

東海大學畜產與生物科技學系

Department of Animal Science and Biotechnology

Tunghai University

碩士論文  
Master Thesis

指導教授：謝長奇 博士  
Advisor: Chang-Chi Hsieh, Ph. D.

優酪乳降低硫代乙醯胺誘導小鼠肝纖維化  
Yoghurt dampened thioacetamide induced liver fibrosis in mice

研究生：陳彥文  
Graduate student: Yan-Wen Chen

中華民國一十年六月

June, 2011

## 致謝

感謝恩師謝長奇老師之殷切指導與黽勉，於在學間的悉心照顧，帶領我走過研究路途中的坎坎坷坷，在您的羽翼下成長茁壯，於此謹呈最深最虔摯的感謝，沒有您，就沒有此篇論文的誕生。

論文口試時，承蒙中國醫學大學林文川老師、中山醫學大學詹明修老師對本論文之撥冗審查，惠予寶貴意見與指正，促使本論文得以更臻完善，僅此敬致最誠摯之謝意。

受業期間亦蒙中興大學廖俊旺老師給予組織切片分析方面之指導與協助，及系所內諸位師長之關懷指導，睿與新知，受益恩情永銘於心。

感謝東海乳品加工廠給予東海優酪乳作為實驗材料，在此敬致由衷之謝語。

感謝實驗室夥伴，助理蔡依陵小姐、致芬學姊、宜綸學姊、漢儀學姊、文瑜學姊、同學佑軒、婕妤學妹、美君學妹、宜潔學妹、晉文學妹、秀芳學妹、新雅學妹、慧禎學妹、郁芳學妹、翊甄學妹、維容學妹、治暄學弟、偉仁學弟、炯呈學弟、景聰學弟、宇琦學弟，食科系同學靜菽，弘光科大同學睿成，您們陪伴了我兩年的研究生涯，總是適時伸出援手，實驗才得以順利進行，在此致上最深的謝意。

感謝中興大學學長蕭宏柏博士、晉東學長以及中國醫藥大學麗嬋學姐與助理陳怡姬小姐在實驗上之協助。

感謝同窗好友宏鑫、可蓉、儒芸、永璇、孟修、宜婷、士平，於研究所學習生涯的相互砥礪扶持與一同伴隨過的光陰歲月，使得人生旅途上增添許多繽紛色彩，然於此，心中縱有不捨之情，僅銘於心。

最後，感謝最摯愛的家人，您們給我的愛與鼓勵做為我的精神後盾，由於您們的支持和鼓勵，使我有鼓起勇氣持續踏步向前，使得學業得以順利完成，僅以這微小成果獻予諸位，並敬上感恩之意，謝謝您們！

## 目錄

壹、摘要	1
貳、前言	3
參、文獻回顧	4
一、肝臟之文獻探討	4
(一)、肝臟結構	4
(二)、肝臟的細胞組成與生理功能	4
(三)、肝纖維化之成因	7
(四)、硫代乙醯胺 (thioacetamide, TAA) 造型之肝纖維化動物模式	8
(五)、肝損傷與過氧化傷害之指標	10
二、優酪乳文獻探討	12
(一)、優酪乳之定義	13
(二)、發酵優酪乳的益生菌 (Probiotic)	13
(三)、優酪乳的生理功能	15
(四)、優酪乳與肝損傷的關係	16
肆、研究動機與目的	18
伍、材料與方法	19
一、藥品材料	19
(一)、藥品、試劑	19
(二)、設備、器材	19
二、實驗方法	21
(一)、動物飼養與試驗分組	21
(二)、肝纖維化造型模式	22
(三)、實驗動物樣本採集分析	22
(四)、組織 mRNA 分析	25
三、統計分析	27
(一)、單因子變異數分析 (One-way analysis of variance, One-Way ANOVA)	27
(二)、無母數分析 (Non-parametric statistics)	27
陸、結果	28

一、	優酪乳對肝損傷之保護作用-----	28
	(一)、肝損傷指標測定.....	28
	(二)、小鼠之體重、脾臟與肝臟重量.....	28
	(三)、肝臟之乾濕重比.....	29
	(四)、肝臟之總蛋白含量.....	29
	(五)、肝臟之羥基脯氨酸分析.....	29
	(六)、肝臟病理切片分析.....	29
	(七)、肝臟之半定量 PCR 分析 ( <i>Coll1a1</i> 和 <i>Coll2a3</i> ).....	31
二、	優酪乳對過氧化傷害的保護作用-----	31
	(一)、肝臟之穀胱苷肽分析.....	31
	(二)、肝臟之脂質過氧化分析.....	32
三、	硫代乙醯胺造型肝纖維化的可能途徑-----	32
	(一)、胸腺基質淋巴細胞生成素之免疫組織化學染色.....	32
	(二)、磷酸化 small mothers against decapentaplegic homolog 2/3 (p-Smad2/3)之免疫組織化學染色.....	32
	(三)、肝臟之半定量 PCR 分析 ( <i>Mat1a</i> 、 <i>Mat2a</i> 和 <i>Mmp13</i> ).....	32
柒、	討論-----	34
捌、	結論-----	39
玖、	參考文獻-----	40

## 表目錄

表一、優酪乳對硫代乙醯胺誘發肝纖維化 BALB/c 體重與器官重量的變化。	49
表二、優酪乳對硫代乙醯胺誘發肝纖維化 BALB/c 小鼠甲基紅與蘇木紫染色之病理評分(空泡性)。	50
表三、優酪乳對硫代乙醯胺誘發肝纖維化 BALB/c 小鼠甲基紅與蘇木紫染色之病理評分(細胞壞死)。	51
表四、優酪乳對硫代乙醯胺誘發肝纖維化 BALB/c 小鼠甲基紅與蘇木紫染色之病理評分(纖維化)。	52

## 圖目錄

圖一、優酪乳對硫代乙醯胺誘發肝纖維化 BALB/c 小鼠血清中麩丙酮酸轉胺酶的影響。	53
圖二、優酪乳對硫代乙醯胺誘發肝纖維化 BALB/c 小鼠血清中麩草醋酸轉胺酶的影響。	54
圖三、優酪乳對硫代乙醯胺誘發肝纖維化 BALB/c 小鼠肝臟乾溼重比的影響。	55
圖四、優酪乳對硫代乙醯胺誘發肝纖維化 BALB/c 小鼠肝臟總蛋白含量的影響。	56
圖五、優酪乳對硫代乙醯胺誘發肝纖維化 BALB/c 小鼠甲基紅與蘇木紫染色變化。	57
圖六、優酪乳對硫代乙醯胺誘發肝纖維化 BALB/c 小鼠肝臟羥基脯胺酸含量的影響。	58
圖七、優酪乳對硫代乙醯胺誘發肝纖維化 BALB/c 小鼠之膠原蛋白沉積之影響。	59

圖八、優酪乳對硫代乙醯胺誘發肝纖維化 BALB/c 小鼠肝臟纖維化百分比。	-----60
圖九、優酪乳對硫代乙醯胺誘發肝纖維化 BALB/c 小鼠肝臟穀胱苷肽含量的影響。	-----61
圖十、優酪乳對硫代乙醯胺誘發肝纖維化 BALB/c 小鼠肝臟過氧化脂質含量的影響。	-----62
圖十一、優酪乳對硫代乙醯胺誘發肝纖維化 BALB/c 小鼠 TSLP 染色之影響。	---63
圖十二、優酪乳對硫代乙醯胺誘發肝纖維化 BALB/c 小鼠 mRNA 表現。	-----64
圖十三、優酪乳對硫代乙醯胺誘發肝纖維化 BALB/c 小鼠 p-Smad2/3 染色之影響。	-----65

## 壹、 摘要

優酪乳為一種含有乳酸菌的發酵乳，具有增加鈣質的吸收、改善腸道菌相、免疫調節與抗過敏等機制，有文獻指出含益生菌與益生質之優酪乳具有抗肝纖維化之作用，但其相關抗病機制不明。本研究旨在探討東海大學優酪乳對硫代乙醯胺誘發BALB/c小鼠肝纖維化之保護機制，透過血清中麩丙酮酸轉胺酶與麩草醋酸轉胺酶的變化來判斷肝細胞受損程度；分析肝臟之總蛋白與羥基脯胺酸含量來評估肝纖維化的嚴重程度；測定肝臟中的過氧化脂質和穀胱甘肽用以分析清除硫代乙醯胺誘發之丙二醛的作用；利用半定量PCR分析肝臟之*Coll1a1*、*Col3a1*、*Mat1a*、*Mat2a*、*Mmp13*等調節纖維化之基因表現，另外，病理切片方面，利用蘇木紫和伊紅染色及天狼星紅染色來評估肝組織發炎與纖維化的程度，並計算纖維化之面積。結果顯示，東海大學優酪乳可顯著降低血清中麩丙酮酸轉胺酶、肝臟中羥基脯胺酸和總蛋白含量，表示其改善了肝細胞損傷和減少纖維化組織的沉積，其調節機制與膠原蛋白形成之相關基因的表達有關；此外，東海大學優酪乳可藉由顯著降低肝臟之丙二醛並提高穀胱甘肽之含量，減緩過氧化物造成之傷害。綜合上述，東海大學優酪乳可防止硫代乙醯胺所造成之過氧化傷害，並進一步降低肝纖維化。

關鍵字：肝纖維化、過氧化傷害、硫代乙醯胺、優酪乳

## ABSTRACT

Yoghurt is the fermented dairy foods containing lactic acid bacteria have been consumed worldwide. The reported nutritional and health benefits of yoghurt include: enhancement of bioavailability of calcium, improvement of microbiota in gastrointestinal tract, modulation of the immunological system and anti-allergic effect. Previous study indicated yoghurt including probiotics and prebiotics can reduce hepatic fibrosis. But the protected effects of hepatic injury are still not clear. The objective of this study was to investigate the effect of Tunghai yoghurt on the thioacetamide induced liver fibrosis in BALB/c mice. Serum alanine aminotransferase (sALT) and aspartate aminotransferase (sAST) were used to determinate hepatic injury. Analysis total protein and hydroxyproline (HP) of liver can determinate liver fibrosis status. Measurement the malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) to evaluate yoghurt reduced the thioacetamide induced liver peroxidation. Fibrosis genes expressions including *Coll1a1*, *Col3a1*, *Mat1a*, *Mat2a*, *Mmp13* were used to monitor the fibrosis progression. In the liver pathological study, use the haematoxylin & eosin stain and Sirius red stain to observed inflammation and fibrosis, and calculate the area of fibrosis. The results indicated the Tunghai yoghurt can significant dampened sALT, sAST, liver HP and total protein, improve that hepatocyte damage and accumulation of collagen, that might be modulated the fibrosis related genes expression. In addition, the yoghurt can significant eliminate that MDA and elevation GSH to reduce the damage from liver peroxidation. In conclusion, Tunghai yoghurt can dampen thioacetamide induced liver damage and prevent liver fibrosis in mice.

Key words: Liver fibrosis, Peroxidative damage, Thioacetamide, Yoghurt



## 貳、 前言

肝臟是人體最大的代謝器官，肝臟疾病在國內也是相當常見的疾病，根據衛生署統計，直至民國九十八年止，十大惡性腫瘤，肝癌排名第二位[衛生署統計系列(一)死因統計-歷年癌症死因統計，[http://www.doh.gov.tw/CHT2006/DM/DM2\\_2.aspx?now\\_fod\\_list\\_no=11663&class\\_no=440&level\\_no=5](http://www.doh.gov.tw/CHT2006/DM/DM2_2.aspx?now_fod_list_no=11663&class_no=440&level_no=5)，2011年6月]。許多慢性肝病的病人容易轉變為肝纖維化[Brenner, 2009]，最終會形成不可逆的肝硬化[Bridle *et al.*, 2009]。隨著醫學的進步，許多疾病已有較明確的治療方式，惟獨肝臟疾病的治療方式進展緩慢[Bridle *et al.*, 2009]。肝損傷的其中一個成因為脂質過氧化物，如丙二醛等所形成的氧化傷害，間接造成肝臟發炎，反覆不斷的發炎導致肝纖維化組織的沉積。優酪乳為一種益生菌 (probiotic)發酵製成之食品，當益生菌數量足夠時能促進人類的健康[Guarner *et al.*, 2005]。優酪乳的功效與使用的菌種息息相關，東海大學優酪乳含有(1) *Streptococcus thermophilus* (2) *Lactobacillus bulgaricus* (3) *Lactobacillus acidophilus* (4) *Bifidobacterium lactis* (5) *Enterococcus faecium* 等五種菌醃，許多研究指出這類乳酸菌具有抗發炎與清除自由基的能力[Ou *et al.*, 2006 ; Muriel, 2009 ; Terahara *et al.*, 2001]。因此，本論文希望透過硫代乙醯胺誘發小鼠肝臟形成過氧化傷害進而產生肝纖維化，在肝損傷形成的過程中，同時給予東海大學優酪乳，藉此探討優酪乳對硫代乙醯胺誘發之肝損傷與纖維化是否有減緩作用並探討其調控機制。

## 參、 文獻回顧

### 一、肝臟之文獻探討

#### (一)、肝臟結構

肝臟是人體僅次於皮膚的最大器官，重量超過一公斤，正常為紅棕色，是人體重要的臟器，在體內的位置位於腹腔的右邊，膽囊之前，隔膜之下，共有四個葉片[Parramon, 2006]。最大兩葉可分為左葉和右葉，右葉較左葉大，佔全肝百分之六十以上。肝臟血液供應非常豐富，總血容量相當於人體總量的百分之十四，成人每分鐘血流量可達 1500-2000 ml。肝的血管依進出方向可分為入肝血管和出肝血管。入肝血管包括肝動脈 (hepatic artery)和門靜脈 (portal vein)，為雙重血管供應。出肝血管為肝靜脈 (hepatic vein)。肝動脈來自腹腔，主要提供肝臟所需的氧氣，門靜脈來自消化道與脾臟，帶來經消化道吸收的物質，在肝臟進行代謝。肝臟是體內具有再生能力的器官，因此外科手術上可作為活體肝移植的來源。肝臟約有八萬個肝小葉 (liver lobule)，每個肝小葉由無數個肝細胞 (hepatocyte)組成。肝細胞為肝臟主要細胞，約占整個總細胞數的百分之八十，屬實質細胞，其於百分之二十則為庫氏細胞 (Kupffer cell)、星狀細胞 (stellate cell)等非實質細胞 [Eugene *et al.*, 2003]。

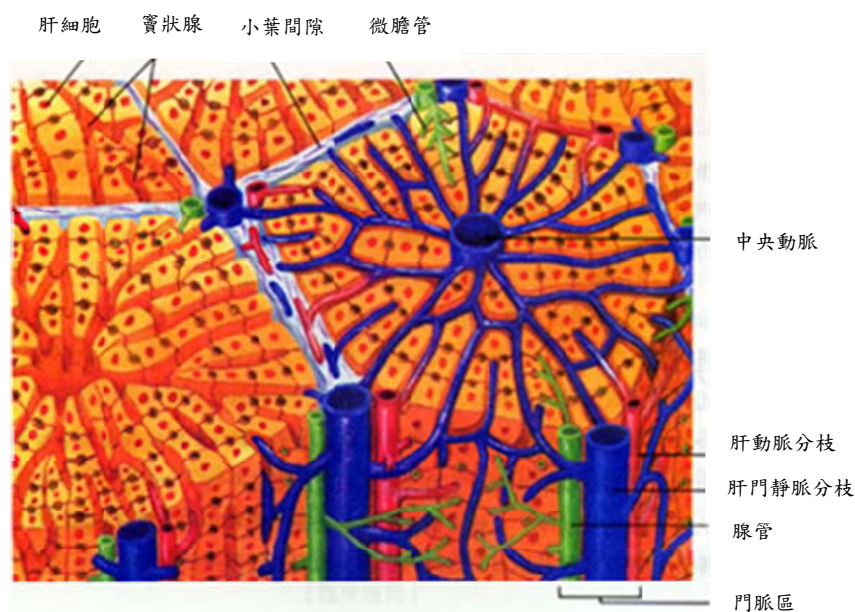
#### (二)、肝臟的細胞組成與生理功能

肝臟的細胞組成，可分成兩類，一為實質細胞 (parenchymal cell)，另一類則屬非實質細胞 (nonparenchymal cell)，實質細胞為肝細胞 (hepatocyte)，而非實質細胞總類繁多，如星狀細胞 (stellate cell)、庫氏細胞 (Kupffer cell)、竇細胞

(sinusoidal endothelium cell)和上皮細胞 (epithelial cell)等。

### 1. 肝細胞 (hepatocyte) ,

肝細胞約佔肝臟細胞組成的百分之八十，顯微鏡下觀察呈橢圓狀，許多的肝細胞聚集成肝小葉，肝臟約有八萬個肝小葉，如附圖一所示，肝小葉呈六角型結構，直徑約為 1 mm，肝細胞由中央靜脈向四周以放射狀排列，每個肝小葉中間有中央靜脈分枝穿過，肝小葉可視為肝臟的代謝工廠，負責清除身體吸收的有毒物質，維持身體健康和體內代謝平衡，代謝的功能尚包括分泌到血清中的白蛋白、分泌酵素以清除有毒物質、產生膽酸幫助消化作用和控制體內代謝作用，具有調控膽固醇、肝醣和胺基酸的合成等[Kenneth and Grompe, 2008]。



附圖一、肝臟之肝小葉結構 (李文森，1991)

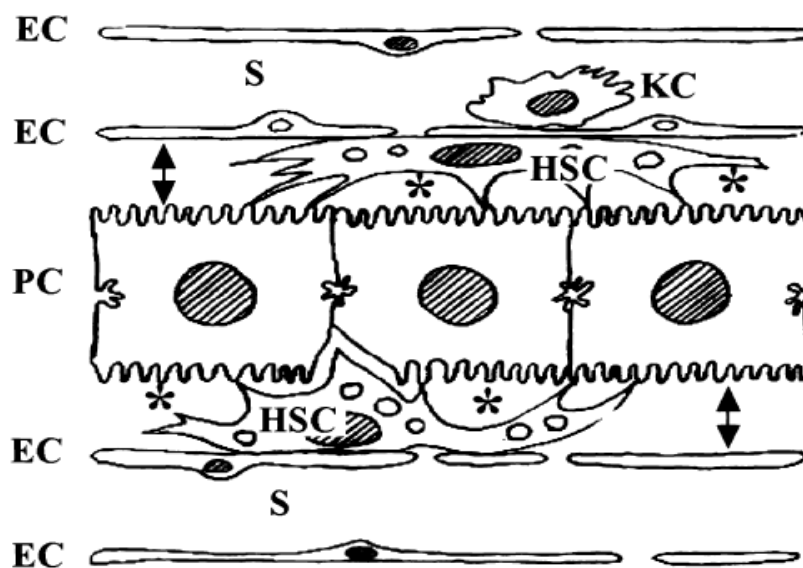
### 2. 庫氏細胞 (Kupffer cell)

庫氏細胞為肝臟特化的巨噬細胞 (macrophages)[Wu *et al.*, 2010]，主要作用為清除細菌、毒素分子 (反式脂肪酸、致癌物質等)、老化或死亡之血球等。當肝臟受到刺激，如脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS)等內毒素 (endotoxin)，便會活化庫氏細胞。活化的庫氏細胞會釋放如轉型生長因子 $\beta$  (transforming growth factor

beta, TGF- $\beta$ )、腫瘤壞死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor-alpha, TNF- $\alpha$ )、干擾素  $\gamma$  (interferon-gamma, IFN- $\gamma$ )和血小板衍生生長因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)等趨化因子 (chemokines)和細胞激素 (cytokines)，進而活化更多的細胞，產生發炎反應[Holt *et al.*, 2008 ; Seki *et al.*, 2007]，因此，如何有效降低庫氏細胞活化，在肝損傷的治療上一直是重要的研究方向。

