

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫 名 稱	： 探討高劑量N-乙酰半胱胺酸(NAC)誘導小鼠的非酒精性 肝損傷的毒性效應與可能分子機制
------------	--

報 告 類 別 ： 成果報告

執行計畫學生：吳思燁

學生計畫編號：MOST 110-2813-C-040-004-B

研 究 期 間 ： 110年07月01日至111年02月28日止，計8個月

指 導 教 授 ： 王淑紅

處 理 方 式 ： 本計畫可公開查詢

執 行 單 位 ： 中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中 華 民 國 111年03月30日

目錄

大專生計畫研究成果

一、	摘要	2
二、	研究動機與研究問題	2
三、	文獻回顧與探討	4
四、	研究方法及步驟	5
五、	研究結果	8
六、	總結	15
七、	參考文獻	15

探討高劑量 N-乙酰半胱氨酸(NAC)誘導小鼠的非酒精性肝損傷的毒性效

應與可能分子機制

(一) 摘要

N-乙酰半胱氨酸(N-acetyl cysteine, NAC)為一種抗氧化劑，為穀胱甘胺酸(Glutathione, GSH)的前驅物，因在人體內可有效且快速的被轉化成 GSH，所以是目前在臨床上被廣泛地當作 APAP 過量的解毒劑，也有報導指出它可以抑制神經細胞的凋亡、抗發炎、抗菌、抗癌症等效果。雖然 NAC 可以做為 APAP 誘導的急性肝損傷的治療劑，但在 NAC 治療中也有許多副作用，包括類過敏、頭暈、嘔吐等，也具有一定的死亡率。且若以 NAC 治療於本身就富含 GSH 的細胞，其抗氧化功能可能無效用，甚至可能成為促氧化劑。在我們先前的研究結果顯示，以高劑量 NAC800 治療 APAP 急性肝衰竭，反而造成小鼠脂肪肝，嚴重者甚至死亡；而以不同 NAC 劑量 NAC400 與 NAC800 mg/Kg 處理正常小鼠，存活率分別為 90% 與 70%，NAC800 組肝臟外觀有脫水現象，肝臟病理切片(H&E stain)明顯看出肝臟細胞有脂肪累積；血清發炎因子 TNF- α 、IL-6 與 CCL2 也大量增加。肝臟 IL-6 表現增加，但 GSH 表現明顯降低，推測高劑量 NAC 誘導系統性的發炎，及干擾肝臟代謝功能，引起非酒精性脂肪肝。而目前高劑量 NAC 如何造成人類及小鼠的肝臟代謝影響與毒性效應並不清楚，本研究計畫旨在了解高劑量 NAC 誘導小鼠的非酒精性肝損傷所導致的毒性效應及可能的機制與路徑，過去我們的研究結果顯示 NAC275-400 是促進 de novo GSH 合成的最佳劑量，但 NAC800 反而降低肝臟 GSH 量及造成脂肪累積，所以本研究計畫比較 NAC275 與 NAC800 處理不同時間後分析肝臟與血液生化指數，我們初步觀察到，高劑量 NAC800 組的各內臟器官在不同時間皆有腫大及發紅的狀況，且肝臟表面變白、心臟有脂肪堆積等現象，肝臟病理切片也可以看出 NAC800 組隨著時間的延長其脂肪堆積的情形更為明顯；而在生化分析上，NAC800 組血液及肝臟內的 triacylglyceride (TG) 也隨著時間延長而上升，GCLC(Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic Subunit; 合成 GSH 的限速酵素)及 GSH 則降低，總結以上結果，高劑量 NAC 抑制 GSH 合成及導致脂肪肝的現象。故未來本計畫將延伸探討高劑量 NAC 造成的脂肪在肝細胞的累積是否進一步發展出脂肪肝炎，及高劑量 NAC 可能影響的肝臟代謝的相關酵素的表現及分子機制，最後探討高劑量 NAC 造成小鼠死亡的可能原因。

(二) 研究動機與研究問題

研究動機

為了治療 APAP 對肝臟造成的毒性，臨床上通常以 NAC 作為肝臟解毒的治療劑，而 NAC 解毒機轉主要分為兩部分，最主要的機制為 NAC 在體內先轉換成 cysteine，再和 glutamate 及 glycine 於肝臟細胞內合成 GSH 來協助 NAPQI 代謝；另外 NAC 也可作為硫的供應者，直接結合 APAP 使其成為無毒的代謝物質。

但在現今臨床治療中，對於不論高低乙醯胺酚(APAP)過量的患者，所給予的 NAC 治療劑量都是相同的，又臨床上高劑量 APAP 過量的患者，若增加 NAC 劑量，則

須考慮到高劑量 NAC 可能會帶來的副作用，目前並無研究指出高劑量的 NAC 對於動物造成的急毒性，而高劑量的 NAC 所造成的毒理與病理機制也不明確。根據我們過去研究高劑量 NAC 治療 APAP 毒性，研究結果發現：(1). 高劑量 NAC 治療 APAP 中毒小鼠，雖然有效降低肝毒性，卻有誘導發炎反應與脂肪肝，甚至死亡的副作用；(2). NAC 誘導正常小鼠肝臟中 GSH 從頭合成(de novo synthesis)的能力有限，最適合的劑量範圍是 300-400 mg / kg；(3). 高劑量 NAC 除了無法提供更多 GSH 之外，反而使 GSH 量低於正常值；(4). 高劑量 NAC 干擾肝臟代謝功能，誘導正常小鼠或 APAP 中毒小鼠產生脂肪肝(Figure 1.)。

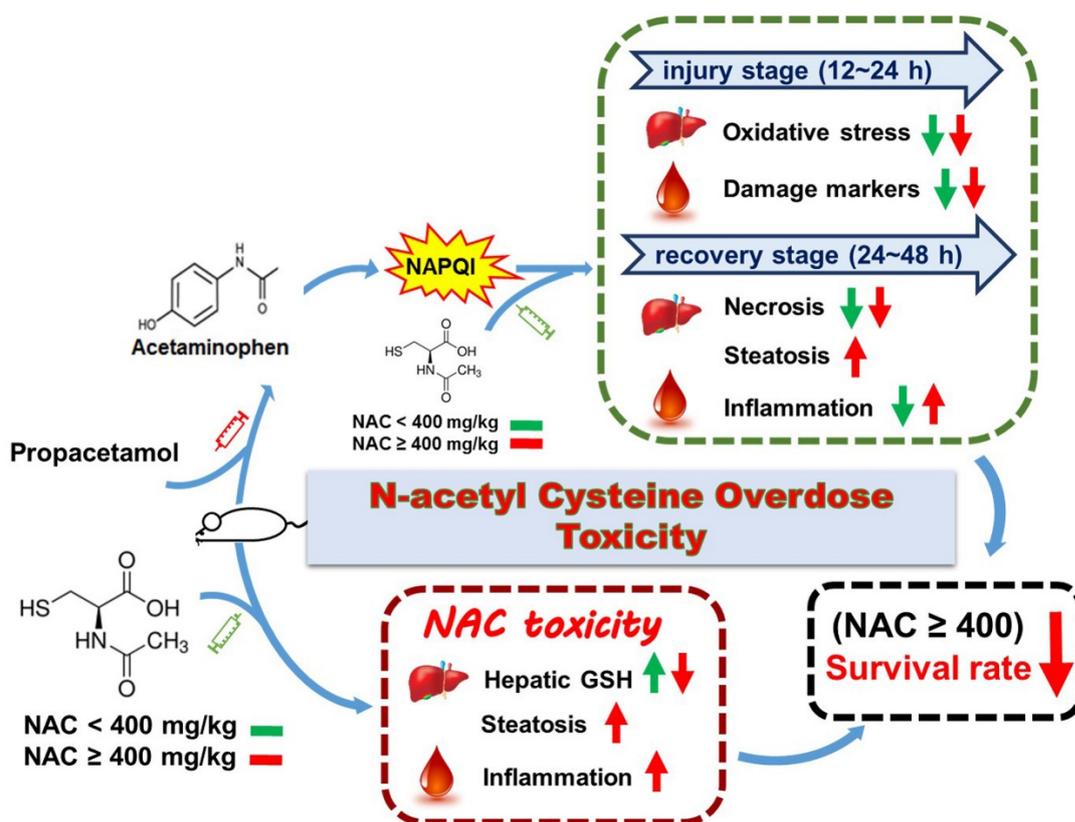


Figure 1. 根據我們過去未發表結果顯示，以高劑量NAC (N800) 治療APAP過量會對小鼠產生毒性。

故在臨床上高劑量 APAP 中毒的患者，若需要提高 NAC 劑量治療，則需評估是否可能加重病情發展，我們的結果不僅可以為確定實驗動物中的 NAC 治療劑量，也可以為臨床 APAP 過量患者和正常人確定 NAC 劑量以提供參考。而目前高劑量 NAC 所導致的毒理與病理作用尚不清楚，其影響肝臟代謝作用的機制也不明確，故本研究延續先前未發表研究，進一步探討高劑量 NAC 對肝臟損傷的可能機制與路徑。

