SMA mRNA 表現，但並不會因為玉米油同時投與而影響。這些結果顯示，玉米油的同時投與不會惡化四氯化碳引發的肝纖維化病程，雖然增加氧化壓力路徑的脂質過氧化產物，如 MDA 和 8-iso-PGF_{2 α} ，卻沒有增加發炎路徑和星狀細胞的活化。

文獻指出大鼠投與四氯化碳或玉米油，肝臟都會有大量的三酸甘油酯聚集引發脂肪肝^{94, 205}。三酸甘油酯合成的速率限制步驟是：以 lysophosphatidic acid 為材料，藉由 GPAT 進行 glycerol-3-phosphate 催化而合成三酸甘油酯³⁹。GPAT 的過度表現會導致肝臟三酸甘油酯聚集²⁰⁶。本研究中，四氯化碳引發的脂肪肝，有明顯大量的 *GPAT* mRNA 表現。玉米油合併四氯化碳投與之後，肝臟 *GPAT* mRNA 明顯表現增加，脂肪肝情形也較明顯。從病理組織染色的結果，也證實合併玉米油組的脂肪肝較為嚴重。

UCPs 家族蛋白質位於細胞粒線體上，主要負責 ATP 合成時的質子轉換³⁷。當因發炎反應、酒精性肝損傷或是脂肪酸大量進入，形成脂肪肝時，UCP-2 蛋白會在肝細胞大量表現，會以細胞壞死形式促使肝細胞死亡，以減少活性氧分子的傷害^{38, 207}，也會降低過氧化氫的傷害²⁰⁸。此研究中指出肝臟 *UCP-2* mRNA 表現在四氯化碳組大量增加，但玉米油的合併給與不會影響四氯化碳組的表現。顯示玉米油不會加重四氯化碳組的細胞壞死程度。

CD36 會與長鏈脂肪酸結合，具有轉運功能(transporter)⁴⁰。CD36 通常大量表現於脂肪組織，主要負責傳送脂肪酸⁴⁰。近年研究指出，當肝臟出現大量長鏈不飽和脂肪酸或三酸甘油酯堆積，就會有大量 *CD36* 表現^{209, 210}。此研究結果顯示，*CD36* 的表現在四氯化碳組與控制組相比，沒有影響，但合併投與玉米油，會明顯增加肝臟 *CD36* 表現。顯示 *CD36* 的表現不受四氯化碳傷害的影響，在脂肪油投與時才會增加表現。

這些結果顯示，影響四氯化碳和玉米油造成脂肪肝的相關基因表現不同。*UCP-2* 以細胞壞死來減少活性氧分子的傷害，四氯化碳的

UCP-2 大量表現，增加肝細胞壞死，因此無法代謝脂肪，導致脂肪肝的發生。而合併玉米油組，可能是因為增加了脂肪油的攝取，*CD36*、*GPAT* 表現上升，脂肪酸和三酸甘油酯大量積存於肝臟而導致脂肪肝。

血液中的 ALT、AST 是肝損傷中常見的生化指標²¹¹。過去的研究中，因四氯化碳引發的肝臟損傷，也會明顯的增加血漿中 ALT、AST 的活性¹⁹⁶。玉米油合併四氯化碳投與的血漿 ALT、AST 的活性，與四氯化碳組相比，並沒有影響。當肝臟受損會引發修復再生功能活化²¹²，因此而增加肝臟的重量。低白蛋白血症（*hypoalbuminemia*），也是肝硬化病程中常見的症狀²¹³。此研究中，在大鼠模式下四氯化碳引發的肝纖維化，伴隨著肝臟腫大和低白蛋白血症。但這些症狀並未因玉米油合併投與而加重。這些結果指出玉米油並未加重四氯化碳引發的肝損傷。

結論是，在本研究的動物實驗結果顯示，這些非酵素型的脂質過氧化產物，並未引發星狀細胞活化，也未加重纖維化，可能是因為沒有 COX-2 所媒介發炎路徑所致，此酵素路徑為肝纖維化病程發展的主要機制。

Table 7. Primer sequences for PCR amplification. (corn oil + CCl₄)

mRNA	Primer sequence	Length (bp)
<i>collagen (α1)(I)</i>	Sense 5' CGA CTA AGT TGG AGG GAA CGG TC3'	319
	Antisense 5' TGG CAT GTT GCT AGG CAC GAC3'	
<i>TGF-β1</i>	Sense 5' TAT AGC AAC AAT TCC TGG CG3'	162
	Antisense 5' TGC TGT CAC AGG AGC AGT G 3'	
<i>MAT1A</i>	Sense 5' CGG TAG GAG AAG GGC ATC C3'	270
	Antisense 5' GGG ACT GTT GCT CCA GAG CC 3'	
<i>MAT2A</i>	Sense 5' GCA TCT GCG CCC TCC GCA GT3'	420
	Antisense 5' GTG ACT GTT GTT CCA AGG CA3'	
<i>α-SMA</i>	Sense 5' AAT GGC TGG CTT TAA TGC TT3'	194
	Antisense 5' CAG GAC GAC AAT CGA CAA TC3'	
<i>CD36</i>	Sense 5'GGA GGC ATT CTC ATG CCG GTT GGA G3'	348
	Antisense 5' TGA GAA CTG TGA AGT TGT CAT TCT C3'	
<i>UCP-2</i>	Sense 5' TCG GAG ATA CCA GAG CAC TGT C'3	263
	Antisense 5' TCG TCT TGA CCA CAT CAA CGG G 3	
<i>GPAT</i>	Sense 5'AGT GGC AGA GCA AGA TGA CCA G 3'	251
	Antisense 5' TGT GGA CAA AGA TGG CAG CAG 3'	
<i>GAPDH</i>	Sense 5' TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA 3'	76
	Antisense 5' CCT GCT TCA CCA CCT TCT TGA 3'	

Table 8. Effect of Corn oil on the activities of plasma AST, ALT and albumin concentration in CCl₄-treated rats.

Treatments	Doses (ml/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Albumin (g/dL)
Control	-	41.4 ± 5.7	69.4 ± 10.7	3.8 ± 0.4
CCl ₄ + H ₂ O	-	1782.7 ± 168.3 ^{##}	2079.6 ± 798.5 ^{###}	2.8 ± 0.3 ^{###}
+ Corn oil	2	1246.7 ± 799.9	1439.4 ± 807.6	2.7 ± 0.3
	10	1596.0 ± 864.1	1771.9 ± 903.8	3.0 ± 0.3

Liver fibrosis was induced by oral administration of 2 ml/kg CCl₄ (20%) twice a week for 8 weeks. Animals received CCl₄ with distilled water (10 ml/kg, p.o., daily) or corn oil (2 and 10 ml/kg, p.o., daily) throughout the whole experimental period. After experimental, the rat blood was collected for activities of plasma AST, ALT and albumin concentration measure. Values are mean ± S.D. (n=10). ^{###}*P* < 0.001 compared with control group.

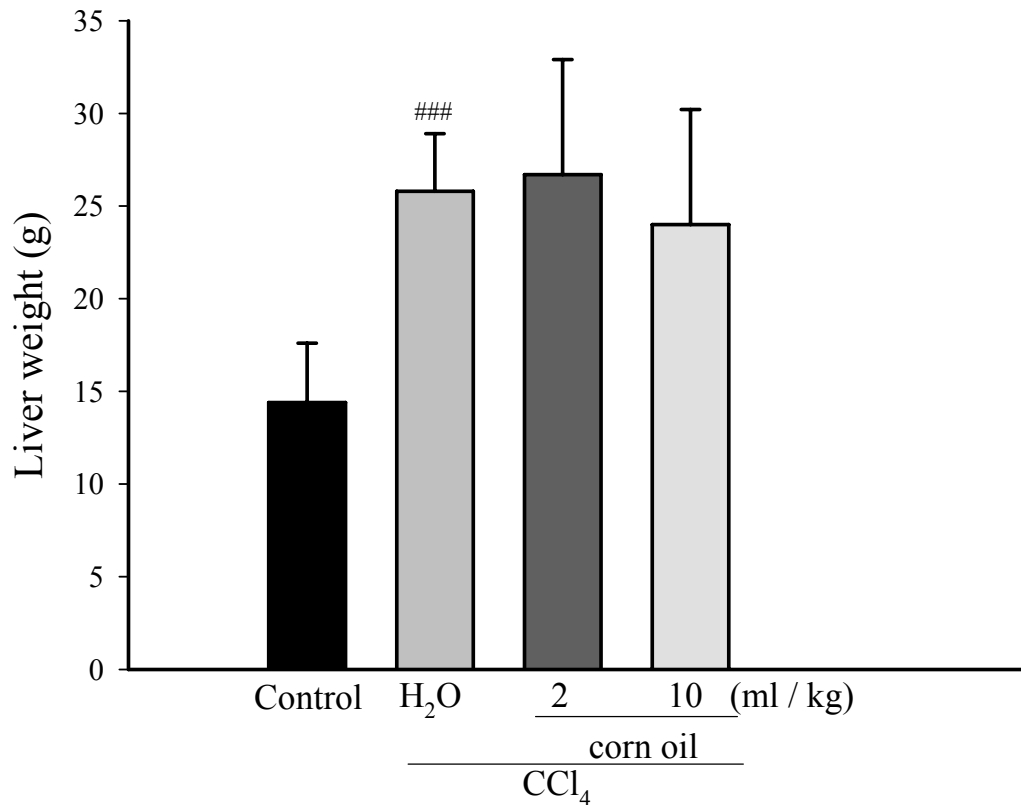


Fig 12. Effect of corn oil on liver weight in CCl₄-treated rats.

Liver fibrosis was induced by oral administration of 2 ml/kg CCl₄ (20%) twice a week for 8 weeks. Animals received CCl₄ with distilled water (10 ml/kg, p.o., daily) or corn oil (2 and 10 ml/kg, p.o., daily) throughout the whole experimental period. After experimental, the rat liver was collected for liver weight measure. Values are mean ± S.D. (n=10). ^{###} *P* < 0.001 compared with control group.

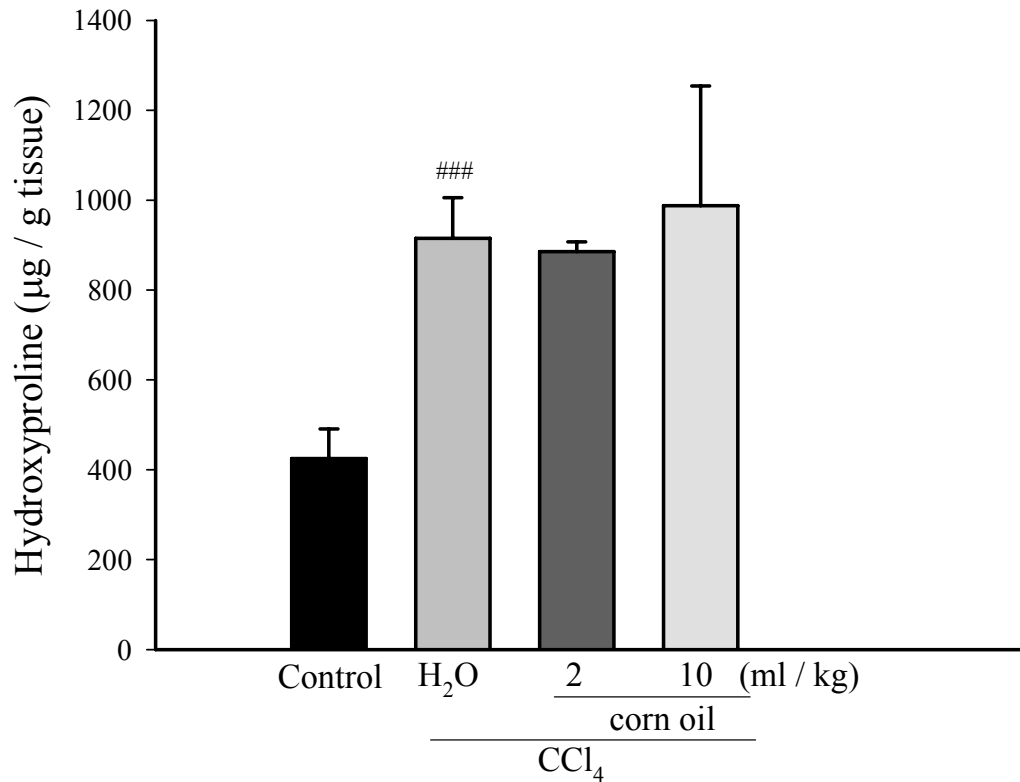


Fig 13. Effect of corn oil on hepatic hydroxyproline in CCl₄-treated rats.

Liver fibrosis was induced by oral administration of 2 ml/kg CCl₄ (20%) twice a week for 8 weeks. Animals received CCl₄ with distilled water (10 ml/kg, p.o., daily) or corn oil (2 and 10 ml/kg, p.o., daily) throughout the whole experimental period. After experimental, the rat blood was collected for hepatic hydroxyproline measure. Values are mean ± S.D. (n=10). ^{###}*P* < 0.001 compared with control group.

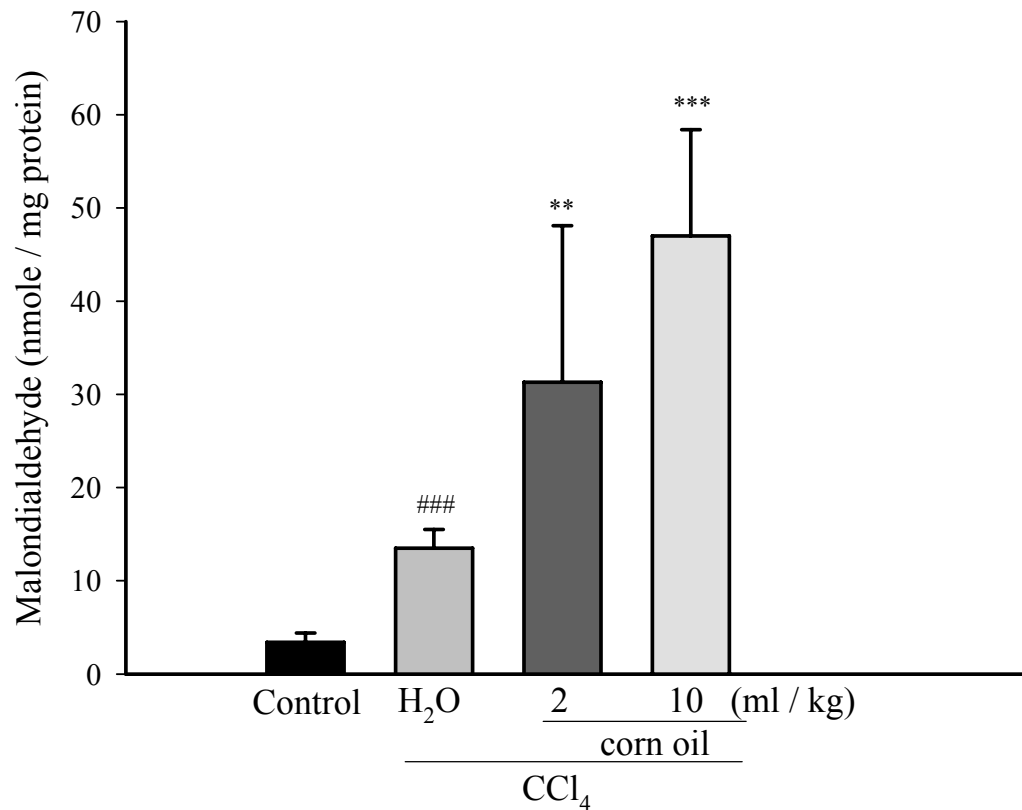


Fig 14. Effect of corn oil on malondialdehyde in CCl₄-treated rats.

Liver fibrosis was induced by oral administration of 2 ml/kg CCl₄ (20%) twice a week for 8 weeks. Animals received CCl₄ with distilled water (10 ml/kg, p.o., daily) or corn oil (2 and 10 ml/kg, p.o., daily) throughout the whole experimental period. After experimental, the rat blood was collected for hepatic malondialdehyde measure. Values are mean \pm S.D. (n=10). #*P* < 0.05 compared with control group. ***P* < 0.01, *** *P* < 0.001 compared with CCl₄ + H₂O group.

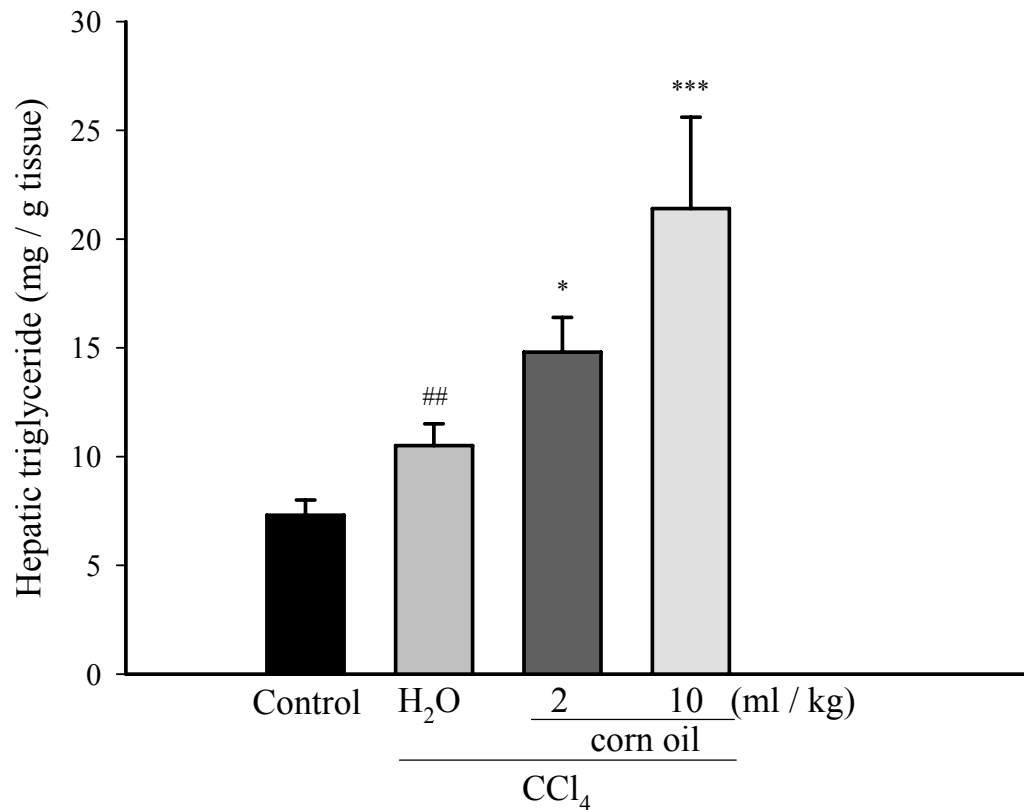


Fig 15. Effect of corn oil on hepatic triglycerides (TGs) in CCl₄-treated rats.

Liver fibrosis was induced by oral administration of 2 ml/kg CCl₄ (20%) twice a week for 8 weeks. Animals received CCl₄ with distilled water (10 ml/kg, p.o., daily) or corn oil (2 and 10 ml/kg, p.o., daily) throughout the whole experimental period. After experimental, the rat blood was collected for hepatic triglyceride measure. Values are mean ± S.D. (n=10). #*P* < 0.05 compared with control group. **P* < 0.05, *** *P* < 0.001 compared with CCl₄ + H₂O group.

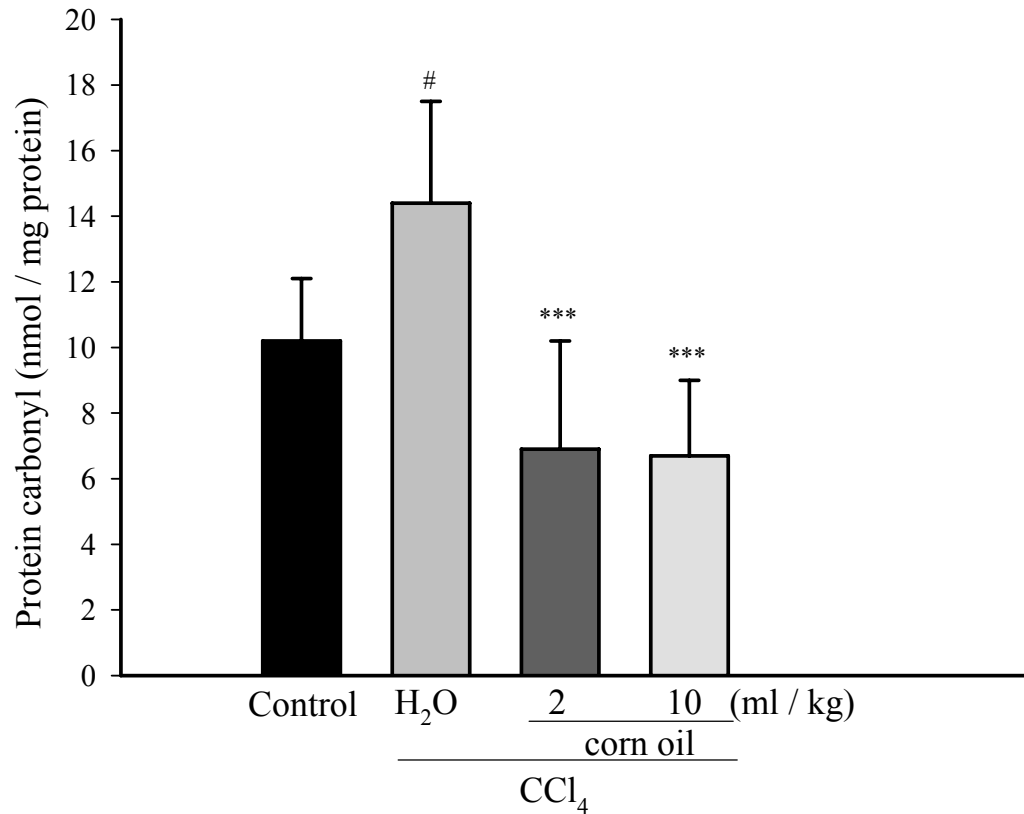


Fig 16. Effect of corn oil on hepatic protein carbonyl in CCl₄-treated rats.

Liver fibrosis was induced by oral administration of 2 ml/kg CCl₄ (20%) twice a week for 8 weeks. Animals received CCl₄ with distilled water (10 ml/kg, p.o., daily) or corn oil (2 and 10 ml/kg, p.o., daily) throughout the whole experimental period. After experimental, the rat blood was collected for hepatic protein carbonyl measure. Values are mean ± S.D. (n=10). #*P* < 0.05 compared with control group. *** *P* < 0.001 compared with CCl₄ + H₂O group.

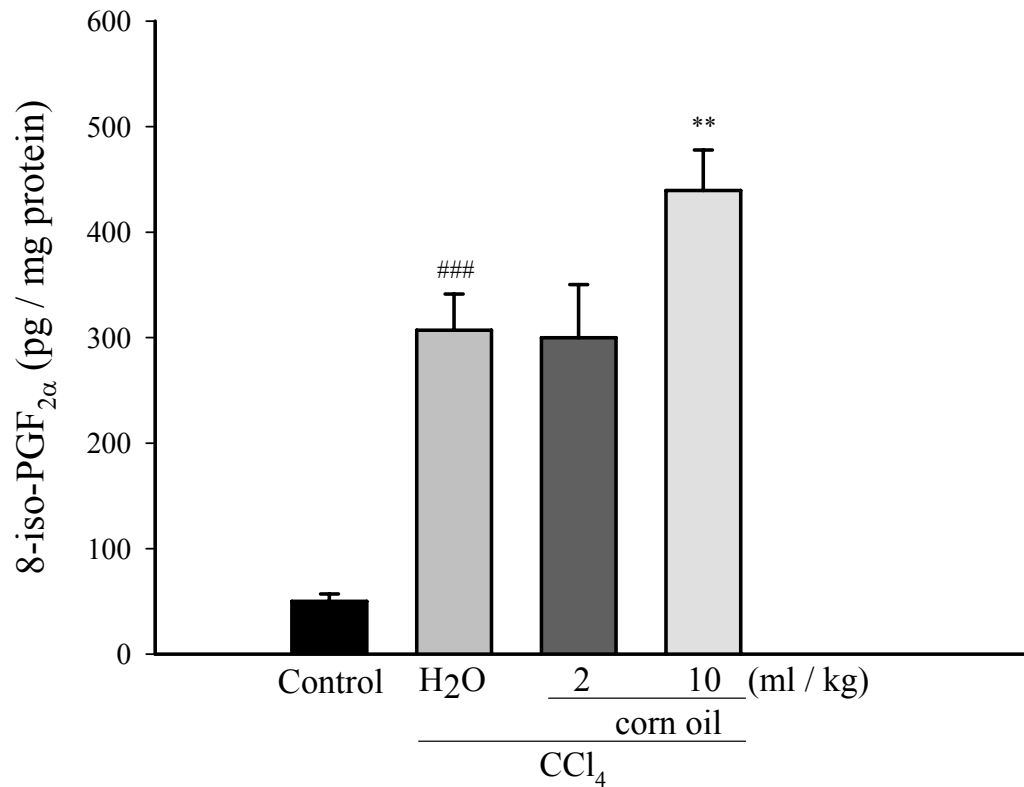


Fig 17. Effect of corn oil on hepatic 8-iso-PGF_{2α} in CCl₄-treated rats.

Liver fibrosis was induced by oral administration of 2 ml/kg CCl₄ (20%) twice a week for 8 weeks. Animals received CCl₄ with distilled water (10 ml/kg, p.o., daily) or corn oil (2 and 10 ml/kg, p.o., daily) throughout the whole experimental period. After experimental, the rat blood was collected for hepatic 8-iso-PGF_{2α} measure. Values are mean ± S.D. (n=10). ### *P* < 0.001 compared with control group. ** *P* < 0.01 compared with CCl₄ + H₂O group.

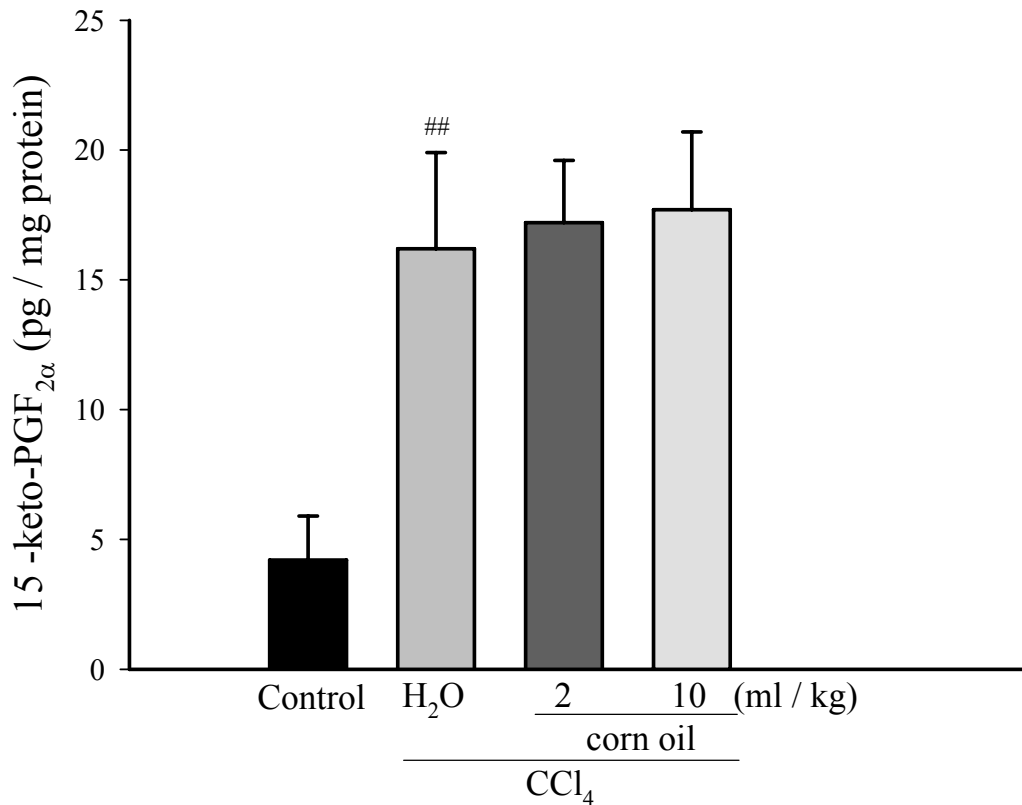


Fig 18. Effect of corn oil on hepatic 15-keto-PGF_{2α} in CCl₄-treated rats.

Liver fibrosis was induced by oral administration of 2 ml/kg CCl₄ (20%) twice a week for 8 weeks. Animals received CCl₄ with distilled water (10 ml/kg, p.o., daily) or corn oil (2 and 10 ml/kg, p.o., daily) throughout the whole experimental period. After experimental, the rat blood was collected for hepatic 15-keto-PGF_{2α} measure. Values are mean ± S.D. (n=10). ^{##}*P* < 0.01 compared with control group.

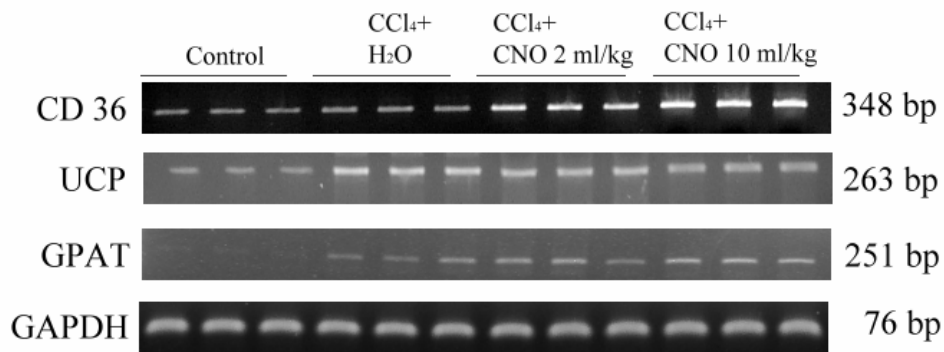


Fig 19. Effects of corn oil on hepatic mRNA expression of *CD36*, *UCP-2* and *GPAT* in CCl_4 -treated rats.

CNO = corn oil

Liver fibrosis was induced by oral administration of 2 ml/kg CCl_4 (20%) twice a week for 8 weeks. Animals received CCl_4 with distilled water (10 ml/kg, p.o., daily) or corn oil (2 and 10 ml/kg, p.o., daily) throughout the whole experimental period. After experimental, the rat blood was collected for hepatic mRNA expression analysis.

Table 9. Effect of corn oil on the hepatic mRNA expressions of COX-2, collagen ($\alpha 1$)(I), TGF- $\beta 1$, α -SMA, MAT2A, GPAT, CD36 and UCP in CCl₄-treated rats.

mRNA	Control	CCl ₄ + H ₂ O	CCl ₄ + CNO (2 ml/kg)	CCl ₄ + CNO (10 ml/kg)
COX-2	1.0 ± 0.1	2.2 ± 0.6 ^{##}	2.5 ± 0.2	2.5 ± 0.1
Collagen ($\alpha 1$)(I)	1.0 ± 0.3	2.1 ± 0.6 ^{###}	1.4 ± 1.1	1.6 ± 0.9
TGF- $\beta 1$	1.0 ± 0.3	1.4 ± 0.2 ^{##}	1.2 ± 0.2	1.3 ± 0.3
α -SMA	1.0 ± 0.1	1.5 ± 0.4 [#]	1.5 ± 0.5	1.5 ± 0.3
MAT2A	1.0 ± 0.2	2.1 ± 0.5 ^{###}	1.9 ± 0.6	1.8 ± 0.2
GPAT	1.0 ± 1.0	1.2 ± 1.2 [#]	1.5 ± 0.3 ^{**}	2.0 ± 0.2 ^{***}
CD36	1.0 ± 0.2	2.2 ± 2.0	7.6 ± 4.7 [*]	11.2 ± 3.7 ^{***}
UCP-2	1.0 ± 0.7	2.8 ± 1.6 ^{##}	2.6 ± 1.0	2.3 ± 1.0

Liver fibrosis was induced by oral administration of 2 ml/kg CCl₄ (20%) twice a week for 8 weeks. Animals received CCl₄ with distilled water (10 ml/kg, p.o., daily) or corn oil (2 and 10 ml/kg, p.o., daily) throughout the whole experimental period. After experimental, the rat blood was collected for hepatic mRNA expression analysis. All values are mean ± S.D. (n = 10). [#]*P* < 0.05, ^{##}*P* < 0.01, ^{###}*P* < 0.001 compared with control group; ^{**}*P* < 0.01, ^{***}*P* < 0.001 compared with CCl₄ + H₂O group.

CNO=corn oil

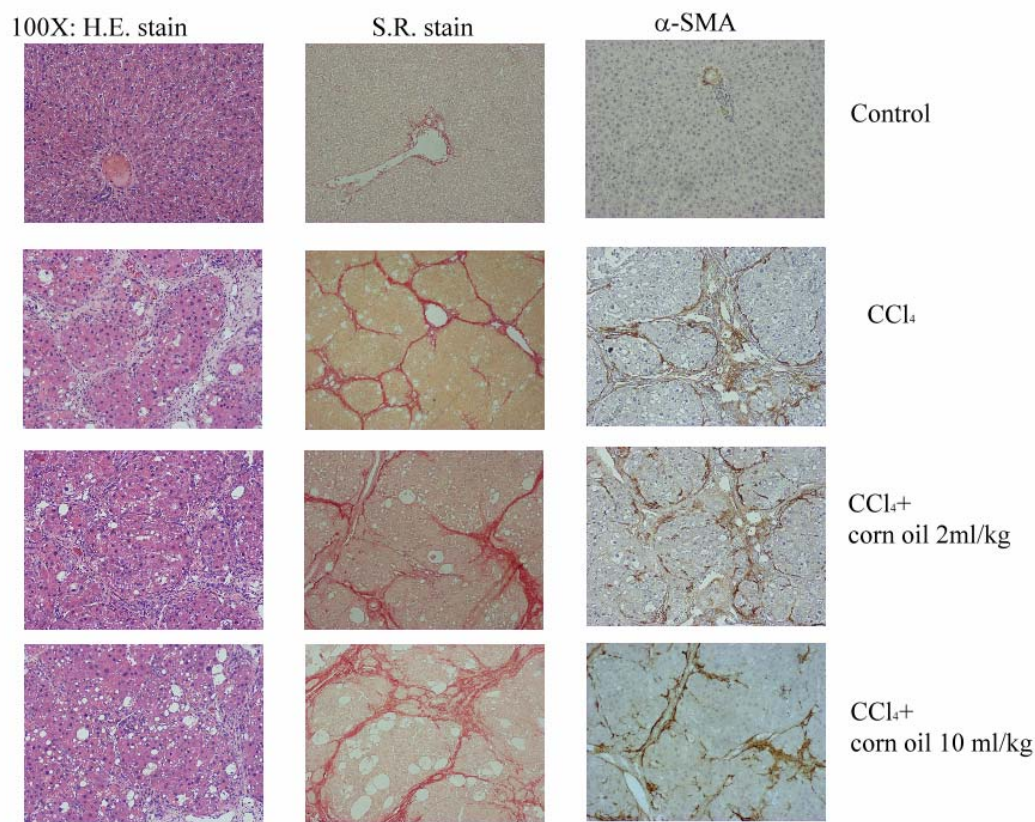


Fig 20. Histology and immunochemistry for treatment with corn oil improved CCl₄-treated rat liver.

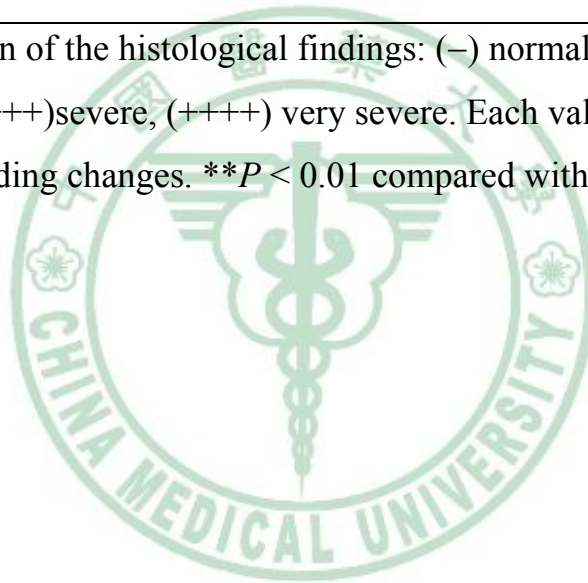
The 1st left hand column 1 were H.E. staining; the 2nd and 3rd left hand columns were Sirius red staining and α -SMA staining respectively.

The first cell was a control group; the second cell was CCl₄ + H₂O group; the third cell was CCl₄ + corn oil (2 ml/kg) group and the fourth cell were CCl₄ + corn oil (10 ml/kg) group.

Table 10. Effect of corn oil on the fatty change score of CCl₄-induced chronic liver damage in rats.

Treatments	Doses (mL/kg)	Fatty changes					Average
		-	+	++	+++	++++	
Control	-	10	0	0	0	0	0
CCl ₄ +H ₂ O	-	0	1	5	4	0	2.3
CCl ₄ + Corn oil	2	0	1	4	3	2	2.6
	10	0	1	2	3	6	3.4**

Grade designation of the histological findings: (-) normal, (+)slight, (++)moderate, (+++)severe, (++++) very severe. Each value is the number of animals with grading changes. ** $P < 0.01$ compared with the CCl₄ group for fibrosis.



