

# β-胡蘿蔔素抑制長期攝食酒精之大白鼠肝臟脂肪堆積

黃啓彰 陳俊榮 黃娣儀 謝明哲 朱娟秀<sup>1</sup> 楊素卿\*

## β-Carotene Prevents Hepatic Lipid Accumulation in Rats under Chronic Alcohol Consumption

Chi-Chang Huang, Jiun-Rong Chen, Ti-I Huang, Ming-Jer Shieh, Jan-Show Chu<sup>1</sup>, and Suh-Ching Yang\*

Graduate Institute of Nutrition and Health Sciences, and

<sup>1</sup> Department of Pathology, Taipei Medical University, Taipei, Taiwan, ROC

(Received: May 6, 2001. Accepted: June 14, 2002)

**ABSTRACT** The purpose of this study was to investigate the effects of β-carotene on hypertriglycemia and alcoholic fatty liver in rats with chronic alcohol intake. Rats were divided into three groups: the control (C), ethanol (E), and ethanol with β-carotene (E+B) groups. After 10 weeks, results revealed that plasma GOT and GPT activities in group E were significantly higher than those in group C at weeks 6, 8, and 10, but they were significantly lower in group E+B compared to group E at week 10. Plasma total cholesterol (TC) levels in group E were significantly lower than those in the other groups at week 10. When compared to the plasma triglyceride (TG) concentration in group E, those of groups C and E+B were significantly lower at weeks 4, 6, 8, and 10. Furthermore, plasma HDL-C levels in group E+B were significantly higher, by 13%, than those in group E at week 10. On the other hand, the hepatic cholesterol and TG contents of group E were significantly higher, by 33% and 73%, respectively, than those in C group. However, hepatic cholesterol and TG contents in group E+B were significantly lower by 20% and 38%, respectively, compared to those in group E. β-carotene storage was detected in livers of E+B group, and the hepatic retinol content was significantly higher than those in groups C and E by 33% and 51%, respectively. Furthermore, the apparent accumulation of fat within hepatocytes was observed in the ethanol group. Results demonstrate that β-carotene supplementation can prevent alcoholic fatty liver formation by decreasing the plasma TG concentration, and inhibiting the accumulation of cholesterol and TG contents in the liver.

**Keywords:** β-carotene, hypertriglycemia, alcoholic fatty liver

### 前 言

根據行政院衛生署統計資料顯示，台灣地區

2001年十大死因中，慢性肝病以及肝硬化位居第六位，其原因除了肝炎病毒感染與飲食方式不當之外，酒精性飲料的消費在近幾年內大幅增加也有密切的關係。肝臟是酒精代謝的主要場所，長期過量攝取

\* To whom correspondence should be addressed.

酒精會造成脂質代謝異常，包括：酒精會促進細胞內膽固醇的合成作用<sup>(1)</sup>以及酒精代謝成乙醛的反應過程中，會使得氧化還原的平衡狀態遭到破壞而趨向於還原狀態，使得脂肪酸的氧化作用受影響而減少，因此，不同來源的脂肪酸堆積於肝臟中後，以三酸甘油酯的型式儲存於肝臟中，因而造成脂肪堆積的情形<sup>(2)</sup>。故長期攝取酒精會影響脂質正常代謝而造成酒精性高脂血症以及酒精性脂肪肝等症狀。另一方面，研究指出  $\beta$ -胡蘿蔔素具有降低高脂血症大白鼠肝臟中膽固醇含量的效果<sup>(3,4)</sup>，而最近的研究亦指出，由於  $\beta$ -胡蘿蔔素具有抑制肝臟中 HMG-CoA reductase 的活性<sup>(5)</sup>，故能夠減少細胞內膽固醇的生成量<sup>(6)</sup>。此外，與酒精代謝相關的報告也指出，長期攝取酒精後，其血液以及肝臟中維生素 A 與  $\beta$ -胡蘿蔔素的含量會有降低的情形，而且降低的程度與酒精攝取量有密切的相關性<sup>(7-11)</sup>。 $\beta$ -胡蘿蔔素存在於天然食物中，不僅具有抗氧化能力，同時也扮演著維生素 A 先質的角色。因此，本研究之目的在探討是否可以藉由補充  $\beta$ -胡蘿蔔素改善大白鼠因長期攝取酒精所引起的高三酸甘油酯血症與酒精性脂肪肝，同時觀察  $\beta$ -胡蘿蔔素對於長期攝取酒精所造成之高尿酸血症，以及維生素 A 含量減少之改善情形。

## 材料與方法

### 一、實驗動物之分組與飼養

實驗動物為雄性 Sprague-Dawley 品系大白鼠 24 隻，6 週齡，重約 120 g (購自國家實驗動物繁殖及研究中心)。以實驗動物固形飼料 (Rodent Laboratory Chow 5001) 預養一週後，利用肝功能指數 GOT、GPT 將動物分成控制組 (C)、酒精組 (E) 以及  $\beta$ -胡蘿蔔素添加酒精組 (E+B) 共三組，每組 8 隻，實驗期 10 週。飼料組成以 AIN-76 (American Institute of Nutrition, 1977) 為基礎，控制組以不含粉末酒精之飼料飼養，酒精組則以含有 58% 粉末酒精的粉狀飼料飼養，而  $\beta$ -胡蘿蔔素添加酒精組則是以含有  $\beta$ -胡蘿蔔素 (5 mg/kg BW) 之酒精飼料飼養。三組以等熱量的方式進行飼養，其飼料組成如表一所示。粉末酒精 (佐藤食品工業株式會社，日本) 主要成分包含 30.5% 酒精、65.0% 葡萄糖以及 4.5% 水分。至於  $\beta$ -胡蘿蔔素則是以水溶性 Solatene (10%  $\beta$ -carotene in beadlets, Hoffmann-La

