

# 健康食品之護肝功能評估方法

## (針對化學性肝損傷)

### 壹、前言

肝臟為人體最大、機能最複雜的重要代謝器官。它在醣、脂質、蛋白質、維生素、激素、膽汁等物質代謝中，均有重要作用；同時肝臟還有分泌、排泄、生物轉化等方面的功能。肝細胞含有豐富的，並合成許多和某些凝血因子，儲存和釋放造血因子，參與血液凝固和造血過程。肝臟也是機體重要屏障器官，其解毒和吞噬功能對機體有重要保護作用。當肝功能損傷時則代謝障礙，並影響其他臟器功能，嚴重則危及生命。肝臟具有肝動脈和門靜脈的雙重血液供應，並擁有大量血竇，肝細胞膜能直接與血液接觸，同時肝細胞膜的通透性又較大，故肝細胞與血液進行活躍有效的物質交換。很多有毒物質易引起肝細胞損傷，肝具有強大再生和代償能力，對輕度或局限性損傷往往不致造成肝功能障礙。肝臟對各種致病因子的反應方式，主要是肝實質細胞和星狀細胞增生與肝實質細胞的變性和壞死，以及肝間質的滲出和增生。當肝細胞壞死，而剩餘肝細胞再生的情況下，則發生纖維增生導致肝硬化。在肝硬化時使靜脈血流受阻，導致肝靜脈與門靜脈壓上升，促進肝內動靜脈吻合支的形成，致使肝細胞供血減少，進而發生變性或壞死、纖維增生，肝硬化更加嚴重，這樣形成惡性循環。當肝嚴重損傷，且代償能力顯著減弱時，則出現嚴重肝功能障礙稱肝功能不全，進一步發展則肝功能衰竭，引起中樞神經系統功能障礙，出現肝昏迷。中醫學認為肝的主要功能藏血、主魂、主目、主筋脈和主疏泄，與脾胃的升降密切相關，與膽互為表裡。肝氣鬱結則出現脅肋脹滿、精神抑鬱、納食不化、脘痞腹脹，甚則黃疸等症候。

國人肝臟疾病罹患率甚高，慢性肝病及肝硬化為十大死亡原因之第六位，每年死亡人數在三千人以上。造成肝臟疾病之主要因素有病毒性、酒精性與化學性三大類，而在老鼠動物模式之病理切片中與人體有一致之病理現象者為化學性肝損傷。由於造成病毒性、酒精性肝損傷之動物模式不易建立，因此本評估方法僅針對化學性肝損傷進行護肝功能之評估。所以本評估方法之進行主要是以四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)誘導大(小)白鼠慢性肝損傷的實驗模式，探討不同試驗樣品之處理對於大(小)白鼠慢性肝損傷之影響。四氯化碳誘

導肝損傷之原理，主要是因四氯化碳受肝微粒酵素活化成三氯甲烷自由基，然後與蛋白質結合導致蛋白質合成受阻，並引起脂質分解代謝失調，引起肝細胞內三酸甘油酯蓄積，另外三氯甲烷自由基形成過氧化物，導致脂質過氧化而使得肝細胞膜損傷，造成肝中酵素滲出及細胞病變而壞死。本評估方法將於日後再予以適當增加肝功能評估項目，以加強肝功能評估之完整性。另外，本評估方法目前僅針對化學性肝損傷進行護肝功能之評估，未來陸續將病毒性、酒精性肝損傷護肝功能之評估方法納入。

## 貳、實驗項目與實驗方法

### 實驗設計：

將研究組別【每組 10-12 隻雄性 SD 或 Wistar 大白鼠 (200-250 克) 或 ICR 小白鼠 (20-25 克)】分為

1. 正常對照組：正常飲食組
2. 負對照組：四氯化碳處理組
3. 正對照組：Silymarin 處理組
4. 實驗組：試驗樣品處理組 (需有二種或以上劑量組，其中之一為人體建議攝取量，另一組則為人體建議攝取量之 5-10 倍左右)

### 四氯化碳誘導大 (小) 白鼠慢性肝損傷的方法

(Lin et al., 1993; 張冠群等, 1996):

1. 實驗方法：四氯化碳誘發大 (小) 白鼠慢性肝損傷實驗模式，本方法中之四氯化碳使用劑量僅供參考。

實驗前將大 (小) 鼠以亂數法大別為至少四組，每組 10-12 隻：

A 組為正常對照組：I.P. 或灌食 olive oil (or corn oil)

+

Normal saline or d.d.H<sub>2</sub>O (P.O.)