第五章 探討脂質過氧化產物對肝纖維化之影響

前言

肝纖維化及肝硬化的發展，源自於慢性的肝細胞受損後的修復過程。肝纖維化的發展過程中，會大量增加自由基表現¹²。脂質過氧化，一種自由基傷害後的產物，長久以來被認為與慢性肝損傷、肝纖維化有密切關聯¹²。一般認為肝纖維化發生時，肝細胞先受損，因而增加脂質過氧化產物，活化庫氏細胞，釋出細胞激素，也使星狀細胞活化，大量的 α -smooth muscle actin (α -SMA)和膠原蛋白表現¹⁹²。但是，脂質過氧化產物對於肝纖維化是否有直接的促進關係，仍是有爭議的。

在動物實驗證實魚油(屬於多元長鏈不飽和脂肪酸)，在四氯化碳模式²¹⁴，或在酒精誘導肝損傷模式¹¹³都不會加重傷害的誘導程度。根據 Iritani 等人¹⁴¹發表，大鼠餵以玉米油，會增加脂質過氧化產物，但未提及傷害的發生。

在星狀細胞部分，多數學者認為脂質過氧化產物如丙二醛，4-hydroxynonenal (4-HNE)和 F₂-isoprostanes，會直接活化星狀細胞^{12, 83, 215-217}。但是，有相反的論點認為丙二醛(malondialdehyde, MDA)或 4-HNE 並不會促使星狀細胞活化²¹⁸，也指出 MDA 能使細胞週期停滯(arrest)²¹⁹。

從我們前一篇研究結果來看，玉米油合併四氯化碳使用時，會產生大量的脂質過氧化產物，但並未加重大鼠的四氯化碳誘導肝損傷，只加重了脂肪肝的情況。因此，脂質過氧化產物對肝纖維化病程的影響，仍需更進一步的釐清。本實驗的第一部分是動物實驗，目的是

透過單獨給予玉米油或四氯化碳的時間點差異，能藉此了解不同來源的脂質過氧化產物對肝纖維化的影響。第二部分是直接使用大鼠的肝細胞和星狀細胞為實驗材料，加入 TGF- β 1 和 MDA 等脂質過氧化產物，藉此釐清脂質過氧化產物對細胞直接的影響。

材料與方法

一、材料

1. Sigma-Aldrich, USA：膠原蛋白分解酶 (Collagenase type IV)、CaCl₂、triton X-100、DMSO、trypsin-EDTA、paraformaldehyde
2. BioSource, USA：ApoTarget Annexin-V FITC Apoptosis 套組
3. Promega, USA：MTS 試劑
4. HyClone, USA：RPMI 培養液，L-15 培養液
5. GeHealthcare, Sweden：percoll
6. BD, USA：Titanium Taq polymerase kit
7. Cambrex, USA：Sybr-Green nucleic acid stain

二、動物

使用 Wistar 雄性大鼠，體重 250-300 公克，購自國家實驗動物繁殖及研究中心。飼養環境維持 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ，相對溼度 $55 \pm 5\%$ ，光照為 12 小時亮 12 小時暗(早上七點亮，下午七點暗)的環境，自由飲水及攝食。

三、四氯化碳及玉米油的給藥方式

四氯化碳組大鼠誘導方式如第二章所述，將大鼠分為 3 組，每週投與兩次四氯化碳，分別於開始投與四氯化碳後滿二、四、八週時，將動物犧牲，犧牲方式如第二章所述。

玉米油組大鼠則分為 6 組，每天分別投予玉米油，劑量分別是 2 ml/kg 或 10 ml/kg 體重，共 6 組，分別於開始投與四氯化碳後滿二、四、八週時，將動物犧牲，犧牲方式如第二章所述。另有 3 組大鼠，但只餵食一次水，於實驗開始進行之後滿二、四、八週時，將動物犧牲，犧牲方式如第二章所述。

四、血液生化值檢驗

血漿處理方式，如第三章所述。血液生化值測定項目包括 Alanine aminotransferase (ALT)、Aspartate aminotransferase (AST)、albumin、triglycerin。

五、肝中三酸甘油酯含量

實驗步驟參考第二章所述。

六、肝臟脂質過氧化產物測定

實驗步驟參考第二章所述。

七、肝臟中 8-iso-PGF_{2α} 含量分析

實驗步驟參考第四章所述。

八、肝臟中 15-keto-PGF_{2α} 含量偵測

實驗步驟參考第四章所述。

九、肝臟羥基脯胺酸含量測定

實驗步驟參考第二章所述。

十、肝中 protein carbonyl 含量測試

實驗步驟參考第三章所述。

十一、mRNA 表現分析

RNA 萃取及 cDNA 合成如第二章所述。

半定量式 PCR (Real time PCR)：將 cDNA 稀釋 100 倍，將下列材料：取去離子水 17 μ l、10X Titanium Taq PCR buffer 2.5 μ l、10 mM dNTP 1 μ l、Sybr-Green (1: 1000) 1 μ l、50X Titanium Taq polymerase 0.5 μ l、引子 各 1 μ l、cDNA 1 μ l，混合均勻後，以 Rotor Gene 2000 (Corbett Research) 進行反應及並以軟體 (Rotor Gene Real-time amplification system) 分析之，分析方式如第二章所述。

此部份分析基因為 *Collagen (α 1)(I)*, *transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)*, *cyclooxygenase-2 (COX-2)*, *methionine adenosyltransferase 1A (MAT1A)*, *methionine adenosyltransferase 2A (MAT2A)*，所用引子列於表十一。

十二、病理檢驗

切片組織處理，如第二章所述，分為三種染色分別是蘇木青及伊紅染色 (Hematoxylin 和 Eosin stain) 及天狼星紅染色 (Sirius Red stain)，以便評估肝纖維化程度，以及 α -SMA 的免疫化學染色，藉以評估星狀細胞活化程度。結果判讀如第二章所述。

十三、大鼠星狀細胞分離和培養

分離星狀細胞之步驟，參考自 Mudra 和 Parkinson 發表以及 Froh 等人發表之方法^{220, 221}，大鼠約 300 公克，以乙醚深度麻醉，75% 酒精擦拭腹部，剪開腹部之後，將腸胃向右翻轉，找出肝門靜脈及下腔大靜脈。以止血鉗將下腔大靜脈夾住，頭皮針插入肝門靜脈三分之一處用止血鉗夾住，用灌流液 (成分為：磷酸鹽緩衝液+葡萄糖+胎牛血清) 充分灌流，同時剪開心臟，讓灌流液流出。灌流約 200ml 後，使肝臟呈現紅灰色，灌流時一邊按摩使血液及血球沖洗乾淨。之後加入膠原蛋白酶及 CaCl_2 灌流。將肝剪下，放置於 10 公分培養皿，將肝剪成小碎

片，再倒入 100 ml 燒杯中，放到培養箱 37 °C 中，充分攪拌反應五分鐘。取出用 100 號網篩過篩，懸浮液放入 50 ml 離心管，離心 100 g、3 分鐘、4°C，收集上清液後，沉澱物再加入 L-15 培養液混合均勻，離心 100 g、3 分鐘、4°C。將上清液統一收集後，以 700 g 離心、7 分鐘、4°C，沉澱物以 L-15 培養液均勻混合至 20 ml，和 50%、25% percoll 分別依 1: 2: 2 比例順序加入 50 ml 離心管，以 1800 g、15 分鐘、4°C，收集下層液體 20 ml，離心 650 g、7 分鐘、4°C，為星狀細胞，計算細胞數目後，以 RPMI 培養液稀釋至適當濃度，即可分盤培養。

十四、細胞生長曲線分析

細胞濃度為 1×10^5 cell/ml，培養於 96 孔盤中，每孔加入 100 μ l 含細胞培養液，分別加入以培養液配製之藥物，每個時間點將含藥培養液更換為不含藥之新鮮培養液，再加入 MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, tetrazolium salt] 試劑，培養 12 小時，以分光光度計 490 nm 讀取吸光值，除以只加培養液之對照組，即可獲得細胞存活率。MTS 試劑原理為 MTS 是一種有機鹽染料，只和活細胞內具有活性的琥珀酸脫氫酶起反應，生成紅紫色的 Formazan 顆粒，被還原 Formazan 的生成量與存活細胞數成正比關係。因脫氫酶只存在於活細胞線粒體內，而不存在於上清液中，故特异性極高。

依照 Kharbanda 等人文獻²²²，TGF- β 1 選用 1 ng/ml 的濃度，避免星狀細胞過度活化，而無法觀察脂質過氧化產物是否會促進星狀細胞活化。

星狀細胞的部份，實驗分二部份進行，第一組是為除對照組外，全部均加入 TGF- β 1 (1 ng/ml)，培養 24 小時後，分別加入 MDA($10^{-4}\sim^{-7}$ M)、8-iso-PGF $_{2\alpha}$ ($10^{-4}\sim^{-7}$ M)和 15-keto-PGF $_{2\alpha}$ ($10^{-4}\sim^{-7}$ M)，時間點為 0，24，48，72 小時；第二組 TGF- β 1 (1ng/ml)以及 MDA ($10^{-4}\sim^{-7}$ M)、8-iso-PGF $_{2\alpha}$ ($10^{-4}\sim^{-7}$ M) 和 15-keto-PGF $_{2\alpha}$ ($10^{-4}\sim^{-7}$ M)，分別加入細胞中，時間點與第一組相同。

十五、以西方墨點法分析星狀細胞之 α -SMA 表現

此部份實驗為取下初代培養星狀細胞 24 小時後進行，先加入 TGF- β 1 (1 ng/ml)，培養 24 小時後，再分別加入 10^{-4} M 的 MDA、8-iso-PGF $_{2\alpha}$ 及 15-keto-PGF $_{2\alpha}$ ，48 小時後收集細胞，進行以西方墨點法分析星狀細胞之 α -SMA 表現。西方墨點法之步驟，如前所述。

十六、雷射掃描共軛焦分光光譜顯微鏡分析

每格數量為 5×10^4 cell/ml 的細胞，培養於 24 well，內部放上滅菌過之 13 mm 的圓形蓋玻片，24 小時後進行實驗，一組事先加入 TGF- β 1 (1 ng/ml)，培養 24 小時後，另一組則不事先處理，再同時分別加入 MDA、8-iso-PGF $_{2\alpha}$ 和 15-keto-PGF $_{2\alpha}$ ，濃度為 10^{-4} 和 10^{-7} M，於第 48 小時，以 PBS 清洗 2 次，加入 4% paraformaldehyde 1 ml 固定，以 0.25% triton X-100/ 7.5% DMSO/ PBS 輕度振搖 10 分鐘，以 PBS 清洗 2 次，加入 1.5% BSA/PBS 1 小時，加入一級抗體 1：500 室溫下一小時，以 PBS 清洗 2 次，加入具 FITC 螢光的二級抗體避光反應一小時，利用 50% 甘油封片，即可進行觀察。

十七、Flow cytometry 偵測細胞早期的計畫性凋亡

Annexin-V 為 35-36 kDa 大小的蛋白質，對細胞膜上磷脂醯絲胺酸(phosphatidylserine) 有高度親和性，若細胞正值早期凋亡，細胞膜失

去對稱性或完整性(membrane integrity)，Annexin-V 就會與磷脂醯絲胺酸結合，只要將 Annexin-V 接上 FITC 螢光物質，即可以螢光偵測細胞膜受損的早期凋亡。如果細胞已經死亡，propidium Iodine (PI) 染劑會進入細胞中，與核苷酸結合，亦可以螢光偵測得知。偵測螢光為流式細胞儀雷射 488 nm 激發，FITC 為綠色螢光，PI 為紅色螢光。

此實驗流程為取下初代培養星狀細胞 24 小時後進行，先加入 TGF- β 1 (1 ng/ml)，培養 24 小時後，再分別加入濃度為 10^{-4} M 的 MDA、8-iso-PGF $_{2\alpha}$ 及 15-keto-PGF $_{2\alpha}$ ，48 小時後進行此實驗。

使用 ApoTarget Annexin-V FITC Apoptosis 套組進行實驗，細胞以 PBS 清洗二次後，加入 0.5 ml 0.1% trypsin-EDTA 置於 37°C，5 分鐘後，輕拍培養皿底部，加入新鮮培養液以中和掉 trypsin 的作用。充份混合細胞懸浮液，使細胞皆成為單一顆粒，以 PBS 清洗並離心 1000 rpm 5 分鐘二次，使細胞懸浮於 Annexin-V 結合緩衝液中，並調整細胞濃度為 2×10^6 個/ml，取 0.1 ml 細胞懸浮液，加入 5 μ l Annexin-V FITC，10 μ l PI (50 μ g/ml)，避光室溫下 15 分鐘，以緩衝液將體積補足為 0.5 ml，一小時內以 FACScan flow cytometer 分析。

十八、統計方法

數據結果以平均值 (mean) \pm 標準偏差 (standard deviation; SD) 表示，統計方法如前所述。以 *P* 值小於 0.05 表示在統計學上具有顯著差異。

結果

一、血液中 ALT、AST 活性和 albumin 濃度

血液中 ALT 酵素(圖二十一)、AST 酵素(圖二十二)和 albumin 含量(圖二十三)，第二、四和八週四氯化碳誘導大鼠的血漿值與控制組相比，有明顯差異，ALT 酵素分別上升 378.9%、1921.5%、4394.2%，AST 酵素分別上升 272.3%、2088.9%、3093.5% 和 albumin 含量第八週下降 22.2%，但給玉米油組並無明顯影響。

二、血液和肝臟中三酸甘油酯含量

如圖二十四所示，四氯化碳誘導大鼠的三酸甘油酯含量與控制組相比，在第二週及第四週，分別降低 60.8%、67.9%，於第八週則無影響。玉米油組在第二、四週沒有影響，第八週上升 54.6%。

如圖二十五所示，四氯化碳誘導大鼠的肝臟三酸甘油酯含量與控制組相比，第二週沒有影響，在第四週及第八週，分別上升 25.5%、32.0%。玉米油組肝臟中三酸甘油酯在第二、四、八週有明顯上升的情形，分別上升 62.6%、29.0%、77.3%。

三、肝臟脂質過氧化含量

在脂質過氧化含量方面，如圖二十六所示，四氯化碳組與控制組相比，在第二、四、八週分別增加 69.4%、121.2%、115.4%。而玉米油高劑量組在第四、八週則比控制組分別高出 103.0% 和 124.6%。

四、肝臟 8-iso-PGF_{2α} 含量

在肝臟 8-iso-PGF_{2α} 含量方面，如圖二十七所示，四氯化碳組與控制組相比，在第二、四、八週分別增加 441.4%、581.8%、512.8%。

而玉米油組高劑量組與控制組相比，在第二、四、八週分別高出 230.2%、269.0% 和 443.1%。

五、肝臟 15-keto-PGF_{2α} 含量

在肝臟 15-keto-PGF_{2α} 含量方面，如圖二十八所示，四氯化碳組與控制組相比，在第二、四、八週分別增 87.3%、220.5%、285.7%，但給玉米油組對此並無明顯影響。

六、肝臟羥基脯胺酸含量

肝臟羥基脯胺酸含量，如圖二十九所示，四氯化碳組與控制組相比，有明顯差異，在第二、四、八週分別增加 19.2%、38.2%、74.4%。玉米油組對此並無明顯影響。

七、肝臟 protein carbonyl 含量

肝臟 protein carbonyl 含量，如圖三十所示，四氯化碳組與控制組相比，有明顯差異，在第四、八週分別增加 30.6%、41.2%。玉米油組對此並無明顯影響。

八、肝臟組織 mRNA 表現

肝臟組織的 *collagen(α1)(I)* mRNA 表現結果，如圖三十一所示。四氯化碳組的表現與控制組相比，在第二、四、八週分別增加 60%、80%、110%，而玉米油的投與不會影響此基因的表現。

肝臟組織的 *TGF-β1* mRNA 表現結果，如圖三十二所示。四氯化碳組的表現與控制組相比，在第二、四、八週都增加了 40%，而玉米油的投與不會影響此基因的表現。

肝臟組織的 *COX-2* mRNA 表現結果，如圖三十三所示。四氯化碳組的表現與控制組相比，在第二、四、八週分別增加 20%、50%、120%，而玉米油的投與不會影響。

肝臟組織的 *MAT1A* mRNA 表現結果，如圖三十四所示。四氯化碳組的表現與控制組相比，在第二、四、八週分別下降 20%、30%、50%，玉米油的投與不會影響此基因的表現。

肝臟組織的 *MAT2A* mRNA 表現結果，如圖三十五所示。四氯化碳組的表現與控制組相比，在第四、八週分別增加 190%、110%，而投與玉米油不會影響這些基因的表現。

九、病理學結果

如圖三十六所示，左邊第一列為 H.E. 染色，可以明顯觀察到經四氯化碳處理的老鼠肝臟會呈現脂肪堆積、細胞壞死、廣泛的單核球浸潤。而在玉米油單獨投與組，在第二週出現發炎細胞聚集的情形，到第四和第八週有較明顯增加肝臟脂肪堆積的情形，但沒有細胞壞死的情形。可藉由纖維擴展和膠原蛋白聚集判斷四氯化碳誘發的肝纖維化程度，此可藉由天狼星紅染色印證。纖維化的結果，如圖三十六第二列所示，四氯化碳組的纖維化程度比控制組明顯嚴重，但單獨投與玉米油組，第二、第四週無明顯影響，但第八週有些微的細絲般纖維化出現。肝纖維化時，星狀細胞活化，使 α -SMA 表現大量增加，增加纖維化程度，此可藉由免疫化學染色評估。四氯化碳組 α -SMA 表現明顯高於控制組。而單獨投與玉米油組，則無變化，顯示玉米油的投與並未引發星狀細胞活化。

十、初代培養星狀細胞之細胞存活率評估

1. TGF- β 1 預先處理組

星狀細胞先以 TGF- β 1 (1ng/ml)處理 24 小時之後，分別加入 10^{-4} ~ 10^{-7} M 的 MDA、8-iso-PGF $_{2\alpha}$ 和 15-keto-PGF $_{2\alpha}$ 。TGF- β 1 細胞存活率與控制組相比降低約 12~14%。

MDA 對 TGF- β 1 處理過星狀細胞的影響，如圖三十七所示，MDA 加入後 24 小時，濃度 10^{-4} , 10^{-5} M 細胞存活率與 TGF- β 1 組相比降低 39.9%、28%，而濃度 10^{-6} , 10^{-7} M 則無明顯影響。第 48 小時濃度 10^{-4} , 10^{-5} M 細胞存活率與 TGF- β 1 組相比降低 45.6%、36.6%，而濃度 10^{-6} , 10^{-7} M 則無明顯影響。第 72 小時濃度 10^{-4} , 10^{-5} M 細胞存活率與 TGF- β 1 組相比降低 47.5%、41.6%，而濃度 10^{-6} , 10^{-7} M 則無明顯影響。

8-iso-PGF $_{2\alpha}$ 對 TGF- β 1 處理過星狀細胞的影響，如圖三十八所示，8-iso-PGF $_{2\alpha}$ 加入後 24 小時，濃度 10^{-4} , 10^{-5} M 細胞存活率與 TGF- β 1 組相比降低 22.8%、20.6%，而濃度 10^{-6} , 10^{-7} M 則無明顯影響。第 48 小時濃度 10^{-4} , 10^{-5} M 細胞存活率與 TGF- β 1 組相比降低 27.9%、25.4%，而濃度 10^{-6} , 10^{-7} M 則無明顯影響。第 72 小時濃度 10^{-4} , 10^{-5} M 細胞存活率與 TGF- β 1 組相比降低 41.8%、39.2%，而濃度 10^{-6} , 10^{-7} M 則無明顯影響。

15-keto-PGF $_{2\alpha}$ 對 TGF- β 1 處理過星狀細胞的影響，如圖三十九所示，15-keto-PGF $_{2\alpha}$ 加入後 24 小時，濃度 10^{-4} , 10^{-5} M 細胞存活率與 TGF- β 1 組相比降低 26.7%、25.2%，而濃度 10^{-6} , 10^{-7} M 則無明顯影響。第 48 小時濃度 10^{-4} , 10^{-5} M 細胞存活率與 TGF- β 1 組相比降低 30.6%、28.4%，而濃度 10^{-6} , 10^{-7} M 則無明顯影響。第 72 小時濃度 10^{-4} , 10^{-5} M 細胞存活率與 TGF- β 1 組相比降低 41.4%、30.4%，而濃度 10^{-6} , 10^{-7} M 則無明顯影響。

2. TGF- β 1、MDA、8-iso-PGF $_{2\alpha}$ 、15-keto-PGF $_{2\alpha}$ 個別處理組

星狀細胞加入 TGF- β 1 (1ng/ml)處理後，在第 24、48、72 小時之細胞存活率與控制組相比降低約 10~15%。

MDA 對星狀細胞的影響，如圖四十所示，MDA 加入後 24 小時，濃度 10^{-4} M 細胞存活率與 TGF- β 1 組相比降低 17.8%，而濃度 10^{-5} ~ 10^{-7} M 則無明顯影響。第 48 小時濃度 10^{-4} M 細胞存活率與 TGF- β 1 組相比降低 21.9%，而濃度 10^{-5} ~ 10^{-7} M 則無明顯影響。第 72 小時濃度 10^{-4} 、 10^{-5} M 細胞存活率與 TGF- β 1 組相比降低 32.6%、29.1%，而濃度 10^{-6} 、 10^{-7} M 則無明顯影響。

8-iso-PGF $_{2\alpha}$ 對星狀細胞的影響，如圖四十一所示，8-iso-PGF $_{2\alpha}$ 加入後 24 小時，濃度 10^{-4} M 細胞存活率與 TGF- β 1 組相比降低 18%，而濃度 10^{-5} ~ 10^{-7} M 則無明顯影響。第 48 小時濃度 10^{-4} M 細胞存活率與 TGF- β 1 組相比降低 22.3%，而濃度 10^{-5} ~ 10^{-7} M 則無明顯影響。第 72 小時濃度 10^{-4} 、 10^{-5} M 細胞存活率與 TGF- β 1 組相比降低 26.5%、23.7%，而濃度 10^{-6} 、 10^{-7} M 則無明顯影響。

15-keto-PGF $_{2\alpha}$ 對星狀細胞的影響，如圖四十二所示，15-keto-PGF $_{2\alpha}$ 加入後 24 小時，濃度 10^{-4} M 細胞存活率與 TGF- β 1 組相比降低 17.9%，而濃度 10^{-5} ~ 10^{-7} M 則無明顯影響。第 48 小時濃度 10^{-4} M 細胞存活率與 TGF- β 1 組相比降低 21.9%，而濃度 10^{-5} ~ 10^{-7} M 則無明顯影響。第 72 小時濃度 10^{-4} M 細胞存活率與 TGF- β 1 組相比降低 25.4%，而濃度 10^{-5} ~ 10^{-7} M 則無明顯影響。

此部分結果顯示，TGF- β 1 對星狀細胞傷害性不大，脂質過氧化產物: MDA、8-iso-PGF $_{2\alpha}$ 、15-keto-PGF $_{2\alpha}$ ，對未經 TGF- β 1 處理之星狀

細胞的影響較小。但對於先以 TGF- β 1 處理 24 小時之星狀細胞，以 MDA 影響最大，8-iso-PGF_{2 α} 、15-keto-PGF_{2 α} 次之。

十一、以西方墨點法分析星狀細胞之 α -SMA 表現

如圖四十三所示，星狀細胞以 TGF- β 1 處理 24 小時後，加入濃度為 10^{-4} M 的 MDA、8-iso-PGF_{2 α} 、15-keto-PGF_{2 α} 處理 48 小時後，分析 α -SMA 的表現。TGF- β 1 表現明顯高於控制組。MDA、8-iso-PGF_{2 α} 和 15-keto-PGF_{2 α} 表現，對星狀細胞的 α -SMA 的表現無明顯影響。

十二、初代培養星狀細胞之雷射掃描共軛焦分光光譜顯微鏡評估

選擇第 48 小時的初代培養星狀細胞 TGF- β 1 (1 ng/ml) 預先處理 24 小時，MDA (10^{-4} M)、8-iso-PGF_{2 α} (10^{-4} M)、15-keto-PGF_{2 α} (10^{-4} M) 處理 48 小時之後，結果如圖四十四所示，圖 A 為對照組，圖 B 為單獨給予 TGF- β 1 (1 ng/ml) 刺激，圖 F 為單獨給予 TGF- β 1 (100 ng/ml) 刺激，圖 G 為單獨給予 TGF- β 1 (10 ng/ml) 刺激，圖 G 上方所附小圖為星狀細胞因含有維他命 A 而特有的自體螢光，圖 C、D、E 為 MDA (10^{-4} M)、8-iso-PGF_{2 α} (10^{-4} M)、15-keto-PGF_{2 α} (10^{-4} M) 單獨處理之星狀細胞，可以見到星狀細胞並無明顯活化之影響，也未見明顯之細胞死亡情形。

圖 H、I、J 分別為 TGF- β 1 處理 24 小時後，加入濃度為 10^{-4} M 的 MDA、8-iso-PGF_{2 α} 、15-keto-PGF_{2 α} 處理 48 小時之星狀細胞。MDA 組有明顯的細胞受損情況，但未有明顯活化之情形。8-iso-PGF_{2 α} 的結果，可以看到些微細胞受損，亦未見星狀細胞活化之情形。15-keto-PGF_{2 α} 之結果，可以看到細胞雖有受損，但存活的細胞有稍微增加活化趨勢。

十三、初代培養星狀細胞之早期細胞凋亡評估

比較初代培養星狀細胞 TGF- β 1 (1 ng/ml)預先處理 24 小時或不預先以 TGF- β 1 處理，分別加入濃度為 10^{-4} M 為 MDA、8-iso-PGF $_{2\alpha}$ 、15-keto-PGF $_{2\alpha}$ 處理之後的分析結果，結果如圖四十五所示，圖四十六則是以統計圖表示之結果，左半部為預先以 TGF- β 1 處理，右半部為不預先以 TGF- β 1 處理。

此部分結果顯示出預先以 TGF- β 1 處理後的星狀細胞，加入脂質過氧化產物 MDA 之後，會增加其早期凋亡現象，8-iso-PGF $_{2\alpha}$ 、15-keto-PGF $_{2\alpha}$ 的表現也有稍稍增加，但無明顯影響。而不以 TGF- β 1 預先處理的星狀細胞，脂質過氧化產物的影響明顯減弱。

討論

本實驗動物實驗的結果，證實四氯化碳會造成大鼠肝臟傷害，傷害指標如血液生化值、膠原蛋白含量、星狀細胞活化、脂質過氧化產物等表現都會增加，組織學的變化如肝臟組織纖維化、脂肪肝也非常明顯。而玉米油的投與，除了脂肪肝和非經酵素型的脂質過氧化產物如丙二醛，8-iso-PGF $_{2\alpha}$ 以外，其他特徵均無明顯表現，也不會造成肝纖維化或肝硬化。

長久以來認為四氯化碳誘發肝纖維化過程中，會偵測到較高的脂質過氧化產物，因此篩選治療肝纖維化藥物及抗氧化藥物時，都是以是否具有降低脂質過氧化的作用為依據⁹⁴。四氯化碳誘導模式下，會有酵素型脂質過氧化產物，如 15-keto-PGF $_{2\alpha}$ ，和非酵素型的脂質過氧化產物，如 MDA、8-iso-PGF $_{2\alpha}$ 的表現^{202, 203}。我們的實驗結果證實此項論點，在四氯化碳誘導大鼠的肝臟中 MDA、8-iso-PGF $_{2\alpha}$ 、15-keto-PGF $_{2\alpha}$

濃度都很高，所以四氯化碳誘導肝損傷，會引發氧化傷害和發炎路徑的活化。發炎路徑的活化，可以從 *COX-2* mRNA 的 q-PCR 分析結果得到印證。

但是，玉米油只增加了肝臟 MDA 和 8-iso-PGF_{2α} 的濃度，肝臟 15-keto-PGF_{2α} 和 *COX-2* mRNA 發炎基因的表現，卻都沒有影響。顯示玉米油只產生了非酵素型的脂質過氧化產物，沒有引起發炎路徑的活化。

先前的實驗也證實，四氯化碳的傷害，會造成 protein carbonyl 損傷²⁰⁴。本實驗結果，四氯化碳組有蛋白質氧化產物產生，單獨給予玉米油組卻沒有影響。玉米油雖引起的過高脂質過氧化產物，但並沒有增加自由基的量，以致蛋白質沒有受損。

四氯化碳誘導肝纖維化時，肝臟羥基脯氨酸和 *collagen (α1)(I)* mRNA 會大量表現。單獨給予玉米油卻沒有增加膠原蛋白或是基因的表現。病理組織染色，並未觀察到有組織病變之情況。天狼星紅的染色，雖然在第 8 週的結果中，有些非常細的纖維出現，但仍屬正常範圍之中。因此，此部分結果證實了因玉米油而產生的過高脂質過氧化產物，肝臟並不會出現纖維化的情形。

肝臟星狀細胞是肝纖維化中促使膠原蛋白合成的主要細胞¹⁹²。星狀細胞活化時，型態會發生改變，大量表現細胞骨架蛋白 α-SMA¹⁹²。TGF-β1 是最重要的促纖維化細胞激素，會活化星狀細胞¹⁹²。TGF-β1 基因表現和 α-SMA 免疫化學染色之結果顯示，四氯化碳組會隨著時間增加而增加星狀細胞的活化。玉米油組不會影響星狀細胞的活化。

MAT1A 會在正常肝臟組織表現³¹。當肝臟受損時，*MAT1A* 表現會下降，而 *MAT2A* 表現會被啟動²⁷。四氯化碳組的 *MAT1A* 表現會明顯下降，*MAT2A* 表現則會上升。但玉米油組對 *MAT1A* 和 *MAT2A* 的表現沒有影響，顯示沒有肝損傷的發生。

由以上實驗結果，可以合理推測玉米油組較高的 MDA 和 8-iso-PGF_{2α} 產物，是因為所含多元長鏈不飽和脂肪酸受肝臟內正常產生之自由基攻擊所致，這些脂質過氧化產物不會對肝臟造成損傷，也未引發星狀細胞的活化。

由肝臟三酸甘油酯含量的結果可推知，投與玉米油會對肝臟造成脂肪肝之情形，由前章玉米油合併四氯化碳的結果相似，玉米油和四氯化碳造成脂肪肝的機制不同。玉米油組只是單純因大量油脂堆積造成，而四氯化碳是因為肝臟受損，無法發揮正常代謝油脂功能所致。脂質過氧化產物是否能直接活化星狀細胞，引起肝纖維化，一直有爭議存在。一些細胞實驗的結果指出，脂質過氧化產物如 MDA 和 8-iso-PGF_{2α}，能直接活化星狀細胞^{83, 223, 224}。

因此更進一步分析 TGF-β1、MDA、8-iso-PGF_{2α} 和 15-keto-PGF_{2α} 對星狀細胞的影響。星狀細胞在 TGF-β1 給藥之後，與控制組相比，會造成細胞生長曲線下降約 10-15%，影響並不大。合併 MDA、8-iso-PGF_{2α} 和 15-keto-PGF_{2α} 時，對未活化的星狀細胞影響較小，但對在 TGF-β1(1 ng/ml) 刺激下的輕微活化後星狀細胞，MDA、8-iso-PGF_{2α} 和 15-keto-PGF_{2α} 等脂質過氧化產物，細胞生長曲線下降，以 MDA 最為明顯，8-iso-PGF_{2α} 和 15-keto-PGF_{2α} 次之。顯示脂質過氧化產物，的確會使輕微活化的星狀細胞生長曲線下降。

以 TGF- β 1(1 ng/ml)刺激輕微活化後的星狀細胞，加入 MDA、8-iso-PGF_{2 α} 和 15-keto-PGF_{2 α} 後，分析這些脂質過氧化產物對 α -SMA 表現，結果顯示，脂質過氧化產物，對 α -SMA 表現沒有影響，並不會促使星狀細胞進一步活化。偵測細胞早期凋亡的結果，MDA 組有較明顯的出現細胞早期凋亡的情形，8-iso-PGF_{2 α} 和 15-keto-PGF_{2 α} 的組別，沒有明顯影響。

雷射掃描共軛焦分光光譜顯微鏡下，也觀察到脂質過氧化產物不會刺激星狀細胞活化，不管是輕微活化或是沒有活化的星狀細胞。但是，MDA 組有明顯的出現細胞破損死亡的情形，8-iso-PGF_{2 α} 和 15-keto-PGF_{2 α} 的組別，則是對細胞沒有明顯的損傷。此項結果顯示，脂質過氧化產物不會使星狀細胞活化，可能是因為脂質過氧化產物會促使星狀細胞死亡。

Yang 等人發表，脂質過氧化產物是造成細胞凋亡的輔助因子²²⁵。活性氧分子能直接透過脂質過氧化過程，而破壞細胞膜，以及使粒線體失去功能，進而使細胞受損²²⁶。顯示脂質過氧化產物的確會對星狀細胞產生傷害。

Olynyk 學者指出 MDA 不會增加 α -SMA 的表現，不會直接引起星狀細胞活化²¹⁸。另外，Comporti 等人所發表 8-iso-PGF_{2 α} 只會在 10⁻⁸ 至 10⁻¹⁰ M 促使星狀細胞活化，但 8-iso-PGF_{2 α} 更高或更低的濃度並不會對星狀細胞產生影響⁸³。

由本實驗的結果得知，脂質過氧化產物不會直接活化星狀細胞，反而是受脂質過氧化產物影響，而有細胞凋亡現象。若在肝纖維

化情況下，雖會造成較多肝細胞死亡，但因活化態星狀細胞也因此而受損，所以整體而言並不會加重肝纖維化情況。

對正常生理狀態而言，過多脂質過氧化產物，雖不會使星狀細胞活化，但會造成細胞的凋亡，卻因為並沒有其他傷害造成更多的活性氧分子，加重傷害的情況，因此過多脂質過氧化產物造成的細胞受損，會被身體自我修復。

所以，導致纖維化的是：活性氧分子破壞肝細胞，釋出細胞激素，如 TGF- β 1，使星狀細胞活化而加速纖維化進行。在此同時，破壞肝臟細胞的細胞膜而產生的脂質過氧化產物也會被釋出。因此，偵測肝纖維化的同時，才會伴隨著高的脂質過氧化產物。

結論是脂質過氧化產物，如 MDA、8-iso-PGF_{2 α} 和 15-keto-PGF_{2 α} 等脂質過氧化產物，不會直接引起星狀細胞活化。

Table 11. Primer sequences for PCR amplification. (corn oil and / or CCl₄)

mRNA	Primer sequence	Length (bp)
<i>collagen (α1)(I)</i>	Sense 5' CGA CTA AGT TGG AGG GAA CGG TC3' Antisense 5' TGG CAT GTT GCT AGG CAC GAC3'	319
<i>TGF-β1</i>	Sense 5' TAT AGC AAC AAT TCC TGG CG3' Antisense 5' TGC TGT CAC AGG AGC AGT G 3'	162
<i>COX-2</i>	Sense 5'CATAGCAACAAAAGAGTCC3' Antisense 5' AAGAAGCCCCTGATACC3'	224
<i>MAT1A</i>	Sense 5' CGG TAG GAG AAG GGC ATC C3' Antisense 5' GGG ACT GTT GCT CCA GAG CC 3'	270
<i>MAT2A</i>	Sense 5' GCA TCT GCG CCC TCC GCA GT3' Antisense 5' GTG ACT GTT GTT CCA AGG CA3'	420
<i>GAPDH</i>	Sense 5' TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA 3' Antisense 5' CCT GCT TCA CCA CCT TCT TGA 3'	76

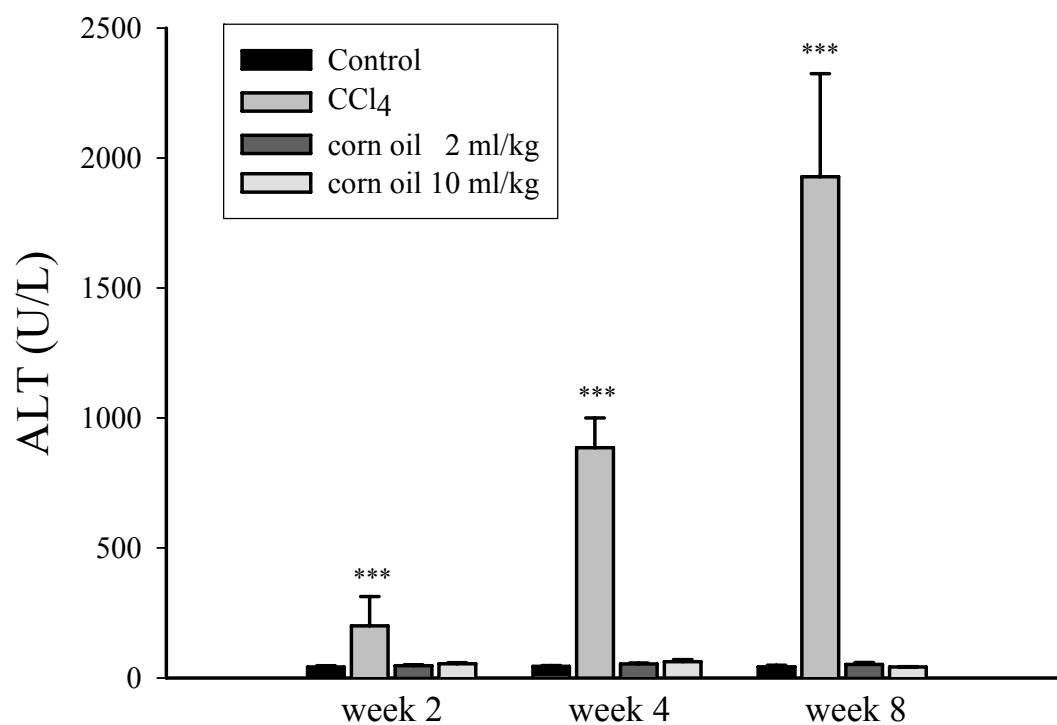


Fig 21. Effect of corn oil and / or CCl₄ on ALT activities in rats.

The carbon tetrachloride or corn oil was orally administered to rats and the three time points were week 2, 4, 8. The values are expressed as mean \pm S.D.. The one time point data were compared with relative control group. *** $P < 0.001$ compared with control group.

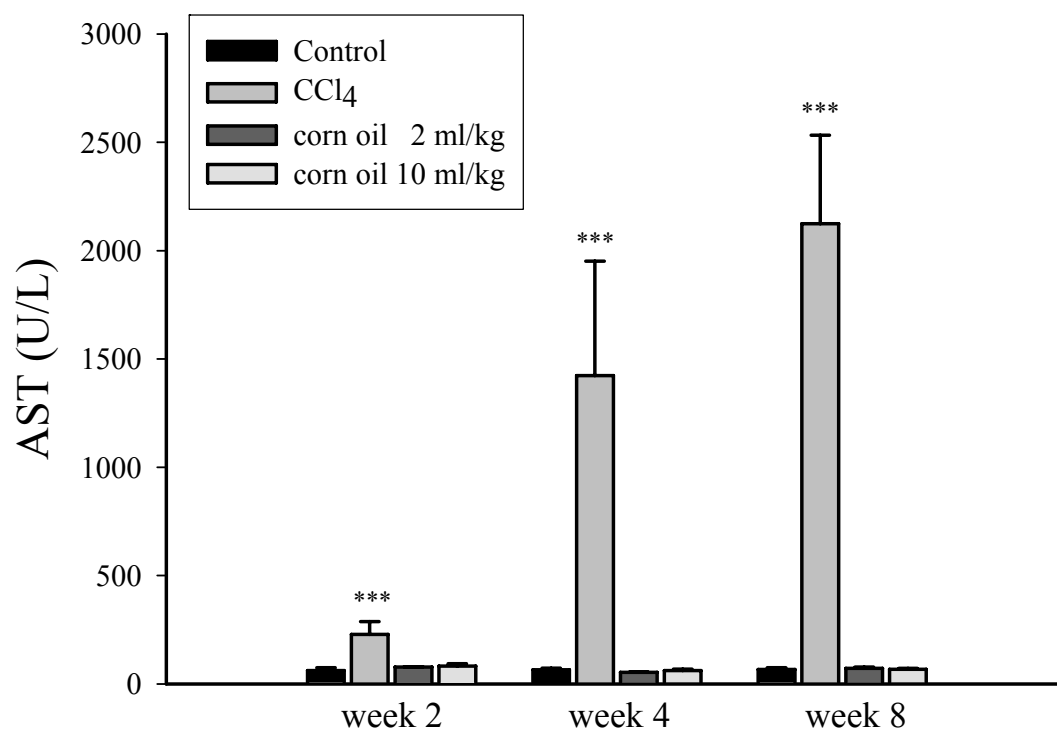


Fig 22. Effect of corn oil and / or CCl₄ on AST activities in rats.

The carbon tetrachloride or corn oil was orally administered to rats and the three time points were week 2, 4, 8. The values are expressed as mean \pm S.D.. The one time point data were compared with relative control group. *** $P < 0.001$ compared with control group.

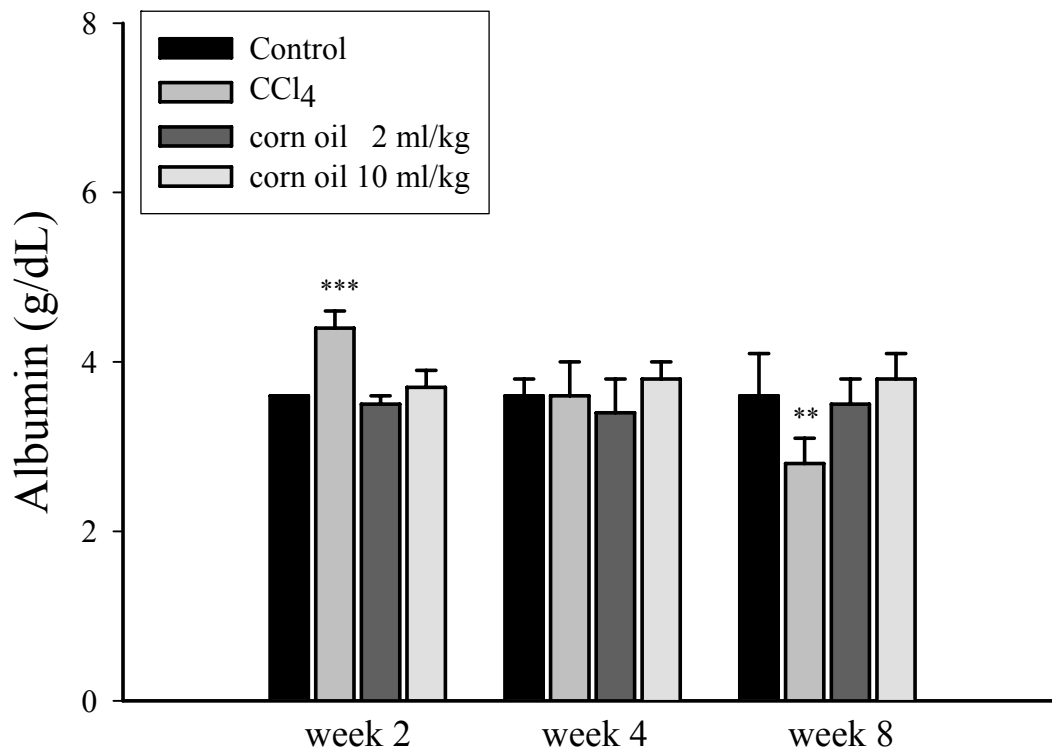


Fig 23. Effect of corn oil and / or CCl₄ on albumin in rats.

The carbon tetrachloride or corn oil was orally administered to rats and the three time points were week 2, 4, 8. The values are expressed as mean \pm S.D.. The one time point data were compared with relative control group.

*** $P < 0.001$ compared with control group.

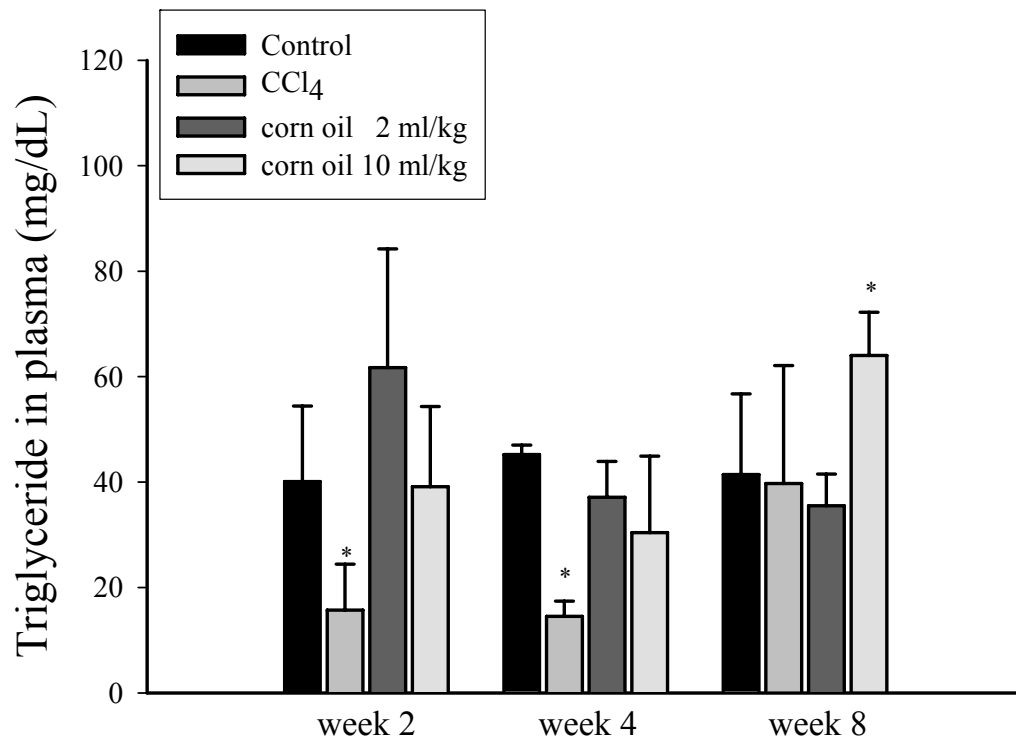


Fig 24. Effect of corn oil and / or CCl₄ on plasma triglyceride in rats.

The carbon tetrachloride or corn oil was orally administered to rats and the three time points were week 2, 4, 8. The values are expressed as mean \pm S.D.. The one time point data were compared with relative control group. * $P < 0.05$ compared with control group.

