

半葉馬尾藻萃取物對四氯化碳誘導大鼠肝損傷之 護肝及抗氧化功效評估

簡世勇·洪郁嵐·黃培安*·吳純衡

行政院農業委員會水產試驗所水產加工組

摘 要

本研究旨在探討半葉馬尾藻萃取物以大鼠初代肝細胞之分離與培養為實驗模式，評估不同濃度之半葉馬尾藻萃取物對大鼠初代肝細胞的存活率、抗氧化及解毒代謝能力之影響。接著再將大鼠初代肝細胞與大鼠施以四氯化碳 (CCl₄) 誘導氧化損傷，評估半葉馬尾藻萃取物之護肝及抗氧化能力。結果發現，以 5.0 mg/mL 半葉馬尾藻萃取物培養大鼠初代肝細胞後，能夠顯著提升細胞存活率，並使胞內麩胱甘肽 (Glutathione, GSH) 含量與麩胱甘肽 S 轉移酶 (Glutathion-S-transferase, GST) 酵素活性上昇。而大鼠初代肝細胞受四氯化碳損傷時，半葉馬尾藻萃取物可以顯著增加大鼠初代肝細胞的存活率，且能增加正常大鼠初代肝細胞的 GSH 含量，並且提升抗氧化系統的麩胱甘肽過氧化酶 (Glutathione peroxidase, GPx)、麩胱甘肽還原酶 (Glutathione reductase, GRd)、過氧化氫酶 (Catalase, CAT)、超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 與解毒酵素 GST 的活性。除此之外，半葉馬尾藻萃取物也能降低因四氯化碳氧化損傷所引起的細胞壞死現象發生。在動物實驗方面，餵食半葉馬尾藻萃取物 160 mg/kg body weight 時能夠降低麩胺酸-草醋酸轉胺酶 (Glutamic oxaloacetic transaminase, GOT) 與麩胺酸-焦葡萄糖轉胺酶 (Glutamic pyruvic transaminase, GPT) 肝損傷指標，並進一步提昇 GSH、GPx、GRd、SOD 與 GST 酵素活性。最後由肝臟病理組織切片可得知，餵食半葉馬尾藻萃取物後可降低四氯化碳誘發之細胞空泡化及壞死細胞之生成。從上述結果得知，半葉馬尾藻萃取物可顯著降低肝臟損傷程度，並可顯著提升肝臟中因四氯化碳誘導下降之抗氧化酵素活性，因此推測半葉馬尾藻萃取物應是阻斷四氯化碳對細胞之氧化傷害而達到保護肝臟之效果。

關鍵詞：半葉馬尾藻萃取物、抗氧化、保護肝臟、大鼠初代肝細胞

前 言

在古代中國及日本就有利用海藻做為藥物的證據，古醫典包括《本草綱目》、《本草經集注》、《海藥本草》及《本草拾遺》等都有用海藻治療各種疾病的紀載。而馬尾藻屬 (*Sargassum* spp.) 在醫藥上的利用更有上千年歷史 (Nardella *et al.*, 1996)。

褐藻在傳統中藥常被宣稱主治癭瘤結氣、消

潰腫、治惡瘡等功效，由近年來的研究發現，匍枝馬尾藻 (*S. polycystum*)、鈍凹頂藻 (*Laurencia obtuse*) 及羊栖菜 (*Sargassum fusiforme*) 的萃取物具有抗氧化及清除超氧陰離子效果 (Anggadiredja *et al.*, 1997; Nagai and Yukimoto, 2003)。匍枝馬尾藻也可改善因乙醯胺酚所導致的肝臟脂肪代謝不正常，使大鼠血清中三酸甘油酯與膽固醇明顯下降 (Raghavendran *et al.*, 2005)，並可進一步增加大鼠肝臟中抗氧化酵素活性，藉此預防乙醯胺酚誘發大鼠肝損傷的發生 (Raghavendran *et al.*, 2005)。另外，在誘導高膽固醇的大鼠上，於飼料中添加海帶與紫菜時，會增加肝臟中麩胱甘肽過氧化酶 (Glutathione peroxidase, GPx) 與麩胱甘肽

*通訊作者 / 基隆市和一路 199 號; TEL: (02) 2462-2101; FAX: (02) 2463-2677; E-mail: pahwang@mail.tfrin.gov.tw

還原酶 (Glutathione reductase, GRd) 酵素活性 (Bocanegra *et al.*, 2006)。此外在乙醯胺酚誘導大鼠肝損傷的研究中發現，羊栖菜水萃物也發現具有提升大鼠血液中的麩胱甘肽 (Glutathione, GSH) 之作用 (Hwang *et al.*, 2008)。

根據上述研究顯示，褐藻萃取物不僅在體外試驗中具有良好的抗氧化能力，於生物體內之護肝與抗氧化能力也同樣具有良好的功效。有鑑於台灣產褐藻除部分藻種質地較細可作為蔬菜食用外，其他種類褐藻均因口感不佳，使得利用性非常低。而 Hwang *et al.* (2010) 發現台灣產半葉馬尾藻 (*S. hemiphyllum*) 於體外試驗中具有良好的抗氧化能力，因此推測半葉馬尾藻可能具有護肝之作用，所以本研究以台灣產半葉馬尾藻為樣品進行抗氧化及護肝功能評估。而研究分為三部分，第一部分是：半葉馬尾藻萃取物對於大鼠初代肝細胞存活率與抗氧化能力評估；第二部分是：以半葉馬尾藻萃取物處理因四氯化碳損傷之大鼠初代肝細胞，觀察其存活率與抗氧化能力；第三部分是：以四氯化碳誘導大鼠肝損傷與氧化傷害之動物模式，進行馬尾藻萃取物於大鼠體內之護肝及抗氧化能力評估。

材料與方法

一、材料

(一) 半葉馬尾藻萃取物製備

本研究所使用之半葉馬尾藻係採自台灣沿海海域。半葉馬尾藻經清水洗淨後以烘箱 (RHD-602D, RISEN, Taiwan) 50 °C 乾燥，後以粉碎機 (D3V-10, YOUQI, Taiwan) 進行粉碎，再經 0.5 mm 孔徑篩網篩洗備用。在傳統中醫藥之藥材多以研末、酒劑或水煎方式服用，而本實驗為貼近傳統中藥之萃取方式，故以熱水進行萃取，其萃取物以下簡稱為 SE。取 100 g 半葉馬尾藻粉末加入 50 倍量的去離子水 (v/w)，於 121 °C 加熱 30 mins，後以 5500 rpm、10 mins 離心，將上清液以凍乾機 (FDU-1200, EYELA, Japan) 凍乾成粉末。最後取得凍乾粉末 11.6 g，收率為 11.6%。接著取凍乾粉末以細胞培養液配製 1.0、2.5 和 5.0 mg/mL 等濃度，供細胞實驗使用。另以蒸餾水將

