

探討 sildenafil 類緣物對大鼠肝臟一氧化氮生成及氧化壓力之影響

陳怡宏¹ 曹渝涵¹ 翁家瑞² 孫芳明^{1*}

¹嘉南藥理大學保健營養系

²台南應用科技大學生活應用科學研究所

摘 要

本實驗目的以 sildenafil 類緣物(分子量為 484)為材料，探討其對大鼠肝臟一氧化氮(NO)合成、脂質代謝、氧化壓力(TBARS)及肝功能(GPT、GOT)之影響。32 隻八週大 Sprague-Dawley(SD)雄性大鼠隨機分為四組(n=8)，(1)Control 組-C 組，(2) 低劑量組(36 mg sildenafil 類緣物/Kg diet)-L 組，(3) 中劑量組(90 mg sildenafil 類緣物/Kg diet)-M 組及(4) 高劑量組(180 mg sildenafil 類緣物/Kg diet)-H 組，並採用 AIN-93G 飼料配方，飼料及飲水採自由進食。在飼養 30 天後，以 CO₂ 將其犧牲；並進行樣品分析。結果發現低劑量的 sildenafil 類緣物具有較佳調控血脂的作用；大鼠肝臟 NO 的濃度隨著 sildenafil 類緣物劑量的增加而增加，三組實驗組大鼠肝臟的 TBARS 和 GOT 顯著高於 C 組大鼠；從本實驗的結果推論，此 sildenafil 類緣物會促進實驗大鼠肝臟的 NO 的合成，NO 濃度上升對肝臟可能會造成氧化性傷害而使 GPT、GOT 升高。

關鍵字：Sildenafil 類緣物、一氧化氮、氧化壓力、肝功能指標

*通訊作者:嘉南藥理大學保健營養系

Tel:+886-6-2664911#3427

E-mail:fangming@mail.chna.edu.tw

前言

一氧化氮(Nitric oxide; NO)是一種帶有自由基(free radical)的活性氣體，也是一種在生理過程、發病機制及藥物藥理作用中扮演著不同的角色的內源性分子(1)。NO 在生物體內參與著許多重要的生理代謝，例如：發炎反應、調節免疫系統、老年痴呆症、抑制血小板凝集、擴張血管、抑制平滑肌細胞增生及神經傳導；由於其與人體的健康密切相關，因此近年來 NO 成為各個學科爭相研究的主題(2-4)，在生物體內 NO 的合成需透過一氧化氮合成酶(Nitric Oxide Synthase; NOS)所催化(3)，NOS 的活性受到包含 sildenafil citrate 等因子的調控(1、5)。

Sildenuafil citrate 是威而鋼 (Viagra)的成份學名，而 Viagra 是在 1996 年由美國輝瑞藥廠 (Pfizer Inc.)

所研發，原先為治療心血管疾病用藥，後來成為第一個能克服勃起障礙(Erectile dysfunction, ED)的口服藥物，並在美國取得專利(6)，Sildenafil 可刺激血管內 NOS 之活性，可促使 NO 合成，NO 釋放並擴散進入平滑肌細胞，與可溶性鳥苷酸環化酶(guanylate cyclase)中的血紅素結合，刺激環單磷酸鳥苷 (cGMP) 的合成並抑制磷酸雙酯酶 (Phosphodiesterase Type 5, PDE5) 的活性。當 cGMP 與環單磷酸鳥苷(guanylate)依賴之蛋白激酶(cGMP protein kinase, PKGs)與離子通道結合後，會透過吸收和擠壓鈣離子而降低細胞內鈣離子濃度，進而抑制平滑肌收縮，而促使陰莖勃起(6-8)。在許多國家 sildenafil 及其類緣物(sildenafil analogue)被歸類為「生活品質用藥」，自費購買比例較高，以日

本為例，自費購買 sildenafil 的量為透過醫師開立處方簽的 2.5 倍(10)，在 2000 至 2001 年的調查 sildenafil 的銷售金額達 10 億美金，因此許多藥廠也投入新的 PDE5 抑制劑或 sildenafil analogue 的研發，自 2003 年第一個 sildenafil analogue-Homosildenafil 被報導以來至 2006 年已有超過 10 種以上的 sildenafil analogue 被合成(9)；在台灣 sildenafil、sildenafil analogue、或其它壯陽藥在食品被檢測出的比率逐年都在增加中，截至 2012 年 5 月為止，衛生署食品藥物管理局所公佈的非法添加至食品的 sildenafil analogue 及其他廠商正式合法上市的治療 ED 藥物，總共有 37 種(10-12)。

