

攝取類胡蘿蔔素對雄性倉鼠口腔癌化 與抗氧化酵素之影響

錢 信¹ 黃士懿^{2*} 林永和³ 謝穎欣⁴ 謝孟志⁵ 謝明哲²

Effects of Carotenoid Consumption on Oral Carcinogenesis and Antioxidative Enzymes in Male Hamsters

Hsin Chien¹, Shih-Yi Huang^{2*}, Yun-Ho Lin³,
Ying-Hsin Shieh⁴, Meng-Jyh Shieh⁵ and Ming-Jer Shieh²

¹ Graduate Institute of Pharmaceutical Science, Taipei Medical University, Taipei, Taiwan, ROC

² Graduate Institute of Nutrition and Health Sciences, Taipei Medical University, Taipei, Taiwan, ROC

³ Department of Pathology, Taipei Medical University, Taipei, Taiwan, ROC

⁴ Graduate Institute of Cell and Molecular Biology, Taipei Medical University, Taipei, Taiwan, ROC

⁵ Department of Food Sanitation, Tajen Institute of Technology, Pingtung, Taiwan, ROC

(Received: April 19, 2001. Accepted: June 11, 2001)

ABSTRACT This study investigated the effects of consumption of various carotenoids on oral carcinogenesis and the activity of antioxidative enzymes in male hamsters. In the first 4 weeks, the right buccal pouch of each animal was daubed with 9,10-dimethyl-1,2-benz-anthracene (DMBA) three times a week, and in the following 12 weeks the right buccal pouch was daubed with betel quid extract (BQE) and the rats were fed different experimental diets. Diets of the experimental groups were individually supplemented with 0.1% of β -carotene, lycopene, lutein, canthaxanthin, or equal amount of these four carotenoids (0.025% each) during the following 12 weeks. The results indicate that plasma and liver carotenoid levels of experimental groups were significantly higher than those of the control group ($p < 0.05$). Red blood cell (RBC) superoxide dismutase (SOD) activities of the lycopene and mixture groups were significantly lower than the control group, as was liver SOD activity of the canthaxanthin and mixture groups. Liver glutathione peroxidase (GPx) activities of the lutein, canthaxanthin, and mixture groups were significantly lower than that of the control group; however there was no difference between the activity of RBC GPx in each group. The plasma malondialdehyde (MDA) level in the mixture group was significantly lower than in the control group ($p < 0.05$); furthermore, hepatic MDA levels of the carotenoid treated groups were all significantly lower than that of the control group ($p < 0.05$). The number and volume of the tumor burden of the experimental groups were significantly lower than those of the control group. In conclusion, carotenoids provide an inhibitory capability on BQE-induced hamster oral carcinogenesis. The carotenoids significantly reduced the plasma and liver MDA levels and decreased the BQE-induced tumor burden in hamsters, especially in groups treated with lycopene, canthaxanthin, and a mixture of carotenoids.

Keywords: betel quid extract, carotenoids, hamster, buccal pouch carcinoma

* To whom correspondence should be addressed.



前 言

流行病學和動物實驗均顯示嚼食檳榔和口腔癌的發生具有顯著的相關性^(1,4)。在台灣，嚼食檳榔所導致口腔癌症除了危害國民的健康，也造成許多社會問題。而根據衛生署於民國八十八年公告的國人因癌症死亡的排行資料顯示，口腔癌已為台灣地區男性死亡率排名的第七位及最易罹患腫瘤排名的第五位⁽⁵⁾，而約 80% 口腔癌症患者有曾經嚼食檳榔的經驗^(1,2)。近年來許多學者研究檳榔與口腔癌症的關係指出，在誘發倉鼠口頰囊腫實驗模式中檳榔嚼塊萃取物扮演著促癌的角色^(3,4)。

檳榔嚼塊包括檳榔子、老藤或老葉、白灰或紅灰，而成分如檳榔子中的生物鹼 (alkaloids) 和生物鹼的硝化衍生物 (nitroso-compounds)、檳榔子中多酚類自動氧化所釋出的活性氧 (reactive oxygen species)、紅灰成分對口腔黏膜的刺激作用、老花和老葉中的黃樟素和 hydroxychavicol 等都是致癌的因子，這些致癌因子作用至口腔黏膜可能會造成染色體異常、DNA 斷裂、基因突變、細胞微核化等基因毒性⁽⁶⁾。

類胡蘿蔔素廣泛存在於黃綠色蔬菜水果中，是一群黃色至橙紅色的天然脂溶性色素，具有結合自由基功能的植物因子。截至目前為止至少有 600 種以上的類胡蘿蔔素被發現，其中大約有 50 種具有維生素 A 的活性。由於類胡蘿蔔素具有 9 到 11 個共軛雙鍵 (polyenes)，具有結合自由基的能力。 β -胡蘿蔔素是只含碳氫的胡蘿蔔素 (carotene)，它不但是維生素 A 的先質 (precursor)，亦有消除自由基和單電子態氧分子的能力。其它廣泛存在於自然界中的類胡蘿蔔素如： α -胡蘿蔔素 (α -carotene)、番茄紅素 (lycopene) 亦具有類似的能力，而含氧類胡蘿蔔素 (oxycarotenoids) 如：木質黃素 (lutein, 另稱黃體素)、玉蜀黍黃質 (zeaxanthin)、隱黃質 (β -cryptoxanthin)、蝦青素 (astaxanthin) 和 4,4'-二酮- β -胡蘿蔔素 (canthaxanthin) 雖不具有維生素 A 的活性，亦具有不同程度的抗氧化性質。許多動物試驗探討類胡蘿蔔素對口腔癌症的預防，發現類胡蘿蔔素有延遲或抑制口腔腫瘤數目和腫瘤負荷的能力^(7,8)；在臨床試驗研究也證實維生素 A 及其衍生物、維生素 E 和 β -胡蘿蔔素皆具有抑制口腔黏膜細