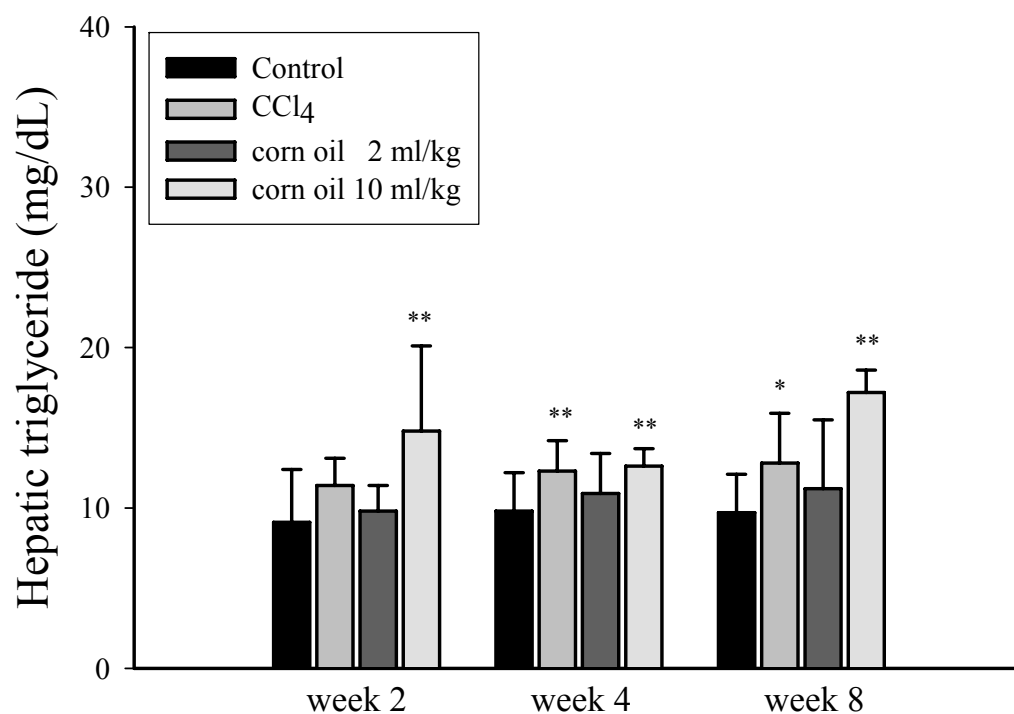


Fig 25. Effect of corn oil and / or CCl₄ on hepatic triglyceride in rats.

The carbon tetrachloride or corn oil was orally administered to rats and the three time points were week 2, 4, 8. The values are expressed as mean \pm S.D.. The one time point data were compared with relative control group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control group.

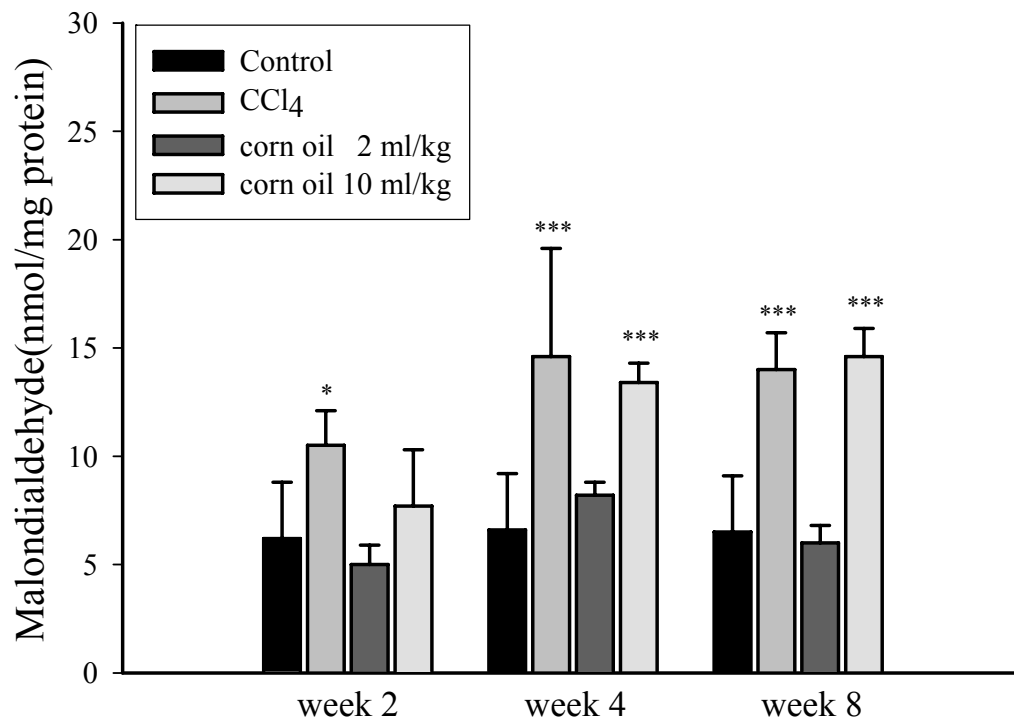


Fig 26. Effect of corn oil and / or CCl₄ on malondialdehyde in rats.

The carbon tetrachloride or corn oil was orally administered to rats and the three time points were week 2, 4, 8. The values are expressed as mean \pm S.D.. The one time point data were compared with relative control group. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ compared with control group.

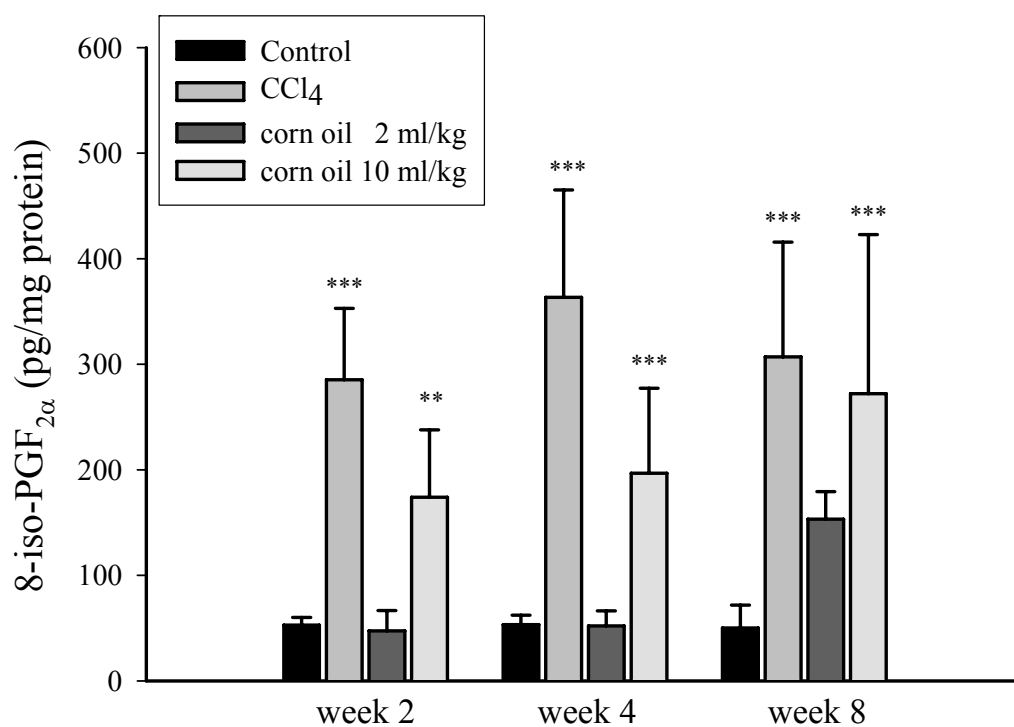


Fig 27. The biologic effect of 8-iso-PGF_{2α} on corn oil and / or CCl₄ treated rats.

The carbon tetrachloride or corn oil was orally administered to rats and the three time points were week 2, 4, 8. The values are expressed as mean ± S.D..

The one time point data were compared with relative control group. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with control group.

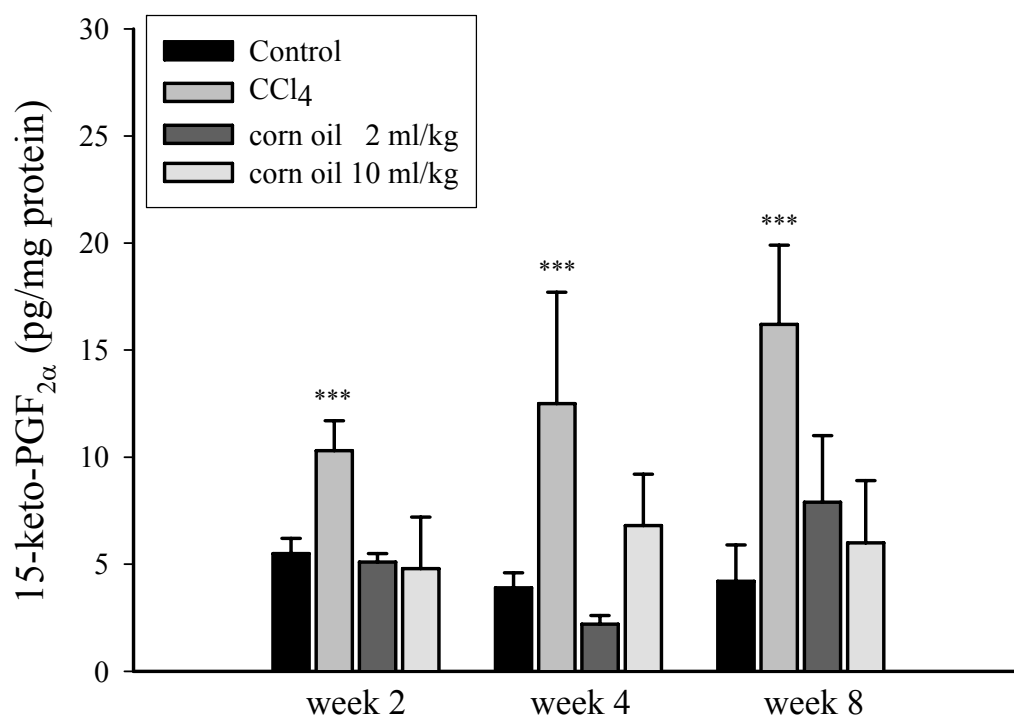


Fig 28. The biologic effect of 15-keto-PGF_{2α} on corn oil and / or CCl₄ treated rats.

The carbon tetrachloride or corn oil was orally administered to rats and the three time points were week 2, 4, 8. The values are expressed as mean ± S.D.. The one time point data were compared with relative control group. ****P* < 0.001 compared with control group.

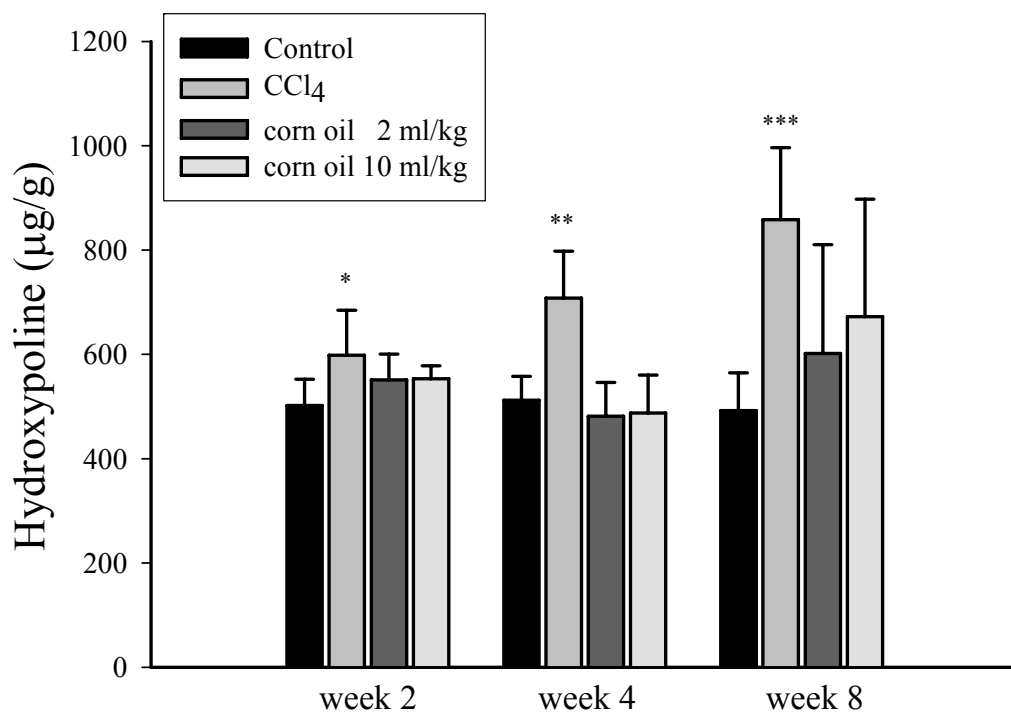


Fig 29. Effect of corn oil and / or CCl₄ on hydroxypoline in rats.

The carbon tetrachloride or corn oil was orally administered to rats and the three time points were week 2, 4, 8. The values are expressed as mean \pm S.D.. The one time point data were compared with relative control group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with control group.

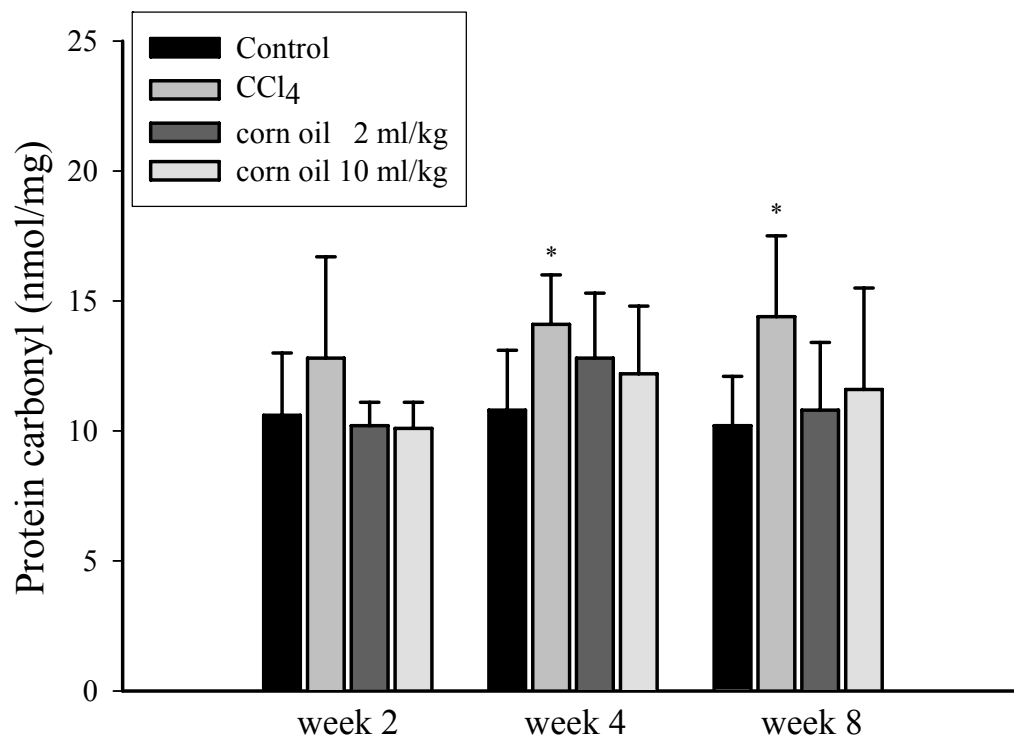


Fig 30. Effect of corn oil and / or CCl₄ on protein carbonyl in rats.

The carbon tetrachloride or corn oil was orally administered to rats and the three time points were week 2, 4, 8. The values are expressed as mean \pm S.D.. The one time point data were compared with relative control group. * $P < 0.05$ compared with control group.

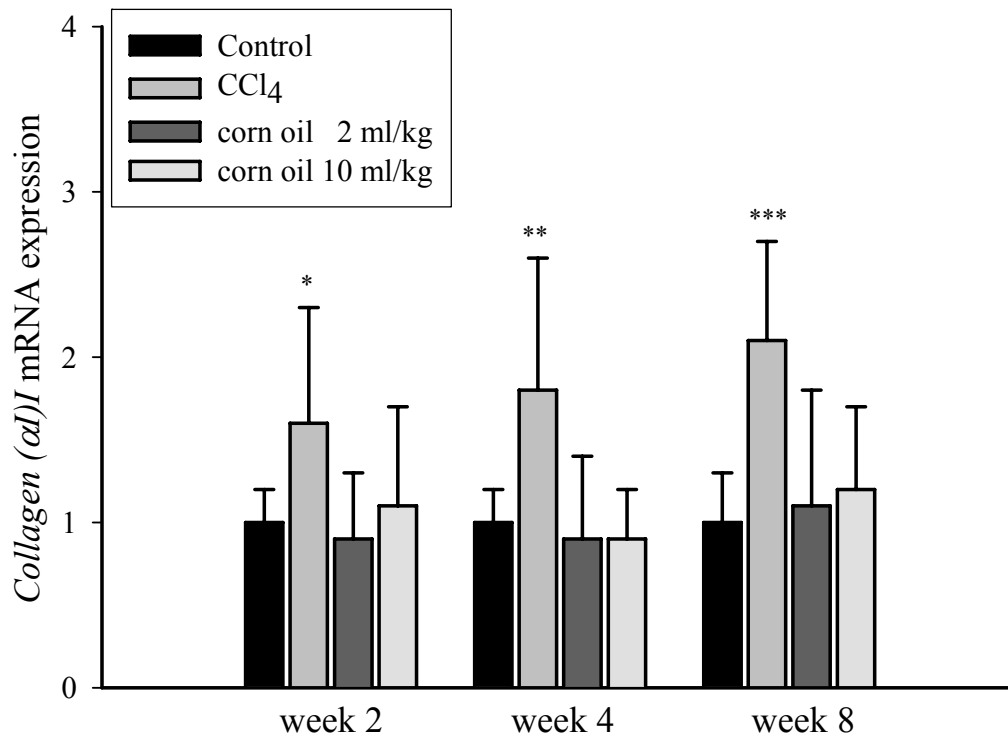


Fig 31. The *collagen(α1)I* mRNA expression of corn oil and / or CCl₄ in rats.

The carbon tetrachloride or corn oil was orally administered to rats and the three time points were week 2, 4, 8. The values are expressed as mean ± S.D.. The one time point data were compared with relative control group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with control group.

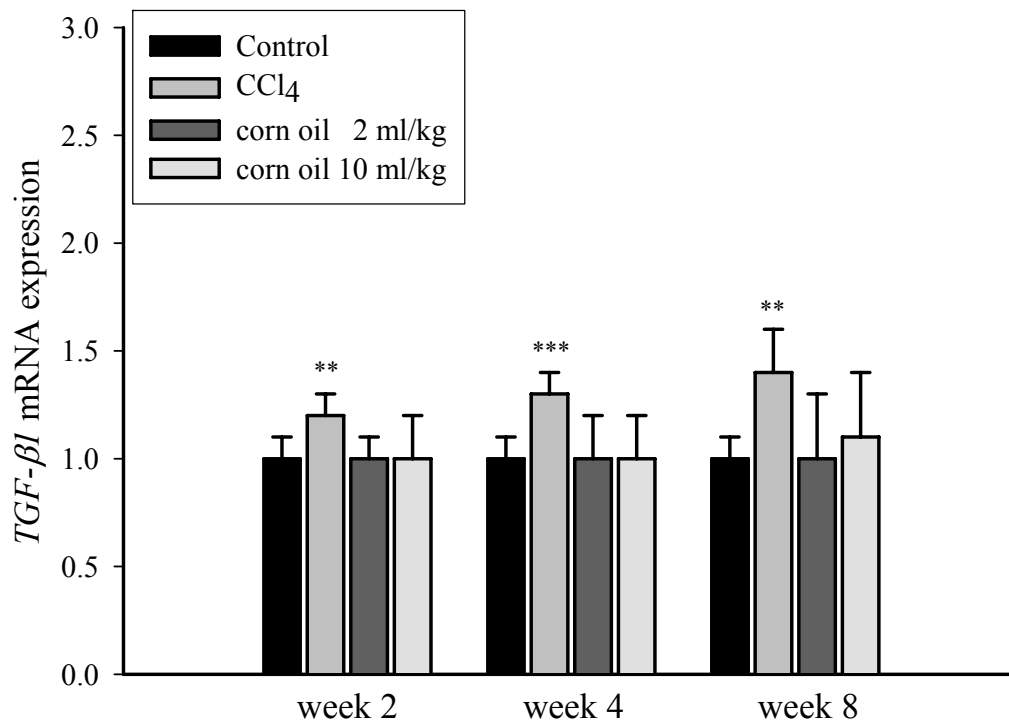


Fig 32. The *TGF-β1* mRNA expression of corn oil and / or CCl₄ in rats.

The carbon tetrachloride or corn oil was orally administered to rats and the three time points were week 2, 4, 8. The values are expressed as mean ± S.D..

The one time point data were compared with relative control group. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with control group.

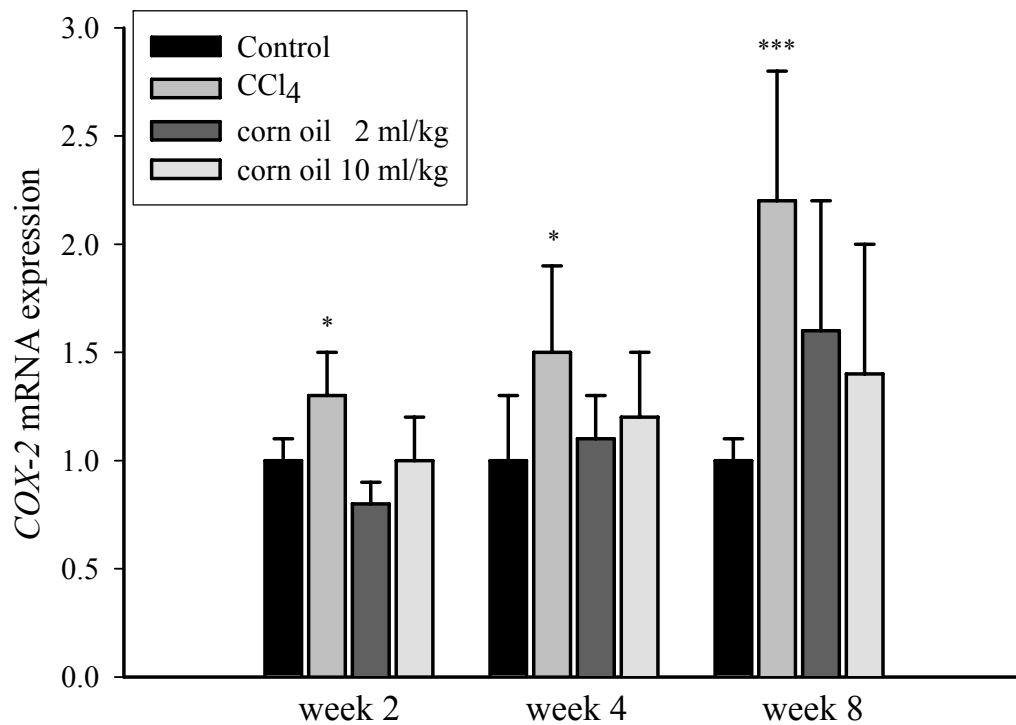


Fig 33. The *COX-2* mRNA expression of corn oil and / or CCl₄ in rats.

The carbon tetrachloride or corn oil was orally administered to rats and the three time points were week 2, 4, 8. The values are expressed as mean \pm S.D.. The one time point data were compared with relative control group. *** $P < 0.001$ compared with control group.

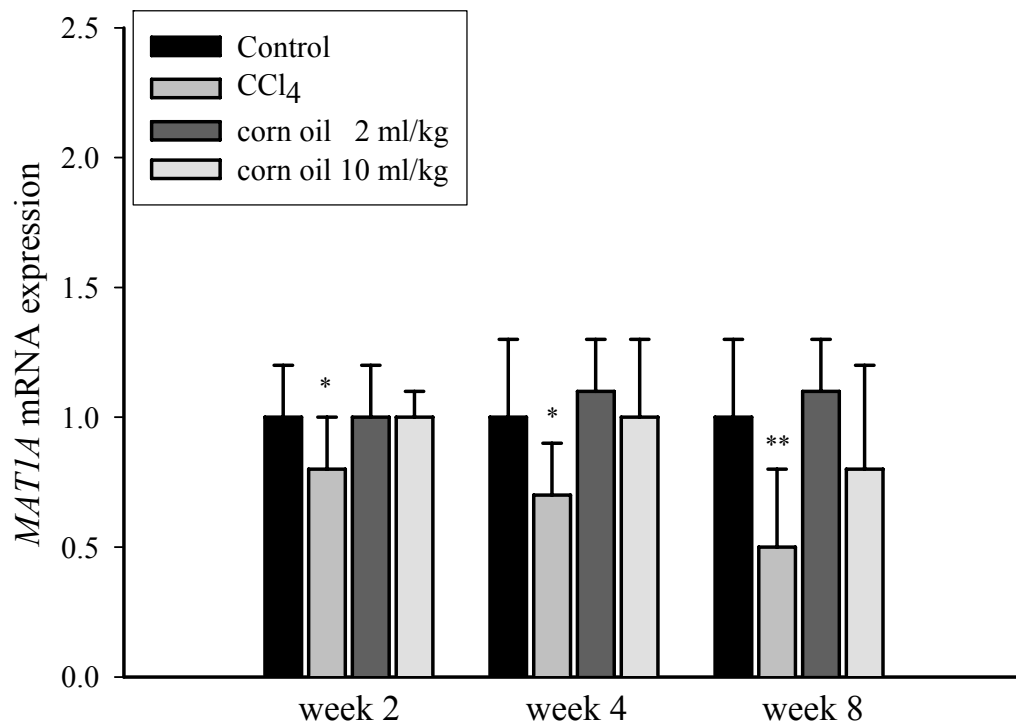


Fig 34. The *MAT1A* mRNA expression of corn oil and / or CCl₄ in rats.

The carbon tetrachloride or corn oil was orally administered to rats and the three time points were week 2, 4, 8. The values are expressed as mean \pm S.D..

The one time point data were compared with relative control group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control group.

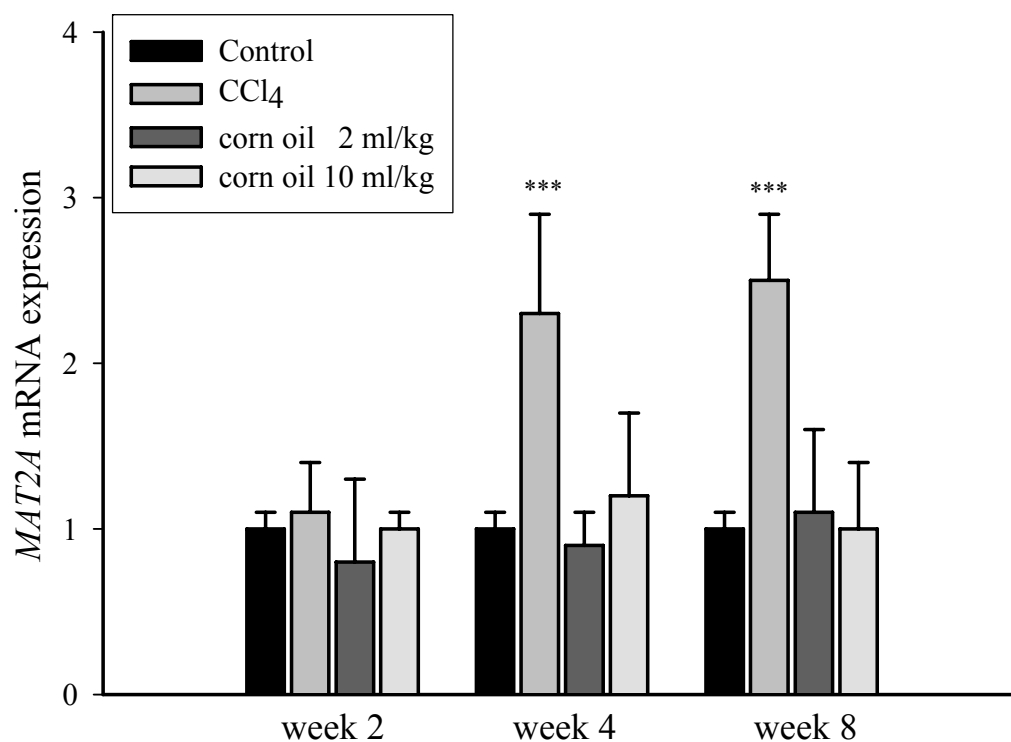


Fig 35. The *MAT2A* mRNA expression of corn oil and / or CCl₄ in rats.

The carbon tetrachloride or corn oil was orally administered to rats and the three time points were week 2, 4, 8. The values are expressed as mean \pm S.D.. The one time point data were compared with relative control group.

*** $P < 0.001$ compared with control group.

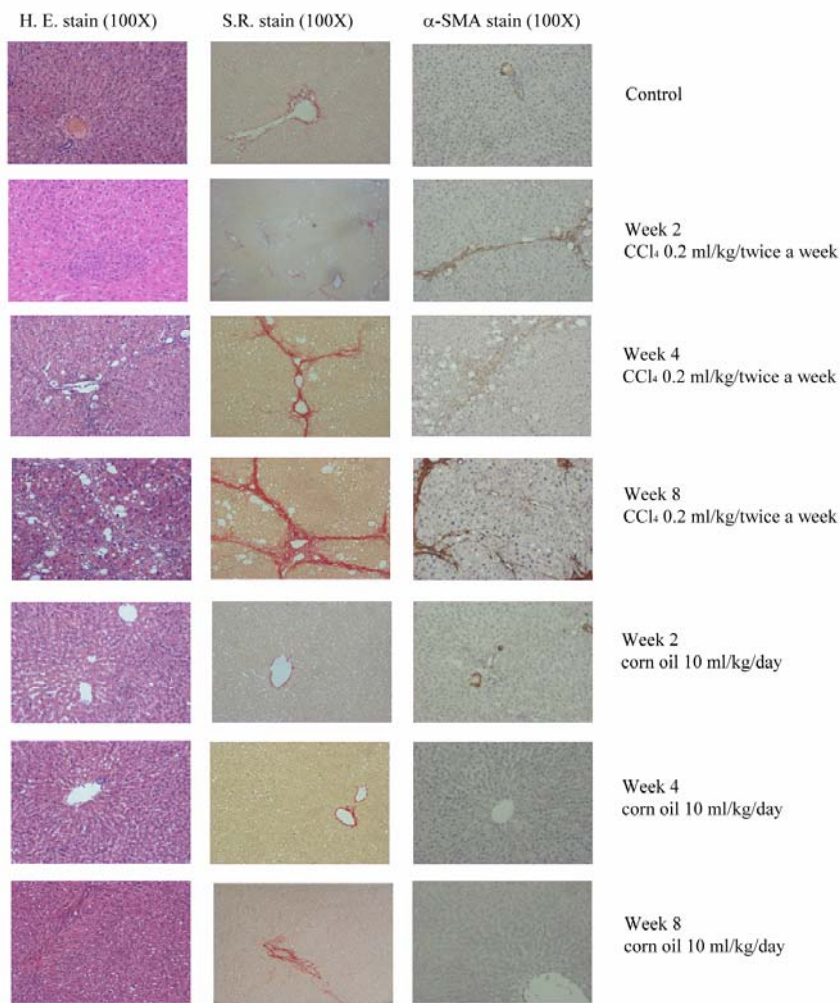


Fig 36. The histology and immunochemistry staining result of corn oil and / or CCl₄ treated rat liver.

The 1 left column were H.E. staining; the 2 left column were sirius red staining; and according α -SMA staining.

The according cells were the control group, week 2 CCl₄, week 4 CCl₄, week 8 CCl₄, week 2 corn oil (10 ml/kg), week 4 corn oil (10 ml/kg) group, and week 8 corn oil (10 ml/kg).

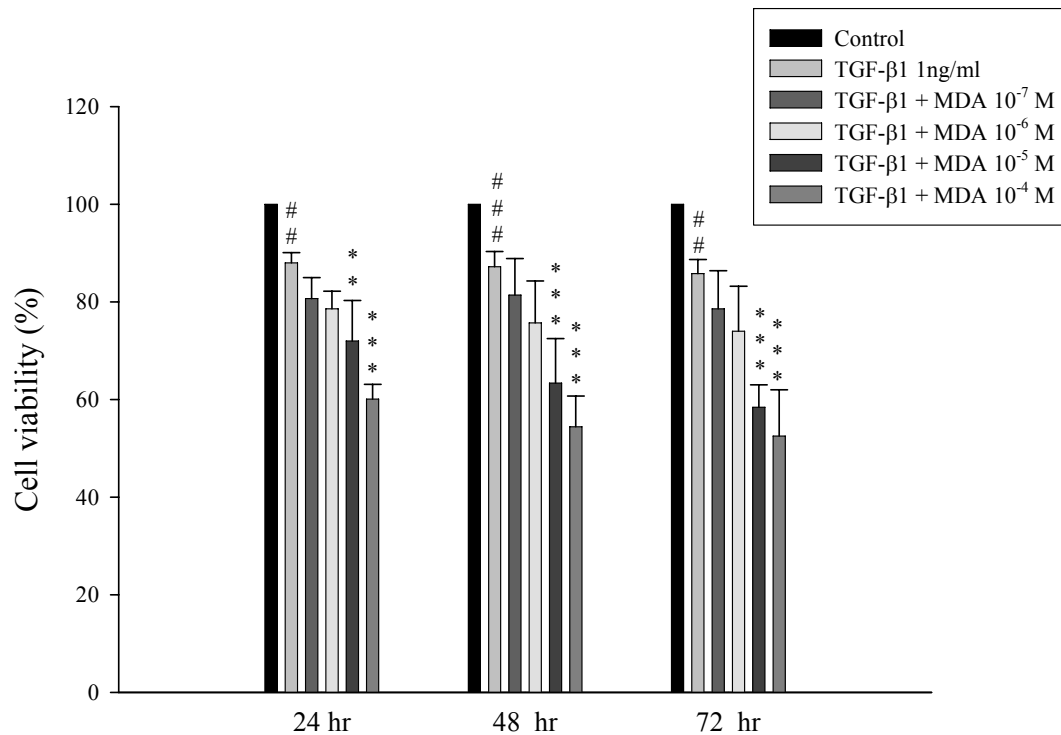


Fig 37. Effect of MDA on primary HSC viability induced by TGF-β1.

The cells were pretreated with TGF-β1 (1 ng/ml) initially for 24 hr. After pretreatment MDA (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} M) were added separately for 24, 48, 72 hr. The values are expressed as mean \pm S.D.. [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$ compared with control group at the same time period. ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$ compared with TGF-β1 group at the same time period.

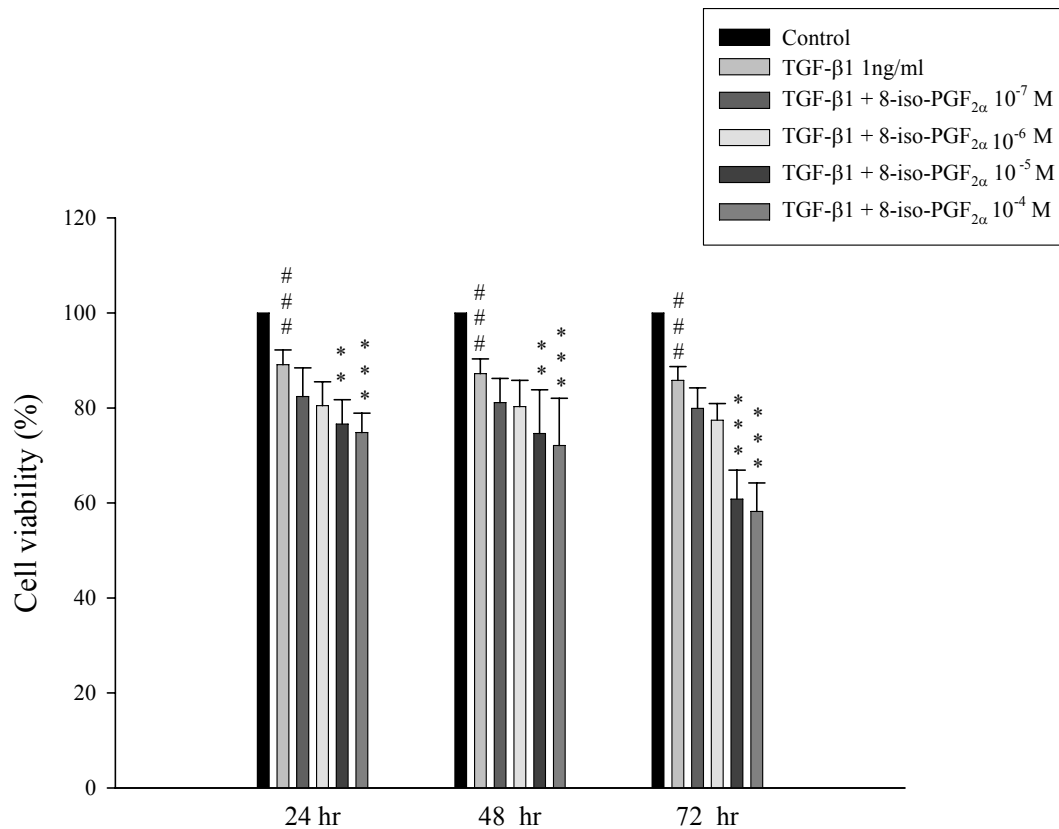


Fig 38. Effect of 8-iso-PGF_{2α} on primary HSC viability induced by TGF-β1.

The cells were pretreated with TGF-β1 (1 ng/ml) initially for 24 hr. After pretreatment 8-iso-PGF_{2α} (10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷M) were added separately for 24, 48, 72 hr. The values are expressed as mean ± S.D.. The one time point data were compared with relative control group. ^{###}*P* < 0.001 compared with control group at the same time period. ^{**}*P* < 0.01, ^{***}*P* < 0.001 compared with TGF-β1 group at the same time period.

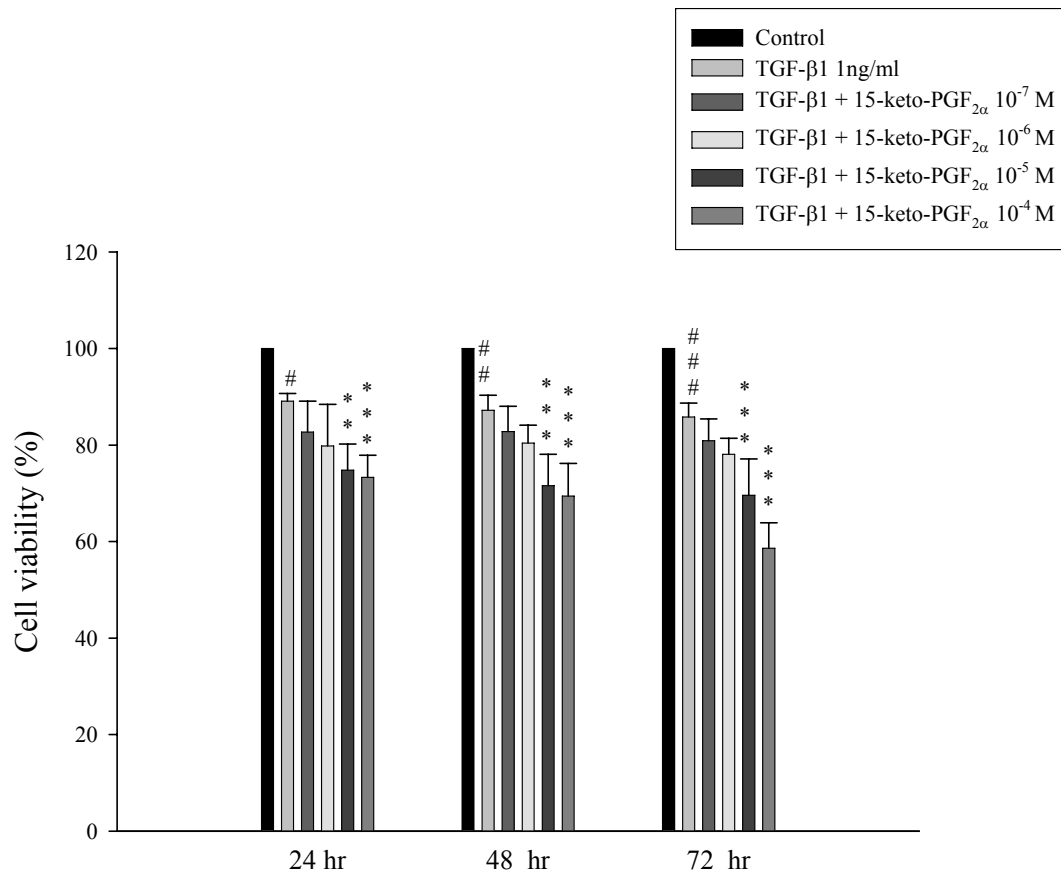


Fig 39. Effect of 15-keto-PGF_{2α} on primary HSC viability induced by TGF-β1.

The cells were pretreated with TGF-β1 (1 ng/ml) initially for 24 hr. After pretreatment 15-keto-PGF_{2α} (10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷M) were added separately for 24, 48, 72 hr. The values are expressed as mean ± S.D.. [#]*P* < 0.05, ^{##}*P* < 0.01, ^{###}*P* < 0.001 compared with control group at the same time period. ^{*}*P* < 0.01, ^{**}*P* < 0.01, ^{***}*P* < 0.001 compared with TGF-β1 group at the same time period.

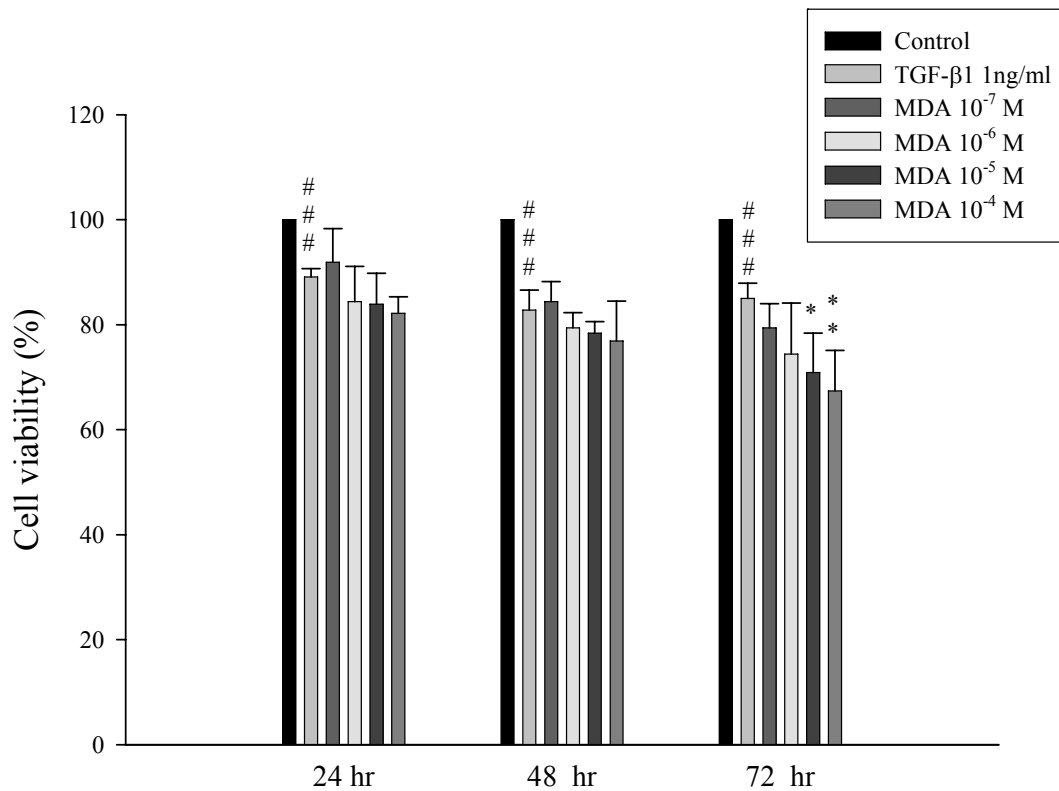


Fig 40. Effect of TGF-β1 or MDA on primary HSC viability.

