

R
0088
305 ✓
87

中山醫學院營養科學研究所
Graduate Institute of Nutritional Science
Chung Shan Medical and Dental College

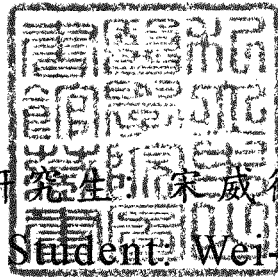
碩士論文
Master Thesis

維生素 E 對於大白鼠體內抗氧化系統和解毒酶
素所造成的影響

Effect of dietary vitamin E on antioxidant status
and hepatic cytochrome P450 enzymes in
Sprague-Dawley rats

指導教授：陳 暉 雯 博士

Advisor : Haw-Wen Chen, Ph. D.



研究生 宋 威 徹

Graduate Student: Wei-Che Sung

參考書恕不外借

中華民國八十七年七月

July, 1998

中山醫學院圖書館



C050084

授權書

(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學院 營養科學研究所
組 86 學年度第 2 學期所撰 碩士 學位論文。

論文名稱：維生素 E 對於大白鼠體內抗氧化系統和解毒酵素所造成的影響

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文提要，授予國家圖書館、本人畢業學校及行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得重製成電子資料檔後收錄於該單位之網路，並與台灣學術網路及科技網路連線，得不限地域時間與次數，以光碟或紙本重製發行。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得不限地域時間與次數以微縮、光碟重製後發行，並得享該中心微縮小組製作之研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔資料等值新台幣伍佰元之服務。本論文因涉及專利等智慧財產權之申請，請將本論文全文延後至民國 __ 年 __ 月後再公開。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限時間與地域，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。

指導教授姓名：陳暉雯

研究生簽名：李威強 學號：r85302
(親筆正楷)

日期：民國 87 年 7 月 30 日

- 備註：1. 上述同意與不同意之欄位若未勾選，本人同意視同授權。
2. 授權第二項者，請再交論文一本予承辦人員。
3. 本授權書已於民國 85 年 4 月 10 日送請著委會修正定稿。

簽署人須知

1. 依著作權法的規定，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先得到著作財產權人授權，請分別在三種利用方式的同意欄內鈎選並填妥各項資料。
2. 所謂非專屬授權是指被授權人所取得的權利並非獨占性的使用權，授權人尚可將相同的權利重複授權給他人使用；反之即為專屬授權，如果您已簽署專屬授權書予其他法人或自然人，請勿簽署本授權書。
3. 授權人的權利與義務：
在美國授權博碩士論文予UMI公司(博碩士論文全文資料發行公司)製作發行，須交付美金 45 元的出版費，銷售年逾七件以上時得享收入 10%的權利金約美金 20 元；在國內本計畫之經費全數由政府支應，收入亦應歸國庫，為答謝您的支持，科資中心特為您提供新台幣 500 元的等值資料服務(以研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔為限)，請逕洽本案聯絡人，地址電話詳如 第5項。義務方面唯一要注意是，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可以授權其他自然人或法人上述的行為。
4. 全國博碩士論文全文資料微縮片整合計畫的宏觀效益：
在個人方面，您的論文將可永久保存(微縮技術在理論上可保存八百年，實證已逾百年)，也因為您的授權，使得後進得以透過電腦網路與光碟多管道檢索，您的論文將因而被充分利用。在國家總體利益方面，紙本容易因影印而造成裝訂上的傷害，圖書館中孤本的公開陳列與外借也有破損之虞，唯有賴政府全面性的整合，借助科技設備才能一舉完成保存與利用的全方位效益，回憶您過去尋找資料之不便經驗，學弟與學妹確實須要您的論文與授權書。
5. 本案聯絡電話：(02)7377746 江守田、王淑貞
地址：台北市和平東路二段 106 號 17 樓 1702 室

研究生姓名：宋 威 徹 聯絡電話：0224523853

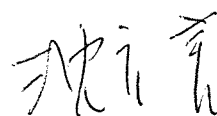
地址：基隆市五堵長安街 259 巷 22 號

本論文為中山醫學院授與理學碩士學位之必備條件之一，經中山醫學院營養科學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

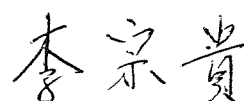
私立中國醫藥學院營養系副教授

沈立言 博士



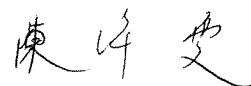
私立中山醫學院營養科學研究所教授

李宗貴 博士



私立中山醫學院營養科學研究所教授

陳暉雯 博士



(論文指導教授)

中華民國八十七年七月

學生宋威徹論文題目維生素 E 對於大白鼠體內抗氧化系統和解毒酵素所造成的影響，其論文已經中山醫學院營養科學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：陳暉雯 教授 簽名：陳暉雯

中華民國 87 年 7 月

謝 誌

本論文完成，承蒙指導教授 陳暉雯 博士之指導與校閱，得以完成碩士論文，學生由衷感激，謹於此致上由衷敬意與謝忱。

感謝 李宗貴 博士和 沈立言 博士在百忙期間批閱斧正本文，提供許多寶貴意見，使本論文更加完整，謹致上最誠摯的謝意。

兩年來的研究生活，幸運的認識這麼多的同學、學長姐和學弟妹，謝謝你們在生活及實質上的幫助，在此一併致上最誠摯的謝意。同時也希望同學工作順利，學弟妹實驗順利。另外特別感謝大哥、大嫂及姑姑在生活上之照顧，提供良好的居住環境，使我能無後顧之憂地完成實驗。

最後感謝我的父母多年來的養育栽培之恩，以及妹妹、眾多好友的關懷與鼓勵，將此小小的成果獻給每一位家人及所有關心我的師長及朋友，願與大家共同分享這份喜悅。

宋威徹 謹誌於

中山醫學院 營養科學研究所

中華民國八十七年七月

目 錄

Part 1. 不同含量維生素 E 對於大白鼠體內 抗氧化系統和解毒酵素所造成的影響	1
中文摘要	2
英文摘要	4
壹、前言	6
貳、文獻探討	
一、自由基的產生	8
二、脂質氧化	9
三、細胞組織氧化傷害	10
四、生物體內的抗氧化系統	
(一) 維生素 E	12
(二) 維生素 C	15
(三) 麩胱甘肽	16
(四) 超氧化歧化酶(superoxide dismutase, SOD)	17
五、生物體內的解毒代謝系統	18
六、細胞色素 P450	20
七、細胞色素 P450 誘發脂質過氧化反應 ..	22
八、維生素 E 與細胞色素 P450	23
文獻圖一、維生素 E 之異構物	25
文獻圖二、維生素 E 與自由基作用	26
文獻圖三、維生素 E 再生	27

文獻圖四、脂質過氧化與細胞色素 P450 關係	28
-------------------------------	----

參、研究動機	29
--------------	----

肆、材料與方法

一、實驗動物及飼料	30
二、動物飼養	30
三、大鼠犧牲及樣品收集	31
四、肝臟微小體及細胞質液之製備	31
五、蛋白質濃度測定	32
六、脂質過氧化物分析	33
七、維生素 C 濃度測定	34
八、維生素 E 濃度測定	35
九、血漿蛋白質硫醇濃度測定	37
十、GSH 及 GSSG 濃度測定	37
十一、血漿中尿酸濃度測定	40
十二、超氧化歧化酶活性測定	40
十三、麩胱甘肽過氧化酵素活性測定	41
十四、麩胱甘肽還原酶活性測定	42
十五、肝臟中麩胱甘肽硫轉移酶活性測定 ..	42
十六、肝臟 Total P450 含量測定	43
十七、肝臟細胞色素 P450 還原酶活性測定 ..	44
十八、肝臟 N-nitrosodimethylamine	

demethylase(NDMA)活性測定	44
十九、肝臟 Pentoxeresorufin O-depentylase (POD) 活性測定	45
二十、肝臟磷脂質脂肪酸成分分析	46
二一、統計分析	48
伍、結果	49
陸、討論	53

表次

表一、實驗飼料組成	58
表二、不同維生素 E 處理對大鼠生長情形的 影響	59
表三、不同維生素 E 處理對大鼠紅血球麩胱 甘肽的影響	60
表四、不同維生素 E 處理對大鼠體內水溶性 抗氧化分子的影響	61
表五、不同維生素 E 處理對大鼠紅血球及肝 臟抗氧化酵素的影響	62
表六、不同維生素 E 處理對大鼠肝臟細胞色 素 P-450 及麩胱甘肽硫轉移酶活性的 影響	63
表七、不同維生素 E 處理對大鼠肝臟磷脂質 脂肪酸組成的影響	68

圖次

圖一、不同維生素 E 處理對大鼠血漿維生素 E 濃度的影響	64
圖二、不同維生素 E 處理對大鼠肝中維生素 E 濃度的影響	65
圖三、不同維生素 E 處理對大鼠血漿脂質過氧化物濃度的影響	66
圖四、不同維生素 E 處理對大鼠肝中脂質過氧化物濃度的影響	67

Part 2. 飲食中不同維生素 E 含量對腹腔注射 phenobarbital 大鼠體內解毒酵素所造成的影響	69
中文摘要	70
英文摘要	72
壹、前言	74
貳、文獻探討	75
參、研究動機	78
肆、材料與方法	79
伍、結果	83
陸、討論	85

表次

表一、AIN-76 飼料組成	88
表二、實驗飼料組成	89
表三、在 phenobarbital 處理下，同時餵飼 不同維生素 E 含量飲食對大鼠生長情 形的影響	90
表四、在 phenobarbital 處理下，同時餵飼 不同維生素 E 含量飲食對大鼠體內維 生素 E 及脂質過氧化物濃度的影 響	91
表五、在 phenobarbital 處理下，同時餵飼 不同維生素 E 含量飲食對大鼠肝臟細 胞色素 P-450 及麩胱甘肽硫轉移酶活 性的影響	92
表六、在 phenobarbital 處理下，同時餵飼 不同維生素 E 含量飲食對大鼠肝臟微 粒體 POD (CYP 2B1) 蛋白質定量.	94

圖次

圖一、在 phenobarbital 處理下，同時餵飼 不同維生素 E 含量飲食對大鼠肝臟微 粒體 POD (CYP 2B1) 蛋白質表現的 影響	93
--	----

結論	95
----------	----

參考文獻	96
附錄	117



Part 1

不同含量維生素E對於大鼠體內抗氧化系統和解毒酵素所造成的影響

中 文 摘 要

自由基所誘發的脂質過氧化作用，造成動物體內細胞傷害，而維生素 E 主要存在細胞膜上，是目前已知最重要的天然脂溶性抗氧化劑，它可以藉由本身結構中的酚基，提供一個氫質子轉移到自由基，而達到抗氧化的防禦作用。近年來也有研究指出，維生素 E 的攝取對於老鼠肝臟微粒體氧化還原代謝酵素會產生影響，所以本次實驗有兩大目標，一是探討飲食中維生素 E 對於動物體內抗氧化系統的影響，二是評估它對肝臟微粒體酵素系統的影響。

實驗採用 18 隻雄性 Sprague-Dawley 大鼠，分成三組分別餵飼含 0、100 和 1500 ppm 維生素 E 的飼料七週，實驗分析項目，在抗氧化系統方面比較三組老鼠紅血球、血漿和肝臟組織脂質過氧化物濃度 (TBARS)，維生素 C、E 含量，麩胱甘肽 (GSH)，GSSG，尿酸(uric acid) 濃度，以及麩胱甘肽還原酶(GSH reductase)，麩胱甘肽過氧化酶(GSH peroxidase) 以及超氧化歧化酶(SOD)活性；肝臟微粒體酵素系統分析 total P450 content，NADPH P450 reductase、CYP2E1、CYP2B1 及 GST 活性。

結果顯示飼料中維生素 E 顯著影響血漿及肝臟中維

生素 E 的濃度，而且維生素 E 能有效的抑制 TBARS 的形成。在抗氧化作用方面顯示維生素 E 對紅血球 GSH、GSSG、肝臟細胞質部分的 SOD 和 GSH reductase 活性及血漿中 uric acid 濃度有顯著影響。而對微粒體酵素系統方面 CYP2B1 和 GST 酵素活性，會隨維生素 E 含量增加而有增加趨勢。

關鍵詞：維生素 E，細胞色素 P450，抗氧化系統

麩胱甘肽硫轉移酶

Abstract

Lipid peroxidation caused by free-radicals leads to destruction of cells in the animal body. Vitamin E present mainly in the cell membrane, is recognized as one of the most important natural fat-soluble antioxidant. With the presence of phenyl group can transfer a hydrogen atom to the free radical, thereby exerts its antioxidative effect. Recent researches have shown that dietary vitamin E can affect the activities of hepatic cytochrome P-450 enzymes, however the results were not consistent. The goals of the present study are to investigate the influence of vitamin E on antioxidant status and antioxidant enzymes and to investigate the effect of vitamin E on activities of hepatic cytochrome P-450 enzymes. Three groups of 6 Sprague-Dawley rats were fed 0, 100 or 1500 ppm vitamin E for 7 weeks. The results show that dietary vitamin E significantly influence the concentrations of vitamin E in plasma and liver, and vitamin E can significantly inhibit the formation of TBARS ($p < 0.05$). For antioxidative effect, it shows that vitamin E affects the concentrations of RBC reduced glutathione (GSH), and GSSG, SOD and GSH reductase activities in hepatic cytosolic fraction, and uric acid level in the plasma. For microsomal enzymes, the CYP2B1 and

GST activities were positively correlated with the dietary vitamin E level.

Keywords: Vitamin E 、 Cytochrome P-450 、 GST
Antioxidation system

前 言

環境中許多的毒物，不論是來自於工業、農業或是醫藥用途，會在生物體內經氧化還原作用產生自由基 (Yasuda et al., 1997; Poyer et al., 1980)。這些自由基能與體內的分子包括脂質、蛋白質、核酸和酵素作用。自由基產生的主要來源有細胞色素 P450 解毒作用 (Ando et al., 1985)、粒線體的電子傳遞、脂質氧化 (Esterbauer and Cheeseman, 1987)、NADPH 氧化酶和巨噬細胞吞噬作用 (Chance et al., 1979)。

生物體內有一套抗氧化防禦系統，可以分成兩大類，第一類抗氧化的防線是抗氧化酵素，包含有超氧化物歧化酶 (SOD)、觸酶 (catalase) 和麩胱甘肽過氧化酶 (GSH peroxidase)，這些酵素在生物體內可自行合成且預防自由基的生成，減低自由基所造成的傷害。另一類抗氧化的防線是抗氧化分子如維生素 C、維生素 E、 β -胡蘿蔔素、麩胱甘肽 (GSH)、蛋白硫醇和尿酸等，這些物質可以提供氫質子給予自由基，使不穩定的高能自由基轉變為較安定的產物而降低其攻擊能力。而在這類抗氧化系統中，維生素 E 在脂溶性的環境中扮演重要的角色。防止因化學藥物 (Lalonde et al., 1997)、飲

食攝取 (Wander et al., 1997) 和運動 (Dekkers et al., 1996) 所產生自由基對生物體造成的傷害。它直接提供一個氫質子給予自由基，使其轉變為穩定的產物，而自己形成相對穩定共振結構的維生素 E 自由基 (α -tocopheroxyl radical) (Chow, 1991)。

維生素 E 在細胞內主要存在細胞膜上，當維生素 E 缺乏時，首當其衝是細胞膜組織，很容易受到外來的氧化刺激，而發生氧化傷害，而存在膜上的酵素蛋白如微粒體細胞色素 P450 活性，是否也會受到影響，是本實驗探討的目標。大鼠將給予不同維生素 E 含量的飲食為期七週，觀察維生素 E 對動物體內脂質過氧化產物、抗氧化酵素和其它抗氧化分子的影響，同時也探討它對細胞色素 P450 酵素活性的影響。

文獻探討

一、自由基的產生

自由基及活性氧的產生，是因為生物體內的抗氧化以及氧化作用二者之間未能達成平衡所致。氧是細胞生存必需的分⼦，當細胞進行藥物代謝或正常生理功能時，例如細胞色素 P450 的解毒作用、粒線體的電子傳遞、脂質氧化、NADPH 氧化和巨噬細胞吞噬作用時，常會伴隨活性氧分子的產生(Chance et al., 1979)。這些活性氧分子包括： 1O_2 (singlet oxygen)、 $O_2^{\cdot-}$ (superoxide radical)、 H_2O_2 (hydrogen peroxide)、 OH^{\cdot} (hydroxyl radical) 等(Klebanoff, 1980)。這些分子在正常狀況下，可以透過生物體內的抗氧化系統將其清除，當體內的抗氧化防禦系統未能將大量生成的活性氧分子清除時，將會造成細胞內抗氧化物質的損耗、脂質的過氧化、膜結構的破壞以及 DNA 的損壞，因而導致細胞受傷進而死亡(Gilbert, 1981)。目前已知與自由基產生有關的疾病包括粥狀動脈硬化、風溼性關節炎、威爾森氏症(Deiss et al., 1970)和癌症(Horvarth

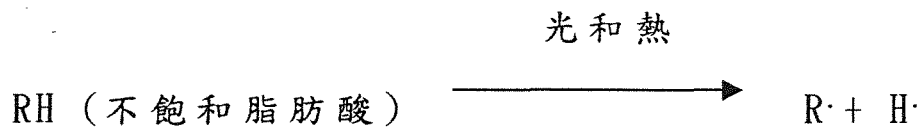
and Ip, 1983)等。

二、脂質過氧化

脂質過氧化的發生是指存在生物體內的不飽和脂肪酸受到氧化傷害，脂質過氧化可產生多種產物，例如脂質氫過氧化物或多種醛、酮、酸等，這是一種自由基連鎖反應所生成的產物，脂質的過氧化可分成三個階段，包括起始、連鎖和終止作用 (Halliwell and Gutteridge, 1990)。

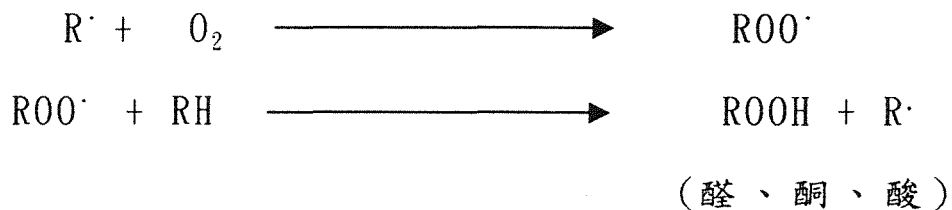
(1) 起始期 (initiation phase)

不飽和鍵 (雙鍵) 上的碳氫受到外界因子影響而失去氫離子形成自由基。



(2) 連鎖期 (propagation phase)

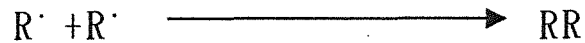
氫過氧化物的生成並進行連鎖反應。



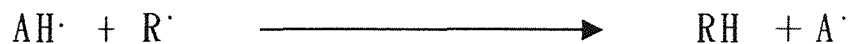
(3) 終止期 (termination phase)

此過氧化過程，可受下列作用而終止。

* 兩個自由基相互作用，產生非自由基產物，反應終止。



將自由基清除，如自由基的清除者(維生素 E)，便可參與此反應，與自由基結合成穩定產物而自己本身形成較安定的自由基。



三、細胞組織氧化傷害

細胞膜的主要結構，是由脂質、蛋白質和少部分的碳水化合物所組成。膜脂質的成分主要有磷脂類(phospholipids)、固醇類(sterol)等，其中主要的磷脂類有磷酸甘油酯(phosphoglycerides)，至於膽固醇則是細胞膜中最常見的固醇類。細胞膜中膽固醇和脂肪酸的含量控制著膜的流動性，而位於膜上的蛋白質分