B 組為負對照組 (肝損傷組)：I.P. (40% CCl<sub>4</sub>/olive oil or corn oil) 或灌食 (20% CCl<sub>4</sub>/olive oil or corn oil)

+

Normal saline or d.d.H<sub>2</sub>O (P.O.)

C 組為正對照組 (Silymarin 治療對照組)：I.P. (40% CCl<sub>4</sub>/olive oil or corn oil) 或灌食 (20% CCl<sub>4</sub>/olive oil or corn oil)

+

Silymarin (P.O.)

D組為實驗組：I.P. (40% CCl<sub>4</sub>/olive oil or corn oil) 或  
灌食(20% CCl<sub>4</sub>/olive oil or corn oil)  
十  
試驗樣品 (P.O.)

## 2. 步驟：

A組腹腔注射 olive oil 或 corn oil (0.1 ml/100 g BW for rats, 4  $\mu$ l/100 g BW for mice) 或灌食 olive oil 或 corn oil (0.5 ml/rat), B-D組腹腔注射 40% CCl<sub>4</sub>/olive oil or corn oil (0.1 ml/100 g BW for rats, 4  $\mu$ l/100 g BW for mice) 或灌食 20% CCl<sub>4</sub>/olive oil or corn oil (0.5 ml/rat), 每週兩次 (星期一及四); 並於星期二、三、五、六或每日, 在 A、B組以胃管灌胃 Normal saline or d.d.H<sub>2</sub>O, 在 C組灌胃予 Silymarin (200 mg/kg for rats or mice), 在 D組則灌胃予試驗樣品, 共為期八週之久。所有實驗動物分別於第一週、第三週及第六週投予試驗樣品 (或 Normal saline or d.d.H<sub>2</sub>O 或 Silymarin) 後 2 小時, 以尾部採血方式檢測肝臟的生化功能: GOT (AST)、GPT (ALT)、TG、Cholesterol。最後於第八週結束時全部犧牲, 以頸動脈或腹大動脈採血檢驗肝臟生化功能, 並剖腹取肝臟標本, 秤重後將最大右葉肝割取兩塊 1 cm x 1 cm Block 固定於 10% 的中性福馬林 (Formaline) 液中, 石蠟包封切片後分別作 HE、Masson、Reticulin stain 來進行病理學觀察。另外將其餘肝臟依解剖相關位置分為五袋, 分別進行檢測抗氧化成分 GSH 與 GSH Px、GSH Rd、SOD、Catalase 等酵素活性。

## 實驗測定項目：

- (一) 血清：測定與肝傷害相關之成分或酵素活性
1. GOT (AST)
  2. GPT (ALT)
  3. TG
  4. Cholesterol

(二) 肝臟：測定各種與抗氧化功能相關之成分或酵素活性

1. Glutathione (GSH)
2. Glutathione reductase (GSH Rd)
3. Glutathione peroxidase (GSH Px)
4. Superoxide dismutase (SOD)
5. Catalase

#### 肝臟生化指數的檢測：

所有大白鼠血液樣品在室溫下放置一小時以使其凝結。再以冷凍離心機於 4°C 下每分鐘 12000 rpm 離心 5 分鐘，來分離血清(Lin et al., 1997)。再以自動生化分析儀檢測肝臟生化指數，如 GOT (AST)、GPT (ALT)、TG、Cholesterol 等，其中 GOT (AST)及 GPT (ALT)檢測原理是依據 Reitman & Frankel (1957)及國際聯邦臨床化學 (IFCC, 1986a, b) 的標準方法。

#### 抗氧化功能相關之成分或酵素活性之分析

##### 麩胱甘 (glutathione, GSH)濃度之分析

參考 Reed 等(1980)的方法。取肝組織約 0.3 克，加入 9 倍(V/W)的 50 mM 磷酸鉀緩衝液(pH 7.0)均質 1 分鐘，得肝臟均質液樣品。肝臟均質後，迅速取均質液 400  $\mu$ l 加入等量 10% 過氯酸