凍乾粉末配製成 80 mg/kg body weight 與 160 mg/mL BW 濃度，供動物實驗使用。

(二) 化學藥品

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、Leibowitz, L-15 medium、Fetal Bovine Serum (FBS) 購自 Gibco 公司 (Grand Island, NY, U.S.A.)、Ethanol、Paraformaldehyde 購自默克公司 (Darmstadt, Germany)。Albumin Bovine fraction V (BSA)、Ampicillin、Collagen (VII)、Collagenase H、Dimethyl sulfoxide (DMSO)、Olive oil、Phosphate Buffered Saline (PBS)、3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 購自 Sigma 公司 (St. Louis, MO, U.S.A.)。四氯化碳 (CCl₄) 購自林純藥工業株式會社 (日本大阪)。

(三) 實驗試劑

Glutathione (GSH) assay kit、Glutathione peroxidase (GPx) assay kit、Glutathione reductase (GRd) assay kit、Glutathion-S-transferase (GST) assay kit、Catalase (CAT) assay kit、Superoxide dismutase (SOD) assay kit 購自 Cayman chemical company (Ann Arbor, U.S.A.)。分析動物血漿中 GOT kit、GPT kit 購自 ID Labs Biotechnology (London, ON, Canada)。

二、方法

(一) 半葉馬尾藻萃取物對大鼠初代肝細胞存活率與抗氧化活性之影響

1. 大鼠初代肝細胞的分離與培養

Collagen (VII) 以 2 mg/ML 的濃度溶於 13 mM HCl，待完全溶解後以 0.22 μm 濾膜過濾。再於無菌操作台內，吸取 Collagen 溶液將培養皿底部潤濕，待風乾後以無菌 PBS 及無菌水各沖洗兩次，置於細胞培養箱中備用。初代肝細胞的分離主要參考 Cascales *et al.* (1984) 的方法，為兩階段膠原蛋白酶灌流法 (Two-steps collagenase perfusion)。實驗設備均需經過高溫高壓滅菌或以 75% 乙醇及無菌水沖淨。

將八週大之雄性 SD 大鼠以乙醚麻醉後，剪開腹部及胸部呈 U 字型，露出內臟；以止血鉗夾住

肝臟下方的下腔靜脈後，將導管由右心房上方插入通過肝靜脈進入肝臟，利用綿線將導管綁住固定，避免導管滑出肝靜脈，迅速將肝門靜脈剪斷，讓肝臟中的血液流出，此時通以 Krebs-Henseleit buffer 灌流約 5~10 mins 將血液沖淨，再將肝臟提起迅速剪去其他器官，使肝臟與身體分離後，置於不銹鋼網上，此時加入 0.02% 的膠原蛋白酶 (collagenase) 及 0.0125% 的胰蛋白酶抑制劑 (trypsin inhibitor)，並進行循環灌注，流速為 15 mL/min 灌流約 10~20 mins，直到肝臟被消化至肝組織呈現顆粒狀並且失去彈性後，將肝臟置於 100 ml 灌流液中剪碎，細胞懸浮液通過 80 及 100 號篩網後，於 1000 rpm, 25 °C, 離心 2 mins，上述離心過程重複三次，並且過程中使用之緩衝液及培養液均需維持於 25 °C；最後以適量的 L-15 medium 含 0.2% BSA 使細胞懸浮，以 150 號篩網過濾，接著測定細胞存活率。再以 L-15 medium 含 10% FBS 將細胞濃度稀釋為 1×10^5 cells/mL，分注 1 mL 於 24 孔盤，置於細胞培養箱中培養 4 h 後，更換培養液，以移除尚未貼附或死亡之細胞 (陳, 2004)。

2. 細胞存活率分析

將大鼠初代肝細胞分為不添加 SE 及四氯化碳的負控制組，以及添加 1.0、2.5 和 5.0 mg/mL SE 處理的實驗組。在培養 48 h 後，吸去上清液後，加入含有 1 mg/mL MTT 的 PBS，培養 2 h 後，將上清液吸去，加入 100 μ L DMSO 使細胞破裂釋放出 Formazan 結晶，利用 ELISA reader 於波長 570 nm 讀取吸光值，其細胞存活率 (%) = [(樣品組吸光值 - 空白組吸光值) / 負控制組吸光值] \times 100%。

3. GSH 含量之測定

以下抗氧化酵素測定方法，皆參考 Park *et al.* (2010) 之方法測定。將上述各組細胞加入細胞均質液，待溶破細胞膜後，取出 50 ml 細胞上清液於 96 孔盤中，再加入 5,5-Dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) 溶液後反應 10 mins，以 ELISA reader 檢測 405 nm 下之吸光值，藉此分析 GSH 含量。

4. GPx 活性之測定

取上述 5 μ L 細胞上清液及 95 μ 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 Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen (NADPH)、1 U/mL GRd 及 1 mM GSH)，在室溫下靜置 5 mins，再加入 100 μ L 2.5 mM 過氧化氫後，在 25 °C 下，以 ELISA reader 檢測 340 nm 下吸光值 3 mins，計算 NADPH 減少之速率，藉此分析 GPx 活性。

5. GRd 活性之測定

取上述 10 μ L 之細胞上清液及 90 μ L 20 mM 磷酸鉀緩衝液 (pH 7.0) 加入 0.9 mL 含有 1.1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、5.0 mM GSSG 及 0.1 mM NADPH 之 100 mM 磷酸鉀緩衝液 (pH 7.0)，在 25 °C 下，以 ELISA reader 檢測 340 nm 下吸光值 5 mins，藉此分析 GRd 活性。

6. GST 活性之測定

取 20 μ L 細胞上清液與 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) 為受質來進行反應。將反應溶液 (0.5 mg Cytosol protein/mL、0.1 M Potassium phosphate buffer, pH 6.5、1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene 及 5 mM GSH) 混合均勻後，在 25 °C 下，以 ELISA reader 檢測 340 nm 下，每分鐘的吸光值變化，藉此分析 GST 活性。

7. CAT 活性之測定

取 100 μ L assay buffer 並加入 30 μ L methanol 及 20 μ L 細胞上清液，再加入 20 μ L Hydrogen peroxide，振搖 20 mins，加入 30 μ L Potassium hydroxide 與 30 μ L purpald，振搖 10 mins，再加入 10 μ L Potassium periodate，反應 5 分鐘後，以 ELISA reader 測波長 540 nm 下的吸光值，藉此分析 CAT 活性。