子包括酵素、抗體、抗原等，也具有特殊的生理功能(Ben-Zeev et al., 1979)。當細胞遭受氧化傷害攻擊時，除了脂質成分受到氧化傷害外，位於細胞膜上的蛋白質，也會受到活性氧分子的攻擊(Richards et al., 1988)。分析脂質過氧化物(TBARS)的生成，可瞭解脂質過氧化情形(Cadenas et al., 1996)。另外當細胞遭受氧化傷害攻擊時，蛋白質可發生不可逆交錯、連結(Schuessler and Schilling, 1984)或分解反應(Dean et al., 1986)。這時由於細胞膜上結構成分發生改變，加上外層的膜與細胞架構接點處分離，可使得細胞膜的流動性增加，而造成細胞膜的穩定性下降(Jacobson et al., 1983; Schlessinger et al., 1983)。另外也有可能進一步誘發細胞架構不正常的去聚合反應(depolymerization)，造成細胞膜上細胞架構蛋白完整性受到破壞(Schlessinger et al., 1983)。隨著細胞膜的脂質經過氧化作用後，會改變膜的流動性、膜電位、氫離子和其它離子的通透性增加，最後導致細胞破裂、胞器釋出。如何避免細胞傷害，最有效的方法是減少暴露在氧化緊迫的環境和增強體內的抗氧化系統(Chow, 1979)。

四、生物體內的抗氧化系統

生物體內進行正常的代謝、活化或是解毒作用時，常會伴隨著多種自由基的產生，因而造成生物體內的氧化傷害。生物為了要預防或降低此一氧化傷害，在體內有一套完整的抗氧化系統

(Cotgreave et al., 1988)，包括有抗氧化分子，其中依溶解性可區分為脂溶解性的維生素 E 和 β -胡蘿蔔素，和水溶解性的有麩胱甘肽 (GSH)、維生素 C 和尿酸等。除了抗氧化分子外，另外還有抗氧化酵素，包括超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、觸酶 (catalase) 和麩胱甘肽過氧化酶 (glutathione peroxidase, GSH Px) 等，

透過這一完整抗氧化系統，生物在體內築起一道嚴密的防線，防止細胞受到氧化傷害。

(一) 維生素 E

維生素 E 的歷史及其結構

維生素 E 主要是存在植物油中，在早期的研究指出若老鼠體內缺乏維生素 E 則喪失生育的能力

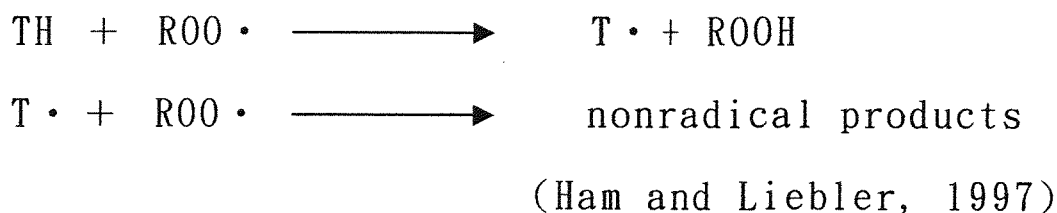
(Century and Horwitt, 1965), 所以維生素 E 又被稱為生育醇, 是一種淡黃色油狀物可以溶在有機溶劑, 在自然界中有多種異構物, 分別是 α 、 β 、 γ 、 δ (圖一)。異構物間的差異是由於酚類環上接甲基的數目與位置不同, 其抗氧化能力強弱分別是 $\alpha > \beta > \gamma > \delta$ 。在食品加工上維生素 E 常被作為天然抗氧化劑, 至於常用於食品或飼料添加的 α -tocopherol acetate (TA), 是屬於酯類的維生素 E, 其它如 α -tocopheryl succinate (TS)、 α -tocopheryl phosphate、 α -tocopheryl nicotinate 都是酯類的維生素 E。不論是何種形式的 α -tocopherol 衍生物大都擁有相似的抗氧化活性 (Burton and Traber, 1990)。

維生素 E 的生理特性

維生素 E 具有溶於脂肪的生理特性, 主要是位於細胞膜上 (Niki, 1991), 在它的異構物中以 α -tocopherol 具有最大的生理活性 (Parrish, 1980)。維生素 E 在生物體內最主要的功能是擔任脂溶性抗氧化劑即自由基捕捉劑, 可終止不飽和脂肪酸的過氧化連鎖反應, 清除高能量不穩定自由基如氫過氧化自由基 (hydroxyl radical)、過氧化自由基

(peroxyl radical) 及超過氧化自由基 (superoxide radical)，避免膜上脂肪酸、膽固醇的氧化傷害，是目前被認為最有效的天然脂溶性抗氧化劑之一 (Ahn et al., 1995; Machlin, 1984)。

維生素 E 對於預防多元不飽和脂肪酸的過氧化有明顯功效 (Kanner et al., 1987)。而多元不飽和脂肪酸是鍵結於細胞膜磷脂質上，易受到自由基之攻擊而產生過氧化反應。維生素 E 在脂質過氧化反應中可以清除自由基，終止脂質過氧化的連鎖反應。維生素 E 的抗氧化功能機制是利用維生素 E 結構中的酚基，提供一個氫質子給與自由基，而自己本身形成一相對穩定的維生素 E 自由基 (α -tocopheryl radical) (圖二)。以下說明維生素 E 的抗氧化性質，在式中 TH 代表維生素 E，而 $\text{ROO}\cdot$ 表示為自由基形式。



當細胞面對自由基、過氧化物的氧化緊迫威脅時，維生素 E 在細胞膜中也與花生四烯酸 (arachidonic acid) 或其它脂質形成氫鍵，有助

於維持細胞膜的穩定 (Kagan and Quinn, 1988), 透過此作用可以保護細胞膜免於氧化傷害, 增加細胞存活率, 藉以維持膜中脂質成分穩定、蛋白質功能或酵素活性(Reed et al., 1987; Takenaka et al., 1991)。

維生素 E 的再生

近來的研究指出維生素 E 的抗氧化功能與維生素 C (ascorbic acid) 及麩胱甘肽 (GSH) 具有密切相關 (Bendich et al., 1986; Chen and Chang, 1979)。這些抗氧化物質的抗氧化功能除了可減少維生素 E 的消耗外 (Ursini et al., 1985; Rotruck et al., 1973), 它們也可以透過維生素 E 再生系統 (Chow, 1991), 利用一些還原劑如維生素 C、麩胱甘肽 (GSH) 及其酵素作用, 將氧化後的維生素 E 自由基還原成可以被生物再利用的維生素 E (圖三)。

(二) 維生素 C (ascorbic acid)

維生素 C 是生物體內重要的水溶性抗氧化分子 (Anderson et al., 1987), 它在血漿中具有重要的抗氧化功能。特性上極易受到外界影響而被破

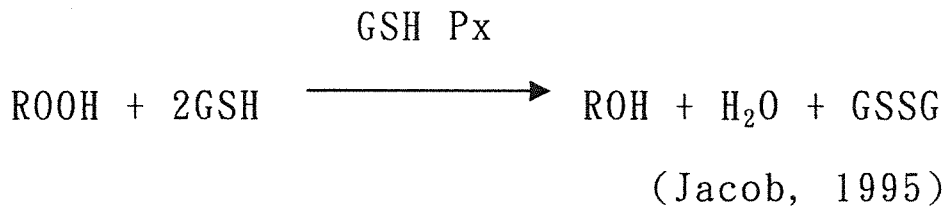
壞，如熱、鹼，使其失去活性，但不被弱酸所影響。它可以清除超氧陰離子 (superoxide anion)、singlet oxygen 以及氫氧化自由基 (hydroxyl radical) (Bendich et al., 1986; Frei et al., 1989)。

有研究指出體內維生素 C 濃度會影響維生素 E 的需要量 (Bendich et al., 1984)。維生素 C 和維生素 E 在生物體內都具有抗氧化功能，Hrubá 等人 (1982) 研究發現，給與老鼠補充維生素 C，可以減少其肺部維生素 E 的消耗。另一項研究也發現維生素 C 和維生素 E 二者之間的抗氧化作用存有相乘效果，維生素 E 可以利用維生素 C 而再生 (Rojas et al., 1994)。

(三) 麩胱甘肽 (GSH)

麩胱甘肽 (GSH) 在胞內抗氧化系統中扮演重要角色。麩胱甘肽是由三個氨基酸所構成的水溶性抗氧化分子，它的結構為 γ -Glu-Cys-Gly。廣泛分佈在動物、植物和微生物細胞中；在動物體內濃度可高達 0.5 - 10 mM (Kosower and Kosower, 1978)。麩胱甘肽的生理功能很多，主要包括：(1) 還原態

的麩胱甘肽在細胞內扮演抗氧化劑的角色，它利用麩胱甘肽過氧化酶（Glutathione peroxidase, GSH Px）來移除過氧化氫（ H_2O_2 ），以減少氧化緊迫對於細胞的傷害。



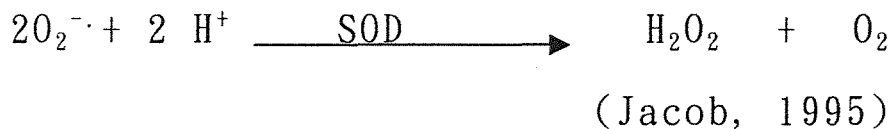
(2) 參與維生素 E 的再生。(3) 參與細胞內的解毒代謝作用，麩胱甘肽透過麩胱甘肽硫轉移酶的催化與外來物質結合，增加外來物的水溶解性，以利排出體外 (Reed, 1990; Neal et al., 1987) (4) 維持膜蛋白硫醇完整性，並維持細胞之正常生理功能 (Kosower and Kosower, 1978)。

在氧化的反應過程中麩胱甘肽 (GSH) 轉變成氧化態的麩胱甘肽 (GSSG)，隨後氧化態的麩胱甘肽可以透過麩胱甘肽還原酶 (Glutathione reductase, GSH Rd) 作用，將其還原成麩胱甘肽 (GSH) (Skrzydłowska et al., 1997)。

(四) 超氧化歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD)

超氧化歧化酶 (SOD) 是一種需要結合金屬離子為反應中心之酵素，可催化反應而消除活性氧，在人體細胞的粒線體中含有以錳為還原中心的 SOD，而在細胞質中的 SOD 則以銅、鋅為反應中心，遍佈於所有好氧性生物體內 (Fridovich, 1995)。而好氧性生物主要是依賴體內 SOD 酵素將過剩的超氧陰離子 ($O_2^{\cdot -}$) 予以還原形成過氧化氫及水 ($H_2O_2 + O_2$)。此乃一項重要的防禦機制。

超氧化歧化酶代謝 $O_2^{\cdot -}$ 形成 H_2O_2 的反應如下：

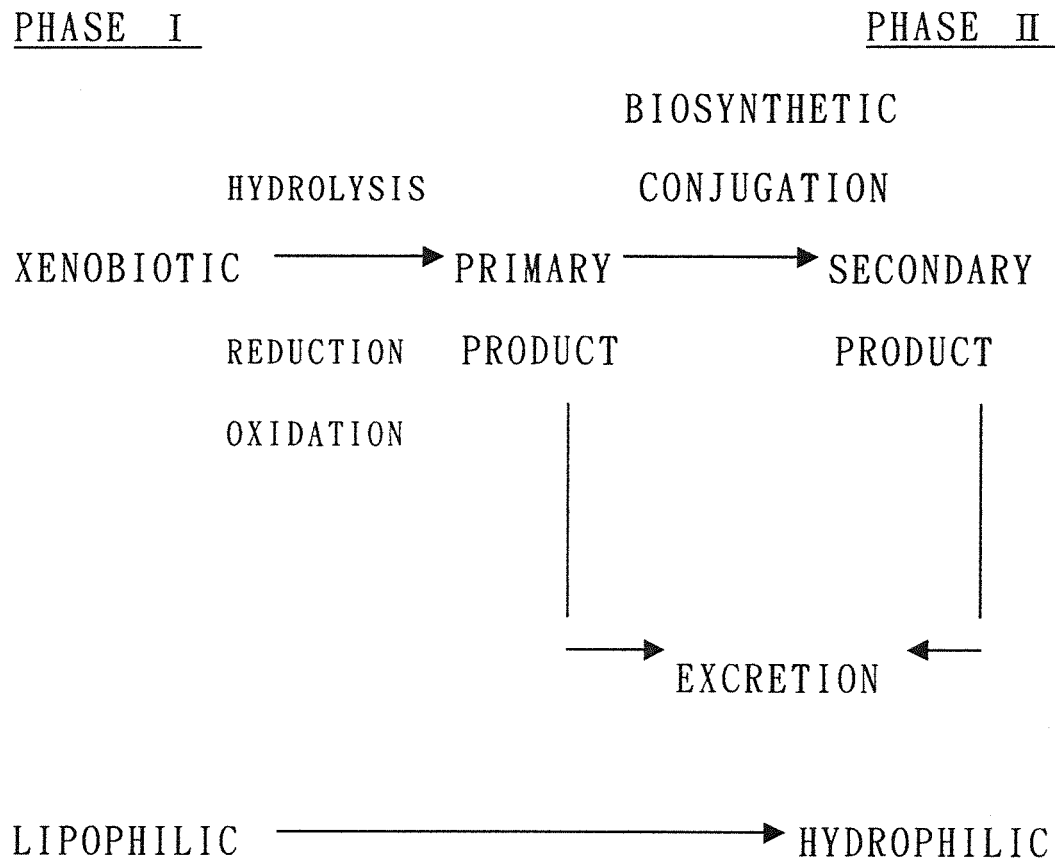


五、生物體內的解毒代謝系統

毒物可以經由不同途徑進入生物體內，經吸收後分佈到生物體各個部位，可透過體內的解毒酵素系統，使其毒性降低。肝臟是生物體內主要的解毒代謝器官，其它尚有肺、胃、小腸、和腎臟等。學者將解毒代謝過程分為兩步驟，分別為 phase I 及 phase II (Veld, 1990)。在 phase I，親脂性化學物質經由氧化、還原及水解作用，使化學物質

的官能基產生改變進而影響其溶解性以利代謝物可以直接排出體外或是進入 phase II。在 phase II 中將 phase I 反應代謝後的產物再進一步進行結合作用 (conjugation) (Anders and Jakobson, 1985; Guengerich and Liebler, 1985)。結合作用是將內生性的硫酸鹽 (sulfate)、葡萄糖醛酸 (glucuronic acid) 和麩胱甘肽 (glutathione) 等水溶性的小分子與 phase I 產物接合，增加這些物質的水溶解性，以利迅速排出體外。

Integration of phase I and phase II
biotransformation reactions



(Veld et al., 1990)

六、細胞色素 P450

肝臟微粒體細胞色素 P450 是屬於 phase I 酵素，在生物解毒代謝酵素系統中細胞色素 P450 酵素與 NADPH 細胞色素 P450 還原酶二者稱為混和功能氧化酵素 (mixed function oxidase, MFO)，具有

氧化還原功能。細胞色素 P450 酵素鑲嵌在內質網膜上，作用時需有 NADPH 提供電子及氧原子的參與。細胞色素 P450 酵素是一種含鐵蛋白質，其血基質鐵 (heme iron) 的形式通常為三價鐵，當還原成二價鐵時，細胞色素 P450 酵素會結合配位子 (ligand) 如氧或一氧化碳，此時含二價鐵的 P450 及一氧化碳複合物在波長 450 nm 附近有最大吸光值，因此以細胞色素 P450 來命名。細胞色素 P450 酵素系統負責執行代謝解毒作用，催化的基本反應是 monooxygenation，氧原子併入受質，再由 NADPH 處獲得電子，將受質形成具有氫氧基的產物及水的過程 (Guengerich et al., 1991)。

調控細胞色素 P450 活性的研究，在毒理學上具有重要的意義。因為細胞色素 P450 酵素是多種致癌物，例如 polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)、及黃麴毒素的代謝酵素。經由細胞色素 P450 作用後，有些物質可代謝成毒性較弱的產物 (Gonzalez and Gelbolin, 1994)，但另一方面其他物質在經細胞色素 P450 作用後，卻也會轉變成具有活性的中間產物因而導致癌症產生，其它如乙醇在代謝過程中形成的乙醛，對細胞即具有較乙醇高的親和力，會與去氧核糖核酸 (DNA) 或是蛋白質結合而造成細胞

受損。細胞色素 P450 代謝解毒過程中，能否將有毒物質順利排除，或是造成生物體內更大的傷害須視細胞色素 P450 與化學物質是進行解毒或活化作用而定。

七、細胞色素 P450 誘發脂質過氧化反應

細胞色素 P450 在進行代謝、解毒、活化的過程中可以經由電子的轉換，以及傳遞釋放出超氧陰離子 (superoxide anion) (Halliwell, 1989; Gorsky et al., 1984; White and Coom, 1980)，而引發生物體內的脂質過氧化反應。

二位學者 Hochstein 以及 Ernster (1964) 最先發現透過 NADPH 和鐵的作用，造成老鼠微粒體的脂質過氧化發生。之後的學者也發現在不同組織如肝臟、腎臟、睪丸、胎盤和淋巴等，它們的微粒體會受到內生性 NADPH 電子轉移或鐵化合物的催化作用而產生微粒體的脂質過氧化反應 (Ohmori et al., 1993; Poyer and MaCay, 1971) (圖四)。

細胞色素 P450 主要是存在內質網膜上，在最近的研究指出，經由氧的參與以及透過 NADPH 細胞色素還原酶和細胞色素 P450 酵素所引發的微粒體

脂質過氧化反應 (Ursini et al., 1989), 首當其衝是膜上的多元不飽和脂肪酸 (Doba et al., 1985; Niki et al., 1984)。利用維生素 E 抗氧化及捕捉自由基的特性 (Venekci, 1987), 可終止因自由基所引起脂質過氧化作用, 而降低了細胞的傷害。

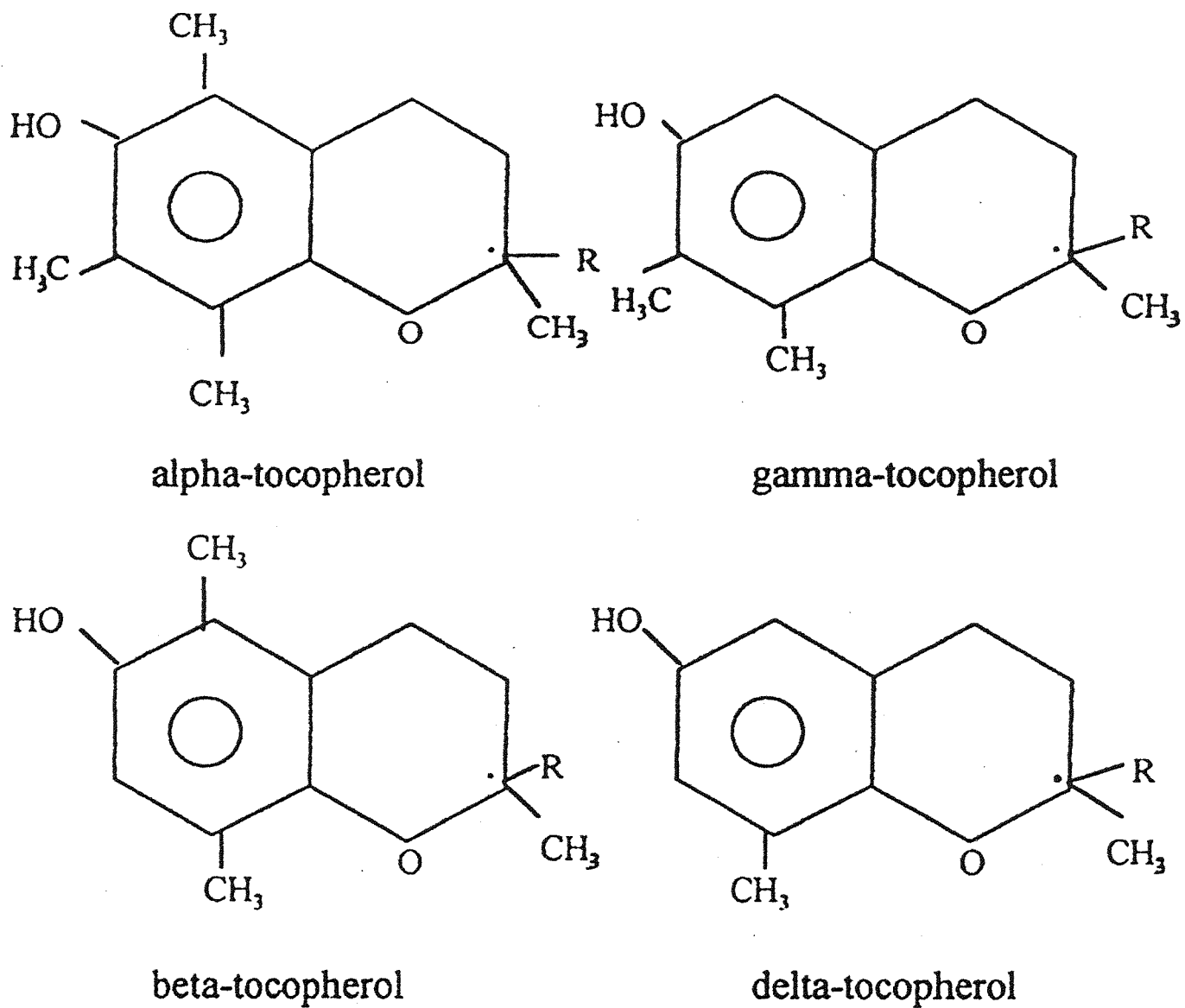
八、維生素 E 與細胞色素 P450

維生素 E 對於生物的抗氧化保護作用, 為防止自由基促進脂肪組織的過氧化反應 (Tappel, 1972)。而維生素 E 除了清除自由基的生理功能外, 也有證據顯示在缺乏維生素 E 的情況下, 兔子體內嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase) 會有合成增加的情形 (Catignani et al., 1974), 但是老鼠肝臟中細胞色素 P450 含量則會降低, 其中又以對雄性老鼠的影響較雌性老鼠來的明顯 (Iwasaki et al., 1994)。似乎說明了飲食中維生素 E 含量的改變, 也會影響蛋白質合成。