研究問題

1. 探討 NAC800 對於 BALB/c 小鼠的可能致死原因
2. 探討 NAC800 對於 BALB/c 小鼠肝臟代謝的影響
3. 探討 NAC800 誘導 BALB/c 小鼠產生藥物性誘導脂肪性肝炎 (Drug induced steatohepatitis: DISH) 的可能機制

(三) 文獻回顧與探討

目前已有研究證實NAC有許多抗氧化、抗發炎等療效，除了用於APAP誘導肝臟急性損傷的解毒劑，又因其可以化解過多的黏液，也可用來緩解囊腫性纖維化及慢性阻塞性肺病的症狀、肺纖維化等相關疾病，且在根除幽門螺桿菌中起到輔助作用，並在腎臟透析患者中預防由慶大霉素引起的聽力喪失[2]。最近也有進行研究NAC在神經退化疾病的臨床應用上的潛在功效[3]。在NAC治療中其主要身分是作為抗氧化劑，也就是合成GSH的前驅物質，而有關NAC作為抗氧化劑的大量臨床報導中，許多研究結果相互矛盾，在重新審查評估後，對於NAC作為抗氧化劑的優缺點尚未達成共識，尤其是在細胞中本身就富含大量GSH時，NAC的抗氧化功能可能無效，甚至可能成為促氧化劑[4]。

雖然NAC目前被視為許多疾病的有效治療劑，但在臨床上，患者對於NAC的不良反應卻很普遍。在1218例APAP過量患者中共記錄了950例病患接受NAC靜脈注射治療，發生類過敏反應的不良反應就佔了18.6%，而在反復接觸NAC的患者中，先前對NAC有反應的患者與先前沒有反應的患者相比，再次接觸的不良反應發生率更高[5]。其不良反應大多來自劑量的不正確（過量），症狀相似於過敏反應，包括皮疹、瘙癢、血管性水腫、支氣管痙攣等，但是是由非免疫反應所引起，相關的機制目前尚不明確[6]。另外，NAC治療造成的副作用也是降低療效的原因之一，60% NAC治療病人會產生與NAC劑量相關的嘔吐，20% NAC治療病人會因為過敏反應導致治療中斷或拒絕接受治療[7][8]。

先前曾有臨床上的醫療失誤，以過量的NAC治療APAP誘導急性肝損傷的病人，反而造成病人嚴重的腦水腫、癲癇發作和永久性神經系統疾病、意外的溶血和急性腎功能衰竭等等異常，嚴重者甚至死亡，顯示出過量的NAC不僅降低了治療效果，反而造成其他嚴重的副作用。以上研究顯示出NAC所造成的促氧化效果不容小覷，因此不建議用於治療在不清楚是否有氧化壓力的狀況下[9]。

目前臨床上治療APAP誘導肝損傷的NAC劑量，是由實驗動物所推論出來的，而不同小鼠的品系，對應於不同APAP中毒的有效及致死劑量也有所不同，因此也間接導致NAC治療的有效劑量由300到1200 mg / kg不等。根據去年科技部研究計畫未發表成果，比較研究上常見的BALB/c與C57BL/6小鼠，發現BALB/c小鼠明顯對於APAP毒性的敏感度較高。而由先前未發表結果已知：(1)高劑量NAC確實可以有效降低APAP致死性肝損傷，但也引起一些副作用，嚴重者甚至致死，(2)高劑量NAC降低正常小鼠肝臟GSH量，引起脂肪肝等副作用，甚至發展出藥物性誘導脂肪肝，嚴重可能致死。

藥物性誘導脂肪性肝炎 (Drug induced steatohepatitis: DISH) 是藥物誘導肝損傷 (drug induced liver injury: DILI) 的一種形式，也是非酒精性脂肪肝炎 (Nonalcoholic steatohepatitis: NASH) 的一種。藥物誘發的脂肪變性 (DIS) 或脂肪性肝炎 (DISH) 是DILI的罕見形式，在所有NASH病例中，只有不到2%歸因於藥物[10]。其主要特徵是脂質在肝細胞內堆積，導致脂肪變性，進而引起炎症反應。

藥物的代謝大部分是由肝細胞中的內質網完成的，這是因為內質網中含有輔酶，特別是還原型輔酶 II。此外，藥物在肝臟的代謝中還受到性別、年齡、種族、個體差異、給藥途徑、有無服用誘導劑及抑制劑、肝細胞有無疾病、膽汁排泄、腸肝循環、腸道菌叢以及藥物損傷肝臟與某種藥物在體內或肝臟停留狀態等因素的影響，而造成許多藥物對肝臟都具有直接或間接的毒害作用。藥物引起的脂肪性炎症，病患可能出現肝衰竭、腦病和嚴重的低血糖症，由肝臟病理切片顯示，肝臟細胞累積大量油脂，可用oil red染色，還可以在不同程度上觀察到肝細胞溶解

和ALT/AST數值升高[11]藥物誘導引發DISH的脂肪變性或脂肪堆積所造成的炎症反應，主要由四種廣泛的基本機制引起：1) 增加脂肪酸合成；2) 降低脂肪酸 β -氧化；3) 脂蛋白運出減少；4) 增加脂肪酸的移動和攝取。而由單純脂肪堆積誘發為脂肪性肝炎的主要原因與氧化壓力有關，其機制為線粒體功能障礙導致並加劇了藥物引起的 β 氧化和磷酸化，從而導致ROS的產生。ROS的能量供應減少和直接損害，進而導致脂質過氧化和氧化壓力增加，嚴重時肝細胞可能壞死。隨後並誘導了發炎相關細胞因子（如TGF- β ，TNF- α 和IL-8）的產生。另一種可能導致肝細胞FFA積累增加的機制是FFA和非常低密度脂蛋白（VLDL）的結合降低或是VLDL的分泌減弱（Figure 2.）。