8. SOD 活性之測定

取 200 μ L Radical detector 與 20 μ L 細胞上清液混合均勻後，加入 20 μ L Xanthine oxidase，以 ELISA reader 測 450 nm 下的吸光值，並以內插法即可分析出 SOD 之活性。

(二) 以四氯化碳誘導大鼠初代肝細胞氧化傷害之模式，評估 SE 對大鼠初代肝細胞之保護功能及抗氧化能力

1. 細胞存活率

為評估 SE 對已損傷肝細胞之影響，參考 Anon *et al.* (1991) 的方法，因此以 1.0、2.5 和 5.0 mg/mL SE 與 10 mM 四氯化碳共同處理大鼠初代肝細胞為研究模式。首先將組別分成負控制組同上述二、(一)(2) 方法處理，正控制組：添加 10 mM 四氯化碳，及實驗組：先添加 10 mM 四氯化碳，30 sec 後再添加 1.0、2.5 和 5.0 mg/mL SE，上述各組培養 60 min 後，依二、(一)(2) 方法分析細胞存活率。

2. 抗氧化活性分析

將上述各組細胞加入均質液，待溶破細胞膜後，以 5500 rpm、4 °C、15 mins，取上清液。依上述二、(一)(3)~(8) 方法，進行抗氧化酵素活性分析。

3. 利用流式細胞儀分析凋亡細胞的 DNA 含量 (DNA 單染法)

將正控制組與實驗組之細胞收集後，加入 1 mL 含有 2% FBS 之 PBS，使細胞均勻分布後，再加入 80% 酒精固定細胞，移至 -20 °C 冰箱凍存，隔夜後再以 20 µg/mL Propidium iodide (PI)、0.1% Triton X-100 以及 0.2 mg/mL RNaseA 進行核酸染色後，以流式細胞儀 (Flow cytometry) 偵測細胞中 PI 的螢光強度 (激發光波長為 488 nm；螢光為 615 nm)，可估計細胞內的 DNA 含量，並分析壞死細胞之比例。所得到的低 PI 螢光的細胞群，代表其為 DNA 受損的細胞，可做為細胞凋亡的初步指標；高 PI 螢光的細胞群，代表為正常 DNA 未受損的細胞。

4. 細胞螢光染色

參考 Sun *et al.* (2010) 之方法，將正控制組與實驗組之細胞，以 3.7% Formaldehyde solution，於室溫下固定細胞結構，15 mins 後移除固定液，再以 PBS 清洗細胞，加入 50 µL Cytonin (permeabilisation solution) 使細胞產生空洞，蓋上蓋玻片置放於室溫 15~30 mins。接著移除 Cytonin (permeabilisation solution)，以 DNase-free water 清

洗細胞，小心清洗玻片周圍，加入 50 µL Labeling reaction mix 蓋上蓋玻片，37 °C 培養 1 h，再以 PBS 清洗 2 次，小心清洗玻片周圍，加入 50 µL PI Working solution 避光置於室溫培養 20 mins，在螢光顯微鏡下觀察。

(三) 以四氯化碳誘導大鼠肝損傷與氧化傷害之動物模式，評估 SE 於大鼠體內之護肝功能及抗氧化能力

1. 實驗動物

由樂斯科生物科技公司購入週齡 4 週大之雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠，寄養於台灣海洋大學實驗動物中心，飼養於有吹塵式無菌籠架設備之動物房中，動物房內維持室溫控制在 22 ± 2 °C，相對濕度 50~60%，每日定時 12 h 循環光照與黑暗。飼養期間提供大鼠滅菌處理之墊料、自由攝食飼料與飲用蒸餾水，並確保實驗動物能在無病原菌之環境中健康生長。參照衛生署公告的健康食品之護肝功能評估方法 (2000)，將大鼠以亂數法分為負控制組、正控制組及實驗組，每組 6 隻大鼠。負控制組：灌食 Olive oil + 蒸餾水；正控制組 (肝損傷組)：灌食 20% CCl₄ / olive oil + 蒸餾水；實驗組：灌食 20% CCl₄ / olive oil + SE (80 及 160 mg/kg BW)。負控制組灌食 Olive oil (0.5 ml/rat)，正控制組及實驗組灌食 20% CCl₄ / olive oil (0.5 ml/rat)，每週兩次 (星期一及四)；並於星期二、三、五、六，在負控制組及正控制組以蒸餾水灌食，在實驗組則灌食予試驗樣品，共為期八週。

2. 動物犧牲及檢體採取

先以針筒抽取上述四組之大鼠的尾部血液備用，再以斷頸的方式犧牲，然後噴灑 70% 酒精消毒，剪開老鼠胸骨取出肝臟，將右葉肝臟取 1 公分見方置於盛有 10% 中性福馬林緩衝溶液中，且將剩餘肝臟置於盛有液態氮之桶子。血液用以測定 GOT 及 GPT 活性，肝臟用以測定 GSH、GPx、GRd、GST、CAT、SOD 等抗氧化酵素活性。

3. 抗氧化活性分析

取 1 g 肝臟組織加入 10 倍體積 (w/v) 之磷酸鉀緩衝溶液 (pH=7.0) 中，以均質機 (IKARW 20

DZM) 進行均質。將均質液於 6000 rpm、4 °C 下，離心10 mins，取上清液儲存於 -80 °C 備用，並依前述二、(一)(2) 抗氧化酵素活性方法分析。

4. GOT、GPT 活性之測定

將大鼠血液靜置於室溫下 10 mins 後，再以 10000 rpm 離心 10 mins，取上層血清 10 μ L 於 96-well 中，接著分別加入其 GOT 試劑組中 Master Mix 與 GPT 試劑組中 Reagent Mix 240 μ L 培養 5 mins 後，以 ELISA reader 測 340 nm 下的吸光值。

5. 肝臟組織切片

將肝臟浸於 10% 中性福馬林緩衝溶液固定後，依序將標本組織置入 70%、80%、90% 及 95% 酒精中，各脫水 1 h 後，以 xylene 清洗，再進行石蠟包埋，且置於 -20 °C 中，接著進行切片 (厚度約為 5 μ m)，放入烘箱內，使石蠟烘乾固定，最後再以蘇木青與伊紅染色 (Haematoxylin-Eosin stain, H & E stain)。使用倒立式顯微鏡，以放大倍率 200 倍觀察已染色好的玻片，並加以拍照。