維生素 E 有調節解毒酵素系統的作用, 在缺乏的情況下, MFO 代謝藥物的能力會下降, 但經過補充後又會回復正常的活性 (Carpenter, 1972)。有些研究也發現當維生素 E 缺乏時, 肝臟細胞色素 P450

對於 ethylmorphine 及 benzo[a]pyrene 的代謝能力會下降，但是對細胞色素 P450 含量及細胞色素 P450 還原酶活性則沒有顯著影響 (Yang and Yoo, 1988; Carpenter, 1972)。

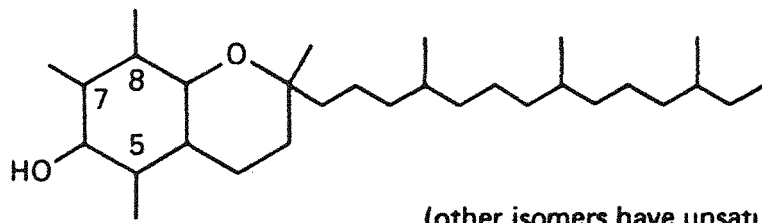
細胞色素 P450 活性改變，有可能是受到微粒體脂質過氧化作用的影響，造成細胞色素 P450 的水解，所以當脂質過氧化作用發生時，細胞色素 P450 的含量會減少 (Kitada et al., 1989; Klimek et al., 1983; Kagan et al., 1984)，因此維生素 E 對於細胞色素 P450 酵素的保護，可能是藉由其抗氧化劑的功能，對於膜上脂肪酸、蛋白質或酵素產生保護作用，進一步達到維持細胞色素 P450 的酵素活性 (Gower, 1988)。



R: Side chain identical for all tocopherols.

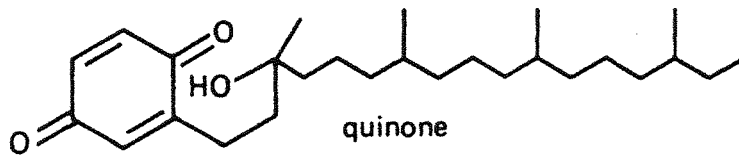
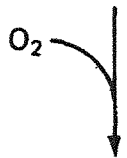
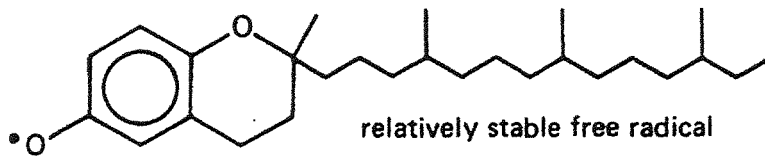
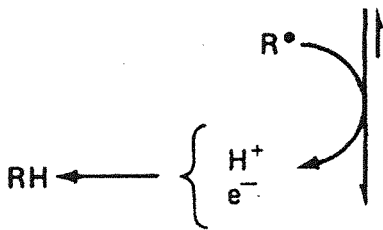
(Chan and Decker, 1994)

圖一、維生素 E 之異構物

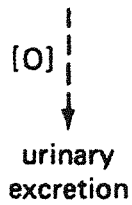


(other isomers have unsaturated side chain, or additional CH₃ groups)

- α - tocopherol (methyl at positions 5, 7, 8)
- β - tocopherol (methyl at positions 5, 8)
- γ - tocopherol (methyl at positions 7, 8)
- δ - tocopherol (methyl at position 8)

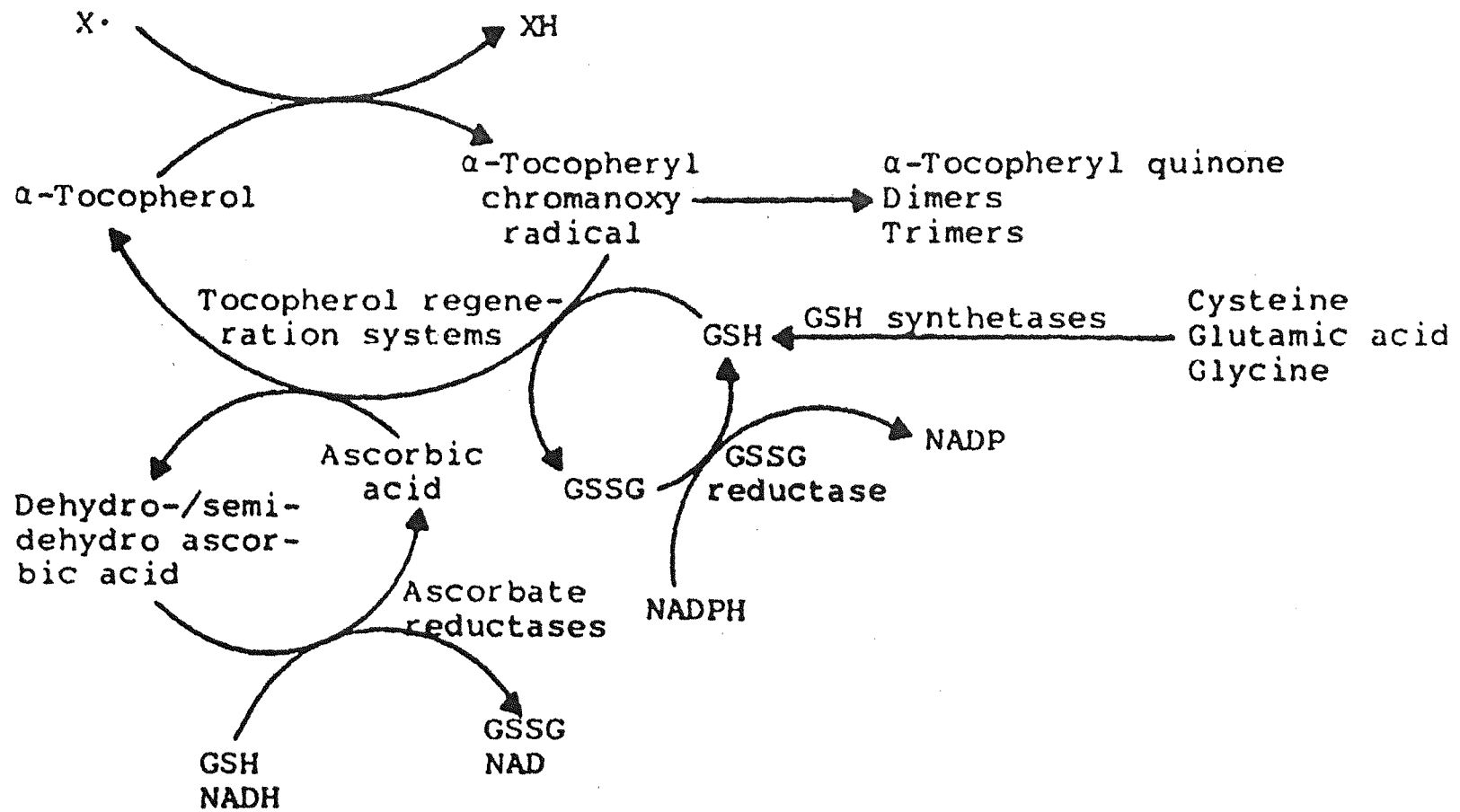


→ may inhibit vitamin K action (clotting time)



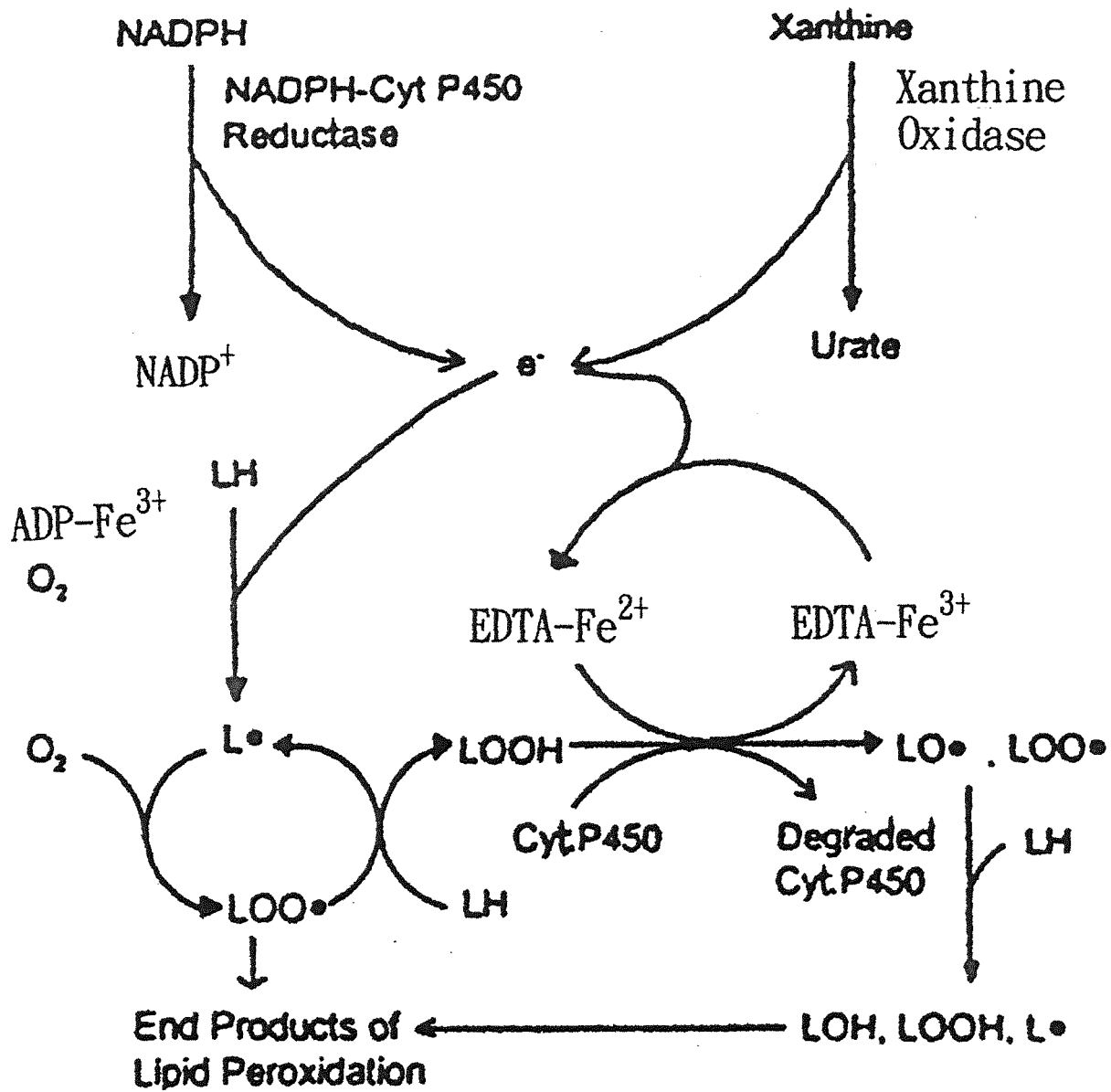
(Bland, 1980)

圖二、維生素 E 與自由基作用



(Chow, 1991)

圖三、維生素E 再生



(Halliwell and Chirico, 1993)

圖四、脂質過氧化與細胞色素 P450 之關係

研究動機

維生素 E 在整個抗氧化系統中扮演重要的角色，它在細胞內是鑲嵌在細胞膜上。有研究指出維生素 E 的抗氧化能力可以保護細胞膜上蛋白質和脂肪酸等成分免於氧化傷害，故推測飲食中不同含量維生素 E 會對膜上細胞色素 P450 活性有所影響。但以往研究結果並非一致，所以本次實驗針對大鼠給予不同含量維生素 E，觀察它對大鼠體內抗氧化分子及抗氧化酵素活性的影響，另一方面也探討它對於細胞色素 P450 活性的影響。

材料與方法

一、實驗動物及飼料

自國科會實驗動物繁殖及研究中心，購入雄性 Sprague-Dawley 大鼠十八隻。

酪蛋白、玉米粉、纖維素、膽素、甲硫胺酸、不含維生素 E 的玉米油 (tocopherol-stripped corn oil)、tocopherol-acetate、不含維生素 E 的 AIN-76 維生素混合物、AIN-76 維生素混合物及 AIN-76 礦物質混合物等購自 Teklad (Madison, WI)，玉米油為 Mazole 品牌 (CPC Intl Inc. Englewood, NJ)。

二、動物飼養

購入離乳之雄性 Sprague-Dawley 大鼠 18 隻，平均體重 60-70 克，每組實驗有六隻大鼠，分別給與三種不同維生素 E 含量之飲食 (0、100、1500 ppm) (Table 1)。每隻大鼠獨立飼養在一個不銹鋼絲網籠中，動物房之溫度維持在 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ，光

照和黑夜環境各為 12 小時，飼料和飲水以任食方式供應。每兩天更換飼料及記錄大鼠飼料攝取量，另外每週稱量大鼠體重。

三、大鼠犧牲及樣品收集

大鼠以給與過量 CO₂ 方式犧牲，以含有 5% 檸檬酸鈉 (sodium citrate) 為抗凝血劑的針筒採血，由大鼠的頸靜脈進行採血 5 c.c. (抗凝血劑：全血 = 1:9)。取出 0.5 ml 的全血，製備紅血球待日後分析 superoxide dismutase (SOD) 活性。剩餘的全血以 500xg 離心 10 分鐘，取得血漿和紅血球部分。血漿維生素 C 濃度及紅血球 GSH/GSSG 濃度是以新鮮樣品進行分析，剩餘的血漿則置於零下 80°C 冷凍櫃中存放，待日後分析其它項目。肝臟取出秤重，取出 5 克肝臟進行微小體和細胞質液製備，其他部分隨即置入零下 80°C 冷凍櫃中儲存，待日後分析其它項目。

四、肝臟微小體 (microsomes) 及細胞質液 (cytosolic) 之製備

採用 Huang 等人的方法 (1988) , 新鮮肝臟秤重 5 克, 加入 4 倍 0.01 M 磷酸鉀緩衝溶液 (pH 7.4 含 1.15% KCl) 均質, 均質後將均質液倒入離心管中, 在 4°C 下以 10000xg 高速離心 30 分鐘, 將上清液取出, 在 4°C 下再以 100000xg 進行超高速離心 43 分鐘, 離心後下層的沈澱物即為微小體, 而上層為細胞質液。沈澱物加入 1 ml 0.05 M 微小體緩衝溶液 (含 1 mM EDTA 的磷酸鉀緩衝溶液, pH 7.6) 。將微粒體以及細胞質液皆置於零下 80°C 冷凍櫃中, 待日後分析。

五、蛋白質濃度測定

採用 Lowry 等人的方法 (1951) 來測定蛋白質濃度。取實驗樣品 50 μ l (如微小體懸浮液), 加入等量的 10% trichloroacetic acid (TCA) 使蛋白質產生酸沈澱, 在室溫下靜置 30 分鐘後, 以 8000xg 離心 6 分鐘, 去除上清液, 再加入 300 μ l, 1 N NaOH 將沈澱的蛋白質溶解。取適量樣品和標準品各加入 200 μ l 去離子水及 100 μ l 的反應試劑 (25% NaCO₃ : 2% Na-K tartrate : 1% CuSO₄ = 8:1:1) , 混合均勻後在室溫下靜置 10 分鐘, 再

加入 1 ml Folin reagent 試液 (Folin :去離子水 =1 : 19.5) , 立即搖晃均勻 , 置於 37°C 水浴中 20 分鐘 , 取出後置於室溫下回溫 , 利用分光光譜儀在波長 660 nm 下測其吸光值。將標準品的蛋白質濃度與吸光值作成標準曲線 , 即可用內插法來求得樣品的蛋白質濃度。

六、脂質過氧化物分析

肝臟脂質過氧化物濃度

本實驗參考 Fraga 等人的方法 (1988) 。稱 0.2 克肝臟組織 , 加入 9 倍體積均質液 (50 mM 磷酸鉀緩衝溶液 , pH 7.4) 均質 , 然後取出肝臟組織均質液 500 μ l , 於冰浴中依序加入 0.5 ml 3% sodium dodecyl sulfate (SDS) 、 2 ml 0.1 N HCl 、 0.3 ml 10% phosphotungstic acid , 混合均勻後再加入 1 ml 0.7% thiobarbituric acid 與之發生反應 , 置於沸水中加熱 30 分鐘 , 冷卻後再加入 5 ml 1-butanol 萃取 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) , 而後以 1100xg 離心 15 分鐘 , 取出上層液於 excitation 515 nm 及 emission 555 nm 下 , 利用螢光光譜儀測吸光值 , 所得的數值再

與標準溶液 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMP) 所做出的標準曲線比較，求出肝臟脂質過氧化濃度，表示方法為 nmol/g liver。

血漿的脂質過氧化分析

取 25 μ l 血漿，加入 100 μ l 5 mM t-butyl hydroperoxide 以及 375 μ l 去離子水，將其置於 37°C 水浴中反應 30 分鐘，之後的步驟同肝臟脂質過氧化物濃度測定。TBARS 表示方法為 μ M。

七、維生素 C 濃度測定

採用 Kyaw 的方法(1978)。稱取 0.2 克肝臟加入 9 倍體積的 50 mM 磷酸鉀緩衝溶液 (pH 7.4) 均質，取出肝臟均質液或血漿 200 μ l，加入等量的呈色劑 (含 $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 20g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10g、 H_2SO_4 5 ml 和去離子水 25 ml)，靜置 30 分鐘後以 6000xg 離心 10 分鐘，取出上層液，以分光光譜儀在波長 520 nm 下測其吸光值，用已知濃度維生素 C 作一標準曲線，求出樣品維生素 C 的含量，濃度表示方法為血漿 (nmol/ml) 和肝臟 (μ mol/g)。

八、維生素 E 濃度測定

本實驗參考 Catignani and Bieri 的分析方法(1983)。取 0.1 g 肝臟加入 0.9 ml 50 mM 磷酸鉀緩衝溶液 (pH 7.0) 進行均質，均質完成後取 200 μ l 均質液，加入 100 μ l α -tocopherol acetate 作為內標 (50 ng/ml, in 100% ethanol) 之後震盪一分鐘使其混合均勻，再加入 200 μ l hexane 萃取一分鐘，於 4°C 下以 1500xg 離心 3 分鐘，取出上層液，下層部分再加入 200 μ l hexane 萃取，重覆萃取三次後，將收集的上層液以 N₂ 吹乾，吹乾後加入 350 μ l methanol 溶解，以過濾膜過濾，取出 50 μ l 打入 HPLC 來定量肝臟中維生素 E 濃度，以 μ g/g liver 表示。血漿中維生素 E 濃度，以 μ g/mg total lipid 表示。

HPLC 系統由以下所組成：

L-6200A intelligent pump, L-4200 UV-VIS detector, D-6000 interface 及 LC organizer (Hitachi, Tokyo, Japan); Mobile phase: 100% methanol; flow rate: 1.2 ml/min; Detector wavelength: 290 nm; Sensitivity: 0.01 A.U.F.S.