表一 各組實驗飼料組成<sup>1</sup>

Table 1. Composition of experimental diets in each group<sup>1</sup>

Components	C	E	E+B
	(g/1000 kcal powdered-diet)		
Casein	48.8	48.8	48.8
Soybean oil	14.6	14.6	14.6
Cellulose	19.5	19.5	19.5
AIN-76 Vitamins	4.9	4.9	4.9
AIN-76 Minerals	14.6	14.6	14.6
Dextrose	168.3	---	---
Powdered-ethanol	---	141.5	141.5
Solatene <sup>2</sup>	---	---	5 mg/kg body weight/day

<sup>1</sup> C: control diet; E: ethanol diet; E+B: ethanol with  $\beta$ -carotene diet

<sup>2</sup> Solatene: 10%  $\beta$ -carotene in beadlets, Hoffmann-La Roche

Roche) 的型式投予。實驗動物個別飼養於不鏽鋼製籠內，並飼養於室溫  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、相對濕度  $55 \pm 10\%$ 、12 小時明暗自動更替的動物飼養室內。飼料於每日夜間八點給予，並於隔日八點收回，記錄其攝食量。另外，充分供應蒸餾水予以自由攝取，每週記錄體重一次。

### 二、分析方法

#### (一) 樣品之收集

分別於實驗期第 0、2、4、6、8 週進行尾靜脈採血，並在第 10 週犧牲實驗動物。禁食 12 小時後，以乙醚麻醉，收集腹大動脈血液。血液以含有抗凝劑 Heparin 之採血管收集，並於  $2,700 \times \text{g}$ 、 $4^\circ\text{C}$  條件下，離心 10 分鐘後，取血漿進行分析。此外，於腹腔動脈採血結束後，取  $4^\circ\text{C}$  的生理食鹽水 50 mL 進行肝臟灌流，並將肝臟取下後進行分析。

#### (二) 血液樣本之分析

於各時間點所收集的的血漿，進行以下各項分析。

##### 1. 肝功能指數 GOT 與 GPT 之活性

血漿中 GOT 與 GPT 之活性是以市售試劑組 (RM 163-K, Iatron laboratories, Toyko, Japan) 進行分析。

##### 2. 脂質含量之分析

總膽固醇 (total cholesterol, TC)、三酸甘油酯

(triglyceride, TG) 以及血漿低密度脂蛋白膽固醇與高密度脂蛋白膽固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C; high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 濃度則分別利用市售試劑組 (Randox Co., Autrim, Ireland) 測定。

### 3. 血漿中尿酸含量之分析

血漿中尿酸之濃度是以市售試劑組 (Randox) 進行分析。

### 4. $\beta$ -胡蘿蔔素與維生素 A 之分析

血漿中  $\beta$ -胡蘿蔔素與維生素 A 萃取方法，係根據 Lederman 等人的方法<sup>(12)</sup>，取血漿 500  $\mu$ L，加入 500  $\mu$ L 絕對酒精 (含 BHT 0.1%) 震盪並使蛋白質變性，再加入 1 mL 的 n-hexane 震盪 20 秒，再加入 2 mL 的 n-hexane 震盪 20 秒進行萃取；至於肝臟部分，則是剪取肝臟 1 克，加入 4 mL 絕對酒精 (含 BHT 0.1%) 進行均質，以使蛋白質變性，取出均質液至 15 mL 塑膠離心管中，加入 1 mL KOH 飽和溶液，混勻後於 70°C 下水浴 30 分鐘，進行皂化反應。取出並靜置於室溫下使之降溫至室溫，待冷卻後，加入 2 mL 的去離子水並震盪 20 秒，之後加入 6 mL 的 n-hexane 震盪之，進行萃取；最後將萃取液於 3,000 rpm、4°C 條件下離心 10 分鐘，取出上層液各 1 mL 至 1.5 mL 微量離心管中，保存於 -80°C。分析時，將微量離心管置於真空乾燥箱中以去除溶劑，加入 200  $\mu$ L methanol 震盪之使其充分溶解後，取 50  $\mu$ L 的量注入 HPLC 分析。另外，分別選取 trans- $\beta$ -carotene 與 all trans-retinol (Sigma Chemical) 作為  $\beta$ -胡蘿蔔素與維生素 A 的外部標準品，並以標準品所測得之波峰面積製作檢量線，再以內插法求出各樣品中  $\beta$ -胡蘿蔔素與維生素 A 的相對濃度。分析儀器由 Shimadzu LC-10A HPLC Pump 與 Shimadzu SPD-10AV UV/Vis Detector 以及 Enshine Super Co-150 Column Oven 組成，分析軟體為訊華 SISC (色層分析儀數據處理系統)，分析管柱為 Vydac 201TP54 ( $C_{18}$ , 5  $\mu$ m, 300  $\text{\AA}$ , 4.6 mm i.d.  $\times$  250 mm)。  $\beta$ -胡蘿蔔素之移動相為 methanol:acetonitrile:H<sub>2</sub>O = 88:9:3，而維生素 A 則是 methanol。至於測定波長方面， $\beta$ -胡蘿蔔素與維生素 A 分別為 452 nm 以及 325 nm，並於固定流速 (1 mL/min) 與溫度 (40°C) 條件下進行分析。