結 果

一、半葉馬尾藻萃取物對大鼠初代肝細胞存活率與抗氧化能力評估

目前以體外實驗研究肝臟之生理功能，通常是以肝癌細胞株為研究對象。在 Kim *et al.* (2005) 等人研究中，發現到日本黑藻 (*Ecklonia stolonifera*) 酒精萃取物具有降低塔克寧 (tacrine) 對 HepG₂ 肝癌細胞株的毒性。但是肝癌細胞株畢竟與正常肝細胞代謝是有所不同的，因此本研究中以大鼠初代肝細胞為對象，其優點是研究結果不易受到有絲分裂的影響，使得細胞代謝的反應結果受到混淆，並且細胞特徵有其均一性、作為初期樣品篩選的評估方法，能減少動物的使用量，同時達到經濟性的考量。

Figure 1 為大鼠初代肝細胞經 1.0、2.5和5.0 mg/mL SE 處理 48 h 後之細胞存活率。在1.0、2.5 和 5.0 mg/mL SE 處理後，其細胞存活率分別為 104、112、120%，且在 5.0 mg/ml 濃度下能顯著提昇其細胞存活率。由上述結果得知，隨著 SE 濃

度的增加，正常大鼠初代肝細胞的存活率就隨之增加，呈劑量依賴效應。顯示SE對大鼠初代肝細胞並沒有任何毒性反應，且在 5.0 mg/mL 濃度下能促進大鼠初代肝細胞的生長。

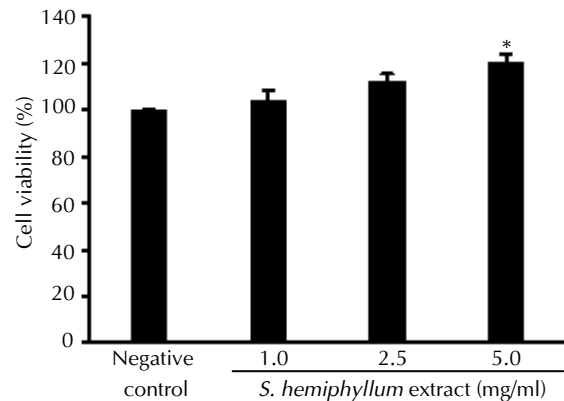


Fig. 1 Effect of various concentrations of *S. hemiphyllum* extract on cell viability of primary rat hepatocytes after 24 h incubation by MTT assay. *Compared with negative control at a significant level of $p < 0.05$.

SE 在提昇大鼠初代肝細胞抗氧化能力方面，如Table 1 所示，可以發現以 2.5 與 5.0 mg/mL SE處理時，GSH含量會由未處理的 $52.53 \pm 5.96 \mu\text{mol/mg protein}$ 分別上升至 $75.36 \pm 8.56 \mu\text{mol/mg protein}$ 與 $81.31 \pm 2.83 \mu\text{mol/mg protein}$ 。而 GST 也相同地從未處理的 $402.82 \pm 51.23 \text{ nmol/min/mg protein}$ 分別明顯上升至 $519.29 \pm 42.63 \text{ nmol/min/mg protein}$ 與 $527.65 \pm 38.25 \text{ nmol/min/mg protein}$ 的現象，顯示 SE 能夠提升大鼠初代肝細胞中的抗氧化與解毒能力。

二、半葉馬尾藻萃取物降低四氯化碳對大鼠初代肝細胞損傷與提升抗氧化酵素活性之能力

四氯化碳在肝臟中經 Cytochrome P450 酵素系統作用，會產生 Trichloromethyl radical ($\text{CCl}_3 \cdot$)。 $\text{CCl}_3 \cdot$ 和蛋白質結合會導致蛋白質合成受阻，並引起脂質分解代謝失調，使肝細胞內三酸甘油酯蓄積； $\text{CCl}_3 \cdot$ 會和氧分子一同作用產生 Trichloromethyl peroxy radical ($\text{CCl}_3\text{OO} \cdot$)，會攻擊脂質或脂肪酸，進而引發脂質過氧化發生，

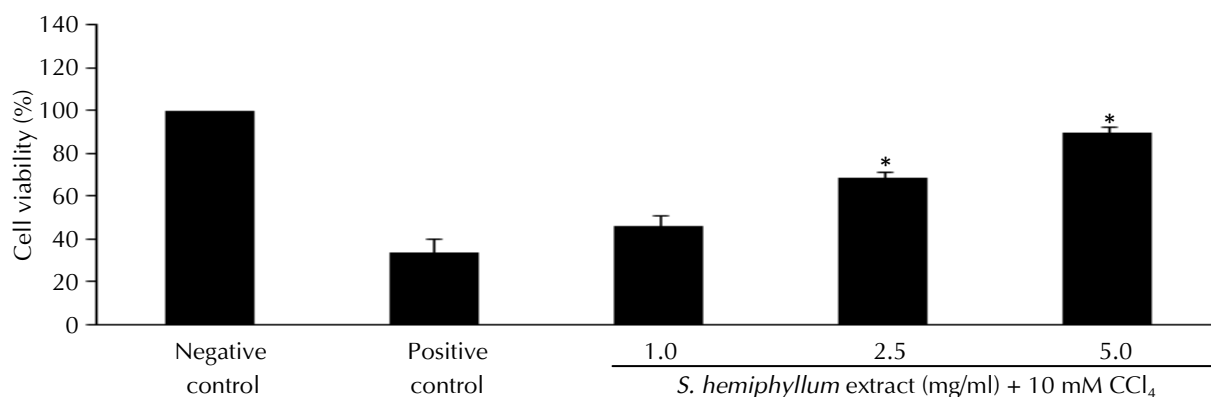


Fig. 2 Effect of various concentrations of *S. hemiphyllum* extract on cell viability in primary rat hepatocytes treated with CCl₄ for 60 min. *Compared with positive control at a significant level of $p < 0.05$.

Table 1 Effect of *S. hemiphyllum* extract on antioxidant enzymes activities in primary rat hepatocytes

	Negative control	<i>Sargassum</i> extract (mg/ml)		
		1.0	2.5	5.0
GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)	52.53 \pm 5.96	53.25 \pm 6.24	75.36 \pm 8.56*	81.31 \pm 2.83*
GPx (nmol/min/mg protein)	50.46 \pm 3.63	51.59 \pm 6.62	52.75 \pm 2.55	53.65 \pm 4.94
GRd (nmol/min/mg protein)	42.69 \pm 3.65	43.75 \pm 4.62	42.99 \pm 2.71	42.92 \pm 1.05
GST (nmol/min/mg protein)	402.82 \pm 51.23	423.54 \pm 62.57	519.29 \pm 42.63*	527.65 \pm 38.25*
CAT (nmol/min/mg protein)	26.45 \pm 3.54	25.51 \pm 2.89	27.63 \pm 4.10	32.12 \pm 4.03
SOD (U/mg protein)	0.53 \pm 0.01	0.56 \pm 0.02	0.66 \pm 0.16	0.65 \pm 0.11

Values are mean \pm S.D. for six rats in each group, and significance of the differences between mean values were determined by student t-test (t -test).