The cells were treated with TGF-β1 (1 ng/ml) or MDA (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} M) were added separately for 24, 48, 72 hr. The values are expressed as mean \pm S.D.. ^{###} $P < 0.001$ compared with control group at the same time period. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with TGF-β1 group at the same time period.

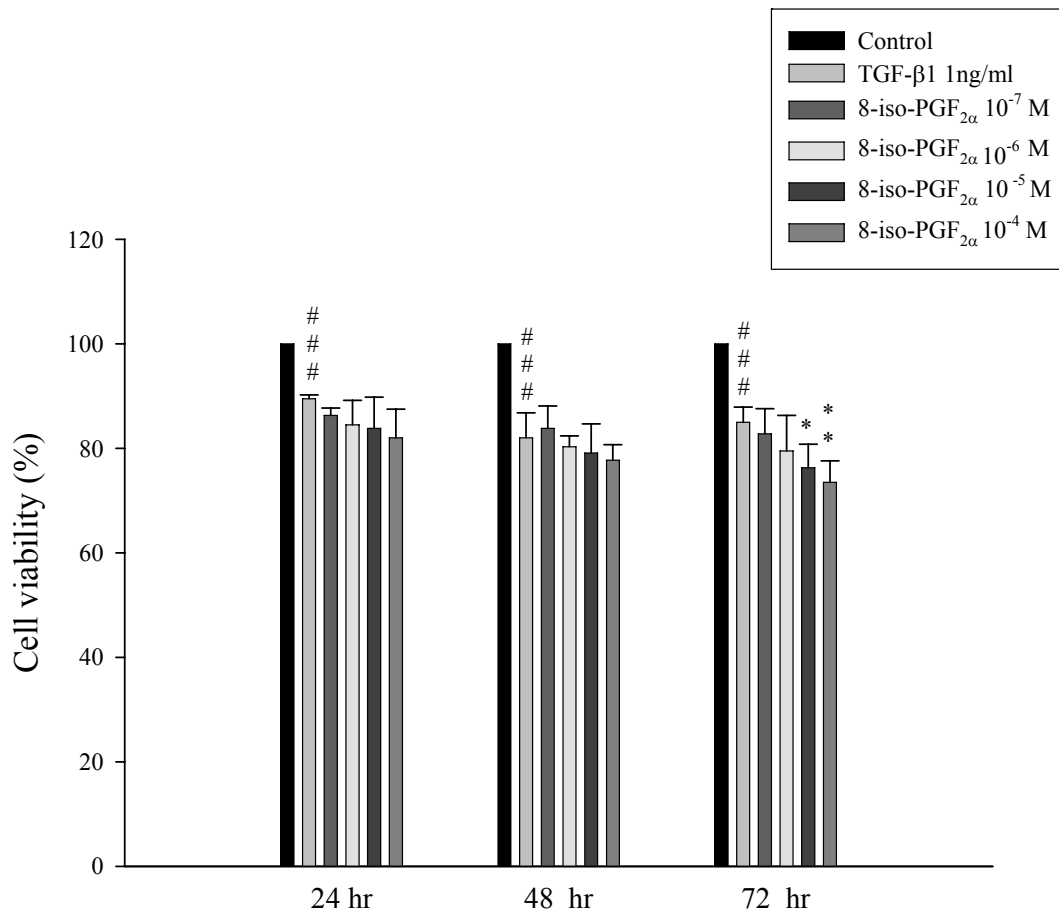


Fig 41. Effect of TGF-β1 or 8-iso-PGF_{2α} on primary HSC viability.

The cells were treated with TGF-β1 (1 ng/ml) or 8-iso-PGF_{2α}(10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷M) were added separately for 24, 48, 72 hr. The values are expressed as mean ± S.D.. ####*P* < 0.001 compared with control group at the same time period. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 compared with TGF-β1 group at the same time period.

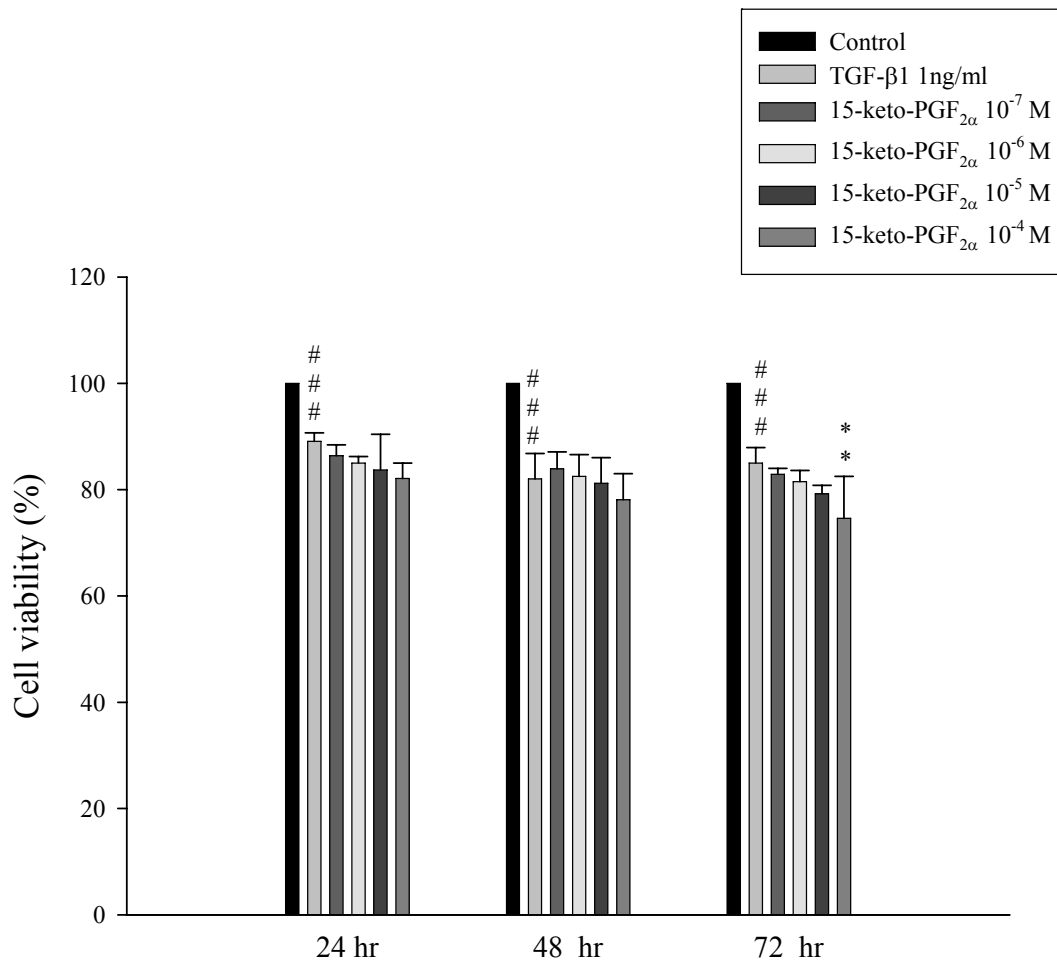


Fig 42. Effect of TGF-β1 or 15-keto-PGF_{2α} on primary HSC viability. The cells were treated with TGF-β1 (1 ng/ml) or 15-keto-PGF_{2α} (10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷M) were added separately for 24, 48, 72 hr. The values are expressed as mean ± S.D.. ###*P* < 0.001 compared with control group at the same time period. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 compared with TGF-β1 group at the same time period.

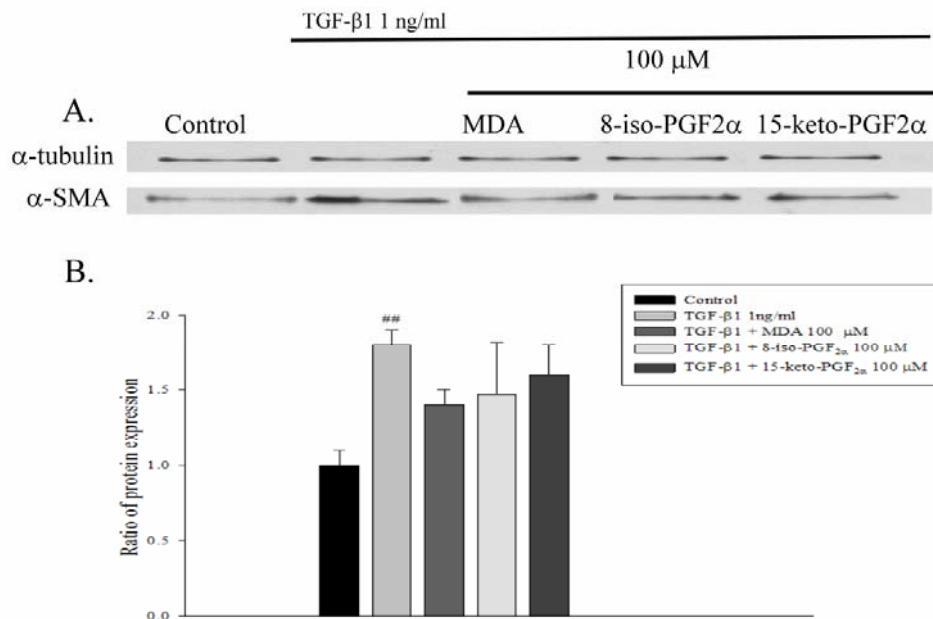


Fig 43. The Western blot result of α -SMA expression of primary hepatic stellate cells.

The cells were pretreated with TGF- β 1 (1 ng/ml) initially for 24 hr. After pretreatment MDA, 8-iso-PGF_{2 α} , 15-keto-PGF_{2 α} (10⁻⁴M) were added separately for 48 hr. The values are expressed as mean \pm S.D.. ^{##}*P* < 0.001 compared with control group.

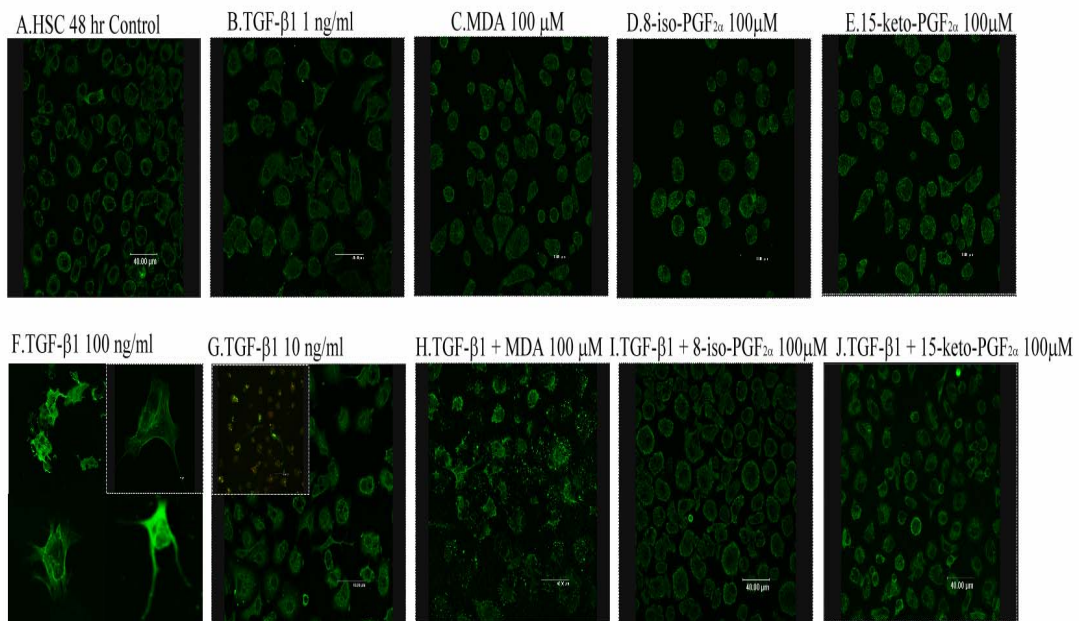


Fig 44. The confocal result of primary hepatic stellate cells.

A: control group. **B:** TGF- β 1 1 ng/ml treated 48 hr.

C, D, E: MDA, 8-iso-PGF $_{2\alpha}$, 15-keto-PGF $_{2\alpha}$ (100 μ M) treated.

F: fully active phenomenon of HSC.

G: TGF- β 1 10 ng/ml treated 48 hr and the contracted slide picture above is indicative of the autofluorescence distinction feature of HSC.

H, I, J: TGF- β 1 (1 ng/ml) pretreated 24 hr, after MDA, 8-iso-PGF $_{2\alpha}$, 15-keto-PGF $_{2\alpha}$ (100 μ M) were added separately for 48 hr.

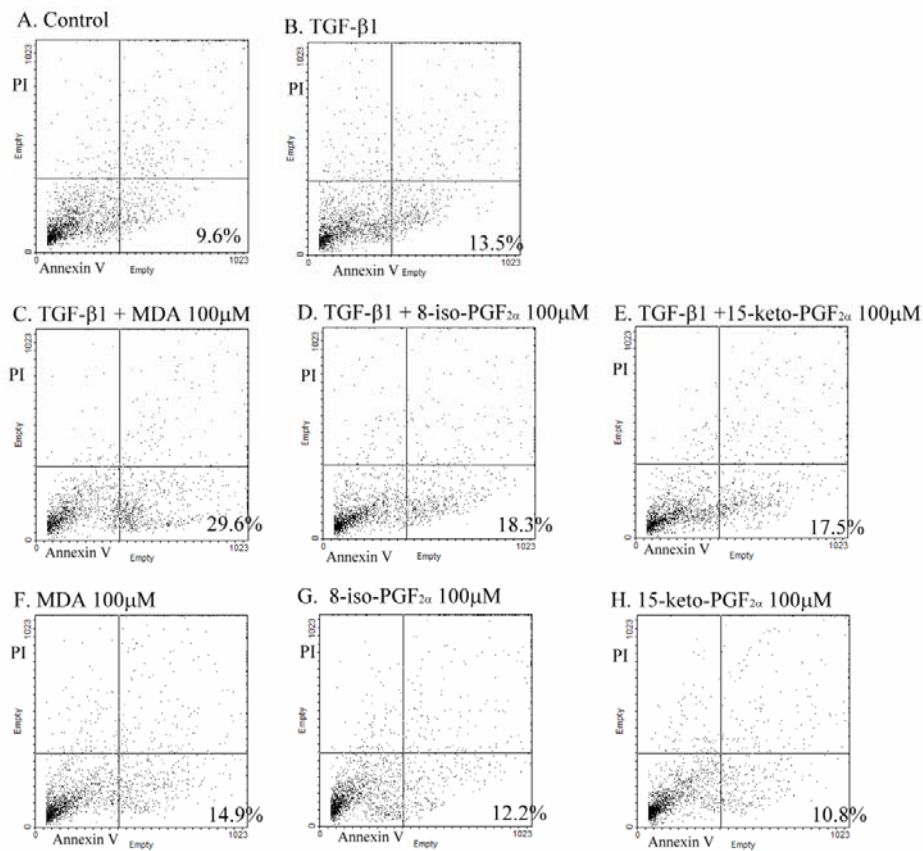


Fig 45. The Annexin-V staining for primary early apoptosis in hepatic stellate cell.

The percentage of annexin-V positive cells, resembling the apoptotic fraction.

A: control group. **B:** TGF- β 1 1 ng/ml treated 48 hr.

C, D, E: MDA, 8-iso-PGF $_{2\alpha}$, 15-keto-PGF $_{2\alpha}$ (100 μ M) treated.

F, G, H: TGF- β 1 (1 ng/ml) pretreated 24 hr, after MDA, 8-iso-PGF $_{2\alpha}$, 15-keto-PGF $_{2\alpha}$ (100 μ M) were added separately for 48 hr.

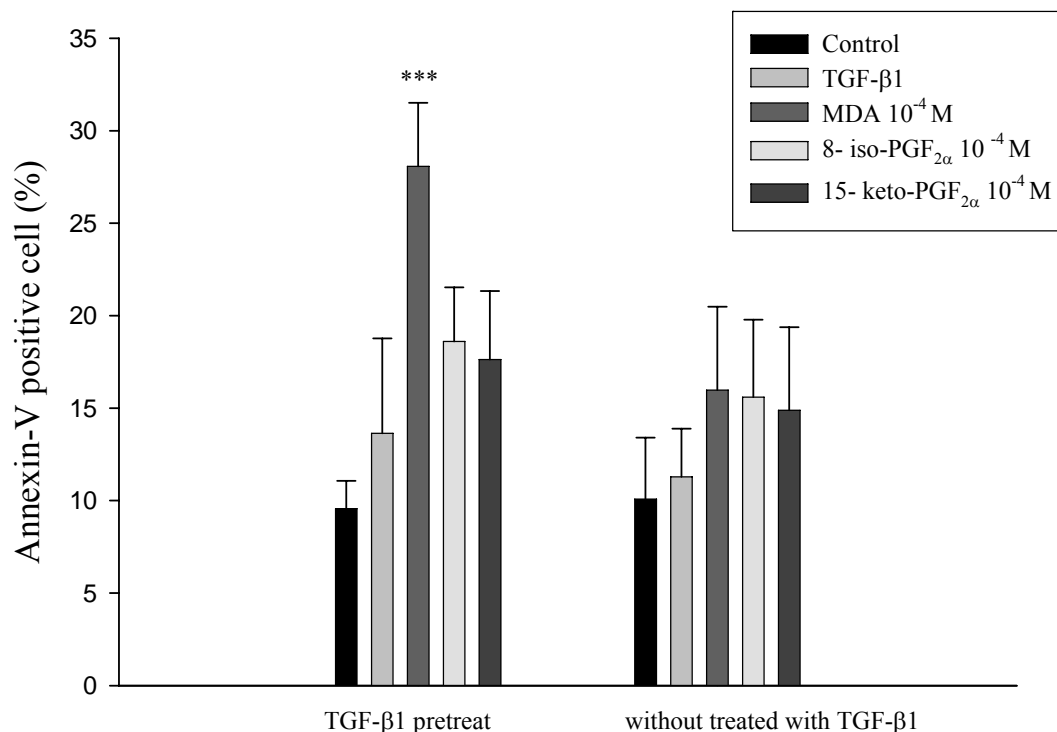


Fig 46. The Annexin-V staining for primary hepatic stellate cell early apoptosis. The left side cells were pretreated with TGF-β1 (1 ng/ml) initially for 24 hr. After pretreatment MDA, 8-iso-PGF_{2α}, 15-keto-PGF_{2α} (10⁻⁴M) were added separately for 48 hr. The right side cells were treated with MDA, 8-iso-PGF_{2α}, 15-keto-PGF_{2α} (10⁻⁴M) were added separately for 48 hr. The values are expressed as mean ± S.D.. ****P* < 0.001 compared with TGF-β1 group.

第六章 台灣金線連(*Anoectochilus formosanus*)之護肝作用評估

前言

台灣金線連(*Anoectochilus formosanus*)，屬於蘭科(Orchidaceae)金線連屬(*Anoectochilus*)，為一重要的台灣原生植物，其植物特徵為葉上有明顯中肋脈並鋪滿金色網狀支脈，葉呈綠中兼具金黃色，故名為金線連¹¹⁶。台灣金線連的主要成分水分佔約 87%以外，含有配醣體金線連醣(kinsenoside)¹⁵⁷。

台灣金線連的水粗抽出物，在過去研究中，顯示在 acetaminophen²²⁷、thioacetimide²²⁸、二甲基亞硝酸胺(dimethylnitrosamine)¹⁶³ 或四氯化碳^{163, 164}等動物誘導肝傷害模式下，均有明顯降低肝傷害之效果。

台灣金線連粗萃物能降低四氯化碳及 acetaminophen 引起之大鼠急性肝炎¹⁶²。本實驗室的研究也指出台灣金線連水萃物改善四氯化碳和二甲基亞硝酸胺引起的慢性肝炎^{163, 164}。在四氯化碳誘導肝損傷模式的實驗，證實金線連醣為主要保肝的有效成分¹⁶⁵。

本研究中，我們以含有金線連醣成分在台灣金線連有效分劃(*A. formosanus* effective fraction, AFEF)，以小鼠誘導四氯化碳肝纖維化模式評估其護肝功效。

材料與方法

一、AFEF 材料製備

台灣金線連購自有容農場(埔里，台灣)栽植之鮮品，以去離子水充分萃取，水萃液再經有機溶媒萃取，水溶部分經減壓濃縮至適當濃度後，此水層萃取物稱為 AFEF，儲存於-30°C 備用。使用前以去離

子水調配至適當濃度即可。AFEF 抽出率約 3 %。以高效能液相層析法確認 AFEF 中含有 kinsenoside 約 180 mg/g¹⁶⁵。

二、動物

實驗動物使用 ICR 雄性小鼠，購自國家實驗動物繁殖及研究中心。飼養環境維持 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ，相對溼度 $55 \pm 5\%$ ，光照為 12 小時亮 12 小時暗(早上七點亮，下午七點暗)的環境，自由飲水及攝食。

三、四氯化碳誘導之慢性肝毒性

小鼠每週兩次經口服投與四氯化碳，劑量為 0.1 ml/10g 體重，四氯化碳以橄欖油稀釋為 5% (v/v)，一週給兩次，持續 9 週。當小鼠體重約 26-30 g 時，開始進行實驗，將小鼠分成四個組別，其中三組均以四氯化碳誘導肝纖維化，三組中的兩組每天分別投予 AFEF (0.5 和 1.0 g/kg 體重，口服，每天)。第三組投予一次水，另外，第四組不投與四氯化碳，只投與一次水。每週秤體重一次，以作為給予實驗物質之依據。四氯化碳與實驗物質投予時間，相隔 5 小時以上。

四氯化碳給予滿 3、6 週時，自小鼠後眼窩血管叢採血，進行生化值分析。滿九週犧牲時，血液和肝臟處理方式如第二章所示。

四、肝功能分析

血液處理方式如第三章所述，測定項目為 alanine aminotransferase (ALT)。

五、肝臟羥基脯胺酸含量分析

測定方式如第二章所述。

六、肝臟脂質過氧化產物及蛋白質含量分析

測定方式如第二章所述。

七、RNA 萃取以及 mRNA 表現分析 (real-time quantitative reverse transcriptase- polymerase chain reactions, RT-qPCR)

實驗方式如第五章所述，本實驗主要的分析基因為 *MAT1A* (*methionine adenosyltransferase 1A*), *collagen (α1)(I)* 和 *TGF-β1* (*transforming growth factor-β1*)，使用的引子列於表十二。

八、病理檢驗

病理組織處理如第二章所述。進行蘇木青及伊紅染色及天狼星紅染色，以便評估肝纖維化程度。

九、統計方法

數據結果以平均值 (mean) ± 標準偏差 (standard deviation; SD) 表示。分析方式如前所述，以 *P* 值小於 0.05 表示在統計學上具有顯著差異。

結果

一、血漿 ALT 活性分析

如表十三所示，四氯化碳開始投與後，滿三、六、九週的小鼠之血漿 ALT 活性，均明顯高於控制組。AFEF 組(0.5、1.0 g/kg)均能降低因四氯化碳而增加的 ALT 活性。

二、肝臟羥基脯胺酸及脂質過氧化、蛋白質含量

如表十四所示，小鼠以四氯化碳誘發肝損傷時，肝臟羥基脯胺酸及脂質過氧化，與控制組相比，分別明顯增加了 40.9 % 和 30.6 %。給予 AFEF 高劑量組 (1.0 g/kg) 與四氯化碳組相比，分別降低了 20.1 %

和 17.0 %。

三、肝組織中基因 mRNA 表現結果分析

MAT1A、*collagen (α1)(I)* 和 *TGF-β1* 的 RT-qPCR 結果，如圖四十七-A。*MAT1A*，*collagen(α1)(I)*和 *TGF-β1* 量化後結果，如圖四十七-B 所示。四氯化碳組的 *MAT1A* 基因表現較對照組低，但給予 AFEF 1 g/kg 組則是明顯回升。*collagen I* 和 *TGF-β1* mRNA 在四氯化碳組表現則是明顯增加，投與 AFEF 高劑量組則是可以明顯降低因四氯化碳而增加的表現。

四、病理切片結果分析

四氯化碳組的切片染色結果顯示於中央靜脈區有明顯的細胞壞死，廣泛的發炎浸潤表現，和纖維化的病徵，結果如圖 四十八 B 及 2E。相較之下，投與 AFEF 1 g/kg 組的小鼠肝臟，則是呈現較輕微的細胞壞死及浸潤現象，結果如圖 四十八 C 及 2F，在細胞壞死方面及纖維化方面，AFEF 1 g/kg 組與控制組相比，均明顯降低 (細胞壞死：2.3 vs 3.2, $P < 0.05$ ；纖維化：2.5 vs 3.4 $P < 0.05$)。

討論

就本研究結果，AFEF 能降低大鼠因四氯化碳誘導肝纖維化的損傷。從生化指標及肝臟病理切片指標來分析，AFEF 能降低四氯化碳對肝臟之傷害，從 RT-PCR 分析纖維化相關基因的表現，亦印證此結果。AFEF 對肝臟的確有肝臟保護作用及減緩肝纖維化病程。

血漿中 ALT 活性為肝臟傷害之常見生化指標²²⁹。因四氯化碳引發的肝臟傷害的纖維化病程中，第三、六、九週的血漿 ALT 活性會明顯的增加。而 AFEF 能明顯的降低因四氯化碳而增加的 ALT 活性，能

減輕四氯化碳對肝臟的損傷。

甲硫胺酸腺甘基轉移酵素 (Methionine adenosyltransferase, MAT), 為肝臟中的重要酵素, 如與麩胱甘肽合成、檸檬酸循環相關²⁶。在哺乳動物組織中, MAT 蛋白有兩種形式, 一是 MAT I/III 和 MAT II, 分別由兩種不同的基因控制: *MAT1A* 和 *MAT2A*。*MAT1A* 會在正常肝臟組織表現的, 負責正常之運作³¹。而 *MAT2A* 則進行分化作用時會表現³²⁻³⁴。當肝臟受損時, *MAT1A* 表現會下降, 而 *MAT2A* 表現會被啟動¹⁹⁵。在本實驗中, 在四氯化碳的慢性肝損傷下, 會降低 *MAT1A* 的表現, 而 *MAT2A* 的表現則是增加的。AFEF 組的表現, 正好相反, 顯示 AFEF 在小鼠四氯化碳誘導肝損傷, 有肝臟保護作用。

肝纖維化認為是慢性肝炎的末期發展, 也包含了細胞外間質的大量聚集, 特別是膠原蛋白⁷⁰。羥基脯胺酸為膠原蛋白特殊的成分²³。膠原蛋白含量偵測可以藉由偵測羥基脯胺酸含量, 得知纖維化的嚴重程度²³。當四氯化碳引發肝纖維化時, 肝臟中羥基脯胺酸會明顯增加; AFEF 則能顯著的降低其含量。此 AFEF 能降低纖維化程度的結果, 亦能由病理染色結果得到確認。

肝纖維化時所增加的膠原蛋白主要為第一型¹⁹⁵。分析肝臟的膠原蛋白第一型之基因表現, 四氯化碳組與控制組相比會明顯增加, 而 AFEF 組則會顯著降低因四氯化碳而增加的膠原蛋白表現。此項結果顯示, AFEF 能降低膠原蛋白第一型的表現, 而減輕纖維化情形。

TGF- β 1 為促纖維化細胞激素, 因為其能藉由庫氏細胞和星狀細胞, 而直接刺激細胞外間質生成^{230, 231}。在肝纖維化的臨床及動物模式中, TGF- β 1 的基因表現會增加^{195, 197}。本研究中, 四氯化碳組會明顯

增加 TGF- β 1 之基因表現，而 AFEF 則可以明顯降低其表現。顯示 AFEF 減緩纖維化，可能是透過降低 TGF- β 1 所致。

過去認為脂質過氧化與四氯化碳誘導肝纖維化之間有密不可分之關係^{82, 195, 232, 233}。本研究指出，四氯化碳組有較高的脂質過氧化表現，而 AFEF 會抑制因四氯化碳而增加的脂質過氧化，故能肝纖維化情況較輕微。結論，此項研究結果顯示 AFEF 能減緩四氯化碳誘導之肝纖維化病程。



Table 12. Primer sequences for PCR amplification. (AFEF)

mRNA	Primer sequence	Length (bp)
<i>Collagen ($\alpha 1$)(I)</i>	Sense 5' CGA CTA AGT TGG AGG GAA CGG TC 3'	182
	Antisense 5' TGG CAT GTT GCT AGG CAC GAC 3'	
<i>TGF-β1</i>	Sense 5' TAT AGC AAC AAT TCC TGG CG 3'	162
	Antisense 5' TGC TGT CAC AGG AGC AGTG 3'	
<i>MAT1A</i>	Sense 5' AAA TGA AGA GGA TGT TGG TG 3'	264
	Antisense 5' ATT GTG TTG GCA CAG AGA GAT GA 3'	
<i>GAPDH</i>	Sense 5' CTT CAT TGA CCT CAA CTA CAT GGT CTA 3'	99
	Antisense 5' GATG ACA AGC TTC CCA TTC TCA G 3'	

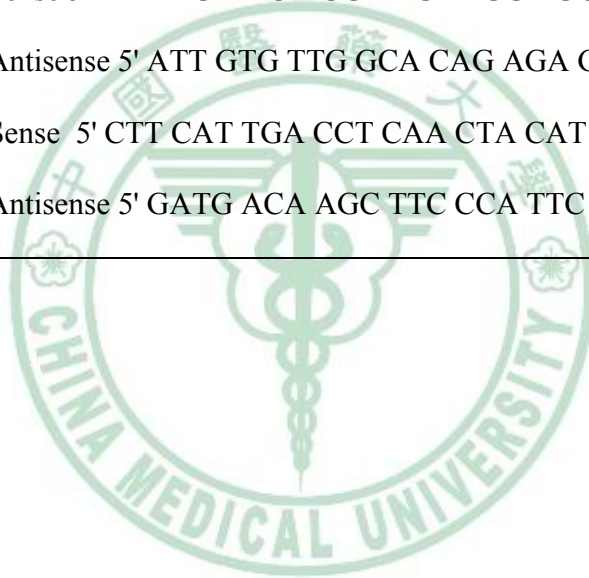


Table 13. Effect of AFEF on the activities of serum ALT in CCl₄-treated mice at 3, 6 and 9 weeks.

Drugs	Dose (g/kg)	ALT (U/L)		
		Week 3	Week 6	Week 9
Control	-	35.9 ± 3.8	34.0 ± 7.3	33.4 ± 10.7
CCl ₄ + H ₂ O	-	574.3 ± 56.7 ^{###}	759.0 ± 322.6 ^{###}	650.6 ± 170.9 ^{###}
+ AFEF	0.5	420.4 ± 159.2 ^{**}	543.8 ± 166.2	440.9 ± 221.2 [*]
	1.0	310.3 ± 109.3 ^{***}	331.0 ± 108.3 ^{***}	464.6 ± 194.3 [*]

Data are mean ± S.D.. (n=10). ^{###}*P* < 0.01 compared with control group.

^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01, ^{***}*P* < 0.001 compared with CCl₄ + H₂O group.

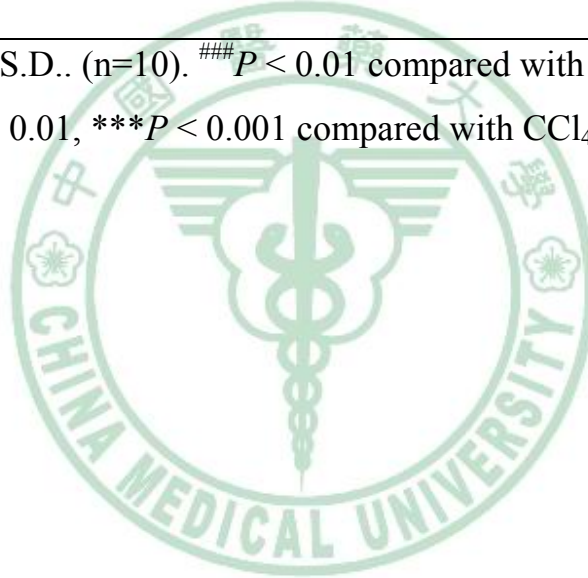
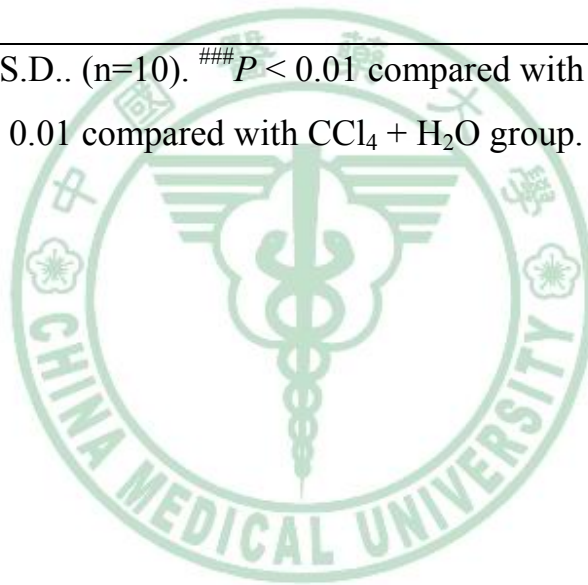


Table 14. Effect of AFEF on the hepatic hydroxyproline and malondialdehyde in CCl₄-treated mice.

Drugs	Dose (g/kg)	Hydroxyproline (μg /g tissue)	Malondialdehyde (nmol /mg protein)
Control	-	490.5 \pm 76.1	3.6 \pm 0.9
CCl ₄ + H ₂ O	-	691.0 \pm 167.1 ^{###}	4.7 \pm 0.3 ^{###}
+ AFEF	0.5	622.9 \pm 51.8	4.6 \pm 0.3
	1.0	552.2 \pm 79.0*	3.9 \pm 0.3**

Data are mean \pm S.D.. (n=10). ^{###}*P* < 0.01 compared with control group.

P* < 0.05, *P* < 0.01 compared with CCl₄ + H₂O group.



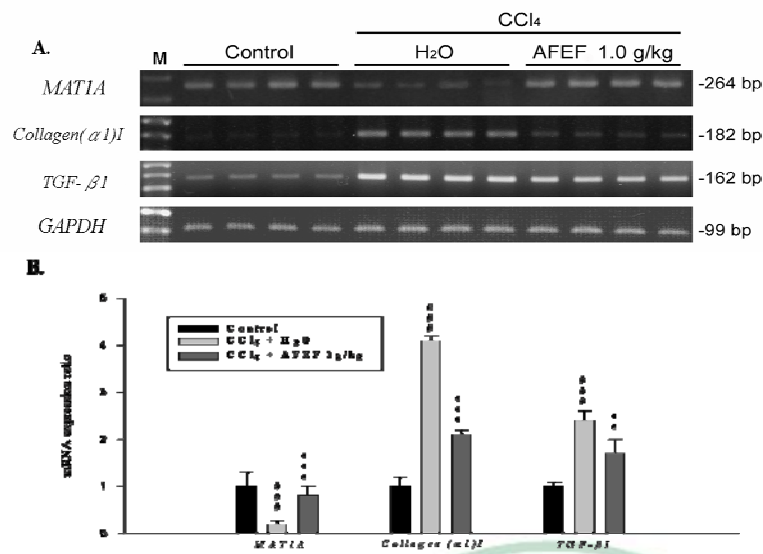


Fig 47. Effects of AFEF on hepatic mRNA expression of *MAT1A*, *collagen (α1)I* and *TGF-β1* in CCl₄-treated mice.

(A) Representative RT-qPCR amplification products of *MAT1A*, *collagen (α1)I* and *TGF-β1* in CCl₄-treated mice. (B) Densities of *collagen (α1)I*, *collagen (α1)III*, *TGF-β1* and *MAT2A* relative to *GAPDH* mRNA levels were analyzed by computerized densitometry and are expressed as *MAT1A/GAPDH*, *collagen (α1)I/GAPDH* and *TGF-β1/GAPDH* ratios, respectively. Data are expressed as the mean ± S.D. (n=10). ^{###}*P* < 0.001 compared with the control group. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, compared with the CCl₄ + H₂O group.

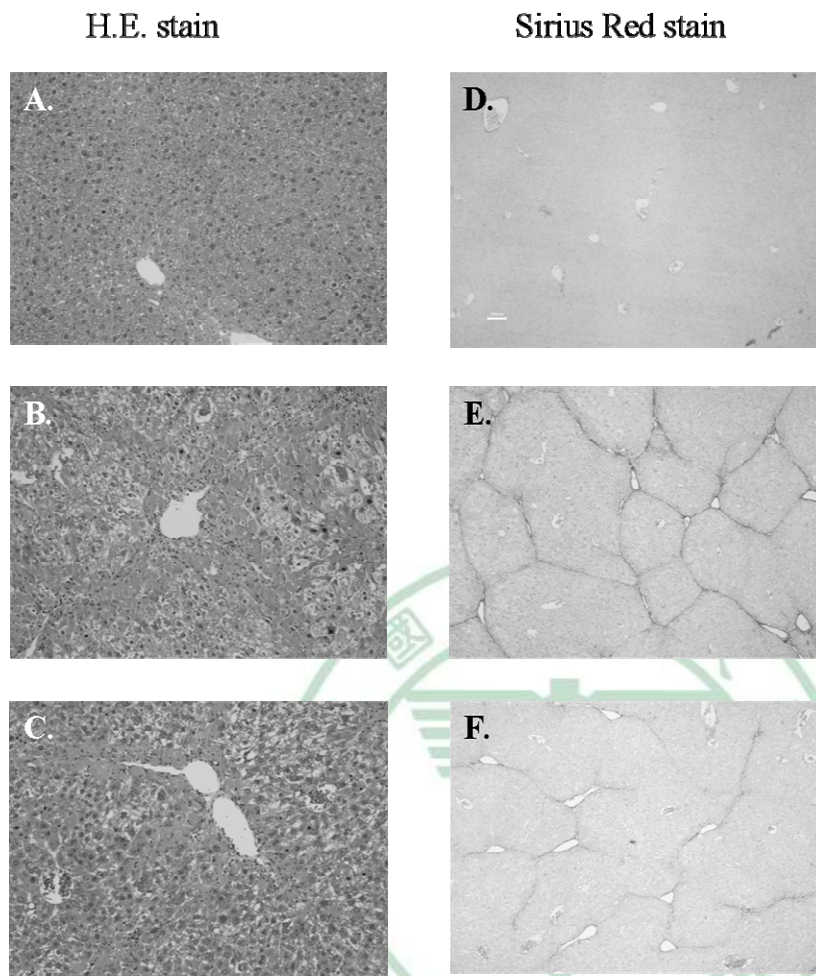


Fig 48. Treatment with AFEF improved the histology of CCl₄-treated mice liver.

(A-C) H.E. staining; (D-F) Sirius red staining. A, D: control group; B, E: CCl₄ + H₂O group; C, F: CCl₄ + AFEF (1.0 g/kg) group.