胞病變的能力^(9,10)。推測 β -胡蘿蔔素參與預防癌症的機制除了抗氧化特性外， β -胡蘿蔔素轉變成維生素 A，促進細胞正常分化和增加免疫能力，諸如：增加胸腺重量和淋巴球數目、刺激干擾素分泌、增加巨噬細胞對癌細胞的細胞毒性有關⁽¹¹⁾。

本實驗探討係倉鼠飲食中單獨或混合投與 β -胡蘿蔔素、蕃茄紅素、木質黃素和 4,4'-二酮- β -胡蘿蔔素，對檳榔嚼塊萃取物所誘導口腔癌症評估其預防效力。本研究延續先前實驗^(7,8)以雄性倉鼠口頰囊 (male hamster cheek pouch) 為實驗模型，並以兩階段式 (two-stage) 進行癌化 (carcinogenesis) 過程；先以致癌物 DMBA 誘發倉鼠口腔癌前徵兆，之後再以檳榔嚼塊萃取液進行第二階段癌化誘導，以了解攝食類胡蘿蔔素在檳榔嚼塊萃取物誘導口腔癌症產生過程中，是否藉由其抗氧化性質防止癌化的過程。

材料與方法

一、實驗動物與飼養

58 隻購自於國家實驗動物及研究中心之 6~8 週大雄性倉鼠 (male Syrian hamster)，體重約 110 克，預養一週後隨機分組，分別飼養於不銹鋼金屬籠中，任其自由取食，同時提供足夠的水分和動物飼料 (# 5001, Ralston Purina CO. Chicago, IL, USA)；實驗期間分別飼養於 12 小時光暗循環和通風良好的動物房中，觀察其生長情形。

二、實驗設計

實驗動物在適應環境一週後隨機分配於 6 組，對照組 (9 隻；group A) 以 AIN-76 標準飲食配方⁽¹²⁾為基準，其他各組額外添加 0.1% 的不同類胡蘿蔔素，分別為 β -胡蘿蔔素組 (12 隻；group B)，蕃茄紅素組 (10 隻；group C)，木質黃素組 (8 隻；group D)，4,4'-二酮- β -胡蘿蔔素組 (9 隻；group E) 和混合組 (10 隻；group F；四種類胡蘿蔔素，各 0.025%)。第 1 至第 4 週各組先以溶有 0.5% DMBA (9,10-dimethyl-1,2-benz-anthracene) 礦物油為誘癌物質，塗抹於倉鼠右側口頰內側，每週各塗抹三次，每次塗抹 0.3 mL，第 5 週至第 16 週致癌物的投予改為檳榔萃取物，投予劑量亦為 0.3 mL，並同時開始餵與不同飲食配方。檳榔嚼塊萃取



物 (betel quid extract, BQE) 是以 450 克檳榔、120 克荖藤和 50 克紅灰經均質後，置於 4℃ 下 48 小時，再以 300 mL dimethylsulfoxide (DMSO) 溶劑萃取，經紗布擠壓過濾後得檳榔嚼塊萃取物，隨後置於 4℃ 冰箱內冷藏待用⁽⁴⁾。實驗期間所需之類胡蘿蔔素如：β-胡蘿蔔素 (β-carotene gelatin beadlet, 30%)、4,4'-二酮-β-胡蘿蔔素 (canthaxanthin gelatin beadlet, 10%) 購自於瑞士 Roche 公司，木質黃素 (lutein gelatin beadlet, 3% lutein) 購自於美國 Kemin 公司，番茄紅素 (Lyc-O-Mato™, 6%) 購自以色列 LycoRed Natural Product Industries 公司，而其他化學試劑皆購自 Sigma 公司，檳榔嚼塊組成份則購自傳統檳榔攤。

三、樣品收集

實驗期結束前一天將倉鼠隔夜禁食後以乙醚麻醉犧牲，以含肝素之真空抽血管由腹腔大動脈取血，血液經離心 (3000 rpm, 15 min, 4℃) 後，取得血漿和紅血球；部分肝臟則以液態氮迅速冷凍。部分紅血球、全血及肝臟保存於 4℃ 下，進行抗氧化酵素分析，部分血漿和肝臟存於 -20℃，進行類胡蘿蔔素濃度之分析。

四、病理切片判讀

小心切下口腔左右兩側之頰囊及食道 (咽部至黃門處)，平攤於硬紙板上，比較腫瘤大小、特徵外並照相紀錄。將右側口頰黏膜標本置於 10% 福馬林固定液中，浸泡固定 24 小時後，進行常規石蠟切片製作，並進行蘇木精與伊紅染色 (H & E stain)。染色後的切片延請本院病理科醫師進行組織病理切片判讀。腫瘤負荷 (tumor burden) 將以【每組之腫瘤數】×【每組之平均腫瘤體積】公式計算；腫瘤數之判定，依照口腔病理判定標準，測量腫瘤塊大小大於直徑 1 mm 者列入計算，平均腫瘤體積則以每組每隻所形成之球體體積 ($4/3\pi r^3$)，以每組平均值表示。

五、血紅素及蛋白質濃度測定

血紅素是以 cyanomethemoglobin 法分析，採用市售之組合試劑 (Randox Lab-Ltd., U.K.)，以分光光度計 (U-2000 Spectrophotometer, Hitachi, Japan) 於波長 540 nm 下測定其吸光值，於標準曲