(absorbance units full scale); HPLC column:
3.9x300 mm stainless steel packed with micro
Bondapak C18 (Waters Inc. Milford, MA)。

Plasma total lipid 分析

本實驗參考 Frings and Dunn 的分析方法
(1969)。取出 50 μ l 血漿加入 1 ml H_2SO_4 ，以
100°C 水浴 10 分鐘後，取出 100 μ l 再加入 5 ml
phospho-vanillin reagent (200 ml 0.6% vanillin
和 800 ml phosphoric acid)，混合後置於 37°C 水
浴 15 分鐘，取出後冷卻 5 分鐘，利用分光光譜儀
在波長 540 nm 下測其吸光值，另以已知濃度的橄
欖油(1 g/dl)作一標準曲線，求出血漿中 total
lipid 濃度。

標準曲線製作：

stock solution (1 g olive oil/dl)

取 0.25 g olive oil 至 25 ml 定量瓶以 absolute
ethanol 定量至 25 ml

working solution					
Conc. (mg/dl)	200	400	600	800	1000
stock solution	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
absolute ethanol	0.4	0.3	0.2	0.1	0

九、血漿蛋白質硫醇濃度測定

本實驗參考 Boyne and Ellman 的分析方法 (1972)。取出 50 μ l 血漿，加入 23 μ l 呈色劑 5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)，震盪後反應 30 分鐘，以 10000xg 離心 10 分鐘去除雜質，利用分光光譜儀在波長 412 nm 下測吸光值為 a，加入 50 μ l 10.8 M n-ethyl maleimide (NEM) 進行脫色反應 20 分鐘，再次用分光光譜儀在波長 412 nm 下測吸光值為 b。換算血漿蛋白質硫醇濃度以 $(a-b)/13600$ 計算，另以蛋白質濃度校正，蛋白質硫醇濃度表示為 μ mol/mg protein。

十、GSH 及 GSSG 濃度測定

採用 Reed 等人方法 (1980)。稱取肝臟組織 0.3

克，加入 9 倍體積的 50 mM 磷酸鉀緩衝溶液 (pH 7.0) 進行均質，均質後快速取出 400 μ l 均質液加入等量 10 % perchloric acid (PCA) 靜置 40 分鐘，PCA 能將待測樣品中的 GSH 及 GSSG 充分溶出，於 4°C 下以 2000xg 離心 3 分鐘，取出上層液置於 1.5 ml 微量離心管中，加入新鮮製備的 100 mM iodoacetic acid (IAA) 40 μ l，接著緩慢添加 KHC03 直到不起泡為止，暗反應 15 分鐘後再加入 440 μ l 3% 2,2-dinitrofluoro benzene (FDNB)，混合均勻後置於 4°C 下冷藏八小時以上，以 4000xg 離心 10 分鐘，取出上層液，並用 0.45 mm 過濾膜過濾取 50 μ l 注入 HPLC 中分析 GSH 及 GSSG 之含量。

HPLC 之條件設定

偵測器波長	365 nm
流速	1.2 ml/min
移動相	Solvent A: 80% methanol Solvent B: 20% solvent A + 80% Stock solution B; stock B: 272g CH ₃ COONa、621 ml CH ₃ COOH、189 ml H ₂ O
滯留時間	30 min

濃度梯度變換

Gradient time	Solvent A	Solvent B
	%	
0	80	20
3	80	20
12	5	95
20	5	95
22	80	20
30	80	20

肝臟 GSH 及 GSSG 濃度以 n mol/mg protein 表示

Total GSH 之含量 = $\text{GSH} + 2 \times \text{GSSG}$

若樣品為新鮮紅血球，加入含有 100 mM glucose 之磷酸緩衝液（1 升 PBS 含有 1.8 g glucose）稀釋成 5% 紅血球懸浮液，取 300 μl 紅血球加入等量的 IAA-PCA（90 mg IAA/1ml 10% PCA），於冰浴中暗反應 15 分鐘，以 2000xg 離心 3 分鐘，取出上層液 400 μl 於微量離心管中，緩慢加入 KHCO_3 直到不起泡為止，暗反應 15 分鐘後再加入 480 μl FDNB，混合後置於 4°C 下八小時以上，以 4000xg 離心 5 分鐘，取出上層液，並用 0.45

mm 過濾膜過濾，即可使用 HPLC 來分析 GSH 及 GSSG 之含量，其他條件同上述肝臟樣品。

十一、血漿中尿酸 (uric acid) 濃度測定

以 Sigma 公司所提供之尿酸診斷套件組測定 (Sigma, St. Louis, MO)。依套件說明配製尿酸測定試劑。取 1 ml 試劑於試管中，加入 25 μ l 血漿樣品或套件組中之標準品 (5 mg uric acid/dl) (空白組以去離子水取代)，於 37°C 下水浴 5 分鐘，移至分光光譜儀在 520 nm 下測其吸光值，濃度以 mg/dl 表示。

十二、超氧化歧化酶 (SOD) 分析

實驗採用 RANDOX 公司 (RANDOX Laboratories LTD, Antrim, U.K.) 超氧化歧化酶診斷套件組測定。分析時取出置於零下 80°C 冷凍櫃中之紅血球，加入去離子水使體積達 2 ml，置於 4°C 下靜置 15 分鐘，依照套件的使用說明，用 0.01 mol/L phosphate buffer (pH 7.0) 來稀釋血球，使樣品的抑制百分比達到 30% ~ 60% 範圍。標準曲線的

配製，用已知濃度的 SOD (6.2U) 來配製標準曲線，將反應試劑均勻混合後利用分光光譜儀在波長 550 nm 下進行 time scanning 三分鐘，紀錄 xanthine oxidase 與 SOD 酵素競爭的改變，細胞質液及微小體 SOD 活性的分析方法相似於紅血球的作法，但以蛋白質作為定量單位，表示方式為 U/mg protein。紅血球 SOD 活性以 U/g 血紅素表示。

紅血球血紅素 (hemoglobin) 濃度分析

採用 Oshiro 等人(1981)所敘述的 SLS-Hemoglobin 方法來測量。紅血球血紅素濃度以 mg 血紅素/ml 表示。

十三、麩胱甘肽過氧化酵素活性測定

實驗參考 Lawrence and Burk 的方法(1976)。取製備好之細胞質為樣本，於 1.5 ml 石英管中加入 0.8 ml 反應液(含有 1 mM EDTA、1 mM NaN_3 、0.2 mM NADPH、1 U/ml GSH reductase 及 1 mM GSH 之 100 mM 磷酸鉀緩衝液(pH 7.0)。加入 100 μl 經 20 mM 磷酸鉀緩衝液(pH 7.0)稀釋 150 倍後的樣品，然後在室溫下靜置 5 分鐘。再加入 0.1 ml 2.5 mM H_2O_2

以分光光譜儀，在 340 nm、25°C 下測其吸光值變化 3 分鐘，計算 NADPH 減少速率。麩胱甘肽過氧化酶活性以 nmole NADPH/min/mg protein 表示。

十四、麩胱甘肽還原酶活性測定

實驗參考 Bellomo 等人方法(1978)。取製備好之細胞質為樣本，於 1.5 ml 石英管中加入 0.9 ml 反應液(含有 1.1 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 、5.0 mM GSSG 及 0.1 mM NADPH 之 100 mM 磷酸鉀緩衝液，pH 7.0)，加入 80 μ l 20 mM 磷酸鉀緩衝液(pH 7.0)及 20 μ l 樣品。以分光光譜儀，在 25°C、340 nm 下進行吸光值測定，持續 5 分鐘，計算 NADPH 減少速率。麩胱甘肽還原酶活性以 nmole NADPH/min/mg protein 表示。

十五、肝臟中麩胱甘肽硫轉移酶活性分析

實驗採用 Habig 等人方法測定(1974)。取 880 μ l 含有 1 mM GSH 的反應試劑(100 mM potassium phosphate buffer, pH 6.5)加入 20 μ l 50 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)、80 μ l 10 mM 磷

酸鉀緩衝溶液 (potassium phosphate buffer pH 7.4) 及 20 μ l 肝臟細胞均質液 (先經過 100 mM 磷酸鉀緩衝溶液稀釋 20 倍)，混合均勻後利用分光光譜儀在 340 nm 波長下於 25°C 連續測其吸光值 3 分鐘，空白組以 20 μ l 去離子水來取代，計算 CDNB-GSH 增加速度，GST 活性以 nmole CDNB conjugate formed/min/mg protein 表示。

十六、肝臟 Total P450 含量測定

採用 Omura and Sato 的方法來分析(1964)。將放置在 -80°C 冷凍櫃中的微粒體樣品取出，解凍後磨開，使其成為均勻的微粒體懸浮溶液，首先將此懸浮溶液稀釋使其蛋白質濃度為 1.5 mg/ml，取出 2 ml 待測懸浮液，加入 1 mg 的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 來還原細胞色素 P450，混和均勻後分別取出 1 ml，置於兩管石英管中，將石英管置入分光光譜儀的 reference cell 及 sample cell 位置，利用波長 400 ~ 500 nm 掃瞄，首先記錄樣品在 450 nm 及 490 nm 之初次掃瞄吸光值，後取出 sample cell 之石英管，緩緩的注入約 40 粒一氧化碳的氣泡，混合後

再放回分光光譜儀 sample cell 的位置，再次掃描並記錄 450 nm 及 490 nm 之掃描吸光值，濃度以 nmole/mg protein 表示。

十七、肝臟細胞色素 P450 還原酶活性測定

根據 Phillips and Langdon 的分析方法 (1962)。樣品的製備同 total P450 含量，先將樣品蛋白質濃度稀釋成 0.5 mg/ml 左右，使用 1 ml 石英管，加入 320 μ l 0.5 mM 的細胞色素 C，40 μ l 稀釋後的樣品，360 μ l 0.3 M 磷酸鉀緩衝溶液 (pH 7.7)，混合後置於室溫下 3 分鐘，再加入 40 μ l 10 mM NADPH 利用分光光譜儀在波長 550 nm 下測其吸光值，紀錄三分鐘內吸光值變化，P450 還原酶之活性以 nmole/min/mg protein 表示。

十八、肝臟 N-nitrosodimethylamine demethylase (NDMA) 活性測定

採用 Nash 所使用的方法 (1953)。樣品製備同 total P450 含量，先將樣品蛋白質濃度稀釋在 1 mg/ml 左右。加入 100 μ l 100 mM $MgCl_2$ 、100

μl 1.5 M KCl 和 400 μl 稀釋後樣品 (1 mg/ml) , 100 μl 40 mM NDMA 。 200 μl 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) , 使總體積達 900 μl , 混合均勻後加入 100 μl 100 mM NADPH 於 37°C 下反應 10 分鐘 , 最後加入 50 μl 25% ZnSO_4 及 50 μl 飽和 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 來終止反應。空白實驗則在加入 NADPH 之前 , 先加入終止反應試劑。終止反應後進行離心 , 以 1000xg 離心 5 分鐘 , 取出 0.7 ml 上層液 , 再加入 0.3 ml Nash 試劑 (含 5 g ammonium sulfate、0.1 ml acetylacetone 6 ml 3% acetic acid) , 混合後在 50°C 水浴下作用 30 分鐘 , 用已知濃度的甲醛來做標準曲線 , 利用分光光譜儀在波長 412 nm 下測其吸光值 , NDMA 活性以 nmole/min/mg protein 表示。

十九、肝臟 Pentoxoresorufin O-depentylase (POD) 活性測定

採用 Lubet 等人所使用的方法(1985) 。樣品製備同 total P450 含量。先將樣品蛋白質濃度稀釋成 1 mg/ml 左右 , 加入 100 μl 500 mM MgCl_2 、400 μl 稀釋後樣品 (1 mg/ml) , 20 μl 1 mM pentoxoresorufin , 380 μl 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) , 使總體積達 900 μl ,

混合均勻後加入 100 μ l 2.5 mM NADPH 於室溫下反應 5 分鐘，最後加入 200 μ l 25% $ZnSO_4$ 及 200 μ l 飽和 $Ba(OH)_2$ 來終止反應。空白實驗則在加入 NADPH 之前，先加入終止反應試劑，終止反應後進行離心，以 1000xg 離心 5 分鐘，取出 0.5 ml 的上層液，用 1.5 ml 四面透光石英管，放入螢光光譜儀中進行掃描（excitation 為 522 nm、emission 為 586 nm），用已知濃度的 resorufin 作一標準曲線來定量 resorufin 生成量，POD 活性以 pmole/min/mg protein 表示。

二十、肝臟磷脂質脂肪酸成分分析

使用 Lepage and Roy 提出的方法(1986)。取 0.2 g 肝臟加入 1.5 ml CH_3Cl : MeOH (2:1)，充分均質後以濾紙過濾，再用氮氣吹乾，加入 50 μ l CH_3Cl 將脂質萃取物充分振盪混合均勻。採用 TLC aluminum sheets (20 \times 20 cm)，其上覆蓋 0.2 mm silica gel 60(Merck) 來分離脂質中各種不同成分，將脂質萃取物點在 TLC sheets 上，以 hexane/diethylether/formic acid(80:20:4, v/v/v) 展開液展開，待展開液移動至距離 TLC sheets 頂端 1 cm 時，將 TLC 片取出吹乾，噴上呈色液

2,7-dichlorofluorescein (0.1% w/v in methanol), 將位於原點的磷脂質部分刮下, 收集在有蓋玻璃試管中, 加入 2 ml methanol: benzene (4:1, v/v) 充分混合。然後沿管壁慢慢加入 200 μ l acetyl chloride, 蓋子鎖緊後充分振盪, 置於 90-92°C 水浴中 1 小時以進行甲基化反應, 取出冷卻後加入 5 ml 6% K_2CO_3 混合均勻, 以 1100xg 離心 10 分鐘, 取上層液以氮氣吹乾, 加入 20 μ l n-hexane。取 1 μ l 注射於氣相層析儀 (GC) 中測定各種脂肪酸含量。氣相層析儀利用氮氣為 carrier gas, 管柱溫度在 150°C 持續 8 分鐘後, 再以每分鐘 3°C 速度上升到 190°C, 注射器 (injector) 及偵測器 (detector, FID) 的溫度皆為 220°C, 所出現的波峰再與脂肪酸標準品 (Alltech, Deerfield, IL) 滯留時間作比較, 確認每個脂肪酸。每個脂肪酸百分比是以個別脂肪酸佔所有脂肪酸之總面積比來計算。

氣相層析儀系統: 氣相層析儀 G3000 (Hitachi Tokyo, Japan), D-2500 integrator (Hitachi, Tokyo, Japan), 氣相層析儀管柱 (GC column): SP-2330 fused silica capillar column

30 m×0.25 mm ID, 0.20 μm film thickness
(Supelco Bellefonte, PA)。

二一、統計分析

統計是以 one way analysis of variance (ANOVA) 來分析，並以 Duncan's test 進行顯著差異分析，當 $p < 0.05$ 表示具有顯著差異。

結 果

體重增加量與食物攝取量

表二結果顯示，餵飼 0、100 或是 1500 ppm 維生素 E 並不影響大鼠體重增加量及食物攝取量。

肝臟重量

表二結果顯示，餵飼 1500 ppm 維生素 E 大鼠在肝臟重量與肝臟佔體重百分比顯著高於餵飼缺乏維生素 E 的大鼠 ($p < 0.05$)，但與餵飼 100 ppm 維生素 E 大鼠無顯著差異。

紅血球與肝臟中麩胱甘肽 (GSH) 濃度

表三結果顯示，大鼠餵飼 1500 ppm 維生素 E，紅血球 GSH 濃度顯著高於其他二組 ($p < 0.05$)，而 GSSG 濃度顯著低於其他二組 ($p < 0.05$)，GSH/總 GSH 比值，餵飼 1500 ppm 維生素 E 大鼠顯著高於餵飼維生素 E 缺乏的大鼠 ($p < 0.05$)。肝臟麩胱甘肽濃度則不受飲食中維生素 E 含量所影響。

水溶性抗氧化分子

表四結果顯示，飲食中維生素 E 含量，對於血漿中維生素 C、蛋白硫醇和肝中維生素 C 濃度並無顯著影響。攝取含 1500 ppm 維生素 E 大鼠其血漿中尿酸濃度顯著高於其他二組大鼠 ($p < 0.05$)。

抗氧化酵素

表五結果顯示，飲食中維生素 E 含量 (0-1500 ppm)，對於紅血球超氧化歧化酶(SOD)、肝臟中微粒體 SOD 及麩胱甘肽過氧化酶活性，並沒有顯著的影響。但對肝臟細胞質 SOD 活性方面，大鼠餵飼含 1500 ppm 維生素 E 飲食，其活性顯著高於餵飼 100 ppm 維生素 E 的大鼠 ($p < 0.05$)。大鼠餵飼 1500 ppm 維生素 E 飲食，其麩胱甘肽還原酶活性，顯著高於餵飼不含維生素 E 飲食的大鼠 ($p < 0.05$)。

肝臟微粒體細胞色素 P450 和麩胱甘肽硫轉移酶(GST)

表六結果顯示，飲食中維生素 E 含量 (0-1500 ppm) 並不會影響肝臟微粒體細胞色素 P450 含量、NADPH P450 還原酶活性及 NDMA 酵素活性。飲食中含 100 及 1500 ppm 維生素 E 相較於缺乏維生素 E，顯著增加大鼠 POD 及 GST 活性 ($p < 0.05$)。

體內維生素 E 濃度

由圖一、二結果顯示組織中維生素 E 濃度隨著飲食中維生素 E 含量增加而增加，而且三組間有顯著性的差異 ($p < 0.05$)。

脂質過氧化

由圖三、四結果顯示，大鼠餵飼維生素 E 缺乏飲食其肝臟及血漿中脂質過氧化物濃度顯著高於餵飼 100 及 1500 ppm 維生素 E 的大鼠 ($p < 0.05$)。維生素 E 抑制組織脂肪過氧化作用是劑量依賴效應。

肝臟磷脂質脂肪酸組成

表七結果顯示，飲食中不同含量維生素 E 並不會影響肝臟磷脂質 C16:0 及 C20:4 (n-6) 組成。大鼠餵飼含 1500 ppm 維生素 E 飲食其 C16:1 (n-7) 顯著高於大鼠餵飼不含維生素 E 飲食 ($p < 0.05$)。而 C18:0 結果剛好與 C16:1 (n-7) 結果相反。大鼠餵飼含 1500 ppm 維生素 E 飲食其 C18:1 (n-9) 顯著高於大鼠餵飼含 100 ppm 維生素 E 飲食 ($p < 0.05$)。而大鼠餵飼含 100 ppm 維生素 E 飲食其 C18:2 (n-6) 顯著低於其他二組大鼠 ($p < 0.05$)。C20:5 (n-3) 隨維生素 E 含量的增加

而有顯著的增加 ($p < 0.05$)。大鼠餵飼含 100 ppm 維生素 E 飲食，其 C22:6 (n-3) 顯著高於大鼠餵飼不含維生素 E 飲食 ($p < 0.05$)。大鼠餵飼 1500 ppm 維生素 E 其 C24:0 顯著高於其它二組 ($p < 0.05$)。

討 論

動物生長情形

不同維生素 E 含量的飲食，對大鼠食物攝取量和體重增加量，沒有明顯影響，此結果類似於本實驗室先前的研究發現(Lii et al., 1997)，大鼠其食物攝取量和體重增加量不受飲食中維生素 E 含量不同而所影響。肝臟重量部份，實驗結果發現，餵飼 1500 ppm 維生素 E 的大鼠相較於餵飼缺乏維生素 E 的大鼠，肝臟重量和肝臟佔體重百分比值有顯著增加($p < 0.05$)，其原因到目前仍不十分清楚。