第七章 枳椇子 (*Hovenia dulcis*) 果實酒精萃取物對小鼠慢性肝纖維化模式之影響

前言

枳椇子(*Hovenia dulcis*)，為傳統中藥，為急性酒精中毒解毒劑，止吐和緩瀉劑¹⁷。

果實內成分含有類黃酮 (flavonoids)，如(+)-ampelopsin、hovenitins I¹⁷。藥理學研究結果指出 hovenitin I 對小鼠 D-galactosamine/lipopolysaccharide 或四氯化碳模式的肝損傷有保護作用¹⁷。Hase 等人的報告指出，(+)-ampelopsin 也有肝保護作用¹⁹。

枳椇子對於慢性肝損傷的作用仍然不清楚。本實驗的目的要探討枳椇子之酒精萃取物對於小鼠四氯化碳誘導慢性肝損傷的影響。

方法與材料

一、試劑

1. Sigma-Aldrich, USA : Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), Catechin。

二、植物提取物製備

枳椇子購自於台中草藥市場，經由中國醫藥大學中國藥學研究所陳忠川教授鑑定，確認無誤。

枳椇子的傳統炮製法為浸泡於酒中，所以本實驗採用酒精萃取有效成分。枳椇子 (20 kg) 用 40 公升酒精萃取三次，之後過濾，溶媒於 50⁰C 進行減壓濃縮，酒精萃取得的濃縮物(ethanolic extract of the fruit of *Hovenia dulcis*, EHD) 冰存於-30⁰C 備用。萃取率約 16 %。

三、酚類化合物及抗氧化活性測試

植物中酚類化合物含量，被視為一種具有抗氧化能力和抗自由

基效果的特徵²³⁴。許多報告指出含有高抗氧化物質，多數有抗纖維化作用^{67, 235}。此實驗中，分析總酚類含量及自由基清除能力，確認本實驗物質的藥理作用特性。

總酚類含量測試法：以 Folin-Ciocalteu 反應法¹¹⁸。取枳椇子萃取液 1 ml 加入 0.1 ml Folin-Ciocalteu 和 0.2 ml 10% Na₂CO₃。混合均勻後，水浴 99°C 1 分鐘。待冷卻後，以分光光度計 (Hitachi U-2001) 700 nm 測定反應後產物吸光值，以 catechin 為標準品。

EHD 的 DPPH 自由基清除能力測試，修改自 Chang 等人²³⁶之方法，以 0.1 mM DPPH/methanol 加入不同濃度萃取液或以 methanol 當對照組。室溫下靜置 30 分鐘，於分光光度計以波長 517 nm 測試。

四、動物

實驗動物使用 ICR 雄性小鼠，購自國家實驗動物繁殖及研究中心。飼養環境維持 22 ± 3°C，相對溼度 55 ± 5%，光照為 12 小時亮 12 小時暗(早上七點亮，下午七點暗)的環境，自由飲水及攝食。

五、四氯化碳誘導肝損傷模式

小鼠之四氯化碳誘導方式如第六章所述，EHD 劑量為 0.5 或 1.0 g/kg 體重，口服，每天給藥。實驗時間共為九週。

給四氯化碳滿三和六週後，收集小鼠後眼窩血管叢之血液，進行生化值分析。滿九週小鼠犧牲時，血液和肝臟處理方式如前所述。

六、肝臟功能分析

血漿處理如第三章所述，分析項目為 alanine aminotransferase (AST)、aspartate aminotransferase (ALT)。

七、肝臟脂質過氧化產物和羥基脯胺酸含量分析

肝臟脂質過氧化產物和羥基脯胺酸含量測定，如第二章所述。

八、RNA 萃取以及 mRNA 表現分析 (real-time quantitative reverse transcriptase- polymerase chain reactions, RT-qPCR)

實驗處理如第五章所述。

本實驗主要的分析基因為 *collagen (α1)(I)* , *collagen (α1)(III)* , *methionine adenosyltransferase 1A (MAT1A)* 和 *methionine adenosyltransferase 2A (MAT2A)* , 詳細引子如表十五所述。

九、病理檢驗

病理組織處理如第二章所述。進行蘇木青及伊紅染色 (Hematoxylin 和 Eosin stain) 及天狼星紅染色 (Sirius Red stain) , 以便評估肝纖維化程度。

肝纖維化判斷及統計分析方法，如第二章所述。

十、統計方法

數據結果以平均值 (mean) ± 標準偏差 (standard deviation , SD) 表示，統計方式如前所述，以 *P* 值小於 0.05 表示在統計學上具有顯著差異。

結果

一、酚類化合物及抗氧化活性測試

1. 測得 EHD 總酚類含量為 27.2 μg/mg 。
2. EHD 和 catechin 相對清除 DPPH 50 % 的能力，分別為 0.94 mg/ml 、5.42 μg/ml 。EHD 具有明顯的清除 DPPH 自由基的能力。

二、血漿中 AST 和 ALT 活性

如表十六所示，第三、六和九週的小鼠 ALT 和 AST 血液生化值，單獨給予四氯化碳組，會明顯高於控制組，且此組的數據，有時間依賴性的關係，以第九週數值最高。而投與 EHD (0.5 或 1.0 g/kg) 的組別，則是在第三週與四氯化碳組相比，明顯降低 ALT 和 AST 的活性。EHD 1.0 g/kg 的劑量，則在第六週及第九週都能降低因四氯化碳而增加的 ALT 和 AST 活性。

三、肝臟脂質過氧化及羥基脯胺酸含量

如表十七所示，四氯化碳組能增加小鼠中肝臟脂質過氧化產物和羥基脯胺酸含量，相較於控制組分別高出 60% 和 66.7%。投與 EHD (0.5、1.0 g/kg) 能明顯降低肝臟脂質過氧化產物和羥基脯胺酸含量，相較於四氯化碳組分別降低了 18.8%、31.3% 和 22.5%、25.4%。

四、肝組織中基因 mRNA 表現結果分析

如圖四十九所示，肝臟組織的 RT-qPCR 基因表現分析，包括 *collagen (α1)(I)*、*collagen (α1)(III)* 和 *MAT2A*，四氯化碳組分別高出控制組 46.1%、70.0% 和 140.0%。EHD 1.0 mg/kg 組與四氯化碳組相比較，能降低 *collagen (α1)(I)*，*collagen (α1)(III)* 和 *MAT2A* mRNA 的表現，分別降低 18.2%、29.4% 和 41.7%。四氯化碳組的 *MAT1A* 的基因表現，低於對照組 50.4%，EHD 1.0 mg/kg 組比四氯化碳組增加 96.4%。

五、病理切片結果分析

四氯化碳組的切片染色結果，顯示於中央靜脈區有嚴重的細胞壞死，廣泛的發炎浸潤表現，和纖維化的病徵，結果如圖五十 B 及五十 E，統計結果如表十六。相較之下，投與 EHD 的小鼠肝臟，則是呈

現較輕微的細胞壞死及浸潤現象，結果如圖 五十 C 及 五十 F，統計結果如表十六所示。

討論

本實驗結果顯示，小鼠口服投與枳椇子之酒精萃取物，能有效的降低四氯化碳所誘發之肝纖維化。可以從 ALT 和 AST 的血液生化值中，以及肝臟的 *collagen (α1)(I)* 和 *collagen (α1)(III)* mRNA 表現的結果得到印證。

ALT 和 AST 等兩項血液生化值，被認為肝臟細胞壞死的重要生化指標²¹¹。在小鼠投與四氯化碳誘發肝細胞受損，血液中 ALT 和 AST 活性，在第三、六、九週有明顯的增加。第三週時，EHD 能明顯降低 ALT 和 AST 活性，顯示 EHD 有明確的肝細胞保護作用。枳椇子的肝保護作用在第六和第九週變弱，這可能是因為慢性四氯化碳在第六週和第九週時，肝臟傷害越來越嚴重，低劑量的 EHD 無法抵抗四氯化碳毒性所致。

當肝臟受損時，*MAT1A* 表現會下降，而 *MAT2A* 表現會被啟動¹⁹⁵。在本實驗中，在四氯化碳的慢性肝損傷下，會降低 *MAT1A* 的表現，而 *MAT2A* 的表現則是增加的。EHD 組的表現，正好相反，更支持了 EHD 對小鼠四氯化碳誘導肝損傷有保護作用。

肝纖維化是慢性肝發炎的修復過程，會使細胞外間質 (extracellular matrix protein) 聚集，特別是膠原蛋白⁷⁰。而羥基脯氨酸是膠原蛋白中的特有胺基酸成分²³。羥基脯氨酸的量，會反應出膠原蛋白的聚集的程度，可以藉由羥基脯氨酸的量來評估纖維化程度²³。當四氯化碳誘導肝損傷時，羥基脯氨酸含量會明顯增加，EHD 組的小鼠肝臟

可以降低羥基脯氨酸含量，顯示 EHD 組的纖維化程度較輕。此外，許多研究指出，在肝纖維化時，膠原蛋白第一型和第三型表現會明顯上升²³⁷。本實驗的 EHD 組 *Collagen (α 1)(I)* 和 *collagen (α 1)(III)* 的 mRNA 表現結果明顯降低。這些結果也與病理切片結果相互印證，EHD 確能減緩四氯化碳誘導的肝損傷。

四氯化碳誘導肝毒性的機轉，主要會增加自由基的生成，和產生脂質過氧化²³³。一般認為脂質過氧化與肝纖維化有相當密切的關係，在四氯化碳誘導肝纖維化模式中，可以偵測到較高的脂質過氧化產物²³²。在本實驗也印證了此項結果，四氯化碳組有較高的脂質過氧化產物，EHD 能減少肝臟脂質過氧化產物的產生，顯示 EHD 本身的抗氧化能力抑制脂質過氧化的作用，減緩了肝纖維化的發展。

Yoshikawa 等人¹⁷曾經報告枳椇子中含有數種類黃酮。類黃酮類化合物具有酚基，故也具有抗氧化及抗自由基之功能²³⁴。本研究中也測得 EHD 有很強的清除 DPPH 自由基的能力。清除 DPPH 自由基能力，被認為與抑制脂質過氧化能力相關^{238, 239}。所以，EHD 的抑制脂質過氧化的結果，可以視為是因為清除 DPPH 自由基的能力所致。

結論，口服投與枳椇子酒精萃取物對於四氯化碳誘導的小鼠慢性肝損傷，具有肝臟保護作用，其影響機制應該是透過抗氧化作用而來。

Table 15. Primer Sequences for PCR Amplification. (EHD)

mRNA	Primer sequence	Length (bp)
<i>Collagen(α1)(I)</i>	Sense 5' CGA CTA AGT TGG AGG GAA CGG TC3'	319
	Antisense 5' TGG CAT GTT GCT AGG CAC GAC3'	
<i>Collagen(α1)(III)</i>	Sense 5' CGA GGT GAC AGA GGT GAA AGA 3'	336
	Antisense 5' AAC CCA GTA TTC TCC GCT CTT 3'	
<i>MAT1A</i>	Sense 5' CGG TAG GAA AAG GGC ATCC 3'	270
	Antisense 5' GGG ACT GTT GCT CCA GAA CC 3'	
<i>MAT2A</i>	Sense 5' GCA TCT GCG CCC TCC GCA GT3'	420
	Antisense 5' GTG ACT GTT GTT CCA AGG CA3'	
<i>GAPDH</i>	Sense 5' TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA 3'	76
	Antisense 5' CCT GCT TCA CCA CCT TCT TGA 3'	

Table 16. Effect of EHD on the activities of plasma ALT and AST in CCl₄-treated mice.

Treatment	Dose (g/kg)	Activity (U/L)		
		3 Weeks	6 Weeks	9 Weeks
ALT				
Control	-	35.2 ± 4.8	33.0 ± 6.5	34.4 ± 9.6
CCl ₄ + H ₂ O	-	382.9 ± 32.7 ^{###}	632.5 ± 240.0 ^{###}	867.6 ± 203.0 ^{###}
CCl ₄ + EHD	0.5	154.9 ± 40.9 ^{***}	622.2 ± 192.0	608.0 ± 334.5
	1.0	103.2 ± 28.8 ^{***}	418.8 ± 80.4 [*]	588.4 ± 251.5 [*]
AST				
Control	-	67.6 ± 6.8	69.9 ± 6.5	68.0 ± 14.7
CCl ₄ + H ₂ O	-	259.7 ± 46.8 ^{###}	313.7 ± 80.1 ^{###}	476.4 ± 167.5 ^{###}
CCl ₄ + EHD	0.5	148.2 ± 41.2 ^{***}	347.4 ± 196.8	352.6 ± 168.6
	1.0	118.2 ± 23.4 ^{***}	195.6 ± 63.2 ^{**}	310.4 ± 49.1 [*]

All values are mean ± S.D. (n = 10). ^{###}*P* < 0.001 compared with the control group.

^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01, ^{***}*P* < 0.001 compared with the CCl₄ + H₂O group.

Table 17. Effect of EHD on the hepatic malondialdehyde and hydroxyproline in CCl₄-treated mice at 9 weeks.

Drugs	Dose (g/kg)	Malondialdehyde (nmol / mg protein)	Hydroxyproline (μg/g tissue)
Control	-	1.0 ± 0.2	566.8 ± 163.5
CCl ₄ + H ₂ O	-	1.6 ± 0.1 ^{###}	944.3 ± 234.0 ^{##}
+ EHD	0.5	1.3 ± 0.2*	732.9 ± 149.1*
	1.0	1.1 ± 0.1 ^{***}	704.9 ± 78.0*

All values are mean ± S.D. (n = 10). ^{###}*P* < 0.01 compared with the control group. **P* < 0.05, ^{***}*P* < 0.001 compared with the CCl₄+H₂O group.

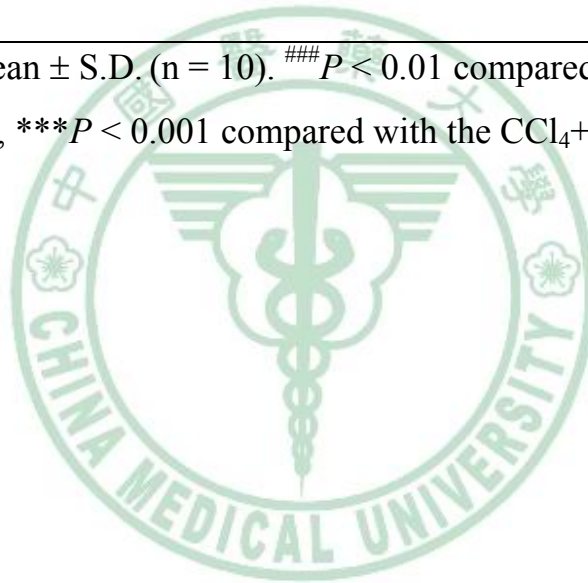
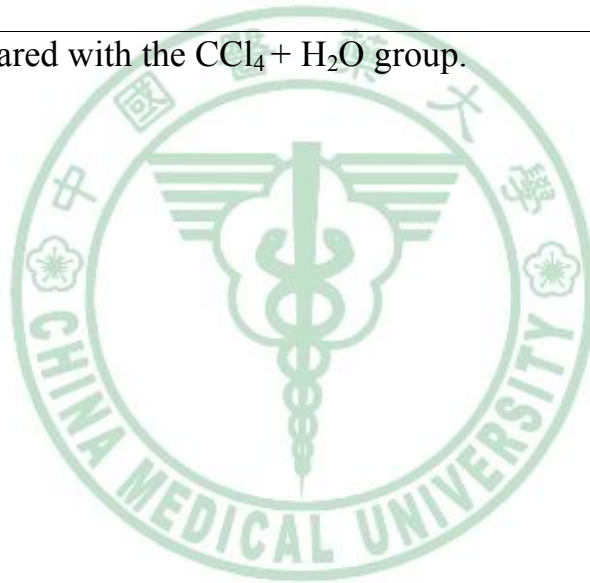


Table 18. The pathological score of CCl₄-induced chronic liver damage in mice.

Treatments	Dose (g/kg)	Fibrosis						Necrosis					
		0	1	2	3	4	Average	0	1	2	3	4	Average
Control	-	10	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
CCl ₄ + H ₂ O	-	0	0	1	3	6	3.5	0	0	1	4	5	3.4
CCl ₄ + EHD	0.5	0	0	2	5	3	3.1	0	0	2	4	4	3.2
	1.0	0	0	2	8	0	2.8*	0	0	3	7	0	2.7*

* $p < 0.01$ compared with the CCl₄ + H₂O group.



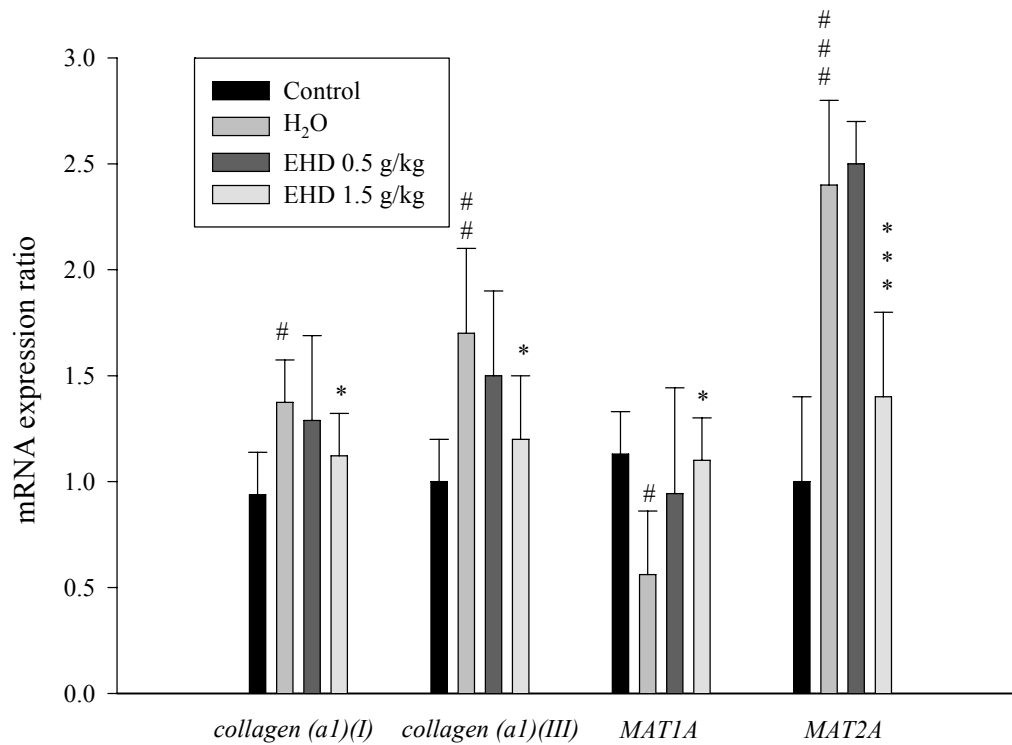


Fig 49. RT-qPCR analysis of *collagen (α1)(I)*, *collagen (α1)(III)*, *MAT1A* and *MAT2A* in CCl₄-treated rat liver tissue.

Results are expressed in arbitrary units, and data are mean ± S.D. (n=10). [#]*P* < 0.05, ^{##}*P* < 0.01, ^{###}*P* < 0.001 compared with the control group. **P* < 0.05, ****P* < 0.001 compared with the CCl₄ + H₂O group.

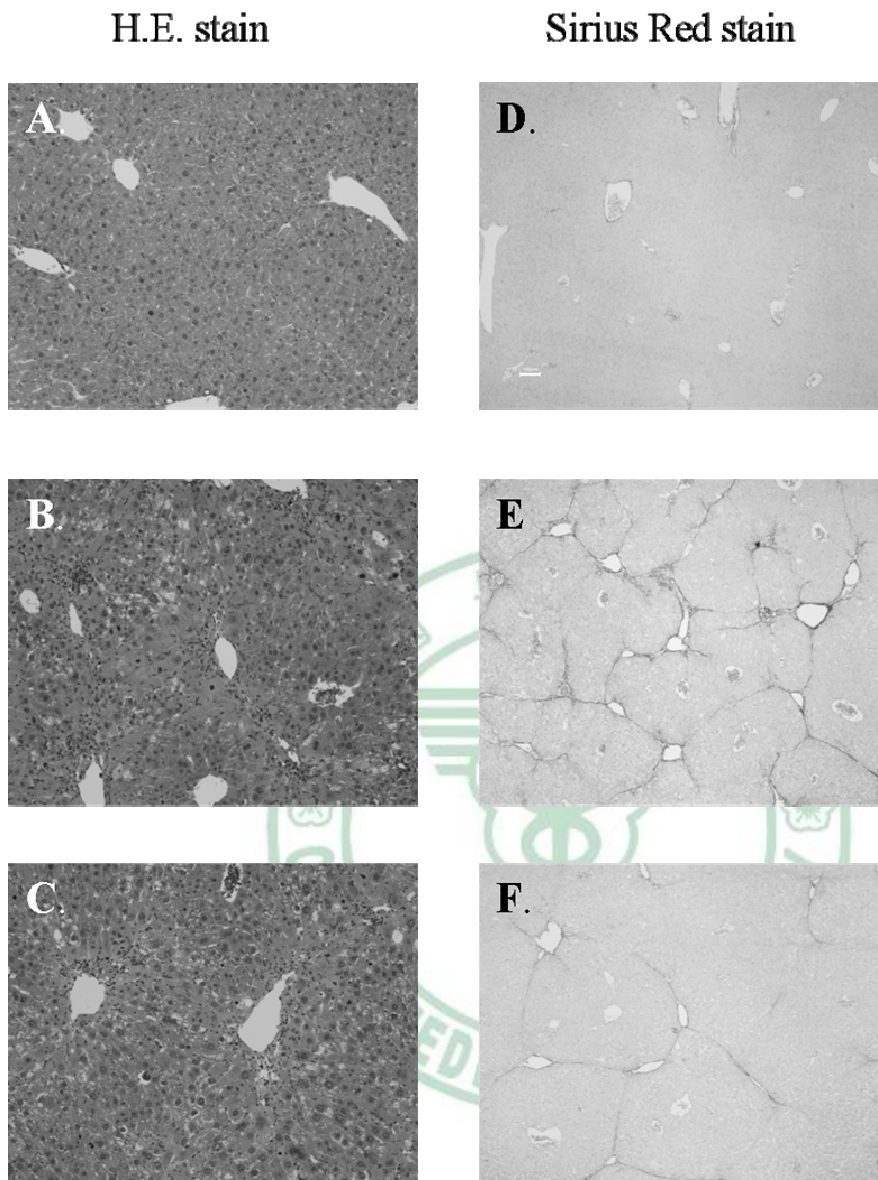


Fig 50. Treatment with EHD improved the histology of CCl₄-treated rat liver.

(A-C) H.E. staining (100X); (D-F) Sirius red staining (100X). (A, D) control group; (B, E) CCl₄ + H₂O group, showing gross necrosis, broad infiltration of lymphocytes around the central vein, and fibrosis ; (C, F) CCl₄ + EHD (1.0 g/kg) group, showing a reduction in gross necrosis, broad infiltration of lymphocytes around the central vein, and fibrosis.

第八章 麴菌 (*Aspergillus phoenicis*) 發酵物對四氯化碳誘導肝纖維化模式之影響

前言

活性氧分子被認為與許多疾病相關，因此活性氧清除者被預期能減輕自由基所媒介的疾病。天然或是合成的抗氧化劑，被廣泛的使用在預防及治療各種疾病上。在慢性肝臟疾病，包括發炎反應、氧化壓力，以及細胞受自由基攻擊後造成的損傷等都是致病的原因之一¹²。目前利用抗氧化療法來治療慢性肝臟疾病受到重視²⁴⁰。

發酵微生物被視為一項重要的天然抗氧化物質來源。*Aspergillus* 屬常被用來發酵方式生產大量的抗氧化物質^{91, 181}。篩選過 200 種菌種後，選出 *A. phoenicis* 此品種，其發酵萃取物具有較高的抗氧化活性。此研究中藉由四氯化碳誘導大鼠肝纖維化模式評估 *Aspergillus phoenicis* 的發酵產物(簡稱 FSAP)之影響。

材料與方法

一、試劑

1. BD & Difco, USA：馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基(potato dextrose agar, PDA)
2. Randox, United Kingdom：RANSOD 套組

二、FSAP 的製備

Aspergillus phoenicis 由食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心篩選並培養之，利用馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基(potato dextrose agar, PDA) 繼代培養 *A. phoenicis* 的孢菌種，以放大方式培養該發酵液，以 121°C、30 分鐘滅菌，並過濾掉殘餘細菌碎片，加入脫脂牛

奶，使最終濃度為 10%。凍晶乾燥後，儲存於 4°C 以供日後使用。

三、SOD-like (superoxide dismutase-like) 活性測試

由食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心，進行經乾熱滅菌過的 FSAP 發酵液之類 SOD 活性測試，此實驗依照 Aruther 和 Boyne²⁴¹ 等人描述之方法進行，以市售 RANSOD 套組分析。

四、動物

使用 Wistar 雄性大鼠，體重 250-300 公克，購自國家實驗動物繁殖及研究中心。飼養環境維持 $22 \pm 3^\circ\text{C}$ ，相對溼度 $55 \pm 5\%$ ，光照為 12 小時亮 12 小時暗(早上七點亮，下午七點暗)的環境，自由飲水及攝食。

五、四氯化碳誘導之慢性肝毒性

大鼠之四氯化碳誘導模式如第二章所述。FSAP 劑量 200 或 400 mg/kg 體重，以口服方式，每天分別投與。滿八周犧牲時，血液和肝臟處理方式，如第二章所述。

六、血液生化值檢驗

血液之處理如第三章所述，測定項目分別為 alanine aminotransferase (ALT)、aspartate aminotransferase (AST) 以及 albumin。

七、肝臟脂質過氧化產物、蛋白質和羥基脯胺酸含量測定

實驗方法如第二章所述。

八、mRNA 表現分析

實驗步驟如第二章所述。分析基因為 *methionine adenosyltransferase 2A (MAT2A)*，*collagen ($\alpha 1$)(I)*，*collagen ($\alpha 1$)(III)*，*transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)*，*matrix metalloproteinase-13*

(MMP-13) 和 *tissue inhibitors of MMP-1 (TIMP-1)*，詳細引子如表十九所列。

九、病理檢驗

肝臟病理切片組織處理方式，如第二章所述。進行蘇木青及伊紅染色 (Hematoxylin 和 Eosin stain) 及天狼星紅染色 (Sirius Red stain)，以便評估肝纖維化程度。

結果判讀如第二章所述。

十、統計方法

數據結果以平均值 (mean) \pm 標準偏差 (standard deviation, SD) 表示，統計方式如前所述，以 *P* 值小於 0.05 表示在統計學上具有顯著差異。

結果

一、FSAP 對生化指標之影響

如表二十所示，與控制組相比四氯化碳組能明顯增加血漿中 AST 和 ALT 活性。口服投與 FSAP (400 mg/kg) 能明顯降低因四氯化碳誘導肝纖維化而增加的 AST 和 ALT 活性。

血漿中白蛋白的量，四氯化碳組明顯低於控制組，FSAP 組可明顯提升因四氯化碳降低的白蛋白含量(如表十八)。

二、FSAP 對肝臟、脾臟重量及腹水之影響

如表二十一所示，四氯化碳組之肝臟重量，與控制組相比減輕 17.4%，FSAP 投與後，肝臟重量明顯回升。

如表二十一之結果，脾臟重量也會因四氯化碳投與而增加，比控制組增加 150%，而 FSAP (400 mg/kg) 組，則能明顯降低。

見表二十一之結果，控制組之大鼠無腹水之現象，四氯化碳組

有 60% 出現腹水現象，而 FSAP (400 mg/kg) 組則明顯降低。

三、肝臟脂質過氧化產物、蛋白質和羥基脯胺酸含量

如表二十二所示，四氯化碳之肝纖維化模式，會降低肝臟中蛋白質含量，與對照組相比降低 36.6%，FSAP 組會增加肝臟蛋白質含量。

如表二十二之結果，四氯化碳組的肝臟脂質過氧化產物和羥基脯胺酸含量，與控制組相較分別增加約 46.9% 和 237.8%，FSAP (400 mg/kg) 與四氯化碳組相比，明顯降低其含量，分別是 19.1% 和 194.0%。

四、肝臟組織 mRNA 表現

肝臟組織的 *MAT2A*、*collagen (α1)(I)* 和 *collagen (α1)(III)* 基因分析結果如圖五十一所示，這些基因在四氯化碳組的表現，與控制組相比，分別增加約 5 倍、2 倍和 2 倍；投與 FSAP 後，因四氯化碳而增加的基因表現會明顯降低(如圖五十一 B-D)。

如圖五十二所示，四氯化碳組之肝臟組織基因 *TGF-β1* 和 *TIMP-1* 表現比控制組分別增加約 120% 和 180%。投與 FSAP 能降低因四氯化碳而增加 *TGF-β1* 和 *TIMP-1* 基因表現。四氯化碳組肝臟的 *MMP-13* 基因表現，與控制組相比較降低 50%，FSAP 400 mg/kg 組則有大幅的增加，如圖五十二 B-五十二 D。

五、病理學結果

圖五十三 A-C 為病理切片 H.E. 染色之結果，圖五十三 D-E 為天狼星紅染色之結果。經四氯化碳處理的老鼠肝臟會呈現圍繞著中央靜脈區有細胞壞死、廣泛的單核球浸潤和纖維化情形，如圖五十三 B 和 E。而 FSAP 給藥組，肝臟細胞損傷較輕微，肝纖維化也較不嚴重，如

五十三 C、F 和表二十三所示。

討論

就本研究結果，FSAP 能降低大鼠因四氯化碳誘導肝纖維化的損傷。從生化指標及肝臟病理切片指標來分析，FSAP 能降低四氯化碳對肝臟之傷害，從半定量 PCR 分析纖維化相關基因表現結果，亦驗證此結果，FSAP 對肝臟的確有肝臟保護作用及減緩肝纖維化病程。

血漿中 ALT 和 AST 活性，是常見的肝臟損傷生化指標²¹¹。從過去研究中，四氯化碳引發肝損傷的模式中，血漿中 ALT 和 AST 活性會明顯增加。FSAP 能明顯降低因四氯化碳而增加的 ALT 和 AST 活性，顯示其有減少肝細胞損傷的作用。

當肝細胞受損時，*MAT1A* 表現會下降，而 *MAT2A* 表現會被啟動²⁷。在本實驗中，在四氯化碳的慢性肝損傷下，會降低 *MAT1A* 的表現，而 *MAT2A* 的表現則是增加的。FASP 組的表現，正好相反，此結果更支持了 FASP 在小鼠的四氯化碳誘導肝損傷，有肝細胞保護作用。從病理學分析結果，也印證此結果。

肝臟是重要的合成蛋白質的器官，而血漿中的白蛋白亦是由肝臟合成²⁴²。慢性肝損傷時，白蛋白量會降低²⁴³。此研究中，四氯化碳誘導肝損傷會降低肝臟中蛋白及血漿中白蛋白的量，FSAP 能明顯抑制因四氯化碳而降低的肝臟蛋白質及血漿中白蛋白的量，顯示 FSAP 能減緩四氯化碳對肝臟合成功能的影響。

肝纖維化為慢性肝損傷末期常見的結果。肝纖維化和肝硬化，會造成肝臟血流供應受阻，因此產生肝門脈高壓，導致血液灌流至脾臟，導致脾臟腫大²¹³。腹水，也是肝硬化病人常見症狀，因為門脈高

壓以及低白蛋白血症所致²¹³。此實驗，四氯化碳誘導肝纖維化出現脾臟腫大及腹水症狀。FSAP 能改善脾臟腫大及腹水症狀，顯示 FSAP 能降低門脈高血壓。

當肝臟受損時，會促使肝臟新生作用²¹²，而致肝臟重量增加。當肝臟遭遇嚴重傷害，轉變成肝纖維化和硬化時，反而使肝臟萎縮²⁴⁴。在本實驗四氯化碳誘導大鼠肝纖維化伴隨著肝萎縮。FSAP 能改善四氯化碳所致的肝臟萎縮。顯示 FSAP 能延遲四氯化碳誘導大鼠肝臟由腫大發展至萎縮之過程。

已知肝纖維化為大量膠原蛋白合成聚集之結果²⁴⁵，而羥基脯氨酸為膠原蛋白特有成分²³。膠原蛋白含量偵測可以藉由偵測羥基脯氨酸含量，而得知纖維化的嚴重程度²³。肝纖維化時，膠原蛋白第一型和第三型會大量表現。此研究結果指出 FSAP 會降低肝臟羥基脯氨酸含量以及膠原蛋白第一型及第三型之基因表現，減緩肝纖維化病程。

TGF- β 1 為促纖維化細胞激素，會直接活化星狀細胞，促使細胞外間質增生^{193, 194}。肝纖維化病人及肝纖維化模式中，常見 TGF- β 1 基因表現增加¹⁹⁵⁻¹⁹⁷。此研究中，四氯化碳組的 TGF- β 1 基因表現如預期增加，而 FSAP 則明顯降低其表現。此結果顯示 FSAP 藉由降低 TGF- β 1 表現，延緩肝纖維化病程。

肝纖維化時，肝臟會藉由合成及降解兩種作用來平衡細胞外間質含量，調節纖維化之程度⁶⁷。大鼠的膠原蛋白第一型纖維會藉由負責膠原蛋白降解的間質金屬結合蛋白酶(MMP-13)來降解調節⁶⁸。而 MMP 活性，受組織金屬蛋白酶抑制劑 (TIMP-1)抑制⁶⁷。所以，TIMP-1 在纖維化過程裡，扮演相當重要之角色⁷¹。之前的研究顯示四氯化碳誘導，

大鼠肝臟 *TIMP-1* 表現會上升，而 *MMP-13* 表現下降^{196, 246}。此兩種基因 *TIMP-1* 和 *MMP-13* 的表現失去平衡，會加速肝纖維化之發展。投與 FSAP 能有效降低 *TIMP-1* 表現和增加 *MMP-13* 表現，而延緩肝纖維化之發展。

自由基活躍和脂質過氧化，被認為是四氯化碳細胞毒性之主因²³³。一般認為脂質過氧化與四氯化碳誘導肝纖維化之間有密不可分之關係^{195, 232}。本研究指出，四氯化碳組有較高的脂質過氧化表現，FSAP 會抑制因四氯化碳而增加的脂質過氧化，因此肝纖維化情況較輕微。

結論，從實驗結果顯示，FSAP 會減緩四氯化碳誘發的肝纖維病程，其作用機制可能是來自 FSAP 有類 SOD 之作用。FSAP 的抗氧化作用成分，有待進一步分離、鑑定。



Table 19. Primer sequences for PCR amplification. (FSAP)

mRNA	Primer sequence	Length
<i>MAT2A</i>	Sense 5' GCA TCT GCG CCC TCC GCA GT 3'	420
	Antisense 5' GTG ACT GTT GTT CCA AGG CA 3'	
<i>Collagen (α1)(I)</i>	Sense 5' GGT CCC AAA GGT GCT GAT GG 3'	182
	Antisense 5' GAC CAG CCT CAC CAC GGT CT 3'	
<i>Collagen (α1)(III)</i>	Sense 5' CGA GGT GAC AGA GGT GAA AGA 3'	336
	Antisense 5' AAC CCA GTA TTC TCC GCT CTT 3'	
<i>TGF-β1</i>	Sense 5' TAT AGC AAC AAT TCC TGG CG 3'	162
	Antisense 5' TGC TGT CAC AGG AGC AGTG 3'	
<i>MMP- 13</i>	Sense 5' GCA TGA AAA CTG TGG GGA GT 3'	112
	Antisense 5' AGC TGA AAT CTT GCC TTG GA 3'	
<i>TIMP -1</i>	Sense 5' TCC CTT GCA AAC TGG AGA GT 3''	140
	Antisense 5' AGC TGA AAT CTT GCC TTG GA 3''	
<i>GAPDH</i>	Sense 5' TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA 3'	76
	Antisense 5' CCT GCT TCA CCA CCT TCT TGA 3	

Table 20. Effect of FSAP on the activities of plasma AST and ALT in CCl₄-treated rats.

Treatment	Dose (mg/kg)	AST (U / L)	ALT (U / L)	Albumin (g /dL)
Control	-	72.1 ± 4.3	37.6 ± 2.0	3.56 ± 0.12
CCl ₄ + H ₂ O	-	1348.7 ± 476.5 ^{###}	1123.6 ± 326.2 ^{###}	2.42 ± 0.21 ^{###}
CCl ₄ + FSAP	200	1203.9 ± 412.4	1077.8 ± 278.4	2.85 ± 0.43 ^{**}
	400	875.0 ± 130.4 [*]	781.0 ± 284.2 [*]	3.18 ± 0.27 ^{**}

All values are mean ± S.D. (n = 10). ^{###}*P* < 0.001 as compared with control group. ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01 as compared with CCl₄ + H₂O group.

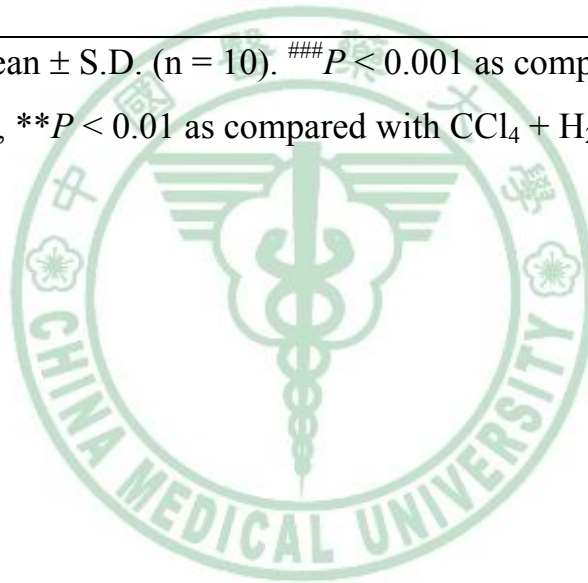


Table 21. Effect of FSAP on weights of liver and spleen, and number of ascites in CCl₄-treated rats.

Treatments	Doses (mg/kg)	Liver (g)	Spleen (g)	Ascites (No.)
Control	-	14.4 ± 1.6	1.0 ± 0.2	0
CCl ₄ + H ₂ O	-	11.9 ± 2.6 [#]	2.5 ± 0.7 ^{###}	6
CCl ₄ + FSAP	200	16.0 ± 2.1 ^{**}	2.4 ± 0.6	5
	400	16.5 ± 1.6 ^{***}	1.7 ± 0.3 [*]	2

All values are mean ± S.D. (n = 10). [#]*P* < 0.05, ^{###}*P* < 0.001 as compared with control group. ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01, ^{***}*P* < 0.001 compared with CCl₄ + H₂O group.

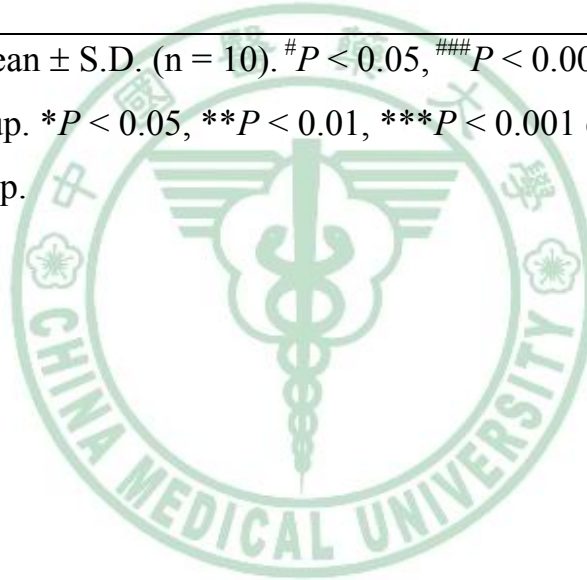
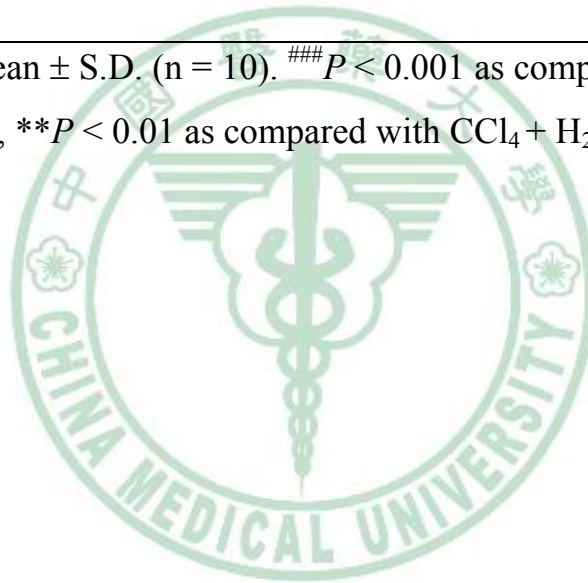


Table 22. Effect of FSAP on hepatic protein, malondialdehyde and hydroxyproline in CCl₄-treated rats.

Treatment	Dose (mg/kg)	Protein (mg/g tissue)	Malondialdehyde (nmol/mg protein)	Hydroxyproline (μg /g tissue)
Control	-	249.8 ± 18.9	3.2 ± 0.5	593.2 ± 119.5
CCl ₄ + H ₂ O	-	158.4 ± 15.0 ^{###}	4.7 ± 0.8 ^{###}	2003.6 ± 422.8 ^{###}
CCl ₄ + FSAP	200	177.6 ± 11.2*	4.0 ± 0.6.	1845.2 ± 385.9
	400	182.4 ± 7.6**	3.8 ± 0.3*	1614.9 ± 307.6*

All values are mean ± S.D. (n = 10). ^{###}*P* < 0.001 as compared with control group. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 as compared with CCl₄ + H₂O group.



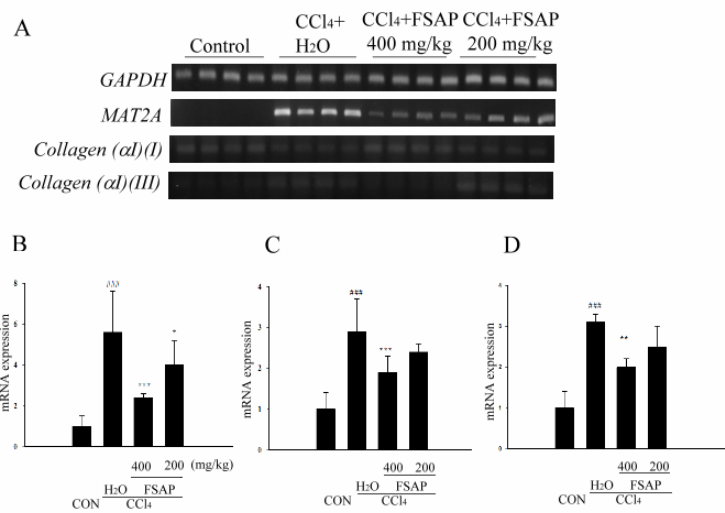


Fig 51. Effect of FSAP on the hepatic mRNA expressions of *MAT2A*, *Collagen (α1)(I)*, and *Collagen (α1)(III)* in CCl₄-treated rats.

Fragments are amplified by RT-PCR (A). The expression levels of *MAT2A* (B), *collagen (α1)(I)* (C), and *collagen (α1)(III)* (D) mRNA were quantified using RT-qPCR. Values are normalized to *GAPDH* mRNA expression. ^{###} $P < 0.001$ compared with control group. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ compared with the CCl₄ + H₂O group.

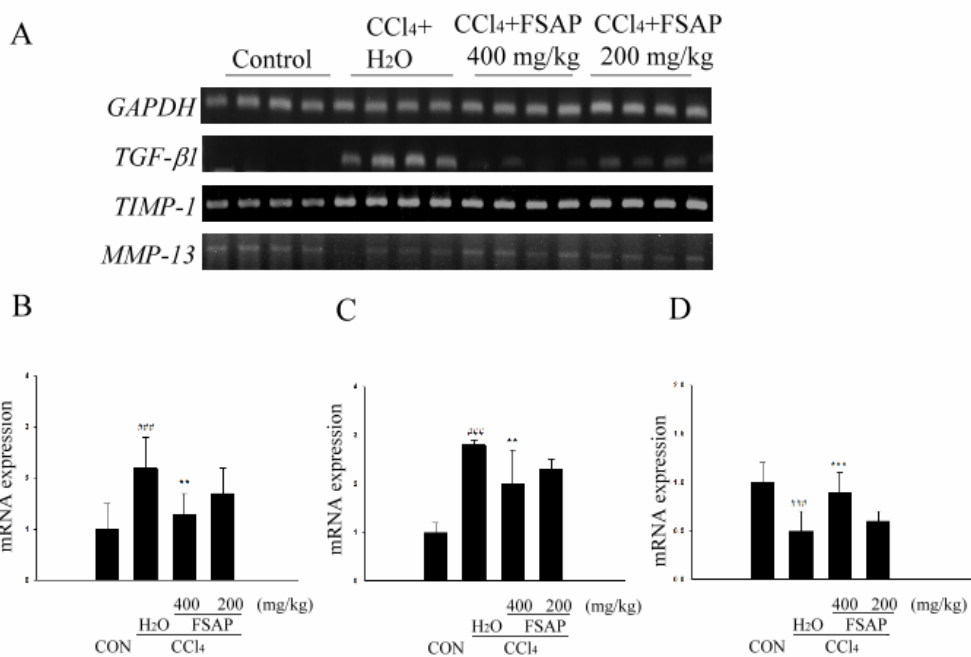


Fig 52. Effect of FSAP on the hepatic mRNA expressions of *TGF-β1*, *TIMP-1* and *MMP-13* in CCl₄-treated rats.