### 3. 肝臟星狀細胞 (hepatic stellate cell, HSC)

星狀細胞屬非實質細胞，也被稱為維生素 A 貯存細胞，脂肪細胞，間質細胞，脂肪存儲細胞，Ito 細胞，如附圖二所示，位於肝小葉 (liver lobule)中的實質細胞和肝竇內皮細胞 (liver sinusoidal endothelial cell)間的迪氏腔 (Disse space)內，以脂肪油滴的形式儲存了體內百分之八十的維生素 A，對體內維生素 A 的平衡扮演了很重要的角色[Senoo *et al.*, 2007; Brenner, 2009]。當肝臟受損時，星狀細胞也會分泌胞外基質 (extracellular matrix, ECM)和間質金屬蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP)來修補破損的組織和細胞，此外，星狀細胞和竇狀腔內管 (sinusoidal lumen)的收縮與擴張有關[Sato *et al.*, 2003]。



附圖2、肝臟星狀細胞[Sato *et al.*, 2003]。EC：內皮細胞 (endothelial cells)；HSC：肝臟星狀細胞 (hepatic stellate cells)；KC：庫氏細胞 (Kupffer cells)；PC：實質細胞 (parenchymal cells)；S：竇狀隙 (sinusoids)。

### (三)、肝纖維化之成因

肝臟為體內解毒的器官，日常生活習慣如飲食、睡眠和運動皆會影響到肝臟的代謝，持續的刺激會使肝臟受到損傷。肝纖維化其實是肝臟一種傷口癒合 (wound-healing) 的自我保護機制，可視為傷口復原過程中所形成的「珈」，藉以保護並修復組織[Wynn, 2007]，然而，持續的刺激，如飲酒、藥物、病毒和熬夜等會使肝纖維化持續進行，這些 collagen alpha1 type I 和 collagen alpha1 type III 形成的纖維蛋白會包覆肝小葉[Bruck *et al.*, 2001]，持續的纖維化會轉變成肝硬化 (hepatic cirrhosis)，乃至肝壞死 (hepatic necrosis)。

內毒素或過氧化物等皆會導致肝臟庫氏細胞的活化[Brenner, 2009]，活化的庫氏細胞會釋放出血小板衍生生長因子、腫瘤壞死因子  $\alpha$ 、轉型生長因子  $\beta 1$  和第六型介白素 (interleukin-6, IL-6) 等發炎物質進一步的活化星狀細胞，進而產生纖維化的胞外基質[Holt *et al.*, 2008]，星狀細胞在活化的過程中，主要可區分成二個狀態，分別為靜止態 (quiescent) 與活化態 (activated)，或稱為轉分化態[Sato *et al.*, 2003]。

#### 1. 靜止態

在正常的肝臟中，星狀細胞皆處於靜止狀態，負責維持胞外基質，胞外基質的主成份為膠原蛋白 (collagen)、彈力蛋白 (elastin) 等，負責維持細胞的型態和組織間的結構。此時期的星狀細胞的特色為細胞質含有視黃酯脂滴，表示尚未活化。

#### 2. 活化態

在活化態中，星狀細胞會逐漸釋出油滴，並開始大量增生，轉化為類似纖維母細胞的形態，活化狀態的星狀細胞可自行分泌細胞激素，如轉化生長因子  $\beta$ 、血小板衍生生長因子、內皮素 (endothelin, ET) 等，誘使庫氏細胞持續分泌腫瘤壞死因子  $\alpha$ 、轉化生長因子  $\beta$ 、血小板衍生生長因子等細胞激素，藉此活化更多

的星狀細胞，如此將呈現一個循環狀態，導致肝臟一直持續發炎[Sato *et al.*, 2003]。

星狀細胞的活化伴隨著表現型態和基因表現的改變，活化的星狀細胞會從原本的儲脂細胞轉變成纖維母細胞，胞體增大、胞突伸展並表現出 $\alpha$ -平滑肌動蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)，最終將導致細胞激素表現能力的提升，加速胞外基質的累積。此外，星狀細胞分泌的間質金屬蛋白酵素和組織金屬蛋白抑制酵素 (tissue inhibitors of metalloproteinase, TIMP)會影響胞外基質的重塑[Maier and McGuire, 1990; Nakatsukasa *et al.*, 1990; Iredale *et al.*, 1995]，因此，這類酵素分泌的情形也可做為纖維化狀態判斷的依據。

#### (四)、硫代乙醯胺 (thioacetamide, TAA)造型之肝纖維化動物模式

肝纖維化之實驗動物模式多以鼠類為主要之實驗動物，誘發實驗動物產生肝纖維化的方法可分為物理性和化學性兩類，目前常見的物理性法，包括慢性膽管結紮 (chronic bile duct ligation, CBDL)、部分門靜脈結紮 (partial portal vein ligation, PVL)等，而化學性法則以四氯化碳誘發肝纖維化 ( $\text{CCl}_4$  induced liver fibrosis)和硫代乙醯胺誘發肝纖維化 (thioacetamide induced liver fibrosis)等方法較為常見。在本研究中，考量到實驗動物為小鼠，進行手術不易，且實驗設計所需造型之肝損傷為慢性肝纖維化，硫代乙醯胺較容易控制造型模式，且其所造成之損傷具肝臟特異性，在肝臟病理變化上與人類之肝損傷類似 (纖維化物質圍繞著肝小葉纏繞)[Hung *et al.*, 2005]，因此選用硫代乙醯胺誘發肝纖維化動物模式進行實驗。

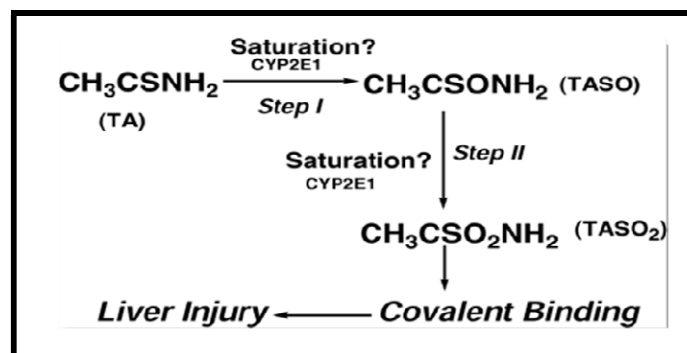
硫代乙醯胺為無色或白色結晶，其分子式為  $\text{C}_2\text{H}_5\text{NS}$ ，分子量為 74.14，有硫醇臭，微吸潮，熔點為  $114^\circ\text{C}$ ，在常溫水中溶解度為 163 g/L。溶液在室溫或  $50\sim 60^\circ\text{C}$  間相當穩定，但當水溶液中有氫離子時，會迅速的產生硫化氫而分解。傳統上用

來作為催化劑、穩定劑，照相藥劑、染色助劑、硫化劑、橡膠助劑和醫療原料等，故於日常生活中有機會接觸硫代乙醯胺而產生毒害。

硫代乙醯胺可造型為急性或慢性肝損傷[Hung *et al.*, 2005]，短時間內大量投藥產生的急毒性會導致小葉中心壞死和腎臟毒性。而慢性給予硫代乙醯胺會使膽管增生並使肝臟硬化，在病理上類似由病毒引起之肝炎[Karantonis *et al.*, 2010]。

硫代乙醯胺含有硫基團，在動物體內經混和功能氧化酶系統 (mixed function oxidase system) 代謝後會產生大量的乙醯胺酚 (acetamide) 和 TAA-S-oxide [Chieli and Malvaldi, 1984]，此兩化合物存在的時間較短，之後會迅速的轉變成 TAA-S、S-dioxide 等，這些不穩定的代謝物會利用共價鍵，結合到肝細胞的細胞膜等大分子上，造成脂質過氧化，這是目前被認為最有可能的肝損傷途徑 [Low *et al.*, 2004; Chilakapati *et al.*, 2005]。

當硫代乙醯胺進入到生物體內進行轉化，轉化步驟如附圖三，主要透過兩種酵素進行，分別為 flavin-containing monooxygenase (FMO) [Lee *et al.*, 2003] 和細胞色素 (cytochrome P450, CYP) [Lee *et al.*, 2003]，前述分子是轉化、催化氧分子過氧化的酵素，進一步使二氧化碳轉變成超氧陰離子 (superoxide anion,  $O_2^-$ ) [Low *et al.*, 2004; Ekstrom and Ingelman-Sundberg, 1989]。此外，硫代乙醯胺會透過微粒體 (microsomal) 中的細胞色素 CYP2E1，來產生生物活性，轉變成氧化硫化物之後再更進一步轉變成 TAA-S 和 S-dioxide [Chilakapati *et al.*, 2005 ; Sanz *et al.*, 2002 ; So *et al.*, 2002]。



附圖三、硫代乙醯胺在體內的轉化途徑[Chieli and Malvaldi, 1984]。

## (五)、肝損傷與過氧化傷害之指標

當肝細胞受損時，儲存於細胞內的酵素會被釋放到血清中，如麩丙酮酸轉胺酶 (alanine aminotransferase, ALT)、麩草醋酸轉胺酶 (aspartate aminotransferase, AST)等，因此，測定這些酵素或相關基因表現的多寡可作為判斷肝損傷和纖維化情況的依據，本研究所使用之標的如下：

### 1. 麩丙酮酸轉胺酶 (alanine aminotransferase, ALT)

主要存於肝細胞內之酵素，進行胺基酸代謝產生氨的轉化作用。血清中正常值一般介於 30~40 U/L。當肝損傷形成時，肝細胞破裂而造成 ALT 釋出於血液中，使得血液中的 ALT 上升。此酵素具有肝專一性，幾乎只存在於肝細胞內，因此可做為檢測肝損傷的主要依據。

### 2. 麩草醋酸轉胺酶 (aspartate aminotransferase, AST)

為一種主要存於肝臟、心臟、腎臟、肌肉、和腦的酵素，其作用與 ALT 相同，進行胺基酸代謝產生氨的轉化作用。正常值介於 40~50 U/L，當這些器官受損時即可於血液中測得高量的 AST，AST 並不具肝專一性，因此 AST 數值可作為肝損傷的輔助診斷依據。

### 3. 羥基脯胺酸 (hydroxyproline, HP)

羥基脯胺酸是膠原蛋白合成中特殊的胺基酸，它是透過 4-hydroxylases 催化脯氨酸 (proline)產生羥基化作用而產生。HP 和 proline 是維持膠原蛋白結構穩定性的重要蛋白質[Cincik *et al.*, 2011]。不僅膠原蛋白內含有 HP，在彈力蛋白中也有 HP 的存在，而這兩種蛋白質皆為肝纖維化過程中累積的細胞外基質之主要



成分。因此，HP 可以用來判斷膠原蛋白的含量，以此作為纖維化的指標[DiMatteo and Reasor, 1997]。

#### 4. 脂質過氧化物 (lipid Peroxiden, LPO)

過氧化物會造成氧化損傷，尤其是形成脂肪過氧化，細胞膜上的磷脂質會受到過氧化物上未配對電子鍵的影響產生變性，最終形成丙二醛 (malondialdehyde, MDA)和 4-hydroxynonenal 等醛類產物，造成細胞的破壞[Halliwell, 2000]；TAA 誘發的肝損傷所形成的過氧化物會使肝細胞的脂質過氧化，進而造成肝損傷，因此測定肝臟的 MDA 可判斷肝臟受過氧化傷害的程度，脂質的過氧化目前也已證實為心血管疾病的來源。

#### 5. 穀胱甘肽 (glutathione, GSH)

穀胱甘肽擁有豐富的非蛋白巰基，由穀氨酸 (glutamic acid)、半胱氨酸 (cysteine)、甘氨酸 (glycine)等三個胺基酸所組成，參與體內多項重要的細胞過程，如蛋白質和 DNA 的合成與胺基酸的轉運。許多酵素的反應都會與穀胱甘肽共同作用，包含脫氫、解毒、抗氧化作用和前列腺素的合成。肝細胞含有大量的穀胱甘肽，用來保護細胞免於過氧化傷害。受到內毒素或過氧化傷害而造成肝細胞損傷時會造成穀胱甘肽含量的改變，這將會嚴重的影響肝臟的抗氧化與解毒能力[Harbrecht *et al.*, 1997]。

#### 6. 轉型生長因子 $\beta 1$ (Transforming growth factor-beta, TGF- $\beta 1$ )

TGF- $\beta 1$  在免疫學上的角色為一個抗發炎的因子，可以抑制第一型 T 輔助細胞 (T helper one, TH1)和第二型 T 輔助細胞 (T helper two, TH2)細胞的分化，在 TGF- $\beta 1$  基因剔除鼠上會出現強烈的免疫反應[Veldhoen and Stockinger, 2006]。一般認為，當肝臟受到刺激而產生發炎反應時，活化的庫氏細胞會釋出 TGF- $\beta 1$  來

影響星狀細胞的活化狀態，使星狀細胞分泌胞外基質而導致纖維化。降低 TGF- $\beta$ 1 基因的表現量可間接的減緩纖維化的發生。

## 7. 膠原蛋白 (collagen)

當肝臟受到損傷，活化的星狀細胞所產生的胞外基質主成分為膠原蛋白，其中又以第一型和第三型膠原蛋白 (collagen, type I, alpha 1, Col1a1 和 collagen, type III, alpha1, Col3a1) 為主，分別占組成分的 88.2% 和 10.4% [Senoo, 2004]，因此測定膠原蛋白第一型和第三型基因的表現量可代表纖維化的程度。

## 8. 甲硫胺酸腺苷基轉移酶 (methionine adenosyltransferase, MAT)

甲硫胺酸腺苷基轉移酶在體內的兩種特化態分別為 methionine adenosyltransferase I, alpha (Mat1a) 和 methionine adenosyltransferase II, alpha (Mat2a)，在胎兒時期，Mat2a 扮演了組織再生的角色 [Rodríguez *et al.*, 2007]，在此時期表現量高，當組織成熟時，Mat1a 則取代了 Mat2a 的角色維持細胞的正常作用。因此在正常的肝臟中 Mat1a 會大量表現，若肝細胞受損，Mat2a 則出現取代 Mat1a，開始進行細胞分化和組織修復的工作，因此在受損的肝臟中可發現大量的 Mat2a 表現，兩者基因的調節機制與 TNF- $\alpha$ 、IL-6 等細胞激素的刺激有關 [Mato *et al.*, 2010]。

## 9. 間質金屬蛋白酶 13 (matrix metalloproteinase 13)

間質金屬蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 屬於蛋白水解酵素的家族，與胞外基質的重組有著重要的關聯，生物體即是透過間質金屬蛋白酶來調節胞外基質所產生的膠原蛋白，在人類是由 Mmp-1 來調節，而在小鼠則是透過 Mmp-13 調節，此種調節機制受 TGF- $\beta$ 1 途徑調節 [Lechuga *et al.*, 2004]。

## 二、優酪乳文獻探討

### (一)、優酪乳之定義

發酵乳或優酪乳的使用已經有很長的歷史。對優酪乳的定義最初是由歐盟執行委員會 (European Commission, EC)所提出，用來規範所有市場所生產的發酵乳、優酪乳和相關乳製發酵產品 (AGRI/38 743/2003rev3)[Guarner *et al.*, 2005]。

此條例中說明優酪乳是一種使用 *Streptococcus thermophilus*、*Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus*等菌醃發酵牛奶後製造而成之產品。因此優酪乳產品必須含此二類菌醃才可稱其為優酪乳。在這項法規中，優酪乳類產品清楚的區分了單純的優酪乳 (例如添加*L. bulgaricus*來發酵牛奶)和優酪乳中額外添加益生菌 (當不屬於上列生產所用之菌種額外添加到yoghurt中)的產品。並且在最後的附註中還說明了添加的“probiotic bacteria”必須是已證實對人類健康有幫助之菌種 [Guarner *et al.*, 2005]。

### (二)、發酵優酪乳的益生菌 (Probiotic)

根據世界衛生組織 (World Health Organization, WHO)及聯合國糧食與衛生組織 (Food and Agriculture Organization, FAO)之定義，益生菌為活的微生物，在適當的攝取下能促進人類健康。除了對人體無害外，上需擁有以下特性：(1)基因穩定性，部分益生菌帶有抗藥性之基因，因此必須確認菌株基因穩定性高，以避免因基因轉移而導致致病菌產生抗藥性；(2)需對宿主體內之嚴苛環境具耐受性，如胃酸、膽鹽等；(3)能與腸道之上皮細胞共存，以利其生長；(4)能成為體內的優勢菌種，抑制致腐及致病菌的生長[Tuomola *et al.*, 2001]。

從腸道中分離出之益生菌主要以能利用碳水化合物進行發酵產生乳酸之乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)為主。在西方國家，利用乳酸菌將牛奶發酵成優酪

乳，做為日常飲食，已流行了一百多年[Ou *et al.*, 2006]。本研究所使用之優酪乳，由五種益生菌混合發酵製成，包括(1) *Streptococcus thermophilus* (2) *Lactobacillus bulgaricus* (3) *Lactobacillus acidophilus* (4) *Bifidobacterium lactis* (5) *Enterococcus faecium*。

### 1. *Streptococcus thermophilus*

嗜熱乳鏈球菌為格蘭氏陽性菌 (Gram-positive)，為一種厭氧鏈球菌，在顯微鏡下觀察呈現連續不斷的短鏈狀。為優酪乳必須添加的菌種之一。經研究證實能透過消耗  $H_2O_2$  達到抗氧化功效[Ou *et al.*, 2006]，能減緩脂質過氧化的發生，此外，有學者指出，嗜熱乳鏈球菌對鐵過量小鼠 (iron-overloaded mice) 產生過氧化傷害形成的結腸黏膜損傷具有保護作用[Ito *et al.*, 2008]。

### 2. *Lactobacillus bulgaricus*

保加利亞乳酸桿菌為格蘭氏陽性厭氧桿菌，顯微鏡下觀察呈現短桿狀，為優酪乳必須添加的菌種之一，普遍為大眾所使用，菌名源自於西班牙語中的 "bacilos bulgaros"，在體內必須維持一定的數量，研究顯示其與腸道發炎和早產兒的壞死性小腸炎(necrotizing enterocolitis, NEC)有關[Hunter *et al.*, 2009]，此外，經研究證實能透過消耗  $H_2O_2$  達到抗氧化功效[Ou *et al.*, 2006]。

### 3. *Lactobacillus acidophilus*

嗜酸乳桿菌為格蘭氏陽性厭氧桿菌，需在酸性環境下生存，為最常用的益生菌之一，顯微鏡下觀察呈現短桿狀，細胞實驗中證實其有免疫調節的功效，能減緩過敏的發生[Vissers *et al.*, 2010]，另有學者指出在比目魚的飼料中添加 *lactobacillus acidophilus* 能增強非特異性免疫反應 (non-specific immune responses)，減少疾病的感染[Harikrishnan *et al.*, 2011]。

#### 4. *Bifidobacterium lactis*

比菲德氏菌為格蘭氏陽性厭氧桿菌，顯微鏡下觀察菌體呈Y字型，亦稱為比菲德氏雙歧桿菌，為比菲德氏菌屬中最耐胃酸及膽鹽的乳酸菌。比菲德氏菌發酵後能產生乳酸和醋酸，能降低腸道中的pH值並減緩害菌的生長，在抗生素治療後能維持腸道菌相，幫助宿主生成維生素B [Narayan *et al.*, 2010]，並能夠促進宿主的免疫調節[Li *et al.*, 2011]。

#### 5. *Enterococcus faecium*

腸球菌為格蘭氏陽性厭氧鏈球菌，在顯微鏡下觀察，一般為類似卵型的球面體，兩兩成對或連續的短鏈狀。通常能在人類或動物的腸道內發現，能夠調節體內腹瀉的狀況，當其數量大量減少時通常伴隨著腸道發炎及腹瀉的出現[Narayan *et al.*, 2010]，有研究指出餵飼西門塔爾牛(Simmental calves)含有 *Enterococcus faecium* 的乳果糖後能產生免疫調節的功效[Fleige *et al.*, 2008]。