Sildenafil 及 sildenafil analogue 能改善 ED 的功能是與血管的擴張有關連，而血管的擴張又和 NO 的生成有相關，而 NO 也是一種 Free radical，過多的 NO 也可造成 oxidative stress 的上升，而 oxidative stress 的確與許多疾病癌症、心臟疾病、腦血管疾病、糖尿病等疾病的發病有相關(13)，且目前關於 sildenafil 或 sildenafil analogue 的研究大多為探討其短期治療 ED 的效果(7-9)，但如添加至食品或飲料，則可能造成人體長期攝取的機會，因此有必須了解長期攝取 sildenafil 或 sildenafil analogue 是否對人體是否有不良的影響，所以本實驗就是以 2012 年 5 月 9 號食品藥物管理局公告的第 37 種 sildenafil analogue(分子量為 484 g/mol)為材料，探討其對大鼠體內脂質代謝、氧化壓力及肝功能之影響。

材料與方法

(一) 藥品與套裝試劑

Sildenafil analogue(分子量為 484、含 50%玉米澱粉)由冠文藥品股份有限公司(高雄，台灣)提供， K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、Hcl 購自 J.T.Baker，USA， H_2O_2 (Riedel-dehean，Germany)，2-thiobarbituric acid 等其它藥品 Sigma，Germany；商用套裝試劑 NOx - Cayman162-780001 (USA)，TC (CH7945)、TG (TR213)、HDL-C (CH204)、GOT(AS1267)及 GPT (AL1268)Randox (UK)，

3. 肝臟 NO 含量分析：組織均質液之 NO 濃度以市售組合試劑 Cayman (USA)處理，最後以 ELISA reader (Spectrostar Nano，0601，Germany) 在 OD_{540 nm} 下進行吸光值測試。

(二) 動物飼養及飼料配方

32 隻八週齡雄性 Sprague-Dawley(SD)品系大鼠(樂斯科生技公司)，隨機分為 4 組：控制組(C 組)、低劑量組(L 組)、中劑量組(M 組)及高劑量組(H 組)，實驗動物飼料以 AIN-93G 為基礎配方，並以未添加 Sildenafil analogue 為 C 組、每公斤飼料加入 36 mg sildenafil analogue 為 L 組(以該 sildenafil analogue 的成人建議攝取量 250 mg/70 kg 體重為基準，乘於大鼠的平均體重 0.4 kg，每天供給 40 g 飼料)、每公斤飼料加入 90 mg sildenafil analogue 為 M 組(L 組劑量的 2.5 倍)、及每公斤飼料加入 180 mg sildenafil analogue 為 H 組(L 組劑量的 5 倍)。動物分別飼養在不鏽鋼絲網籠中。在動物房中溫度保持在於 23±2℃。在光度方面，光照及黑暗都維持各有 12 小時(08:00 ~ 20:00 屬光照期，其餘為黑暗期)。

(三) 樣品處理

實驗大鼠飼養 30 天後以二氧化碳將其窒息，大鼠犧牲後，自下腔大靜脈收集血液，並將所收集的血液注入含 heparin 的真空採血管中；然後將全血用 3500 rpm 離心 10 分鐘，離心後血漿與血球分開，將其分別裝至 2 ml 微量離心管中，儲存於 -80℃ 冰箱中以供往後分析；快速取下肝臟以冰冷的生理食鹽水 (0.9% NaCl) 沖洗，再以濾紙吸乾，並立即放入液態氮，再保存於 -80℃ 冰箱以製備組織均質液。

(四) 樣品分析

1. 血漿脂質分析：血漿以市售組合試劑 Randox (UK) Enzymatic Endpoint Method 處理，反應後由分光光譜儀 (Hitachi, U2800, Japan)測定血漿三酸甘油酯(TG)、總膽固醇(TC)及高密度脂蛋白膽固醇(HDL-C)，低密度脂蛋白膽固醇(LDL-C)濃度由以下公式計算： $LDL-C(mmol/L) = TC - (TG/2.2) - HDL-C$ 。
2. 肝臟氧化壓力 Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS)測定：參考 Oteiza 等人之方法(14)以分光光譜儀 (Hitachi, U2800, Japan)測定。
4. 肝臟功能(glutamic pyruvic transaminase，GPT 及 glutamic oxaloacetic transaminase，GOT)測試：分別以 Randox AS1267 及 AL1268 市售組合試劑測定。