體內麩胱甘肽(GSH)濃度

根據實驗結果顯示，餵飼 1500 ppm 維生素 E 的大鼠，其紅血球 GSH 含量及與 total GSH 比值與餵飼缺乏維生素 E 大鼠比較，二組有顯著的差異($p < 0.05$)，且隨餵飼含量的增加，其 GSH 含量及與 total GSH 比值也隨之增加，但是肝臟中 GSH 含量及 total GSH 比值卻不受餵飼不同維生素 E 含量的飲食而有所影響。根據 Rojas 等人研究指出(1996)，餵飼不同含量維生素 E 飲食的 guinea pig (15-1500 mg/kg)，發現心臟的 GSH 含量減少，但是與 total GSH 比值卻會受到飲食維生素 E 的影響而增加。紅血球在生物體內負責氧

氣的運送、交換，一直處在高氧壓的環境，對於氧化壓力特別敏感，很容易有活性氧分子產生，造成自由基的氧化傷害 (Kurata and Suzuki, 1994)，因此存在此間的抗氧化劑濃度比肝臟組織更容易受到飲食的影響。而飲食中維生素 E 含量的增加可以減少紅血球中 GSH 的消耗，增加紅血球的抗氧化能力，減少紅血球在攜帶氧時所受到的氧化傷害。

水溶性抗氧化分子

以前的實驗發現，在體外模式系統下，施與氧化壓力處理再給與水溶性抗氧化分子，觀察它們抗氧化能力的表現，依序是尿酸 > 維生素 C > 麩胱甘肽 (Winston et al., 1998)。本次實驗結果顯示 (表四)，餵飼不同含量維生素 E 飲食，對於水溶性抗氧化分子除了在尿酸部分有顯著的影響，其他部分則不受飲食中維生素 E 含量的影響。飲食中不同含量維生素 E 會影響尿酸濃度，可能原因是維生素 E 可節省尿酸的消耗。維生素 E 額外補充是否會增加尿酸的產生，目前並沒有學者證實。以抗氧化的角度而言，我們推測適度的提高尿酸的濃度對於抗氧化作用也不失為一件好事。

抗氧化酵素

當生物體內發生粒線體的電子傳遞、脂質氧化、NADPH

氧化作用和巨噬細胞吞噬作用以及細胞色素的解毒作用時，同時會伴隨自由基的產生 (Mino et al., 1993)。這些不安定的自由基分子在生物體內受到抗氧化酵素的作用，可減少它們在生物體內所造成的氧化傷害。生物體內抗氧化酵素作用的模式，可以透過 SOD 將超氧陰離子代謝成氫過氧化物，再經 GSH 過氧化酶的作用，代謝成水 (Chow, 1991)。

實驗結果顯示，餵飼不同維生素 E 含量的飲食 (0-1500 ppm)，對於紅血球 SOD、肝中 SOD 和 GSH 過氧化酶活性沒有顯著影響。以前的研究也發現，以每公斤含 15-1500 mg 維生素 E 的飼料餵飼天竺鼠 5 星期，觀察其對動物體內抗氧化酵素的影響，發現飲食中的維生素 E 並不影響天竺鼠心臟的 SOD 和 GSH 過氧化酶活性 (Rojas et al., 1996)。而在本實驗中發現，大部分的抗氧化酵素活性，並不會受到飲食中不同維生素 E 含量的影響。

解毒酵素活性

動物餵飼不同含量維生素 E 的飲食，各組間細胞色素 P450 含量、NADPH P450 還原酶及 NDMA 酵素活性沒有明顯差異。可能因為細胞色素 P450 含量代表著是對細胞色素 P450 酵素整體表現，細胞色素 P450 之中含有多種同功異構酶，每一種同功異構酶有它們專一的酵素功能，會受到個別不同化學物質的誘發。大鼠餵飼維生素 E 缺乏的飲食其 POD 和 GST 酵

素活性顯著低於大鼠餵飼含 100 及 1500 ppm 維生素 E 的飲食 ($p < 0.05$)。

此結果顯示飲食中不同含量的維生素 E，對於解毒酵素活性的影響是選擇性而非全面性。

體內維生素 E 和脂質過氧化物濃度

體內維生素 E 濃度會隨著飲食中維生素 E 含量增加而增加。維生素 E 具有良好的抗氧化功能在很多實驗已得到証實 (Brown et al., 1998; Eder and Kirchgessner, 1998; Scholz et al., 1997)，它可以有效的抑制脂肪過氧化作用，在本實驗我們也發現隨著飲食中維生素 E 含量的增加，動物體內脂質過氧化反應有明顯下降趨勢。

脂肪酸組成

實驗結果發現，餵飼不同含量維生素 E 的飲食對於肝臟磷脂質脂肪酸組成有部分影響。餵飼 1500 ppm 維生素 E 相較於餵飼 100 ppm 維生素 E，有較高的亞麻油酸，但是花生四烯酸卻沒有顯著的差異。而且二十碳五烯酸，會隨著餵飼維生素 E 含量的增加，而有顯著的增加。二十碳五烯酸，為一超長鏈多元不飽和脂肪酸，可增加細胞膜的流動性 (Castuma and Brenner, 1983)，但是二十碳五烯酸具有較多

雙鍵，容易受到自由基攻擊。

表一. 實驗飼料組成.

Table 1. Composition of experimental diets.

Ingredient	0 ppm vitamin E	100 ppm vitamin E %	1500 ppm vitamin E
Corn oil, tocopherol-stripped ^a	5	-	-
Corn oil ^b	-	5	5
Casein "vitamin free" test ^a	20	20	20
Sucrose ^c	50	50	50
Corn starch ^a	15	15	15
Cellulose ^a	5	5	5
AIN mineral mixture 76 ^a	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture (α -tocopherol devoid) ^a	1	-	-
AIN vitamin mixture 76 ^a	-	1	1
Tocopheryl acetate ^a	-	-	0.15
DL-Methionine ^a	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate ^a	0.2	0.2	0.2

a : Teklad (Madison, WI)

b : CPC Intl Inc. (Englewood, NJ)

c : 臺糖細砂

表二. 不同維生素E 處理對於大鼠生長情形的影響.

Table 2. Effect of dietary vitamin E on food intake, body weight gain, liver weight and liver weight / body weight .

	vitamin E (ppm)		
	0	100	1500
Food intake (g)	1031±137	1085±51	1078±61
Body weight gain (g)	288±42	318±22	307±21
Liver weight (g)	12.6±3.0 ^b	15.0±3.1 ^{ab}	16.4±1.8 ^a
Liver wt/body wt (%)	3.54±0.48 ^b	4.00±0.60 ^{ab}	4.88±0.81 ^a

Values are means ± SD. Groups that do not share the same letter (a,b) are significantly different from one another, p<0.05 .

表三. 不同維生素E 處理對於大鼠紅血球和肝臟麩胱甘肽濃度的影響.

Table 3. Effect of dietary vitamin E on glutathione redox state in the RBC and liver.

	vitamin E (ppm)		
	0	100	1500
RBC			
GSH (nmol/mg prot)	3.53±0.41 ^b	4.00±0.60 ^b	4.90±0.90 ^a
GSSG (nmol/mg prot)	0.0093±0.0024 ^a	0.0081±0.0074 ^a	0.0042±0.0059 ^b
GSH/ (GSH+2GSSG)	0.9947±0.0016 ^b	0.9963±0.0033 ^{ab}	0.9983±0.0024 ^a
Liver			
GSH (nmol/mg prot)	26.03±6.15	24.95±5.71	27.17±4.20
GSSG (nmol/mg prot)	1.14±0.22	1.02±0.20	0.99±0.07
GSH/ (GSH+2GSSG)	0.927±0.01	0.92±0.01	0.93±0.01

Values are means ± SD . Groups that do not share the same letter (a,b) are significantly different from one another , p<0.05 .

表四. 不同維生素E 處理對於大鼠體內水溶性抗氧化分子的影響.

Table 4. Effect of dietary vitamin E on plasma vitamin C, protein thiol, uric acid and liver vitamin C .

	vitamin E (ppm)		
	0	100	1500
Plasma			
Vitamin C (nmol/ml)	74.6±22.9	94.8±6.8	81.3±24.9
Protein thiol (nmol/mg prot)	2.72±0.95	2.63±0.43	3.05±0.90
Uric acid (mg/dl)	0.96±0.30 ^b	1.16±0.35 ^b	1.74±0.52 ^a
Liver			
Vitamin C (μ mol/g)	1.64±0.29	1.74±0.22	1.72±0.34

Values are means \pm SD . Groups that do not share the same letter (a,b) are significantly different from one another, $p < 0.05$.

表五. 不同維生素E 處理對於大鼠紅血球及肝臟抗氧化酵素的影響.

Table 5. Effect of dietary vitamin E on RBC and liver SOD, GSH peroxidase and reductase activities .

	vitamin E (ppm)		
	0	100	1500
RBC			
SOD (U/g Hb)	2893±302	2740±170	2854±340
Liver			
mSOD (U/mg prot)	0.43±0.02	0.39±0.07	0.45±0.06
cSOD (U/mg prot)	0.084±0.022 ^{ab}	0.071±0.012 ^b	0.091±0.009 ^a
GSH Px (nmol/min/mg prot)	425.7±26.9	478.7±60.6	462.5±41.9
GSH Rd (nmol/min/mg prot)	57.41±2.23 ^b	63.19±4.17 ^{ab}	60.97±4.31 ^a

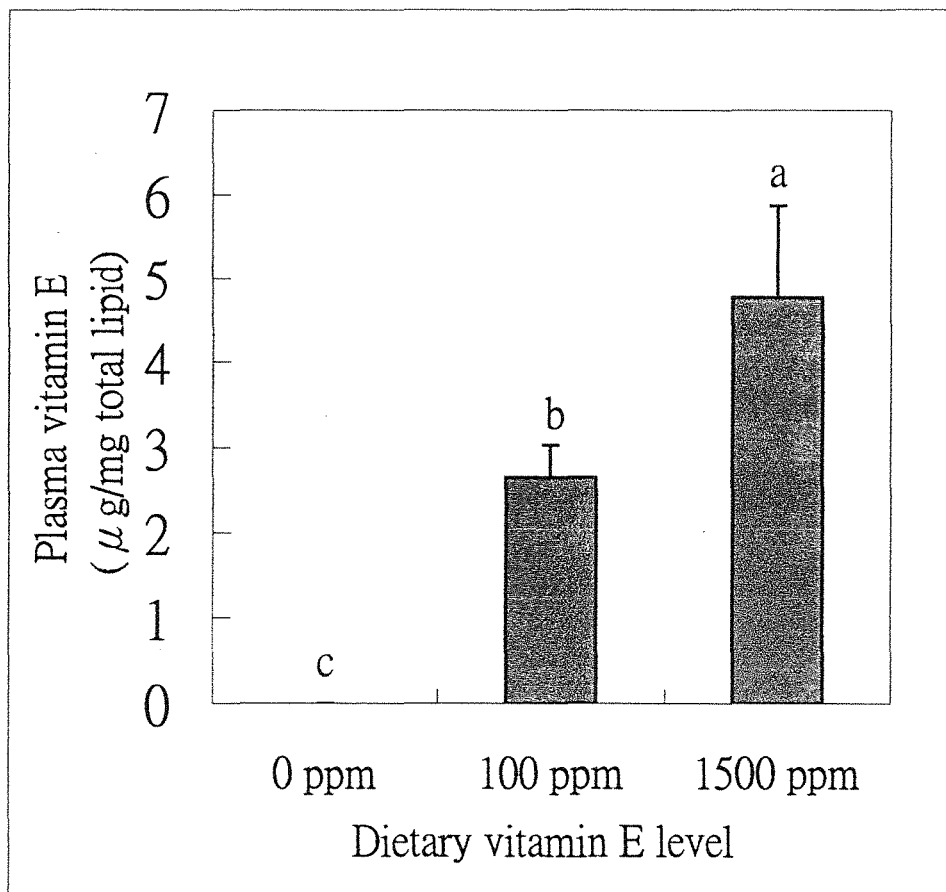
Values are means ± SD . Groups that do not share the same letter (a,b) are significantly different from one another, p<0.05 .

表六. 不同維生素E 處理對於大鼠肝臟細胞色素P-450及麩胱甘肽硫轉移酶活性的影響.

Table 6. Effect of dietary vitamin E on hepatic total P450 content , P450 enzyme and GST activities .

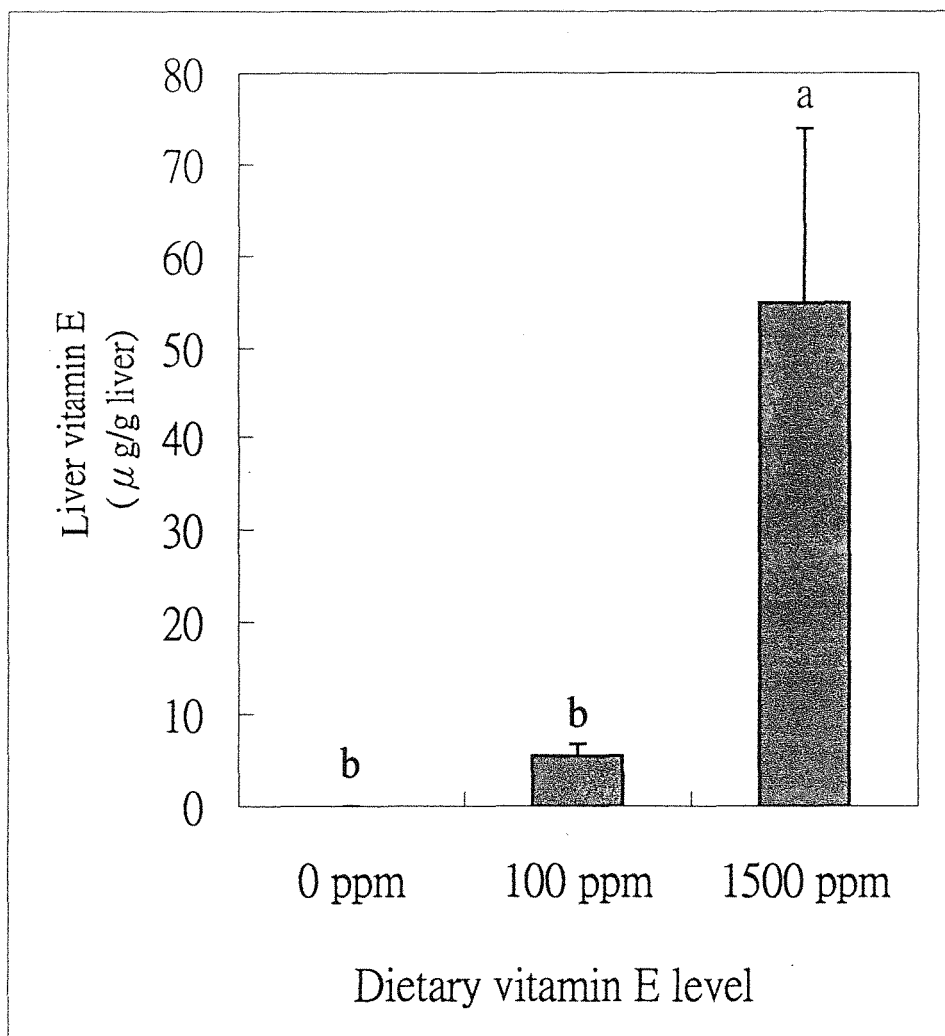
	vitamin E (ppm)		
	0	100	1500
Total P450 content (nmol/mg prot)	0.60±0.09	0.68±0.11	0.61±0.06
NADPH P450 reductase (nmol/min/mg prot)	299.9±46.1	320.5±69.0	301.0±30.0
POD activity (nmol/min/mg prot)	9.39±1.22 ^b	13.07±2.41 ^a	11.96±1.28 ^a
NDMA activity (nmol/min/mg prot)	0.50±0.11	0.46±0.09	0.54±0.11
GST activity (nmol/min/mg prot)	1500±138 ^b	1876±241 ^a	1857±198 ^a

Values are means ± SD . Groups that do not share the same letter (a,b) are significantly different from one another, p<0.05 .



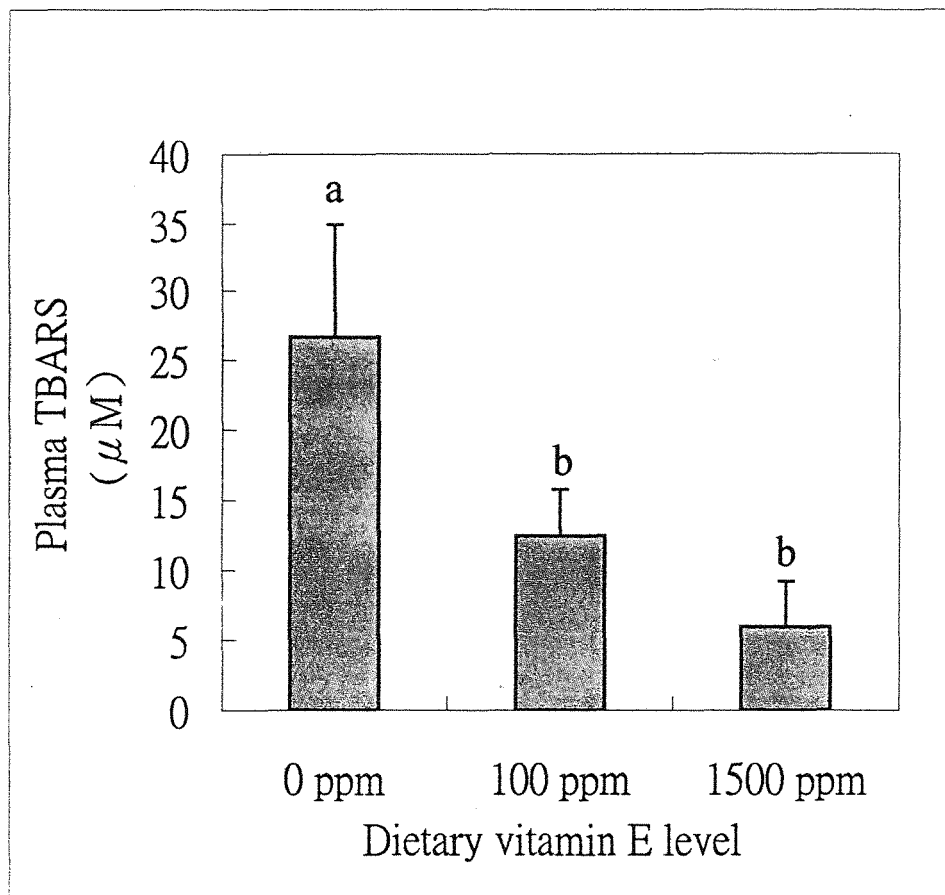
圖一. 不同維生素E 處理對大鼠血漿維生素E 濃度的影響.

Fig. 1. Effect of different vitamin E level on plasma vitamin E concentration.