### (三)、優酪乳的生理功能

飲用優酪乳的最終的目的是為了利用其中的益生菌來管理腸道內的微生物，進而達到改善人類體質的功能[Kolida *et al.*, 2002]。Blaut等人於2002年時從人類的糞便中挑選出500種不同的微生物，其中發現***bifidobacteria***是保持人類健康最主要的菌群，而此種菌正好是優酪乳內可添加的益生菌[Blaut *et al.*, 2002]。目前長期飲用優酪乳已經證實對人體有益的功效如下[Blaut *et al.*, 2002]：

1. 保護腸道，減少格蘭氏陰性菌的生長，促進格蘭氏陽性菌的增生。
2. 當人體攝取碳水化合物後，優酪乳內所含的益生菌會將之發酵後形成乳酸，可降低腸道的pH值。
3. 抑制致腐與致病的細菌。
4. 生產一些人體所必需的維生素。

5. 活化腸道的功能、幫助消化與吸收。
6. 抗過敏。
7. 調節過度的免疫反應。
8. 降低脂肪的形成。
9. 抗氧化。

#### (四)、優酪乳與肝損傷之間的關係

在生物體內，氧化反應都是不可或缺的，但因外力刺激而造成的過度氧化反應，如飲酒、有毒物質和病毒感染等，會對生物分子造成損傷[Mikelsaar and Zilmer, 2009]。在人體內，過度氧化反應形成的過氧化陰離子，造成氧化傷害攻擊體內細胞，產生過氧化脂質，進而使細胞膜受到損傷，是許多疾病的成因[Blau *et al.*, 2000]，諸如過氧化傷害攻擊肝細胞，形成肝纖維化、攻擊腸內皮細胞，造成腸道局部性出血等。因此，如何防止過氧化傷害，在現今討論的健康議題中占有很重要的地位。體內自有一套抗氧化與修補損傷的系統，如生成維生素 C 和 E (Vitamins C and E)、超氧化物歧化酶 (superoxidase dismutase, SOD)、穀胱甘肽和鐵蛋白 (Ferritin)等[Whaley-Connell *et al.*, 2011]，但隨著近年來食物加工過程的多樣化，此套系統已不足以清除日漸增加的刺激而形成的過氧化物[Simic, 1998]。除了活化體內抗氧化酵素系統來清除氧化自由基外，經由攝取抗氧化物，亦可增強人體的抗氧化能力。優酪乳在西方國家的生活飲食中已流行了一百多年，長久以來，許多研究者的實驗都証實了將牛奶發酵成優酪乳的乳酸菌，具有抗氧化的功效[Ahotupa *et al.*, 1996 ; Kaizu *et al.*, 1993 ; Korpela *et al.*, 1997 ; Lin and Yan, 1999 ]，Ahotupa 等人指出 *Lactobillus* 具有抗氧化的功效，Kaizu 等人指出比菲德氏菌能增加維生素 E 缺乏的大鼠之抗氧化能力，Korpela 等人指出 *Lactobillus* 在大鼠心肌內皮細胞培養中有抗氧化的功效，Lin 和 Yan 等人利用十九株乳酸菌進行抗氧化的研究，發現所有菌株均或多或少具久清除過氧化氫的能

力，而在這類研究中，Kaizu 等人首先證實了 *Lactobacillus sp.* 在細胞內具有抗氧化的活性[Kaizu *et al.*, 1993]。

活性氧化物 (reactive oxygen species, ROS)和氧化壓力 (oxidative stress)可引起肝損傷，進一步誘使肝臟星狀細胞增生並合成膠原蛋白構成的胞外基質，經累積膠原蛋白後最終形成纖維化組織[Galli *et al.*, 2005]。目前研究肝臟纖維化的動物模式中，使用硫代乙醯胺誘發肝纖維化模式所造成的損傷，除了在極高劑量會對腎臟造成傷害外，僅對肝臟特異性的傷害，且這種損傷類似人類由病毒引起之肝炎，硫代乙醯胺進入體內代謝後產生的次級代謝物 TAA-S-dioxide 會造成脂質過氧化，破壞肝細胞而形成肝損傷與氧化壓力[Bruck *et al.*, 2004]。

目前已有許多文獻證實將牛奶發酵成優酪乳的乳酸菌對脂肪的不正常累積導致脂肪變性產生的肝損傷有保護作用[Wang *et al.*, 2009 ; Lee *et al.*, 2006 ; Yadav *et al.*, 2007 ; Paik *et al.*, 2005]，Wang 等人的研究指出乳酸菌對高膽固醇飲食引起的脂肪肝有減緩效果，Lee 等人的研究指出鼠李糖乳桿菌 (*Lactobacillus rhamnosus*)能降低肥胖鼠的體脂肪和脂肪肝，Yadav 等人的研究益生菌對高糖誘發大鼠之糖尿病和胰島素阻抗有保護作用，Paik 等人的研究指出芽苞桿菌 (*Bacillus*)能促進高脂肪和高膽固醇飲食造型肥胖和脂肪肝的大鼠之抗氧化和枝質代謝，也有學者證實益生菌發酵的優酪乳可能透過對患者腸道菌群的修正減緩肝性腦病 (hepatic encephalopathy)[Bajaj *et al.*, 2008]，但對於化學物質引起的肝損傷是否有保護作用目前尚無定論。

#### 肆、 研究動機與目的

過氧化反應造成的氧化傷害是形成肝損傷的主要原因，若能透過抗氧化物質來幫助體內消除氧化壓力，期望減緩過氧化傷害形成的肝損傷，乃至肝纖維化。在前人的研究中發現本研究使用之優酪乳所含的乳酸菌，具有抗氧化和抗發炎的功效，因此，本研究嘗試以硫代乙醯胺誘使小鼠產生氧化傷害，進而造成肝纖維化，在投與硫代乙醯胺的過程中以優酪乳緩解過氧化傷害，期望能藉由優酪乳中乳酸菌的抗氧化能力達到減緩肝纖維化的形成，進一步說明優酪乳的預防保健功效。



## 伍、 材料與方法

### 一、 藥品材料

#### (一)、 藥品、 試劑

編號	藥品名稱	廠牌
1	TAA (thioacetamide)	Amresco, Solon, OH, USA
2	Chloroform	Amresco, Solon, OH, USA
3	LE agarose	Cambrex, East Rutherford, NJ, USA
4	cDNA synthesis kit	Fermentas, Court, Burlington, Ontario
5	DEPC treated water	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
6	Anti-TSLP antibody	LifeSpan, Seattle, WA, USA
7	Anti-Smad2/3 antibody	LifeSpan, Seattle, WA, USA
8	Max Polymer Detection System	Leica, Germany
9	Isopropanol	MERCK, Darmstadt, Germany
10	Potassium Chloride, KCL	MERCK, Darmstadt, Germany
11	Ethanol (99%)	Panreac, Barcelona, Spain
13	6× DNA Loading Dye	PROtec, Oberstenfeld, Germany
14	dNTP	PROtec, Oberstenfeld, Germany
16	Klen Taq DNA Polymerase	PROtec, Oberstenfeld, Germany
17	Klen Taq Buffer, 10×	PROtec, Oberstenfeld, Germany
18	Tissue RNA extraction kit	PROtec, Oberstenfeld, Germany
19	DNA Ladder (100 bp)	PROtec, Oberstenfeld, Germany
20	DNA Ladder (1 kb)	PROtec, Oberstenfeld, Germany
21	ALT (ALAT/GPT) 11876805	Roche/Hitachi, Basel, Schweiz

22	AST (ASAT/GPT) 11876848	Roche/Hitachi, Basel, Schweiz
23	Total protein kit	Roche/Hitachi, Basel, Schweiz
24	Hydrochloric acid	Roche/Hitachi, Basel, Schweiz
25	Fast green FCF	Sigma, St. Louis, MO, USA
26	Sirius red (Direct red 80)	Sigma, St. Louis, MO, USA
27	Saturated picric acid	Sigma, St. Louis, MO, USA
28	4-(Dimethyl-amino)benzaldehyde	Sigma, St. Louis, MO, USA
29	Carboxy methylcellulose sodium salt	Sigma, St. Louis, MO, USA
30	Hydrogen peroxide, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sigma, St. Louis, MO, USA
31	10% 福馬林液	博盛貿易公司, 新北市, 台灣
32	Ethyl ether	聯工化學, 新竹市, 台灣
33	Xylene	聯工化學, 新竹市, 台灣
34	DNA Primer	源資公司, 新北市, 台灣
35	東海大學優酪乳	東海大學實習工廠, 台中市, 台灣

## (二)、設備、器材

編號	器材名稱	廠牌
1	1.5 ml eppendorf	Axygen, Union City, California, USA
2	ASTEC program temp. control system	ASTEC, Carlsbad, CA, USA
3	Dry bath incubator	MajorScience, Saratoga, CA, USA
3	減壓濃縮機	BUCHI, Zurich, Switzerland
4	膠體電泳槽 (Mupid-2plus)	Advance, Tokyo, Japan
5	CoBAS MIRA PLUS 生化自動分析儀	Roche, Basel, Switzerland
6	ELISA reader (Multiskan spectrum)	Thermo Labsystem, Waltham,

		MA, USA
7	1 ml、5 ml 針筒	台灣特浦公司, 高雄市, 台灣
8	電泳膠影像照相儲存分析系統	ANT Technology, 台北市, 台灣
9	小鼠餵食管	捷陞公司, 台中市, 台灣
10	手術器械、200 目鋼篩	捷陞公司, 台中市, 台灣
11	顯微鏡傳輸器 Nikon DS-U2	國祥儀器公司, 台北市, 台灣
13	顯微鏡 Nikon E-200、TS-100	國祥儀器公司, 台北市, 台灣
14	桌上型離心機 HERMLE、 HSIANGTAI	保富公司, 台中市, 台灣
15	落地式離心機 KUBOTA 6200	東興儀器公司, 台中市, 台灣
16	PCR TE ThermoCycler	季勗公司, 台北市, 台灣

## 二、 實驗方法

### (一)、動物飼養與試驗分組

實驗動物選用八週齡，25-30 克，無特定病源之雄性 BALB/c 小白鼠 (購自國家實驗動物中心，台北，台灣)，將實驗鼠分成五組：Naïve 組 (n=6)，為不經過任何處理之組別，Control 組 (n=10)，為藥物腹腔注射誘發肝纖維化及餵食管口服給予滅菌蒸餾水 10 ml/kg/day 之組別、及試驗組：包括低劑量 Yoghurt 組 (LY、n=6)，藥物腹腔注射誘發肝纖維化及餵食管口服給予 (12.5 ml/kg/day) 之 yoghurt；中劑量 Yoghurt 組 (MY、n=6)，藥物腹腔注射誘發肝纖維化及餵食管口服給予 (25 ml/kg/day) 之 yoghurt；及高劑量 Yoghurt 組 (HY、n=6)，藥物腹腔注射造型肝纖維化及餵食管口服給予 (50 ml/kg/day) 之 yoghurt；飲水與飼料均減

菌後任飼，光照循環為 12 小時亮、12 小時暗。

## (二)、肝纖維化造型模式

肝纖維化的造型利用腹腔注射 TAA 給予小鼠 (250 mg/kg/day)，每週三次，每兩週進行採血，將收集所得之血液進行離心，離心後吸取上清液，收集血清，小鼠血清測定 ALT、AST 之濃度追蹤肝損傷之造型情形。

## (三)、實驗動物樣本採集分析

### 1. 血清 (serum) 收集與肝功能分析

投藥滿八週後，將小鼠經乙醚麻醉，以剪刀剪開小鼠腋下皮膚及下腋動脈或頸動脈，使用 1 ml 針管收集血液，待血液凝固後，以  $8,000 \times g$  離心 10 分鐘，取血清使用生化儀進行 sALT 和 sAST 生化值的測定。

### 2. 羥基脯氨酸 (hydroxyproline) 的檢測

羥基脯氨酸測定參照 Neumanre and Loganma 的方法 [Neumanre and Loganma, 1950]。取小鼠之肝組織約 0.3 g，於  $100^{\circ}\text{C}$  烘箱中烘乾。將烘乾後的肝組織稱重並記錄，加入 3 ml 6 N HCl (0.1 g liver tissue/1 ml HCl) 於  $100^{\circ}\text{C}$  下加熱 16 小時將肝組織水解。水解後，於每組各取出 1 ml 樣品，在室溫下以每分鐘  $9,300 \times g$ 、離心 30 分鐘。離心完成後，樣品可觀察到沉澱物，取中段溶液的樣品 0.1 ml，加入 1 N NaOH 中和，於每管樣品中加入 0.01 M  $\text{CuSO}_4$ 、2.5 N NaOH 和 6%  $\text{H}_2\text{O}_2$  各 1 ml，均勻震盪後放置室溫下靜置 5 分鐘。放入  $80^{\circ}\text{C}$  水浴鍋中、加熱 5 分鐘。冷卻後，加入 4 ml 的 3 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ，和 2 ml 的 5% p-dimethylaminobexzoaldehyde，

均勻震盪。置於 70°C 水浴鍋加熱 16 分鐘後冷卻至室溫。利用分光光度計於波長 540 nm 測定吸光值。羥基脯氨酸之含量以  $\mu\text{g/g}$  組織濕重表示。

### 3. 穀胱苷肽 (glutathione, GSH)

取小鼠之肝臟組織約 0.3 g，使用均漿液 (3 ml 1.15% KCl、2 ml Tris-EDTA pH 8.9、1.5 ml acetic acid) 將肝臟組織均質，取 1 ml 均質液加入同體積的三氯醋酸 (trichloroacetic acid 10%, TCA 10%) 溶液並均勻混合，於室溫下使用 4,100 rpm 離心五分鐘，取 20  $\mu\text{l}$  上清液加入 170  $\mu\text{l}$  之 phosphate-EDTA 緩衝液，和 10  $\mu\text{l}$  之磷苯二甲醛 (*o*-phthaldialdehyde, OPA; 1mg/ml methanol) 後，靜置 15 分鐘，使用分光光度計於波長 460 nm 下測定其吸光值。

### 4. 丙二醛 (malondialdehyde, MDA)

取小鼠之肝臟組織約 0.3 g，使用均漿液 (3 ml 1.15% KCl、2 ml Tris-EDTA pH 8.9、1.5 ml acetic acid) 將肝臟組織均質，取 1 ml 均質液放入離心管，於 4°C 下使用 3,000 rpm 離心 5 分鐘，取 200  $\mu\text{l}$  上清液加入同體積之 20% SDS 溶液和 3.6 ml 之混合液 (1.5 ml 之 acetic acid、1.5 ml 之 2-thiobarbituric acid、0.6 ml 之去離子水) 後混合均勻，於 99°C 水浴 1 小時，於室溫冷卻後加入 4 ml 之 butanol/pyridine (15:1) 混合液，混合至溶液分層後，於 80°C 水浴 2 分鐘後使用分光光度計於波長 355 nm 下測定吸光值。

### 5. 肝臟水溶性蛋白質 (liver water-soluble protein)

取小鼠之肝臟組織約 0.3 g，使用均漿液 (3 ml 1.15% KCl、2 ml Tris-EDTA pH 8.9、1.5 ml acetic acid) 將肝臟組織均質，取適量之均質液，稀釋 10 倍後，取稀釋液 30  $\mu\text{l}$  至離心管，加入 570  $\mu\text{l}$  去離子水，使用 protein kit 於生化儀上機測定。

## 6. 肝臟病理切片的評估 (pathological examination)

小鼠犧牲後取肝臟最大葉中的 1/3，浸泡於 10%福馬林液中固定一週後將其分組編號，委託中興大學獸醫病理所廖俊旺教授協助，將組織石蠟包埋後進行蘇木紫與伊紅染色 (haematoxylin & eosin stain, H & E stain)，玻片樣本使用光學顯微鏡觀察肝臟組織變性及細胞壞死程度[Hsieh *et al.*, 2008]。

## 7. 天狼星紅染色 (Sirius red stain)

肝組織石蠟包埋切片後，利用二甲苯 (xylene)與酒精將組織進行脫蠟與復水，以 0.1%天狼星紅染劑，將肝臟組織之膠原蛋白部分染成紅色，以 0.1% Fast green FCF 染劑將玻片背景染成綠色以利對照。在 10×20 倍的光學顯微鏡視野下照相，利用 ImagePro Plus 影像分析軟體計算肝組織之纖維化分布程度。

## 8. 免疫組織化學染色 (immunohistochemistry stain)

肝組織石蠟包埋切片後，利用二甲苯與酒精將組織進行脫蠟與復水，透過 Max Polymer Detection System kit 進行染色，將脫蠟後的玻片置於滅菌釜中隔水加熱至 121°C，3 分鐘後關掉電源，放置 15 分鐘，取出玻片於室溫下冷卻，滴上 peroxidase blocking solution，放置 5 分鐘去除過氧化物干擾，使用 wash buffer (1×TTBS) (10 mM Tris-HCl pH 7.4、0.05% Tween 20)洗淨三次，滴上一級抗體 (TSLP、p-Smad2/3)，反應 30 分鐘，使用 wash buffer 洗淨三次，滴上二級抗體反應 10 分鐘，使用 wash buffer 洗淨三次後滴上蘇木子染劑染色 10 分鐘，最後以 3,3-diaminobenzidine (DAB)呈色，使免疫反應部分呈現咖啡色，以蘇木紫為背景色以便觀察。在 10×40 倍的光學顯微鏡視野下照相紀錄。

#### (四)、組織 mRNA 分析

##### 1. RNA 的萃取

取約 0.1 g 的肝組織於研鉢中，加入適量的液態氮進行研磨。研磨後的組織加入 0.3 ml 的 trizol，利用 18G 的針頭抽吸數次，直至組織能順暢的吸取為止。在  $4,000 \times g$ 、 $4^{\circ}C$ 、10 分鐘的條件下離心，取上清液與 40  $\mu l$  的 chloroform/isoamyl-alcohol (24/1) 混合，均勻震盪後置於冰上 5 分鐘。以  $14,700 \times g$ 、 $4^{\circ}C$ 、15 分鐘之條件離心，離心後可觀察到兩層分層，小心的吸取澄清之上清液至新的離心管，加入等量的 isopropanol，上下搖晃後置於冰上 10 分鐘，以  $14,700 \times g$ 、 $4^{\circ}C$ 、10 分鐘的條件離心，離心後肉眼可見底部有白色塊狀沉澱，此即為 RNA 的沉澱物 (pellet)，倒掉上清液留下 pellet，加入 1 ml 之 75% ethanol/DEPC 水，置於  $-20^{\circ}C$  環境下，兩小時後取出樣品，以  $9,300 \times g$ 、 $4^{\circ}C$ 、5 分鐘的條件離心，倒掉上清液留下 pellet，加入 30 至 50  $\mu l$  之 DEPC 水將其充分溶解。利用分光光度計，以波長 260 nm 和 280 nm 偵測吸光值，將 260 nm 之吸光值換算濃度，260 nm/280 nm 換算 RNA 之純度。完成之樣品置於  $-20^{\circ}C$  保存。

##### 2. cDNA 製備

採用 cDNA synthesis kit 製備小鼠肝臟組織 cDNA。取 0.5  $\mu l$  的 mRNA 至 PCR tube，加入試劑後，均勻混合放置於聚合酶鏈結反應器 (PCR TE ThermoCycler) 中，以  $37^{\circ}C$ 、60 分鐘的條件進行合成，製備完成後保存於  $-20^{\circ}C$ 。

##### 3. 半定量 PCR (semi-quantitative PCR) 擴增及 DNA 電泳

將小鼠肝臟組織 cDNA 加入適當的引子，第一次反應條件為  $94^{\circ}C$ 、5 分鐘； $57^{\circ}C$ 、1.5 分鐘； $72^{\circ}C$ 、3 分鐘，PCR 條件為： $94^{\circ}C$ 、1 分鐘； $60^{\circ}C$ 、1 分鐘；

72°C、1.5 分鐘，終止溫度使用 72 °C、10 分鐘作為結束條件終止反應，產物大小與引子序列參照附表 1，樣本保存於-20°C。

反應後之產物取其中 10 µl 與 6×DNA loading dye 1 µl 混合，以 2 % 洋菜膠於 0.5% TBE buffer 電泳液，100 伏特電壓下進行跑膠。結果以電泳膠影像照相儲存分析系統照相，並以 AlphaDigDoc 軟體進行影像分析，擷取產物之片段亮度和 *Gapdh* 之片段亮度，將兩者相除以進行定量。