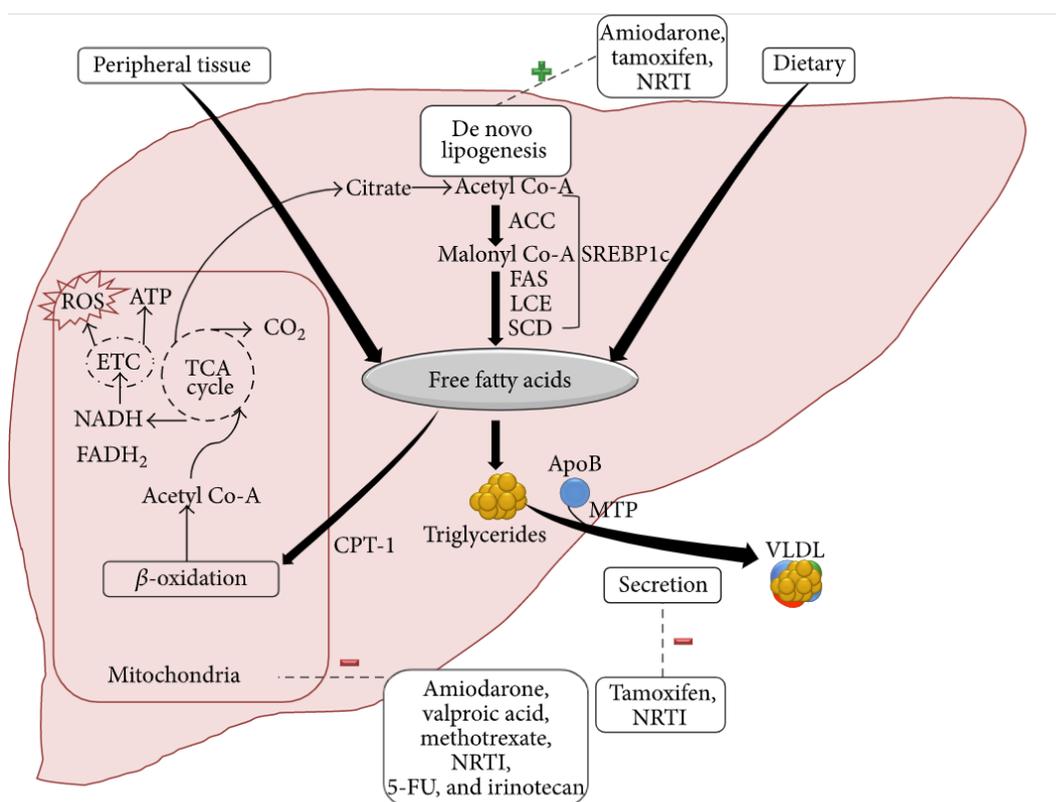


Figure 2. 藥物性誘導肝脂肪變性/脂肪性肝炎的機制[10]

(四) 研究方法及步驟

➤ 實驗分組與流程

將BALB/c小鼠分成2組，腹腔分別注射NAC 275或NAC 800 mg/Kg，在24、48和96小時後秤重後犧牲小鼠。過去我們的研究結果顯示NAC275-400mg/kg是促進de novo GSH合成的最佳劑量、NAC800mg/kg反而降低肝臟GSH量及造成脂肪累積，所以本研究計畫著重比較NAC275與NAC800處理不同時間後做後續的分析。

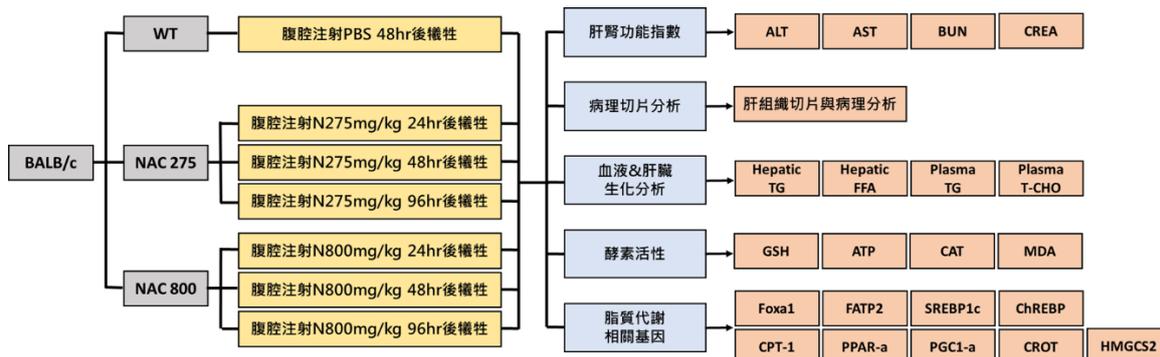


Figure 3. 實驗流程及後續規劃流程表。WT 組(正常對照組)、N275 48hr(腹腔注射 NAC 275mg/kg, 48 小時後犧牲)、N275 72hr(腹腔注射 NAC 275mg/kg, 72 小時後犧牲)、N275 96hr(腹腔注射 NAC 275mg/kg, 96 小時後犧牲)、N800 48hr(腹腔注射 NAC 800mg/kg, 48 小時後犧牲)、N800 72hr(腹腔注射 NAC 800mg/kg, 72 小時後犧牲)、N800 96hr(腹腔注射 NAC 800mg/kg, 96 小時後犧牲)。

➤ 病理切片分析

犧牲後的小鼠，經心臟採血後，沿腹腔打開。肝臟取出後將其大葉與其他葉分離，在大葉的肝動脈處水平切下約一公分後的肝臟，將其放入包埋夾並固定在 10% 中性緩衝的福馬林中隔夜，脫水後以石蠟進行包埋，製備五微米厚的切片並用蘇木紫和依紅染色(H&E staining)。將染色後的玻片，以 TissueFaxs 掃描組織切片。

➤ ALT/AST 肝發炎指數分析

將血液於室溫靜置 30 分鐘後，先在 4°C, 3000 rpm 離心 10 分鐘後，取出血清，再以 4°C, 3000 rpm 離心 10 分鐘，再次取出血清。後續依循 RANDOX ALT/AST Kit 進行。

➤ 肝組織的游離脂肪酸測定

取 20mg 的組織，再加入 400 μ l 含 1% TRITON X-1000 的氯仿，磨勻後再以超音波震盪研磨確保組織完全均質(Amp 20%; on 10sec; off 30sec)，接著離心(10000rpm, 4°C, 10min)，接著將水層去除後留下有機層，之後放入 50°C 烘箱 40 分鐘後將乾燥後的部分以 400 μ l Assay Buffer 回溶，vortex 5 分鐘後靜置，待氣泡消去後，完成樣品的製備。後續依 BioVision 的 Free Fatty Acid Quantification Kit(C/F) 進行。

➤ GSH 抗氧化分析

利用 Elabscience Biotechnology Inc GSH kit 進行檢測。取組織重量約 20 mg 乾磨後加入 200 μ l 的 1xPBS 研磨均勻，再以超音波震盪研磨確保組織完全均質(Amp 20%; on 10sec; off 30sec)。完成後離心 2500rpm, 10mins, 4°C。離完取上清液依 Elabscience Biotechnology Inc GSH kit 的步驟做後續分析。

➤ CAT 抗氧化分析

利用 Elabscience Biotechnology Inc GSH kit 進行檢測。取組織重量約 20 mg 乾磨後加入 200 μ l 的 1xPBS 研磨均勻，再以超音波震盪研磨確保組織完全均質(Amp 20%; on 10sec; off 30sec)。完成後離心 12000rpm, 10mins, 4°C。離完取上清液依 Elabscience Biotechnology Inc GSH kit 的步驟做後續分析。

➤ MDA 抗氧化分析

利用 Elabscience Biotechnology Inc MDA kit 進行檢測。取組織重量和萃取液 1.15% KCl 以比例 1:15 進行混合，並加入 BHT (每 100 μ l 加入 1 μ l BHT)，研磨均勻後，以超音波震盪再次研磨確保組織完全均質(Amp 30%; on 5sec; off 20sec)。之後離心 10000g, 10mins, 4°C。取上清液分裝成兩管各 100 μ l，之後步驟依循 Elabscience Biotechnology Inc MDA kit 進行。

➤ ATP 測定

肝臟組織萃取後稀釋 3 倍測定蛋白濃度，配好所需 ATP Reaction Mix 的量（每一 well 裡需有 44 ul 的 ATP Assay Buffer、2 ul 的 ATP Probe、2 ul 的 ATP convertor、2 ul 的 Developer Mix 共 50 ul）。配好後使用 96 孔盤，在 6 個不同濃度的 Standard Well 中加入稀釋好的 Standard 共 50 ul 和 50 ul ATP Reaction Mix（每一 Well 共 100 ul）；在 Sample Well 中加入稀釋好的 Sample 共 50 ul 和 50 ul 的 ATP Reaction Mix（每一 Well 共 100 ul），混勻後，靜置室溫 30 min，避光。30 min 後以機器測定 Sample 吸光值 OD 570，再套入公式計算。

➤ 組織萃取 RNA

一開始先將組織回溶，再利用均質機（強度 1）將組織震碎後放在冰上約 5 min。加入 200 ul chloroform（易揮發，故要用塞棉花的 tip）vortex 15 秒後放置冰上 3 min。時間到後離心 12000 rpm, 15 min, 4°C。再取上清液約 600 ul 移至新的 eppendorf，加入 300 ul phenol 和 300 ul chloroform 混勻後靜置冰上 3 min。離心 12000 rpm, 15 min, 4°C。離心完取上清液約 600 ul 移至新的 eppendorf，加入 600 ul isopropanol 之後靜置室溫 10 min，最後再離心 12000 rpm, 10 min, 4°C。去除上清液，加入 1 ml 75%酒精，離心 7500 rpm, 5 min, 4°C，去除上清液再加入 1 ml 75%酒精，最後風乾約 10 min，用 65°C 的 DEPC d2H2O 回溶。