(五)統計分析

實驗結果均以算術平均數 $\pm$ 標準偏差(Mean $\pm$ SD) 表示，並以單因子變數(One-way ANOVA)確認顯著差異，當顯著差異存在時，則以 Duncan, s Multiple Range Test 來檢定各組獨立樣本其組間差異之顯著性，當 $p < 0.05$ 表為具顯著性差異。

結果與討論

大鼠飼養 30 天後，C 組、L 組、M 組及 H 組大鼠的體重增加情形、飼料攝取量及飼料效率並無顯著差異(表一)，此結果顯示飼料中添加三種劑量的 sildenafil analogue 不會改變實驗大鼠的飲食習慣或方式，所以在體重的變化上並無影響。

表一: Sildenafil analogue 對大鼠攝食量及體重的影響

	Group			
	Control	L	M	H
Initial body weight(g)	270 $\pm$ 6.45	271.78 $\pm$ 5.22	272.5 $\pm$ 6.83	269.6 $\pm$ 5.95
Final body weight(g)	518 $\pm$ 3.04	534.38 $\pm$ 32.56	533.96 $\pm$ 60.28	504.6 $\pm$ 43.77
Weight gains(g)	7.11 $\pm$ 1.1	7.50 $\pm$ 0.85	7.47 $\pm$ 1.62	6.71 $\pm$ 1.15
Food intake(g/day)	26.33 $\pm$ 2.51	26.49 $\pm$ 2.15	26.34 $\pm$ 2.22	26.25 $\pm$ 1.58
Feed efficiency(%)	27.00	28.31	28.36	25.56

*Feed efficiency= Weight gains(g /day) / Food intake(g /day) 1.Each value represents mean $\pm$ SD.

表二為不同劑量 Sildenafil analogue 對大鼠脂質代謝的影響，其中 L 組大鼠血漿的 TG(比 C 組大鼠下降 39%)、TC(比 C 組大鼠下降 20%)及 HDL-C(比 C 組大鼠下降 13%)皆低於其它三組，M 組大鼠血漿的 LDL-C 顯著低於其它三組，此結果與 Kang 等人(15)發現長期以

PDE5 抑制劑治療患有高膽固醇大鼠，其具有調節脂肪及擴張血管增加血流的作用的結果相似，只是為何 L 組的調節 TG、TC 及 HDL-C 效果較 H 組顯著，其原因有待進一步的探討。

表二: Sildenafil analogue 對大鼠脂質代謝的影響

	Groups			
	Control	L	M	H
Total-C(mmol/L)	2.25 $\pm$ 0.68 ^a	1.80 $\pm$ 0.23 ^b	2.00 $\pm$ 0.50 ^a	2.10 $\pm$ 0.50 ^a
Triglyceride(mmol/L)	1.76 $\pm$ 0.69 ^a	1.07 $\pm$ 0.34 ^d	1.48 $\pm$ 0.41 ^c	1.42 $\pm$ 0.28 ^b
HDL-C(mmol/L)	0.82 $\pm$ 0.033 ^a	0.71 $\pm$ 0.032 ^c	0.75 $\pm$ 0.04 ^b	0.75 $\pm$ 0.02 ^b
LDL-C(mmol/L)	0.63 $\pm$ 0.55 ^b	0.60 $\pm$ 0.27 ^d	0.58 $\pm$ 0.45 ^c	0.70 $\pm$ 0.45 ^a

1.Each value represents mean $\pm$ SD.

2.Values not sharing common superscript letters are significantly different from one another among C (Control), H (H-High Dose), M (M- Medium Dose), L(L- Low Dose) by one way ANOVA and Duncan's Multiple Range Tests ($p < 0.05$)

3.The detection methods of TC, TG, HDL-C are used the Randox CH7945, Randox TR213 and Randox CH204 kit

於飼料中添加三種不同劑量的 sildenafil analogue 與 C 組大鼠比較，其肝臟 NO 的產量皆有顯著差異，且 NO 濃度和 sildenafil analogue 劑量有正相關的關係($r^2 = 0.99$) (圖 1)，本實驗結果說明此 sildenafil analogue