附表 1、半定量 PCR 使用之引子

mRNA		Sequence	Product size (bp)
<i>Coll1a1</i>	F	5' CGACTAAGTTGGAGGGAACGGTC 3'	182
	R	5' TGGCATGTTGCTAGGCACGAC 3'	
<i>Col3a1</i>	F	5' CGAGGTGACAGAGGTGAAAGA 3'	336
	R	5' AACCCAGTATTCTCCGCTCTT 3'	
<i>Mmp13</i>	F	5' GCATGAAAACACTGTGGGGAGT 3'	112
	R	5' AGCTGAAATCTTGCCTTGGA 3'	
<i>Mat1a</i>	F	5' CGGTAGGAGAAGGGCATCC 3'	270
	R	5' GGGACTGTTGCTCCAGAGCC 3'	
<i>Mat2a</i>	F	5' GCATCTGCGCCCTCCGCAGT 3'	420
	R	5' GTGACTGTTGTTCCAAGGCA 3'	
<i>Gapdh</i>	F	5' TGTGTCCGTCGTGGATCTGA 3'	76
	R	5' CCTGCTTCACCACCTTCTTGA 3'	



### 三、 統計分析

#### (一)、單因子變異數分析 (One-way analysis of variance, One-Way ANOVA)

所有試驗數據以 SPSS 17 中的 One-Way ANOVA 方法分析，並以鄧肯多變域檢定 (Duncan's multiple-range test) 進行事後檢定，組間比較以不同小寫上標字母顯著差異顯著性 ( $P < 0.05$ ) [Duncan, 1955]。

#### (二)、無母數分析 (Non-parametric statistics)

病理切片之評分數據以無母數分析評估其統計差異，並以 Kolmogorov-Smirnov 進行檢定，處理組與對照組相比以  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$  標示差異顯著性，對照組與 naïve 組相比則以  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{\#\#}P < 0.01$ ,  $^{\#\#\#}P < 0.001$  標示差異顯著性。

## 陸、 結果

### 一、 優酪乳對肝損傷之保護作用

#### (一)、 肝損傷指標測定

肝臟的肝功能指標為判斷肝損傷的首要標的，血清中之 ALT 與 AST 值為肝功能指標的評估標準，圖一為各組間血清中之 ALT 比較，結果顯示硫代乙醯胺誘發肝纖維化造型後對照組 (Control)其血清中 ALT 值高於正常組 (Naïve)，兩者間有顯著差異 ( $P < 0.05$ )，此外對照組之 ALT 值也顯著高於其餘優酪乳組 (LY、MY、HY) ( $P < 0.05$ )。圖二為各組間血清中之 AST 比較，結果顯示對照組小鼠血清中之 AST 顯著的高於正常組 ( $P < 0.05$ )與其餘優酪乳處理組 ( $P < 0.05$ )，表示對照組的肝損傷程度較其餘組別嚴重。

#### (二)、 小鼠之體重、脾臟與肝臟重量

在八週的實驗期間各組小鼠的體重變化，如表一所示，經硫代乙醯胺誘發肝纖維化造型後對照組之體重與正常組小鼠相比有顯著差異 ( $P < 0.05$ )，而與其餘實驗組 (LY、MY、HY)無顯著差異。另外，在各組小鼠的肝臟與脾臟重量變化上，對照組小鼠的肝臟重量顯著的高於正常組，和優酪乳組相比，對照組的肝臟重量顯著的高於中、高劑量組 ( $P < 0.05$ )、對照組與低劑量優酪乳組無顯著差異。在脾臟重量上則均無顯著差異。將肝臟重量與個體重相除，對照組小鼠顯著的高於正常組 ( $P < 0.05$ )，和優酪乳組相比，對照組顯著的高於所有優酪乳組並且達到顯著差異 ( $P < 0.05$ )，表示肝纖維化的程度較其餘組別來的嚴重。

### (三)、 肝臟之乾濕重比

將肝臟完全烘乾後，比較各組乾重可了解肝水腫程度，圖三為肝臟之乾濕比，結果顯示硫代乙醯胺誘發肝纖維化造型後對照組其乾重/濕重比例顯著高於正常組和優酪乳處理組 (LY、MY、HY) ( $P < 0.05$ )，表示對照組小鼠之肝水腫的情形較嚴重。

### (四)、 肝臟之水溶性蛋白質含量

肝細胞受損後會使肝臟的功能降低，因此測定肝臟水溶性蛋白質的含量可間接判斷肝損傷的情形，圖四為肝臟之水溶性蛋白質含量，結果顯示硫代乙醯胺誘發肝纖維化造型後對照組之水溶性蛋白質濃度顯著高於正常組 ( $P < 0.05$ )，和優酪乳處理組 (LY、MY、HY) ( $P < 0.05$ )，表示對照組小鼠其肝細胞受損的情形較嚴重。

### (五)、 肝臟之羥基脯氨酸分析

羥基脯氨酸為膠原蛋白合成中特殊的胺基酸，測定其在肝臟中的含量可間接判斷膠原蛋白形成之纖維化的程度，如圖六所示，硫代乙醯胺誘發肝纖維化造型後之對照組中羥基脯氨酸的含量顯著的高於正常組 ( $P < 0.05$ )，和優酪乳處理組 (LY、HY、MY) ( $P < 0.05$ )。顯示對照組有較嚴重之膠原蛋白增生情形。

### (六)、 肝臟病理切片分析

肝臟的病理切片分析能顯示纖維化之嚴重程度。在化學染色上使用蘇木紫與伊紅染色來觀察細胞的型態與壞死情形，並藉由天狼星紅染色來觀察肝臟膠原蛋白沉積的情形。

## 1. 蘇木紫與伊紅染色

硫代乙醯胺誘發肝纖維化後各組小鼠之 H & E 染色結果，如圖五所示，在正常組中，細胞排列整齊並且無壞死與再生的情形出現，在對照組中，觀察到明顯的肝細胞壞死與再生，組織細胞排列混亂；在優酪乳處理組中，所有組別中肝細胞壞死的情形都有減少。染色結果委託中興大學廖俊旺教授進行評分，評分結果以無母數分析進行統計，如表二所示，評分項目分為液泡 (vacuolization)、壞死 (necrosis) 和纖維化 (fibrosis)。在肝臟液泡中對照組和正常組相比液泡顯著的增加 ( $P < 0.05$ )，低劑量優酪乳組 (LY) 和對照組無顯著差異，中劑量、高劑量優酪乳組 (MY、HY) 和對照組相比顯著減少 ( $P < 0.05$ )。在細胞壞死情形中，對照組和正常組相比顯著增加 ( $P < 0.05$ )，低劑量、中劑量和高劑量優酪乳組 (LY、MY、HY) 無顯著差異。在纖維化組織方面，正常組及低劑量、中劑量和高劑量優酪乳組 (LY、MY、HY) 皆顯著低於對照組 ( $P < 0.05$ )。

## 2. 天狼星紅染色

如圖七所示，硫代乙醯胺誘發肝纖維化後各組小鼠肝臟以天狼星紅染色，紅色為膠原蛋白沉積，綠色為組織背景；在正常組中無明顯纖維組織出現，而在對照組中則觀察到大量的纖維化組織，經優酪乳 (LY、MY、HY) 處理後，可觀察到纖維化組織的明顯減少。將染色結果使用 ImagePro Plus 軟體量化，量化的結果依序為正常組、對照組、低劑量優酪乳 (LY)、中劑量優酪乳 (MY) 和高劑量優酪乳 (HY) 分別為 0.15 %、8.05 %、0.77 %、0.67 % 和 0.37 %，所有組別與對照組相比其膠原蛋白的沉積分佈均有顯著下降的情形 ( $P < 0.05$ )。

## (七)、 肝臟之半定量 PCR 分析 (*Colla1* 和 *Coll2a3*)

圖十二(A)、(B)為硫代乙醯胺誘發肝纖維化後各組小鼠肝臟 *Colla1*、*Coll2a3* 等 mRNA 表現量的影響，使用 AlphaDigDoc 軟體進行量化。

### 1. *Colla1*

結果顯示硫代乙醯胺誘發肝纖維化造型後對照組中 *Colla1* 的表現量顯著高於正常組 ( $P < 0.05$ )，各組優酪乳處理組 (LY、MY、HY)的 *Colla1* 表現量也顯著低於對照組( $P < 0.05$ )，並且和正常組無顯著差異。

### 2. *Colla3*

結果顯示硫代乙醯胺誘發肝纖維化造型後對照組中 *Colla3* 的表現量顯著高於正常組 ( $P < 0.05$ )和中劑量、高劑量優酪乳處理組 (MY、HY)，而低劑量優酪乳組 (LY)和對照組無顯著差異。

## 二、 優酪乳對過氧化傷害的保護作用

### (一)、 肝臟之穀胱苷肽分析

穀胱苷肽為體內重要的抗氧化寡肽，主要由肝臟合成，當肝細胞受損時，GSH 的含量會降低。圖九為硫代乙醯胺誘發肝纖維化造型後各組間 GSH 含量的變化，在對照組中小鼠肝臟 GSH 的含量顯著的低於正常組和優酪乳處理組 (LY、MY、HY)( $P < 0.05$ )。

## (二)、 肝臟之丙二醛分析

肝臟的丙二醛累積程度可代表肝臟過氧化傷害的程度，圖十為硫代乙醯胺誘發肝纖維化造型後各組丙二醛的含量，結果顯示對照組中丙二醛的含量與顯著的高於正常組 ( $P < 0.05$ )和優酪乳處理組 (LY、MY、HY) ( $P < 0.05$ )，表示優酪乳對肝臟的過氧化傷害有保護作用。

## 三、 硫代乙醯胺造型肝纖維化的可能途徑

### (一)、 胸線基質淋巴細胞生成素之免疫組織化學染色

圖十一為硫代乙醯胺誘發肝纖維化後各組小鼠肝臟之胸線基質淋巴細胞生成素 (thymic stromal lymphopoietin, TSLP)免疫染色的結果，經 DAB 呈色後，與抗體呈陽性反應之區塊會呈現咖啡色，在對照組中可觀察到較大量的 TSLP，而在正常組中則無任何發現，經優酪乳處理後，可發現 TSLP 的明顯減少。

### (二)、 磷酸化 small mothers against decapentaplegic homolog 2/3

#### (p-Smad 2/3)之免疫組織化學染色

圖十三為硫代乙醯胺誘發肝纖維化後各組小鼠肝臟之 p-Smad2/3 免疫染色的結果，經 DAB 呈色後，與抗體呈陽性反應之區塊會呈現咖啡色，結果顯示，在所有組別中，幾顯著之呈色反應。

### (三)、 肝臟之半定量 PCR 分析 (*Mat1a*、*Mat2a* 和 *Mmp13*)

圖十二(C)、(D)、(E)為硫代乙醯胺誘發肝纖維化後各組小鼠肝臟 *Mat1a*、*Mat2a*、*Mmp13* 等 mRNA 表現量的影響，使用 AlphaDigDoc 量化。

### 1. *Mat1a*

結果顯示硫代乙醯胺誘發肝纖維化造型後對照組中 *Mat1a* 的表現量顯著低於正常組 ( $P < 0.05$ )和優酪乳處理組 (LY、MY、HY) ( $P < 0.05$ )。

### 2. *Mat2a*

結果顯示硫代乙醯胺誘發肝纖維化造型後對照組中 *Mat2a* 的表現量顯著高於正常組 ( $P < 0.05$ )和優酪乳處理組 (LY、MY、HY) ( $P < 0.05$ )。

### 3. *Mmp13*

結果顯示硫代乙醯胺誘發肝纖維化造型後對照組中 *Mmp13* 的表現量與正常組相比無顯著差異，餵飼優酪乳後之組別與對照組相比也無顯著差異

## 柒、 討論

本研究為探討東海大學優酪乳減緩硫代乙醯胺形成之小鼠肝纖維化的影響。小鼠經八週餵飼後犧牲，測定個體重、肝濕重、肝乾重和脾臟重，收集血清測定 ALT、AST；收集肝組織，將石蠟包埋之肝臟切片進行 H & E 染色觀察細胞壞死情形，和天狼星紅染色觀察纖維化的程度；測定其肝臟中的水溶性蛋白質和 hydroxyproline 來觀察肝細胞受損的情形和纖維化累積的程度；分析肝臟 MDA 和 GSH 來判斷過氧化傷害的情形和自由基清除的能力；將石蠟包埋之肝臟切片進行 TSLP 免疫染色來觀察肝臟發炎的反應；抽取肝臟 RNA，將其轉錄成 cDNA 後進行半定量 PCR 來觀察肝臟之 *Coll1a1*、*Coll3a1*、*Mat1a*、*Mat2a* 和 *Mmp13* 等 mRNA 的表現量來探討肝損傷的成因。

早在 1950 年即有以硫代乙醯胺造型大鼠肝損傷的相關報告，硫代乙醯胺在誘發鼠肝損傷的病理變化類似人類的肝病變過程，使用在模擬人類肝纖維化的研究上，已有多年的歷史[Torres-Lopez *et al.*, 1996]。血清中的 ALT 和 AST 濃度是普遍被用來判斷肝臟損傷的指標[Sturgill and Lambert, 1997]，其中又以 ALT 較具專一性。圖一和圖二為小鼠血清犧牲時血清中 ALT 和 AST 的濃度，實驗結果發現 ALT 和 AST 兩項肝損傷指標在硫代乙醯胺誘發小鼠肝纖維化後會顯著的提高，然而餵飼小鼠優酪乳後會顯著的降低血清中 ALT 和 AST 的濃度，顯示肝細胞受損的程度有減緩的趨勢。表一為小鼠體重、肝臟、脾臟重的變化，當肝臟受損時會開始啟動自我修復[Yamada and Fausto, 1998]，這個動作所形成的纖維化物質會使肝臟的重量增加，當肝臟受損持續加劇時，會發展成肝硬化，這時的肝臟可以觀察到萎縮的情形發生[Perez Tamayp, 1983]，肝臟重量反而會減輕，因此可藉由肝臟重量來判斷肝損傷的程度，此外，由於肝臟是人體主要的代謝器官，因此肝臟受損也會造成個體體重的下降[Kenneth and Grompe, 2008]。本研究以硫代乙醯胺誘發肝纖維化後小鼠肝臟重量上升，出現肝腫大的情形，表示所造型之肝



損傷形成肝纖維化，而尚未演變成肝硬化，肝腫大的現象在餵飼優酪乳後有減緩的趨勢。研究指出當肝臟纖維化演變成肝硬化時，因肝臟組織壞死，會導致門脈高血壓的情形出現，血液會逆流到脾臟，造成脾臟腫大，而在本研究中，脾臟重量在各組間均無顯著差異，顯示我們所造型的肝纖維化並無造成門脈高血壓。由於每隻小鼠個體重量差異，因此容易造成結果的誤差，為了得到更客觀的數據，將個體重量和肝臟重相除，結果顯示對照組的確高於各組優酪乳處理組，表示纖維化情形經優酪乳處理後確有減緩的趨勢。

當肝臟產生栓塞時會產生肝水腫，而導致肝臟重量增加[L'Abbate *et al.*, 2010]，將肝臟的乾重與濕重相除後做圖，結果如圖三所示，硫代乙醯胺誘發肝纖維化小鼠肝臟的乾濕重比顯著提高，以優酪乳處理後則出現下降的結果。顯示餵飼優酪乳對硫代乙醯胺誘發的小鼠肝損傷有保護作用。

當肝臟受損時，因為肝細胞的死亡會導致肝臟產生蛋白質的能力降低，此外，觀察肝組織切片可觀察到細胞壞死與脂肪空泡[Knodell *et al.*, 1981]，圖四為肝臟水溶性蛋白質的濃度，結果顯示硫代乙醯胺誘發肝纖維化後小鼠肝臟的總蛋白濃度顯著下降，而當以優酪乳處理後有回升的情形。另外，對肝組織切片進行H & E染色，如圖五和表二所示，發現硫代乙醯胺誘發肝纖維化後小鼠之肝組織的確出現壞死及空泡性，餵飼優酪乳後雖然有改善的趨勢，但在病理評分上並無顯著差異。當肝臟受損時產生的肝纖維化是不正常累積胞外基質的結果，而這類胞外基質的主要組成為膠原蛋白[Tsukada *et al.*, 2006]，羥基脯氨酸是膠原蛋白組成中特有的胺基酸[Hanuske-Abel, 2003]，因此羥基脯氨酸常被用來做為膠原蛋白積累的標的，並有學者指出其可用來做為肝臟纖維化程度的指標[Hanuske-Abel, 2003]；此外，也有學者指出，當肝纖維化發生時，第一型膠原蛋白的 mRNA 表現量會增加[Tsukada *et al.*, 2006]。在本研究中，將小鼠肝臟均質後測定羥基脯氨酸的含量，結果如圖六所示，以硫代乙醯胺誘發肝纖維化後羥基脯氨酸的含量顯著提高，餵飼優酪乳後則有顯著的減少。此外，將小鼠肝組織切片進行天狼星紅染色，如圖七所示，當給予硫代乙醯胺誘發肝纖維化後可觀察

到明顯的膠原蛋白沉積，經優酪乳處理後膠原蛋白沉積的情形顯著減少，將染色結果以軟體量化後，如圖八所示，也發現相同的趨勢。肝臟 *Coll1a1* 和 *Col3a1* 的 mRNA 表現量中，如圖十二(A)、(B)所示，硫代乙醯胺誘發肝纖維化後表現量會顯著上升，以優酪乳處理後會有下降的情形出現。這些結果指出餵飼優酪乳能降低肝臟羥基脯氨酸的含量並降低肝臟 *Coll1a1* 和 *Col3a1* 的 mRNA 表現量；此外，在 H & E 染色上，優酪乳處理後可顯著的降低肝組織空泡和纖維化的評分，而在天狼星紅染色的結果也顯示優酪乳對肝臟纖維化有減緩的效果。

硫代乙醯胺為一種可透過不同處理方式，選擇性造成急性或慢性肝損傷的毒性物質 [Hung *et al.*, 2005]，所誘發的病變位處於肝臟小葉中心，硫代乙醯胺造成之肝損傷並不是來自於本身毒性，而是當其進入動物體內代謝後的過氧化代謝產物攻擊肝臟所致。硫代乙醯胺進入動物體後，透過混和功能氧化系統代謝後產生乙醯胺 (acetamide) 與 TAA-S-oxide [Chieli and Malvaldi, 1984]，TAA-S-oxide 再經由細胞色素 P-450 代謝後即轉變為一具高活性化學物質 TAA-S-dioxide，TAA-S-dioxide 會進一步和組織的大分子作共價鍵結 [Hunter *et al.*, 1977; Porter *et al.*, 1979; Porter and Neal, 1978]，造成丙二醛等物質的出現，破壞肝細胞形成肝損傷與氧化壓力(oxidative stress) [Bruck *et al.*, 2004]。氧化壓力破壞肝細胞後活化庫氏細胞，造成肝臟星狀細胞的活化，活化的星狀細胞會產生促進增生、生成和降解胞外基質等能力而形成肝纖維化。肝臟 GSH 會與過氧化物反應以達到抗氧化的功效，因此當肝臟受到過氧化物攻擊時，GSH 會減少 [Al-Shabanah *et al.*, 2000; Ahmed *et al.*, 2011]。在本研究中，以硫代乙醯胺誘發肝纖維化小鼠其 GSH 濃度之結果，如圖九所示，對照組之小鼠肝臟 GSH 顯著的降低，這可能是 GSH 過氧化反應程度的提高所造成，而以優酪乳處理後 GSH 的濃度有顯著的回復。而在小鼠肝臟的丙二醛濃度的實驗中出現了相反的結果，如圖十所示，硫代乙醯胺誘發肝纖維化後丙二醛的量顯著增加，經優酪乳處理後則有減少的趨勢，此結果與 Al-Shabanah 等人和 Ahmed 等人的實驗結果相同，表示硫代乙醯胺會透過過氧化物攻擊小鼠肝臟，造成肝損傷而形成肝纖維化，東海大學優酪乳對過氧化