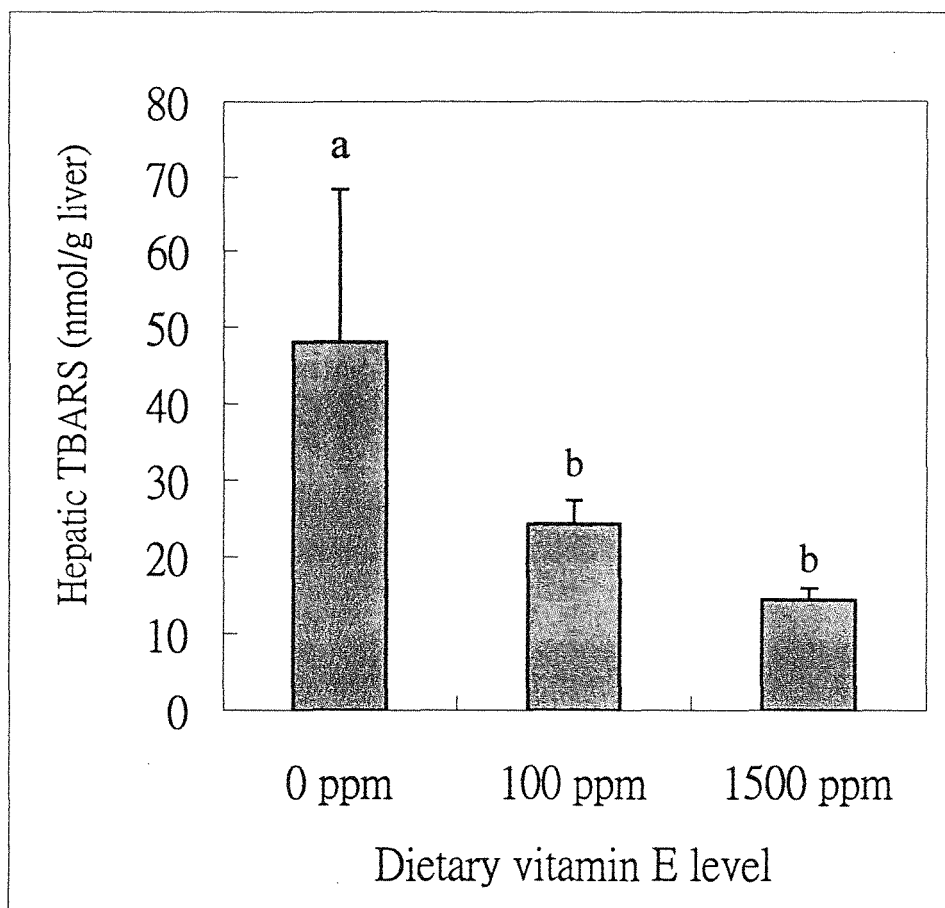
圖二. 不同維生素E 處理對大鼠肝中維生素E 濃度的影響.

Fig. 2. Effect of different vitamin E level on hepatic vitamin E content .



圖三. 不同維生素E 處理對大鼠血漿脂質過氧化物濃度的影響.

Fig. 3. Effect of different vitamin E level on plasma TBARS concentration .



圖四. 不同維生素E 處理對大鼠肝中脂質過氧化物濃度的影響.

Fig. 4. Effect of different vitamin E level on hepatic TBARS content .

表七. 不同維生素E 處理對大鼠肝臟磷脂質脂肪酸組成的影響.

Table 7. Effect of vitamin E treatment on hepatic phospholipid fatty acid composition .

Fatty acid	0 ppm vitamin E	100 ppm vitamin E	1500 ppm vitamin E
16 : 0 (%)	18.04 ± 2.15	19.61 ± 1.63	19.52 ± 1.82
16 : 1 (n-7) (%)	0.78 ± 0.24 ^b	0.94 ± 0.24 ^{ab}	1.27 ± 0.54 ^a
18 : 0 (%)	24.39 ± 1.61 ^a	24.08 ± 0.69 ^{ab}	22.52 ± 1.36 ^b
18 : 1 (n-9) (%)	3.48 ± 0.64 ^{ab}	3.13 ± 0.42 ^b	3.95 ± 0.47 ^a
18 : 2 (n-6) (%)	11.47 ± 0.91 ^a	9.83 ± 1.18 ^b	12.48 ± 1.17 ^a
20 : 4 (n-6) (%)	36.20 ± 1.71	36.08 ± 3.60	34.11 ± 2.98
20 : 5 (n-3) (%)	0.20 ± 0.03 ^c	0.25 ± 0.04 ^b	0.31 ± 0.02 ^a
22 : 6 (n-3) (%)	4.45 ± 0.50 ^b	5.08 ± 1.57 ^a	4.68 ± 0.38 ^{ab}
24 : 0 (%)	0.98 ± 0.50 ^b	0.98 ± 0.09 ^b	1.17 ± 0.14 ^a

Values are means ± SD. Groups that do not share the same letter(a,b,c) are significantly different from one another, p<0.05 .

Part 2

飲食中不同維生素 E 含量
對腹腔注射 phenobarbital 大鼠
體內解毒酵素所造成的影響

中 文 摘 要

肝臟中細胞色素 P-450 在致癌物的生物活化、內生性物質的生物轉換及毒物的解毒作用扮演重要的角色，然而這些酵素活性會受到不同飲食因子所調控，最近的研究報告指出，餵飼不同含量維生素 E，會影響大鼠肝中 CYP2B1 活性。

實驗採用 16 隻雄性 Sprague-Dawley 大鼠，餵飼 AIN-76diet 四天，接著空腹兩天，之後大鼠分成四組分別餵飼含 0、100、5000 和 15000 ppm 維生素 E 飲食四天，大鼠犧牲前連續給與腹腔注射 phenobarbital (75 mg/kg) 三天，以誘發細胞色素 P450 2B1 活性。

結果顯示經過 phenobarbital 腹腔注射的大鼠，飼料中維生素 E 含量顯著影響血漿及肝臟組織中維生素 E 濃度，並且維生素 E 能有效地抑制 TBARS 的產生。至於在解毒酵素方面，CYP2B1 活性在餵飼 5000 和 15000 ppm 維生素 E 的大鼠相較於餵飼 100 及 0 ppm 維生素 E 的大鼠，活性有明顯提升 ($p < 0.05$)；餵飼 5000 和 15000 ppm 維生素 E 的大鼠，細胞色素 P450 含量顯著高於餵飼 100 ppm 維生素 E 之大鼠 ($p < 0.05$)。

由此實驗結果得知，飲食中維生素 E 的添加確

實會影響 phenobarbital 誘發解毒酵素 CYP2B1。

關鍵詞：維生素 E，細胞色素 P450，phenobarbital

Abstract

Hepatic cytochrome P-450 enzymes play important roles in the bioactivation of chemical carcinogens, the biotransformation of many endogenous compounds, and the detoxification of numerous xenobiotics. These enzyme activities have been showed to be regulated by various dietary factors. The objective of the present study was to investigate the effect of dietary vitamin E on hepatic cytochrome P-450 2B1 activity in the presence of phenobarbital. Weaning male Sprague-Dawley rats were fed the AIN-76 diet for 4 days, then fasted 2 days, followed by semipurified diets containing 0, 100, 5000 or 15000 ppm vitamin E for 4 days. Both liver and plasma α -tocopherol concentrations were dose-dependently regulated by dietary vitamin E level. The inhibition of lipid peroxidation by dietary vitamin E was dose-dependent. Rats fed diets containing 5000 and 15000 ppm vitamin E had significantly greater hepatic total cytochrome P-450 content than rats fed diets containing 100 ppm vitamin E ($p < 0.05$). Hepatic cytochrome P-450 2B1 activity was significantly greater in rats fed diets containing 5000 and 15000 ppm vitamin E than in rats fed diets containing 0 or 100 ppm vitamin E ($p < 0.05$). These results suggest that, in the presence of phenobarbital induction, dietary vitamin E

efficiently affects tissue α -tocopherol level and inhibits lipid peroxidation, and that vitamin E supplementation (a diet containing 5000 or 15000 ppm) enhances hepatic cytochrome P-450 2B1 activity compared to a diet containing 0 or 100 ppm vitamin E.

Keywords : Vitamin E 、 Cytochrome P-450 、 Phenobarbital

前 言

第一部份的實驗結果顯示，餵飼不同維生素 E 含量的飲食會影響血漿及肝臟組織中維生素 E 的濃度，並且維生素 E 能有效的抑制 TBARS 的形成。在解毒酵素方面發現 CYP2B1 和 GST 酵素活性，會隨飲食中維生素 E 含量增加而有增加的趨勢，但其他酵素活性則不受飲食中維生素 E 含量的影響。所以我們認為飲食中維生素 E 含量對於解毒酵素的影響是選擇性而非全面性。

因此在第二部份的實驗，給與大鼠腹腔注射 phenobarbital (75 mg/kg)，以誘發生物體 CYP2B1 活性，來觀察飲食中維生素 E 含量對於 CYP2B1 的影響。

文 獻 探 討

維生素 E 可以影響解毒酵素系統的生物轉換能力，因而改變了化學毒物在生物體內的作用 (Carpenter, 1972)。生物體內的生物轉換系統 (biotransformation) 包括了兩大類解毒酵素，它們分別是 phase I 和 phase II 酵素。生物體面對外來有毒物質的侵犯時，生物體內的解毒酵素活性會增加，將親脂性的有機毒物轉變成具有較高水溶解性的產物，以利它們排出體外，減少毒物對細胞造成的傷害。phase I 的解毒酵素，主要有細胞色素 P450 及 NADPH 細胞色素 P450 還原酶 (Fabacher et al., 1980)，而 phase II 的解毒酵素，包括有麩胱甘肽硫轉移酶 (GST)、N-乙酰基轉移酶 (N-acetyltransferase) 及硫轉移酶 (sulfotransferase) 等。

Phenobarbital (PB) 是目前被廣泛使用的肝癌促進劑 (hepatopromoter) 和細胞色素 P450 的誘發劑 (Nelson et al., 1993)，但是 PB 是如何引發癌症的機制，到目前為止並不是很清楚，而 PB 除了可以誘發體內 phase I 細胞色素 P450 酵素活性 (Nebert et al., 1991; Ryan and Levin, 1990) 同時也具有誘發 phase II 麩胱甘肽硫轉移酶的作用 (Vos et al.,

1988)。

學者證實 phenobarbital 誘發 CYP2B1 之機制是啟動轉錄蛋白質合成的作用(Waxman and Azaroff, 1992)。之後也有學者研究發現給與雄性及雌性老鼠不同劑量 phenobarbital (Agrawal and Shapior, 1996)，探討 phenobarbital 對於 CYP2B1 mRNA 的影響，結果發現，phenobarbital 可以增加 CYP2B1 mRNA 的量，並且雄性老鼠被誘發的程度顯著高於雌性老鼠。除了 mRNA 表現外，實驗也證實雄性老鼠 CYP2B1 蛋白質的表現也顯著高於雌性老鼠。

維生素 E 具有調節代謝解毒酵素 mixed-function oxidase (MFO) 的能力，在維生素 E 缺乏的情況下 MFO 代謝藥物的能力會降低，但經過補充後又會回復 MFO 的活性 (Carpenter, 1972)。有些學者研究發現當維生素 E 缺乏時，造成肝臟中細胞色素 P450 酵素對於 ethylmorphine 及 benzo[a]pyrene 藥物的代謝能力降低，但是對於細胞色素 P450 含量及細胞色素 P450 還原酶的活性則沒有顯著的影響 (Yang and Yoo, 1988； Carpenter, 1972)。

維生素 E 對於細胞色素 P450 酵素的保護作用，可能是藉由其抗氧化劑的功能，對位於膜上的脂肪酸、蛋白質或酵素產生保護，進一步達到影響細胞色素 P450 酵素活性的作用 (Gower, 1988)。

學者因此提出，維生素 E 可以藉由預防細胞膜的氧化傷害，維持肝中微粒體細胞色素 P450 的活性 (Cassand et al., 1993)，進而調控外來物的解毒代謝 (Chow et al., 1984)。

研究動機

藥物或環境化合物的藥效或毒性與其代謝有密切的關係。細胞色素 P450 酵素系統負責許多藥物、致癌物、食品添加物、環境污染物的氧化代謝反應。根據第一部份的實驗結果，飲食中不同含量的維生素 E，可以影響 POD 和 GST 活性，選用雄性大鼠腹腔注射 phenobarbital (75 mg/kg)，同時餵飼不同含量的維生素 E，來觀察飲食中維生素 E 含量對於 CYP2B1 活性的影響。

材 料 與 方 法

實驗動物及飼料

實驗動物

自國科會實驗動物繁殖及研究中心，購入離乳雄性 Sprague-Dawley 大鼠十六隻。

飼料組成

酪蛋白、玉米粉、纖維素、膽素、甲硫胺酸、不含維生素 E 的玉米油 (tocopherol-stripped corn oil)、不含維生素 E 的 AIN-76 維生素混合物、tocopherol-acetate、AIN-76 維生素混合物及 AIN-76 礦物質混合物等購自 Teklad (Madison, WI); 玉米油為 Mazole 品牌 (CPC Intl Inc. Englewood, NJ)。

動物飼養

離乳之雄性 Sprague-Dawley 大鼠 16 隻，平均體重 60-70 克，每隻大鼠獨立飼養在一個不銹鋼絲網籠中，動物房之溫度維持在 $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，光照和黑夜環境各為 12 小時，飼料和飲水以任食方式給與。首先老鼠餵食 AIN-76 diet (Table 1) 適應 4 天，接著空腹 2 天，之後大鼠分成四組，分別餵飼含 0, 100, 5000

及 15000 ppm 維生素 E 飲食四天 (Table 2)，由於 phenobarbital (PB) 具有誘發細胞色素 CYP2B1 活性的作用，在大鼠犧牲前連續給與腹腔注射 phenobarbital 3 天 (9 g/l saline)，劑量為每天每公斤體重 75 mg，實驗過程稱量大鼠體重及記錄大鼠飼料攝取量。

大鼠犧牲及樣品收集步驟同第一部份實驗。

肝臟微粒體 CYP2B1 蛋白質表現

SDS-聚丙烯醯胺板膠電泳法 (Laemmli, 1970)

樣品製備

樣品製備同酵素活性分析，但在電泳分析前先將同組所有樣本等量混合，測定蛋白質濃度 (Lowry et al., 1951)。將樣品稀釋為 2 mg protein/ml，隨後加入等量 protein loading buffer，置於 95°C 下煮 5 分鐘，冷卻後再將等量樣品分別加入各個樣品凹型槽中，電源供應設定以 200 伏特的電壓通過，待樣品移行至距離底板約 0.5 cm 時，將電源關掉，小心將電泳膠片由玻璃板上取下。

西方墨點法(Towbin et al., 1979)

抗原抗體染色

將 PVDF 膜由 blocking solution 取出，以 buffer A 沖洗 3 次，每次 5 分鐘。再倒入一級抗體 (anti-rat cytochrome 2B1 抗體)，配製比例如下所示，於 37°C 水浴中震盪 30 分鐘。

取出一級抗體溶液，以 buffer A 沖洗 3 次，每次 5 分鐘，接著倒入二級抗體 (goat anti-mouse IgG antiserum 或 anti-rabbit IgG biotinylated antibody)，於 37°C 水浴中震盪 30 分鐘。之後取出二級抗體溶液，以 buffer A 沖洗 3 次，每次 5 分鐘。再接著倒入 A-B complex (avidin-horseradish peroxidase) 溶液，於 37°C 水浴中震盪 30 分鐘。後取出 A-B complex 溶液，以 buffer A 沖洗 3 次，每次 5 分鐘。最後加入 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (10 cc buffer B 加入 4 μ l 3% H₂O₂ 及 40 μ l 25 mg/ml DAB) 呈色。倒出顯色液，以 buffer A 沖洗 5 分鐘。取出 PVDF 膜，蔭乾即可。

一級抗體或二級抗體配製比例

	一級抗體	二級抗體
2B1	P450 2B1 antibody : buffer B =1:1000	anti-rabbit IgG : buffer B=1:400

肝臟微粒體 CYP2B1 蛋白質定量

採用美國 Alpha Innotech 公司的 Alpha Imager 2000 數位化影像分析系統。首先用西方墨點法將 16 隻大鼠的 CYP 2B1 蛋白質轉移到 gel 上，然後把 gel 放置在影像分析系統攝影機下方，調整焦距使 gel 在螢幕上清晰可見。圈選待測的 CYP 2B1 蛋白質範圍，定量後以 integrated density value (IDV) 為表示單位。

結 果

體重增加量與食物攝取量

表三結果顯示，大鼠經腹腔注射 phenobarbital (75 mg/kg)，同時餵食含 5000 與 15000 ppm 維生素 E 飼料，其食物攝取量較餵飼含 100 ppm 維生素 E 飼料的大鼠有顯著減少 ($p < 0.05$)。體重增加部分，餵飼 5000 ppm 維生素 E 大鼠相較於其他三組有顯著減少 ($p < 0.05$)。

肝臟重量

表三結果顯示，大鼠經腹腔注射 phenobarbital (75 mg/kg)，同時餵飼 100 ppm 維生素 E，其肝臟重量與肝臟佔體重百分比顯著高於其他各組 ($p < 0.05$)。

體內維生素 E 與脂質過氧化物濃度

表四結果顯示，大鼠經腹腔注射 phenobarbital (75 mg/kg)，組織中維生素 E 濃度，隨著飲食中維生素 E 含量的增加而有顯著增加的情形 ($p < 0.05$)。大鼠餵飼維生素 E 缺乏飲食其肝臟及血漿中脂質過氧化物濃度顯著高於餵飼 100、5000 及 15000 ppm 維生素 E 的大鼠 ($p < 0.05$)。維生素

E 抑制組織脂肪過氧化作用是劑量依賴效應。

肝臟微粒體細胞色素 P450 和麩胱甘肽硫轉移酶

表五結果顯示，大鼠經腹腔注射 phenobarbital (75 mg/kg)，餵飼 5000 ppm 維生素 E 大鼠其肝臟中細胞色素 P450 含量顯著高於其他各組($p < 0.05$)，而餵飼 100 ppm 維生素 E 大鼠相較於其他三組有明顯降低($p < 0.05$)。而大鼠餵飼 5000 ppm 維生素 E 其細胞色素 P450 還原酶活性顯著高於其他各組($p < 0.05$)。在 POD 酵素活性方面，餵飼 5000 ppm 與 15000 ppm 維生素 E 大鼠，顯著高於餵飼 0 以及 100 ppm 維生素 E 的大鼠($p < 0.05$)。而餵飼 100 ppm 維生素 E 的大鼠其 GST 酵素活性顯著高於其他各組($p < 0.05$)。

微粒體 POD (2B1) 蛋白質表現

圖一西方墨點法結果顯示，餵飼 5000 ppm 維生素 E 的大鼠，肝臟微粒體 POD 蛋白質表現高於餵飼缺乏維生素 E 與 100 ppm 維生素 E 的大鼠；而餵飼 100 ppm 維生素 E 的大鼠相較於其他三組有顯著減少的情形。

膠片經過定量後，表六得到的結果與圖一相類似。

討 論

老鼠生長情形

第二部分實驗飼料配方的設計，參考 1985 年學者 Wade 等人的飲食設計方法，先給予大鼠正常的 AIN-76 飲食四天，接著斷食二日，之後再給與餵飼不同維生素 E 含量的飲食四天，於犧牲前三天同時給與大鼠注射 75 mg/kg phenobarbital，目的是要在短時間內觀察細胞色素 P450 活性。

大鼠經過 phenobarbital 處理，餵飼 5000 ppm 維生素 E 的大鼠，其肝臟重量相較於其他組別有顯著降低($P < 0.05$)。以前研究指出(Lii et al., 1997)飲食中維生素 E 含量對大鼠肝重和肝重占體重百分比並無顯著的影響，與本次實驗結果不同，推測是大鼠同時接受 phenobarbital 與維生素 E 處理，可能是它們二者之間產生的交互作用所致。

體內維生素 E 和脂質過氧化物濃度

結果顯示，大鼠餵飼缺乏維生素 E 飲食，其血漿和肝臟組織中維生素 E 濃度相較於餵飼飲食中含維生素 E 的大鼠，有顯著降低($P < 0.05$)，這意味著大鼠體內維生素 E 濃度

是受飲食中維生素 E 含量所影響。在脂質過氧化方面，當血漿和肝臟組織中維生素 E 濃度增高時，其 TBARS 濃度會降低，這顯示維生素 E 具有抑制脂質過氧化作用。飲食中維生素 E 含量和體內脂質過氧化物濃度呈負相關，這樣的結果與其他學者所作的結果相同(Wang et al., 1996; Tampo and Yonaha, 1990)。

解毒酵素

大鼠給與腹腔注射 phenobarbital(75 mg/kg)，結果發現，解毒酵素的活性較第一部份未注射 phenobarbital 的大鼠來得高。証實學者所提當動物受到外來物侵入時，可誘發體內解毒酵素活性，以利解毒代謝的進行(Waxman et al., 1983; Waxman, 1986)。維生素 E 對解毒酵素的影響，在細胞色素 P450 含量和 NADPH P450 reductase 方面沒有明顯的影響，此結果與先前的研究發現相類似(Carpenter, 1972; Horn et al., 1976)。至於 POD 活性方面，餵飼 5000 和 15000 ppm 維生素 E 的大鼠其活性相較於其它二組有顯著增加 ($P < 0.05$)，這更進一步証明維生素 E 的存在對 POD 活性表現是必要的。在 GST 活性方面，餵飼 100 ppm 維生素 E 的大鼠，其 GST 活性較其他三組顯著的增加 ($p < 0.05$)，可能是 phenobarbital 與維生素 E 對 GST 活性存有交互作用。

肝臟微粒體 POD (CYP 2B1) 蛋白質表現

利用 phenobarbital 腹腔注射處理，同時餵飼不同含量維生素 E 的大鼠，其肝臟微粒體 POD 蛋白質表現也受飲食中維生素 E 所影響。餵飼 5000 ppm 維生素 E 的大鼠其肝臟微粒體 POD 蛋白質表現較餵飼 0 與 100 ppm 維生素 E 二組有明顯增加。肝臟微粒體 POD 蛋白質表現的結果與 POD 酵素活性呈現類似趨勢，但非完全一致。

表一. AIN-76 飼料組成.