線中求得樣品濃度。蛋白質濃度是以 Lowry 法測定⁽¹³⁾。

六、抗氧化酵素活性測定

超氧化歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 與麩胱甘肽過氧化酶 (glutathione peroxidase; GPx) 等抗氧化酵素之活性則分別依 Flohe⁽¹⁴⁾ 及 Paglia 等⁽¹⁵⁾ 的原理，以市售組合試劑 (Randox Lab-Ltd., U.K.) 測定之。

七、血漿及肝臟中脂質過氧化產物 (malondialdehyde, MDA) 測定

脂質過氧化產物 (malondialdehyde, MDA) 在酸性環境下可與兩分子的 thiobarbituric acid (TBA) 縮合成一紅色物質 thiobarbituric acid reactive substance (TBARS)，利用螢光光度計在 excitation 515 nm 及 emission 553 nm 之下可測得 MDA 濃度。本實驗根據 Fraga 等⁽¹⁶⁾ 的方法來測定血漿和肝臟均質液中 MDA 含量，單位以血漿及肝臟均質液中單位蛋白質 (mg) 所含 MDA 的含量 (nmol) 來表示。

八、血漿及肝臟類胡蘿蔔素濃度測定

血漿及肝臟類胡蘿蔔素皆是以高效液相層析法 (high performance liquid chromatography; HPLC) 測得⁽¹⁷⁾。為了防止類胡蘿蔔素光解，所有步驟均在暗光及阻光器皿下操作。方法簡述如下：取 1 mL 血漿加入適量的絕對酒精、鹽酸和正己烷，均勻震盪 5 分鐘，於 4℃ 下離心 10 分鐘 ($3500 \times g$)，取上清液，重複兩次後並以無水硫酸鈉，以氮氣吹乾，再加入定量之流動相 (methanol/tetrahydrofuran: 95/5, by volume) 溶解，以進行 HPLC 分析。而肝臟先精稱 0.2 克之肝臟於褐色試管中，以 PBS 緩衝液均質後，加入 0.5 mL 之 25% sodium ascorbate、2 mL 絕對酒精、1 mL 飽和氫氧化鉀溶液，混合均勻，置於 80℃ 水浴中加熱 20 分鐘進行皂化反應。皂化後冰浴，加入 3 mL 5% 氯化鈉溶液及 5 mL 正己烷進行萃取，並於 4℃ 下離心 10 分鐘 ($3500 \times g$)，取上清液，重複兩次後並以無水硫酸鈉除去水分，再以氮氣吹乾，並加入定量之流動相溶液溶解，以進行 HPLC 分析，所得結果帶入標準曲線中求得樣品濃度。分析條件如下：HPLC 系統 (L-7420 UV/VIS detector and L-7100 pump, Hitachi,

Japan); 管柱: RP-18 管柱 (Vydac 201TP54, 250 mm × 4.6 mm, 5 μM, Vydac, USA), 偵測波長 470 nm; 移動相: (methanol/tetrahydrofuran: 95/5, v/v); 流速: 1 mL/min, echinenone 為內在標準 (internal standard)。血液與肝臟之類胡蘿蔔素濃度經比較 echinenone 之曲線高度計算求出, 並以色層分析儀數據處理系統-訊華 SISC 分析軟體 (訊華股份有限公司) 進行數據處理計算。

九、統計分析

實驗結果數據以平均值 ± 標準偏差 (mean ± SD) 表示。統計分析採用 Student's t-test 統計方法, 進行組間差異分析, $p < 0.05$ 表示具統計意義, 即有顯著性差異; $p > 0.05$ 表示組間無顯著性差異。

結 果

一、血漿及肝臟類胡蘿蔔素含量

實驗各組血漿及肝臟類胡蘿蔔素含量如表一所示, 對照組並無發現類胡蘿蔔素, 而各實驗組之血漿及肝臟類胡蘿蔔素濃度皆顯著上升, 混合組四種類胡蘿蔔素濃度皆有測得, 但其值皆小於其他類胡蘿蔔素各組。

二、倉鼠體內抗氧化酵素活性和脂質過氧化產物濃度

血漿及肝臟抗氧化酵素活性如表二所述, 在超氧化歧化酶活性方面, 蕃茄紅素和混合組紅血球超氧化歧化酶活性顯著低於對照組 ($p < 0.05$), 而 4,4'-二酮-β-胡蘿蔔素組和混合組肝臟超氧化歧化酶活性也低於對照組, 但無統計上差異。在麩胱甘肽過氧化酶活性方面, 類胡蘿蔔素各組血漿麩胱甘肽過氧化酶活性無統計上差異, 但木質黃素組、4,4'-二酮-β-胡蘿蔔素組和混合組肝臟麩胱甘肽過氧化酶活性顯著低於對照組 ($p < 0.05$)。在脂質過氧化產物 (malondialdehyde, MDA) 方面, 混合組血漿 MDA 濃度顯著小於對照組 ($p < 0.05$), 而肝臟 MDA 濃度則為類胡蘿蔔素各組皆小於對照組 ($p < 0.05$)。

在癌化病理表徵發現, 各實驗組口腔內側黏膜

病灶, 以對照組最為嚴重, 而以混合組症狀最輕。對照組黏膜上皮增生 (hyperplasia)、過度角質化 (hyperkeratosis)、黏膜上皮異常增生 (dysplasia) 和發炎反應的嚴重性皆較其他類胡蘿蔔素組嚴重。

三、口腔腫瘤數目及腫瘤負荷 (tumor burden) 之體積

若以誘發之口腔腫瘤數目及腫瘤負荷 (tumor burden) 之體積表示預防腫瘤的發生的能力如表三所示, 實驗結果以對照組最嚴重, 而混合組和類胡蘿蔔素各組腫瘤負荷體積與對照組比較有明顯下降的趨勢 ($p < 0.05$); 整體上腫瘤抑制的效果以混合組最為顯著, 其次為 4,4'-二酮-β-胡蘿蔔素組、蕃茄紅素組、木質黃素組和 β-胡蘿蔔素組。由 β-胡蘿蔔素組和木質黃素組在腫瘤發生和平均腫瘤體積之間的互相比較可看出, β-胡蘿蔔素組腫瘤數目較木質黃素組多, 但平均腫瘤體積較小; 但木質黃素組的腫瘤數目比其他各組較少, 但平均腫瘤體積顯著高於其他類胡蘿蔔素各組。