傷害有保護作用。

TSLP 為動物體內 Th2 發炎反應的前驅物質，會調節樹突細胞與單核球的活化[Ramalingam *et al.*, 2009]，為了觀察肝臟的發炎情形，將肝臟切片進行 TSLP 的免疫染色，結果如圖十一所示，發現以硫代乙醯胺誘發肝纖維化後小鼠肝臟的 TSLP 會產生較大量表現，以優酪乳處理後表現量明顯減少。

一般認為 TGF- $\beta$ 1 活化星狀細胞分化，分泌胞外基質為纖維化的主要途徑，TGF- $\beta$ 1 為 Th1 發炎反應的途徑，而 TSLP 所誘發的發炎反應為 Th2 途徑，分泌的細胞激素為腫瘤壞死因子  $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )和第六型介白素(Interleukin 6, IL-6)等。為了更進一步確認星狀細胞的活化途徑，因此進行 TGF- $\beta$ 1 下游活化的 *Mmp13* 的 mRNA 表現量分析，以及 p-Smad2/3 的免疫染色。

MMP-1 和 MMP-13 是由庫氏細胞和肝臟星狀細胞所表現[Hironaka *et al.*, 2000 ; Knittel *et al.*, 1999]。這類蛋白質除了主要合成 type I collagen 外，對 type III 和 type II 蛋白質也具有選擇性[Deng *et al.*, 2000 ; Lauer-Fields *et al.*, 2002]。然而，type II collagen 並不表現在肝臟，肝臟中主要的纖維化組織為 type I collagen。圖十二(E)為肝臟 *Mmp13* mRNA 的表現量，結果顯示以硫代乙醯胺誘發小鼠肝纖維化後其 *Mmp13* 的表現量沒有顯著差異，而優酪乳處理後也沒有顯著差異，表示硫代乙醯胺和優酪乳對 *Mmp13* 的 mRNA 的表現並無影響。

將小鼠肝組織切片進行 p-Smad2/3 免疫染色，結果如圖十三所示，硫代乙醯胺誘發肝纖維化小鼠肝組織切片並無觀察到 p-Smad2/3 的表現，以優酪乳處理後也得到相同的結果，結果顯示硫代乙醯胺形成之肝纖維化可能不是透過 TGF- $\beta$ 1 刺激星狀細胞活化。

Adenosylmethionine-dependent methylation是許多生物反應過程的中心[Mato *et al.*, 2002]，Methionine adenosyltransferase (MAT)是肝臟中甲硫胺酸 (methionine) 代謝的關鍵酵素，它扮演了催化S-adenosylmethionine合成的角色[Mato *et al.*, 1997]。在哺乳動物組織，MAT有三種不同的型態，分別為MAT I/III和MAT II，分別來自兩種不同的基因*Mat1a*和*Mat2a*，有研究指出，在肝臟中*Mat1a*和*Mat2a*

mRNA表現的調節會受到Th2發炎途徑所分泌TNF- $\alpha$ 和IL-6的調控。*Mat1a*僅在成年人的肝臟中表現[Avila *et al.*, 1997]。*Mat2a*在胎兒的肝臟中大量表現，在成年人肝臟中，正常狀態下表現量可忽略，只有在肝臟受損時會大量表現[Frago *et al.*, 1998; Paneda *et al.*, 2002]。因此，當肝臟受損時，*Mat1a*的表現量會減少，降低甲基傳遞的作用，並開始啟動*Mat2a*的表現，進行肝臟再生。在本研究中，*Mat1a*和*Mat2a*的mRNA表現量的結果如圖十二(C)、(D)所示，以硫代乙醯胺誘發肝纖維化小鼠其*Mat1a*的表現量明顯下降，經優酪乳處理後皆有回復到正常水平，結果與前人實驗結果相符。而在*Mat2a*的表現量中，也獲得與前人相同的結果，給予小鼠硫代乙醯胺後其*Mat2a*的表現量顯著上升，表示肝細胞受損因而造成*Mat2a*開始表現，以優酪乳處理後，各組的表現量皆有下降。此外，這也代表TAA所誘發的肝纖維化可能主要受到TNF- $\alpha$ 和IL-6的調節。

## 捌、 結論

綜合上述結果，可知硫代乙醯胺誘發之肝纖維化是經由過氧化作用形成脂質過氧化物，造成過氧化傷害破壞肝細胞而產生肝損傷，持續的肝損傷活化了庫氏細胞，進而使星狀細胞分化並分泌胞外間質，反覆的作用下導致肝纖維化。東海大學優酪乳對硫代乙醯胺產生的過氧化傷害形成之肝損傷，可透過增加肝臟 GSH 的濃度和減少丙二醛的產生，達到保護作用，且在減緩肝纖維化的過程中，降低膠原蛋白的沉積。除此之外，透過 *Mat1a* 和 *Mat2a* 基因的調節發現優酪乳能減緩肝臟的受損的程度。而在 TAA 誘發的肝纖維化模式中，除了 TGF- $\beta$ 1 誘使星狀細胞活化導致纖維化產生的途徑外，透過 Th2 發炎路徑分泌的 TNF- $\alpha$  和 IL-6 在整個肝損傷的過程中，也扮演了很重要的角色。

## 玖、 參考文獻

- 衛生署統計系列(一)死因統計-歷年癌症死因統計，[http://www.doh.gov.tw/CHT2006/DM/DM2\\_2.aspx?now\\_fod\\_list\\_no=11663&class\\_no=440&level\\_no=5](http://www.doh.gov.tw/CHT2006/DM/DM2_2.aspx?now_fod_list_no=11663&class_no=440&level_no=5)，2011年6月]
- Ahmed, A. F., M. F. Mahmoud, M. A. Ouf, E. A. El-Fathaah. 2011. Aminoguanidine potentiates the hepatoprotective effect of silymarin in CCL<sub>4</sub> treated rats. *Ann Hepatol.* 10(2): 207-215.
- Ahotupa, M., M. Saxelin, R. Korpela. 1996. Antioxidative properties of *Lactobacillus GG*. *Nutr.* 31: 51-52.
- Al-Shabanah, O. A., K. Alam, M. N. Nagi, A. C. Al-Rikabi, A. M. Al-Bekairi. 2000. Protective effect of aminoguanidine, a nitric oxide synthase inhibitor, against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in mice. *Life Sci.* 66: 265-270.
- Avila, M. A., J. Mingorance, M. L. Martinez-Chantar, M. Casado, P. Martin-Sanz, L. Bosca, J. M. Mato. 1997. Regulation of rat liver S-adenosylmethionine synthetase during septic shock: role of nitric oxide. *Hepatology.* 25: 391-396.
- Bajaj, J. S., K. Saeian, K. M. Christensen, M. Hafeezullah, R. R. Varma, J. Franco, J. A. Pleuss, G. Krakower, R. G. Hoffmann, D. G. Binion. 2008. Probiotic yogurt for the treatment of minimal hepatic encephalopathy. *Am J Gastroenterol.* 103(7):1707-1715.
- Blau, B., R. Kohen, P. Bass, A. Rubinstein. 2000. Relation between colonic inflammation severity and total low-molecular-weight antioxidant profiles in experiential colitis. *Dig. Dis Sci.* 45: 1180-1187.
- Brenner, D. A. 2009. Molecular pathogenesis of liver fibrosis. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 120: 361-368.
- Bridle, K. R., C. Popa, M. L. Morgan, A. L. Sobbe, A. D. Clouston, L. M. Fletcher, D. H. Crawford. 2009. Rapamycin inhibits hepatic fibrosis in rats by attenuating multiple profibrogenic pathways. *Liver Transpl.* 15(10):1315-1324.

- Bruck, R., H. Aeed, R. Schey, Z. Matas, R. Reifen, G. Zaiger. 2002. Pyrrolidine dithiocarbamate protects against thioacetamide-induced fulminant hepatic failure in rats. *J. Hepatol.* 36(3): 370-377.
- Bruck, R., O. Genina, H. Aeed, R. Alexiev, A. Nagler, Y. Avni, M. Pines. 2001. Halofuginone to prevent and treat thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *Hepatology.* 33(2): 379-386.
- Cawston, T. E., W. A. Galloway, E. Mercer, G. Murphy, J. J. Reynolds. 1981. Purification of rabbit bone inhibitor of collagenase. *Biochemical Journal.* 195: 159-165.
- Chieli, E., G. Malvaldi. 1984. Role of the microsomal FAD-containing monooxygenase in the liver toxicity of thioacetamide S-oxide. *Toxicology.* 31: 41-52.
- Chilakapati, J., K. Shankar, M. C. Korrapati, R. A. Hill, H. M. Mehendale. 2005. Saturation toxicokinetics of thioacetamide: role in initiation of liver injury. *Drug Metab. Dispos.* 33: 1877-1885.
- Cincik, H., B. Kapucu, O. M. Ipcioglu, A. Gungor, E. Dursun. 2011. Hydroxyproline levels in nasal polyps. Epub ahead of print.
- .Deng, S. J., D. M. Bickett, J. L. Mitchell, M. H. Lambert, R. K. Blackburn, H. L. Carter, J. Neugebauer, G. Pahel, M. P. Weiner, M. L. Moss. 2000. Substrate specificity of human collagenase 3 assessed using a phage-displayed peptide library. *J. Biol. Chem.* 275: 31422-31427.
- DiMatteo, M., M. J. Reasor. 1997. Modulation of silica-induced pulmonary toxicity by Dexamethasone-containing liposomes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 142(2): 411-421.
- Duncan, D. B. 1955. Multiple range and multiple F test. *Biometrics* 11: 41-42.
- Ekstrom, G., M. Ingelman-Sundberg. 1989. Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol-inducible cytochrome P-450 (P-450IIE1). *Biochem. Pharmacol.* 38: 1313-1319.
- Frago, L. M., A. Gimenez, E. N. Rodriguez, I. Varela-Nieto. 1998. Pattern of

methionine adenosyltransferase isoenzyme expression during rat liver regeneration after partial hepatectomy. *Febs. Lett.* 426: 305-308.

Friedman, S. L. 2003. Liver fibrosis-from bench to bedside. *J. Hepatol.* 38: 38-53.

Fleige, S., W. Preissinger, H. H. Meyer, M. W. Pfaffl. 2009. The immunomodulatory effect of lactulose on *Enterococcus faecium* fed preruminant calves. *J. Anim. Sci.* 87(5): 1731-1738.

Galli, A., G. Svegliati-Baroni, E. Ceni, S. Milani, F. Ridolfi, R. Salzano, M. Tarocchi, C. Grappone, G. Pellegrini, A. Benedetti, C. Surrenti, A. Casini. 2005. Oxidative stress stimulates proliferation and invasiveness of hepatic stellate cells via a MMP2-mediated mechanism. *Hepatology.* 41: 1074-1084.

Guarner, F., G. Perdigon, G. Corthier, S. Salminen, B. Koletzko, L. Morelli. 2005. Should yoghurt cultures be considered probiotic? *Br. J. Nutr.* 93(6): 783-786.

Halliwell, B. 2000. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? *Cardiovasc. Res.* 47(3): 410-418.

Lin, W. C., S. C. Ku., W. L. Lin., H. L. Fang., B. C. Wang. 2006. Fibrosis of the liver: representative molecular elements and their emerging role as anti-fibrotic targets. *Hepatology: A Textbook of Liver Disease.* *World J. Gastroenterol.* 12(15): 2369-2374.

Harbrecht, B. G., M. D. Silvio, V. Chough, Y. M. Kim, R. L. Simmons, T. R. Billiar. 1997. Glutathione regulates nitric oxide synthase in cultured hepatocytes. *Ann. Surg.* 225(1): 76-87.

Harikrishnan, R., M. C. Kim, J. S. Kim, C. Balasundaram, M. S. Heo. 2011. Immunomodulatory effect of probiotics enriched diets on *Uronema marinum* infected olive flounder. *Fish Shellfish. Immunol.* 30(3): 964-971.

Hironaka, K., I. Sakaida, Y. Matsumura, S. Kaino, K. Miyamoto, K. Okita. 2000. Enhanced interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-13) production of Kupffer cell by gadolinium chloride prevents pig serum induced rat liver fibrosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267: 290-295.



- Holt, A. P., M. Salmon, C. D. Buckley, D. H. Adams. 2008. Immune interactions in hepatic fibrosis. *Clin. Liver. Dis.* 12(4): 861-882.
- Hsieh, C. C., H. L. Fang, W. C. Lina. 2008. Inhibitory effect of *Solanum nigrum* on thioacetamide-induced liver fibrosis in mice. *J. Ethnopharmacol.* 119(1): 117-121.
- Hung, K. S., T. H. Lee, W. Y. Chou, C. L. Wu, C. L. Cho, C. N. Lu. 2005. Interleukin-10 gene therapy reverses thioacetamide-induced liver fibrosis in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336(1): 324-331.
- Iredale, J. P., S. Goddard, G. Murphy, R. C. Benyon, M. J. Arthur. 1995. Tissue inhibitor of metalloproteinase-I and interstitial collagenase expression in autoimmune chronic active hepatitis and activated human hepatic lipocytes. *Clin. Sci. Lond.* 89: 75-81.
- Kaizu, H., M. Sasaki, H. Nakajima, Y. Suzuki. 1993. Effect of antioxidative lactic acid bacteria on rats fed a diet deficient in vitamin E. *J. Dairy. Sci.* 76: 2493-2499.
- Karantonis, H. C., G. Gribilas, I. Stamoulis, C. Giaginis, C. Spiliopoulou, G. Kouraklis, C. Demopoulos, S. E. Theocharis. 2010. Platelet-activating factor involvement in thioacetamide-induced experimental liver fibrosis and cirrhosis. *Dig. Dis. Sci.* 55(2): 276-84.
- Kim, S., E. H. Chung, M. Gilbert, K. E. Healy. 2005. Synthetic MMP-13 degradable ECMs based on poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) semi-interpenetrating polymer networks. I. Degradation and cell migration. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 75(1): 73-88.
- Knittel, T., M. Medhe, D. Kobold, B. Saile, C. Dinter, G. Ramadori. 1999. Expression patterns of matrix metalloproteinases, and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: regulation by TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ . *J. Hepatol.* 30: 48-60.
- Knodell, R. G., K. G. Ishak, W. C. Black, T. S. Chen, R. Craig, N. Kaplowitz. 1981. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology.* 1: 431-435.

- Kolida, S., K. Tuohy, G. R. Gibson. 2002. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *Br. J. Nutr.* 87: S193-S197.
- Korpela, R., K. Peuhkuri, T. Lahteenmaki, E. Sievi, M. Saxelin, H. Vapaatalo. 1997. *Lactobacillus rhamnosus GG* shows antioxidative properties in vascular endothelial cell culture. *Milchwissenschaft.* 52: 503-505.
- Lauer-Fields, J. L., D. Juska, G. B. Fields. 2002. Matrix metalloproteinases and collagen catabolism. *Biopolymers.* 66: 19-32.
- L'Abbate, A., C. Kusmic, M. Matteucci, G. Pelosi, A. Navari, A. Pagliazzo, P. Longobardi, R. Bedini. 2010. Gas embolization of the liver in a rat model of rapid decompression. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 299(2): 673-682.
- Lechuga, C. G., Z. H. Hernández-Nazara, J. A. Domínguez Rosales, E. R. Morris, A. R. Rincón, A. M. Rivas-Estilla, A. Esteban-Gamboa, M. Rojkind. 2004. TGF-beta1 modulates matrix metalloproteinase-13 expression in hepatic stellate cells by complex mechanisms involving p38MAPK, PI3-kinase, AKT, and p70S6k. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287(5): 974-987.
- Lee, J. W., K. D. Shin, M. Lee. 2003. Role of metabolism by flavincontaining monooxygenase in thioacetamide-induced immunosuppression. *Toxicol. Lett.* 136: 163-172.
- Lee, H. Y., J. H. Park, S. H. Seok, M. W. Baek, D. J. Kim, K. E. Lee. 2006. Human originated bacteria, *Lactobacillus rhamnosus* PL60, produce conjugated linoleic acid and show anti-obesity effects in diet-induced obese mice. *Biochim. Biophys. Acta.* 1761(7): 736-744.
- Lin, M. Y., and C. L. Yen. 1999. Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 47: 1460-1466.
- Li, C. Y., H. C. Lin, C. H. Lai, J. J. Lu, S. F. Wu, S. H. Fang. 2011. Immunomodulatory Effects of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on Both Murine and Human Mitogen-Activated T Cells. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* 156(2): 128-136.

- Low, T. Y., C. K. Leow, M. Salto-Tellez, M. C. Chung. 2004. A proteomic analysis of thioacetamide-induced hepatotoxicity and cirrhosis in rat livers. *Proteomics*. 4: 3960-3974.
- Maher, J. J., and R. F. McGuire. 1990. Extracellular matrix gene expression increases preferentially in rat lipocytes and sinusoidal endothelial cells during hepatic fibrosis in vivo. *J. Clin. Invest.* 86: 1641-1648.
- Mato, J. M., F. J. Corrales, S. C. Lu, M. A. Avila. 2002. S-Adenosylmethio-nine: a control switch that regulates liver function. *Faseb. J.* 16: 15-26.
- Mato, J. M., L. Alvarez, P. Ortiz, M. A. Pajares. 1997. S-adenosylmethioni-ne synthesis: molecular mechanisms and clinical implications. *Pharmacol. Ther.* 73: 265-280.
- Mato, J. M., F. J. Corrales, S. C. Lu, M. A. Avila. 2002 S-adenosylmethionine: a control switch that regulates liver function. *Faseb. J.* 16(1): 15-26.
- Mikelsaar, M., and M. Zilmer. 2009. *Lactobacillus fermentum* ME-3-an antimicrobial and antioxidative probiotic. *Microb. Ecol. Health Dis.* 21(1): 21-27.
- Nagashima, H., K. Maeda-Nakamura, K. Iwashita, T. Goto. 2006. Induced secretion of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in vivo and in vitro by hepatotoxin rubratoxin B. *Food. Chem. Toxicol.* 44(7): 1138-1143.
- Nakatsukasa, H., P. Nagy, R. P. Evarts, C. C. Hsia, E. Marsden, S. S. Thorgeirsson. 1990. Cellular distribution of transforming growth factor-beta 1 and procollagen types I, III, and IV transcripts in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. *J. Clin. Invest.* 85: 1833-1843.
- Narayan, S. S., S. Jalgaonkar, S. Shahani, V. N. Kulkarni. 2010. Probiotics: current trends in the treatment of diarrhoea. *Hong Kong Med J.* 16(3): 213-218.
- Neumanre, Loganma. 1950. The determination of hydroxyproline. *J. Biol. Chem.* 184(1): 299-306.
- Paik, H. D., J. S. Park, E. Park. 2005. Effects of *Bacillus polyfermenticus* SCD on lipid and antioxidant metabolisms in rats fed a high-fat and high-cholesterol diet. *Biol. Pharm. Bull.* 28(7): 1270-1274.