Table 1. Composition of experimental diets.

Ingredient	AIN-76 diet %
Corn oil ^b	5
Casein "vitamin free" test ^a	20
Sucrose ^c	50
Corn starch ^a	15
Cellulose ^a	5
AIN mineral mixture 76 ^a	3.5
AIN vitamin mixture 76 ^a	1
DL-Methionine ^a	0.3
Choline bitartrate ^a	0.2

a : Teklad (Madison, WI)

b : CPC Intl Inc. (Englewood, NJ)

c : 臺糖細砂

表二. 實驗飼料組成

Table 2. Composition of experimental diets.

Ingredient	0 ppm	100 ppm	5000 ppm	15000 ppm
	vitamin E	vitamin E	vitamin E	vitamin E
g				
Corn oil, tocopherol-stripped ^a	17	-	-	-
Corn oil ^b	-	17	17	17
Casein "vitamin free" test ^a	20	20	20	20
Sucrose ^c	23	23	23	23
Corn starch ^a	15	15	15	15
Cellulose ^a	5	5	5	5
AIN mineral mixture 76 ^a	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture (α -tocopherol devoid) ^a	1	-	-	-
AIN vitamin mixture 76 ^a	-	1	1	1
Tocopheryl acetate ^a	-	-	0.425	1.275
DL-Methionine ^a	0.3	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate ^a	0.2	0.2	0.2	0.2

a : Teklad (Madison, WI)

b : CPC Intl Inc. (Englewood, NJ)

c : 臺糖細砂

表三. 在PB 處理下, 同時餵飼不同維生素E 含量飲食對於大鼠生長情形的影響.

Table 3. Effect of dietary vitamin E on food intake, body weight gain, liver weight and liver weight/body weight in the presence of phenobarbital .

	vitamin E (ppm)			
	0	100	5000	15000
Food intake (g)	122±4 ^{ab}	131±2 ^a	116±6 ^b	116±13 ^b
Body weight gain (g)	51.2±1.1 ^a	58.7±4.9 ^a	42.2±4.3 ^b	55.5±7.0 ^a
Liver weight (g)	9.25±1.15 ^b	13.15±1.20 ^a	7.38±0.46 ^c	8.90±0.97 ^{bc}
Liver wt/body wt (%)	7.27±0.46 ^b	9.94±1.32 ^a	6.52±0.41 ^b	7.26±0.79 ^b

Values are means ± SD. Groups that do not share the same letter (a, b, c) are significantly different from one another, $p < 0.05$.

表四. 在PB 處理下, 同時餵飼不同維生素E 含量飲食對大鼠體內維生素E 及脂質過氧化物濃度的影響.

Table 4. Effect of dietary vitamin E on tissue vitamin E content and hepatic lipid peroxidation in the presence of phenobarbital.

	vitamin E (ppm)			
	0	100	5000	15000
Plasma				
Vitamin E ($\mu\text{g}/\text{mg}$ total lipid)	1.01 ± 0.07^d	2.86 ± 0.42^c	6.95 ± 1.13^b	9.23 ± 0.91^a
Hepatic				
Vitamin E ($\mu\text{g}/\text{g}$ liver)	0.00 ± 0.00^c	6.73 ± 2.04^c	71.75 ± 14.62^b	320.68 ± 69.75^a
TBARS (nmol/ g liver)	467 ± 27^a	151 ± 35^b	119 ± 14^{bc}	100 ± 10^c

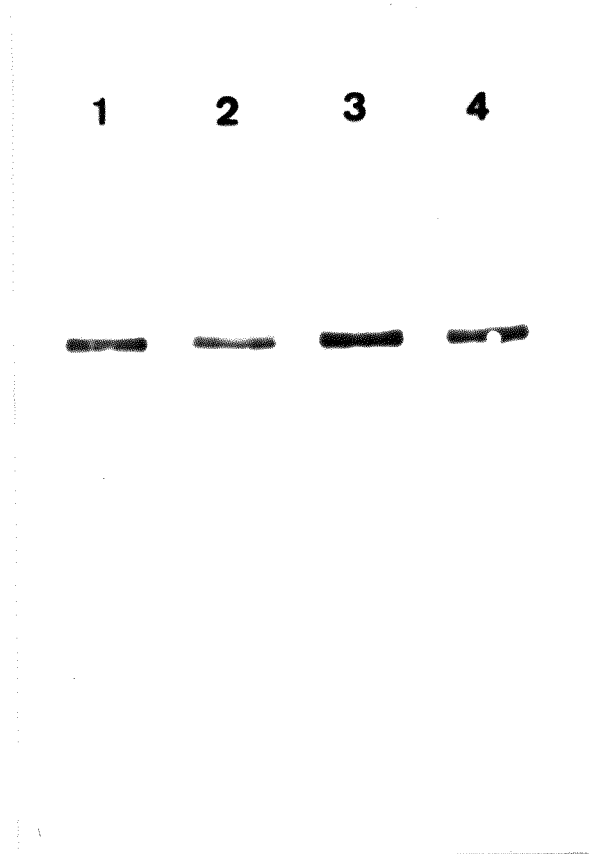
Values are means \pm SD. Groups that do not share the same letter (a, b, c, d) are significantly different from one another, $p < 0.05$.

表五. 在PB 處理下, 同時餵飼不同維生素E 含量飲食對於大鼠肝臟細胞色素 P-450及麩胱甘肽硫轉移酶活性的影響.

Table 5. Effect of dietary vitamin E on hepatic total P450 content, P450 enzyme and GST activities in the presence of phenobarbital.

	vitamin E (ppm)			
	0	100	5000	15000
Total P450 content (nmol/mg prot)	1.09±0.11 ^b	0.68±0.14 ^c	1.29±0.08 ^a	1.18±0.10 ^{ab}
NADPH P450 reductase (nmol/min/mg prot)	574±56 ^{ab}	533±76 ^b	622±36 ^a	514±43 ^b
POD activity (nmol/min/mg prot)	572±33 ^b	445±60 ^c	1252±131 ^a	1177±68 ^a
GST activity (nmol/min/mg prot)	2289±256 ^b	3317±395 ^a	2269±116 ^b	2565±170 ^b

Values are means ± SD . Groups that do not share the same letter (a, b, c) are significantly different from one another, p<0.05.



圖一. 在PB 處理下,同時餵飼不同維生素E 含量飲食,對於大鼠肝臟微粒體POD 蛋白質表現的影響.

1: 0 ppm vitamin E 2: 100 ppm vitamin E
3: 5000 ppm vitamin E 4: 15000 ppm vitamin E

Figure. 1. Effect of dietary vitamin E on hepatic cytochrome P450 POD (2B1) protein level in the presence of phenobarbital.

表六. 在PB 處理下, 同時餵飼不同維生素E 含量飲食, 對於大鼠肝臟微粒體POD 蛋白質表現.

Table. 6. Effect of dietary vitamin E on hepatic cytochrome P450 POD (2B1) protein expression in the presence of phenobarbital.

	vitamin E (ppm)			
	0	100	5000	15000
POD protein density (IDV)	17820±2164 ^b	13420±1249 ^c	22880±2667 ^a	20680±1560 ^{ab}

Values are means ± SD. Groups that do not share the same letter (a, b, c) are significantly different from one another, $p < 0.05$.

IDV: integrated density value

結 論

飲食中維生素 E 含量可影響大鼠體內抗氧化系統，抑制脂質過氧化物產生、提升紅血球麩胱甘肽濃度、增加血漿尿酸濃度、增加細胞質超氧化歧化酶活性和影響細胞色素 POD 和 GST 活性，但不影響 total P450 含量。

在 P450 2B1 誘發劑存在時，維生素 E 對於 P450 2B1 活性及蛋白質表現能有影響。

參考文獻

Agrawal AK and Shapior BH. (1996) Phenobarbital induction of hepatic CYP1B1 and CYP1B2 : Pretranscriptional and post-transcriptional effects of gender, adult age, and phenobarbital dose. *Molecular Pharmacol.* 49: 523-531

Ahn DV, Wolfe FH and Sim JS. (1995) Dietary α -linolenic acid and mixed tocopherols and packaging influences on lipid stability in broiler chicken breast and leg muscle. *J. Food Sci.* 60: 1013-1018

Anders MW and Jakobson I. (1985) Biotransformation of halogenated solvents. *Scand. J. Work Environ. Health* 1: 23-32

Anders MW, Lash LH, Dekant W, Elfarra AA and Dohn DR. (1988) Biosynthesis and biotransformation of glutathione S-conjugates to toxic metabolites. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 18: 311-341

Anderson KE, Pantuck EJ, Conney AH and Kappas A. (1985) Nutrient regulation of chemical metabolism in humans. *Fed. Proc.* 44: 130-133

Anderson R, Theron AJ and Ras GJ. (1987) Regulation by the antioxidants ascorbate, cysteine, and dapsone of the increased extracellular and intracellular generation of reactive oxidants by activated phagocytes from cigarette smokers. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135: 1027-1032

Ando M and Tappel AL. (1985) Methyl ethyl ketone peroxide damage to cytochrome P-450 peroxidase activities. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 81: 517-524

Ando M and Tappel AL. (1985) Effect of dietary vitamin E on methyl ethyl ketone peroxide damage to microsomal cytochrome P-450 peroxidase. *Chem. Biol. Interact.* 55: 317-326

Asamoto M, Tssuda H , Kato T, Ito N and Masuko T. (1989) Strain differences in susceptibility to 2-acetylaminofluorene and phenobarbital promotion of hepatocarcinogenesis: immunohistochemical analysis of cytochrome P450 isozyme induction by 2-acetylaminofluorene and phenobarbital. *Jpn. J. Cancer Res.* 80 : 1041-1046

Bendich A, D'Apolito P, Gabriel and Machlin LJ. (1984) Interaction of dietary vitamin C and vitamin E on guinea pig immune responses to mitogens. *J. Nutr.* 114: 1588-1593

Bendich A, Gabriel E and Machlin LJ. (1986) Dietary vitamin E requirement for optimum immune responses in the rat. *J. Nutr.* 116: 675-681

Bellomo G, Mirabelli F, Dimonte D, Richelmi P, Thor H, Orreniuns C and Orrenius S. (1978) Formation and reduction for glutathione protein mixed disulfides during oxidative stress. *Biochem. Pharmacol.* 36: 1313-1320.

Ben-Zeev A, Duerr A, Solomon F and Penman S. (1979) The outer boundary of the cytoskeleton: A lamina derived from plasma membrane proteins. *Cell* 17: 859-865

Bland J. (1980): In Brewster MA, Naito HK, eds: *Nutritional elements and clinical biochemistry*. New York: Plenum, p-139

Boyne AF and Ellman GL. (1972) A Methodology for analysis of tissue sulfhydryls components. *Anal. Biochem.* 46: 639-653

Brown KM, Morrice PC and Duthine GG. (1998) Erythrocyte membrane fatty acid composition of smokers and non-smokers: effects of vitamin E supplementation. *Eur. J. Clin. Nutr.* 52: 145-150

Bridge KR and Hoffman KE. (1986) The effects of ascorbic acid on the intracellular metabolism of iron and ferritin. *J. Biol. Chem.* 261: 14273-14277

Burton GW and Traber MG. (1990) Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics and bioavailability. *Annu. Rev. Nutr.* 10: 357-382

Cadenas E. (1989) Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 79-110

Cadenas S, Rojas C, Mendez J, Herrero A and Barja G. (1996) Vitamin E decreases urine lipid peroxidation products in young healthy human volunteers under normal conditions. *Pharmacol. Toxicol.* 79: 247-253

Carpenter MP. (1972) Vitamin E and microsomal drug hydroxylations. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 203: 81-92

Carpenter MP and Howard CN. (1974) Vitamin E, steroids, and liver microsomal hydroxylations. *Am. J. Clin. Nutr.* 27: 966-979

Cassand P, Decoudu S, Leveque F, Daubeze M and Narbonne JF. (1993) Effect of vitamin E dietary intake on in vitro activation of aflatoxin B1. *Mutation Res.* 319: 309-316

Castuma CE and Brenner RR. (1983) Effect of fatty acid

deficiency on microsomal membrane fluidity and cooperativity of the UDP-glucuronyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta.* 729: 9-16

Catignani GJ, Chytil F and Darby WJ. (1974) Vitamin E deficiency: immunochemical evidence for increased accumulation of liver xanthine oxidase. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 71: 1966-1968

Catignani GL and Bieri JG. (1983) Simultaneous determination of retinol and α -tocopherol in serum or plasma by liquid chromatography. *Clin. Chem.* 29: 708-712.

Century B and Horwitt MK. (1965) Biological availability of various forms of vitamin E with respect to different induces of deficiency. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 24: 906-911

Chan KM and Decker EA. (1994) Endogenous skeletal muscle antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* 34: 403

Chan WKM, Hakkarainen K, Faustman C, Schaefer M, Scheller KK and Liu Q. (1996) Dietary vitamin E effect on color spoilage in three beef muscle. *Meat Sci.* 42: 387-389

Chance B, Sies H and Boveris A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59: 527-605

Chen LH and Chang HM. (1979) Effect of high level of vitamin C on tissue antioxidant status of guinea pigs. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 49: 87-91

Chen J, Goetchius MP, Campbell C and Combs GFJR. (1982) Effects of dietary selenium and vitamin E on hepatic mixed-function oxidase activities and in vivo covalent binding of

aflatoxin B1 in rats. *J. Nutr.* 112: 324-331

Chen HW, Hendrich S and Cook LR. (1994) Vitamin E deficiency increases serum thromboxane A₂, platelet arachidonate and lipid peroxidation in male Sprague-Dawley rats. *Prostaglandins Leukotrienes Essent. Fatty Acids* 51: 7-11

Chen HW, Lii CK, Wang ML, Ou CC and Wang MF. (1995) Effects of vitamin E deficiency and dietary linoleate on serum thromboxane synthesis in male Sprague-Dawley rats. *Prostaglandins Leukotrienes Essent. Fatty Acids* 53: 405-411

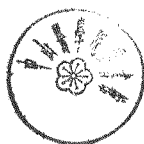
Chen HW, Lii CK, Wu MH, Ou CC and Sheen LY. (1997) Amount and type of dietary lipid modulate rat hepatic cytochrome P-450 activity. *Nutr. Cancer* 29: 174-180

Cho SH and Choi YS. (1994) Lipid peroxidation and antioxidant status is affected by different vitamin E levels when feeding fish oil. *Lipids* 29: 47-52

Chow CK. (1979) Nutritional influence on cellular antioxidant defense system. *Am. J. Clin. Nutr.* 32: 1066-1081

Chow CK and Gairola C. (1984) Influence of dietary vitamin E and selenium on metabolic activation of chemicals to mutagens. *J. Agrc. Food Chem.* 32: 443-447

Chow CK, Chen LH, Thacker RR and griffith RB. (1984) Dietary vitamin E and pulmonary biochemical responses of rats to cigarette smoking. *Environ. Res.* 34: 8-17



Chow CK. (1991) Vitamin E and oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.* 11: 215-232

Comporti M. (1989) Three models of free radical-induced lung injury. *Chem. Biol. Interact.* 72: 1-56

Cotgreave IA, Moldeus P and Orrenius S. (1988) Host biochemical defense mechanisms against prooxidants. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 28: 189-212

Dean RT, Thomal SM and Garner A. (1986) Free-radical-mediated fragmentation of monoamine oxidase in the mitochondrial membrane . Role of lipid radical. *Biochem. J.* 240: 489-494

Deiss A, Lee GR and Gartwright GE. (1970) Hemolytic anemia in Wilson's disease. *Ann. Intl. Med.* 73: 413-418

Dekkers JC, Doornen LJ and Kemper HC. (1996) The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sports Med.* 21: 213-238

Doba T, Burton GW and Ingold KU. (1985) Antioxidant and co-antioxidant activity of vitamin C. The effect of vitamin C, either alone or in the presence of vitamin E or a water-soluble vitamin E analogue, upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipid liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 835: 298-303

Dohn DR, Quebbemann AJ, Borch RF and Anders MW. (1985) Enzymatic reaction of chlorotrifluoroethene with glutathione: ¹⁹F NMR evidence for stereochemical control of the reaction. *J. Biol. Chem.* 260: 5137-5143

Eder K and Kirchgessner M. (1998) The effect of dietary vitamin E supply and a moderately oxidized oil on activities of hepatic lipogenic enzymes in rats. *Lipids* 33: 277-283

Esterbauer H and Cheeseman H. (1987) Lipid peroxidation: part II -pathological implication. *Chem. Phys. Lipids* 235: 529-531

Fabacher DL, Kulkarni AP and Hodgson E. (1980) Pesticides as inducers of hepatic drug-metabolizing enzymes-- I . Mixed function oxidase activity. *Gen. Pharmacol.* 11: 429-435

Fraga CG, Leibovitz BE and Tappel AL. (1988) Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid reactive substances in tissue slices: characterization and comparison with homogenates and microsoms. *Free Rad. Biol. Med.* 4: 155-161.

Frei B, England L and Ames BN. (1989) Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 6377-6381

Fridovich I. (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 97-112

Frings CS and Dunn RT. (1969) A colorimetric method for determination of total serum lipid based on the sulfo-phospho-vanillin reaction. *Am. J. Clin. Path.* 53: 89-91

Gilbert W. (1981) DNA sequencing and gene structure. *Science* 214: 1305-1312

Gorsky LD, Koop DR and Coon MJ. (1984) On the stoichiometry of the oxidase and monooxygenase reactions catalyzed by liver microsomal cytochrome P-450. Products of

oxygen reduction. *J. Biol. Chem.* 259: 6812-6817

Gonzalez FJ and Gelboin HV. (1994) Role of human cytochromes P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxin. *Drug Metabolism Rev.* 26: 165-183

Gower JD. (1988) A role for dietary lipids and antioxidants in the activation of carcinogens. *Free Rad. Biol. Med.* 5: 95-111

Gray JR and Yardley BWD. (1979) Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* 278: 737-738

Guengerich FP and Liebler DC. (1985) Enzymatic activation of chemicals to toxic metabolites. *Crit. Rev. Toxicol.* 14: 259-307

Guengerich FP, Brian WR, Sari MA and Ross JT. (1991) Expression of mammalian cytochrome P450 enzymes using yeast-based vectors. *Methods enzymol.* 206: 130-145

Habig WH, Pabst MJ and Jakoby WB. (1974) Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249:7130-7139

Halliwell B. (1989) Superoxide, iron, vascular endothelium and reperfusion injury. *Free Radic. Res. Commun.* 5: 315-318

Halliwell B. (1989) Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br. J. Exp. Pathol.* 70: 737-757

Halliwell B. and Gutteridge JMC. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186: 1-85

Halliwell B and Chirico S. (1993) Lipid peroxidation: its mechanism, measurements and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 57(suppl) : 715s-725s

Ham AJL and Liebner DC. (1997) Antioxidant reactions of vitamin E in the perfused rat liver: product distribution and effect of dietary vitamin E supplementation. *Arch. Biochem. Biophys.* 339: 157-164

Hendrich S and Pitot HC. (1987) Enzymes of glutathione metabolism as biochemical markers during hepatocarcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 6: 155-178

Hochstein P, Nordenbrand K and Ernster L. (1964) Evidence for involvement of iron in the ADP-activated peroxidation of lipids in microsomes and mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 14: 323-328

Hogberg J, Bergstrand A and Jakobsson S. (1973) Lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Eur. J. Biochem.* 37: 51-59

Horn LR, Machlin LJ, Barker MO and Brin M. (1976) Drug metabolism and hepatic heme proteins in the vitamin E deficient rat. *Arch. Biochem. Biophys.* 172: 270-277

Horvath PM and Ip C. (1983) Synergistic effect of vitamin E and selenium in the chemoprevention of mammary carcinogenesis in rats. *Cancer Res.* 43: 5335-5341

Howard LJ. (1990) The neurologic syndrome of vitamin E deficiency : laboratory and electrophysiologic assessment. *Nutr. Res.* 48: 169-177

Hruba F, Novakova V and Ginter E. (1982) The effect of chronic marginal vitamin C deficiency on the alpha-tocopherol content of the organs and plasma of guinea-pigs. *Experientia*. 38: 1454-1455

Huang CJ, Cheung NS and Lu VR. (1988) Effects of deteriorated frying oil and dietary protein levels on liver microsomal enzymes in rats. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65: 1796-1803

Iwasaki M, Iwama MM, N IY and Kanke Y. (1994) Effects of vitamin E deficiency on hepatic microsomal cytochrome P450 and phase II enzymes in male female rats. *Intl. J. Vit. Nutr. Res.* 64: 109-112

Jacob RA. (1995) The integrated antioxidant system. *Nutr. Res.* 15: 755-766

Jacobson BS. (1983) Interaction of the plasma membrane with the cytoskeleton: an overview. *Tissue & Cell.* 15: 852-859

Kagan VE, Novikov KN, Savov VM, Serbinova EA and Kozlov IuP. (1984) Mechanisms of mixed-function oxidase system breakdown in the hepatic endoplasmic reticulum. The role of membrane phospholipid peroxidation. *Nauchnye Doki. Vyss. Shkoly. Biol. Nauki.* 3: 21-32

Kagan VE and Quinn PJ. (1988) The interaction of alpha-tocopherol and homologues with shorter hydrocarbon chains with phospholipid bilayer dispersions. A fluorescence probe study. *Eur. J. Biochem.* 171: 661-667

Kagan VE, Serbinova EA, Safadi A, Catudioc JD and Packer L.