➤ DNase 處理

RNA 風乾後，加入 44 ul 的 DEPC d2H2O（需加熱至 65°C）回溶（pipette 上下吸放），依序加入 5 ul 的 DNase buffer、1 ul 的 DNase I、1 ul 的 RNase out（total=51 λ ），以 pipette 混勻後 spin down，放入烘箱約 1.5-2 hr。時間到後，加入 DEPC d2H2O 將液體補至 100 ul，再分別加入 50 ul 的 chloroform 和 50 ul 的 phenol vortex 15 秒混勻，在冰上靜置 3 min 後，離心 12000 rpm, 15min, 4°C。離完心後會有分層，取分層的上層至新的 1.5 ml 的 eppendorf 中（約 100 λ ），要小心避免取到有機層。再分別加入 10 ul 的 3 M NaOAC 和 250 λ 的 95%酒精上下混合均勻後，放入 -20°C 冰箱 over-night 使其沉澱。

➤ Reverse Transcriptase(RT)

先自 -20 or -80°C 冰箱取出 RNA sample 後，離心 4°C, 12000 rpm, 15 min，去除上清液。再加入 75%酒精 1 ml，離心 4°C, 12000 rpm, 5 min，去除上清液（此步驟重複兩次）後，開蓋風乾 10 min，最後加入 d2H2O（加熱 65°C）回溶 RNA。

一開始先測 RNA 的 OD 值（1 ul / 濃度 = X ul，若 X<1 則要稀釋 10X 再取 10X 的 RNA），之後拿 0.2 ml 的 eppendorf 依序加入 10 ul 的 2x RT Reaction Mix、2 ul 的 RT Enzyme Mix、X ul 的 RNA sample 和 8-x ul 的 DEPC d2H2O 放入 PCR 機器（25°C, 10 min/50°C, 30 min/85°C, 5 min/4°C, ∞ ）。時間到後再加入 1 ul 的 RNase H 最後放入 PCR 機器（37°C, 20min/4°C, ∞ ）。

➤ Real-time PCR

一開始先稀釋目標 primer（100 nM，故 di 100x）和 RT 完的 cDNA（依不同 primer 決定稀釋倍數），之後分別加入稀釋後的 7.5 ul 的 primer、5 ul 的 cDNA 和 12.5 ul 的 SYBR 在八連排中，再送至機器測定。

(五) 研究結果

1. 探討 NAC800 對於 BALB/c 小鼠的可能致死原因

➤ 組織外觀

由 Figure 4 可以看到 NAC800 的各組肝臟明顯變白，損傷嚴重；而心臟 NAC800 48h、96h 皆有脂肪堆積的情況；肺臟則是除 WT 外各組皆有發紅或腫大的現象；脾臟在 N800 96h 有些微縮小；腎臟 NAC800 96h 有顏色偏紅的跡象；睪丸則沒有太大變化。

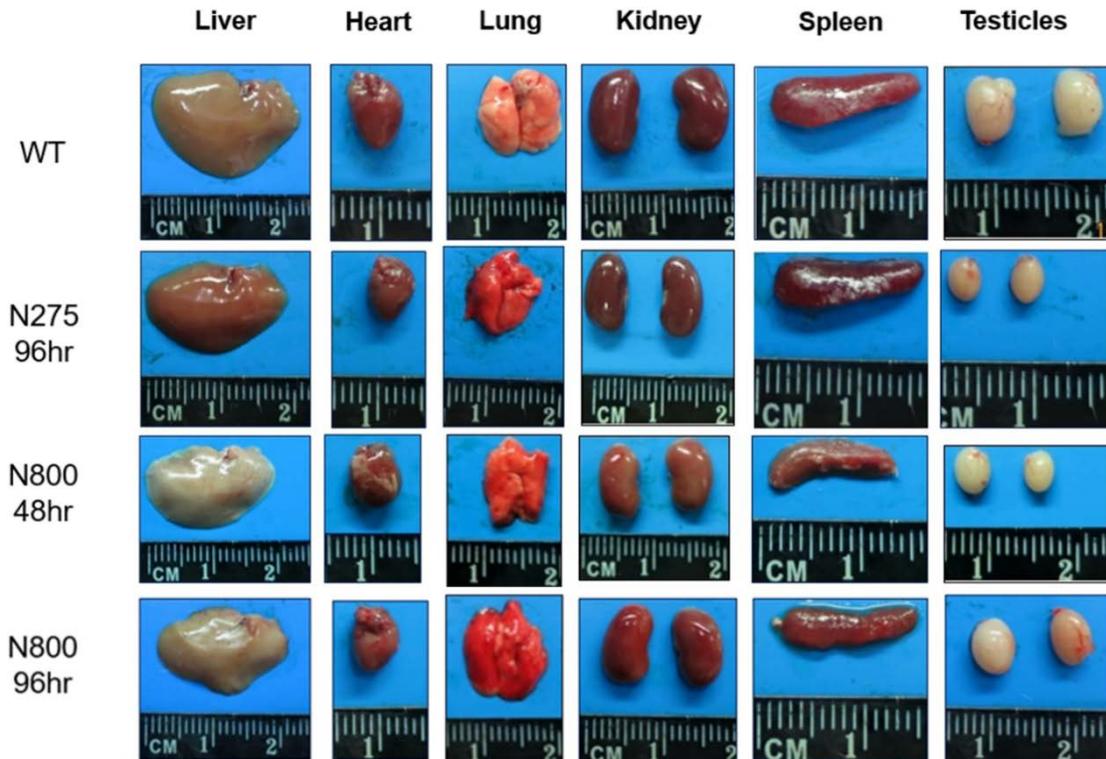


Figure 4. 各組組織外觀圖。WT 組(正常對照組)、N275 96hr(腹腔注射 NAC 275mg/kg, 96 小時後犧牲)、N800 48hr(腹腔注射 NAC 800mg/kg, 48 小時後犧牲)、N800 96hr(腹腔注射 NAC 800mg/kg, 96 小時後犧牲)。

➤ 存活率

由 Figure 5 可見，WT 組和 N275 組在不同的時間下都有 100% 的存活率，但在 N800 組隨著時間的延長，存活率也跟著降低，甚至最後只剩下 60% 的存活率。顯示高劑量 NAC 對於小鼠的存活率有一定程度的影響。

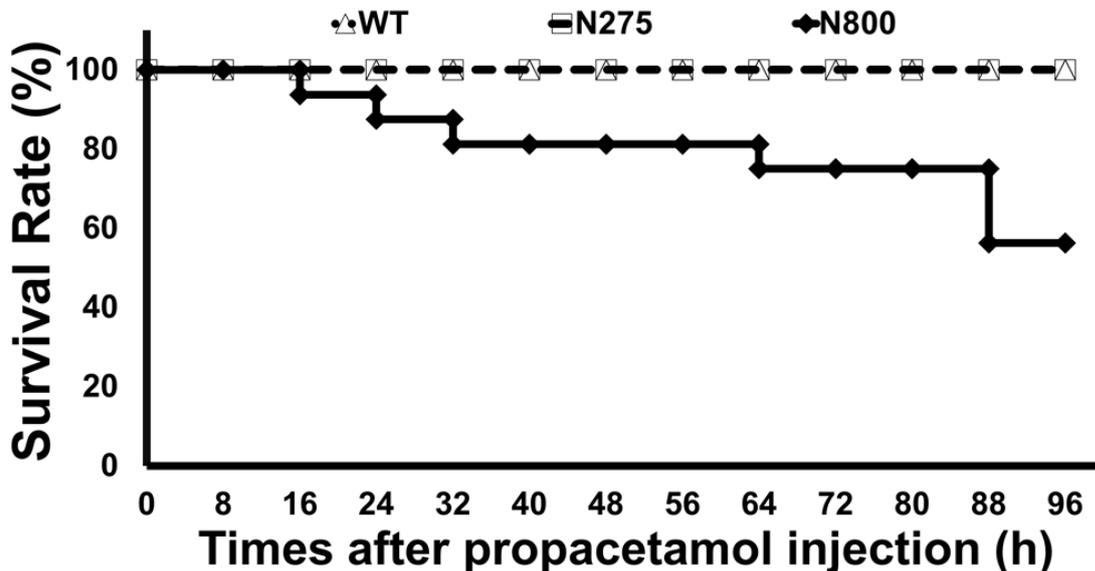


Figure 5. 各組別在不同時間下的存活率。

➤ 病理切片分析

由 Figure 6 可見，不同組別的心、肺、睪丸在病理切片統計下都沒有明顯的損傷。但在腎臟的部分，N800 組別的平均分數達到 2.6 分，顯示具有明顯腎小管變性、壞死等損傷；肝臟部分在 N800 組別的平均分數達到 3.1，顯示肝臟有明顯脂肪堆積和脂肪變性等影響；而脾臟則是在 N800 組別的平均分數達到 2.8，顯示具有紅髓萎縮、細胞數目減少等損傷。