- Paneda, C., I. Gorospe, B. Herrera, T. Nakamura, I. Fabregat, I. Varela-Nieto. 2002. Liver cell proliferation requires methionine adenosyltransferase 2A mRNA up-regulation. *Hepatology*. 35: 1381-1391.
- Perez-Tamayo, R. 1983. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl<sub>4</sub> and adequate model of human cirrhosis? *Hepatology*. 3: 112-120.
- Porter, W. R., and R. A. Neal. 1978. Metabolism of thioacetamide and thioacetamide S-oxide by rat liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* 6(4): 379-388.
- Ramalingam, T. R., J. T. Pesce, M. M. Mentink-Kane, S. Madala, A. W. Cheever, M. R. Comeau, S. F. Ziegler, T. A. Wynn. 2009. Regulation of helminth-induced Th2 responses by thymic stromal lymphopoietin. *J. Immunol.* 182(10): 6452-6459.
- Rizki, G., L. Arnaboldi, B. Gabrielli, J. Yan, G. S. Lee, R. K. Ng. 2006. Mice fed a lipogenic methionine-choline-deficient diet develop hypermetabolism coincident with hepatic suppression of SCD-1. *J. Lipid. Res.* 47(10): 2280-2290.
- Rodríguez, J. L., A. Boukaba, J. Sandoval, E. I. Georgieva, M. U. Latasa, N. García-Trevijano-Sanz, C. Díez-Fernandez, D. Andres, M. Cascales. 2002. Hepatotoxicity and aging: endogenous antioxidant systems in hepatocytes from 2-, 6-, 12-, 18- and 30-month-old rats following a necrogenic dose of thioacetamide. *Biochim. Biophys. Acta.* 1587: 12-20.
- Sanders, J. W., L. J. Leehouts, A. J. Haandrikman, G. Venema, J. Kok, 1995. Stress response in *Lactobacillus lactis*: Cloning, expression analysis, and mutation of the lactococcal superoxide dismutase gene. *J. Bacteriol.* 177: 5254-5260.
- Sato, M., S. Suzuki, H. Senoo. 2003. Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell. Struct. Funct.* 28(2):105-112.
- Seki, E., S. De-Minicis, C. H. Osterreicher, J. Kluwe, Y. Osawa, D. A. Brenner, R. F. Schwabe. 2007. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat. Med.* Nov. 13(11): 1324-1332.
- Senoo, H. 2004. Structure and function of hepatic stellate cells. *Med. Electron. Microsc.* 37(1): 13-15.

- Senoo, H., N. Kojima, M. Sato. 2007. Vitamin A-storing cells (stellate cells). *Vitam. Horm.* 75: 131-59.
- Serviddio, E. R., G. Nakamura, T. Avila, M. A. Sastre, J. Torres, L. Mato, J. M. G. López-Rodas. 2007. Transcription of the MAT2A gene, coding for methionine adenosyltransferase, is up-regulated by E2F and Sp1 at a chromatin level during proliferation of liver cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39(4): 842-50.
- Simic, M. C. 1988. Mechanisms of inhibition of free-radical processed in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.* 202: 377-386.
- So, E. C., K. L. Wong, T. C. Huang, S. C. Tasi, C. F. Liu. 2002. Tetramethylpyrazine protects mice against thioacetamide-induced acute hepatotoxicity. *J. Biomed. Sci.* 9: 410-414.
- Sturgill, M. G., G. H. Lambert. 1997. Xenobiotic-induced hepatotoxicity: mechanisms of liver injury and methods of monitoring hepatic function. *Clinical Chemistry.* 43: 1512-1526.
- Torres-Lopez, M. I., I. Fernandez, L. Fontana, A. Gil, A. Rios. 1996. Influence of dietary nucleotides on liver structural recovery and hepatocyte binuclearity in cirrhosis induced by thioacetamide. *Gut.* 38: 260-264.
- Tsukada, S., C. J. Parsons, R. A. Rippe. 2006. Mechanisms of liver fibrosis. *Clinical Chimica Acta.* 364: 33-60.
- Tuomola, E., R. Crittenden, M. Playne, E. Isolauri, S. Salminen. 2001. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 393-398.
- Veldhoen, M., B. Stockinger. 2006. TGFbeta1, a "Jack of all trades": the link with pro-inflammatory IL-17-producing T cells. *Trends. Immunol.* 27(8): 358-361.
- Vissers, Y. M., J. Snel, P. F. Zuurendonk, B. A. Smit, H. J. Wichers, H. F. Savelkoul. 2010. Differential effects of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* strains on cytokine induction in human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.* 59(1): 60-70.

- Wang, Y., N. Xu, A. Xi, Z. Ahmed, B. Zhang, X. Bai. 2009. Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from Tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84(2): 341-7.
- Whaley-Connell, A., P. A. McCullough, J. R. Sowers. 2011. The role of oxidative stress in the metabolic syndrome. *Rev. Cardiovasc. Med.* 12(1): 21-29.
- Wu, J. B., H. R. Chuang, L. C. Yang, W. C. Lin. 2010. A standardized aqueous extract of *Anoectochilus formosanus* ameliorated thioacetamide-induced liver fibrosis in mice: the role of Kupffer cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74(4): 781-787.
- Wynn, T. A. 2007. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J. Clin. Invest.* 117(3): 524-529.
- Yamada, Y., N. Fausto. 1998. Deficient liver regeneration after carbon tetrachloride in mice lacking type 1 but not type 2 tumor necrosis factor receptor. *American Journal of Pathology.* 152: 1577-1589.
- Yadav, H., S. Jain, P. R. Sinha. 2007. Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats. *Nutrition.* 23(1): 62-68.
- Zaret, K., S. M. Grompe. 2008. Generation and regeneration of cells of the liver and pancreas. *Science.* 322(5907): 1490-1494.

表一、優酪乳對硫代乙醯胺誘發肝纖維化 BALB/c 體重與器官重量的變化。

Table 1. Effect of body weight and organ weight on yoghurt treatment BALB/c mice in TAA- induced hepatic fibrosis.

Group	Body weight, g	Liver weight, g	Spleen weight, g	Body/liver, g
Naïve	27.48 ± 0.96 <sup>b</sup>	1.54 ± 0.05 <sup>c</sup>	0.10 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.06 ± 0.00 <sup>c</sup>
TAA induced				
Control	23.56 ± 0.86 <sup>a</sup>	2.33 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.09 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.10 ± 0.00 <sup>a</sup>
LY, 12.5 ml/kg	24.64 ± 0.74 <sup>a</sup>	2.11 ± 0.19 <sup>a</sup>	0.10 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.09 ± 0.01 <sup>b</sup>
MY, 25 ml/kg	23.82 ± 2.02 <sup>a</sup>	2.04 ± 0.14 <sup>b</sup>	0.10 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.09 ± 0.00 <sup>b</sup>
HY, 50 ml/kg	24.93 ± 0.90 <sup>a</sup>	1.88 ± 0.30 <sup>b</sup>	0.10 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.08 ± 0.01 <sup>b</sup>

Naïve : 正常組 ; Control : 對照組 ; LY : 優酪乳低劑量組, 12.5 ml/kg ; MY : 優酪乳中劑量組, 25 ml/kg ; HY : 優酪乳高劑量組, 50 ml/kg 。<sup>a-c</sup> : 同行中不同字母表示有顯著差異 ( $P < 0.05$ ) 。

Naïve : untreated group ; Control : control group ; LY : yoghurt low dose treatment group, 12.5 ml/kg ; MY : yoghurt medium dose treatment group, 25 ml/kg ; HY : yoghurt high dose treatment group, 50 ml/kg. <sup>a-c</sup> : Different letters in the same column indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

表二、優酪乳對硫代乙醯胺誘發肝纖維化 BALB/c 小鼠蘇木紫與伊紅染色之病理  
 評分(空泡性)。

Table 2. Effect of yoghurt on pathological score (vacuolization) in TAA-induced liver  
 fibrosis of BALB/c mice.

Group	Vacuolization					Mean
	-	+	++	+++	++++	
Naïve	5	0	0	0	0	0
-----						
TAA induced						
Control	0	0	4	6	0	2.60 <sup>##</sup>
LY, 12.5 ml/kg	0	0	2	4	0	2.67
MY, 25 ml/kg	0	2	3	1	0	1.80 <sup>**</sup>
HY, 50 ml/kg	0	0	4	2	0	2.30 <sup>**</sup>

Naïve：正常組；Control：對照組；LY：優酪乳低劑量組，12.5 ml/kg；MY：優酪乳中劑量組，25 ml/kg；HY：優酪乳高劑量組，50 ml/kg。<sup>a-c</sup>：同行中不同字母表示有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

Naïve：untreated group；Control：control group；LY：yoghurt low dose treatment group, 12.5 ml/kg；MY：yoghurt medium dose treatment group, 25 ml/kg；HY：yoghurt high dose treatment group, 50 ml/kg。<sup>a-c</sup>：Different letters in the same column indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).



表三、優酪乳對硫代乙醯胺誘發肝纖維化 BALB/c 小鼠蘇木紫與伊紅染色之病理  
 評分(細胞壞死)。

Table 3. Effect of yoghurt on pathological score (necrosis) in TAA-induced liver  
 fibrosis of BALB/c mice.

Group	Necrosis					Mean
	-	+	++	+++	++++	
Naïve	5	0	0	0	0	0.00
-----						
TAA induced						
Control	0	9	1	0	0	1.10 <sup>##</sup>
LY, 12.5 ml/kg	0	6	0	0	0	1.00
MY, 25 ml/kg	0	6	0	0	0	1.00
HY, 50 ml/kg	0	6	0	0	0	1.00

Naïve：正常組；Control：對照組；LY：優酪乳低劑量組，12.5 ml/kg；MY：優酪乳中劑量組，25 ml/kg；HY：優酪乳高劑量組，50 ml/kg。<sup>a-c</sup>：同行中不同字母表示有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

Naïve：untreated group；Control：control group；LY：yoghurt low dose treatment group, 12.5 ml/kg；MY：yoghurt medium dose treatment group, 25 ml/kg；HY：yoghurt high dose treatment group, 50 ml/kg. <sup>a-c</sup>：Different letters in the same column indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

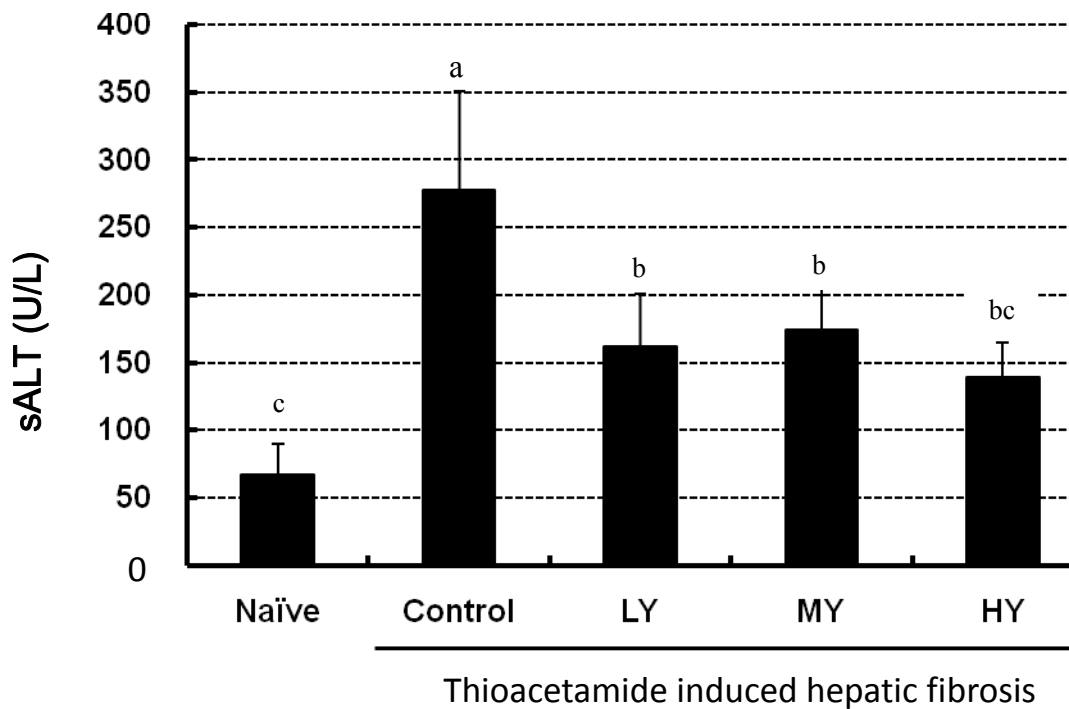
表四、優酪乳對硫代乙醯胺誘發肝纖維化 BALB/c 小鼠蘇木紫與伊紅染色之病理  
 評分(纖維化)。

Table 4. Effect of yoghurt on pathological score (fibrosis) in TAA-induced liver  
 fibrosis of BALB/c mice.

Group	Fibrosis					Mean
	-	+	++	+++	++++	
Naïve	5	0	0	0	0	0
-----						
TAA induced						
Control	0	6	4	0	0	1.40 <sup>##</sup>
LY, 12.5 ml/kg	1	2	3	0	0	1.30
MY, 25 ml/kg	1	2	3	0	0	1.30
HY, 50 ml/kg	0	6	0	0	0	1.00 <sup>**</sup>

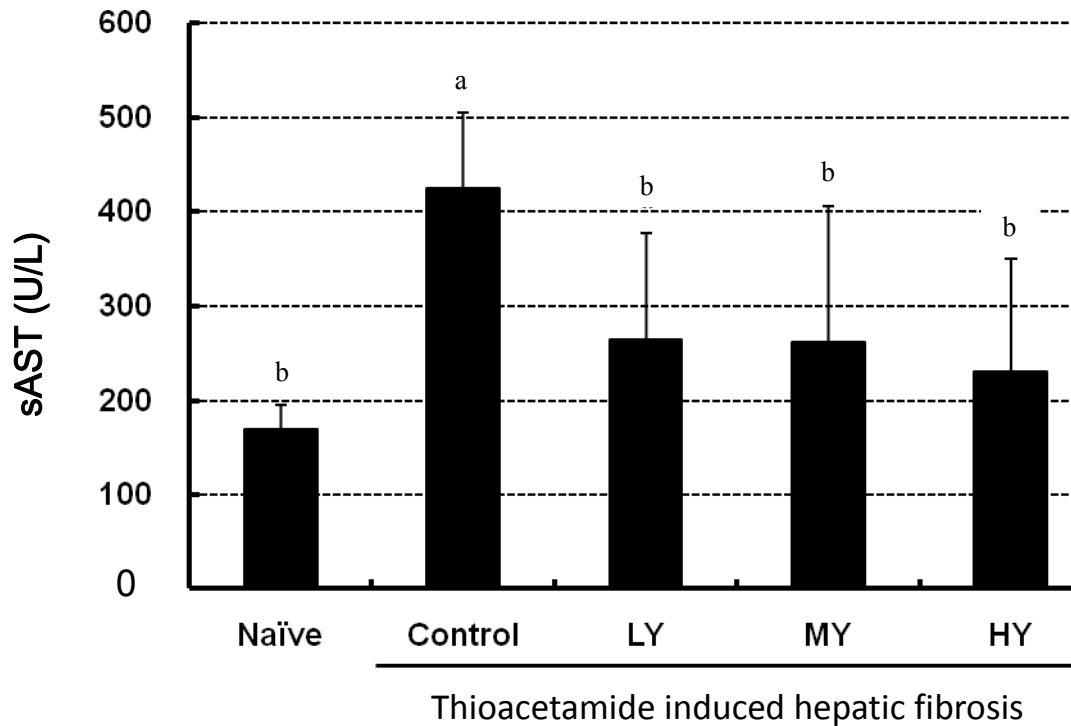
Naïve：正常組；Control：對照組；LY：優酪乳低劑量組，12.5 ml/kg；MY：優酪乳中劑量組，25 ml/kg；HY：優酪乳高劑量組，50 ml/kg。<sup>a-c</sup>：同行中不同字母表示有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

Naïve：untreated group；Control：control group；LY：yoghurt low dose treatment group, 12.5 ml/kg；MY：yoghurt medium dose treatment group, 25 ml/kg；HY：yoghurt high dose treatment group, 50 ml/kg。<sup>a-c</sup>：Different letters in the same column indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).



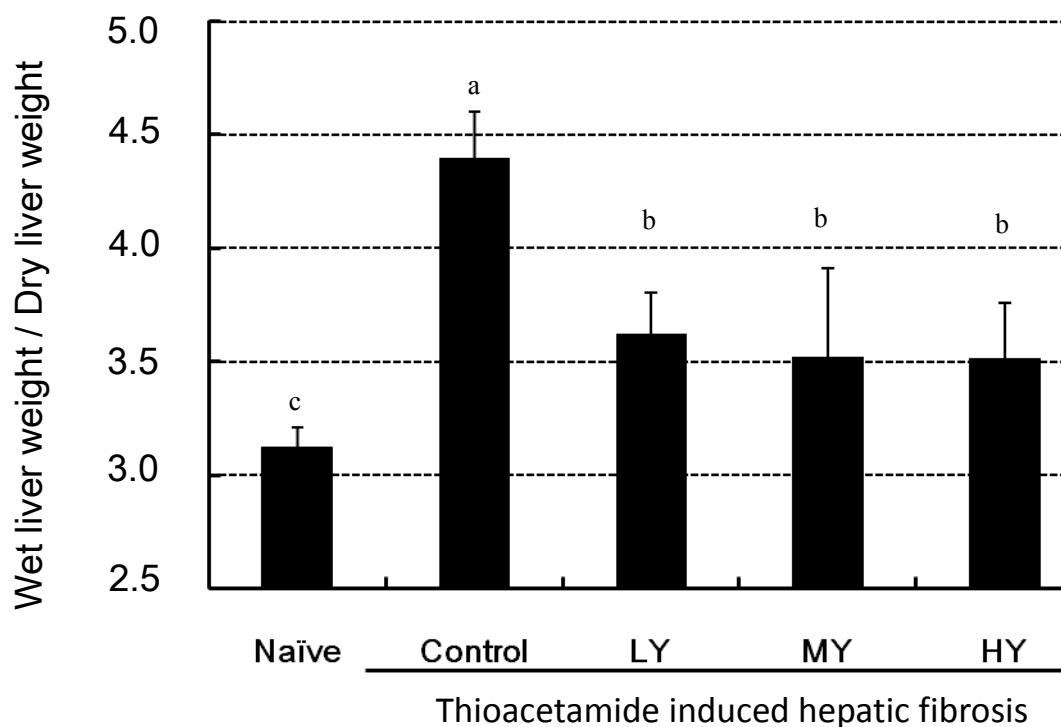
圖一、優酪乳對硫代乙醯胺誘發肝纖維化 BALB/c 小鼠血清中麩丙酮酸轉胺酶的影響。  
 Naïve：正常組；Control：對照組；LY：優酪乳低劑量組，12.5 ml/kg；MY：優酪乳中劑量組，25 ml/kg；HY：優酪乳高劑量組，50 ml/kg。<sup>a-c</sup>：同行中不同字母表示有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

Figure 1. Effect of yoghurt on serum ALT in TAA-induced hepatic fibrosis of BALB/c mice. Naïve : untreated group ; Control : control group ; LY : yoghurt low dose treatment group, 12.5 ml/kg ; MY : yoghurt medium dose treatment group, 25 ml/kg ; HY : yoghurt high dose treatment group, 50 ml/kg. <sup>a-c</sup> : Different letters in the same column indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).