(perchloric acid, PCA)混合後，靜置 40 分鐘，使 PCA 能將樣品中還原態麩胱甘 (GSH)充分溶出後，於 4 °C 下以 5000 rpm 離心 3 分鐘，取上層液待測。至於沉澱部份則加入 1 ml 1N NaOH 溶解，再刮入 eppendorf 中以分析蛋白質。另取以 0.0085g 之還原態麩胱甘 及 0.0072g 之氧化態麩胱甘 所製備好的標準品與上述所得之樣品各 400  $\mu$ l，加入 40  $\mu$ l 碘乙酸(iodoacetic acid, IAA: 100 mM)，使還原態麩胱甘 能與 IAA 結合後，給予還原態麩胱甘 多攜帶一負電荷，以便在 HPLC 分析中能比 GSSG 早分離出來；再緩慢加入碳酸氫鉀 (KHCO<sub>3</sub>)直到不再起為止，此時已中和酸而成微鹼性，以便可在高效能液相層析儀(HPLC)中分析。然後置於暗處 15 分鐘後，再加入 440  $\mu$ l 3 % 2,4-二硝基氟苯(FDNB)振盪混合使與硫元素反應成黃色物質，而此黃色物質可在紫外光偵測器(UV detector:  $\lambda$ =365 nm)中被偵測出來。之後經八小時的冷藏，再以 5000 rpm (1800xg)離心 3 分鐘，取上層液並以注射筒過濾器(syringe filter: 4 mm filter unit, 0.45  $\mu$ m Nylon)濾除雜質。最後以高效能液相層析儀進行分析。

### 麩胱甘 過氧化 (glutathione peroxidase, GSH Px)活性之分析

此酵素之分析主要是依據 Lawrence 與 Burk (1976)所報告之方法。活性測定係以過氧化氫( $H_2O_2$ )為受質。還原態麩胱甘 (GSH)經由麩胱甘 過氧化 (GSH Px)之催化可將過氧化氫還原，而還原態麩胱甘 則變成氧化態麩胱甘，然後氧化態麩胱甘 則利用麩胱甘 還原 (GSH Rd)與 NADPH 將其還原回還原態麩胱甘。取肝臟細胞質樣品 5  $\mu$ l 及 95  $\mu$ l 20 mM 磷酸鉀緩衝液(pH 7.0)，加入 0.8 ml 100 mM 磷酸鉀緩衝液(pH 7.0)之反應混合液(含 1 mM EDTA、1 mM  $NaN_3$ 、0.2 mM NADPH、1 U/ml GSH Rd 及 1 mM GSH)，在室溫下靜置五分鐘，再加入 0.1 ml 2.5 mM 過氧化氫後，以分光光度計在 340 nm 下測三分鐘(25  $^{\circ}C$ )，計算 NADPH 減少之速率，間接求出麩胱甘 過氧化的活性，而以去離子水 5  $\mu$ l 當作空白組。

比活性(specific activity)表示法：nmol NADPH/min/mg protein

### 麩胱甘 還原 (glutathione reductase, GSH Rd)活性之分析

麩胱甘 還原 活性分析是依據 Bellomo 等(1987)的方法。分析時取 10  $\mu$ l 肝臟細胞質樣品及 90  $\mu$ l 20 mM 磷酸鉀緩衝液(pH 7.0) 加入 0.9 ml 含有 1.1 mM  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 、5.0 mM GSSG 及 0.1 mM NADPH 之 100 mM 磷酸鉀緩衝液(pH 7.0)，再以分光光度計在 340 nm 下測五分鐘 (25  $^{\circ}C$ )，計算 NADPH 減少的速率，其中以 10  $\mu$ l 之去離子水作為空白組。

比活性(specific activity)表示法： nmol NADPH/min/mg protein

### 超氧化物歧化 (superoxide dismutase, SOD) 之測定

實驗參照 Marklund 與 Marklund (1974)所描述之方法進行，將肝組織用冰食鹽水 (ice-cold saline) 洗淨，在漏斗上滴乾鹽水，加入適量緩衝液 (0.32 mol/l sucrose、1 mmol/l EDTA、10 nmol/l Tris-HCl, pH 7.4) 打碎使成 10% 之均質漿 (homogenate)。高速離心 30 分鐘 (13600  $g$ )，取上清液 50  $\mu$ l，再加上 Tris - cacodylic acid buffer (pH 8.2, 50 mM) 100  $\mu$ l。溶液再加上超純水，使體積成為 980  $\mu$ l，再加上鄰苯三酚 (pyrogallol) 20  $\mu$ l (0.2 mM)，劇烈搖盪混均，以分光光度計於 420 nm 測量吸光值 (A)，每隔 20 秒測量一次，總共測量 5 分鐘，計算  $\Delta A / \Delta T$ 。