Organ	Histopathology	Group			
		Control	NAC		
			275	400	800
Heart	Mineralization, epicardia, multifocal, minimal to moderate ¹	0/1 ²	1/1	N	3/3
Kidney	Degeneration/necrosis, tubule, multifocal, minimal to severe/high	0/5	2/8	5/9	13/14
	Mean score	0.0±0.0 ³	0.3±0.4	1.1±1.0	2.6±1.3*
Liver	Accumulation, glycogen, central area, multifocal, slight to severe/high	2/3	5/7	1/2	1/3
	Fatty change, micro-vesicular, portal area, multifocal	0/4	2/7	1/2	9/10
	Mean score	0.0	0.6±0.9	1.0±1.0	3.1±1.5*
Lung		0/1	0/1	N	0/3
Spleen	Atrophy, diffuse, slight to severe/high	0/4	1/7	1/2	8/10
	Decrease, cellularity, red pulp, diffuse, slight to severe/high	0/4	1/7	1/2	8/10
	Mean score	0.0	0.3±0.7	1.5±1.5	2.8±1.5*
Testes	Atrophy, seminiferous tubule, multifocal, slight	0/1	1/1	N	1/3

Figure 6. 各組別心、肝、脾、肺、腎、睪丸的病理切片分析圖 (1 = minimal (< 1%); 2 = slight (1-25%); 3 = moderate (26-50%); 4 = moderate/severe (51-75%); 5 = severe/high (76-100%))。

➤ 切片染色圖

由 Figure 7 圖 A 可見，N275 組的肝臟切片染色圖在不同時間下皆與 WT 組的差異不大，而 N800 組別在 24hr 開始有些微脂肪產生，隨著時間增加，在 48hr、72hr、96hr 對於脂肪肝的影響加劇，與 Figure 4. N800 肝臟外觀變白的現象相呼應；圖 B 則是各組別在不同時間下的腎臟切片染色圖，由圖可見，WT 組和 N275 48hr 組並沒有明顯的差異，但 N800 24hr 開始，可以看到箭頭所指的地方腎臟出現明顯的空泡化和腎小管變性，N800 48hr 組在箭頭所指的地方出現細胞碎片，而 N800 96hr 也出現了空泡化和腎小管變性的現象；圖 C 是各組別在不同時間下的脾臟切片染色圖，WT 組和 N275 48hr 組一樣沒有明顯的差異，而從 N800 24hr 開始，由低倍率切片圖可見，隨時間增加，脾臟紅髓有明顯萎縮的現象，與 Figure 4 的脾臟外觀圖

有相呼應，而由高倍率圖可見，隨時間的增加 N800 組別脾臟組織細胞減少的現象愈加明顯。顯示高劑量 NAC 的誘導對於肝臟、腎臟及脾臟皆有一定程度的損傷，而由切片染色圖來看，我們初步判斷高劑量 NAC 導致小鼠死亡的可能原因為腎衰竭，後續將會做更多分析確認。

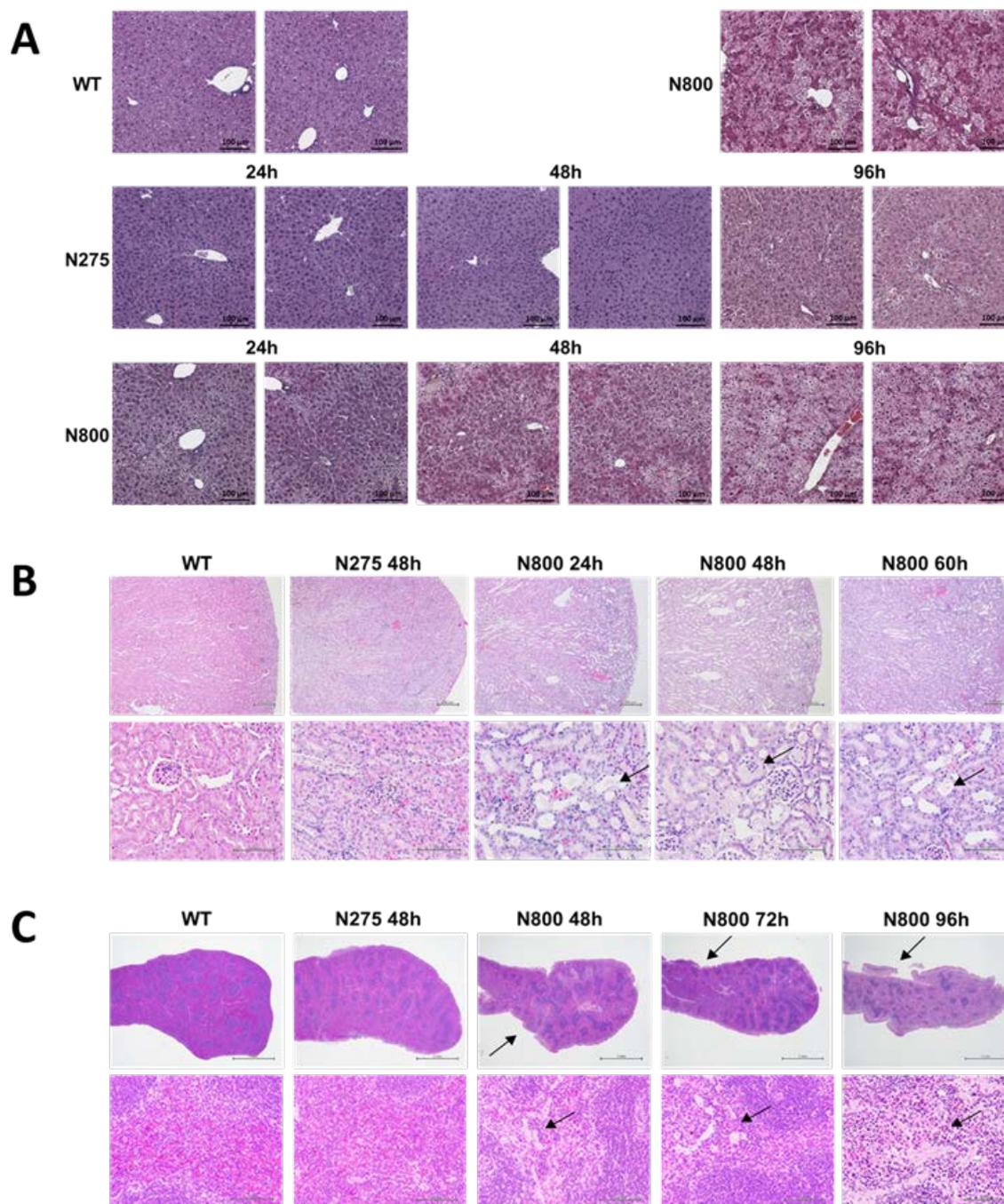


Figure 7. 各組別在不同時間下肝臟、腎臟和脾臟的切片染色圖。

➤ 肝腎功能指數分析

血液中 ALT 和 AST 的高低代表肝臟組織的損傷程度，數值愈高表示肝臟損傷程度愈高。由 Figure 8 可見，WT 組和 N275 組別的數值無明顯差異，但在 N800 組別則是明顯高於 WT 組，且 N800 48hr 與 WT 組具有顯著差異；而血液中的 BUN 和 CREA 的高低則是代表腎臟組織的損傷程度，數值愈高表示腎臟損傷程度愈高。由圖可見，WT 組和 N275 組的數值也是沒有明顯的差異，在 N800 組別則是明顯高於其他兩個組別，而 N800 48hr 組與 WT 組也同樣具有顯著差異。藉由血液中 ALT、AST、BUN 和 CREA 的測定，顯示出高劑量 NAC 的誘導對於肝臟和腎臟組織皆具有一定程度的損傷。