圖二、優酪乳對硫代乙醯胺誘發肝纖維化 BALB/c 小鼠血清中麩草醋酸轉胺酶的影響。Naïve：正常組；Control：對照組；LY：優酪乳低劑量組，12.5 ml/kg；MY：優酪乳中劑量組，25 ml/kg；HY：優酪乳高劑量組，50 ml/kg。<sup>a-c</sup>：同行中不同字母表示有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

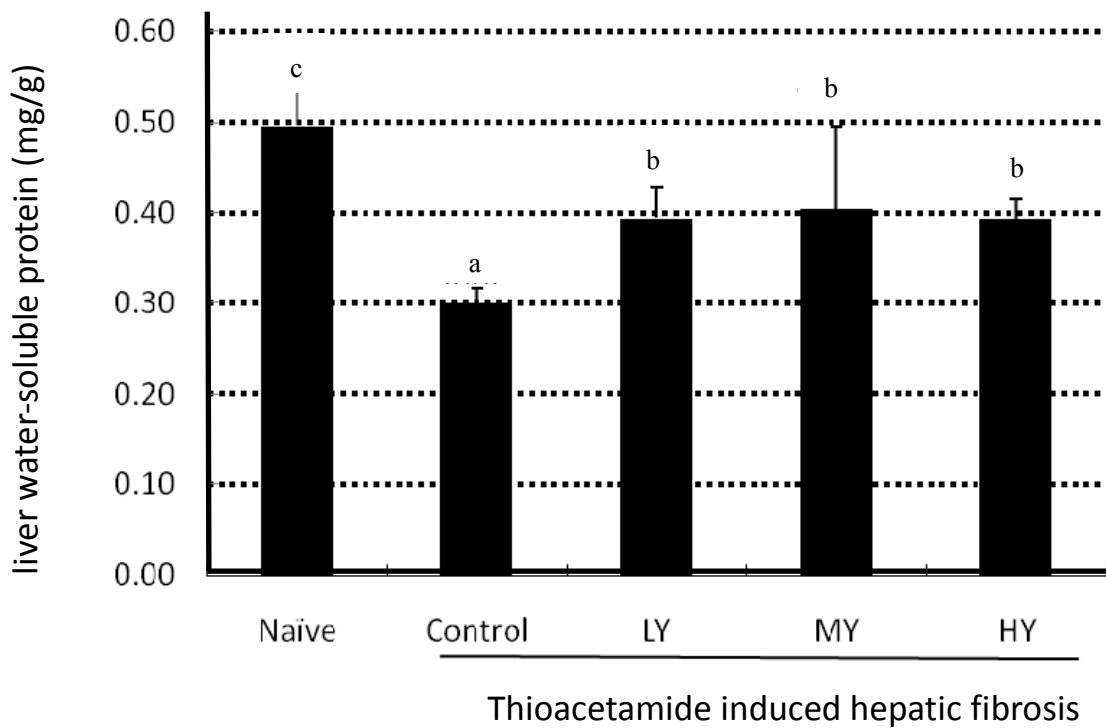
Figure 2. Effect of yoghurt on serum AST in TAA-induced hepatic fibrosis of BALB/c mice. Naïve : untreated group ; Control : control group ; LY : yoghurt low dose treatment group, 12.5 ml/kg ; MY : yoghurt medium dose treatment group, 25 ml/kg ; HY : yoghurt high dose treatment group, 50 ml/kg. <sup>a-c</sup> : Different letters in the same column indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).



圖三、優酪乳對硫代乙醯胺誘發肝纖維化 BALB/c 小鼠肝臟乾溼重比的影響。

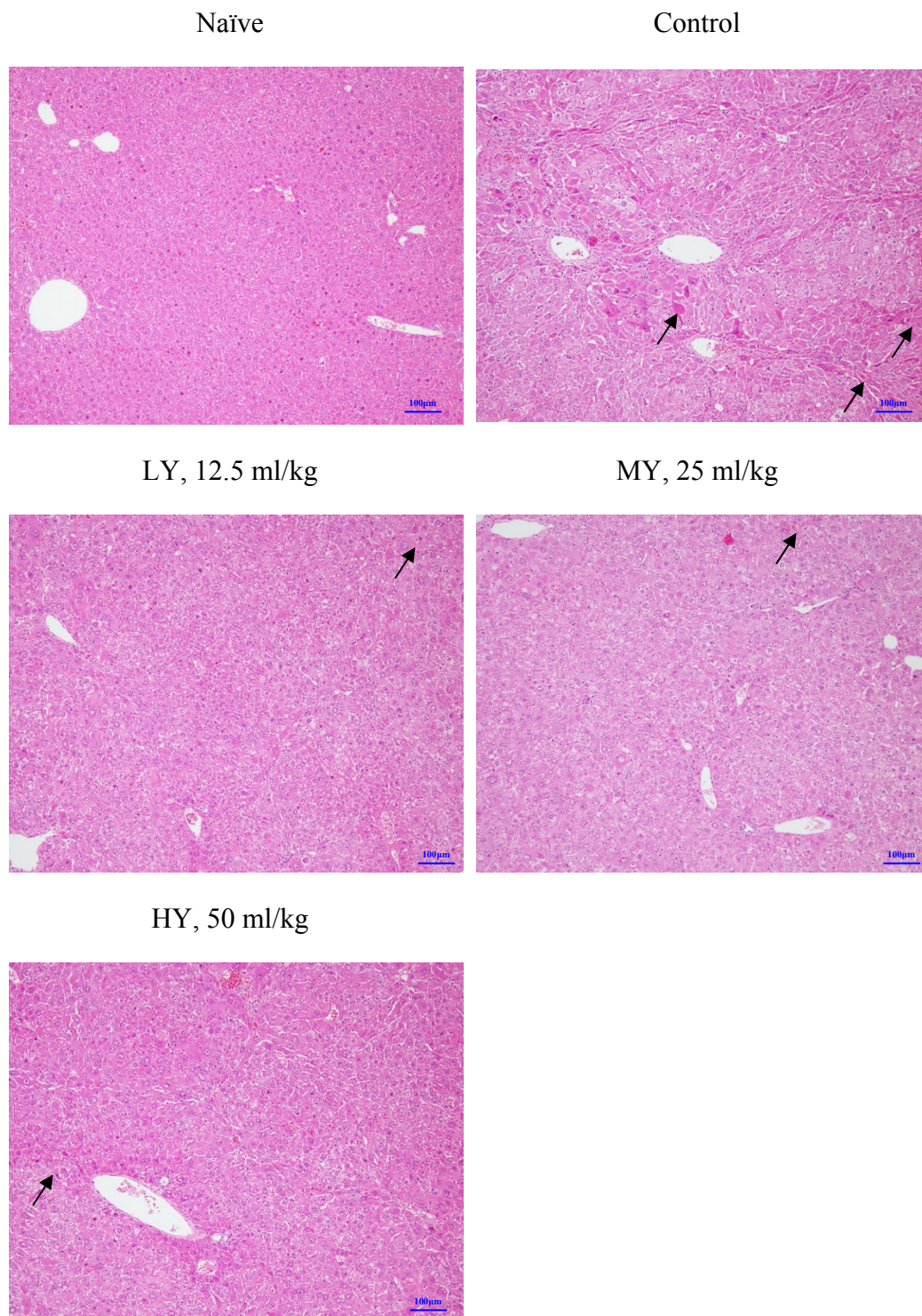
Naïve：正常組；Control：對照組；LY：優酪乳低劑量組，12.5 ml/kg；MY：優酪乳中劑量組，25 ml/kg；HY：優酪乳高劑量組，50 ml/kg。<sup>a-c</sup>：同行中不同字母表示有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

Figure 3. Effect of yoghurt on wet dry liver in TAA-induced hepatic fibrosis of BALB/c mice. Naïve : untreated group ; Control : control group ; LY : yoghurt low dose treatment group, 12.5 ml/kg ; MY : yoghurt medium dose treatment group, 25 ml/kg ; HY : yoghurt high dose treatment group, 50 ml/kg. <sup>a-c</sup> : Different letters in the same column indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).



圖四、優酪乳對硫代乙醯胺誘發肝纖維化 BALB/c 小鼠肝臟水溶性蛋白質含量的影響。Naïve：正常組；Control：對照組；LY：優酪乳低劑量組，12.5 ml/kg；MY：優酪乳中劑量組，25 ml/kg；HY：優酪乳高劑量組，50 ml/kg。<sup>a-c</sup>：同行中不同字母表示有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

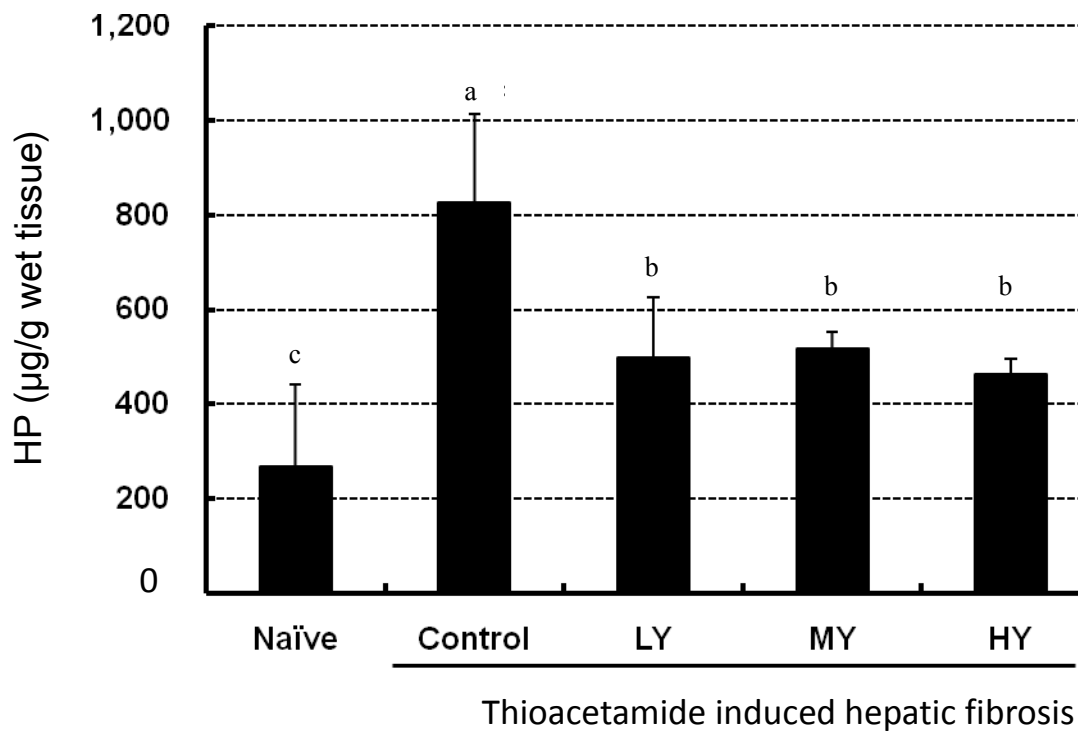
Figure 4. Effect of yoghurt on liver water-soluble protein in TAA-induced hepatic fibrosis of BALB/c mice. Naïve : untreated group ; Control : control group ; LY : yoghurt low dose treatment group, 12.5 ml/kg ; MY : yoghurt medium dose treatment group, 25 ml/kg ; HY : yoghurt high dose treatment group, 50 ml/kg. <sup>a-c</sup> : Different letters in the same column indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).



圖五、優酪乳對硫代乙醯胺誘發肝纖維化 BALB/c 小鼠蘇木紫與伊紅染色變化。

箭頭所指為細胞損傷位置。

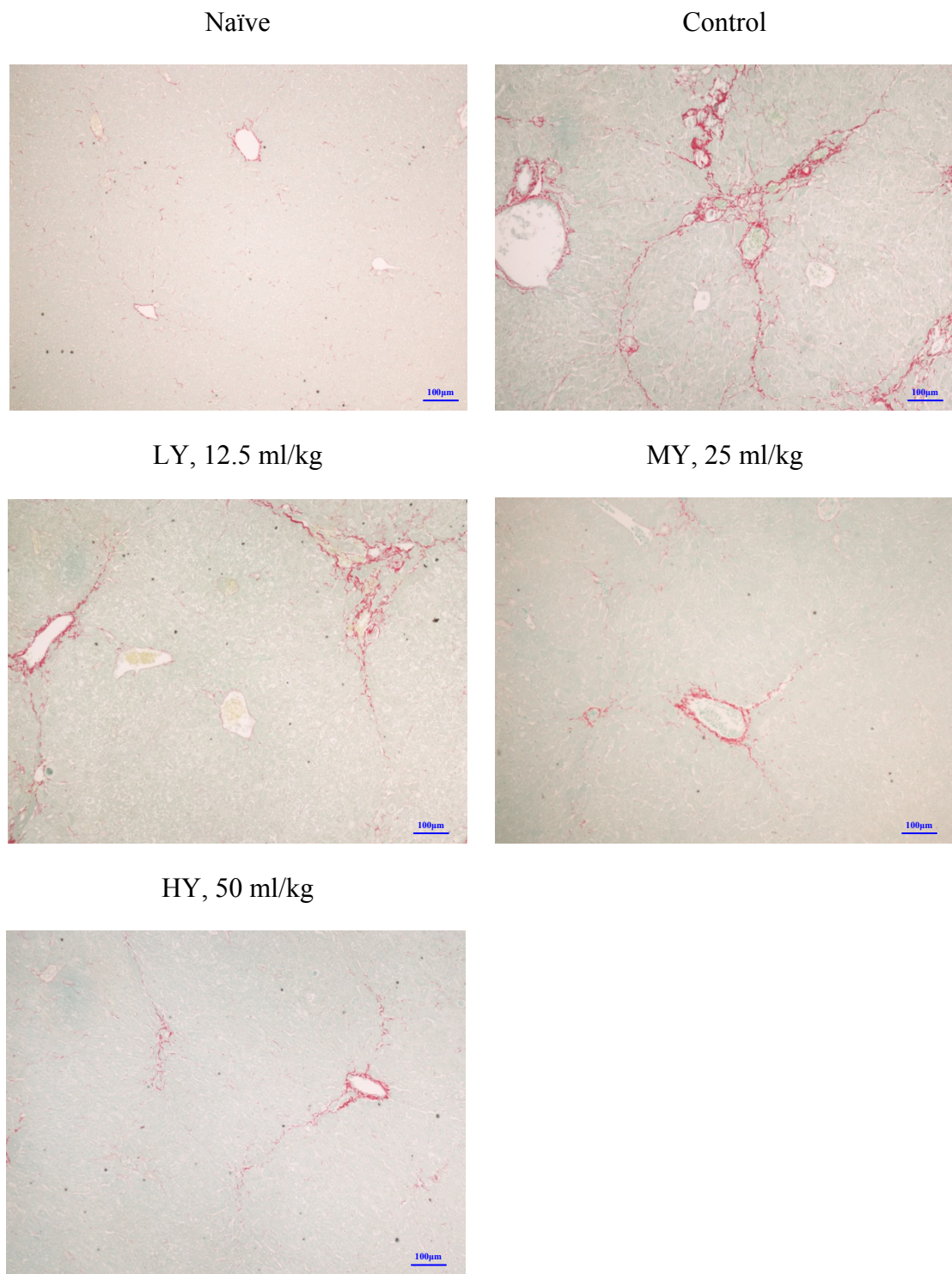
Figure 5. Effect of yoghurt on hisopathological exam (H & E stain) in TAA-induced hepatic fibrosis of BALB/c mice. The arrows indicate that cell damage.



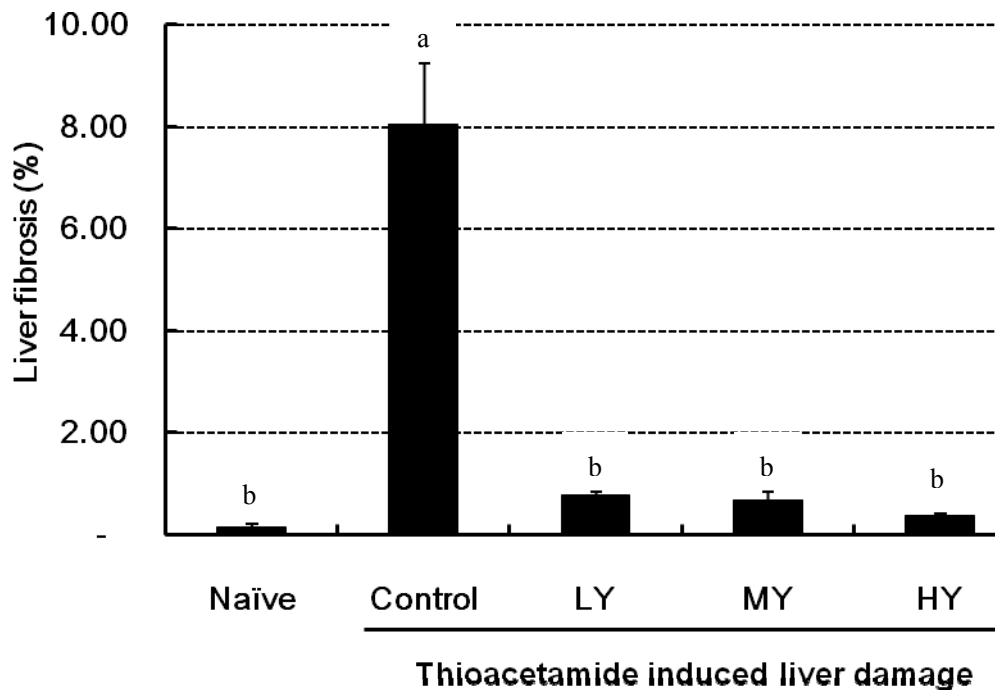
圖六、優酪乳對硫代乙醯胺誘發肝纖維化 BALB/c 小鼠肝臟羥基脯氨酸含量的影響。Naïve：正常組；Control：對照組；LY：優酪乳低劑量組，12.5 ml/kg；MY：優酪乳中劑量組，25 ml/kg；HY：優酪乳高劑量組，50 ml/kg。<sup>a-c</sup>：同行中不同字母表示有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

Figure 6. Effect of yoghurt on liver hydroxyproline in TAA-induced hepatic fibrosis of BALB/c mice. Naïve : untreated group ; Control : control group ; LY : yoghurt low dose treatment group, 12.5 ml/kg ; MY : yoghurt medium dose treatment group, 25 ml/kg ; HY : yoghurt high dose treatment group, 50 ml/kg. <sup>a-c</sup> : Different letters in the same column indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).





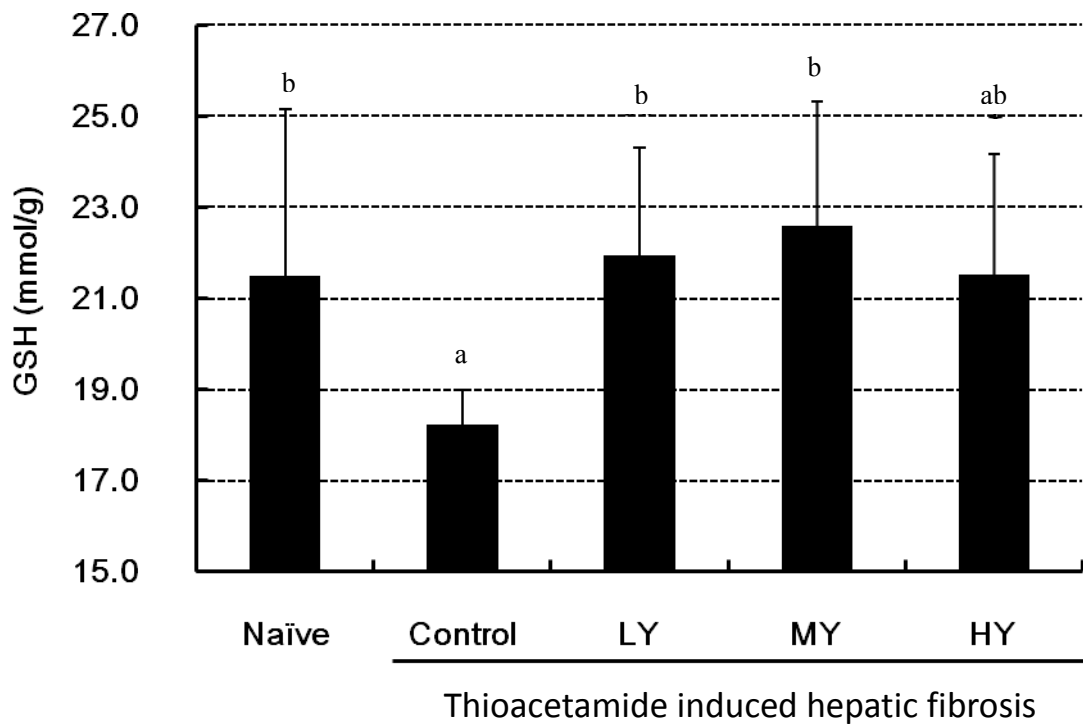
圖七、優酪乳對硫代乙醯胺誘發肝纖維化 BALB/c 小鼠之膠原蛋白沉積之影響  
Figure 7. Effect of yoghurt on liver collagen deposition in TAA-induced hepatic fibrosis of BALB/c mice.