分析過程中以 SOD 標準品，作出標準線 (standard curve)，再進行分析。單位時間內抑制鄰苯三酚自動氧化速率達 50 % 時之酵素量，定為一單位 (U)；肝組織 SOD 活性，以每單位蛋白質所含 SOD 單位量表示 (U per milligram of protein)。

### 過氧化氫 (catalase, CAT) 之測定

實驗參照 Aebi (1984) 所描述之方法進行。將肝組織用冰食鹽水 (ice-cold saline) 洗淨，在漏斗上滴乾鹽水，加入適量磷酸鹽緩衝溶液，打碎使成 10 % 之均質漿 (homogenate)。離心 (700 xg) 10 分鐘，取上層液 9 份加入 1 份 Triton X-100 (1 %) 成為 stock homogenate (S.H.)。取 S.H. 加入適量之磷酸緩衝溶液進行稀釋，調整酸鹼度至 pH 7 成為 dilute homogenate (D.H.)。取 D.H. 2 ml 加入 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.03 M)，劇烈搖盪混均，以分光光度計於溫控 25 °C、波長 240 nm 之條件下測量吸光值(A)，每隔 15 秒測量一次，總共測量 2 次，計算求得反應速率常數 K。

$$K = (2.3 / \Delta t) \log(A_1 / A_2)$$

$\Delta t$ : 時間間隔(15 秒鐘)

A<sub>1</sub>: T<sub>1</sub> 時段，樣品之吸光值一空白吸光值 (空白校正)。

A<sub>2</sub>: T<sub>2</sub> 時段，樣品之吸光值一空白吸光值 (空白校正)。

肝組織 CAT 活性，以每單位蛋白質所含反應速率 K 表示之 (K per milligram of protein)。

### 蛋白質濃度之測定

實驗參照 Lowry 等(1951)之方法進行。取適量蛋白質樣品，並以 1 N NaOH 來調整使其最終體積為 100  $\mu$ l，加入 200  $\mu$ l 去離子水及 100  $\mu$ l 反應混合液(25% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: 2% Na-K-tartarate : 1% CuSO<sub>4</sub> = 8 : 1 : 1, v/v/v)，然後在室溫下靜置 10 分鐘，加入 1 ml Folin reagent (Folin : H<sub>2</sub>O = 1 : 19.5)後於 37 °C 水浴 20 分鐘，並在室溫下冷卻，最後在分光光度計以 660 nm 下測其吸光值(25 °C)。然後將標準曲線做線性回歸，得一方程式，將所得樣品之吸光值代入此一元一次方程式，換算後即可得知樣品之蛋白質含量。

### (三) 病理切片觀察

組織病理學的觀察：

在八星期結束時，所有大白鼠均予以犧牲，頸動脈採血後，割取肝臟，在最大右葉的同一位置割取 1 公分見方的肝組織，放入 10% 的中性福馬林中，做進一步的病理染色，其餘五葉肝臟則置於-80°C 的冷凍櫃中冷凍，以便檢測抗氧化酵素的活性。為了觀察慢性肝損傷時，肝細胞的受損、脂肪變性、壞死、纖維化等變化，因此除了將肝組織做 HE stain 之外，還做網狀纖維及膠原纖維的特殊染色

(Reitculin silver stain & Masson stain)，以便評估肝纖維化程度。

在進行組織病理學的比較時，可以 Jonker 等(1992)的半定量方法，對慢性肝損傷時，肝細胞發炎的程度、脂質變性、肝細胞壞死及膽管增生等予以半定量分析。評估分數是由 "0" 到 "4" 分，其中 "0" 代表沒有(absent)；"1" 代表少量(trace)；"2" 分代表輕微