討 論

一、類胡蘿蔔素之吸收利用

研究顯示類胡蘿蔔素存在人體紅血球細胞膜、白血球、皮膚、腎上腺和甚至睪丸中, 而以脂肪組織、肝臟和血漿是主要類胡蘿蔔素儲存場所; 即使在脫落的口腔黏膜細胞也有類胡蘿蔔素的存在⁽¹⁸⁾。在肝臟、腎上腺、腎臟和脂肪中, β-胡蘿蔔素是主要的類胡蘿蔔素, 在睪丸中蕃茄紅素是主要的類胡蘿蔔素, 而在視網膜上的黃斑區 (macula) 中木質黃素和玉蜀黍黃質是主要的類胡蘿蔔素⁽¹⁹⁾, 由以上的資料可知不同的類胡蘿蔔素其吸收與分布的途徑不盡相同。本研究中顯示當投與 0.1% 類胡蘿蔔素飲食時, 血漿類胡蘿蔔素以 β-胡蘿蔔素和 4,4'-二酮-β-胡蘿蔔素濃度較高, 其次為蕃茄紅素、木質黃素; 而在肝臟中 β-胡蘿蔔素濃度顯著高於其他類胡蘿蔔素各組。在體內各器官中不同種類及含量之類胡蘿蔔素可能因其極性和構形之不同, 而造成類胡蘿蔔素在體內運送和分布不同⁽²⁰⁾; 如果類胡蘿蔔素具有抑制癌症產生的效應, 那麼它應該能夠在曝露於致癌物之組織中被利用, 進而影響其濃度。以上推測可能是本研究中倉鼠在投與 0.1% 類胡蘿蔔素



表一 塗抹 DMBA 4 週並攝食類胡蘿蔔素和塗抹檳榔萃取物 12 週後各組血清和肝臟類胡蘿蔔素濃度¹

Table 1. The levels of carotenoids in blood and liver between different groups after 4-week DMBA & 12-week carotenoid feeding and betel quid extract (BQE) daubing¹

Group	Type of treatment	β-Carotene	Lycopene	Lutein	Canthaxanthin
Serum (nmol/L)					
A	(DMBA + BQE)	ND	ND	ND	ND
B	(DMBA + BQE) + β-Carotene	6.15 ± 1.67	ND	ND	ND
C	(DMBA + BQE) + Lycopene	ND	4.38 ± 2.41	ND	ND
D	(DMBA + BQE) + Lutein	ND	ND	2.58 ± 0.88	ND
E	(DMBA + BQE) + Canthaxanthin	ND	ND	ND	6.12 ± 0.77
F	(DMBA + BQE) + Mixture ²	2.26 ± 0.29	0.43 ± 3.52	0.43 ± 0.07	1.56 ± 0.05
Liver (nmol/g wet organ)					
A	(DMBA + BQE)	ND	ND	ND	ND
B	(DMBA + BQE) + β-Carotene	27.59 ± 3.52	ND	ND	ND
C	(DMBA + BQE) + Lycopene	ND	8.25 ± 3.70	ND	ND
D	(DMBA + BQE) + Lutein	ND	ND	5.99 ± 0.03	ND
E	(DMBA + BQE) + Canthaxanthin	ND	ND	ND	16.60 ± 0.15
F	(DMBA + BQE) + Mixture ²	4.48 ± 0.05	2.54 ± 1.13	2.33 ± 0.31	4.97 ± 0.04

¹ The results of mean carotenoids contents are Means ± SD.

² Treatment for Group F was a mixture of equal amounts of β-carotene, lycopene, lutein and canthaxanthin.

表二 塗抹 DMBA 4 週並攝食類胡蘿蔔素和塗抹檳榔萃取物 12 週後各組血液和肝臟抗氧化酵素活性與脂質過氧化產物 (MDA) 濃度變化^{1,2}

Table 2. Activities of blood and liver antioxidative enzymes and the level of malondialdehyde (MDA) after 4-week DMBA & 12-week carotenoid feeding and betel quid extract (BQE) daubing^{1,2}

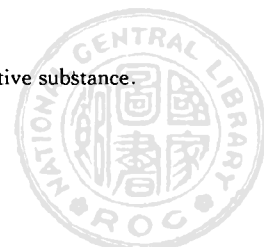
Group	Type of treatment	Blood			Liver		
		SOD ⁴ (U/g Hb)	GPx ⁴ (U/g Hb)	TBARS ⁴ (MDA nmol/mg protein)	SOD ⁴ (U/g protein)	GPx ⁴ (U/g protein)	TBARS ⁴ (MDA nmol/mg protein)
A	(DMBA + BQE)	2012.1 ± 441.9	475.2 ± 66.4	47.08 ± 4.53	20.2 ± 4.7	4224.8 ± 414.8	61.31 ± 3.75
B	(DMBA + BQE) + β-Carotene	1844.0 ± 332.2	452.3 ± 67.8	44.85 ± 11.59	16.9 ± 2.0	3736.9 ± 489.6	54.65 ± 5.52**
C	(DMBA + BQE) + Lycopene	1443.3 ± 370.1**	445.3 ± 86.2	39.19 ± 5.13	17.2 ± 3.1	3737.1 ± 468.4	44.86 ± 8.67**
D	(DMBA + BQE) + Lutein	2229.7 ± 782.0	432.8 ± 83.5	42.97 ± 5.18	18.2 ± 3.7	3546.3 ± 174.9**	52.02 ± 7.53**
E	(DMBA + BQE) + Canthaxanthin	1791.3 ± 245.0	491.1 ± 79.2	41.34 ± 3.41	13.2 ± 2.4	3298.4 ± 244.4**	46.40 ± 5.24**
F	(DMBA + BQE) + Mixture ³	1240.8 ± 336.3**	468.2 ± 76.0	37.49 ± 4.07**	15.1 ± 3.2	3037.8 ± 560.2**	44.35 ± 3.37**

¹ The results of mean superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities are Mean ± SD.