*Compared with positive control at a significant level of $p < 0.05$.

使得體內氧化壓力增加，造成肝細胞的損傷 (Halliwell and Gutteridge, 1998)。所以大部分護肝試驗，皆利用四氯化碳做為誘導肝損傷之傷害劑。

由 Fig. 2 得知，以四氯化碳傷害大鼠初代肝細胞時，其細胞存活率會下降至 33.25%。但當以 1.0、2.5 和 5.0 mg/mL SE 處理時，其細胞存活率會分別上升至 45.67、68.67 和 89.59%，由此可知 SE 能夠降低四氯化碳對大鼠初代肝細胞的傷害，增加大鼠初代肝細胞之存活率。

由先前研究知道匍枝馬尾藻萃取物其中所含的硫酸多醣成分也可改善小鼠肝臟粒線體的酵素活性，使檸檬酸循環中的超氧化物歧化酶、過氧化氫酶抗氧化酵素的活性增加，且過氧化脂質也有減少的現象，因此可減輕過氧化物對肝臟的損傷 (Raghavendran *et al.*, 2005)。而 Zhao *et al.* (2004) 研究中也發現，海帶中的硫酸多醣同樣具有因四氯化碳損傷後，而提升小鼠血液中 GPx 與

SOD 活性的能力。半葉馬尾藻提昇因四氯化碳誘導大鼠初代肝細胞損傷對抗氧化酵素之影響，由 Table 2 可以得知，以 1 mg/mL 馬尾藻萃取物處理氧化損傷後的大鼠初代肝細胞 60 mins 後，對於肝細胞內的 GSH 含量無顯著性之影響，當濃度增加到 2.5 mg/mL 以及 5.0 mg/mL 時，可以顯著性提升大鼠初代肝細胞中的 GSH。除此之外 SE 在 5.0 mg/mL 濃度下時也能顯著提升大鼠初代肝細胞中 GPx、GRd、GST、CAT 與 SOD 的活性。GSH 普遍存在於一般的動物細胞中，在肝細胞中的含量更高於其他組織細胞，在肝細胞中 GSH 扮演對藥物代謝、解毒、抗氧化以及維持細胞膜完整的重要角色。GSH 藉由 GPx 的催化來去除有機氫過氧化物 (Hydroperoxides) 或過氧化氫 (H₂O₂) 等活性氧而轉變為 GSSG，然後再經由 GRd 的作用將這些 GSSG 還原回 GSH，以進行肝細胞中自我調節之抗氧化保護作用。此外 GSH

Table 2 Effect of *S. hemiphyllum* extract on antioxidant enzymes activities of primary rat hepatocytes treated with 10 mM CCl₄

	Negative control	Positive control	<i>Sargassum</i> extract (mg/ml) +10 mM CCl ₄		
			1.0	2.5	5.0
GSH (μmol/mg protein)	52.53±5.96	41.32±2.41 [#]	40.11±2.16	63.10±3.21*	64.51±4.14*
GPx (nmol/min/mg protein)	50.46±3.63	30.22±3.28 [#]	35.21±5.23	50.74±6.35*	50.65±1.09*
GRd (nmol/min/mg protein)	42.69±3.65	50.32±1.84 [#]	51.11±3.21	72.65±3.01*	140.52±3.65*
GST (nmol/min/mg protein)	402.82±51.23	500.25±54.35 [#]	498.54±52.68	605.71±57.04*	607.22±58.19*
CAT (nmol/min/mg protein)	26.45±3.54	34.15±4.35 [#]	35.51±6.54	48.74±5.75	65.12±6.20*
SOD (U/mg protein)	0.53±0.01	0.17±0.03 [#]	0.16±0.04	0.19±0.06	0.22±0.09*

Values are mean ± S.D. for six rats in each group, and significance of the differences between mean values were determined by student t-test (*t*-test).

*Compared with positive control at a significant level of $p < 0.05$.

[#]Compared with negative control at a significant level of $p < 0.05$.

亦利用解毒酵素麩胱甘肽硫轉移酶 GST 來參與解毒作用，即經由GST的催化與各種外生異物 (Xenobiotics) 或內生性反應物結合後，在經過一連串解毒代謝的酵素作用代謝後，形成較不具毒性的物質排出體外，以達到解毒代謝目的(陳，1996)。此外，細胞在代謝過程所進行之生化反應及酵素催化作用中會產生自由基，而細胞內的某些代謝過程或因外來物質侵入會產生 Superoxide (O₂⁻·)、Hydrogen peroxide (H₂O₂)、Hydroxyl radical (OH·) 等具高度反應性的活性氧物質 (Reactive oxygen species, ROS) (Fanton *et al.*, 1982)。當產生的活性氧自由基與體內抗氧化酵素系統未達到平衡，體內抗氧化酵素系統無法將過多的活性氧物質有效清除時，會使細胞無法進行正常代謝，且造成細胞死亡進而讓組織受損 (Thomas, 1994)。因此推測SE能夠提升大鼠初代肝細胞的抗氧化系統，而達到降低四氯化碳損傷的功效。

利用流式細胞儀分析 SE 是否可以降低四氯化碳所造成的細胞凋亡。由 Fig. 3 (A) 可以發現，單純以四氯化碳處理時，其正常的細胞比例為 3.2%，而以1.0、2.5 和 5.0 mg/mL 馬尾藻萃取物處理後，其正常的細胞比例為 26.9、56.2與 60.3%。由以上流式細胞儀的結果知道，馬尾藻萃取物能夠降低大鼠初代肝細胞因四氯化碳損傷的

數目，使壞死 (Necrosis) 的細胞數目有明顯減少的現象。另以細胞螢光染色觀察大鼠初代肝細胞，因為螢光染劑 PI 會染上細胞內的 DNA，而壞死細胞的特徵為細胞膜會呈現不完整現象，而使螢光染劑 PI 容易進入細胞內染上 DNA，因此當 PI 螢光強度越強，其細胞壞死的情形越嚴重。所以由 Fig. 3 (B) 可以看見單純以四氯化碳處理大鼠初代肝細胞時，其螢光強度最強，而以1.0、2.5和5.0 mg/mL SE處理後，其螢光強度有越來越弱的趨勢。所以由此可知，SE 確實能夠藉由提升肝細胞的抗氧化酵素活性，以降低大鼠初代肝細胞因四氯化碳所造的損傷，進而降低大鼠初代肝細胞壞死的比例。