Fragments were amplified by RT-PCR (A). The expression levels of *TGF-β1* (B), *TIMP-1* (C), and *MMP-13* (D) mRNA were quantified by RT-qPCR. Values are normalized to GAPDH mRNA expression. ^{###} $P < 0.001$ compared with control group. ^{*} $P < 0.05$, ^{*} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$ compared with the CCl₄ + H₂O group.

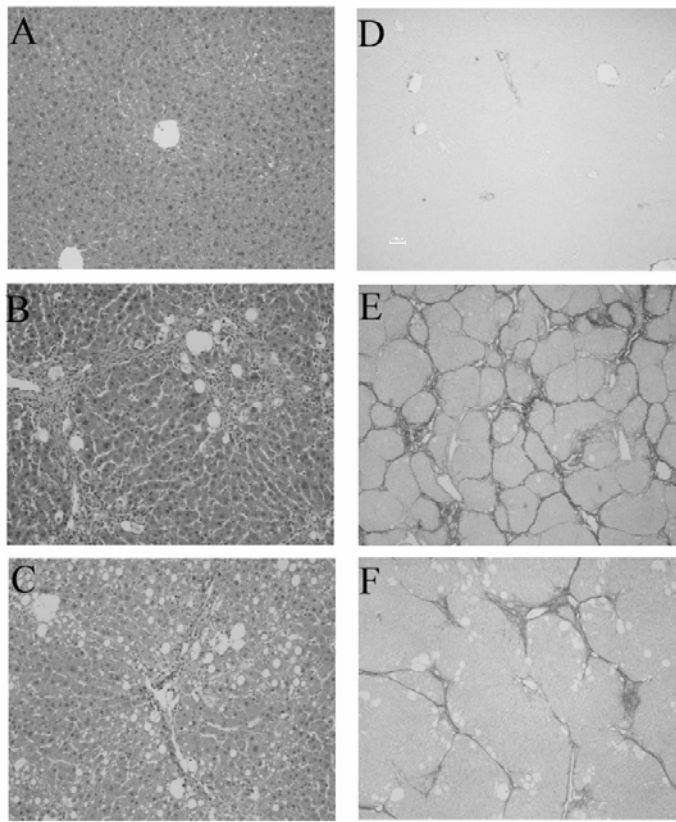


Fig 53. Treatment with FSAP improved the histology of CCl₄-treated rat liver.

H.E. staining: A, control group; B, CCl₄ + H₂O group; showing fatty change, inflammatory cell infiltration and necrosis. C, CCl₄ + FSAP (400 mg/kg) group; showing a marked reduction in fatty changes, inflammatory cell infiltration, and necrosis. Sirius red staining: D, control group; E, CCl₄ + H₂O group, showing micronodular formation and complete interconnection of septa with each other. F, CCl₄ + FSAP (400 mg/kg) group, showing a marked reduction in fiber deposition.

Table 23. The pathological score of CCl₄-induced chronic liver damage in rats.

treatments	Doses (mg/kg)	Fibrosis					Necrosis				
		-	+	++	+++	++++	-	+	++	+++	++++
Control	-	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
CCl ₄ + H ₂ O	-	0	0	0	3	7	0	0	1	4	5
CCl ₄ + FSAP	50	0	0	0	2	8	0	0	1	3	6
	200	0	0	2	4	4	0	0	3	4	3
	400* [#]	0	0	4	4	2	0	0	5	4	1

Grade designation of the histological findings: (-) normal, (+) very slight, (++) slight, (+++) moderate, (++++) severe. Each value is the number of animals with grading changes. * $P < 0.05$ as compared with the CCl₄ group for fibrosis. [#] $P < 0.05$ as compared with the CCl₄ group for necrosis.

第九章 酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae* YA03083) 發酵物對 大鼠誘導肝纖維化之影響

前言

酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)又稱麩包酵母、出芽酵母、啤酒酵母、釀酒酵母。酵母菌是與人類關係最廣泛的一種菌種，不僅因為傳統上它用於製作麵包和饅頭等食品及釀酒之用，屬真核生物，酵母菌是發酵工業中最常用的生物種類。近年來，釀酒酵母除發酵食物及酒精性飲料外，還能提供藥用工業的經濟價值。為增加酵母菌在生化工業上的產值，發展出更完善大規模的發酵製程²⁴⁷。目前酵母菌已經可以大量生產麩胱甘肽²⁴⁸。自修飾過的酵母菌中，篩選出的YA03083品系，有非常高含量的麩胱甘肽，並選擇適當培養液使產值達到最高。

麩胱甘肽缺乏通常導致氧化壓力增加，其通常在疾病發展過程中扮演極重要角色²⁴⁹。組成麩胱甘肽的材料胺基酸，包括麩胺酸、胱氨酸和甘氨酸被吸收之後，多集中於肝門脈區，使得肝細胞內麩胱甘肽前驅物利用率明顯增加²⁵⁰。口服麩胱甘肽，效果如同服用細胞內麩胱甘肽前驅物。此外，胱氨酸曾在動物實驗中被證實，可以減緩肝臟損傷^{251, 252}。此實驗主要目的為探討酵母菌發酵物 (FSSC) 對於大鼠四氯化碳誘發肝損傷模式之影響。

材料與方法

一、試劑

1. BD & Difco, USA：酵母麥芽萃取物瓊脂(Yeast malt agar)、甘蔗糖蜜、大豆水解物。

2. Sigma-Aldrich, USA : glutathione

二、製備 FSSC

FSSC 由食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心提供。使用酵母菌為由 *S. cerevisiae* YA03083 篩選出修飾過後的品種，可以大量生產麩胱甘肽。酵母麥芽萃取物瓊脂和培養液分別用在保存和繼代培養上。主要基礎培養溶液中含甘蔗糖蜜，大豆水解物，及礦物質成份 [(NH₄)₂SO₄ 4 g/l, KH₂PO₄ 6 g/l, MgSO₄·7H₂O 1 g/l]，經放大發酵培養後，將培養液過濾滅菌，凍晶乾燥處理，儲存於 4⁰C 備日後研究用。

三、以高效液相層析分析麩胱甘肽含量

由食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心，以高效液相層析確認麩胱甘肽含量，分析結果為 FSSC 含有麩胱甘肽 11.3 mg/g。

四、動物

使用 Wistar 雄性大鼠，體重 250-300 公克，購自國家實驗動物繁殖及研究中心。飼養環境維持 22 ± 3°C，相對溼度 55 ± 5%，光照為 12 小時亮 12 小時暗(早上七點亮，下午七點暗)的環境，自由飲水及攝食。

五、四氯化碳誘導之慢性肝毒性

大鼠之四氯化碳誘導慢性肝損傷，方式如第二章所述。FSSC 劑量 0.5 或 1.5 g/kg 體重，每天口服投與。犧牲時，血液與肝臟處理方式如第二章所述。

六、血液生化值檢驗

收集之血液處理方式，如第三章所述，項目為 alanine aminotransferase (ALT)、albumin、globulin。

七、肝臟脂質過氧化產物、蛋白質和羥基脯胺酸含量測定

實驗方法如第二章所述。

八、mRNA 表現分析

實驗步驟如第二章所述。分析基因為 *methionine adenosyltransferase 1A (MAT1A)*, *methionine adenosyltransferase 2A (MAT2A)*, *collagen ($\alpha 1$)(I)*, *transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)*, *matrix metalloproteinase 13 (MMP-13)* 和 *tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1)*，詳細引子如表二十四所列。

九、病理檢驗

肝臟病理組織處理方式，如前所述。進行蘇木青及伊紅染色 (Hematoxylin 和 Eosin stain) 及天狼星紅染色 (Sirius Red stain)，以便評估肝纖維化程度。

結果判讀及分析，如前所述。

十、統計方法

數據結果以平均值 (mean) \pm 標準偏差 (standard deviation, SD) 表示，統計方式如前所述，以 *P* 值小於 0.05 表示在統計學上具有顯著差異。

結果

一、動物體重、肝臟及脾臟重量和肝臟含水量

投與四氯化碳的大鼠體重與對照組相比明顯降低。四氯化碳組和四氯化碳+ FSSC 組之間，體重無明顯差異。第八週的控制組與四氯化碳組體重分別為 455.0 ± 16.5 和 407.7 ± 31.6 g ($P < 0.001$)。

四氯化碳肝損傷通明顯造成肝臟和脾臟腫大，四氯化碳組之肝

臟重和脾重分別高出對照組 55% 和 100% (表二十五)。FSSC 1.5 g/kg 組明顯降低因四氯化碳而增加的肝臟和脾臟重。

如表二十五所示，四氯化碳引發的肝纖維化通常會伴隨著增加肝臟含水量，四氯化碳組之肝臟含水量明顯高出對照組 6.8%，而給予 FSSC 1.5 g/kg 組與四氯化碳組相比，明顯降低含水量 2.8%。

二、血液生化值測定

如表二十六所示，四氯化碳誘發肝損傷，血漿中的 ALT 活性明顯比對照組高。FSSC 1.5 g/kg 組明顯降低因四氯化碳而增加的 ALT 活性。

如表二十六所示，四氯化碳組之血漿中的白蛋白含量及白蛋白/血清球蛋白(albumin/globulin, A/G) 比例明顯低於對照組。FSSC 1.5 g/kg 組明顯改善因四氯化碳而降低的血漿白蛋白及白蛋白/血清球蛋白血清值。

三、肝臟脂質過氧化產物、蛋白質和羥基脯胺酸含量

大鼠以四氯化碳誘發肝損傷時，其羥基脯胺酸和脂質過氧化程度與對照組相比，分別增加約 77.5%和 123.5%。FSSC 1.5 g/kg 組與四氯化碳組相比，明顯降低 羥基脯胺酸和脂質過氧化產物，分別降低 17.4% 和 26.3%。

如表二十七所示，四氯化碳引發之肝損傷，會伴隨肝臟蛋白質含量會降低，與控制組相比降低約 34 %。FSSC 1.5 mg/kg 組則會明顯增加因四氯化碳而降低的蛋白質含量。

四、肝臟組織基因表現分析

MAT1A 和 *MAT2A* 的 mRNA 表現結果，如圖五十四 A 所表示。*MAT1A* 量化結果如圖五十四 B，和 *MAT2A* 量化結果如圖五十四 C 所

示。*MAT1A* 會表現於正常無傷害的肝臟，四氯化碳組的 *MAT1A* 表現低於對照組 22%。與四氯化碳組相比，FSSC 1.5 g/kg 組 能增加 29.2% 的 *MAT1A* 表現。*MAT2A* 則是在肝臟受傷害時才會表現，四氯化碳組的 *MAT2A* 表現明顯高於控制組 246%，而 FSSC 1.5 g/kg 組，與四氯化碳組相比則是降低 31.9%。

collagen (α1)(I) 和 *TGF-β1* 的基因表現，如圖五十五 A 所示。量化後結果，*collagen (α1)(I)* 的表現，如圖五十五 B 所示和 *TGF-β1* 表現則是如圖五十五 C 所示。對照組的肝臟 *collagen (α1)(I)* 和 *TGF-β1* 的表現都非常低。四氯化碳組的 *collagen (α1)(I)* 和 *TGF-β1* 表現明顯高於對照組 207% 和 150%。而 FSSC (1.5 g/kg) 與四氯化碳組相比明顯降低，分別是 51.6% 和 52%。

MMP-13 和 *TIMP-1* 的基因表現，如圖五十六 A 所示，量化後結果，*MMP-13* (圖 五十六 B) 和 *TIMP-1* (圖五十六 C)。*MMP-13* 和 *TIMP-1* 均會在正常組織中表現。*MMP-13* 在四氯化碳組中表現比控制組低 50%，併用 FSSC (1.5 g/kg) 之後，與四氯化組相比會提高 80%。四氯化碳組的 *TIMP-1* 表現高於對照組 180%，而併用 FSSC 1.5 g/kg 之後，與四氯化碳組相比則是降低 32.1%。

五、病理學結果

經四氯化碳處理的老鼠肝臟會呈現圍繞著中央靜脈區有細胞壞死、廣泛的單核球浸潤和纖維化情形，如圖五十七 B。而 FSSC 1.5 g/kg 組能降低四氯化碳引起的脂肪堆積、發炎和細胞壞死情形，如圖五十七 C。量化後結果如表二十六所示。

圖五十八為天狼星紅染色結果，可以藉此染色判別肝纖維化之程度，如圖五十八 B 所示，為四氯化碳誘導之肝纖維化，可以看到明顯的紅色纖維及形成中隔較多，而合併 FSSC (1.5g/kg) 組，如圖五十八 C 所示，纖維化程度明顯輕微，量化結果如表二十八所示。

討論

本研究結果顯示，FSSC 能有效降低大鼠慢性四氯化碳誘導之肝臟損傷。從血漿生化值及肝臟病理切片，與肝纖維化和肝臟保護作用相關的基因表現分析，FSSC 能使四氯化碳誘發之肝臟傷害病程減輕。

血漿中 ALT 活性為肝臟傷害之常見生化指標²¹¹。因四氯化碳引發的肝臟傷害的纖維化病程中，血漿中 ALT 活性會明顯的增加。而 FSSC 能明顯的降低因四氯化碳而增加的 ALT 活性，顯示 FSSC 能減輕四氯化碳對肝臟的損傷。

MAT1A 會在正常肝臟組織表現的³¹。當肝臟受損時，*MAT1A* 表現會下降，而 *MAT2A* 表現會被啟動²⁷。因四氯化碳誘導肝傷害而產生的 *MAT* 的基因變化，會因為 FSSC 的給予而改變，這些結果支持了 FSSC 有肝保護作用。組織學分析的結果也證實，FSSC 能減輕四氯化碳造成的損傷。

肝臟內質網合成多種蛋白質，包括白蛋白^{212, 242}。慢性肝損傷時，白蛋白量會降低²⁴³。當四氯化碳引發肝損傷時，肝臟蛋白質和血漿中的白蛋白都會降低。FSSC 能明顯的減緩此現象。顯示 FSSC 能減緩因四氯化碳破壞的蛋白質合成功能。

免疫球蛋白由免疫系統合成，肝臟疾病時常見高免疫球蛋白 (hyperglobulinemia) 現象，為肝臟的防禦反應²⁵³。在四氯化碳誘導慢性

肝損傷中，常見白蛋白/免疫球蛋白(A/G)的比例降低。FSSC 明確的降低因四氯化碳而增加的 A/G 比例，也抑制了肝臟的發炎反應。FSSC 降低四氯化碳誘發肝損傷的發炎反應，亦可以由病理切片上看到此結果。

當肝臟受損，會促使肝新生作用²¹²，因此而增加肝臟的重量。但是，當肝臟嚴重受損，肝纖維化及肝硬化的最終結果會導致肝萎縮²⁴⁴。在本實驗四氯化碳誘導肝纖維化，伴隨著肝腫大(hepatomegaly)以及增加含水量。FSSC 能改善肝腫大及降低肝含水量之程度。由以上結果得知，FSSC 確能減緩四氯化碳引發的肝臟傷害。

肝纖維化是一般慢性肝疾病的末期階段，肝纖維化及肝硬化會阻斷肝臟血流供應，而導致肝門脈高血壓，並影響血流供應至脾臟，導致脾臟腫大²¹³。在本實驗的四氯化碳的肝損傷，伴隨脾臟腫大。而 FSSC 能改善脾臟腫大的情況，顯示能減緩門脈高壓的情形。

肝纖維化是肝臟過多膠原蛋白聚集造成¹⁹²，而羥基脯胺酸為膠原蛋白中特有成份²³。膠原蛋白含量可以由羥基脯胺酸含量推測得知，亦可藉此得知纖維化之程度²³。當四氯化碳引發肝臟損傷進而纖維化時，肝臟羥基脯胺酸的量會明顯上升，FSSC 與四氯化碳組相比，明顯降低肝臟羥基脯胺酸的量，因此 FSSC 會降低肝纖維化程度。天狼星紅染色的組織學結果，亦可得到驗證。許多研究指出肝纖維化的肝臟中，第一型膠原蛋白會顯著大量的增加¹⁹⁶。因此，我們分析了肝臟 *Collagen (α1)(I)* 的表現結果，結果顯示 FSSC 確實可以減少此基因的表現。

透過 TGF-β1 活化的星狀細胞，會產生大量的細胞外間質，增加

纖維化程度²⁵⁴。在纖維化病人及動物模式上，均可以發現 *TGF-β1* 的 mRNA 表現是上升的^{195, 197}。此研究中，四氯化碳組的確增加了 *TGF-β1* 的表現，而 FSSC 則能顯著的降低。這顯示 FSSC 能藉由降低 *TGF-β1* 的量，而減緩肝纖維化病程。

肝纖維化時，肝臟會藉由合成及降解兩種作用來平衡細胞外間質含量，調節纖維化之程度⁶⁷。大鼠的膠原蛋白第一型纖維會藉由 MMP-13 來降解調節⁶⁸。而 MMP 活性，受 TIMP 抑制⁶⁷。所以，TIMP-1 在纖維化過程裡，扮演相當重要之角色⁶⁷。和我們之前的研究相同，四氯化碳誘導下 *TIMP-1* 表現會上升，而 *MMP-13* 表現下降¹⁹⁵。此兩種基因 TIMP-1 和 MMP-13 的表現失去平衡，會加速肝纖維化之發展。投與 FSSC 能有效降低 *TIMP-1* 表現和增加 *MMP-13* 表現，而延緩肝纖維化之發展。

自由基活躍和脂質過氧化，被認為是四氯化碳細胞毒性造成肝細胞損傷最主要的作用機制⁹⁴。一般認為脂質過氧化與四氯化碳誘導肝纖維化之間有密不可分之關係³⁴。本研究指出，四氯化碳組有較高的脂質過氧化表現，而 FSSC 會抑制因四氯化碳而增加的脂質過氧化，因此抑制肝纖維化情況的進展。

結論，實驗結果顯示，FSSC 會減緩因四氯化碳而增加的肝纖維化病程，雖然本實驗以麩胱甘肽來做 FSSC 主要的成分鑑別，但也含有金屬元素如鋅^{255, 256}和鉻^{257, 258}等。未來仍需分析、定量 FSSC 中其他有效成分，以便更深入了解其抗纖維化護肝作用機制。

Table 24. Primer sequences for PCR amplification. (FSSC)

mRNA	Primer sequence	Length (bp)
<i>MAT1A</i>	Sense 5' CGG TAG GAG AAG GGC ATC C 3'	174
	Antisense 5' GGG ACT GTT GCT CCA GAG CC 3'	
<i>MAT2A</i>	Sense 5' GCA TCT GCG CCC TCC GCA GT 3'	420
	Antisense 5' GTG ACT GTT GTT CCA AGG CA 3'	
<i>Collagen (α1)(I)</i>	Sense 5' GGT CCC AAA GGT GCT GAT GG 3'	182
	Antisense 5' GAC CAG CCT CAC CAC GGT CT 3'	
<i>TGF-β1</i>	Sense 5' TAT AGC AAC AAT TCC TGG CG 3'	162
	Antisense 5' TGC TGT CAC AGG AGC AGTG 3'	
<i>MMP-13</i>	Sense 5' GCA TGA AAA CTG TGG GGA GT 3'	112
	Antisense 5' AGC TGA AAT CTT GCC TTG GA 3'	
<i>TIMP -1</i>	Sense 5' TCC CTT GCA AAC TGG AGA GT 3''	140
	Antisense 5' AGC TGA AAT CTT GCC TTG GA 3''	
<i>GAPDH</i>	Sense 5' TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA 3'	76
	Antisense 5' CCT GCT TCA CCA CCT TCT TGA 3	

Table 25. Effect of FSSC on weight of liver and spleen and liver water content in CCl₄-treated rats.

Treatments	Doses (g/kg)	Liver (g)	Liver Water (%)	Spleen (g)
Control	-	14.9 ± 1.6	70.2 ± 7.0	1.0 ± 0.1
CCl ₄ +H ₂ O	-	23.1 ± 2.5 ^{###}	75.0 ± 2.5 ^{###}	2.0 ± 0.6 ^{###}
CCl ₄ +FSSC	1.5	19.5 ± 4.1*	72.1 ± 1.9	1.4 ± 0.3**
	0.5	20.8 ± 1.3	72.9 ± 1.3	1.7 ± 0.3

All values are mean ± S.D. (n = 10). ^{###}*P* < 0.001 compared with the control group. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 compared with the CCl₄ + H₂O group.

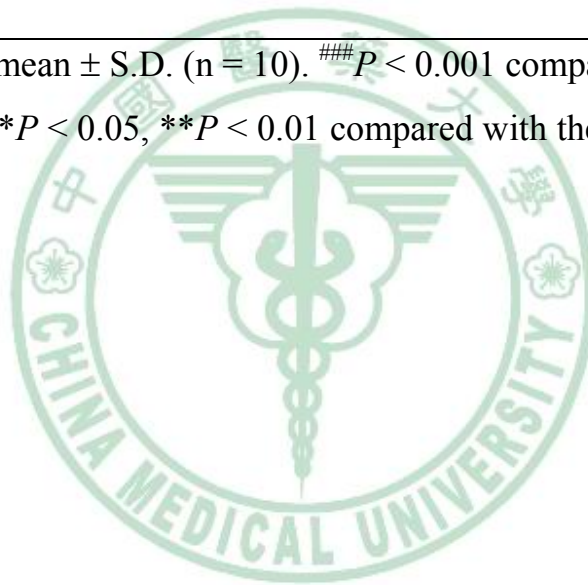


Table 26. Effect of FSSC on plasma ALT activity, albumin concentration and A/G ratio in CCl₄-treated rats.

Drugs	Doses	ALT	Albumin	A/G
	(g/kg)	(U/L)	(g/dL)	Ratio
Control	-	39.7 ± 10.7	3.5 ± 0.1	1.32 ± 0.1
CCl ₄ +H ₂ O	-	1866.4 ± 781.5 ^{###}	2.5 ± 0.3 ^{###}	0.84 ± 0.2 ^{###}
CCl ₄ +FSSC	1.5	1195.0 ± 329.3*	2.9 ± 0.3*	1.03 ± 0.1**
	0.5	1362.9 ± 451.2	2.7 ± 0.3	0.94 ± 0.1

All values are mean ± S.D. (n = 10). ^{###}*P* < 0.001 compared with the control group. * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 compared with the CCl₄+ H₂O group.

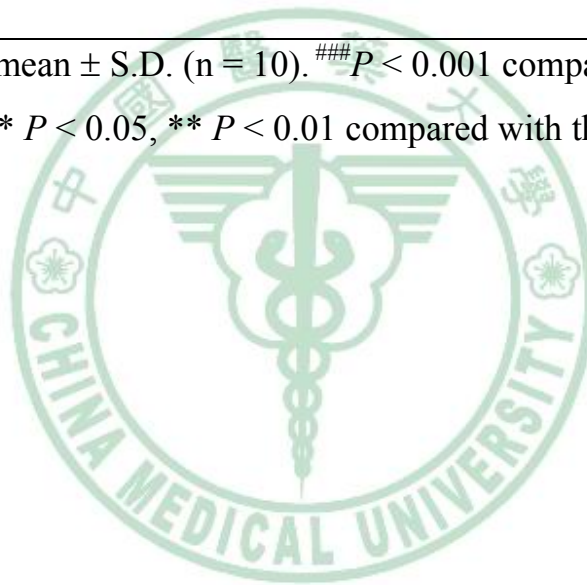


Table 27. Effect of FSSC on hepatic protein and malondialdehyde in CCl₄-treated rats.

Treatments	Doses (g/kg)	Hydroxyproline (μg /g tissue)	Protein (mg/g tissue)	Malondialdehyde (nmol/mg protein)
Control	-	590.5 \pm 121.3	242.8 \pm 19.9	1.7 \pm 0.3
CCl ₄ +H ₂ O	-	1048.0 \pm 254.7 ^{###}	160.3 \pm 12.3 ^{###}	3.8 \pm 1.6 ^{###}
CCl ₄ +FSSC	1.5	799.8 \pm 163.1 ^{**}	192.1 \pm 19.0 ^{**}	2.6 \pm 0.3 [*]
	0.5	865.8 \pm 132.1	168.2 \pm 8.2	2.8 \pm 0.6

All values are mean \pm S.D. (n = 10). ^{###}*P* < 0.001 compared with control group. ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01 compared with CCl₄ + H₂O group.

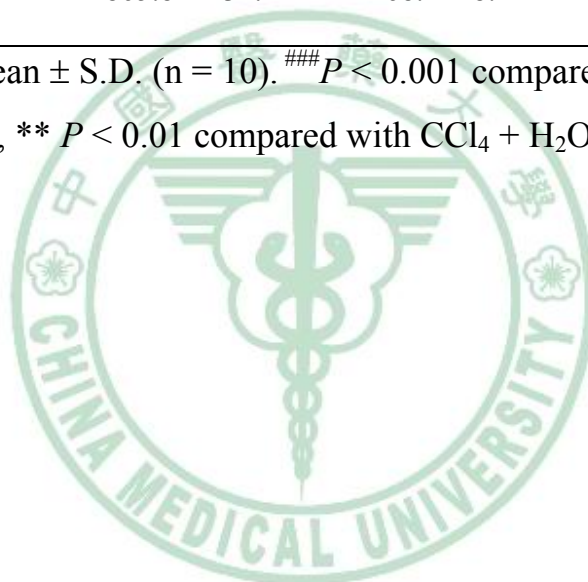
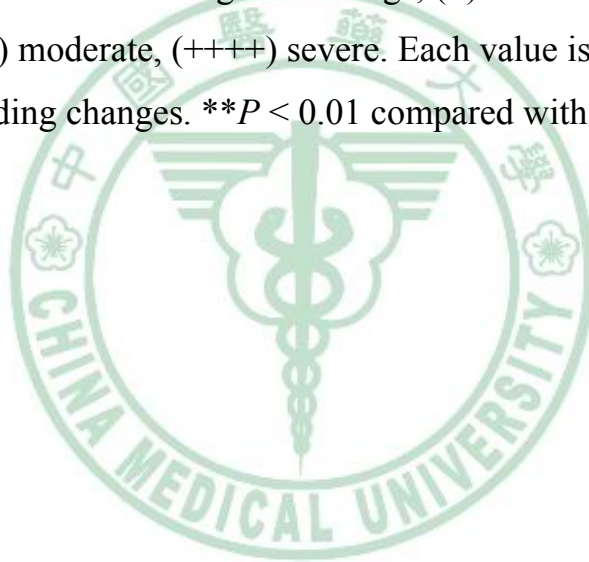


Table 28. Effect of FSSC on CCl₄-induced liver fibrosis in rats.

Drugs	Doses (g/kg)	Fibrosis					Average
		-	+	++	+++	++++	
Control	-	10	0	0	0	0	0
CCl ₄ + H ₂ O	-	0	0	1	2	7	3.6
CCl ₄ + FSSC	1.5	0	0	6	3	1	2.5**
	0.5	0	0	2	4	4	3.2

Grade designation of the histological findings; (-) normal, (+) very slight, (++) slight, (+++) moderate, (++++) severe. Each value is the number of animals with grading changes. ** $P < 0.01$ compared with CCl₄ + H₂O group .



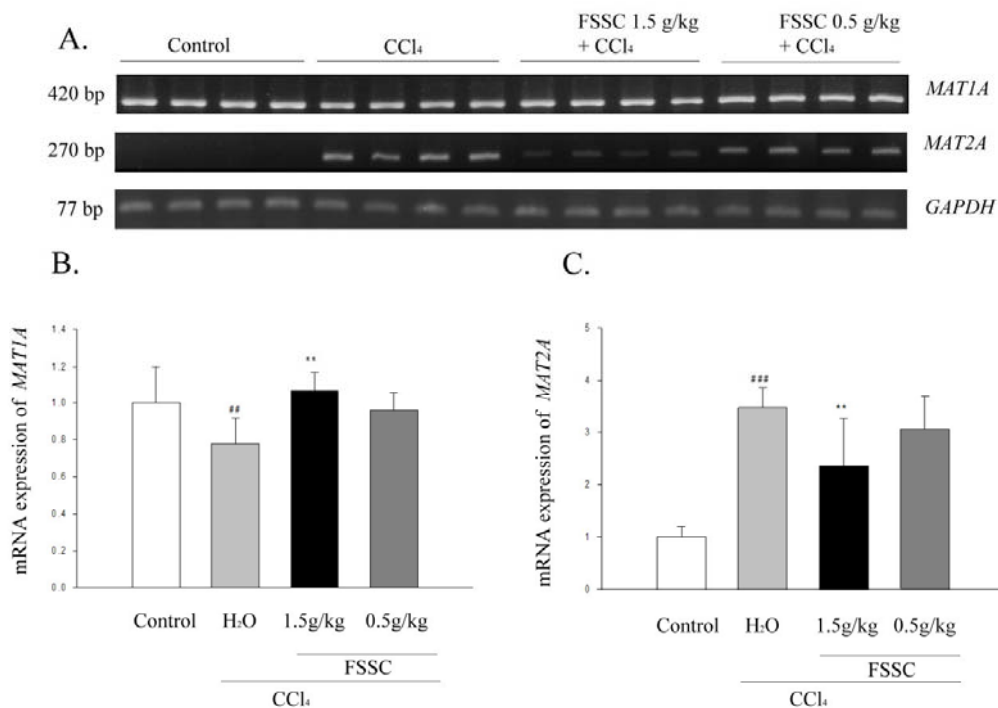


Fig 54. Effect of FSSC on the hepatic mRNA expressions of *MAT1A* and *MAT2A* in CCl_4 -treated rats.

(A) RT-PCR analysis of *MAT1A* and *MAT2A* expression in control rats, in CCl_4 -treated rats, and in rats treated with CCl_4 + FSSC (1.5 or 0.5 g/kg). Expression of the amplified fragment corresponding to *GAPDH* is shown for comparison. (B) Densitometric analyses of *MAT1A* expression after normalization against *GAPDH*. (C) Densitometric analyses of *MAT2A* expression after normalization against *GAPDH*. Data are expressed as the mean of ratio \pm S.D. (n = 10). ### $P < 0.001$ compared with the control group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.01$ compared with the CCl_4 + H_2O group.

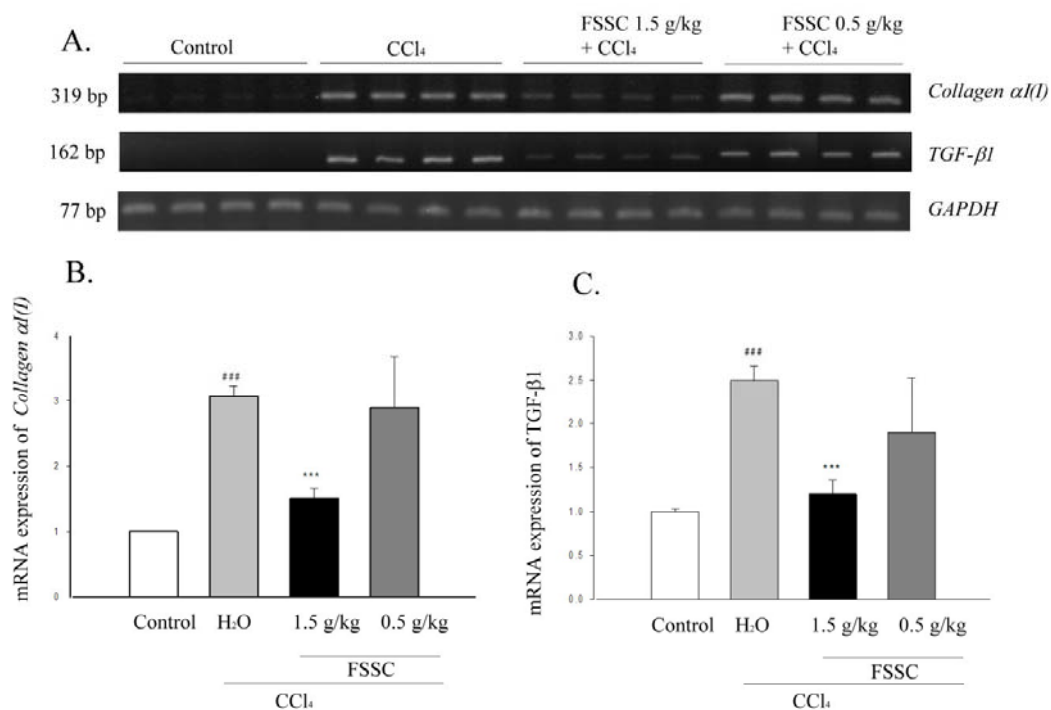


Fig 55. Effect of FSSC on the hepatic mRNA expressions of *Collagen α1(I)* and *TGF-β1* in CCl_4 -treated rats.

(A) RT-PCR analysis of the expression of *Collagen α1(I)* and *TGF-β1* in control rats, in CCl_4 -treated rats, and in rats treated with CCl_4 + FSSC (1.5 or 0.5 g/kg). Expression of the amplified fragment corresponding to *GAPDH* is shown for comparison. (B) Densitometric analyses of *Collagen α1(I)* expression after normalization against *GAPDH*. (C) Densitometric analyses of *TGF-β1* expression after normalization against *GAPDH*. Data are expressed as mean of ratio \pm S.D. (n = 10). ^{###} $P < 0.001$ compared with the control group. ^{***} $P < 0.01$ compared with CCl_4 + H_2O group.

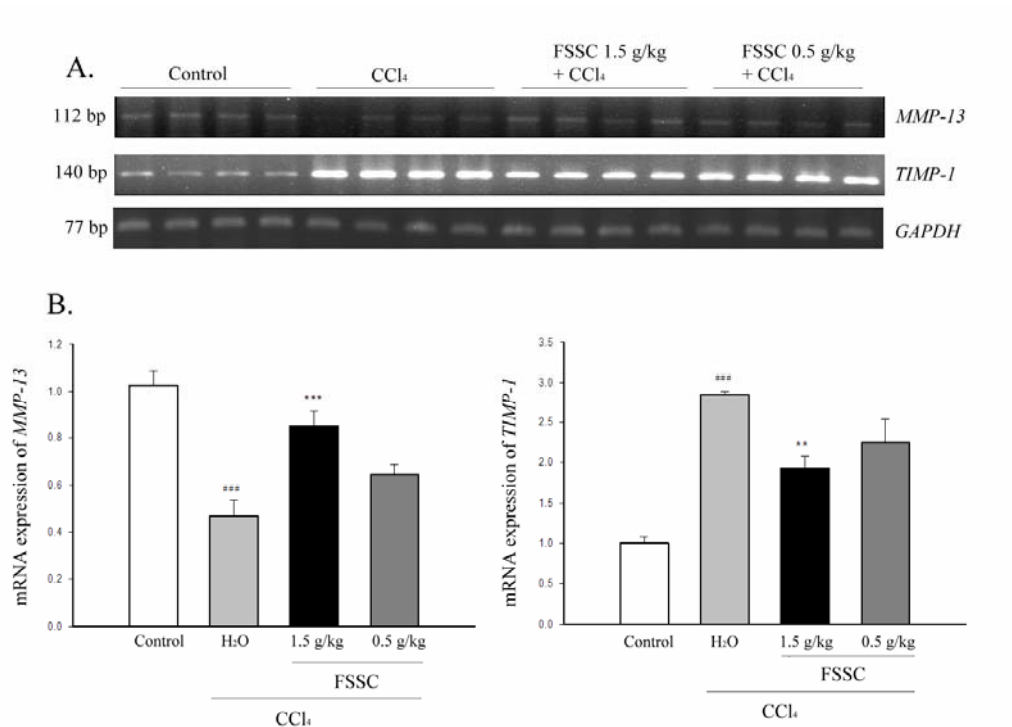


Fig 56. Effect of FSSC on the hepatic mRNA expressions of *MMP-13* and *TIMP-1* in CCl₄-treated rats.

(A) RT-PCR analysis of *MMP-13* and *TIMP-1* expression in control rats, in CCl₄-treated rats, and in rats treated with CCl₄ + FSSC (1.5 or 0.5 g/kg). Expression of the amplified fragment corresponding to *GAPDH* is shown for comparison. (B) Densitometric analyses of *MMP-13* expression after normalization against *GAPDH*. (C) Densitometric analyses of *TIMP-1* expression after normalization against *GAPDH*. Data are expressed as the mean of ratio \pm S.D. (n = 10). ^{###}*P* < 0.001 compared with control group. ^{**}*P* < 0.05, ^{***}*P* < 0.01 compared with CCl₄ + H₂O group.

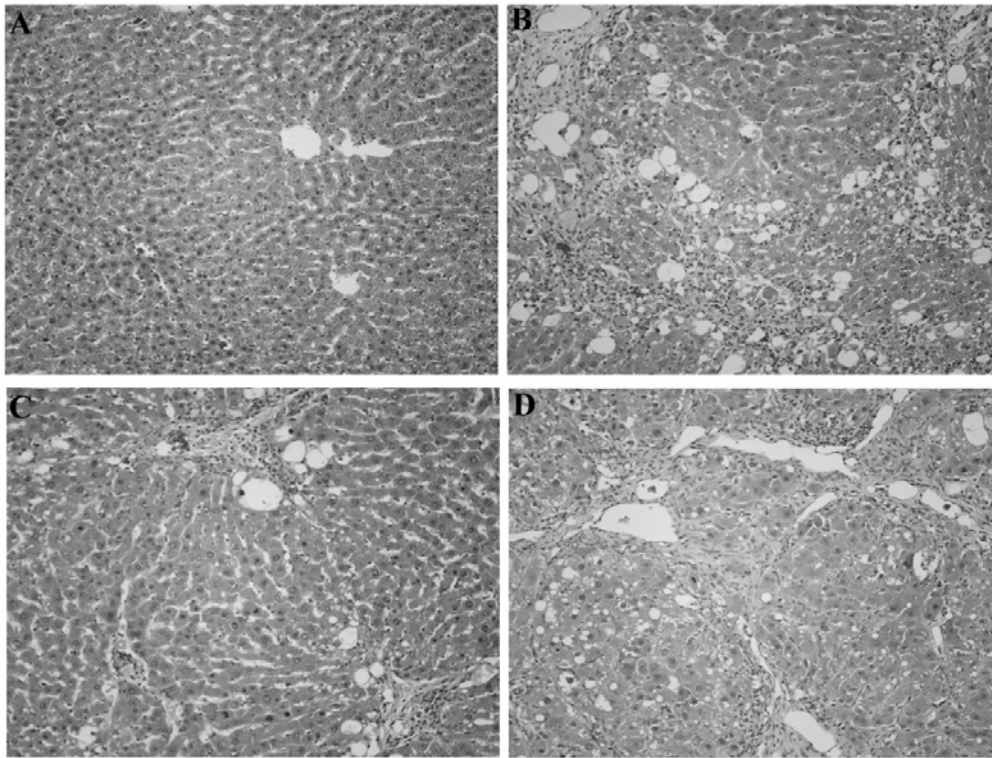


Fig 57. Liver histopathology of the study rats (HE stain).

(A) Control group; (B) CCl₄ + H₂O group, showing fatty change, inflammatory cell infiltration and necrosis was observed. (C) CCl₄ + FSSC (1.5 g/kg) group, showing a marked reduction in fatty changes, inflammatory cell infiltration and necrosis. (D) CCl₄ + FSSC (0.5 g/kg) group.

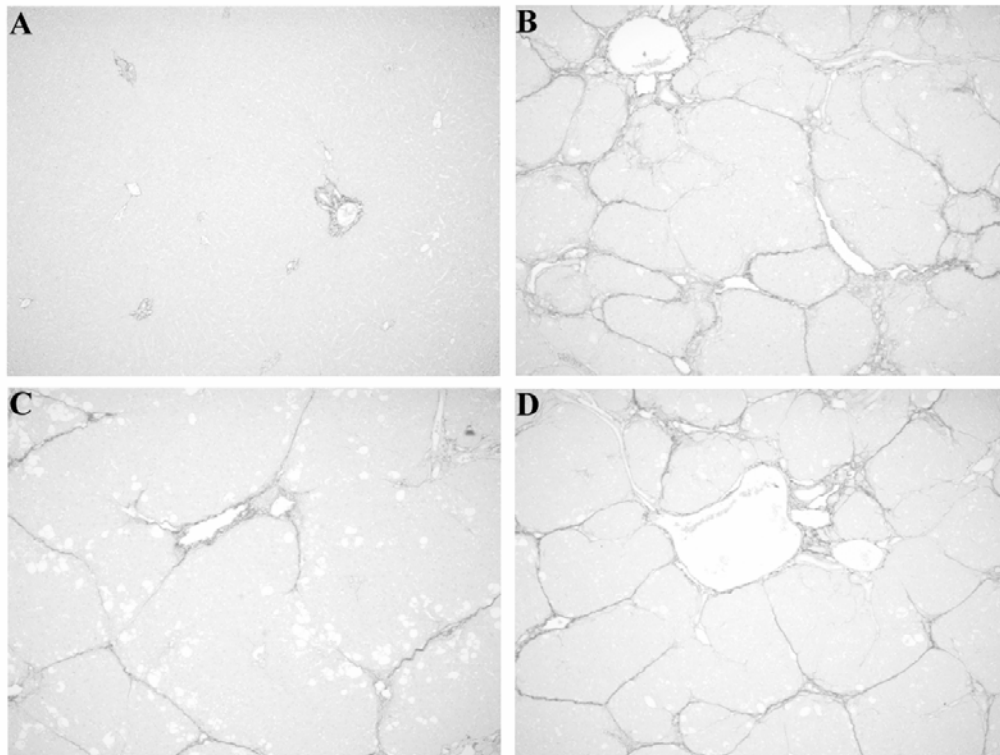


Fig 58. Liver histopathology of the study rats (Sirius Red stain).

(A) Control group; (B) CCl₄ + H₂O group, showing micronodular formation and complete interconnection of septa with each other; (C) CCl₄ + FSSC (1.5 g/kg) group, showing a marked reduction in fiber deposition. (D) CCl₄ + FSSC (0.5 g/kg) group.