² ** It is significantly different when compared with control group (A) ($p < 0.05$) by Student's t test.

³ Treatment for Group F was a mixture of equal amounts of β-carotene, lycopene, lutein and canthaxanthin.

⁴ Abbreviations: SOD, Superoxide dismutase; GPx, Glutathione peroxidase; TBARS, Thiobarbituric acid reactive substance.



表三 塗抹 DMBA 4 週並攝食類胡蘿蔔素和塗抹檳榔萃取物 12 週後各組腫瘤數目、平均體積和腫瘤負荷^{1,2}
 Table 3. Tumor numbers, volume and burden (mm³) after 4-week DMBA & 12-week carotenoid feeding and betel quid extract (BQE) daubing^{1,2}

Group	Type of treatment	No. of animals	No. of tumors	Mean tumor volume	Tumor burden
A	(DMBA + BQE) ³	9	10	0.6569 ± 0.1082	6.5687 ± 1.0828
B	(DMBA + BQE) + β-Carotene	12	11	0.1236 ± 0.0137	1.3601 ± 0.1508**
C	(DMBA + BQE) + Lycopene	10	4	0.1595 ± 0.0460	0.6379 ± 0.1838**
D	(DMBA + BQE) + Lutein	8	4	0.2463 ± 0.1048	0.9853 ± 0.4193**
E	(DMBA + BQE) + Canthaxanthin	9	7	0.0285 ± 0.0054	0.1998 ± 0.0381**
F	(DMBA + BQE) + Mixture ⁴	10	3	0.0003 ± 0.0001	0.0008 ± 0.0002**

¹ The results of mean tumor volume and burden are Means ± SD.

² ** It is significantly different when compared with group (A) ($p < 0.05$) by Student's t test.

³ BQE is betel quid extract.

⁴ Treatment of Group F was as mixture of equal amounts of β-carotene, lycopene, lutein and canthaxanthin.

飲食後，血漿和肝臟類胡蘿蔔素仍出現濃度不一致的原因。

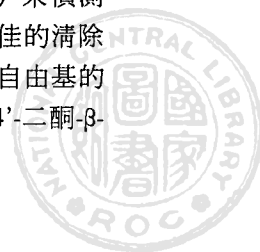
二、檳榔成分與氧化傷害

Nair 等人的研究^(21,22)曾指出在鹼性環境下(當 pH 值 ≥ 9.5 時)檳榔萃取成分會釋出超氧陰離子(O₂^{·-})和過氧化氫(H₂O₂)，一般檳榔嚼塊存在石灰成分，便可使嚼食檳榔者唾液的 pH 值上升，釋出含氧自由基。而嚼食檳榔時所釋出的活性氧化物質(reactive oxidative substance, ROS)使口腔黏膜細胞產生變異的可能機制如下：1) 嚼食檳榔所釋出的含氧自由基，會造成口腔黏膜細胞的基因毒性，產生突變；2) 自由基可能破壞唾液中的蛋白和口腔黏膜組織，使其它檳榔成分及致癌物更容易穿透到組織中，細胞毒性增強，造成組織壞死；同時增加組織壞死後的修復性之細胞增生，使得產生突變的機率增加；3) 檳榔成分的毒性，會造成組織發炎並產生壞死，組織發炎性反應被認為是導致腫瘤的因子之一⁽²³⁾，被活化的發炎細胞釋出活性氧化物質，引起相鄰細胞的突變；4) 造成細胞處於促氧化狀態(prooxidant states)，而促進腫瘤的形成。因此，檳

榔嚼塊萃取物誘導口腔癌症的發生，與自由基的產生有關，而影響到體內抗氧化酵素系統。

三、類胡蘿蔔素與抗氧化能力

癌症的發生可能是由於細胞中氧化過程(oxidative process)促使腫瘤加速發生或若干氧化物質使活性氧化物質增多，並促使細胞分裂增殖變快，產生突變⁽²⁴⁾。若干文獻指出抗氧化營養素的多寡與脂質、DNA 和蛋白質的傷害及癌症、心血管病和白內障的發生率成負相關，其中類胡蘿蔔素與維生素 E 相似，是具有清除細胞膜上自由基和單元氧的脂溶性抗氧化物質⁽²⁵⁾。在若干體外抗氧化實驗中指出^(26,27)，以檢測 TBA (thiobarbituric acid) 數值上升程度藉以比較類胡蘿蔔素結合單電子鍵氧分子能力發現，蝦青素具有最佳的抗氧化效果，其抗氧化能力順序如下：蝦青素 > 玉蜀黍黃質 > 木質黃素 > β-胡蘿蔔素。而 Terao 等人⁽²⁸⁾利用脂質過氧化所產生之氫氧化自由基(hydroxyl free radical)來偵測類胡蘿蔔素的清除能力，蝦青素亦具有最佳的清除能力，4,4'-二酮-β-胡蘿蔔素次之。其清除自由基的能力順序如下：蝦青素 > 玉蜀黍黃質 > 4,4'-二酮-β-