三、半葉馬尾藻萃取物對四氯化碳誘導大鼠肝損傷之護肝及抗氧化功效評估

GOT 和 GPT 這兩種酵素通常大量存在於肝細胞中，當肝細胞受到損傷時，GOT 和GPT 會由肝細胞內釋出，因此當血液中含量上升時，即表示肝細胞有受到傷害，因此 GOT 和 GPT 活性變化常作為評估肝細胞完整性的指標 (Velmurugan *et al.*, 2001)。由Table 3可以得知，單純只管餵大鼠四氯化碳時，其 GOT 與 GPT 活

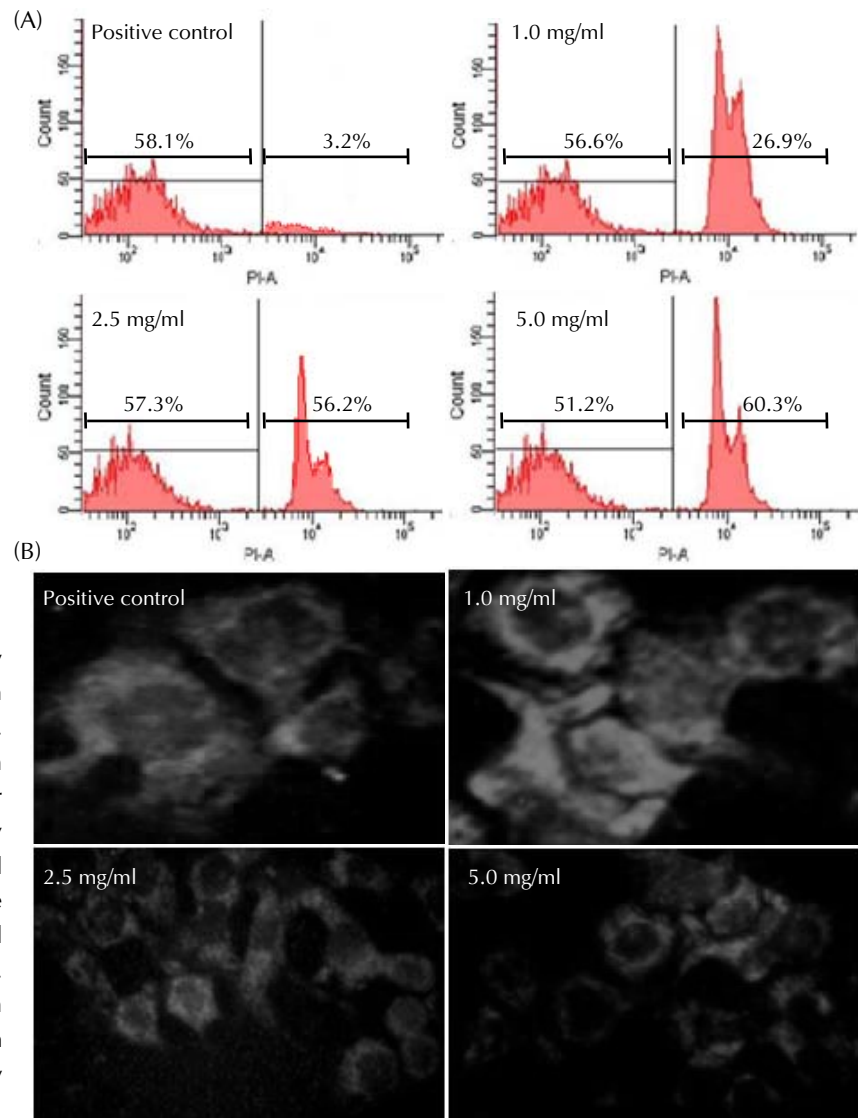


Fig. 3 (A) CCl_4 injured primary rat hepatocytes were treated with various concentrations of *S. hemiphyllum* extract for 60 min and analyzed necrotic cell for Propidium iodide assay by flow cytometry. (B) CCl_4 injured primary rat hepatocytes were treated with 10 mM CCl_4 and various concentrations of *S. hemiphyllum* extract for 60 min and analyzed for Propidium iodide fluorescence intensity by fluorescence microscopy.

性分別會上升至 927.84 ± 360.63 U/L與 604.42 ± 170.62 U/L,但當餵食大鼠 SE 後,80 mg/mL BW 的組別可以降低 GOT 活性至 520.65 ± 93.51 U/L,與 GPT 活性至 587.42 ± 137.54 U/L。而在餵食160 mg/kg BW的組別,則GOT可降低至 335.65 ± 178.24 U/L,GPT可降至 339.36 ± 182.82 U/L,與正控制組相比均有顯著差異。由前述大鼠初代肝細胞結果中,得知 GOT 與 GPT 活性降低時,代表細胞受損的程度降低,因此顯示:在動物活體模式,SE亦能減緩肝細胞因四氯化碳所造成的損傷。

此外,在肝臟中抗氧化酵素活性方面,其大鼠肝臟中受四氯化碳損傷後,其 GSH、GPx、GRd、GST、CAT 及 SOD 酵素活性均下降,而在給予大鼠160 mg/kg BWSE後,GSH、GPx、

GRd、GST 及 SOD 酵素活性皆具有顯著提升之作用,僅 CAT 活性則無明顯之提升作用 (Table 3)。由過去文獻指出褐藻萃取物皆具有良好的抗氧化特性,Lim *et al.* (2002) 研究中,裂葉馬尾藻 (*S. siliquastrum*) 的萃取物不僅具有清除DPPH自由基能力,也具有抑制紅血球溶血作用、脂質過氧化作用及清除過氧化自由基等能力。此外研究也顯示,亨氏馬尾藻 (*S. henslowianum*) 與裂葉馬尾藻 (*S. siliquastrum*) 之水萃物,具有改善大鼠經由四氯化碳所引起的肝損傷,且能夠明顯降低因肝損傷而昇高的 GOT 與 GPT (Wong *et al.*, 2000),推測馬尾藻屬萃取物皆具有良好的抗氧化與護肝能力。