### (三) 肝臟樣本之分析

### 1. 脂質含量之分析

依 Folch 等人<sup>(13)</sup>的方法，剪取約 0.5 克之肝臟組織加入 9 mL 萃取液 (chloroform:methanol = 2:1, v/v)，以均質機 (polytron) 磨碎後，以濾紙過濾至具刻度之塑膠離心管中，再以萃取液定量至 10 mL，加入 0.05% 氯化鈣 (w/v) 2 mL，振盪 10 秒，在 3,500  $\times$  g, 4°C 下，離心 3 分鐘後，去除上層液，再以 chloroform、methanol 及 water 混合液 (chloroform:methanol:water = 3:48:47, v/v) 定量至 12 mL，振盪 10 秒，在 3,500  $\times$  g, 4°C 下，離心 3 分鐘，去除上層液後，所得之脂質萃取液先以甲醇定量至 9 mL，最後再以萃取液 (chloroform:methanol = 2:1, v/v) 定量至 10 mL 後，測定 TC 以及 TG 的含量。

### 2. $\beta$ -胡蘿蔔素與維生素 A 之分析

肝臟中  $\beta$ -胡蘿蔔素與維生素 A 萃取方法，係根據 Lederman 等人的方法<sup>(12)</sup>，測定步驟如同上述。

### 3. 肝臟組織病理切片觀察

於取下肝臟最大葉處，切一部份浸泡於 10% 福馬林後，將肝臟以橫切的方式，切成大小約 0.5 公分、厚度約 0.2 公分左右的樣品，進行組織脫水、清洗、浸潤與包埋的步驟後，最後製成石蠟切片，進行 H&E 染色，觀察肝臟組織病理變化。

## 三、統計分析

實驗之結果以 SAS 統計軟體 (version 6.12, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 進行分析。所有實驗數據均以 means  $\pm$  SD 表示。血液樣本項目以 two-way ANOVA with Fisher's test 分析，至於肝臟之樣本項目則是以 one-way ANOVA 分析，並以  $p < 0.05$  表示具有統計上之差異。

## 結 果

### 一、體重與肝重之變化

於實驗期間，控制組、酒精組與  $\beta$ -胡蘿蔔素添加酒精組每日平均熱量攝取量分別為 61.56  $\pm$  0.05、60.84  $\pm$  0.07 與 60.92  $\pm$  0.46 kcal/day。至於酒精組與  $\beta$ -胡蘿蔔素添加酒精組每日酒精攝取量分別為 2.62  $\pm$  0.03 g 與 2.62  $\pm$  0.02 g，兩組間無顯著差異。實驗初期各組間平均體重皆無顯著差異，但是實驗期末，酒精組的平均體重顯著較控制組減

表二 各組初始體重、期末體重、每日體重增加量、肝重以及相對肝重<sup>1</sup>Table 2. Initial body weight, final body weight, daily body weight gain, liver weight, and relative liver weight in each group<sup>1</sup>

Groups	Body weight (g)		Daily weight gain (g)	Liver weight (g)	Relative liver weight <sup>2</sup> (%)
	Initial	Final			
C	148.36 ± 7.95	413.40 ± 7.47 <sup>b</sup>	3.68 ± 0.20 <sup>b</sup>	14.12 ± 1.50	3.42 ± 0.39 <sup>a</sup>
E	151.21 ± 4.98	376.79 ± 31.01 <sup>a</sup>	3.13 ± 0.40 <sup>a</sup>	14.16 ± 1.99	3.86 ± 0.43 <sup>b</sup>
E+B	155.09 ± 6.64	393.83 ± 12.37 <sup>b</sup>	3.32 ± 0.20 <sup>a</sup>	12.85 ± 2.02	3.25 ± 0.43 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Data are means ± SD (n=8). Values in each column sharing the different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

<sup>2</sup> Relative liver weight = liver weight/body weight × 100%

表三 各組血漿中 GOT 與 GPT 之活性<sup>1</sup>Table 3. Plasma GOT and GPT activities in each group<sup>1</sup>

Groups	GOT <sup>2</sup> (Karmen units/L)					GPT <sup>3</sup> (Karmen units/L)				
	Week 2	Week 4	Week 6	Week 8	Week 10	Week 2	Week 4	Week 6	Week 8	Week 10
C	45.1±6.3	39.0±6.4 <sup>ab</sup>	46.1±4.3 <sup>a</sup>	45.9±1.7 <sup>a</sup>	44.7±3.4 <sup>a</sup>	10.2±1.9	19.6±1.6 <sup>a</sup>	14.7±1.2 <sup>a</sup>	15.2±0.9 <sup>a</sup>	12.8±0.5 <sup>a</sup>
E	44.1±6.1	43.7±5.3 <sup>b</sup>	56.1±2.9 <sup>b</sup>	51.6±1.7 <sup>b</sup>	56.0±5.4 <sup>b</sup>	10.2±2.4	24.9±2.5 <sup>b</sup>	17.3±1.0 <sup>b</sup>	17.9±1.6 <sup>b</sup>	16.2±1.3 <sup>b</sup>
E+B	44.4±4.7	37.4±6.8 <sup>a</sup>	57.1±5.2 <sup>b</sup>	47.5±2.4 <sup>ab</sup>	50.0±5.2 <sup>a</sup>	9.9±2.4	19.4±2.2 <sup>a</sup>	14.1±1.4 <sup>a</sup>	17.3±1.8 <sup>b</sup>	13.8±1.2 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Data are means ± SD (n=8). Values in each column sharing the different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

<sup>2</sup> GOT: glutamate oxaloacetate transferase

<sup>3</sup> GPT: glutamate pyruvate transferase

少 9% ( $p < 0.05$ )。此外，每日體重增加量也是明顯較控制組減少 15% ( $p < 0.05$ )。實驗結束後肝臟重量變化方面，β-胡蘿蔔素添加酒精組相對肝臟重量顯著較酒精組減少 16% ( $p < 0.05$ ) (表二)。