胡蘿蔔素 > 木質黃素 > β -胡蘿蔔素 > α -生育醇。此外, Miller 等人⁽²⁹⁾ 也以 ATBS assay (2,2'-azobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid] diammonium salt) 評估類胡蘿蔔素清除 ATBS \cdot 自由基能力, 結果為蕃茄紅素 > β -cryptoxanthin \approx β -胡蘿蔔素 > 木質黃素 \approx zeaxanthin > α -胡蘿蔔素 > echinenone > 4,4'-二酮- β -胡蘿蔔素 \approx 蝦青素; 表示類胡蘿蔔素的官能基及兩端有無開環, 會影響類胡蘿蔔素清除自由基的能力。本實驗在脂質過氧化產物 (malondialdehyde, MDA) 方面, 混合組血漿 MDA 濃度顯著小於對照組 ($p < 0.05$), 而肝臟 MDA 濃度則為類胡蘿蔔素各組皆小於對照組 ($p < 0.05$)。

從類胡蘿蔔素的分子構形和共振結構而言, 蕃茄紅素比其他類胡蘿蔔素具有更多的共軛雙鍵, 具備較佳的含氧自由基清除能力。當氧化劑對細胞造成氧化傷害時, 蕃茄紅素能比其他類胡蘿蔔素更快地與活性氧分子作用, 減少細胞的氧化傷害。從類胡蘿蔔素化學結構觀點可以發現, 蕃茄紅素與活性氧分子作用後所產生的共振構造比 β -胡蘿蔔素、4,4'-二酮- β -胡蘿蔔素、木質黃素穩定, 而 4,4'-二酮- β -胡蘿蔔素、木質黃素多了氧原子結構。因此穩定的共振結構、立體構面、有無氧原子結構似乎影響了類胡蘿蔔素抗氧化能力。

體內抗氧化作用除了非酵素系統藉由飲食所攝取的抗氧化物質之外, 體內本身也具有抗氧化酵素系統來抵禦外來的氧化傷害, 超氧化歧化酶 (SOD) 將超氧自由基轉換成過氧化氫, 而過氧化氫則由過氧化氫酶 (catalase) 和麩胱甘肽過氧化酶 (GPx) 還原成無毒的 H_2O ; 此外, 多元不飽和脂肪酸被 $O_2\cdot$ 氧化形成 ROOH (fatty acid hydroperoxide) 也可被 GPx 還原成 ROH, 以免進一步發生連鎖反應^(28,30)。由本實驗中血液結果顯示蕃茄紅素組和混合組紅血球超氧化歧化酶活性顯著低於對照組 ($p < 0.05$), 二者所產生之脂質過氧化產物 MDA 亦較控制組低, 推測類胡蘿蔔素的攝取能夠結合體內活性氧化物質包括 $O_2\cdot$ 、 OH^- 、ROOH、甚至 MDA, 間接使體內氧化壓力趨緩, 使抗氧化酵素超氧化歧化酶活性降低。另外 4,4'-二酮- β -胡蘿蔔素組和混合組之肝臟超氧化歧化酶活性也低於對照組, 但無統計上差異。在血漿麩胱甘肽過氧化酶活性方面, 各類胡蘿蔔素組並無統計上差異, 但肝臟中麩胱甘肽過氧化酶活性木質黃素組、4,4'-二酮- β -胡蘿蔔素組和混合組顯

著低於對照組 ($p < 0.05$)。

四、類胡蘿蔔素與囊頸癌化表徵

實驗結果顯示對照組口腔內側黏膜病灶最為嚴重, 而以混合組症狀最輕。對照組黏膜上皮增生 (hyperplasia)、過度角質化 (hyperkeratosis)、黏膜上皮異常增生 (dysplasia) 和發炎反應的嚴重性皆較其他類胡蘿蔔素組嚴重; 而在腫瘤數目及腫瘤負荷方面, 混合組和類胡蘿蔔素各組腫瘤負荷體積與對照組比較有明顯下降的趨勢 ($p < 0.05$); 整體上, 腫瘤抑制的效果以混合組最為顯著, 其次為 4,4'-二酮- β -胡蘿蔔素組、蕃茄紅素組、木質黃素組和 β -胡蘿蔔素組。先前許多研究指出類胡蘿蔔素具有抗癌的特性, 一般推測為他們構形上許多共振結構造成所具有的抗氧化特性, 以抵抗外來的氧化物質或硝化衍生物所造成體內細胞中 DNA、蛋白質和脂質的氧化傷害⁽³⁰⁾; 另外亦有報告指出若干類胡蘿蔔素可轉變為維生素 A 的特性, 能夠與細胞核的 retinoid 接受器結合, 促使細胞正常分化和增生。Santamaria⁽³¹⁾ 等人以 β -胡蘿蔔素和 4,4'-二酮- β -胡蘿蔔素組投與 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine 所誘導胃癌的大白鼠, 雖然皆無法抑制胃的異常增生 (dysplasia), 但皆能抑制其轉變成 (neoplasia) 的癌化過程。由此可知, 類胡蘿蔔素本身可抑制胃癌的發生, 並非絕對藉由轉變成維生素 A 的路徑。在抑制腫瘤細胞的生長方面, 體外實驗中發現類胡蘿蔔素本身具有增加細胞的分化⁽³²⁾、表皮生長因子接受器的負向調節 (down-regulation)⁽³³⁾、增加細胞間隙聯絡蛋白 (gap junctional protein) 的表現⁽³⁴⁾, 強化細胞間的連結性。就個別類胡蘿蔔素而言, 蕃茄紅素雖不具有維生素 A 先質的活性, 是類胡蘿蔔素中最具有單元氧和過氧化自由基清除能力者⁽³⁵⁾, 也能夠增加細胞間的聯繫和控制細胞的生長⁽³⁶⁾。4,4'-二酮- β -胡蘿蔔素組不具維生素 A 先質的活性, 但其兩種氧化代謝產物 all trans-4-oxo-retinoic acid 會與 all trans-retinoic acid 相似的親和性, 與 retinoid 接受器結合來調節基因的表現⁽³⁷⁾。