第十章 酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*) 發酵物對 acetaminophen 及 bromobenzene 誘導急性肝損傷模 式之影響

前言

此發酵物質是由酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)而來，簡稱為 FSSC。酵母菌發酵物含有大量麩胱甘肽的物質²⁵⁹。許多報告指出酵母菌發酵物，在處於酒精²⁶⁰或過氧化氫²⁶¹⁻²⁶⁴之下，可以對抗氧化壓力。亦有報告指出在 bromobenzene 傷害情況下，麩胱甘肽濃度會下降²⁶⁵。

麩胱甘肽參與很多細胞功能，諸如抗自由基和其他毒物的傷害及影響細胞週期等⁸⁴。本研究主要目的是探討高抗氧化物質對 acetaminophen 和 bromobenzene 引起之急性肝損傷是否有保護作用。Acetaminophen 經肝臟 cytochrome P450 代謝產生 N-acetyl-p-benzoquinoneimine (NAPQI)，有過多的 NAPQI 產生時會與肝臟蛋白結合造成毒性²⁶⁶。Bromobenzene 是工業用的溶媒，受到肝臟 cytochrome P-450 代謝後之產物，會與肝臟的蛋白結合引起肝毒性²⁶⁷。

材料與方法

一、試劑

1. Sigma-Aldrich, USA : acetaminophen , bromobenzene , acetylcysteine , σ -phthaldehyde (OPD) , N-ethylmaleimide , EDTA
2. Randox, Germany : GSH peroxidase (GSH-Px) 、GSH reductase (GSSG-Rd)

3. Cayman, USA : GSH transferase

二、 FSSC 材料製備

食品工業發展研究所提供的高抗氧化物質是。FSSC 經 HPLC 定量分析含有約 30% 類麩胱甘肽物質。使用前將 FSSC 以去離子水配製成懸浮液。小鼠每 10 公克體重投予 0.1 ml 為準，對照藥物 acetylcysteine 也同樣以去離子水配製成懸浮液。

三、 實驗動物

使用雄性 BALB/c 小鼠，購自國科會國家實驗動物繁殖及研究中心，購自國家實驗動物繁殖及研究中心。飼養環境維持 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ，相對溼度 $55 \pm 5\%$ ，光照為 12 小時亮 12 小時暗(早上七點亮，下午七點暗)的環境，自由飲水及攝食。

四、 Acetaminophen 誘發小鼠急性肝損傷

使用體重約 22 克的健康成年 BALB/c 小鼠，試驗物質使用三個劑量 (0.5、1.0、2.0 mg/kg 體重)，以 acetylcysteine (1.0 g/kg 體重) 為正對照藥物，試驗物質經口投予 4 天後，動物禁食一晚。第 5 天給予試驗物質後 40 分鐘，除空白對照組外，各組由腹腔注射 acetaminophen 500 mg/kg 體重，acetaminophen 注射後 7 小時，小鼠的血液和肝臟處理方式，如第六章所述。

五、 Bromobenzene 誘發小鼠急性肝損傷

使用體重約 22 克的健康成年 BALB/c 小鼠，試驗物質使用三個劑量 (0.5、1.0、2.0 mg/kg 體重)，以 acetylcysteine (1.0 g/kg 體重) 為正對照藥物。經口投予 4 天後，動物禁食一晚。第 5 天給予試驗物質後 40 分鐘，除空白對照組外，各組經口投予 0.3 mol/l bromobenzene (溶於

橄欖油)，投予量 0.1 ml/10g，空白對照組給予胃同體積橄欖油，經 16 小時後犧牲動物。犧牲時，血液和肝臟處理方式如第六章所述。

六、血漿生化學檢驗

血液處理方式如第三章所述，檢測項目為 AST、ALT。

七、肝臟組織 glutathione(GSH 及 GSSG)含量測定

肝組織的 GSH 及 GSSG 含量測定依據 Hissin 和 Hilf²⁶⁸的方法，秤取肝臟組織 0.5 公克，加入 5ml 的 1.15% KCl 溶液，以均質機均質化後，取 1 ml 的均漿，加入 1 ml trichloroacetic acid 10%，混合均勻後，以 3000 g，離心 15 分鐘。還原型 GSH 的測定，取 0.01 ml 上清液，加入 0.18 ml phosphate-EDTA 緩衝液，及新鮮配製的 0.01 ml σ -phthaldehyde (OPD; 1mg/ml methanol)。混合均勻後，以螢光 420 nm，激發波長 350 nm 偵測之。氧化型 GSSG 則是於室溫下反應，先取 0.5 ml 上清液，加入 0.2 ml 0.04 mol/L *N*-ethylmaleimide 30 分鐘之後，再加入 4.3 ml 0.1 mol/L NaOH，混合均勻後，取 0.01 ml 混合液，之後步驟如同還原型 GSH 的測定。以 $\mu\text{mole} / \text{g wet weight}$ 表示之。

八、脂質過氧化產物之測定

實驗方法如第二章所述。

九、肝臟組織 superoxide dismutase (SOD)、catalase、GSH peroxidase (GSH-Px)、GSH reductase (GSSG-Rd)、GSH transferase (GSH-T)活性測定

1. SOD

此實驗依照 Aruther 和 Boyne²⁴¹等人描述之方法進行，取肝組織 0.5 公克加入 5 ml 緩衝液 (0.32 mol/L sucrose，1 mmol/L EDTA，10 nmol/L Tris-HCl，pH 7.4)，以均質機均質化，以 13600 g 高速離心 30

分鐘，取上清液稀釋 200 倍，以 RANSOD 套組分析。單位定義為抑制 50% INT 生成率為一個單位。肝臟 SOD 活性以 unit/mg protein 表示。

2. Catalase

Catalase 活性測定依具 Aebi²⁶⁹的方法。取肝組織 0.5 公克加入 5 ml 緩衝液 (0.32 mol/L sucrose, 1 mmol/L EDTA, 10 nmol/L Tris-HCl, pH 7.4)，以均質機均質化，以 13600 g 高速離心 30 分鐘，取上清液 0.1 ml 加入 3.9 ml phosphate 內含 triton X-100 0.02% 混合均勻，加入 H₂O₂ 2 ml，於溫控 25°C，波長 240 nm 條件下測量吸光值，每隔 10 秒測一次。其活性定義以 K (一級反應之速率常數)，計算方法如右： $K = (2.3 / t_2 - t_1) (\log A_1 / A_2)$ ，其中 A₁：為 t₁ = 0 秒時之吸光值，A₂：為 t₂ = 25 秒時之吸光值。肝臟 catalase 活性，以 U/mg protein 表示之。

3. GSH-Px、GSH-Rd

GSH-Px 與 GSH-Rd 則依據 Xia²⁷⁰的方法，取肝組織 0.5 公克加入 5 ml 緩衝液 (0.32 mol/L sucrose, 1 mmol/L EDTA, 10 nmol/L Tris-HCl, pH 7.4)，以均質機均質化，以 13600 g 高速離心 30 分鐘，取上清液稀釋 100 倍，以市售套組分析。

GSH-Px 活性定義為每分鐘氧化 1 μmol NADPH 所需酵素的量為為一個單位 (U)。肝組織的 GSH-Px 活性以 mU/mg protein 表示之。GSH-Rd 活性定義為每分鐘氧化 1 μmol NADPH 所需酵素的量為為一個單位 (U)。肝組織的 GSH-Rd 活性以 mU/mg protein 表示之。

4. GSH-T

肝組織之前處理依據 Xia et al. (1995) 的方法。GSH-T 活性測定以市售套組偵測。GSH-T 活性定義為每分鐘產生 S-2,4-dinitrophenyl-glutathione 所需酵素的量為為一個單位 (U)。肝組織的 GSH-T 活性以 mU/mg protein 表示之

十、病理檢驗

肝臟組織切片、H.E. 染色和結果判讀，如第二章所述。

十一、統計分析

數據結果以平均值 (mean) \pm 標準偏差 (standard deviation, SD) 表示，統計方式如前所述，以 *P* 值小於 0.05 表示在統計學上具有顯著差異。

結果與討論

一、FSSC 對 acetaminophen 誘發小鼠急性肝損傷的影響

小鼠腹腔注射 acetaminophen 7 小時後，acetaminophen 加 H₂O 組有兩隻小鼠死亡，餘則無死亡情形。

小鼠腹腔注射 acetaminophen 7 小時後，血漿的 AST、ALT 活性 (表二十九)，明顯高於控制組。FSSC (0.5 – 2.0 g/kg) 具用量依存性的降低 AST、ALT 的活性。Acetylcysteine 也具有同樣效果。

小鼠腹腔注射 acetaminophen 7 小時後，肝臟的蛋白質含量及脂質過氧化程度與控制組比較沒有差異 (表三十)。FSSC 及 Acetylcysteine 的處理對肝臟的蛋白質及脂質過氧化程度也沒有影響。

如表三十一所示，小鼠腹腔注射 acetaminophen 7 小時後，肝臟的氧化型的 GSSG 及還原型的 GSH 含量與控制組比較明顯降低。FSSC

的處理對肝臟 GSSG 及 GSH 的含量具劑量依存性的增加作用。Acetylcysteine 也具有同樣效果。

如表三十二所示，小鼠腹腔注射 acetaminophen 7 小時後，肝臟的抗氧化酵素 SOD 及 catalase 的活性與控制組比較明顯降低。FSSC 的處理能增強肝臟 SOD 的活性，但對 catalase 的活性僅具增強的傾向。Acetylcysteine 的處理能增強此兩種抗氧化酵素的活性。

如表三十三所示，小鼠腹腔注射 acetaminophen 7 小時後，肝臟的麩胱甘肽相關抗氧化酵素 GSH-Px 及 GSH-Rd，及代謝酵素 GSH-T 的活性與控制組比較明顯降低。FSSC 的處理能增強肝臟 GSH-Px 及 GSH-Rd 的活性，在高劑量也提升 GSH-T 的活性。Acetylcysteine 的處理對此三種酵素的活性皆有增強作用。

如圖五十九所示，acetaminophen 所誘導的小鼠急性肝炎，在中央靜脈週邊可見到明顯的細胞壞死、血球浸潤等。FSSC 及 acetylcysteine 的處理明顯減輕這些病變。

Acetaminophen 是常用的止痛藥，當過量時會產生肝組織中央靜脈區的壞死²⁶⁶。Acetaminophen 經 cytochrome P450 代謝產生 N-acetyl-p-benzoquinoneimine (NAPQI)，NAPQI 和肝臟的 GSH 結合後排出，當有過多的 NAPQI 產生時會與肝臟蛋白結合造成毒性。因此提高肝臟中麩胱甘肽的含量可以解 acetaminophen 引起的肝毒性²⁷¹。目前常用的解藥是 acetylcysteine，其可以提供 SH 基，在體內轉成麩胱甘肽²⁷²。在本試驗，acetaminophen 同樣引起嚴重的肝組織中央靜脈區的壞死，血漿中 AST、ALT 明顯上升，肝組織的 GSH、GSSG 被排空。FSSC 和 Acetylcysteine 同樣可以提升肝臟中麩胱甘肽含量及降低血漿中 AST、ALT 的活性。病理組織的壞死表現也較輕。

Acetaminophen 的肝損傷不會引起脂質過氧化，乃因其造成的損傷也會活化庫氏細胞放出 NO 自由基抵消了超氧陰離子自由基²⁶⁶。在本試驗，acetaminophen 同樣沒有增加肝臟脂質過氧化程度。FSSC 和 Acetylcysteine 的處理對肝臟脂質過氧化程度也沒有影響。

在本試驗 acetaminophen 的肝毒性明顯的抑制肝臟抗氧化酵素 SOD、Catalase、GSH-Px、GSH-Rd 及解毒酵素 GSH-T 的活性，FSSC 和 acetylcysteine 的處理可以減輕這些酵素活性的下降。

二、FSSC 對 bromobenzene 誘發小鼠急性肝損傷的影響

Bromobenzene 投予 16 小時後，Bromobenzene 合併 H₂O 組、bromobenzene 合併 FSSC 0.5 g/kg 組、bromobenzene 合併 acetylcysteine 組，各有一隻死亡，餘則無死亡情形。

如表三十四所示，小鼠經口投予 bromobenzene 16 小時後，血漿的 AST、ALT 活性明顯高於控制組。FSSC (1.0, 2.0 g/kg) 具劑量依存性的降低 AST、ALT 活性。Acetylcysteine 也具有同樣效果。

如表三十五所示，小鼠經口投予 bromobenzene 16 小時後，肝臟的蛋白質含量與控制組比較沒有差異。但肝臟脂質過氧化程度明顯高於控制組，肝臟麩胱甘肽含量比控制組低。FSSC 的處理能降低肝臟脂質過氧化程度，及增加肝臟麩胱甘肽含量。同樣 acetylcysteine 的處理對肝臟蛋白含量沒有影響，但能降低肝臟脂質過氧化程度及增加 GSH 含量。

如表三十六所示，小鼠經口投予 bromobenzene 16 小時後，肝臟的抗氧化酵素 SOD 的活性與控制組比較明顯降低。FSSC 的處理能增強肝臟 SOD 的活性，但 acetylcysteine 對 SOD 的活性沒有影響。

Bromobenzene 對肝臟 catalase 的活性僅輕微抑制，不具統計上的意義。FSSC 及 acetylcysteine 的處理對肝臟 catalase 的活性都沒有影響。

如表三十七所示，小鼠經口投予 bromobenzene 16 小時後，肝臟的麩胱甘肽相關抗氧化酵素 GSH-Px 及 GSH-Rd，及代謝酵素 GSH-T 的活性與控制組比較明顯降低。FSSC 的處理能增強肝臟 GSH-Px、GSH-Rd、GSH-T 的活性。Acetylcysteine 的處理對 GSH-Px、GSH-Rd 的活性沒有影響，但能增加 GSH-T 的活性。

如表三十八所示，小鼠經口投予 bromobenzene 16 小時後，肝臟的麩胱甘肽還原型有明顯增加，但氧化型沒有影響。Acetylcysteine 的處理會增加麩胱甘肽還原型，但不會影響氧化型。

如圖六十所示，bromobenzene 所誘導的小鼠急性肝炎，在中央靜脈週邊可見到明顯的細胞壞死、血球浸潤等。FSSC 及 acetylcysteine 的處理明顯減輕這些病變。

Bromobenzene 是工業用的溶媒，受到肝臟 cytochrome P-450 的代謝產生環氧化(epoxidation)，而後與麩胱甘肽結合排出，當肝臟麩胱甘肽被排空時，產生的活性代謝物會與肝臟的蛋白結合引起肝毒性，主要的病變在肝臟中央靜脈區的壞死，也會引起脂質過氧化上升²⁶⁷。

在本試驗，bromobenzene 同樣引起嚴重的肝組織中央靜脈區的壞死，血漿的 AST、ALT 活性明顯上升，減少肝組織的麩胱甘肽含量，脂質過氧化明顯增加。FSSC 和 acetylcysteine 同樣可以提升肝臟中麩胱甘肽含量及降低血漿中 AST、ALT 的活性，抑制脂質過氧化的產生，病理組織的壞死表現也較輕。

在本試驗 bromobenzene 的肝毒性明顯的抑制肝臟抗氧化酵素 SOD、GSH-Px、GSH-Rd 及解毒酵素 GSH-T 的活性，FSSC 處理可以

減輕這些酵素活性的下降，而 acetylcysteine 的處理僅提升 GSH-T 的活性，對 SOD、GSH-Px、GSH-Rd 的活行沒有改善作用。

結論是 acetaminophen 及 bromobenzene 的肝毒性主要來自肝臟麩胱甘肽的排空作用。FSSC 明顯對抗 acetaminophen 及 bromobenzene 肝毒性，顯示含高含量麩胱甘肽的 FSSC 投與後，確實可以增加肝臟麩胱甘肽含量而降低 acetaminophen 及 bromobenzene 的毒性。



Table 29. The effect of FSSC on the activities of AST and ALT in acetaminophen induced acute liver injury.

treatments	Doses (g/kg)	AST (U / L)	ALT (U / L)	No. of mice
Control	-	67.5 ± 5.0	32.5 ± 5.0	6
AMP + H ₂ O	-	3315.0 ± 514.1 ^{###}	5948.3 ± 800.9 ^{###}	7
AMP + FSSC	0.5	1563.8 ± 1238.2 ^{***}	2083.8 ± 1794.3 ^{***}	9
	1.0	478.8 ± 482.3 ^{***}	541.3 ± 542.4 ^{***}	9
	2.0	312.5 ± 190.5 ^{***}	300.0 ± 168.9 ^{***}	9
+ ACT	1.0	280.0 ± 225.3 ^{***}	287.5 ± 277.9 ^{***}	9

All values are means ± S.D. ^{###}*P*<0.001 compared with control group.

^{***}*P*<0.001 compared with acetaminophen + H₂O group.

AMP: acetaminophen ; ACT: acetylcysteine

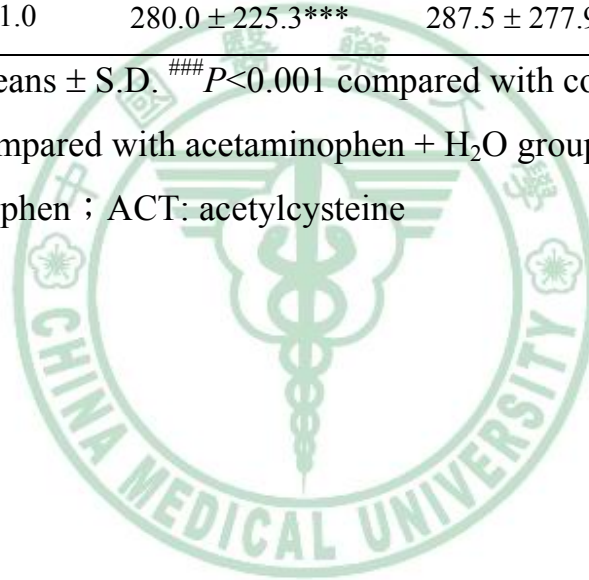


Table 30. The effect of FSSC on hepatic protein and malodialdehyde (MDA) in acetaminophen induced acute liver injury.

Treatments	Doses (g/kg)	Protein (mg / g tissue)	MDA (nmol/ mg protein)	No. of mice
Control	-	276.1 ± 31.6	12.2 ± 3.2	6
AMP+ H ₂ O	-	254.4 ± 42.8	11.7 ± 2.6	7
AMP + FSSC	0.5	262.4 ± 37.3	13.3 ± 4.1	9
	1.0	281.0 ± 31.7	12.9 ± 1.2	9
	2.0	285.7 ± 15.4	14.2 ± 1.5	9
+ ACT	1.0	262.4 ± 18.2	13.4 ± 2.2	9

All values are means ± S.D. ^{###}*P*<0.001 compared with control group.

^{***}*P*<0.001 compared with acetaminophen + H₂O group.

AMP: acetaminophen ; ACT: acetylcysteine

Table 31. The effect on FSSC on hepatic GSH and GSSG in acetaminophen induced acute liver injury.

Treatments	Doses (g/kg)	GSH (nmol/ mg protein)	GSSG (nmol/ mg protein)	No. of mice.
Control	-	23.2 ± 3.0	10.7 ± 1.5	6
AMP + H ₂ O	-	0.8 ± 0.2 ^{###}	0.9 ± 0.2 ^{###}	7
AMP + FSSC	0.5	3.0 ± 1.7	3.4 ± 1.6	9
	1.0	6.0 ± 2.9 ^{***}	5.7 ± 2.2 ^{***}	9
	2.0	12.5 ± 3.3 ^{***}	6.3 ± 1.6 ^{***}	9
+ ACT	1.0	15.5 ± 4.5 ^{***}	6.3 ± 3.0 ^{***}	9

All values are means ± S.D. ^{###}*P*<0.001 compared with control group.

^{***}*P*<0.001 compared with acetaminophen + H₂O group.

AMP: acetaminophen ; ACT: acetylcysteine

Table 32. The effect on FSSC on hepatic SOD and catalase in acetaminophen induced acute liver injury.

Treatments	Doses (g/kg)	SOD (U / mg protein)	Catalase (U / mg protein)	No. of mice.
Control	-	7.7 ± 0.3	29.2 ± 4.5	6
AMP+ H ₂ O	-	5.2 ± 0.7 ^{###}	18.3 ± 5.1 ^{###}	7
AMP + FSSC	0.5	6.1 ± 0.8	19.7 ± 4.0	9
	1.0	6.8 ± 0.8 ^{***}	20.7 ± 4.4	9
	2.0	6.6 ± 0.5 ^{**}	24.0 ± 4.5	9
+ ACT	1.0	7.4 ± 0.8 ^{***}	23.3 ± 1.9 ^{***}	9

All values are means ± S.D..^{###}*P*<0.001 compared with control group.

^{***}*P*<0.001 compared with acetaminophen + H₂O group.

AMP: acetaminophen ; ACT: acetylcysteine

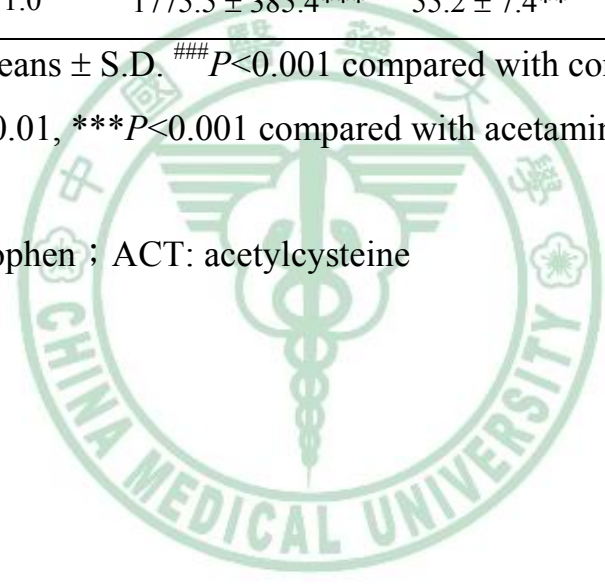
Table 33. The effect on FSSC on hepatic GSH-Px、GSH-Rd and GSH-T in acetaminophen induced acute liver injury.

Treatments	Doses (g/kg)	GSH-Px (U / mg protein)	GSH-Rd (U / mg protein)	GSH-T (U / mg protein)
Control	-	1803.9 ± 455.6	64.3 ± 2.7	4.5 ± 0.5
AMP+ H ₂ O	-	804.4 ± 153.1 ^{###}	41.2 ± 6.7 ^{###}	2.9 ± 0.3 ^{##}
AMP + FSSC	0.5	1497.0 ± 433.4 ^{**}	50.3 ± 5.9 [*]	3.6 ± 1.4
	1.0	1661.5 ± 206.8 ^{***}	53.8 ± 6.3 ^{**}	3.6 ± 0.8
	2.0	1746.6 ± 350.5 ^{***}	54.7 ± 6.2 ^{**}	4.0 ± 0.4 [*]
+ ACT	1.0	1775.5 ± 385.4 ^{***}	55.2 ± 7.4 ^{**}	4.0 ± 0.7 [*]

All values are means ± S.D. ^{###}*P*<0.001 compared with control group.

^{*}*P*<0.05, ^{**}*P*<0.01, ^{***}*P*<0.001 compared with acetaminophen + H₂O group.

AMP: acetaminophen ; ACT: acetylcysteine



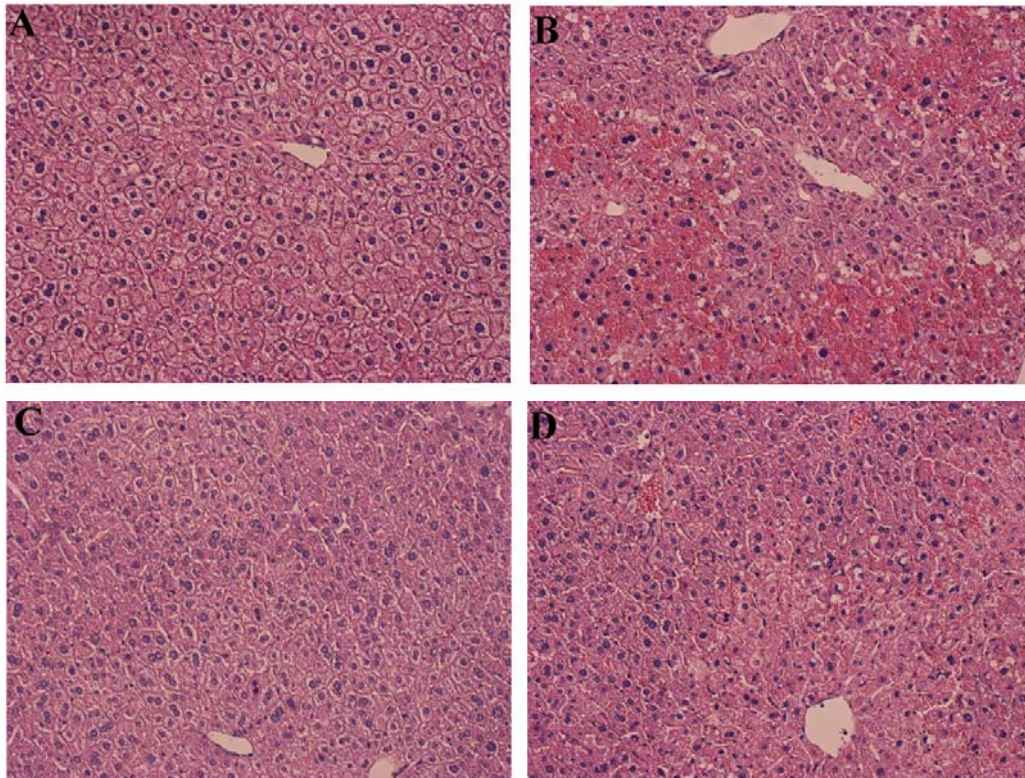


Fig 59. Treatment with FSSC improved the histology of acetaminophen-treated rat liver. (H.E. stain)

A : Control ; B : acetaminophen + H₂O ; C : acetaminophen + FSSC 2 g/kg

D : acetaminophen + acetylcysteine 1 g/kg

Table 34. The effect on FSSC on the activities of plasma AST and ALT in bromobenzene induced acute liver injury.

Treatments	Doses (g/kg)	AST (U / L)	ALT (U / L)	No. of mice
Control	-	65.6 ± 5.0	30.5 ± 5.0	6
BMB + H ₂ O	-	4068.0 ± 1786.2 ^{###}	4110.9 ± 2326.2 ^{###}	8
BMB + FSSC	0.5	3281.1 ± 3296.3	3234.7 ± 3858.1	8
	1.0	923.7 ± 752.4 ^{**}	722.0 ± 576.7 ^{**}	9
	2.0	397.1 ± 547.8 ^{**}	305.7 ± 279.0 ^{**}	9
+ ACT	1.0	352.0 ± 436.1 ^{**}	851.4 ± 1153.1 ^{**}	8

All values are means ± S.D. ^{###}*P*<0.01 compared with control group.

^{**}*P*<0.01 compared with BMB + H₂O group.

BMB: bromobenzene ; ACT: acetylcysteine

Table 35. The effect on FSSC on hepatic protein,MDA and GSH in bromobenzene induced acute liver injury.

Treatments	Doses (g/kg)	Protein (mg / g tissue)	MDA (nmol/ mg protein)	GSH (nmol/ mg protein)
Control	-	282.1 ± 62.5	7.5 ± 5.6	11.7 ± 0.7
AMP + H ₂ O	-	240.8 ± 13.8	18.8 ± 1.9 ^{###}	8.6 ± 0.5 ^{###}
AMP + FSSC	0.5	254.5 ± 20.6	15.3 ± 4.8	10.1 ± 1.1 ^{**}
	1.0	255.9 ± 18.3	13.3 ± 2.7 ^{**}	10.2 ± 0.9 ^{**}
	2.0	261.6 ± 26.9	8.4 ± 4.3 ^{***}	11.8 ± 1.0 ^{***}
+ ACT	1.0	233.6 ± 28.0	9.9 ± 3.8 ^{**}	12.7 ± 0.8 ^{**}

All values are means ± S.D. ^{###}*P*<0.001 compared with control group.

^{**}*P*<0.01, ^{***}*P*<0.001 compared with BMB + H₂O group.

BMB: bromobenzene; ACT: acetylcysteine

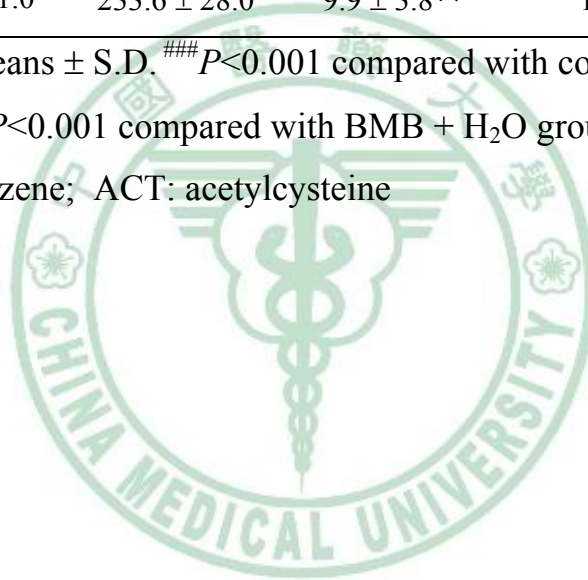


Table 36. The effect on FSSC on hepatic SOD and catalase in bromobenzene induced acute liver injury.

Treatments	Doses (g/kg)	SOD (U / mg protein)	Catalase (U / mg protein)	No. of mice
Control	-	7.8 ± 0.1	22.2 ± 2.7	6
BMB + H ₂ O	-	5.2 ± 0.8 ^{###}	17.0 ± 1.4	7
BMB + FSSC	0.5	6.0 ± 1.6	18.6 ± 4.8	9
	1.0	6.9 ± 0.3 ^{**}	20.8 ± 2.6	9
	2.0	7.5 ± 0.7 ^{***}	19.4 ± 1.9	9
+ ACT	1.0	5.8 ± 0.9	12.9 ± 4.5	9

All values are means ± S.D. ^{###}*P*<0.001 compared with control group.

^{**}*P*<0.01, ^{***}*P*<0.001 compared with bromobenzene + H₂O group.

BMB: bromobenzene; ACT: acetylcysteine

Table 37. The effect on FSSC on hepatic GSH-Px、GSH-Rd and GSH-T in bromobenzene induced acute liver injury.

Treatments	Doses (g/kg)	GSH-Px (U / mg protein)	GSH-Rd (U / mg protein)	GSH-T (U / mg protein)
Control	-	1291.0 ± 321.1	59.9 ± 5.7	4.6 ± 1.1
BMB + H ₂ O	-	862.1 ± 102.4 ^{##}	34.7 ± 3.9 ^{##}	1.2 ± 0.7 ^{###}
BMB + FSSC	0.5	871.3 ± 198.9	34.2 ± 8.8	1.8 ± 0.7
	1.0	1186.2 ± 105.7*	46.6 ± 8.2	1.6 ± 0.8
	2.0	1224.4 ± 105.9*	53.7 ± 7.0**	1.8 ± 0.7*
+ ACT	1.0	1044.6 ± 323.2	47.3 ± 15.7	2.9 ± 0.3**

All values are means ± S.D. ^{##}*P*<0.01, ^{###}*P*<0.001 compared with control group. **P*<0.05, ***P*<0.01 compared with BMB + H₂O group.

BMB: bromobenzene ACT: acetylcysteine

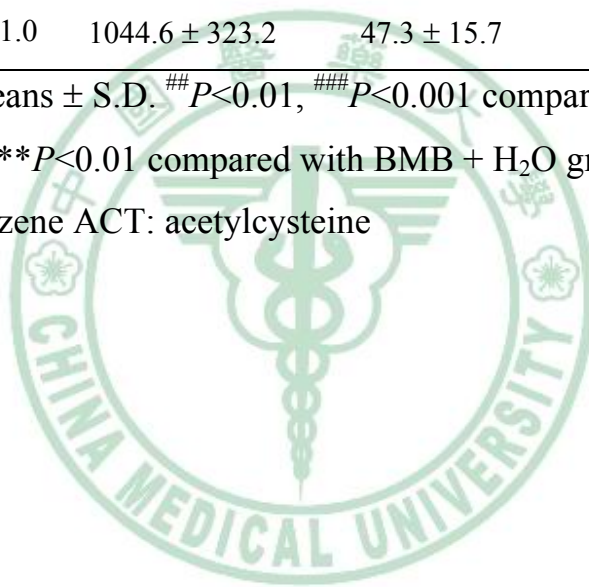


Table 38. The effect on FSSC on hepatic GSH and GSSG in bromobenzene induced acute liver injury.

Treatments	Doses (g/kg)	GSH (nmol/ mg protein)	GSSG (nmol/ mg protein)	No. of mice
Control	-	11.7 ± 0.7	6.1 ± 0.2	6
BMB + H ₂ O	-	8.6 ± 0.5 ^{###}	6.1 ± 0.2	8
BMB + FSSC	0.5	10.1 ± 1.1 ^{**}	6.1 ± 0.1	8
	1.0	10.2 ± 0.9 ^{**}	6.0 ± 0.0	9
	2.0	11.8 ± 1.0 ^{***}	6.0 ± 0.2	9
+ ACT	1.0	12.7 ± 0.8 ^{**}	6.4 ± 0.3	8

All values are means ± S.D. ^{###}*P*<0.001 compared with control group.

^{**}*P*<0.01, ^{***}*P*<0.001 compared with BMB + H₂O group.

BMB: bromobenzene; ACT: acetylcysteine

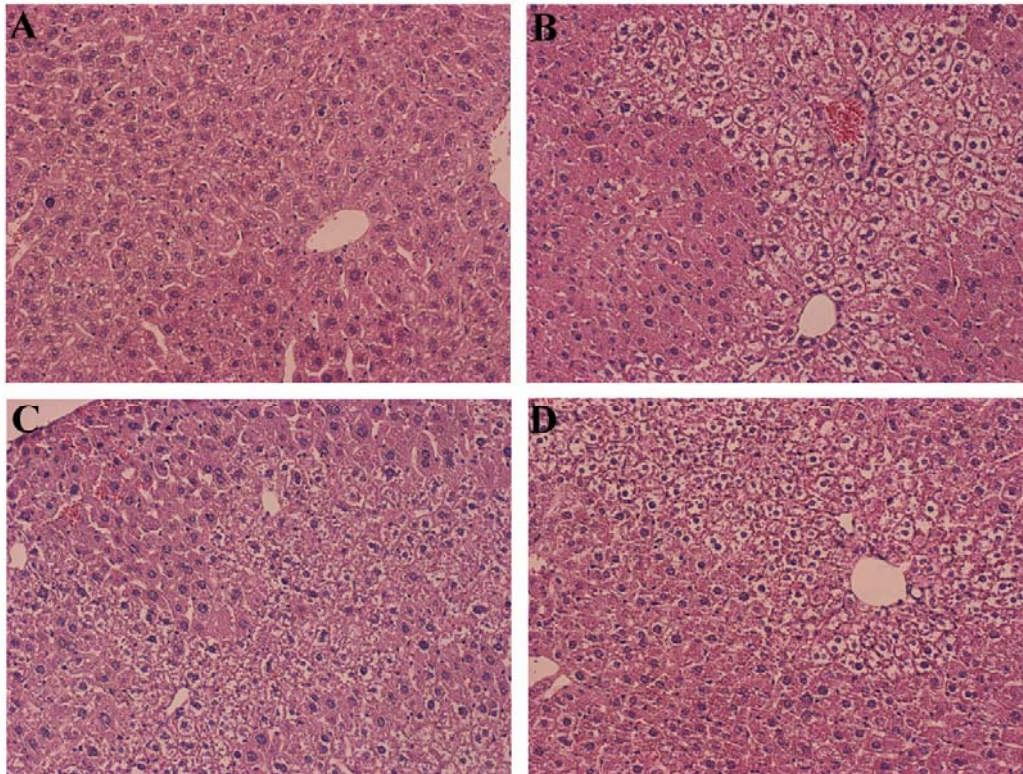


Fig 60. Treatment with FSSC improved the histology of bromobenzene-treated rat liver. (H.E. satin)

A : Control ; B : Bromobenzene + H₂O ; C : Bromobenzene + FSSC 2 g/kg

D : Bromobenzene + acetylcysteine 1 g/kg

第十一章 結論

本研究探討七種生藥，兩種中草藥—台灣金線連、枳椇子，兩種真菌類發酵物—釀酒酵母及麴菌，及三種脂肪油—橄欖油、棕櫚油及玉米油，對四氯化碳誘發大鼠或小鼠肝纖維化的效果。

結果顯示，台灣金線連、枳椇子和酵母菌、麴菌發酵物，以及橄欖油等生藥，在血液生化值、肝臟羥脯氨酸含量及病理檢查，均顯示這五種生藥有明顯的抗肝纖維化效果。進一步以 RT-PCR 分析台灣金線連、枳椇子和酵母菌、麴菌發酵物，以及橄欖油，均會抑制肝臟第一型膠原蛋白及 transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)等纖維化相關基因的表現。

脂質過氧化分為(1)非酵素型脂質過氧化，單純因自由基所引發的和(2)酵素型脂質過氧化(需環氧化酶-2 媒介)。在大鼠四氯化碳致纖維化模式中，兩種路徑的脂質過氧化產物均會增加。在大鼠投與玉米油模式下，僅增加非酵素型的反應，但對酵素型反應則無影響。玉米油與四氯化碳合併投與，玉米油也只增加非酵素型的反應，但對酵素型反應則無影響。

脂質過氧化一直被認為與肝纖維化相關。但是脂質過氧化產物對肝損傷之間的關聯，卻一直沒有明確的定論。在初代培養星狀細胞方面，觀察到酵素型(malondialdehyde 和 8-iso-PGF_{2 α})或非酵素型(15-keto-PGF_{2 α})的脂質過氧化產物單獨投與時，不會刺激星狀細胞活化。但在小劑量 TGF- β 1(1 ng/ml)活化星狀細胞條件下，加入 malondialdehyde、8-iso-PGF_{2 α} 或 15-keto-PGF_{2 α} 的脂質過氧化產物，則三種脂質過氧化產物，都不會加強星狀細胞的活化。

結論一是五種生藥-台灣金線連、枳椇子和酵母菌、麴菌發酵物，以及橄欖油，在肝纖維化動物模式中確實具有肝保護作用。結論二：脂質過氧化產物，如 malondialdehyde、8-iso-PGF_{2α}和 15-keto-PGF_{2α}不會直接引起星狀細胞活化，也不會增強 TGF-β1 的星狀細胞活化作用。



第十二章 參考文獻

1. 巢佳莉. 肝病相關醫藥與診斷最新進展 (工業研究院生物醫學組, 2002)pp1-1.
2. Wilson, B. & Braunwald, E. 哈里遜內科學 In: 肝臟與膽道疾病 12th ed (McGraw-Hill Medical, 2006) pp 1561-1573.
3. Bataller, R. & Brenner, D. A. Hepatic stellate cells as a target for treatment of liver fibrosis. *Seminars in liver disease* 21, 437-451 (2001).
4. Iredale, J. P. et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 102, 538-49 (1998).
5. Lieber, C. S. Alcoholic liver disease: new insights in pathogenesis lead to new treatments. *J Hepatol* 32, 113-28 (2000).
6. Medina, J. & Moreno-Otero, R. Pathophysiological basis for antioxidant therapy in chronic liver disease. *Drugs* 65, 2445-61 (2005).
7. Brady, L. M., Fox, E. S. & Fimmel, C. J. Polyenylphosphatidylcholine inhibits PDGF-induced proliferation in rat hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 248, 174-9 (1998).
8. Poniachik, J., Baraona, E., Zhao, J. & Lieber, C. S. Dilinoleoylphosphatidylcholine decreases hepatic stellate cell activation. *J Lab Clin Med* 133, 342-8 (1999).
9. Wahle, K. W., Caruso, D., Ochoa, J. J. & Quiles, J. L. Olive oil and modulation of cell signaling in disease prevention. *Lipids* 39, 1223-31 (2004).

10. Visioli, F., Poli, A. & Gall, C. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med Res Rev* 22, 65-75 (2002).
11. Leite, M. S. et al. Mechanisms of increased survival after lipopolysaccharide-induced endotoxic shock in mice consuming olive oil-enriched diet. *Shock* 23, 173-8 (2005).
12. Poli, G. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol Aspects Med* 21, 49-98 (2000).
13. Cabre, E. & Gassull, M. A. Polyunsaturated fatty acid deficiency in liver diseases: pathophysiological and clinical significance. *Nutrition* 12, 542-8 (1996).
14. Okita, M. et al. Habitual food intake and polyunsaturated fatty acid deficiency in liver cirrhosis. *Nutrition* 18, 304-8 (2002).
15. Watanabe, A., Saito, S., Tsuchida, T., Higuchi, K. & Okita, M. Low plasma levels of docosahexaenoic acid in patients with liver cirrhosis and its correction with a polyunsaturated fatty acid-enriched soft oil capsule. *Nutrition* 15, 284-8 (1999).
16. Yen, G. C. & Chang, Y. C. Medium optimization for the production of antioxidants from *Aspergillus candidus*. *J Food Prot* 62, 657-61 (1999).
17. Yoshikawa, M. et al. Bioactive constituents of Chinese natural medicines. III. Absolute stereostructures of new dihydroflavonols, hovenitins I, II, and III, isolated from *hoveniae semen seu fructus*, the seed and fruit of *Hovenia dulcis* THUNB. (Rhamnaceae): inhibitory effect on alcohol-induced muscular relaxation and hepatoprotective activity. *Yakugaku Zasshi* 117, 108-18 (1997).

18. Liu, X. L., Zhnag, H. & Wang, F. Effect of Hovenia dulcis extract on expression of MMP-13 and TIMP-1 in hepatic tissue. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 31, 1097-100 (2006).
19. Hase, K. et al. Hepatoprotective effect of Hovenia dulcis THUNB. on experimental liver injuries induced by carbon tetrachloride or D-galactosamine/lipopolysaccharide. *Biol Pharm Bull* 20, 381-5 (1997).
20. Rustgi, A. K. The requisites in Gastroenterology volume 3: Hepatobiliary tract and pancreas (Mosby, 2004)pp1-34.
21. Friedman, S. L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 275, 2247-50 (2000).
22. Alcolado, R., Arthur, M. J. & Iredale, J. P. Pathogenesis of liver fibrosis. *Clin Sci (Lond)* 92, 103-12 (1997).
23. Hartmut, M. & Hanauske-Abel, H. M. Fibrosis of the liver: representative molecular elements and their emerging role as anti-fibrotic targents. In: *Hepatology: A text book of liver disease* (W.B. Saunder, 2003)pp347-394.
24. Kuntz, E. & Kuntz, H.-D. *Hepatology: principles and practice: history, morphology, biochemistry, diagnostics, clinic, therapy* (Springer, 2002)pp78-109.
25. Ganong, W. F. *Ganong 醫學生理學* 1st ed. (合記圖書出版社, 1997)pp544-576.
26. Fontecave, M., Atta, M. & Mulliez, E. S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. *Trends Biochem Sci* 29, 243-9 (2004).
27. Mato, J. M., Corrales, F. J., Lu, S. C. & Avila, M. A. S-Adenosylmethionine: a control switch that regulates liver function. *Faseb J* 16, 15-26 (2002).