## 二、肝功能指數

於實驗初期，控制組、酒精組與 β-胡蘿蔔素添加酒精組 GOT 活性分別為 57.06 ± 7.52、57.16 ± 7.64 與 57.55 ± 6.27 Karmen units/L，GPT 活性三組分別為 21.39 ± 4.38、20.66 ± 3.87 與 20.88 ± 3.80 Karmen units/L，各組間皆無差異。相較於控制組血漿中 GOT 與 GPT 之活性，酒精組於第 6、8、10 週時均顯著較高 ( $p < 0.05$ )。補充 β-胡蘿蔔素之後，β-胡蘿蔔素添加酒精組血漿中 GOT 活性於第 4、10 週時顯著較酒精組降低 ( $p < 0.05$ )。此外，β-胡蘿蔔素添加酒精組血漿中 GPT 活性則是在第 4、6、10 週時明顯較酒精組降低 ( $p < 0.05$ ) (表三)。

## 三、血漿中脂質含量

酒精組血漿中 TC 濃度於第 10 週時顯著較其他二組減少 ( $p < 0.05$ )。β-胡蘿蔔素添加酒精組血漿

中 TC 濃度則是在第 2 週時明顯較其他二組增加 ( $p < 0.05$ ) (表四)。除了第 2 週之外，酒精組血漿中 TG 濃度於其他各時間點皆顯著較控制組增加 ( $p < 0.05$ )。補充 β-胡蘿蔔素之後，β-胡蘿蔔素添加酒精組血漿中 TG 濃度則是在第 4、6、8、10 週時皆明顯較酒精組減少 ( $p < 0.05$ ) (表四)。相較於控制組，酒精組血漿中 LDL-C 濃度於各時間點皆無差異。補充 β-胡蘿蔔素後，β-胡蘿蔔素添加酒精組血漿中 LDL-C 濃度於第 2 週時顯著較控制組增加 ( $p < 0.05$ )，此外，β-胡蘿蔔素添加酒精組在第 10 週時亦顯著較其他二組增加 ( $p < 0.05$ ) (表五)。酒精組與控制組血漿中 HDL-C 濃度於各時間點皆無差異。補充 β-胡蘿蔔素後，β-胡蘿蔔素添加酒精組在第 2、10 週時顯著較酒精組增加 ( $p < 0.05$ ) (表五)。如表六結果所示，三組於各時間點均無明顯差異。

## 四、肝臟中脂質含量

肝臟中膽固醇與 TG 含量方面，酒精組較控制組分別顯著增加 73% 與 33% ( $p < 0.05$ )，補充 β-胡蘿蔔素之後，β-胡蘿蔔素添加酒精組則是顯著較酒精組分別減少 38% 與 20% ( $p < 0.05$ ) (表七)。

表四 各組血漿中總膽固醇與三酸甘油酯之濃度<sup>1</sup>

Table 4. Plasma total cholesterol and triglyceride concentrations in each group<sup>1</sup>

Groups	Total cholesterol (mg/dL)					Triglyceride (mg/dL)				
	Week 2	Week 4	Week 6	Week 8	Week 10	Week 2	Week 4	Week 6	Week 8	Week 10
C	66.7±14.3 <sup>a</sup>	59.8±9.6	65.8±9.9	65.8±11.2	69.6±9.2 <sup>b</sup>	85.4±20.5	50.2±28.8 <sup>a</sup>	76.4±55.8 <sup>a</sup>	59.6±26.9 <sup>a</sup>	50.6±28.2 <sup>a</sup>
E	58.5±6.6 <sup>a</sup>	63.2±5.8	62.8±5.8	65.1±10.5	60.6±7.1 <sup>a</sup>	84.1±14.4	131.5±52.8 <sup>b</sup>	168.3±52.3 <sup>b</sup>	138.8±62.8 <sup>b</sup>	107.2±53.0 <sup>b</sup>
E+B	80.0±8.5 <sup>b</sup>	66.1±9.2	66.5±4.9	68.7±5.0	70.1±4.3 <sup>b</sup>	81.9±30.1	68.9±33.3 <sup>a</sup>	77.5±43.1 <sup>a</sup>	89.3±39.5 <sup>a</sup>	67.6±39.5 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Data are means ± SD (n=8). Values in each column sharing the different superscripts are significantly different (p < 0.05).

表五 各組血漿中低密度脂蛋白膽固醇與高密度脂蛋白膽固醇之濃度<sup>1</sup>

Table 5. Plasma low-density lipoprotein cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol concentrations in each group<sup>1</sup>

Groups	LDL-C <sup>2</sup> (mg/dL)					HDL-C <sup>3</sup> (mg/dL)				
	Week 2	Week 4	Week 6	Week 8	Week 10	Week 2	Week 4	Week 6	Week 8	Week 10
C	33.4±9.5 <sup>a</sup>	32.0±10.0	36.6±9.0	35.0±10.2	46.0±11.0	15.8±2.0 <sup>a</sup>	18.7±2.6	17.2±2.2	14.9±1.4	16.9±2.2 <sup>b</sup>
E	36.9±8.7 <sup>ab</sup>	31.2±6.6	30.1±13.9	30.1±11.8	37.0±14.0	17.1±2.2 <sup>a</sup>	19.8±1.2	17.3±2.3	14.4±1.5	16.5±1.7 <sup>a</sup>
E+B	44.7±7.2 <sup>b</sup>	31.2±4.9	35.3±4.3	33.5±9.3	42.6±7.2	19.4±1.6 <sup>b</sup>	18.9±3.1	19.0±1.9	16.1±1.4	18.7±1.3 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> Data are means ± SD (n=8). Values in each column sharing the different superscripts are significantly different (p < 0.05).