與先前塗抹類胡蘿蔔素的實驗^(7,8) 結果比較, 以腫瘤負荷評估類胡蘿蔔素於口腔癌化的預防效果發現, 以局部塗抹形式較經口攝取形式顯著, 推測可能是塗抹形式所採用的劑量較高, 且以塗抹形式能直接與病兆發生處直接作用; 若以攝取與塗抹同劑

量之類胡蘿蔔，則到達口腔內皮之類胡蘿蔔素含量也相對較低，但以飲食攝取形式卻能夠改善體內因檳榔萃取物所誘導之氧化傷害，降低體內氧化傷害。本實驗亦發現攝取蕃茄紅素有較佳預防倉鼠頰囊口腔癌化之效果，而 4,4'-二酮- β -胡蘿蔔素，其抗氧化作用和降低腫瘤負荷之功效也相當顯著，其機制有待進一步的研究探討。

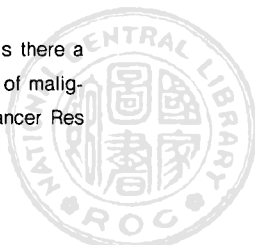
綜合上述，攝取類胡蘿蔔素能降低誘發性口腔癌症倉鼠體內脂質過氧化產物 MDA 的濃度，特別是蕃茄紅素、4,4'-二酮- β -胡蘿蔔素和混合類胡蘿蔔素。若以腫瘤負荷 (tumor burden) 觀點評估類胡蘿蔔素的預防效果，蕃茄紅素、4,4'-二酮- β -胡蘿蔔素和混合類胡蘿蔔素有較佳的抑制效果。

誌 謝

感謝參與本研究的台北醫學大學病理科協助及台北醫學大學保健營養學系洪景順、陳曉豫同學之積極參與，使本計畫得以完成。本研究為國科會計畫 (NSC 89-2320-B-038-039) 成果之一部份，承蒙補助，特此致謝。

參考文獻

1. Kwan HW (1976) A statistical study on oral carcinomas in Taiwan with emphasis on the relationship with betel nut chewing: a preliminary report. *J Formosan Med Assoc* 75:497-505.
2. Chen CH (1987) An epidemiological study of oral squamous cell carcinoma in Southern Taiwan. *J Formosan Dent Assoc* 10:268-274.
3. Jin YT, Tsai ST, Wong TY, Chen FF and Chen RMY (1996) Studies on promoting activity of Taiwan betel quid ingredients in hamster buccal pouch carcinogenesis. *Oral Oncol Eur J Cancer* 32B:343-346.
4. Lin LM, Chen YK, Lai DR, Huang YL and Chen HR (1997) Cancer promoting effect of Taiwan betel quid in hamster buccal pouch carcinogenesis. *Oral Disease* 3:232-235.
5. 中華民國行政院衛生署 (2000) 民國八十九年台灣地區國民死因統計報告。
6. IARC (1985) Betel-quid and areca-nut chewing. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans. Lyon: International Agency for Research on Cancer 37: 141-202.
7. 錢 信、黃士懿、林永和、謝穎欣、謝孟志、謝明哲 (2000) 類胡蘿蔔素對 DMBA 誘發雄性倉鼠口腔癌之預防作用。 *中華營誌* 25:200-207.
8. 錢 信、黃士懿、林永和、謝穎欣、謝孟志、王慧芳、謝明哲 (2001) 類胡蘿蔔素對檳榔嚼塊萃取物誘發倉鼠口腔癌之預防作用。 *中華營誌* 26:98-108.
9. Stich HF and Dunn BP (1986) Relationship between cellular levels of beta-carotene and sensitivity to genotoxic agents. *Int J Cancer* 38:713-717.
10. Garewell HS, Meyskens FL and Killen D (1990) Response of oral leukoplakia to beta-carotene. *J Clin Oncol* 8:1715-1720.
11. Suda D, Schwartz J and Shklar G (1986) Inhibition of experimental oral carcinogenesis by topical beta-carotene. *Carcinogenesis* 7:711-715.
12. American Institute of Nutrition (1997) Report of the American institute of nutrition ad Hoc committee on standards for nutrition studies. *J Nutr* 107:1340-1348.
13. Lowry OH, Resebrough NJ, Farr AL and Grossman S (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
14. Flohe L and Otting F (1984) Superoxide dismutase assays. *Method Enzymol* 105:93-101.
15. Paglia DE and Valentine JP (1967) Studies in the quantitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70:158-169.
16. Fraga CG, Leibovitz BE and Tappel AL (1988) Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid reactive substances in tissue slices: characterization and comparison with homogenates and microsomes. *Free Rad Biol Med* 4:155-161.
17. Khachik F, Beecher GR, Goli MB, Lusby WR and Daitch CE (1992) Separation and quantification of carotenoids in human plasma. *Method Enzymol* 213:205-219.
18. Stahl W, Schwarz W, Sundquist AR and Sies H (1992) Cis-trans isomers of lycopene and β -carotene in human serum and tissues. *Arch Biochem Biophys* 294:173-177.
19. Bone RA, Landrum JT and Tarsis SL (1985) Preliminary identification of the human macula pigment. *Vision Res* 25:1531-1535.
20. Castenmiller JJM and West CE (1998) Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Annu Rev Nutr* 18:19-38.
21. Nair UJ, Floyd RA, Nair J, Bussachini V, Friesen M and Bartsch H (1987) Formation of reactive oxygen species and of 8-hydroxy-deoxyguanosine in DNA in vitro with betel quid ingredients. *Chem Biol Interactions* 63:157-169.
22. Nair UJ, Friesen M, Richard I, MacLennan R, Thomas S and Bartsch H (1990) Effect of lime composition on the formation of reactive oxygen species from areca nut extract in vitro. *Carcinogenesis* 11:2145-2148.
23. Lewis JG and Adams DO (1987) Inflammation, oxidation DNA damage, and carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 76:19-27.
24. Diplock AT, Rice-Evans CA and Burden RH (1994) Is there a significant role for lipid peroxidation in the causation of malignancy and for antioxidants in cancer prevention? *Cancer Res*