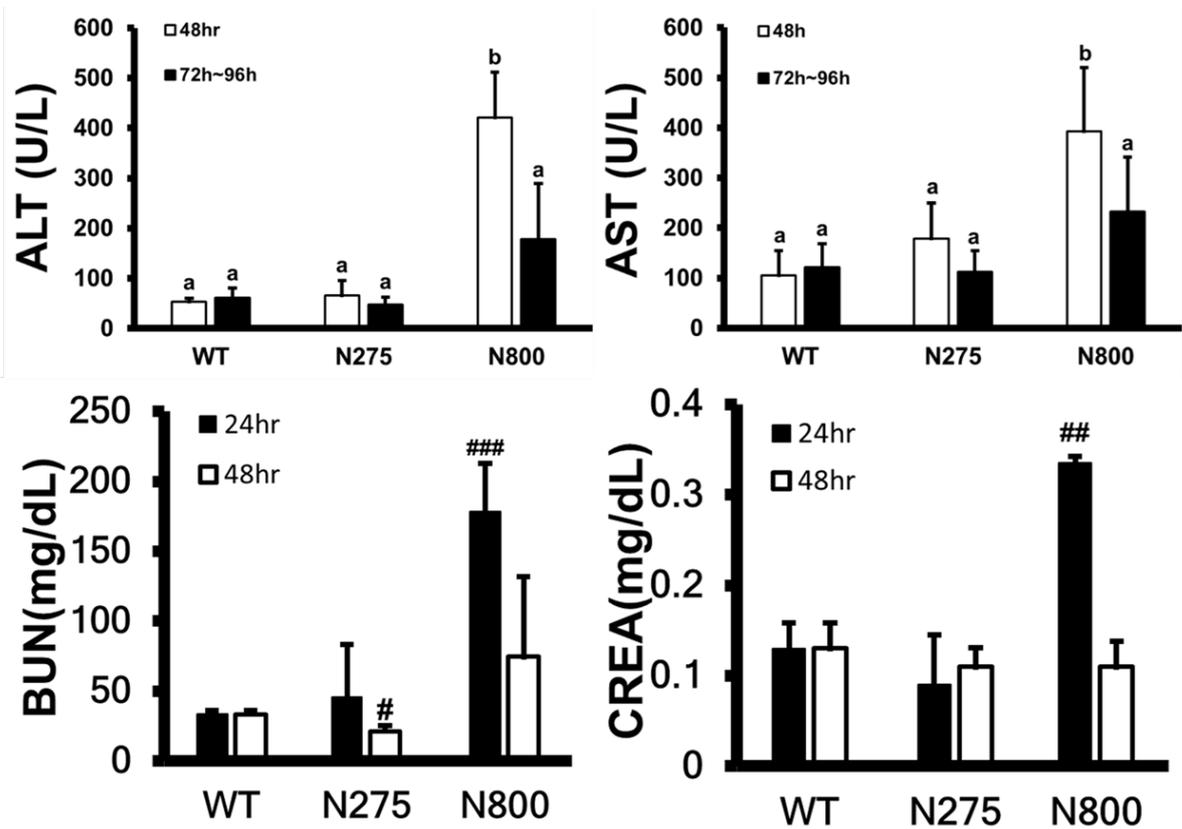


Figure 8. 血清分離後，各組別的肝腎功能指數分析。

2. 探討 NAC800 對於 BALB/c 小鼠肝臟代謝的影響

➤ 血液&肝臟生化分析

由 Figure 9 可見，WT 組和 N275 組的肝臟內 TG 含量沒有明顯差異，但在 N800 不論何種時間下皆明顯高於其他兩個組別，且具有顯著差異；而肝臟內 FFA 的含量，在 N275 48hr 時與 WT 組具有顯著差異，但在 72~96hr 後有降低的趨勢，而 N800 48hr 與 WT 組具有 3 個顯著差異，在 N800 72~96hr 則也有一個顯著差異；而在血漿中 TG 的含量在 N275 48hr 低於 WT 組，且具有 3 個顯著差異，但在 N275 72~96hr 卻又有回升的趨勢，而在 N800 的組別不論何種時間則是與 WT 組沒有明顯差異；在血漿中的 T-CHO，在 WT 組和 N275 組則是沒有明顯的差異，而 N800 48hr 與 WT 組相比則具有兩個顯著差異，但在 N800 72~96hr 則是與 WT 組差不多。顯示出高劑量 NAC 可能會增加肝臟組織內的 TG 和 FFA 且也會增加血漿中的 T-CHO 含量。

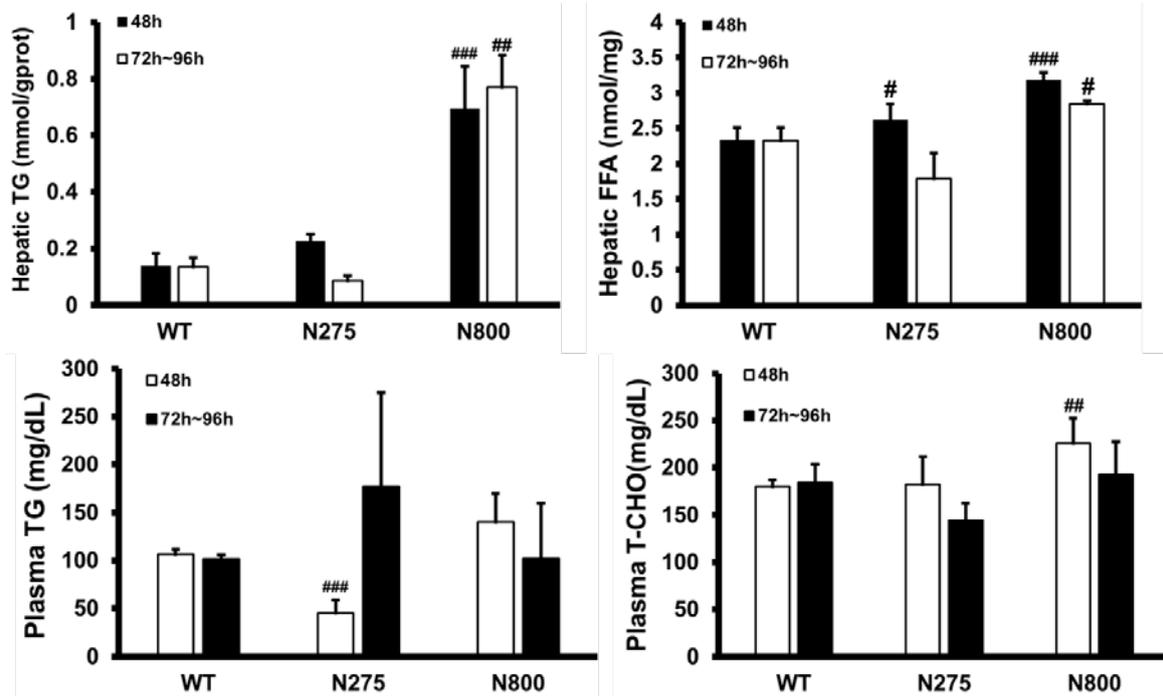


Figure 9. 各組別血液及肝臟生化分析 (TG : Triglyceride ; FFA : Free fatty acid ; T-CHO : Total cholesterol)。