28. Cantoni, G. L. Biological methylation: selected aspects. *Annu Rev Biochem* 44, 435-51 (1975).
29. Finkelstein, J. D. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1, 228-37 (1990).
30. Mari, M. et al. Acidic sphingomyelinase downregulates the liver-specific methionine adenosyltransferase 1A, contributing to tumor necrosis factor-induced lethal hepatitis. *J Clin Invest* 113, 895-904 (2004).
31. Kotb, M. et al. Consensus nomenclature for the mammalian methionine adenosyltransferase genes and gene products. *Trends Genet* 13, 51-2 (1997).
32. Gil, B. et al. Differential expression pattern of S-adenosylmethionine synthetase isoenzymes during rat liver development. *Hepatology* 24, 876-81 (1996).
33. Frago, L. M., Gimenez, A., Rodriguez, E. N. & Varela-Nieto, I. Pattern of methionine adenosyltransferase isoenzyme expression during rat liver regeneration after partial hepatectomy. *FEBS Lett* 426, 305-8 (1998).
34. Paneda, C. et al. Liver cell proliferation requires methionine adenosyltransferase 2A mRNA up-regulation. *Hepatology* 35, 1381-91 (2002).
35. Martinez-Chantar, M. L. et al. Importance of a deficiency in S-adenosyl-L-methionine synthesis in the pathogenesis of liver injury. *Am J Clin Nutr* 76, 1177S-82S (2002).
36. Farrell, G. C., George, J., Hall, P. d. I. M. & McCullough, A. J. Fatty liver disease: NASH and related disorders (Blackwell, 2005) pp109-122.

37. Sluse, F. E. et al. Mitochondrial UCPs: new insights into regulation and impact. *Biochim Biophys Acta* 1757, 480-5 (2006).
38. Rashid, A. et al. Mitochondrial proteins that regulate apoptosis and necrosis are induced in mouse fatty liver. *Hepatology* 29, 1131-8 (1999).
39. Dircks, L. K. & Sul, H. S. Mammalian mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase. *Biochim Biophys Acta* 1348, 17-26 (1997).
40. Abumrad, N. A., el-Maghrabi, M. R., Amri, E. Z., Lopez, E. & Grimaldi, P. A. Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J Biol Chem* 268, 17665-8 (1993).
41. Haubrich, W. S. Kupffer of Kupffer cells. *Gastroenterology* 127, 16 (2004).
42. Gregory, S. H. & Wing, E. J. Neutrophil-Kupffer cell interaction: a critical component of host defenses to systemic bacterial infections. *J Leukoc Biol* 72, 239-48 (2002).
43. Muriel, P., Alba, N., Perez-Alvarez, V. M., Shibayama, M. & Tsutsumi, V. K. Kupffer cells inhibition prevents hepatic lipid peroxidation and damage induced by carbon tetrachloride. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 130, 219-26 (2001).
44. Muriel, P. & Escobar, Y. Kupffer cells are responsible for liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride. *J Appl Toxicol* 23, 103-8 (2003).
45. Luckey, S. W. & Petersen, D. R. Activation of Kupffer cells during the course of carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrosis in rats. *Exp Mol Pathol* 71, 226-40 (2001).

46. Gregory, S. H. et al. Complementary adhesion molecules promote neutrophil-Kupffer cell interaction and the elimination of bacteria taken up by the liver. *J Immunol* 168, 308-15 (2002).
47. Bozza, P. T. et al. Leukocyte lipid body formation and eicosanoid generation: cyclooxygenase-independent inhibition by aspirin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11091-6 (1996).
48. Bozza, P. T., Melo, R. C. & Bandeira-Melo, C. Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. *Pharmacol Ther* 113, 30-49 (2007).
49. Yaqoob, P. Fatty acids as gatekeepers of immune cell regulation. *Trends Immunol* 24, 639-45 (2003).
50. Bozza, P. T. & Bandeira-Melo, C. Mechanisms of leukocyte lipid body formation and function in inflammation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100 Suppl 1, 113-20 (2005).
51. Weller, P. F., Ryeom, S. W., Picard, S. T., Ackerman, S. J. & Dvorak, A. M. Cytoplasmic lipid bodies of neutrophils: formation induced by cis-unsaturated fatty acids and mediated by protein kinase C. *J Cell Biol* 113, 137-46 (1991).
52. Su, G. L. Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283, G256-65 (2002).
53. Nanji, A. A. Role of Kupffer cells in alcoholic hepatitis. *Alcohol* 27, 13-5 (2002).
54. Lorenzo-Zuniga, V. et al. Insulin-like growth factor I improves intestinal barrier function in cirrhotic rats. *Gut* 55, 1306-12 (2006).

55. Qiu, D. K., Hua, J., Li, J. Q. & Li, E. L. CD14 expression on Kupffer cells during the course of carbon tetrachloride-mediated liver injury. *Chin J Dig Dis* 6, 137-41 (2005).
56. Schumann, R. R. & Latz, E. Lipopolysaccharide-binding protein. *Chem Immunol* 74, 42-60 (2000).
57. Cao, Q., Mak, K. M. & Lieber, C. S. Dilinoleoylphosphatidylcholine decreases LPS-induced TNF- α generation in Kupffer cells of ethanol-fed rats: respective roles of MAPKs and NF- κ B. *Biochem Biophys Res Commun* 294, 849-53 (2002).
58. Han, D., Hanawa, N., Saberi, B. & Kaplowitz, N. Hydrogen peroxide and redox modulation sensitize primary mouse hepatocytes to TNF-induced apoptosis. *Free Radic Biol Med* 41, 627-39 (2006).
59. D'Avila, H. et al. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *J Immunol* 176, 3087-97 (2006).
60. Rivera, C. A. et al. Attenuation of CCl₄-induced hepatic fibrosis by GdCl₃ treatment or dietary glycine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281, G200-7 (2001).
61. Ito, T. & Nemoto, M. Kupfer's cells and fat storing cells in the capillary wall of human liver. *Okajimas Folia Anat Jpn* 24, 243-58 (1952).
62. Wake, K. Perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs. *Int Rev Cytol* 66, 303-53 (1980).

63. Geerts, A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Seminars in liver disease* 21, 311-336 (2001).
64. Wake, K. "Sternzellen" in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A. *Am J Anat* 132, 429-62 (1971).
65. Gressner, A. M. Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney Int Suppl* 54, S39-45 (1996).
66. Geerts, A., Lazou, J. M., De Bleser, P. & Wisse, E. Tissue distribution, quantitation and proliferation kinetics of fat-storing cells in carbon tetrachloride-injured rat liver. *Hepatology* 13, 1193-202 (1991).
67. Bataller, R. & Brenner, D. A. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115, 209-18 (2005).
68. Yan, S. et al. Expression pattern of matrix metalloproteinases-13 in a rat model of alcoholic liver fibrosis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 4, 569-72 (2005).
69. Neubauer, K., Saile, B. & Ramadori, G. Liver fibrosis and altered matrix synthesis. *Can J Gastroenterol* 15, 187-93 (2001).
70. Schuppan, D. & Porov, Y. Hepatic fibrosis: From bench to bedside. *J Gastroenterol Hepatol* 17 Suppl 3, S300-S305 (2002).
71. Fiorucci, S. et al. A farnesoid x receptor-small heterodimer partner regulatory cascade modulates tissue metalloproteinase inhibitor-1 and matrix metalloprotease expression in hepatic stellate cells and promotes resolution of liver fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther* 314, 584-95 (2005).

72. Wake, K. Hepatic stellate cells: three-dimensional structure, localization, heterogeneity and development. *Proc Jpn Acad, Ser B* 82, 155-164 (2006).
73. Rust, C. & Gores, G. J. Apoptosis and liver disease. *Am J Med* 108, 567-74 (2000).
74. Issa, R. et al. Apoptosis of hepatic stellate cells: involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factors. *Gut* 48, 548-57 (2001).
75. Arthur, M. J. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279, G245-9 (2000).
76. De Minicis, S., Bataller, R. & Brenner, D. A. NADPH oxidase in the liver: defensive, offensive, or fibrogenic? *Gastroenterology* 131, 272-5 (2006).
77. Thakur, V., Pritchard, M. T., McMullen, M. R., Wang, Q. & Nagy, L. E. Chronic ethanol feeding increases activation of NADPH oxidase by lipopolysaccharide in rat Kupffer cells: role of increased reactive oxygen in LPS-stimulated ERK1/2 activation and TNF- α production. *J Leukoc Biol* 79, 1348-56 (2006).
78. de Zwart, L. L., Meerman, J. H., Commandeur, J. N. & Vermeulen, N. P. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Biol Med* 26, 202-26 (1999).
79. Letteron, P., Fromenty, B., Terris, B., Degott, C. & Pessayre, D. Acute and chronic hepatic steatosis lead to in vivo lipid peroxidation in mice. *J Hepatol* 24, 200-8 (1996).

80. Esterbauer, H., Schaur, R. J. & Zollner, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11, 81-128 (1991).
81. Morrow, J. D. et al. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 9383-7 (1990).
82. Basu, S. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. *Toxicology* 189, 113-27 (2003).
83. Comporti, M. et al. F₂-isoprostanes stimulate collagen synthesis in activated hepatic stellate cells: a link with liver fibrosis? *Lab Invest* 85, 1381-91 (2005).
84. Huang, Z. Z. et al. Mechanism and significance of increased glutathione level in human hepatocellular carcinoma and liver regeneration. *Faseb J* 15, 19-21 (2001).
85. Kosower, N. S. & Kosower, E. M. The glutathione status of cells. *Int Rev Cytol* 54, 109-60 (1978).
86. Astor, M. B., Anderson, M. E. & Meister, A. Relationship between intracellular GSH levels and hypoxic cell radiosensitivity. *Pharmacol Ther* 39, 115-21 (1988).
87. Courtiere, A., Cotte, J. M., Pignol, F. & Jadot, G. Lipid peroxidation in aged patients. Influence of an antioxidant combination (vitamin C-vitamin E-rutin). *Therapie* 44, 13-7 (1989).
88. Shertzer, H. G., Reitman, F. A. & Tabor, M. W. Influence of diet on the expression of hepatotoxicity from carbon tetrachloride in ICR mice. *Drug Nutr Interact* 5, 275-82 (1988).

89. Wang, L. F. et al. Prevention of cellular oxidative damage by an aqueous extract of *Anoectochilus formosanus*. *Ann N Y Acad Sci* 1042, 379-86 (2005).
90. May, M. J., Vernoux, T., Sanchez-Fernandez, R., Van Montagu, M. & Inze, D. Evidence for posttranscriptional activation of gamma-glutamylcysteine synthetase during plant stress responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12049-54 (1998).
91. Malpure, P. P., Shah, A. S. & Juvekar, A. R. Antioxidant and anti-inflammatory activity of extract obtained from *Aspergillus candidus* MTCC 2202 broth filtrate. *Indian J Exp Biol* 44, 468-73 (2006).
92. Cameron, G. & Karunaratne, W. Carbon tetrachloride cirrhosis in relation to liver regeneration. *Biochemical Pharmacology* 42, 1-21 (1936).
93. Zakim, D. & Boyer, T. D. *Hepatology: a textbook of liver disease* Chapter 12: Hanauske-Abel H.M., Fibrosis of the liver: representative molecular elements and their emerging role as anto-fibrotic targents 4th ed. (WB. Saunders, 2003)pp347-394.
94. Weber, L. W., Boll, M. & Stampfl, A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol* 33, 105-36 (2003).
95. Seidel, H. J., Weber, L. & Barthel, E. Hematological toxicity of tetrachloroethylene in mice. *Arch Toxicol* 66, 228-30 (1992).
96. Comporti, M. Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Lab Invest* 53, 599-623 (1985).
97. Belitz, H. D. & Grosch, W. *Food Chemistry In: Lipids* 2nd ed. (Springer, 1999)pp152-234.

98. Insel, P., Turner, R. E. & Ross, D. Nutrition, 2nd ed In: Lipids (American Dietetic Association, 2004)pp164-203.
99. Bach, A., Debry, G. & Metais, P. Hepatic metabolism of medium chain triglycerides. *Bibl Nutr Dieta*, 24-35 (1977).
100. Thompson, T. G. & Veneman, A. M. Dietary Guidelines for Americans In: *Fats* (2005)pp29-34.
101. 成田昌道. 肝病居家療法一本通 (漢宇國際文化出版, 2006)pp103-104.
102. Cabre, E. & Gassull, M. A. Nutritional and metabolic issues in cirrhosis and liver transplantation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 3, 345-54 (2000).
103. Cabre, E. et al. The relationship of plasma polyunsaturated fatty acid deficiency with survival in advanced liver cirrhosis: multivariate analysis. *Am J Gastroenterol* 88, 718-22 (1993).
104. Cabre, E. et al. Effect of total enteral nutrition on the short-term outcome of severely malnourished cirrhotics. A randomized controlled trial. *Gastroenterology* 98, 715-20 (1990).
105. Cabre, E. et al. Plasma polyunsaturated fatty acids in liver cirrhosis with or without chronic hepatic encephalopathy: a preliminary study. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 16, 359-63 (1992).
106. Okita, M., Watanabe, A. & Tsuji, T. Lipid malnutrition of patients with liver cirrhosis: effect of low intake of dietary lipid on plasma fatty acid composition. *Acta Med Okayama* 43, 39-45 (1989).
107. Cabre, E. et al. Polyunsaturated fatty acid deficiency in liver cirrhosis: its relation to associated protein-energy malnutrition (preliminary report). *Am J Gastroenterol* 83, 712-7 (1988).

108. Guarini, P. et al. Erythrocyte membrane lipids and serum selenium in post-viral and alcoholic cirrhosis. *Clin Chim Acta* 270, 139-50 (1998).
109. Shiraishi, K., Matsuzaki, S., Itakura, M. & Ishida, H. Abnormality in membrane fatty acid compositions of cells measured on erythrocyte in alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 20, 56A-59A (1996).
110. Owen, J. S., Bruckdorfer, K. R., Day, R. C. & McIntyre, N. Decreased erythrocyte membrane fluidity and altered lipid composition in human liver disease. *J Lipid Res* 23, 124-32 (1982).
111. Marra, F. et al. Effects of supplementation with unsaturated fatty acids on plasma and membrane lipid composition and platelet function in patients with cirrhosis and defective aggregation. *J Hepatol* 28, 654-61 (1998).
112. Clot, P., Tabone, M., Arico, S. & Albano, E. Monitoring oxidative damage in patients with liver cirrhosis and different daily alcohol intake. *Gut* 35, 1637-43 (1994).
113. Polavarapu, R. et al. 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, 1317-23 (1998).
114. Moreira, E., Fontana, L., Periago, J. L., Sanchez De Medina, F. & Gil, A. Changes in fatty acid composition of plasma, liver microsomes, and erythrocytes in liver cirrhosis induced by oral intake of thioacetamide in rats. *Hepatology* 21, 199-206 (1995).
115. Cabre, E. & Gassull, M. A. Feeding long-chain PUFA to advanced cirrhotics: is it worthwhile? *Nutrition* 15, 322-4 (1999).
116. 甘偉松. 藥用植物學 6th ed. (國立中國醫藥研究所, 1981)pp373, 445, 584, 591, 900.

117. Earl, M. 藥草聖典 1st ed. (迪騰出版圖書有限公司, 2003)pp196-197.
118. Barness, L. A., Mellman, W. J., Tedesco, T., Young, D. G. & Nocho, R. A Quantitative Method Of Determining Urinary Phenols. Clin Chem 102, 600-7 (1963).
119. Visioli, F. & Galli, C. Phenolics from olive oil and its waste products. Biological activities in in vitro and in vivo studies. World Rev Nutr Diet 88, 233-7 (2001).
120. Visioli, F. & Galli, C. Olive oil: more than just oleic acid. Am J Clin Nutr 72, 853 (2000).
121. Servili, M., Baldioli, M., Selvaggini, R., Macchioni, A. & Montedoro, G. Phenolic compounds of olive fruit: one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance characterization of Nuzhenide and its distribution in the constitutive parts of fruit. J Agric Food Chem 47, 12-8 (1999).
122. Visioli, F. & Galli, C. The role of antioxidants in the Mediterranean diet. Lipids 36 Suppl, S49-52 (2001).
123. Visioli, F. & Galli, C. Free radical-scavenging actions of olive oil phenolics. Lipids 34 Suppl, S315 (1999).
124. Stark, A. H. & Madar, Z. Olive oil as a functional food: epidemiology and nutritional approaches. Nutr Rev 60, 170-6 (2002).
125. Bogani, P., Galli, C., Villa, M. & Visioli, F. Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. Atherosclerosis (2006).
126. Miles, E. A., Zoubouli, P. & Calder, P. C. Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. Nutrition 21, 389-94 (2005).

127. Visioli, F. & Galli, C. Antiatherogenic components of olive oil. *Curr Atheroscler Rep* 3, 64-7 (2001).
128. Carluccio, M. A. et al. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 622-9 (2003).
129. Mulrooney, H. M. & Grimble, R. F. Influence of butter and of corn, coconut and fish oils on the effects of recombinant human tumour necrosis factor-alpha in rats. *Clin Sci (Lond)* 84, 105-12 (1993).
130. Visioli, F., Bellomo, G., Montedoro, G. & Galli, C. Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis* 117, 25-32 (1995).
131. Fernandez, M. I., Torres, M. I., Gil, A. & Rios, A. Steatosis and collagen content in experimental liver cirrhosis are affected by dietary monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. *Scand J Gastroenterol* 32, 350-6 (1997).
132. Fernandez, I., Fontana, L., Gil, A., Rios, A. & Torres, M. I. Dietary supplementation with monounsaturated and long-chain polyunsaturated fatty acids influences the liver structural recovery and hepatocyte binuclearity in female Wistar rats in experimental cirrhosis induced by thioacetamide. *Exp Toxicol Pathol* 57, 65-75 (2005).
133. Esteban, F. J. et al. Effect of thioacetamide and dexamethasone on serum lipids in rats fed on high-fat sunflower or olive oil diets. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 45, 231-8 (1999).
134. Szende, B., Timar, F. & Hargitai, B. Olive oil decreases liver damage in rats caused by carbon tetrachloride (CCl₄). *Exp Toxicol Pathol* 46, 355-9 (1994).

135. Rusyn, I. et al. Corn oil rapidly activates nuclear factor-kappaB in hepatic Kupffer cells by oxidant-dependent mechanisms. *Carcinogenesis* 20, 2095-100 (1999).
136. Vissers, M. N., Zock, P. L., Roodenburg, A. J., Leenen, R. & Katan, M. B. Olive oil phenols are absorbed in humans. *J Nutr* 132, 409-17 (2002).
137. Visioli, F. & Galli, C. Biological properties of olive oil phytochemicals. *Crit Rev Food Sci Nutr* 42, 209-21 (2002).
138. Bartsch, H. & Nair, J. Potential role of lipid peroxidation derived DNA damage in human colon carcinogenesis: studies on exocyclic base adducts as stable oxidative stress markers. *Cancer Detect Prev* 26, 308-12 (2002).
139. 桃可成, 明. 食物本草點校本 (人民衛生出版社, 1994)pp243-276.
140. 顏焜熒. 原色生藥學 2nd ed. (南天出版社, 1987)pp229.
141. Iritani, N., Fukuda, E. & Kitamura, Y. Effect of corn oil feeding on lipid peroxidation in rats. *J Nutr* 110, 924-30 (1980).
142. Iritani, N. & Ikeda, Y. Activation of catalase and other enzymes by corn oil intake. *J Nutr* 112, 2235-9 (1982).
143. Yacoub, L. K., Fogt, F., Griniuviene, B. & Nanji, A. A. Apoptosis and bcl-2 protein expression in experimental alcoholic liver disease in the rat. *Alcohol Clin Exp Res* 19, 854-9 (1995).
144. Nanji, A. A. et al. Role of transforming growth factor-[beta]1 in inhibiting endothelial cell proliferation in experimental alcoholic liver disease. *Am J Pathol* 148, 739-47 (1996).
145. Donohue, T. M., Jr., Kharbanda, K. K., Casey, C. A. & Nanji, A. A. Decreased proteasome activity is associated with increased severity of

- liver pathology and oxidative stress in experimental alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 28, 1257-63 (2004).
146. Condie, L. W., Laurie, R. D., Mills, T., Robinson, M. & Bercz, J. P. Effect of gavage vehicle on hepatotoxicity of carbon tetrachloride in CD-1 mice: corn oil versus Tween-60 aqueous emulsion. *Fundam Appl Toxicol* 7, 199-206 (1986).
 147. Edem, D. O. Palm oil: biochemical, physiological, nutritional, hematological, and toxicological aspects: a review. *Plant Foods Hum Nutr* 57, 319-41 (2002).
 148. Pearce, B. C., Parker, R. A., Deason, M. E., Qureshi, A. A. & Wright, J. J. Hypocholesterolemic activity of synthetic and natural tocotrienols. *J Med Chem* 35, 3595-606 (1992).
 149. Nanji, A. A. et al. Dietary saturated fatty acids down-regulate cyclooxygenase-2 and tumor necrosis factor alfa and reverse fibrosis in alcohol-induced liver disease in the rat. *Hepatology* 26, 1538-45 (1997).
 150. Woldseth, B., Christensen, E. & Christophersen, B. O. Incorporation of stearic acid (18:0) and palmitic acid (16:0) in phospholipid molecular species studied in isolated rat liver cells. *Biochim Biophys Acta* 1167, 296-302 (1993).
 151. 台灣植物誌第二版編輯委員會. 台灣植物誌第二版 (國立台灣大學植物學系, 2000)pp746-749, 839-849, 857-859.
 152. 李惠林. 台灣植物誌 1st ed. (現代關係出版社, 1978)pp874-878, 953-979.
 153. 甘偉松, 程兆雄, 張清標. 金線連的藥用植物學考察. 行政院衛生署中醫藥年報 3, 46-55 (1994).

154. 周惠慈, 謝萬全 & 張其善. 台灣金線連組織培養法. 理工學報 19, 155-160 (1982).
155. 劉新裕, 蔡新聲, 徐原田 & 劉柏煙. 金線連之繁殖與栽培技術. 科學農業 35, 125-129 (1987).
156. 甘偉松. 台灣植物藥材誌 第二輯. (國立中國醫藥出版社, 1965) pp85.
157. Wang, S. Y. et al. Profiling and characterization antioxidant activities in *Anoectochilus formosanus* hayata. J Agric Food Chem 50, 1859-65 (2002).
158. Shih, C. C., Wu, Y. W. & Lin, W. C. Scavenging of reactive oxygen species and inhibition of the oxidation of low density lipoprotein by the aqueous extraction of *Anoectochilus formosanus*. Am J Chin Med 31, 25-36 (2003).
159. Du, X. M., Yoshizawa, T. & Shoyama, Y. Butanolic acid glucoside composition of whole body and in vitro plantlets of *Anoectochilus formosanus*. Phytochemistry 49, 1925-1928 (1998).
160. Shih, C. C., Wu, Y. W. & Lin, W. C. Antihyperglycaemic and antioxidant properties of *Anoectochilus formosanus* in diabetic rats. Clin Exp Pharmacol Physiol 29, 684-8 (2002).
161. Du, X. M. et al. Hepatoprotective and antihyperliposis activities of in vitro cultured *Anoectochilus formosanus*. Phytother Res 17, 30-3 (2003).
162. Lin, J. M., Lin, C. C., Chiu, H. F., Yang, J. J. & Lee, S. G. Evaluation of the anti-inflammatory and liver-protective effects of *anoectochilus formosanus*, *ganoderma lucidum* and *gynostemma pentaphyllum* in rats. Am J Chin Med 21, 59-69 (1993).

163. Shih, C. C., Wu, Y. W., Hsieh, C. C. & Lin, W. C. Effect of *Anoectochilus formosanus* on fibrosis and regeneration of the liver in rats. *Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology* 31, 620-625 (2004).
164. Shih, C. C., Wu, Y. W. & Lin, W. C. Aqueous extract of *Anoectochilus formosanus* attenuate hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *Phytomedicine* 12, 453-60 (2005).
165. Wu, J. B. et al. The hepatoprotective activity of kinsenoside from *Anoectochilus formosanus*. *Phytother Res* 21, 58-61 (2007).
166. 曾金章, 許正成 & 鄭可大. 台灣金線連免疫及抗腫瘤活性成分之研究. 天然藥物研討會, p. 45 (2000).
167. 徐致芬. 台灣金線連有效分化對小鼠非特異性免疫的調節 中國醫藥大學碩士論文 (2000).
168. Yang, L.-C., Wu, J.-B. & Lin, W.-C. Prebiotic Effects of *Anoectochilus Formosanus* Effective Fraction on *Bifidobacterium* 中國藥學會. (2005).
169. 施純青. 台灣金線連對大鼠之藥理活性研究 中國醫藥大學博士論文(2000).
170. Shih, C. C., Wu, Y. W. & Lin, W. C. Ameliorative effects of *Anoectochilus formosanus* extract on osteopenia in ovariectomized rats. *J Ethnopharmacol* 77, 233-8 (2001).
171. Ikeuchi, M., Yamaguchi, K., Nishimura, T. & Yazawa, K. Effects of *Anoectochilus formosanus* on endurance capacity in mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 51, 40-4 (2005).
172. Tseng, C. C. et al. Antitumor and immunostimulating effects of *Anoectochilus formosanus* Hayata. *Phytomedicine* 13, 366-70 (2006).

173. Shyur, L. F. et al. Induction of apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells by phytochemicals from *Anoectochilus formosanus*. *J Biomed Sci* 11, 928-39 (2004).
174. 李時珍, 明. 本草綱目 (商務印書館, 1995)pp41.
175. Li, G. et al. Neuroprotective and free radical scavenging activities of phenolic compounds from *Hovenia dulcis*. *Arch Pharm Res* 28, 804-9 (2005).
176. Ji, Y., Li, J. & Yang, P. Effects of fruits of *Hovenia dulcis* Thunb on acute alcohol toxicity in mice. *Zhong Yao Cai* 24, 126-8 (2001).
177. Ji, Y., Chen, S., Zhang, K. & Wang, W. Effects of *Hovenia dulcis* Thunb on blood sugar and hepatic glycogen in diabetic mice. *Zhong Yao Cai* 25, 190-1 (2002).
178. 蘇遠志. 應用微生物學 (華香園, 1999)pp69-83.
179. Garbutt, J. Essentials of Food Microbiology 食品微生物學精要 (藝軒圖書出版公司, 1997)pp26-27.
180. 吳聲華, 周文能 & 王也珍. 台灣高等真菌-子囊菌與擔子菌的認識 (國立自然科學博物館, 2002)pp7-12.
181. Miyake, Y. et al. New potent antioxidative hydroxyflavanones produced with *Aspergillus saitoi* from flavanone glycoside in citrus fruit. *Biosci Biotechnol Biochem* 67, 1443-50 (2003).
182. Turton, H. E., Dawes, I. W. & Grant, C. M. *Saccharomyces cerevisiae* exhibits a yAP-1-mediated adaptive response to malondialdehyde. *J Bacteriol* 179, 1096-101 (1997).
183. Penninckx, M. J. An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Res* 2, 295-305 (2002).

184. Neuman, R. E. & Logan, M. A. The determination of hydroxyproline. *J Biol Chem* 184, 299-306 (1950).
185. Danno, H., Jincho, Y., Budiyo, S., Furukawa, Y. & Kimura, S. A simple enzymatic quantitative analysis of triglycerides in tissues. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 38, 517-21 (1992).
186. Ohkawa, H., Ohishi, N. & Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95, 351-8 (1979).
187. Congdon, R. W., Muth, G. W. & Splittgerber, A. G. The binding interaction of Coomassie blue with proteins. *Anal Biochem* 213, 407-13 (1993).
188. Honda, H. et al. Leptin is required for fibrogenic responses induced by thioacetamide in the murine liver. *Hepatology* 36, 12-21 (2002).
189. Ruwart, M. J. et al. 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, 801-6 (1989).
190. Ramboer, C., Piessens, F. & De Groote, J. Serum xanthine oxidase and liver disease. *Digestion* 7, 183-95 (1972).
191. Pacheco, P. et al. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. *J Immunol* 169, 6498-506 (2002).
192. Tsukada, S., Parsons, C. J. & Rippe, R. A. Mechanisms of liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 364, 33-60 (2006).
193. Kocher, O., Kennedy, S. P. & Madri, J. A. Alternative splicing of endothelial cell fibronectin mRNA in the IICS region. Functional significance. *Am J Pathol* 137, 1509-24 (1990).

194. Bachem, M. G., Meyer, D., Melchior, R., Sell, K. M. & Gressner, A. M. Activation of rat liver perisinusoidal lipocytes by transforming growth factors derived from myofibroblastlike cells. A potential mechanism of self perpetuation in liver fibrogenesis. *J Clin Invest* 89, 19-27 (1992).
195. Lin, W. C. & Lin, W. L. Ameliorative effect of *Ganoderma lucidum* on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 12, 265-70 (2006).
196. Lin, W. C., Kuo, S. C., Lin, W. L., Fang, H. L. & Wang, B. C. Filtrate of fermented mycelia from *Antrodia camphorata* reduces liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *World J Gastroenterol* 12, 2369-74 (2006).
197. Chen, W. X. et al. Quantitative analysis of transforming growth factor beta 1 mRNA in patients with alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol* 8, 379-81 (2002).
198. Reznick, A. Z. & Packer, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 233, 357-63 (1994).
199. Levine, R. L., Wehr, N., Williams, J. A., Stadtman, E. R. & Shacter, E. Determination of carbonyl groups in oxidized proteins. *Methods Mol Biol* 99, 15-24 (2000).
200. Terrazos-Luch, J., Corona-Garcia, S., Zentella-de Pina, M., Ramirez-Gonzalez, M. D. & Pina-Garza, E. Butylated hydroxytoluene prevents hepatic damage induced by food oil. *Proc West Pharmacol Soc* 40, 97-9 (1997).

201. Niittynen, M. et al. Differences in acute toxicity syndromes of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and 1,2,3,4,7,8-hexachlorodibenzo-p-dioxin in rats. *Toxicology* 235, 39-51 (2007).
202. Basu, S. Oxidative injury induced cyclooxygenase activation in experimental hepatotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 254, 764-7 (1999).
203. Sodergren, E., Cederberg, J., Vessby, B. & Basu, S. Vitamin E reduces lipid peroxidation in experimental hepatotoxicity in rats. *Eur J Nutr* 40, 10-6 (2001).
204. Sundari, P. N., Wilfred, G. & Ramakrishna, B. Does oxidative protein damage play a role in the pathogenesis of carbon tetrachloride-induced liver injury in the rat? *Biochim Biophys Acta* 1362, 169-76 (1997).
205. Iritani, N. & Fukuda, E. Effect of corn oil feeding on triglyceride synthesis in the rat. *J Nutr* 110, 1138-43 (1980).
206. Linden, D. et al. Liver-directed overexpression of mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase results in hepatic steatosis, increased triacylglycerol secretion and reduced fatty acid oxidation. *Faseb J* 20, 434-43 (2006).
207. Cortez-Pinto, H. et al. Bacterial lipopolysaccharide induces uncoupling protein-2 expression in hepatocytes by a tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 251, 313-9 (1998).
208. Negre-Salvayre, A. et al. A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *Faseb J* 11, 809-15 (1997).

209. Zhang, X. et al. CD36/fatty acid translocase in rats: distribution, isolation from hepatocytes, and comparison with the scavenger receptor SR-B1. *Lab Invest* 83, 317-32 (2003).
210. Nina A, E. R., Flisher E, Xuia RMW, Louisa C, Amilcar FM, Gunnelt, Petra TE. Female-predominant expression of fatty acid translocase/Cd36 in rat and human liver. *Endocrinology* 145, 1972-1979 (2004).
211. Sturgill, M. G. & Lambert, G. H. Xenobiotic-induced hepatotoxicity: mechanisms of liver injury and methods of monitoring hepatic function. *Clin Chem* 43, 1512-26 (1997).
212. Yamada, Y. & Fausto, N. Deficient liver regeneration after carbon tetrachloride injury in mice lacking type 1 but not type 2 tumor necrosis factor receptor. *Am J Pathol* 152, 1577-89 (1998).
213. Gill, M. A. & Kircbain, W. R. Alcoholic liver disease. In: *Pharmacotherapy: A pathophysiologic Approach* 3th ed. (Staford, 1997)pp347-394, 785-800.
214. Yasuda, S., Watanabe, S., Kobayashi, T. & Okuyama, H. Docosahexaenoic acid-rich fish oil does not enhance the elevation of serum transaminase and liver triacylglycerol induced by carbon tetrachloride in mice. *Lipids* 32, 1249-55 (1997).
215. Anania, F. A., Womack, L., Jiang, M. & Saxena, N. K. Aldehydes potentiate alpha(2)(I) collagen gene activity by JNK in hepatic stellate cells. *Free Radic Biol Med* 30, 846-57 (2001).
216. Maher, J. J., Tzagarakis, C. & Gimenez, A. Malondialdehyde stimulates collagen production by hepatic lipocytes only upon activation in primary culture. *Alcohol* 29, 605-10 (1994).

217. Parola, M. et al. Stimulation of lipid peroxidation or 4-hydroxynonenal treatment increases procollagen alpha 1 (I) gene expression in human liver fat-storing cells. *Biochem Biophys Res Commun* 194, 1044-50 (1993).
218. Olynyk, J. K. et al. Aldehydic products of lipid peroxidation do not directly activate rat hepatic stellate cells. *J Gastroenterol Hepatol* 17, 785-90 (2002).
219. Ji, C., Rouzer, C. A., Marnett, L. J. & Pietenpol, J. A. Induction of cell cycle arrest by the endogenous product of lipid peroxidation, malondialdehyde. *Carcinogenesis* 19, 1275-83 (1998).
220. Mudra, D. R. & Parkinson, A. *Current Protocols in Toxicology* (John Wiley & Sons, 2001)pp14.12.11-14.12.13.
221. Froh, M., Konno, A. & Thurman, R. G. *Current Protocols in Toxicology* (John Wiley & Sons, 2001)pp14.14.11-14.14.12.
222. Kharbanda, K. K., Rogers, D. D., 2nd, Wyatt, T. A., Sorrell, M. F. & Tuma, D. J. Transforming growth factor-beta induces contraction of activated hepatic stellate cells. *J Hepatol* 41, 60-6 (2004).
223. Tsukamoto, H. et al. Experimental liver cirrhosis induced by alcohol and iron. *J Clin Invest* 96, 620-30 (1995).
224. Maher, J. J., Tzagarakis, C. & Gimenez, A. Malondialdehyde stimulates collagen production by hepatic lipocytes only upon activation in primary culture. *Alcohol* 29, 605-10 (1994).
225. Yang, Y., Sharma, R., Sharma, A., Awasthi, S. & Awasthi, Y. C. Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling. *Acta Biochim Pol* 50, 319-36 (2003).

226. Zhan, S. S. et al. Phagocytosis of apoptotic bodies by hepatic stellate cells induces NADPH oxidase and is associated with liver fibrosis in vivo. *Hepatology* 43, 435-43 (2006).
227. Lin, C. C., Huang, P. C. & Lin, J. M. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Anoectochilus formosanus* and *Gynostemma pentaphyllum*. *Am J Chin Med* 28, 87-96 (2000).
228. 莊瑾如. 台灣金線連有效分劃抑制 thioacetamide 誘發小鼠肝纖維化 中國醫藥大學碩士論文 (2006).
229. Friedman, S. L. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol* 38 Suppl 1, S38-53 (2003).
230. Xidakis, C. et al. Production of pro- and anti-fibrotic agents by rat Kupffer cells; the effect of octreotide. *Dig Dis Sci* 50, 935-41 (2005).
231. Breitkopf, K., Sawitza, I. & Gressner, A. M. Characterization of intracellular pathways leading to coinduction of thrombospondin-1 and TGF-beta1 expression in rat hepatic stellate cells. *Growth Factors* 23, 77-85 (2005).
232. Camps, J. et al. Relationship between hepatic lipid peroxidation and fibrogenesis in carbon tetrachloride-treated rats: effect of zinc administration. *Clin Sci (Lond)* 83, 695-700 (1992).
233. Slater, T. F. & Sawyer, B. C. The stimulatory effects of carbon tetrachloride and other halogenoalkanes on peroxidative reactions in rat liver fractions in vitro. General features of the systems used. *Biochem J* 123, 805-14 (1971).
234. Kahkonen, M. P. et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 47, 3954-62 (1999).

235. Gebhardt, R. Oxidative stress, plant-derived antioxidants and liver fibrosis. *Planta Med* 68, 289-96 (2002).
236. Chang, S. T. et al. Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. *J Agric Food Chem* 49, 3420-4 (2001).
237. Pierce, R. A. et al. Increased procollagen mRNA levels in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. *J Biol Chem* 262, 1652-8 (1987).
238. Rekká, E. & Kourounakis, P. N. Effect of hydroxyethyl rutosides and related compounds on lipid peroxidation and free radical scavenging activity. Some structural aspects. *J Pharm Pharmacol* 43, 486-91 (1991).
239. Ratty, A. K., Sunamoto, J. & Das, N. P. Interaction of flavonoids with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical, liposomal membranes and soybean lipoxygenase-1. *Biochem Pharmacol* 37, 989-95 (1988).
240. Lengyel, G. & Tulassay, Z. Antioxidant therapy in chronic liver diseases. *Orv Hetil* 147, 1113-8 (2006).
241. Arthur, J. R. & Boyne, R. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in neutrophils from selenium deficient and copper deficient cattle. *Life Sci* 36, 1569-75 (1985).
242. Podolsky, D. K. & Isselbacher, K. J. Derangements of hepatic metabolism. In: *Harrison's principle of internal medicine*. (McGraw-Hill, 1998)pp1448-1458.
243. Wong, F. Drug insight: the role of albumin in the management of chronic liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 4, 43-51 (2007).

244. Perez Tamayo, R. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄ and adequate model of human cirrhosis? *Hepatology* 3, 112-20 (1983).
245. Bissell, D. M., Friedman, S. L., Maher, J. J. & Roll, F. J. Connective tissue biology and hepatic fibrosis: report of a conference. *Hepatology* 11, 488-98 (1990).
246. Wasser, S., Ho, J. M., Ang, H. K. & Tan, C. E. *Salvia miltiorrhiza* reduces experimentally-induced hepatic fibrosis in rats. *J Hepatol* 29, 760-71 (1998).
247. Ostergaard, S., Olsson, L. & Nielsen, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 34-50 (2000).
248. Li, Y., Wei, G. & Chen, J. Glutathione: a review on biotechnological production. *Appl Microbiol Biotechnol* 66, 233-42 (2004).
249. Wu, G., Fang, Y. Z., Yang, S., Lupton, J. R. & Turner, N. D. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 134, 489-92 (2004).
250. Vina, J., Perez, C., Furukawa, T., Palacin, M. & Vina, J. R. Effect of oral glutathione on hepatic glutathione levels in rats and mice. *Br J Nutr* 62, 683-91 (1989).
251. Chen, W., Kennedy, D. O., Kojima, A. & Matsui-Yuasa, I. Polyamines and thiols in the cytoprotective effect of L-cysteine and L-methionine on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Amino Acids* 18, 319-27 (2000).
252. Matsui, H. et al. Sulfur-containing amino acids attenuate the development of liver fibrosis in rats through down-regulation of stellate cell activation. *J Hepatol* 40, 917-25 (2004).

253. Vandenberghe, J. Hepatotoxicology: mechanisms of liver toxicity and methodological aspects. In: toxicology: Principle and Applications. (1996)pp703-723.
254. Gressner, A. M., Weiskirchen, R., Breitkopf, K. & Dooley, S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 7, d793-807 (2002).
255. Eide, D. J. Multiple regulatory mechanisms maintain zinc homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Nutr* 133, 1532S-5S (2003).
256. Goel, A., Dhawan, D. & Kheruka, S. Evaluation of zinc in the regulation of serum T3 and T4 levels and hepatic functions in carbontetrachloride-intoxicated rats. *Biol Trace Elem Res* 41, 59-68 (1994).
257. Tezuka, M., Sadanobu, S., Gomi, K., Tachikawa, M. & Sawamura, R. In vitro effect of chromium and other trace metals on mouse hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride exposure. *Biol Pharm Bull* 18, 256-61 (1995).
258. Anderson, R. A., Polansky, M. M., Roginski, E. E. & Mertz, W. Factors affecting the retention and extraction of yeast chromium. *J Agric Food Chem* 26, 858-61 (1978).
259. Inoue, Y., Sugiyama, K., Izawa, S. & Kimura, A. Molecular identification of glutathione synthetase (GSH2) gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1395, 315-20 (1998).
260. Gupta, S., Singh, B. & Sharma, S. C. Glutathione-glutathione reductase system and lipid peroxidation in *Saccharomyces cerevisiae* under alcohol stress. *Acta Microbiol Immunol Hung* 43, 33-8 (1996).

261. Izawa, S., Inoue, Y. & Kimura, A. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 368, 73-6 (1995).
262. Izawa, S. et al. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the adaptive response to hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 330 (Pt 2), 811-7 (1998).
263. Grant, C. M., Perrone, G. & Dawes, I. W. Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 253, 893-8 (1998).
264. Monteiro, G., Kowaltowski, A. J., Barros, M. H. & Netto, L. E. Glutathione and thioredoxin peroxidases mediate susceptibility of yeast mitochondria to Ca²⁺-induced damage. *Arch Biochem Biophys* 425, 14-24 (2004).
265. Casini, A. F., Pompella, A. & Comporti, M. Liver glutathione depletion induced by bromobenzene, iodobenzene, and diethylmaleate poisoning and its relation to lipid peroxidation and necrosis. *Am J Pathol* 118, 225-37 (1985).
266. Jaeschke, H. et al. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol Sci* 65, 166-76 (2002).
267. Tinel, M. et al. Subliminal Fas stimulation increases the hepatotoxicity of acetaminophen and bromobenzene in mice. *Hepatology* 39, 655-66 (2004).
268. Hissini, P. & Hilf, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analysis Biochemistry* 24, 304-311 (1973).

269. Aebi, H. Catalase *in vitro*. Methods in Enzymology 105, p 121-126 (1984).
270. Xia, E., Rao, G., Van Remmen, H., Heydari, A. R. & Richardson, A. Activities of antioxidant enzymes in various tissues of male Fischer 344 rats are altered by food restriction. J Nutr 125, 195-201 (1995).
271. Correia, M. A. Drug biotransformation. In: Basic and clinical pharmacology. (McGraw Hill, 2004)pp52-53.
272. Kelly, G. S. Clinical applications of N-acetylcysteine. Altern Med Rev 3, 114-27 (1998).