<sup>2</sup> LDL-C: low density lipoprotein-cholesterol

<sup>3</sup> HDL-C: high density lipoprotein-cholesterol

表六 各組血漿中低密度脂蛋白膽固醇與高密度脂蛋白膽固醇之比值<sup>1</sup>

Table 6. The ratio of plasma low-density lipoprotein cholesterol to high-density lipoprotein cholesterol in each group<sup>1</sup>

Groups	LDL-C/HDL-C <sup>2</sup>				
	Week 2	Week 4	Week 6	Week 8	Week 10
C	2.10 ± 0.53	1.71 ± 0.47	2.16 ± 0.62	2.08 ± 0.65	3.10 ± 0.70
E	2.20 ± 0.66	1.57 ± 0.31	1.78 ± 0.92	1.83 ± 0.78	2.56 ± 0.86
E+B	2.30 ± 0.33	1.67 ± 0.28	1.87 ± 0.29	1.79 ± 0.48	2.66 ± 0.49

<sup>1</sup> Data are means ± SD (n=8). Values in each column sharing the different superscripts are significantly different (p < 0.05).

<sup>2</sup> LDL-C/HDL-C: The ratio of LDL-cholesterol to HDL-cholesterol.

## 五、血漿中尿酸之濃度

除了第2週外，酒精組血漿中尿酸濃度於其他各時間點皆顯著較控制組增加 (p < 0.05)。補充β-胡蘿蔔素之後，β-胡蘿蔔素添加酒精組血漿中尿酸濃度則是在第4、6、8、10週時皆明顯較酒精組減少 (p < 0.05) (表八)。

## 六、血漿與肝臟中β-胡蘿蔔素與維生素A之濃度

實驗結束時各組血漿中β-胡蘿蔔素與維生素A之濃度皆無顯著差異。至於肝臟方面，投予大白鼠酒精同時補充β-胡蘿蔔素10週之後，可以偵測到β-

胡蘿蔔素的存在。另外，β-胡蘿蔔素添加酒精組肝臟中維生素A的含量亦顯著較其他二組增加 (p < 0.05) (表九)。

## 七、肝臟組織病理切片觀察

由肝臟組織病理切片可觀察到酒精組大白鼠肝臟中有脂肪顆粒之堆積，而控制組與β-胡蘿蔔素添加酒精組的肝臟組織則顯示正常 (圖一)。

## 討 論

本實驗乃在探討大白鼠長期餵食酒精下同時投予β-胡蘿蔔素，是否可以改善脂質異常與維生素A



表七 各組肝臟中膽固醇與三酸甘油酯之含量<sup>1</sup>Table 7. Hepatic cholesterol and triglyceride contents in each group<sup>1</sup>

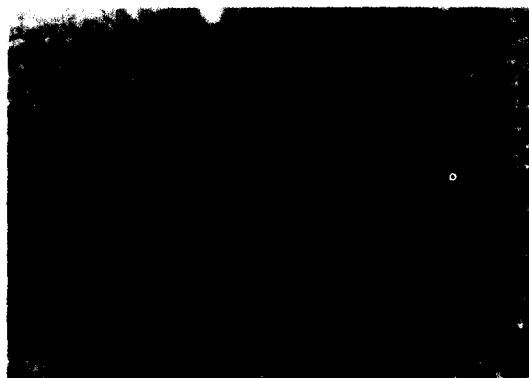
Groups	Cholesterol		Triglyceride
	(mg/g liver)		
C	23.2±2.5 <sup>a</sup>	34.9± 6.0 <sup>a</sup>	
E	30.8±7.1 <sup>b</sup>	60.5±15.2 <sup>b</sup>	
E+B	24.6±3.4 <sup>a</sup>	37.6±12.6 <sup>a</sup>	

<sup>1</sup> Data are means ± SD (n=8). Values in each column sharing the different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

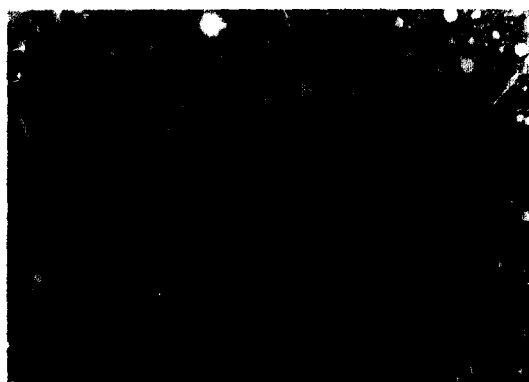
降低的現象。

肝功能指數方面，酒精組血漿中 GOT 與 GPT 活性顯著較控制組提高，顯示長期攝取酒精會造成大白鼠肝功能受損<sup>(14)</sup>。而補充 β-胡蘿蔔素之後，β-胡蘿蔔素添加酒精組血漿中 GOT 與 GPT 活性則是顯著較酒精組降低，顯示補充 β-胡蘿蔔素能夠減少酒精對肝臟的傷害。