➤ 酵素活性

GSH 為 NAC 合成的前驅物，也是生物體內重要的抗氧化劑。由 Figure 10 可見，N275 組別相較 WT 組有上升的趨勢，其中 N275 48hr 組更是與 WT 組有顯著差異，而在高劑量 N800 組別不論何種時間，GSH 含量卻是顯著的降低。顯示出 NAC275 劑量確實增加了 GSH 含量，進而促進生物體的抗氧化效力，而高劑量 NAC 的 GSH 含量不增反減，反而降低了體內抗氧化能力；ATP 是體內重要的能量來源。我們測定了肝臟組織內的 ATP 含量，發現在 N275 48hr 相較 WT 組有增加趨勢，但在 N275 72~96hr 回復到和 WT 組相當，而 N800 組別從 48hr 到 72~96hr 有逐漸減少的現象，且都具有顯著的差異。顯示出高劑量的 NAC 可能消耗了肝臟組織內的能量，使 ATP 含量降低；MDA 是脂質過氧化的指標，數值愈高代表脂質過氧化的程度愈高。由下圖可見，N275 組別不論何種時間皆與 WT 組別的數值相當，但在 N800 組別的 48hr 及 72~96hr 皆有顯著的上升。顯示出高劑量 NAC 的誘導增加了脂質過氧化的現象；CAT 則是生物體內的抗氧化酵素。可以發現在 N275 48hr 有稍微下降的趨勢，但在 N275 72~96hr 則回升，而 N800 24hr 和 72~96hr 則是相較 WT 組有顯著的降低。顯示出高劑量的 NAC 反而使生物體的抗氧化能力降低。

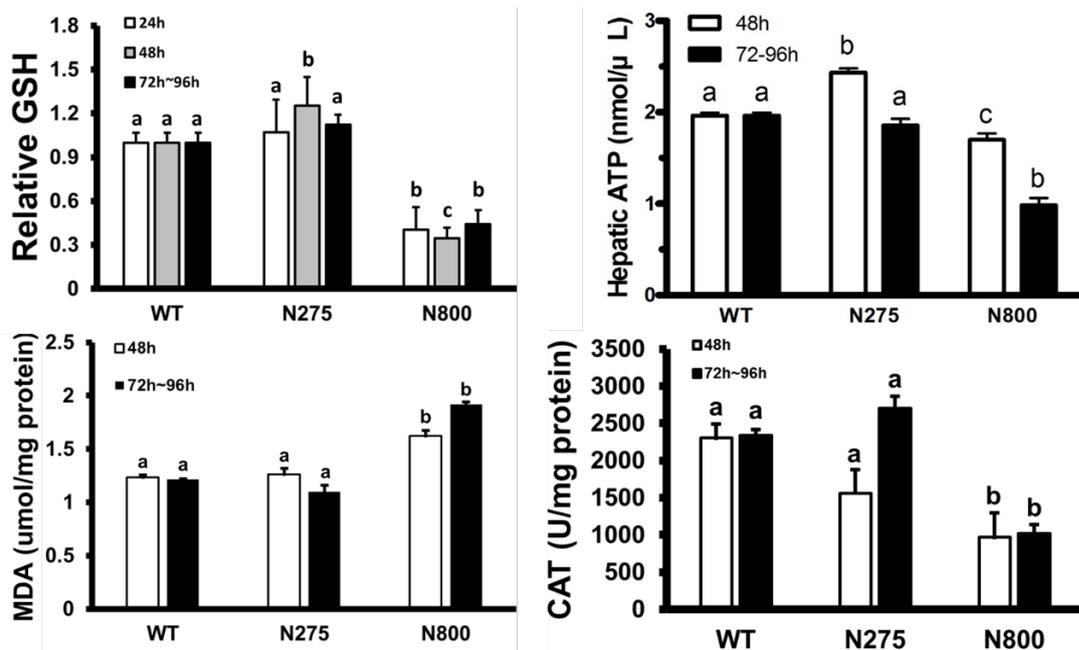


Figure 10. 肝臟組織萃取後，各組別的酵素活性分析 (GSH: Glutathione; ATP: adenosine triphosphate; MDA: Malondialdehyde; CAT: Catalase)。

3. 探討 NAC800 誘導 BALB/c 小鼠產生藥物性誘導脂肪性肝炎 (Drug induced steatohepatitis: DISH) 的可能機制

➤ Real-time PCR

目前已知在脂肪肝的患者中，Foxal 的表現量有下調趨勢，且已知 Foxal 的上調可促進肝臟的 b-oxidation，由 Figure 11 的圖 A 可發現 N800 組 24hr 和 48hr 中 Foxal 的表現量明顯低於 WT 組和 N275 組，與脂肪肝的患者相同，推測高劑量 NAC 可能藉由 Foxal 的下調抑制了 b-oxidation，進而影響肝臟代謝；FATP2 是肝臟內的脂質轉入蛋白，N275 組和 N800 24hr 相較 WT 組有略為上升的趨勢，但在 N800 48hr 又降回與 WT 組相當，推測脂肪酸的運入與高劑量 NAC 誘導的脂肪堆積較無直接關聯；SREBP1c 和 ChREBP 則是脂質新合成的關鍵蛋白，由圖可見 N275 組皆有明顯上升，但在 N800 24hr 和 48hr 表現皆下調，推測出脂肪肝與脂質的新合成可能沒有直接關係。CPT-1 是一種轉運蛋白，會將 free-fatty acid 運送到粒線體內進行 b-oxidation，而由 Figure 11 圖 B 可見，N275 與 N800 的 24hr 組較 WT 組皆有顯著差異，而 N800 48hr 卻是有下降趨勢，顯示出高劑量 NAC 對 FFA 粒線體的運入可能有抑制作用；而 PPAR-a 和 PGC1-a 會相互作用去促進、活化粒線體中 b-oxidation 的目標基因，由 Figure 11 可見 PPAR-a 的表現量在 N275 和 N800 的 48hr 皆有下降趨勢，且劑量愈高表現量愈低，而 PGC1-a 在 N275 組別顯著上升，但 N800 組別與 WT 組皆沒有明顯差異，顯示高劑量 NAC 的誘導下調了 PPAR-a 的表現量，但對 PGC1 沒有太大影響；CROT 是過氧化酶體 b-oxidation 的關鍵蛋白，HMGCS2 是酮體生成的相關基因，由圖可見在 N275 劑量有些許上升，但在 N800 劑量卻又回復到與 WT 相等，顯示高劑量 NAC 對於過氧化酶體的 b-oxidation 和酮體生成較沒有直接影響。