Figure 4 為肝臟病理切片,負控制組為正常肝細胞型態,肝細胞完整,細胞核完整,細胞有明

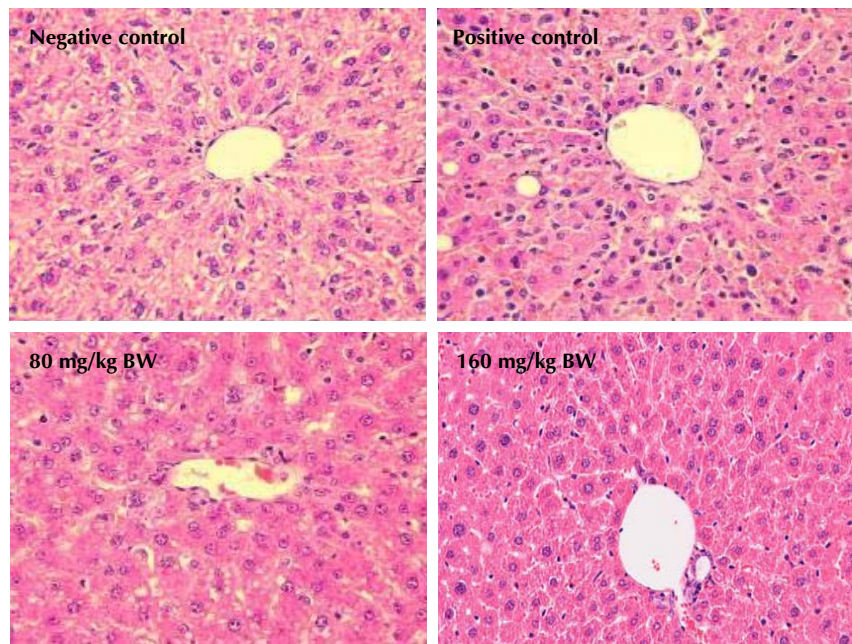


Fig. 4 The photomicrographs of liver section taken from CCl_4 -induced liver damage rats administered by gavaging *S. hemiphyllum* extract for 8 weeks.

Table 2 Effect of *S. hemiphyllum* extract on antioxidant enzymes activities of primary rat hepatocytes treated with 10 mM CCl_4

	Negative control	Positive control	<i>Sargassum</i> extract (mg/kg BW) + 20% CCl_4	
			80	160
GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)	3.21 \pm 0.52	1.52 \pm 0.32 [‡]	2.15 \pm 0.25*	2.51 \pm 0.18*
GPx (nmol/min/mg protein)	198.30 \pm 20.21	85.54 \pm 24.36 [‡]	115.21 \pm 9.51	121.25 \pm 15.02*
GRd (nmol/min/mg protein)	35.54 \pm 3.56	20.24 \pm 3.25 [‡]	24.58 \pm 4.91	25.44 \pm 4.36*
GST (nmol/min/mg protein)	643.25 \pm 102.14	212.98 \pm 41.22 [‡]	325.36 \pm 81.85	385.58 \pm 43.55*
CAT (nmol/min/mg protein)	45.63 \pm 8.23	14.69 \pm 1.36 [‡]	19.44 \pm 5.74	23.54 \pm 9.87
SOD (U/mg protein)	2.74 \pm 0.42	1.31 \pm 0.45 [‡]	2.33 \pm 0.38*	2.59 \pm 0.81*
GOT (U/L)	101.94 \pm 11.54	927.84 \pm 360.63 [‡]	520.65 \pm 93.51*	335.65 \pm 178.24*
GPT (U/L)	59.36 \pm 13.64	604.42 \pm 170.62 [‡]	587.42 \pm 137.54*	339.36 \pm 182.82*

Values are mean \pm S.D. for six rats in each group, and significance of the differences between mean values were determined by student t-test (t-test).

*Compared with positive control at a significant level of $p < 0.05$.

[‡]Compared with positive control vs. negative control at a significant level of $p < 0.05$.

顯邊界，且無纖維化現象產生。正控制組肝細胞表面凹凸不平，且可見到細胞質空泡化情形與發炎細胞浸潤現象 (如箭頭處)。而餵食 80 mg/kg BW 馬尾藻萃取物之組別肝細胞表面有輕度凹凸不平，可見到輕度之細胞質空泡化及發炎細胞浸潤現象 (如箭頭處)。而餵食 160 mg/kg BWSE 之肝表面有極輕度凹凸不平，僅少數細胞有淋巴球浸潤，且無細胞質空泡化現象發生。所以由肝臟

病理切片可得知：餵食 SE 可降低肝臟組織之細胞傷害情形，且隨著 SE 餵食劑量之提高，其肝損傷之恢復效果愈明顯。

結 論

本研究顯示在以 5.0 mg/mL SE 處理大鼠初代肝細胞 48 h 後，能使大鼠初代肝細胞存活率增

加，並使大鼠初代肝細胞內的抗氧化酵素活性顯著增加，進而提升大鼠初代肝細胞抗氧化與解毒代謝的能力。另一方面，SE 可降低以四氯化碳誘導大鼠初代肝細胞之氧化性損傷，能減緩四氯化碳引起之大鼠初代肝細胞死亡，並提高大鼠初代肝細胞之存活率與抗氧化酵素活性。於動物實驗方面，餵食大鼠 SE 可顯著降低肝臟損傷程度，以及提升因四氯化碳損傷下降之肝臟抗氧化酵素活性。由於四氯化碳會被代謝成自由基之型式並造成肝臟細胞之損傷，因此推測馬尾藻萃取物應是阻斷因四氯化碳形成的自由基對肝細胞的攻擊，以達到提升肝臟之抗氧化酵素活性與保護之效果，具有開發作為護肝新素材之潛力。