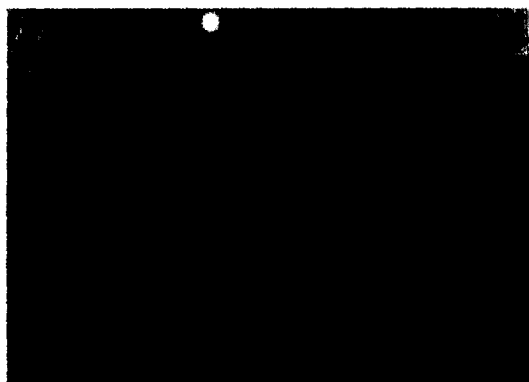
膽固醇代謝方面，有研究指出長期攝取酒精會造成血漿中 TC 濃度上升，主要原因包括：血漿中 LDL-C 濃度增加以及酒精促使腸道對膽固醇吸收能力提高所導致等<sup>(15)</sup>。相反地，本研究結果卻發現，實驗期末酒精組血漿中 TC 濃度反而顯著較其他二組減少（表四）。根據其他結果，實驗結束後酒精組肝臟中膽固醇含量顯著較其他二組增加（表七），但是血漿中 LDL-C 濃度並沒有增加，反而較其他二組有減少的情形（表五），因此推測可能是因為肝臟中膽固醇釋放能力受影響而導致實驗期末酒精組血漿中 TC 濃度顯著較其他二組低。許多報告指出，適量攝取酒精能夠提高人體血漿中 HDL-C 濃度<sup>(16,17)</sup>，但是在本研究中酒精組 HDL-C 濃度則是無顯著變化（表五），推測其原因可能是實驗對象、酒精投予劑量以及實驗期長短不同所造成。另外，根據研究指出，補充 β-胡蘿蔔素可以顯著增加血清中 HDL-C 濃度<sup>(18,19)</sup>，本研究結果亦顯示，補充 β-胡蘿蔔素可以顯著增加酒精組大白鼠血中 HDL-C 濃度。至於血漿中 LDL-C 與 HDL-C 之比值於各時間點則是皆無顯著差異（表六）。在肝臟中膽固醇含量方面，酒精組明顯較控制組增加，此與其他研究結果一致，顯示長期攝取酒精會造成膽固醇累積在肝臟中<sup>(14)</sup>，其原因推測可能與長期攝取酒精會增加細胞內膽固



A. (Group C)



B. (Group E)



C. (Group E+B)

圖一 各組大白鼠肝臟病理切片圖

Fig. 1 A. Section of the liver from a rat fed control diet for 10 weeks shows normal histology with no evidence of pathologic change. B. Section of the liver from a rat fed ethanol diet shows the presence of fat accumulation. C. Section of the liver from a rat fed ethanol with β-carotene diet shows normal histology with no evidence of pathologic change. (H & E, magnification × 200).

表八 各組血漿中尿酸之濃度<sup>1</sup>Table 8. Plasma uric acid concentration in each group<sup>1</sup>

Groups	Uric acid ( $\mu\text{M}$ )				
	Week 2	Week 4	Week 6	Week 8	Week 10
C	46.3 $\pm$ 7.5	46.1 $\pm$ 3.6 <sup>b</sup>	37.3 $\pm$ 8.0 <sup>a</sup>	31.1 $\pm$ 7.3 <sup>a</sup>	69.8 $\pm$ 8.0 <sup>a</sup>
E	38.4 $\pm$ 5.3	52.1 $\pm$ 7.2 <sup>b</sup>	56.0 $\pm$ 9.9 <sup>b</sup>	41.4 $\pm$ 9.5 <sup>b</sup>	93.6 $\pm$ 8.4 <sup>b</sup>
E+B	44.3 $\pm$ 4.8	27.3 $\pm$ 5.3 <sup>a</sup>	39.0 $\pm$ 8.6 <sup>a</sup>	30.2 $\pm$ 7.5 <sup>a</sup>	76.9 $\pm$ 17.8 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Data are means  $\pm$  SD (n=8). Values in each column sharing the different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

表九 各組血漿與肝臟中 $\beta$ -胡蘿蔔素與維生素A之濃度<sup>1</sup>Table 9.  $\beta$ -carotene and retinol concentrations of plasma and liver in each group<sup>1</sup>

Groups	Plasma		Liver	
	$\beta$ -carotene (nM)	Retinol (nM)	$\beta$ -carotene ( $\mu\text{g/g}$ liver)	Retinol (mg/g liver)
C	ND	15.9 $\pm$ 1.6	ND	1.6 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>
E	ND	16.0 $\pm$ 1.9	ND	1.4 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>
E+B	ND	16.7 $\pm$ 4.0	0.8 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> Data are means  $\pm$  SD (n=8). Values in each column sharing the different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ). ND indicates not detectable.

醇的合成<sup>(1)</sup>以及降低膽固醇代謝成膽酸的速率<sup>(20)</sup>等因素有關。先前有研究發現 $\beta$ -胡蘿蔔素具有降低高脂血症大白鼠肝臟中膽固醇含量的效果<sup>(3,4)</sup>，而在本研究中，亦發現補充 $\beta$ -胡蘿蔔素之後， $\beta$ -胡蘿蔔素添加酒精組肝臟中膽固醇含量有顯著較酒精組減少。而根據Moreno等人的研究指出， $\beta$ -胡蘿蔔素具有抑制HMG-CoA reductase活性<sup>(5)</sup>，因此推測在本研究中補充 $\beta$ -胡蘿蔔素可能是藉由抑制此酵素之活性而減少膽固醇在肝臟中的生成量。

另外，在TG代謝方面，酒精組血漿中TG濃度與肝臟中TG含量均顯著較控制組增加，此與Navder等人的研究結果相同<sup>(14)</sup>。根據先前的研究報告指出，酒精代謝成乙醛的反應過程中，會使得氧化還原的平衡狀態遭到破壞而趨向於還原狀態，進而影響代謝路徑的正常運作，因而造成脂質代謝方面的異常，如：脂肪酸的氧化作用受影響而減少，因此，不同來源的脂肪酸堆積於肝臟中後，會以TG的型式儲存於肝臟中，而造成脂肪堆積的情形<sup>(2)</sup>，故長期攝取酒精會造成脂質代謝異常，進而導致酒精性高脂血症以及酒精性脂肪肝。有些研究指出，補充 $\beta$ -胡蘿蔔素並不影響血漿中TG濃度之改變<sup>(21,22)</sup>，然而在本研究結果中， $\beta$ -胡蘿蔔素添加酒精組血漿中TG濃度與肝臟中TG的含量均有顯