(weak)；"3" 分代表中等程度 (moderate)；"4"分代表極嚴重 (strong)。而對肝纖維化的半定量分析，則可以依據 Ruward 等(1989)及 Gabriele 等(1997)的方法，將肝纖維化區分為以下五個等級："0" 分代表正常肝組織、沒有任何肝纖維化；"1" 分代表有膠原的增生，但沒有形成中隔（在中央靜脈或門脈區有放射狀纖維增生）；"2" 分代表在中央靜脈和門脈區二者間，形成不完全的中隔（此中隔彼此沒有交會）；"3" 分代表形成完整的中隔，中間彼此交會，並將肝實質分割成許多節片斷，但此中隔尚很薄；"4" 分代表形成完全的中隔，且中隔變厚，亦即完全的肝硬化。

另外，為了避免觀察主觀上的偏差，所有的組織病理切片都是由最大右葉肝的同一位置切取下來，再去做病理染色。至於病理的半定量分析之評估，則最好是委請醫院病理科，在不清楚本實驗設計的情況下，對所有切片進行評分比較，最後再以統計分析方法進行各組差異性的分析。

### 實驗數據統計分析：

採用 SAS 電腦統計套裝軟體(SAS institute, Cary, NC)進行變異數分析(analysis of variance, ANOVA)，並以 Duncan's test 來測試不同處理間顯著差異效果(P<0.05)。

### 參、評估方法之原則要求

(一) 血清：測定與肝傷害相關之成分或酵素活性

必作：

1. GOT (AST)
2. GPT (ALT)

選作：

1. TG
2. Cholesterol

(二) 肝臟：測定各種與抗氧化功能相關之成分或酵素活性

必作：

1. Glutathione (GSH)
2. Glutathione peroxidase (GSH Px)
3. Superoxide dismutase (SOD)
4. Catalase

選作：

1. Glutathione reductase (GSH Rd)

(三) 病理切片觀察

必作

(四) 其他相關之測定項目由送審單位自行評估是否需要執行。

### 肆、結果判定之基準

由以上血清與肝臟之各項測定值、病理切片觀察結果，並配合其他由送審單位送出之相關測定項目之數據，經統計分析後所得之客觀結果，再由審查委員進行評估。

### 參考文獻

- 張冠群、李伯鵬、劉付傳雄、朱莉芬、李美珠、鐘傳新。1996。肝炎 1 號對大白鼠慢性肝損傷的作用。中草藥 27(9): 549-551.
- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. Methods in Enzymol. 105: 121-126.
- Bellomo, G., Mirabelli, F., Dimonte, D., Richelmi, P., Thor, H., Orrenius, C. and Orrenius, S. 1987. Formation and reduction of glutathione-mixed disulides during oxidative stress. Biochem. Pharmacol. 36: 1313-1320.

- Gabriele B. 1997. Silymarin retards collagen accumulation in early and advanced biliary fibrosis secondary to complete bile duct obliteration in rats. *Hepatology* 26: 643-649.
- International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). 1986a. *J. Clin. Chem. Biochem.* 24: 481-495.
- International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). 1986b. *J. Clin. Chem. Biochem.* 24: 497-510.
- Jonker, A.M., Dijkhuis, F.W.J., Boes, A., Hardonk, M.J. and Grond, J. 1992. Immunohistochemical study of extracellular matrix in acute galactosamine hepatitis in rats. *Hepatology* 15: 423-431.
- Lawrence, R.A. and Burk, R.F. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71: 952-958.
- Lin, J.M., Lin, C.C., Chiu, H.F., Yang, J.J. and Lee, S.G. 1993. 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.
- Lin, S.C., Lin, Y.H., Chen, C.F., Chung, C.Y. and Hsu, S.H. 1997. The hepatoprotective and therapeutic effects of propolic ethanol extract on chronic alcohol-induced liver injuries. *Am. J. Chin. Med.* 25: 325-332.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Marklund, S. and Marklund, G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47: 469-474.
- Reed, D.J., Babson, J.R., Beatty, P.W., Brodie, A.E., Ellis, W.W. and Potter, D.W. 1980. High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. *Ana. Biochem.* 106: 55-62.

- Rietman, S. and Frankel, S. 1957. A colorimetric method for determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am. J. Clin. Pathol.* 25: 56-63.
- Ruwart, M.J., Wilkinson, K.F., Rush, B.D. et al. 1989. The integrated value of serum procollagen III peptide over time predicts hepatic hydroxyproline content and stainable collagen in a model of dietary cirrhosis in the rat. *Hepatology* 10: 801-806.