(1992) NADPH-dependent inhibition of lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186: 74-80

Kanner J, German JB and Kinsella JE. (1987) Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 25: 317-364

Kanner J, Harel S and Joffe R. (1991) Lipid peroxidation of muscle food as affected by NaCl. *J. Agric. Food Chem.* 39: 1017-1021

Kawase T, Kato S and Lieber CS. (1989) Lipid peroxidation and antioxidant defense systems in rat liver after chronic ethanol feeding. *Hepatology* 10: 815-821

Kitada M, Komori M, Ohi H, Imaoka S, Funae Y and Kamataki T. (1989) Form-specific degradation of cytochrome P-450 by lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 63: 175-178

Klebanoff SJ. (1980) Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann. Intern. Med.* 93: 480-489

Klimek J, Schaap AP and Kimura T. (1983) The relationship between NADPH-dependent lipid peroxidation and degradation of cytochrome P-450 in adrenal cortex mitochondria. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 110: 559-566

Kosower NS and Kosower EM. (1978) The glutathione status of cell. *Intl. Cytol.* 54: 109-160

Kurata M and Suzuki M. (1994) Glutathione regeneration in calcium-loaded erythrocytes: a possible relationship among

calcium accumulation, ATP decrement and oxidative damage.
Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 109: 305-312

Kyaw A. (1978) A simple colorimetric method for ascorbic acid determination in blood plasma. Clin. Chim. Acta 86: 153-157

Kyee EB and Christie AK. (1998) Oxidized heme proteins in an animal model of hemochromatosis. Free Rad. Biol. Med. 24: 239-244

Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685

Lalonde C, Nayak U, Hennigan J and Demling RH. (1997) Excessive liver oxidant stress causes mortality in response to burn injury combined with endotoxin and is prevented with antioxidants. J. Burn. Care Rehabil. 18: 187-192

Lawrence RA and Burk RF. (1976) Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 71: 952-958.

Leedle, RA and Aust SD. (1990) The effect of glutathione on the vitamin E requirement for inhibition of liver microsomal lipid peroxidation. Lipids 25: 241-245

Lepage G and Roy CC. (1986) Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. J. Lipid Res. 27: 114-120.

Levin W, Anthony YH, Martin J and Ronald Kuntzman. (1973) Lipid peroxidation and the degradation of cytochrome P450 heme. Arch. Biochem. Biophys. 158: 842-852

- Lii CK, Ko JJ and Chen HW. (1997) No inhibition of γ - glutamyl transpeptidase-positive foci by vitamin E with or without phenobarbital. *Nutr. Cancer* 27: 200-205
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lubet RA, Mayer RT, Cameron JW, Nims RW, Burke MD, Wolff T and Guengerich FP. (1985) Dealkylation of pentoxyresorufin: a rapid and sensitive assay for measuring induction of cytochrome(s) P-450 by phenobarbital and other xenobiotics in the rat. *Arch. Biochem. Biophys.* 238: 43-48.
- Machlin LJ. (1984) Vitamin E in handbook of vitamins nutritional biochemical and clinical aspects.(ed.) Marcel Dekker, New York, USA. p.99-145
- Maiorino M, Coassin M, Roveri A and Ursini F. (1989) Microsomal lipid peroxidation: effect of vitamin E and its functional interaction with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Lipids* 24: 721-726.
- Manson MM, Ball HWL, Barrett MC, Clark HL, Judah DJ, Williamson G and Neal GE. (1997) Mechanism of action of dietary chemoprotective agents in rat liver : induction of phase I and II drug metabolizing enzymes and aflatoxin B₁ metabolism. *Carcinogenesis* 18: 1729-1738
- McCay PB, Poyer JL, Pfeifer PM, May HE and Gilliam JM. (1971) A function for alpha-tocopherol: stabilization of the micromal membrane from radical attack during TPNH-dependent oxidations. *Lipids* 6: 297-306

- McCay PB. (1985) Vitamin E: interactions with free radicals and ascorbate. *Ann. Rev. Nutr.* 5: 323-340
- Ming T and Steven DA. (1982) Rabbit liver microsomal lipid peroxidation: the effect of lipid on the rate of peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta* 712: 1-9
- Mino M, Tamai H, Tanabe T, Morinobu T, Ohsawa N, Takamatsu J, Miyata S and Hirahara F. (1993) Nutritional status of antioxidant vitamins (A, E, and beta-carotene) in elderly Japanese. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 39 suppl: S67-S74
- Murray M. (1991) In vitro and in vivo studies of the effect of vitamin E on microsomal cytochrome P450 in rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 42: 2107-2114
- Murry ME, Scholich H, Wefers H and Sies H. (1989) Alpha-Tocopherol in microsomal lipid peroxidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 570: 480-486
- Murty HS, Caasi PI, Brooks SK and Nair PP. (1985) Biosynthesis of heme in the vitamin E-deficient rat. *J. Biol. Chem.* 245: 5498-5504
- Nash T. (1953) The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem. J.* 55: 416-421.
- Neal GE, Nielsch U, Judah DJ and Hulbert PB. (1987) Conjugation of model substrates or microsomally-activated aflatoxin B1 with reduced glutathione, catalysed by cytosolic glutathione-S-transferases in livers of rats, mice and guinea pigs. *Biochem. Pharmacol.* 36: 4269-4276
- Nebert DW, Peterse DD and Puga A. (1991) Human Ah locus

polymorphism and cancer : inducibility of CYP1A1 and other genes by combustion products and dioxin. *Pharmacogenetics* 1: 68-78

Nelson DR, Kamataki T, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O, Okuda K, Nebert DW and Waxman DJ. (1993) The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes and nomenclature. *DNA Cell Biol.* 12: 1-51

Niki E. (1991) Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radical. *Am. J. Clin. Nutr.* 54: 1119s-1124s

Niki E, Tsuchiya J, Tanimura R and Kamiya Y. (1982) Regeneration of vitamin E from α -chromoxy radical by glutathione and vitamin C. *Chem. Lett.* 789-792

Niki E, Saito T, Kawakami A and Kamiya Y. (1984) Inhibition of oxidation of methyl linoleate in solution by vitamin E and vitamin C. *J. Biol. Chem.* 259: 4177-4182

Ohmori S, Misaizu T, Nakamura T and Takano N. (1993) Differential role in lipid peroxidation between rat P450 1A1 and P450 1A2. *Biochem. Pharmacol.* 46: 55-60

Ohmori S, Takeda S, Rikihisa T, Kiuchi M, Kanakubo Y and Kitada M. (1993) Studies on cytochrome P450 responsible for oxidative metabolism of imipramine in human liver microsomes. *Biol. Pharm. Bull.* 16: 571-575

Okey AB, Roberts EA, Harper PA and Denison MS. (1986) Induction of drug-metabolizing enzymes: mechanisms and consequences. *Clin. Biochem.* 19: 132-141

- Omura T and Sato R. (1962) A new cytochrome in liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 237: 1375-1376
- Omura T and Sato R. (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II: solubilization, purification and properties. *J. Biol. Chem.* 239: 2379-2385.
- Oshiro I, Tsutsui M, Fujii M, Ueyama M, Takenaka T and Maeda J. (1981) New manual and automatic method hemoglobin determination by using SLS. *Rinsho. Byori.* 29: 203-209
- Parrish DB. (1980) Determination of vitamin E in foods--a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 13: 161-187
- Phillips AH and Langdon RG. (1962) Hepatic triphosphopyridine nucleotide-cytochrome C reductase : isolation, characterization, and kinetic studies. *J. Biol. Chem.* 237: 2652-2660
- Poyer JL and MaCay PB. (1971) Reduced triphosphopyridine nucleotide oxidase catalyzed alterations of membrane phospholipids. IV. Dependence on Fe³⁺. *J. Biol. Chem.* 246: 263-269
- Poyer JL, McCay PB, Lai EK, Ganzen EG and Davis ER. (1980) Confirmation of assignment of the trichloromethyl radical spin adduct detected by spin trapping during ¹³C-carbon tetrachloride metabolism in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94: 1154-1160
- Reed DJ, Babson JR, Beatty PW, Brodie AE, Ellis WW and Potter DW. (1980) High-performance liquid chromatography

analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. *Anal. Biochem.* 106: 55-62.

Reed DJ, Pascoe GA and Olafsdottir K. (1987) Some aspects of cell defense mechanisms of glutathione and vitamin E during cell injury. *Arch. Toxicol. Suppl.* 11: 34-38

Reed DJ. (1990) Glutathione: Toxicological implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30: 603-631

Reddy CC, Scholz RW, Thomas CE and Massaro EJ. (1982) Evidence for a possible protein-dependent regeneration of vitamin E in rat liver microsomes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 393: 193-195

Richards DM, Dean RT and Jessup W. (1988) Membrane proteins are critical targets in free radical mediated cytolysis. *Biochim. Biophys. Acta* 946: 281-288

Rojas C, Cadenas S, Perez-Campo R, Lopez-Torres M and Barja G. (1994) Effect of vitamin C on antioxidants, lipid peroxidation, and GSH system in the normal guinea pig heart. *40*: 411-420

Rojas C, Cadenas S, Monica LT, Rosa PC, and Barja G. (1996) Increase in heart glutathione redox ratio and total antioxidant capacity and decrease in lipid peroxidation after vitamin E dietary supplementation in guinea pigs. *Free Rad. Biol. Med.* 21: 907-915

Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG and Hoekstra WG. (1973) Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179: 588-590

Ryan DE and Levin W. (1990) Purification and characterization of hepatic microsomal cytochrome P450. *Pharmacol. Ther.* 45: 153-239

Scholz RS, Reddy PV, Wynn MK, Graham KS, Liken AD, Gumpricht E and Reddy CC. (1997) Glutathione-dependent factors and inhibition of rat liver microsomal lipid peroxidation. *Free Rad. Biol. Med.* 23: 815-828

Schlessinger J. (1983) Mobilities of cell-membrane proteins ; How are they modulated by the cytoskeleton? *Trends Neurosci.* 6: 360-363

Schuessler H and Schilling K. (1984) Oxygen effect in the radiolysis of protein. Part 2. Bovine serum albumin. *Intl. J. Radiat. Biol.* 45: 267-287

Skrzydowska E and Farbiszewski R. (1997) Glutathione consumption and inactivation of glutathione-related enzymes in liver, erythrocytes and serum of rats after methanol intoxication. *Arch. Toxicol.* 71: 741-745

Soucek P and Gut I. (1992) Cytochromes P-450 in rats: structures, functions properties and relevant human forms. *Xenobiotica* 22: 83-103

Takenaka Y, Miki M, Yasuda H and Mino M. (1991) The effect of α -tocopherol as an antioxidant on the oxidation of membrane protein thiols induced by free radical generated in different site . *Arch. Biochem. Biophys.* 285: 344-350

Tampo Y and Yonaha M. (1990) Vitamin E and glutathione are required for preservation of microsomal glutathione S-

- transferase from oxidative stress in microsomes. *Pharmacol. Toxicol.* 66: 259-265
- Tappel AL. (1972) Vitamin E and free radical peroxidation of lipids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 203: 12-28
- Tappel AL. (1973) Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed. Proc.* 32: 1870-1874
- Tombin H, Staehelin T and Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 4350-4354
- Ursini F, Maiorino M and Gregolin C. (1985) The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 839: 62-70
- Ursini F, Maiorino M, Ochstein P and Ernster L. (1989) Microsomal lipid peroxidation: mechanisms of initiation. The role of iron and iron chelators. *Free Rad. Biol.* 6: 31-36
- Veld V. (1990) Induced cytochrome P-450 in intestine and liver of spot (*Leiostomus xanthurus*) from a polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated environment. *Aquat. Toxicol.* 17: 119-132
- Venekei I. (1987) Kinetics of NADPH-dependent lipid peroxidation and a possible initiation-preventing antioxidant effect of microsomal(+)- α -tocopherol. *Biochim. Biophys. Acta* 917: 347-355
- Vos RM, Snoek MC, van Berkel WJ, Muller F, van Bladeren PJ. (1988) Differential induction of rat hepatic glutathione S-

transferase isoenzymes by hexachlorobenzene and benzyl isothiocyanate. Comparison with induction by phenobarbital and 3-methylcholanthrene. *Biochem. Pharmacol.* 37: 1077-1082

Wade AE, White RA, Walton LC and Bellows JT. (1985) Dietary fat-a requirement for induction of mixed-function oxidase activities in starved-refed rats. *Biochem. Pharmacol.* 34: 3747-3754

Wander RC, Hall JA, Gradin JL, Du SH and Jewell DE. (1997) The ratio of dietary (n-6) to (n-3) fatty acids influences immune system function, eicosanoid metabolism, lipid peroxidation and vitamin E status in aged dogs. *J. Nutr.* 127: 1198-1205

Wang ST, Kuo JH, Chou RG and Lii CK. (1996) Vitamin E protection of cell morphology and protein thiols in rat hepatocytes treated with tert-butyl hydroperoxide. *Toxicol. Lett.* 89: 91-98

Waxman DJ and Norred W P. (1976) Effect of dietary lipids on drug metabolizing enzymes. *Fed. Proc.* 35: 2475-2479

Waxman DJ, Ko A and Walsh C. (1983) Regioselectivity and stereoselectivity of androgen hydroxylations catalyzed by cytochrome P-450 isozymes purified from phenobarbital-induced rat liver. *J. Biol. Chem.* 258: 11937-11947

Waxman DJ. (1986) Rat hepatic cholesterol 7 alpha-hydroxylase: biochemical properties and comparison to constitutive and xenobiotic-inducible cytochrome P-450 enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 247: 335-345

Waxman DJ and Azaroff L. (1992) Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression. *Biochem. J.* 281: 577-592

Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU, Barclay LRC and Locke SJ. (1987) The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim. Biophys. Acta* 924: 408-419

White RE and Coon MJ. (1980) Oxygen activation by cytochrome P-450. *Annu. Rev. Biochem.* 49: 315-356

Winston GW, Regoll F, Fong JH and Blanchard KA. (1998) A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Rad. Biol. Med.* 24: 480-493

Yang CS and Yoo JSH. (1988) Dietary effects on drug metabolism by the mixed-function oxidase system. *Pharmacol. Ther.* 38: 53-72

Yasuda S, Watanabe S, Kobayashi T and Okuyama H. (1997) Docosahexaenoic acid-rich fish oil does not enhance the elevation of serum transaminase and liver triacylglycerol induced by carbon tetrachloride in mice. *Lipids* 32: 1249-1255

附 錄

一般分析用藥

試劑	來源
Acetic acid	Tedia Company Inc.
Acetone	Merck
Acetonitrile	Tedia Company Inc.
Acetylacetone	Sigma chemical Co.
Acetyl chloride	Janssen Chemical.
Alcohol (95%)	臺灣省菸酒公賣局
Ammonium acetate	和光純藥工業株式會社
ATP; adenosine-5'-triphosphate	Merck
Arachidonic acid	Sigma chemical Co.
Barium hydroxide	Sigma chemical Co.
Benzene	Fischer
BF ₃ ; boron trifluoride methanol complex	Merck
BSA; bovine serum albumin	Sigma chemical Co.
Bromophenol blue	Bio-Rad
BHT; butylated hydroxytoluene	Sigma chemical Co.
Butanol	Merck
CDNB; 1-chloro-2,4-dinitrobenzene	Sigma chemical Co.
CHCl ₃	Tedia Company Inc.
CuSO ₄	島久藥品株式會社
Cytochrome C	Merck
2',7'-dichlorofluorescein	Sigma chemical Co.
Diethylether	Merck
DMSO; dimethyl sulfoxide	Sigma chemical Co.
EDTA	Sigma chemical Co.

EGTA	Sigma chemical Co.
Ethanol	昭和化學株式會社
Formic acid	Merck
FDNB; 2,4-dinitrofluoro-benzene	Sigma chemical Co.
Folin-cicalteu reagent; Phenol reagent	Wako
Glycine	Bio-Rad
GSH; reduced glutathione	Sigma chemical Co.
GSH reductase	Sigma chemical Co.
GSSG; oxidized glutathione	Sigma chemical Co.
HCl; hydrochloric acid	Merck
Hexane	Merck
H ₂ O ₂ ; hydrogen peroxide	Merck
IAA; iodoacetic acid	Sigma chemical Co.
KCl	Sigma chemical Co.
K ₂ CO ₃	和光純藥工業株式會社
KHCO ₃	Sigma chemical Co.
K ₂ HPO ₄	Sigma chemical Co.
KH ₂ PO ₄	Sigma chemical Co.
KOH	Merck
MeOH; methanol	Tedia Company Inc.
MgCl ₂ · 6H ₂ O	Merck
NaCl; sodium chloride	Merck
Na ₂ CO ₃	Sigma chemical Co.
β-NADPH; nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	和光純藥工業株式會社
Na ₂ HPO ₄	Sigma chemical Co.
NaH ₂ PO ₄	Sigma chemical Co.
NaN ₃ ; sodium azide	Sigma chemical Co.

NaOH; sodium hydroxide	Wako
Na ₂ S ₂ O ₄ ; sodium hydrosulfite	Sigma chemical Co.
Phenobarbital	Sigma chemical Co.
PCA; perchloric acid	GFS Chemicals Inc.
Phenanthroline	Sigma chemical Co.
Phosphotungstic acid	Sigma chemical Co.
Petroleum ether	Merck
PMSF; phenylmethylsulfonyl fluoride	Sigma chemical Co.
POD; 7-pentoxoresorufin	Sigma chemical Co.
Resorufin	Sigma chemical Co.
Sodium acetate	Sigma chemical Co.
Sodium borate	Sigma chemical Co.
SDS; sodium dodecyl sulfate	Sigma chemical Co.
TBA; thiobarbituric acid	Sigma chemical Co.
TCA; trichloroacetic acid	Merck
TLC aluminum sheets (20×20cm)	Merck
TMP; 1,1,3,3-tetramethoxy propane	Sigma chemical Co.
α-tocopheryl acetate	Sigma chemical Co.
Triton X-100	Sigma chemical Co.
Trizma base; Tris[hydroxymethyl]aminomethane	Sigma chemical Co.
Tween 20 (polyoxyethylene-sorbitan monolaurate)	Sigma chemical Co.