著較酒精組減少，至於 $\beta$ -胡蘿蔔素降低血漿與肝臟中TG的詳細機轉，則必須進一步實驗證實，例如： $\beta$ -胡蘿蔔素對於脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase)活性之作用等。

另一方面，在本研究中發現，酒精組血漿中尿酸濃度顯著較控制組高，顯示長期攝取酒精會增加嘌呤代謝成尿酸的反應，而導致血漿中尿酸的濃度增加<sup>(23)</sup>，此現象在其他研究中也已經得到證實。但是，補充 $\beta$ -胡蘿蔔素之後， $\beta$ -胡蘿蔔素添加酒精組血漿中尿酸濃度有顯著較酒精組降低，表示攝取 $\beta$ -胡蘿蔔素可改善因長期攝取酒精攝取所引起之高尿酸血症的現象，推測可能是 $\beta$ -胡蘿蔔素藉由減少嘌呤代謝成尿酸的反應途徑所造成<sup>(24)</sup>。許多研究已證實，經口投予大白鼠 $\beta$ -胡蘿蔔素3小時之後，便可以觀察到血漿中有 $\beta$ -胡蘿蔔素之出現<sup>(25)</sup>，然而在本研究中， $\beta$ -胡蘿蔔素添加酒精組大白鼠血漿中並無法偵測到 $\beta$ -胡蘿蔔素，推測其原因可能是因為 $\beta$ -胡蘿蔔素於血漿中的半衰期較短，故禁食12小時之後的血漿中無法測得 $\beta$ -胡蘿蔔素。但是，補充 $\beta$ -胡蘿蔔素之後， $\beta$ -胡蘿蔔素添加酒精組肝臟中有偵測到 $\beta$ -胡蘿蔔素的存在，此與其他長期補充大白鼠高劑量 $\beta$ -胡蘿蔔素的相關研究的實驗結果相同<sup>(26)</sup>。由此可知，大白鼠在長期補充 $\beta$ -胡蘿蔔素後，仍可以完

整地將β-胡蘿蔔素吸收，並儲存於肝臟中。另外，β-胡蘿蔔素添加酒精組肝臟中維生素A含量顯著較酒精組增加，顯示大白鼠攝取β-胡蘿蔔素之後，β-胡蘿蔔素可以於腸道中經由central cleavage轉變成維生素A，進而儲存於肝臟中<sup>(26)</sup>。

肝功能指數以及肝臟組織病理切片觀察結果發現，酒精組血漿中GOT與GPT活性顯著較控制組提高，顯示長期攝取酒精會造成大白鼠肝功能受損並形成酒精性脂肪肝<sup>(14)</sup>。而由β-胡蘿蔔素添加酒精組血漿中GOT與GPT活性顯著較酒精組降低的結果可知，補充β-胡蘿蔔素能夠減少酒精對肝臟細胞的傷害。由肝臟組織病理切片之結果可獲知補充β-胡蘿蔔素可預防酒精性肝臟疾病的發生。

綜合以上結果可知，補充β-胡蘿蔔素能夠抑制長期攝取酒精大白鼠血中TG以及肝臟中膽固醇與TG的增加。

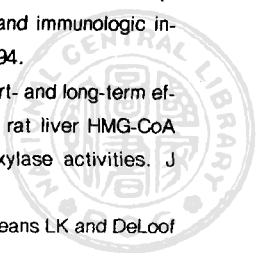
### 誌 謝

本文為國科會專題研究計畫 (NSC89-2320-B038-034) 之部分成果，承蒙國科會研究經費之支持，謹此致謝。

### 參考文獻

1. Visioli F, Monti S, Colombo C and Galli C (1998) Ethanol enhances cholesterol synthesis and secretion in human hepatoma cells. *Alcohol* 15:299-303.
2. Lieber CS (1994) Hepatic and metabolic effects of ethanol: pathogenesis and prevention. *Ann Med* 26:325-330.
3. Amen RJ and Lachane PA (1974) The effect of β-carotene and canthaxanthin on serum cholesterol levels in the rat. *Nutr Rep Int* 10:269-274.
4. Tsai AC, Mazeedi HA and Mameesh MS (1992) Dietary β-carotene reduces serum lipid concentrations in spontaneously hypertensive rats fed a vitamin A-fortified and cholesterol-enriched diet. *J Nutr* 122:1768-1771.
5. Moreno FS, Rossiello MR, Manjeshwar S, Nath R, Rao PM, Rajalakshmi S and Sarma DSR (1995) Effect of β-carotene on the expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in rat liver. *Cancer Lett* 96:201-208.
6. Fuhrman B, Elis A and Aviram M (1997) Hypocholesterolemic effect of lycopene and beta-carotene is related to suppression of cholesterol synthesis and augmentation of LDL receptor activity in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 233:658-662.