- 54:1952S-1956S.
25. Sies H, Stahl W and Sundquist AR (1992) Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Ann NY Acad Sci* 669:7-20.
 26. Buege JA and Aust ATD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Method Enzy* 52:302-310.
 27. Terao J, Nagano A, Song JH and Park DK (1990) Abstract of the 9th International Symposium of Carotenoids. p. 153.
 28. Halliwell B and Gutteridge JMC (1989) *Free Radicals in Biological and Medicine*. Oxford University Press 2nd ed. New York.
 29. Miller NJ, Sampson J, Candeias LP, Bramley PM and Rice-Evans CA (1996) Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters* 384:240-242.
 30. Greenberg ER (1993) Retinoids or carotenoids: is there another choice? *Prev Med* 22:723-727.
 31. Santamaria I, Bianchi A, Ravetto C, Arnaboldi A, Santagati G and Andreoni I (1987) Prevention of gastric cancer induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rat fed supplemental carotenoids. *J Nutr Growth Cancer* 4:175-181.
 32. Rock CL, Kusluski RA, Galvez MM and Ethier SP (1995) Carotenoids induce morphological changes in human mammary epithelial cell cultures. *Nutr Cancer* 23:319-333.
 33. Muto Y, Fujii J, Shidoji Y, Moriwaki H, Kawaguchi T and Noda T (1995) Growth retardation in human cervical dysplasia-derived cell lines by β -carotene through down-regulation of epidermal growth factor receptor. *Am J Clin Nutr* 62:1535S-1540S.
 34. Zhang LX, Coony RV and Bertram JS (1992) Carotenoids up-regulate connexin 43 expression independent of their provitamin A or antioxidant properties. *Cancer Res* 52:5707-5712.
 35. DiMascio P, Kaiser S and Sies H (1989) Lycopene as the most effective biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys* 274:532-538.
 36. Stahl W and Sies H (1996) Lycopene: a biologically important carotenoid for humans. *Arch Biochem Biophys* 336:1-9.
 37. Hanusch M, Stahl W, Schulz WA and Sies H (1995) Induction of gap junctional communication by 4-oxoretinoic acid generated from its precursor canthaxanthin. *Arch Biochem Biophys* 317:423-428.



攝取類胡蘿蔔素對雄性倉鼠口腔癌化 與抗氧化酵素之影響

錢 信¹ 黃士懿² 林永和³ 謝穎欣⁴ 謝孟志⁵ 謝明哲²

¹ 臺北醫學大學藥學研究所食品化學組

² 臺北醫學大學保健營養學研究所

³ 臺北醫學大學病理科

⁴ 臺北醫學大學細胞分子生物研究所

⁵ 大仁技術學院食品衛生學系

(收稿日期：90年4月19日。接受日期：90年6月11日)

摘要 本研究係探討類胡蘿蔔素的攝取對檳榔萃取物誘發倉鼠口腔癌症的預防效果。58隻6~8週齡大雄性倉鼠隨機分配於6組，對照組(control, n=9)以AIN-76標準飲食配方為基準，其他各組額外添加0.1%的不同類胡蘿蔔素，分別為β-胡蘿蔔素組(β-carotene, n=12)，蕃茄紅素組(lycopene, n=10)，木質黃素組(lutein, n=8)，4,4'-二酮-β-胡蘿蔔素組(canthaxanthin, n=9)和混合組(mixed carotenoids, n=10, 0.025% each)。第1至4週各組先以0.5% DMBA (9,10-dimethyl-1,2-benz-anthracene) 礦物油為誘癌物質，塗抹於倉鼠右側口頰內側，每週各塗抹三次，每次塗抹0.3毫升，第5週至第16週致癌物的投予改為檳榔嚼塊萃取物，投予劑量亦為0.3毫升。實驗結果顯示實驗組血漿及肝臟各組類胡蘿蔔素濃度皆顯著上升。在抗氧化酵素(SOD & GPx)活性方面，蕃茄紅素組和混合組紅血球超氧化歧化酶活性顯著低於對照組($p < 0.05$)，木質黃素組，4,4'-二酮-β-胡蘿蔔素組和混合組肝臟巯基甘肅胱胺過氧化酶活性顯著低於對照組；此外，在脂質過氧化產物(malondialdehyde, MDA)方面，混合組血漿MDA濃度顯著小於對照組($p < 0.05$)，而肝臟MDA濃度則為類胡蘿蔔素各組皆小於對照組($p < 0.05$)。綜合上述，攝取類胡蘿蔔素能降低誘發性口腔癌症倉鼠體內脂質過氧化產物(malondialdehyde, MDA)的濃度，特別是蕃茄紅素、4,4'-二酮-β-胡蘿蔔素和混合類胡蘿蔔素。以口腔腫瘤數目及腫瘤負荷(tumor burden)之觀點評估類胡蘿蔔素的預防效果，蕃茄紅素、4,4'-二酮-β-胡蘿蔔素和混合類胡蘿蔔素有較佳的抑制效果。

關鍵詞：檳榔嚼塊萃取物、類胡蘿蔔素、倉鼠、口腔頰囊癌