圖八、優酪乳對硫代乙醯胺誘發肝纖維化 BALB/c 小鼠肝臟纖維化百分比。

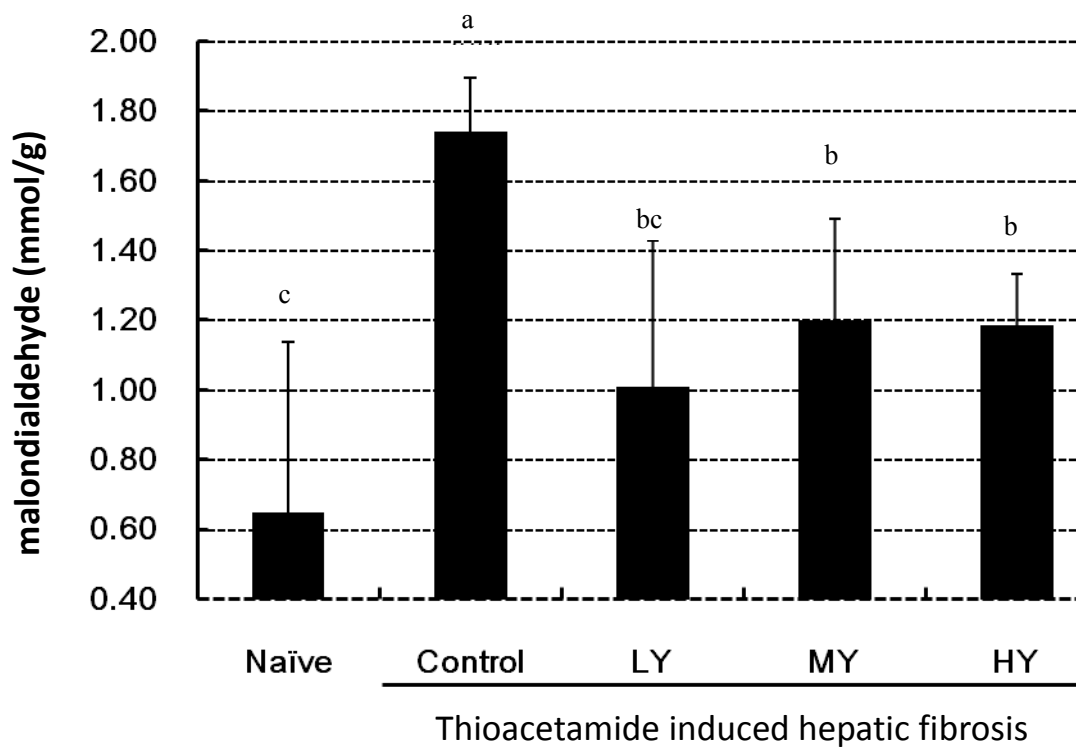
Naïve：正常組；Control：對照組；LY：優酪乳低劑量組，12.5 ml/kg；MY：優酪乳中劑量組，25 ml/kg；HY：優酪乳高劑量組，50 ml/kg。<sup>a-c</sup>：同行中不同字母表示有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

Figure 8. Effect of yoghurt on hepatic fibrosis percentage in TAA-induced hepatic fibrosis of BALB/c mice. Naïve : untreated group ; Control : control group ; LY : yoghurt low dose treatment group, 12.5 ml/kg ; MY : yoghurt medium dose treatment group, 25 ml/kg ; HY : yoghurt high dose treatment group, 50 ml/kg. <sup>a-c</sup> : Different letters in the same column indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).



圖九、優酪乳對硫代乙醯胺誘發肝纖維化 BALB/c 小鼠肝臟穀胱甘肽含量的影響。 Naïve：正常組；Control：對照組；LY：優酪乳低劑量組，12.5 ml/kg；MY：優酪乳中劑量組，25 ml/kg；HY：優酪乳高劑量組，50 ml/kg。<sup>a-c</sup>：同行中不同字母表示有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

Figure 9. Effect of yoghurt on GSH<sub>a</sub> AA-induced hepatic fibrosis of BALB/c mice. Naïve : untreated group ; Control : control group ; LY : yoghurt low dose treatment group, 12.5 ml/kg ; MY : yoghurt medium dose treatment group, 25 ml/kg ; HY : yoghurt high dose treatment group, 50 ml/kg. <sup>a-c</sup> : Different letters in the same column indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

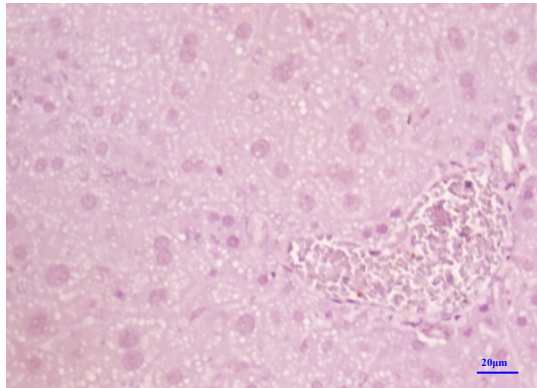


圖十、優酪乳對硫代乙醯胺誘發肝纖維化 BALB/c 小鼠肝臟丙二醛含量的影響。

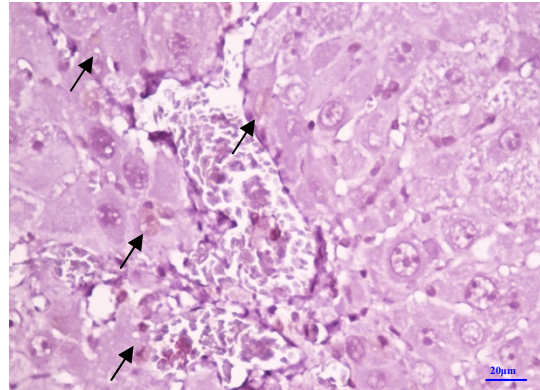
Naïve：正常組；Control：對照組；LY：優酪乳低劑量組，12.5 ml/kg；MY：優酪乳中劑量組，25 ml/kg；HY：優酪乳高劑量組，50 ml/kg。<sup>a-c</sup>：同行中不同字母表示有顯著差異 ( $P < 0.05$ )。

Figure 10. Effect of yoghurt on liver MDA in TAA-induced hepatic fibrosis of BALB/c mice. Naïve : untreated group ; Control : control group ; LY : yoghurt low dose treatment group, 12.5 ml/kg ; MY : yoghurt medium dose treatment group, 25 ml/kg ; HY : yoghurt high dose treatment group, 50 ml/kg. <sup>a-c</sup> : Different letters in the same column indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

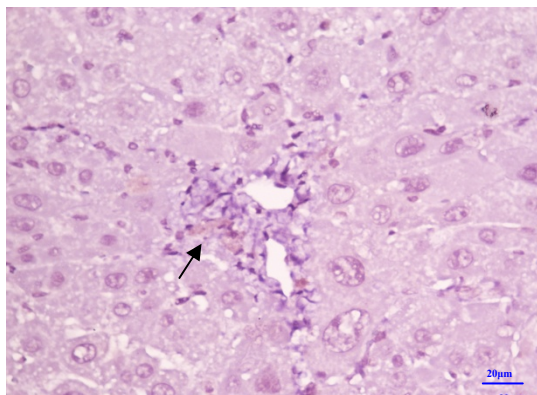
Naïve



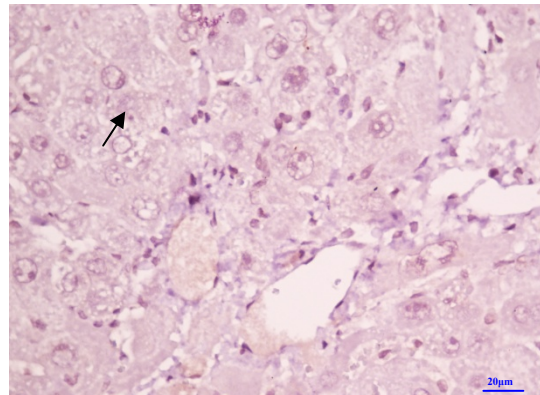
Control



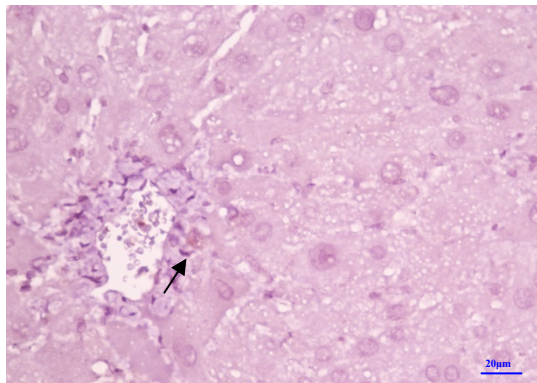
LY, 12.5 ml/kg



MY, 25 ml/kg

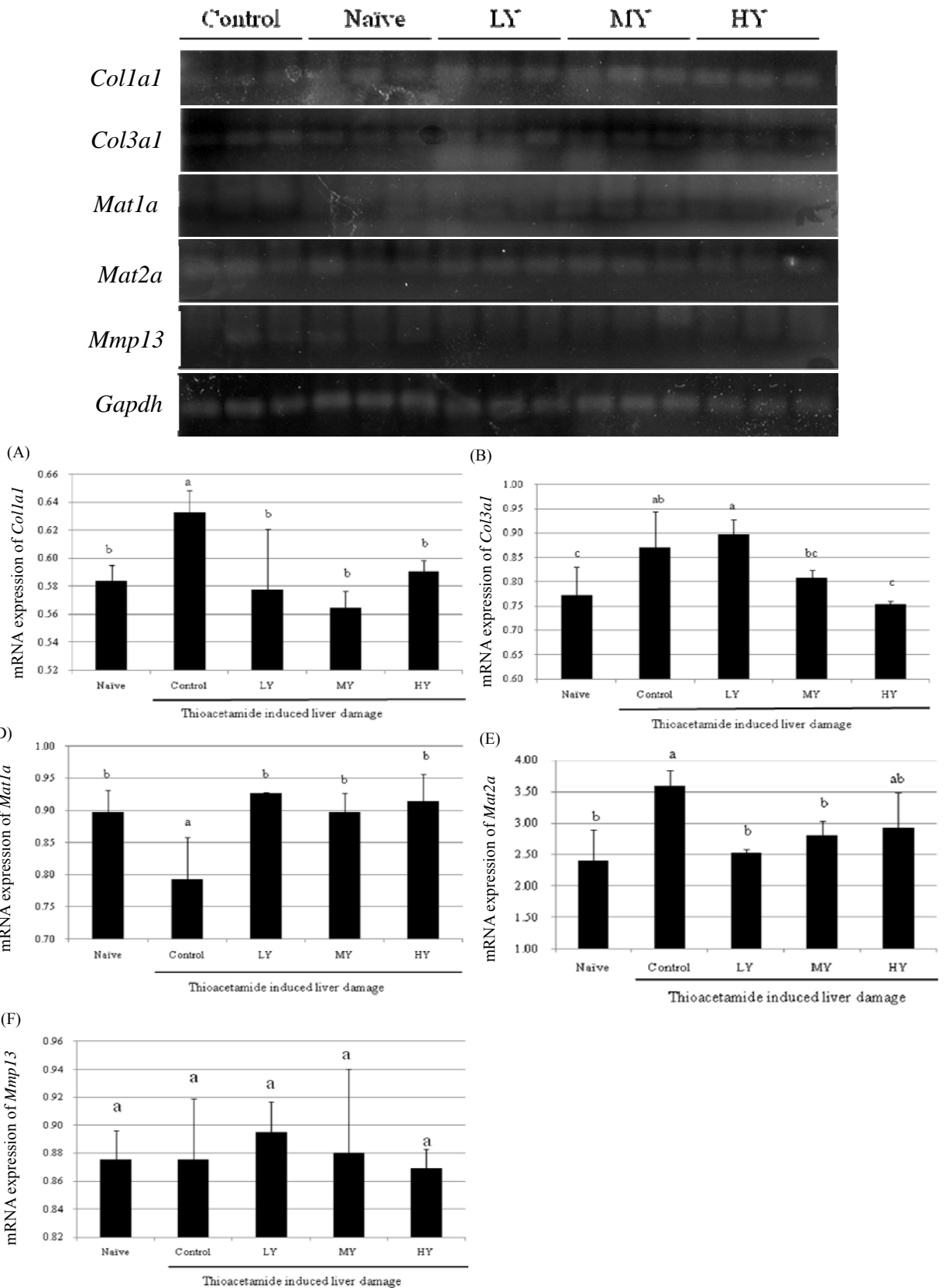


HY, 50 ml/kg



圖十一、優酪乳對硫代乙醯胺誘發肝纖維化 BALB/c 小鼠 TSLP 染色之影響。箭頭所指為 TSLP 表現位置。

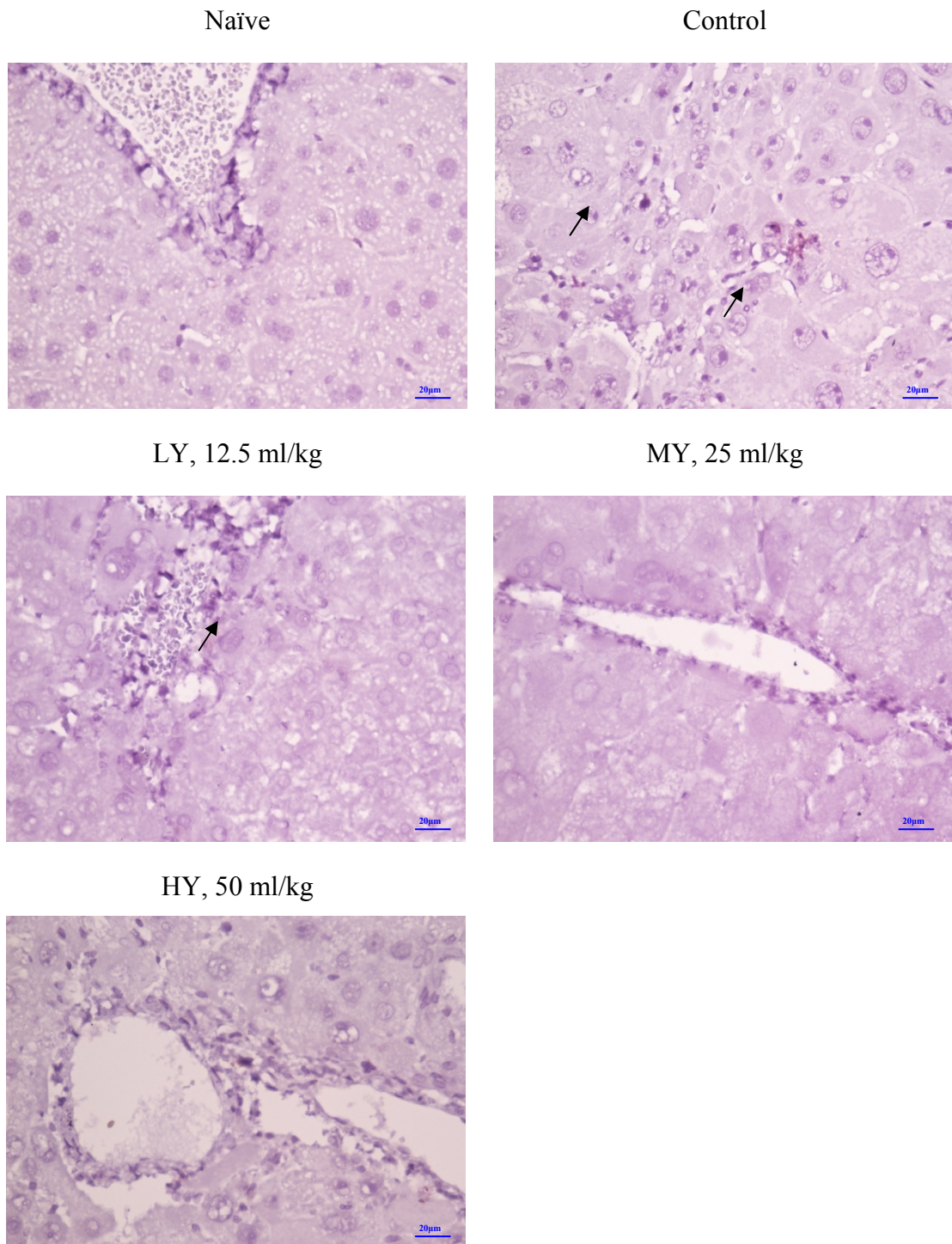
Figure 11. Effect of yoghurt on TSLP stain in TAA-induced hepatic fibrosis of BALB/c mice. The arrows indicate that TSLP.



圖十二、優酪乳對硫代乙醯胺誘發肝纖維化 BALB/c 小鼠 mRNA 表現。

Figure 12. Effect of yoghurt on the hepatic mRNA expression in TAA-induced hepatic fibrosis of BALB/c mice.





圖十三、優酪乳對硫代乙醯胺誘發肝纖維化 BALB/c 小鼠 p-Smad2/3 染色之影響。箭頭所指為 p-Smad2/3 表現位置。

Figure 13. Effect of yoghurt on p-Smad2/3 stain in TAA-induced hepatic fibrosis of BALB/c mice. The arrows indicate that p-Smad2/3.

PA 048

**Anti-hepatic fibrosis effect of yogurt in thioacetamide induced liver fibrosis**

Yan-Wen Chen (陳彥文), Chang-Chi Hsieh (謝長奇)

Department of Animal Science and Biotechnology, Tunghai University

Yogurt is a milk fermented product that beneficially affects the human by selectively stimulating the growth and/or activity of one or a limited number of bacteria in the colon that can improve the human health. In this study, we used yogurt to treat thioacetamide (TAA)-induced murine liver fibrosis. Hepatic fibrosis was modeling by TAA (0.2 mg/kg) three times a week for 8 weeks in male BALB/c mice. Mice in the five TAA groups were treated daily with distilled water as control group, low-dose yogurt, medium-dose yogurt and high-dose yogurt (LDY, MDY and HDY in 12.5, 25 and 50 ml/kg/day) via gastrogavage throughout the experimental period. TAA caused liver damage in increased serum alanine aminotransferase (ALT) and hepatic hydroxyproline contents. Compared with TAA group, MDY and HDY treatment groups significantly decreased the activities of ALT and hydroxyproline contents. Histological examination in inflammatory indicator of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) was significantly reduced in HDY group. On the other hand, fibrosis associate protein Smad2/3 phosphorylation (p-Smad2/3) was also reduced in MDY and HDY group. Our data indicated anti-hepatic fibrosis effect of yogurt might be via down-regulated TSLP and p-Smad2/3 in inflammation and further fibrosis. It is suggest that oral administration of yogurt significantly protect TAA-induced murine hepatic fibrosis.

Keyword: Hepatic fibrosis, p-Smad2/3, Thioacetamide, TSLP, Yogurt



附錄二 動物實驗審查同意書

東海大學實驗動物照護與使用委員會審查同意書  
Affidavit of Approval of Animal Care and Use Protocol  
Tunghai University

動物實驗申請表暨同意書編號： 100-5

計畫申請人： 謝長奇 職稱： 副教授  
單位： 畜產與生物科技學系 飼養/應用地點： 農學院 / 實驗動物房  
計畫名稱： 探討優酪乳對肝臟損傷之保護作用

本計畫之「動物實驗申請表」業經實驗動物照護與使用委員會  
實質 形式審查通過。

本計畫預定飼養應用之動物如下：

動物種類	動物數量	計畫執行期間
Mice-BALB/c	75 隻	100 年 2 月 1 日至 100 年 7 月 31 日

The animal use protocol listed below has been reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

Protocol Title: The protective effects of anti-liver fibrosis in yogurt

IACUC Approval No: 100-5

Period of Protocol: Valid From: 02/01/2011 To: 07/31/2011 (mm/dd/yyyy)

Principle Investigator (PI): Hsieh, Chang-Chi

實驗動物照護與使用委員會召集人  日期 100. 4. 01  
IACUC Chairman \_\_\_\_\_ Date \_\_\_\_\_