7. Leo MA, Aleynik SI, Aleynik MK and Lieber CS (1997) beta-Carotene beadlets potentiate hepatotoxicity of alcohol. *Am J Clin Nutr* 66:1461-1469.
8. Kawase T, Kato S and Lieber CS (1989) Lipid peroxidation and antioxidant defense system in rat liver after chronic ethanol feeding. *Hepatology* 10:815-821.
9. Leo MA, Rosman AS and Lieber CS (1993) Differential depletion of carotenoids and tocopherol in liver disease. *Hepatology* 17:977-986.
10. Ahmed S, Leo MA and Lieber CS (1994) Interaction between alcohol and beta-carotene in patients with alcoholic liver disease. *Am J Clin Nutr* 60:430-436.
11. Polavarapu R, Spitz DR, Sim JE, Follansbee MH, Oberley LW, Rahemtulla A and Nanji AA (1998) Increased lipid peroxidation and impaired antioxidant enzyme function is associated with pathological liver injury in experimental alcoholic liver disease in rats fed diets high in corn oil and fish oil. *Hepatology* 27:1317-1323.
12. Lederman JD, Overton KM, Hofmann NE, Moore BJ, Thornton J and Erdman JW (1998) Ferrets (*Mustela putorius furo*) inefficiently convert β-carotene to vitamin A. *J Nutr* 128:271-279.
13. Floch J, Lees M and Stanley GHS (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem* 226:497-502.
14. Navder KP, Baraona E and Lieber CS (1997) Polyenylphosphatidylcholine attenuates alcohol-induced fatty liver and hyperlipidemia in rats. *J Nutr* 127:1800-1806.
15. Latour MA, Patterson BW, Kitchens RT, Ostlund RE Jr, Hopkins D and Schonfeld G (1999) Effects of alcohol and cholesterol feeding on lipoprotein metabolism and cholesterol absorption in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:598-604.
16. Nishiwaki M, Ishikawa T, Ito T, Shige H, Tomiyasu K, Nakajima K, Kondo K, Hashimoto H, Saitoh K and Manabe M (1994) Effects of alcohol on lipoprotein lipase, hepatic lipase, cholesteryl ester transfer protein, and lecithin: cholesterol acyltransferase in high-density lipoprotein cholesterol elevation. *Atherosclerosis* 111:99-109.
17. Frohlich JJ (1996) Effects of alcohol on plasma lipoprotein metabolism. *Clin Chim Acta* 246 (1-2):39-49.
18. Gaffney PT, Buttenshaw RL, Lovell GA, Kerwill WJ and Ward M (1990) β-carotene supplementation raises serum HDL-cholesterol. *Aust NZ J Med* 20:365.
19. Ringer TV, DeLoof MJ, Winterrowd GE, Francome SF, Gaylor SK, Ryan JA, Sanders ME and Hughes GS (1991) β-carotene's effects on serum lipoproteins and immunologic indices in humans. *Am J Clin Nutr* 53:688-694.
20. Lakshmanan MR and Veech RL (1977) Short- and long-term effects of ethanol administration in vivo on rat liver HMG-CoA reductase and cholesterol 7 alpha-hydroxylase activities. *J Lipid Res* 18:325-330.
21. Hughes GS Jr, Ringer TV, Francome SF, Means LK and DeLoof



- MJ (1994) Lack of effects of beta-carotene on lipids and sex steroid hormones in hyperlipidemics. *Am J Med Sci* 308: 16-22.
22. Nierenberg DW, Bayrd GT and Stukel TA (1991) Lack of effect of chronic administration of oral beta-carotene on serum cholesterol and triglyceride concentrations. *Am J Clin Nutr* 53: 652-654.
23. Faller J and Fox IH (1982) Ethanol-induced hyperuricemia: evidence for increased urate production by activation of adenine nucleotide turnover. *N Engl J Med* 307: 1598-1602.
24. Atanasova-Goranova VK, Dimova PI and Pevicharova GT (1997) Effect of food products on endogenous generation of N-nitrosamines in rats. *Br J Nutr* 78:335-345.
25. Barua AB and Olson JA (2000) beta-carotene is converted primarily to retinoids in rats in vivo. *J Nutr* 130:1996-2001.
26. Bianchi-Santamaria A, Stefanelli C, Cembran M, Gobbi M, Peschiera N, Vannini V and Santamaria L (1999) Hepatic sub-cellular storage of beta-carotene in rats following diet supplementation. *Int J Vit Nutr Res* 69:3-7.



# β-胡蘿蔔素抑制長期攝食酒精之大白鼠肝臟脂肪堆積

黃啓彰 陳俊榮 黃娣儀 謝明哲 朱娟秀<sup>1</sup> 楊素卿

台北醫學大學保健營養學研究所及<sup>1</sup>病理學科

(收稿日期：90年5月6日。接受日期：91年7月14日)

**摘要** 本實驗之目的在探討β-胡蘿蔔素對於長期攝取酒精所導致大白鼠高三酸甘油酯血症以及酒精性脂肪肝之影響。以雄性SD大白鼠為實驗動物，依肝功能指標GOT與GPT活性分成三組：控制組、酒精組以及β-胡蘿蔔素添加酒精組，實驗期10週。結果顯示：血漿中GOT與GPT活性方面，酒精組在第6、8、10週時均顯著較控制組上升，而β-胡蘿蔔素添加酒精組在第10週時則是均顯著較酒精組降低。血漿中總膽固醇濃度方面，酒精組在第10週時明顯較其他二組減少。血漿中三酸甘油酯濃度方面，酒精組則是在第4、6、8、10週時明顯較其他二組增加。此外，β-胡蘿蔔素添加酒精組，血漿中高密度脂蛋白膽固醇濃度在第10週時顯著較酒精組增加13%。至於肝中膽固醇與三酸甘油酯含量方面，酒精組較控制組分別增加33%與73%，而β-胡蘿蔔素添加酒精組則是分別較酒精組減少20%及38%。另外，β-胡蘿蔔素添加酒精組大白鼠肝臟中可測得β-胡蘿蔔素，而且β-胡蘿蔔素添加酒精組肝臟中維生素A之含量分別較控制組與酒精組增加33%與51%。由肝臟組織病理切片觀察顯示，酒精組大白鼠肝臟中有脂質堆積的現象，而β-胡蘿蔔素添加酒精組大白鼠則無此現象。由以上結果可知，補充β-胡蘿蔔素可以減少血漿中三酸甘油酯濃度，以及肝臟中膽固醇與三酸甘油酯之含量，進而預防酒精性脂肪肝之形成。

**關鍵詞：**β-胡蘿蔔素、高三酸甘油酯血症、酒精性脂肪肝