謝 辭

本研究承蒙國立台灣大學生農學院附設動物醫院檢驗室姜吉鴻醫師在血液學臨床診斷方面的協助指導，使試驗得以順利完成，謹此致謝。

參考文獻

- 行政院衛生署 (2000) 健康食品之護肝功能評估方法。衛署食字第0890003826號公告。
- 陳宏彬 (1996) 大蒜精油及其活性成分 vinylthiins 對大白鼠初代肝細胞解毒代謝、抗氧化系統與黃麴毒素 B1 誘發 DNA 傷害之影響。國立中興大學食品科學研究所 碩士論文。
- 陳嘉琳 (2004) 薑精油對肝癌細胞及正常細胞生理機能之影響。國立臺灣大學食品科技研究所 碩士論文。
- Anggadiredja, J., R. Andyani and H. Muawanah (1997) Antioxidant activity of *Sargassum polycystum* (Phaeophyta) and *Laurencia obtusa* (Rhodophyta) from Seribu Islands. *J. appl. Phycol.*, 9: 477-479.
- Anon, M. T., A. Ubeda and M. J. Alcaraz (1991) Protective effects of phenolic compounds on CCl₄-induced toxicity in isolated rat hepatocytes. *Experientia.*, 47: 195-199
- Bocanegra, A., J. Benedí and F. J. Sánchez-Muniz (2006) Differential effects of konbu and nori seaweed dietary supplementation on liver glutathione status in normo- and hypercholesterolaemic growing rats. *Br. J. Nutr.*, 95: 696-702.
- Cascales, C., E. H. Mangiapane and D. N. Brindley (1984) Oleic acid promotes the activation and translocation of phosphatidate phosphohydrolase from the cytosol to particulate fractions of isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.*, 219: 911-916.
- Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge (1998) Antioxidant defense. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford Univ. Press Inc., 105-245.
- Hwang, H. J., I. H. Kim and T. J. Nam (2006) Effect of a glycoprotein from *Hizikia fusiformis* on acetaminophen-induced liver injury. *Food Chem. Toxicol.*, 46: 3475-3481.
- Hwang, P. A., C. H. Wu, S. Y. Gau, S. Y. Chien, and D. F. Hwang (2010) Antioxidant and immune-stimulating activities of hot-water extract from seaweed *Sargassum hemiphyllum*. *J. Mar. Sci. Tech.*, 18: 41-46.
- Lim, S. N., P. C. K. Cheung, V. E. C. Ooi and P. O. Ang (2002) Evaluation of antioxidative activity of extracts from a brown seaweed, *Sargassum siliquastrum*. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 3862-3866.
- Kim, Y. C., R. B. An, N. Y. Yoon, T. J. Nam and J. S. Choi (2005) Hepatoprotective constituents of the edible brown alga *Ecklonia stolonifera* on tacrine-induced cytotoxicity in HepG₂ cells. *Arch. Pharm. Res.*, 28: 1376-1380.
- Nagai, T. and T. Yukimoto (2003) Preparation and functional properties of beverages made from sea algae. *Food Chem.*, 81: 327-332.
- Nardella, A., F. Chaubet, C. Boisson-Vidal, C. Blondin, P. Durand and J. Jozefonvicz (1996) Anticoagulant low molecular weight fucans produced by radical process and ion exchange chromatography of high molecular weight fucans extracted from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Carbohydr. Res.*, 289: 201-208.
- Park H. J., D. A. Dinatale, M. Y. Chung, Y. K. Park, J. Y. Lee, S. I. Koo, M. O'Connor, J. E. Manautou and R. S. Bruno (2010) Green tea extract attenuates hepatic steatosis by decreasing adipose lipogenesis and enhancing hepatic antioxidant defenses in ob/ob mice. *J. Nutr. Biochem.*
- Raghavendran, H. R., A. Sathivel and T. Devaki (2005) Effect of *Sargassum polycystum* (Phaeophyceae)-sulphated polysaccharide extract against acetaminophen-induced hyperlipidemia during toxic hepatitis in experimental rats. *Mol. Cell. Biochem.*, 276: 89-96.
- Raghavendran, H. R., A. Sathivel and T. Devaki (2005)

- Protective Effect of *Sargassum polycystum* (Brown Alga) against Acetaminophen-induced Lipid Peroxidation in Rats. *Phytother. Res.*, 19: 113-115.
- Sun, Q., T. Chen, X. Wang and X. Wei (2010) Taxol induces paraptosis independent of both protein synthesis and MAPK pathway. *J. Cell Physiol.*, 222: 421-432.
- Thomas, J. A. (1994) Oxidative stress, oxidant defense, and dietary constituents. *In Modern Nutrition in Health and Disease*, 8: 501-502.
- Velmurugan, B., V. Bhuvanewari, S. Balasenthil and S. Nagini (2001) Lycopene, an antioxidant carotenoid modulates glutathione-dependent hepatic biotransformation enzymes during experimental gastric carcinogenesis. *Nutri. Res.*, 21: 1117-1124.
- Wong, C. K., V. E. C. Ooi and P. O. Ang (2000) Protective effects of seaweeds against liver injury caused by carbon tetrachloride in rats. *Chemosphere.*, 41: 173-176.
- Zhao, X., H. X. Chang, J. L. Zhao, Y. P. Cai, H. Y. Liu and H. T. Qi (2004) Antioxidant and hepatoprotective activities of low molecular weight sulfated polysaccharide from *Laminaria japonica*. *J. Appl. Phycol.*, 16: 111-115.

Hepatoprotective and Antioxidative Effect of *Sargassum hemiphyllum* Extract Against Carbon Tetrachloride-induced Injury in Primary Rat Hepatocytes and in Rats

Shih-Yung Chien, Yu-Lan Hung, Pai-An Hwang* and Chwen-Herng Wu

Seafood Technology Division, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of various concentrations of *Sargassum hemiphyllum* extract on cell viability, antioxidation system in primary rat hepatocytes and hepatic protection against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatic damage. The results showed that the primary rat hepatocytes had the maximum cell viability at 5.0 mg/ml and was significantly higher than negative control ($p < 0.05$). In addition, the treatment of *S. hemiphyllum* extract could increase the content of intracellular glutathione (GSH) and the activity of glutathione-S-transferase (GST) in primary rat hepatocytes. The *S. hemiphyllum* extract exhibited significant protective activity against CCl₄-induced hepatotoxicity in primary rat hepatocytes, and restored the level of cell viability, GSH content and the activities of antioxidant enzymes such as GST, glutathione reductase (GRd), glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). Finally, the oral treatment with *S. hemiphyllum* extract for 8 consecutive weeks could cause significant reduction of both GOT and GPT levels after the co-administration of CCl₄ induced hepatic damage in rats. It was found that *S. hemiphyllum* extract could significantly decrease GOT and GPT. In antioxidant activity evaluation, administration of *S. hemiphyllum* extract also could significantly increase the GSH content and the activity of GPx, GRd, GST and SOD in liver. The histopathological evaluation of the liver also revealed that *S. hemiphyllum* extract reduced the incidence of liver lesions induced by CCl₄. Based on these result, we suggested that *S. hemiphyllum* extract exerted their hepatoprotective activities against CCl₄-induced injury by preserving the cellular antioxidative defense system.

Key words: *Sargassum hemiphyllum* extract, antioxidation, protect liver, primary rat hepatocytes

*Correspondence: 199, Hou-lh Rd., Keelung 202, Taiwan. TEL: (02) 2462-2101; Fax: (02) 2462-3306; E-mail: pahwang@mail.tfrin.gov.tw