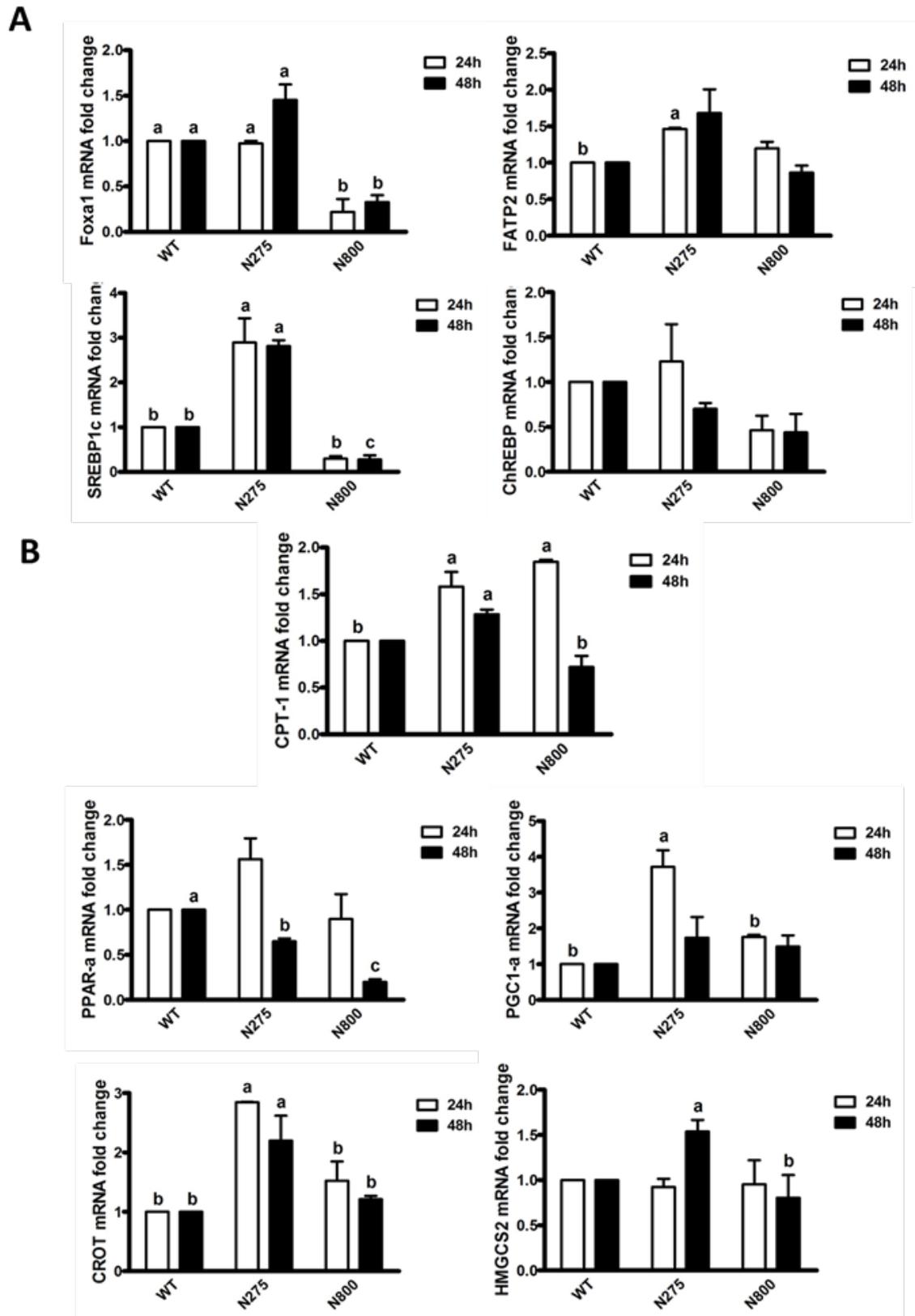


Figure 11. 肝臟組織萃取 RNA 後，藉由 Real-time PCR 測定 Foxa1、FATP2、SREBP1c 和 ChREBP、CPT-1、PPAR-a、PGC1-a、CROT 和 HMGCS2 目標基因的 mRNA 含量。

(六) 總結

我們將小鼠分別由腹腔注射 NAC 275 或 NAC 800 mg/Kg 的劑量後，等待 24、48 及 96 小時進行犧牲，去做後續的分析，探討高劑量 NAC 誘導所造成小鼠死亡的可能原因、肝臟代謝的影響和產生脂肪肝的可能原因與機制。由上述的結果歸納出以下結論，病理切片圖顯示，肝臟具有明顯脂肪堆積與脂質變性，而腎臟具有空泡化和腎小管變性的現象，脾臟則是發現有紅髓萎縮和細胞減少，顯示高劑量 NAC 對於肝、腎、脾皆有一定程度的損傷，我們也做了血液生化分析發現 ALT、AST、BUN 和 CREA 的數值皆為提高，初步結果顯示高劑量 NAC 對於腎臟的損害程度較大，於是我們推論高劑量 NAC 對於小鼠的致死原因為腎衰竭；而後續我們測定了肝臟組織內的 TG、FFA 數值皆為提升，而血液中的 T-CHO 也有增加的趨勢，顯示出高劑量 NAC 增加了生物體內的脂質含量，尤其以肝臟為主要脂質堆積的器官，進而產生了脂肪肝。因 NAC 是一種抗氧化劑，為了進一步瞭解高劑量 NAC 對於肝臟組織內的抗氧化能力，於是我們測定了抗氧化的相關酵素與指標，發現 GSH 和 CAT 含量降低、MDA 含量增加，顯示出在高劑量 NAC 的誘導下，肝臟組織的抗氧化能力不增反減。我們也測定了肝臟組織內的 ATP 含量，發現也有下降趨勢，推測高劑量 NAC 也影響了肝臟組織的能量代謝；最後，為了想了解高劑量 NAC 所導致的脂肪肝的可能原因與機制，我們測定了許多肝臟脂質代謝的相關基因，發現 Foxa1、PPAR- α 、CPT-1 的表現量皆下調，於是初步推測高劑量 NAC 誘導的脂肪肝的可能原因為肝臟的 b-oxidation 被抑制，使脂質無法進行 b-oxidation，進而使脂質堆積至肝臟中。

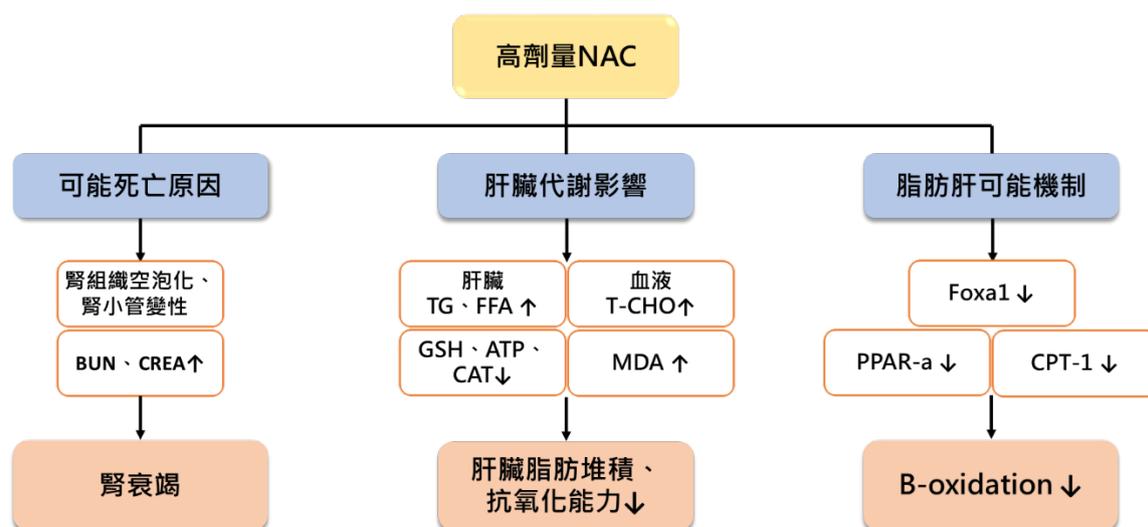


Figure 12. 高劑量 NAC 誘導所導致小鼠的可能死亡原因、肝臟代謝的影響和產生脂肪肝的可能原因與機制。

(七) 參考文獻

- [1] Hodgman, M. J., Garrard, A. R., 2012. A review of acetaminophen poisoning. *Crit Care Clin* 28, 499-516.
- [2] Millea, P. J., 2009. N-acetylcysteine: multiple clinical applications. *Am FamPhysician* 80, 265-269.
- [3] Bavarsad Shahripour, R., Harrigan, M. R., Alexandrov, A. V., 2014. N-acetylcysteine(NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities. *Brain Behav* 4, 108-122.

- [4] Rushworth, G.F., Megson, I.L., 2014. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacol Ther* 141, 150-159.
- [5] Lars E Schmidt., 2013. Identification of patients at risk of anaphylactoid reactions to N-acetylcysteine in the treatment of paracetamol overdose. *Toxicol (Phila)* 51, 467-472.
- [6] Sandilands, E.A., Bateman, D.N., 2009. Adverse reactions associated with acetylcysteine. *Clin Toxicol (Phila)* 47, 81-88.
- [7] Bateman, D.N., Dear, J.W., 2019. Acetylcysteine in paracetamol poisoning: a perspective of 45 years of use. *Toxicol Res (Camb)* 8, 489-498.
- [8] Sandilands, E.A., Bateman, D.N., 2009. Adverse reactions associated with acetylcysteine. *Clin Toxicol (Phila)* 47, 81-88.
- [9] Ziment, I., 1988. Acetylcysteine: a drug that is much more than a mucokinetic. *Biomed Pharmacother* 42, 513-519.
- [10] Liane Rabinowich, Oren Shibolet., 2015. Drug Induced Steatohepatitis: An Uncommon Culprit of a Common Disease. *Biomed Res Int*.
- [11] Dash, A., Figler, R.A., Sanyal, A.J., Wamhoff, B.R., 2017. Drug-induced steatohepatitis. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 13, 193-204.