與 sildenafil 一樣，都具有調控 NO 生成的能力(8)，至於不同劑量的 sildenafil 或 sildenafil analogue 在 NO 產率上是否有差異，因無相關文獻可比較，所以無法探討。

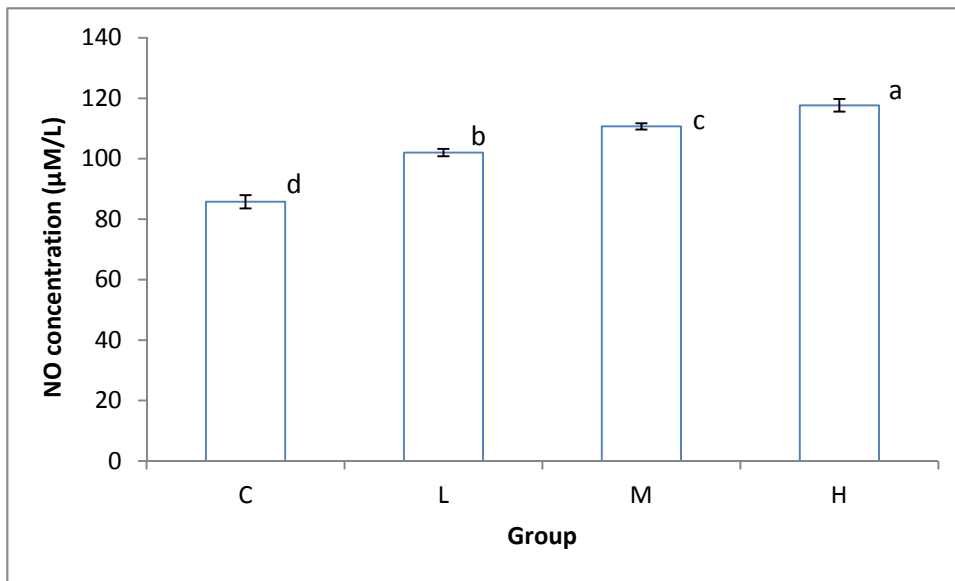


圖 1、不同劑量 Sildenafil analogue 對大鼠肝臟 NO 濃度之影響

1.Each value represents mean $\pm$ SD.

2.Values not sharing common superscript letters are significantly different from one another among C (Control), H (H-High Dose), M (M- Medium Dose), L(L- Low Dose) by one way ANOVA and Duncan's Multiple Range Tests($p < 0.05$)

3. The detection methods of NO is use the Cayman 162-780001 kit

對於實驗大鼠肝臟氧化壓力(TBARS)的測定，H 組、M 組、L 組相對於 C 組都有顯著性差異(表三)，肝臟的 TBARS 濃度隨著 Sildenafil analogue 的劑量的增加而增加($r^2=0.91$)，顯示隨著肝臟 NO 濃度的上升而使得肝臟脂質的過氧化的情形更為嚴重，但 Yildiz 等指出 sildenafil 可刺激肝臟產生大量的 NO，使肝臟血管擴張血流速度增加，而降低血液 TBARS(MDA)的濃度(16)，本實驗結果 Yildiz 等的發現並不相同，造成結果差異的原因可能在於飼料配方的不同，Yildiz 等使用高膽固醇飼料(添加 2%膽固醇)以誘導高膽固醇血

症及氧化壓力，本實驗則使用一般 AIN-93G 飼料配方。從表三 中可看出餵食三種不同劑量的 sildenafil analogue 的大鼠血漿的 GOT 及 GPT 相對於 C 組大鼠都有顯著性的差異，其中 GOT 隨著 sildenafil analogue 劑量的上升而升高，而 GPT 則呈現相反的結果，此不同的效應值得進一步的探討，但不論是補充何種的 sildenafil analogue，其大鼠肝臟的 GOT 及 GPT 皆顯著性的高於 C 組的大鼠，所以推論此 sildenafil analogue 在長期的使用下可能對實驗大鼠的肝臟產生氧化性的傷害。

表三: Sildenafil analogue 對大鼠肝臟氧化壓力及功能的影響

	Groups			
	Control	L	M	H
TBARS	14.00±2.34 ^d	17.62±3.70 ^c	19.05±6.17 ^b	23.98±3.31 ^a
GOT(U/L)	28.08±15.41 ^d	33.97±5.48 ^c	35.07±6.04 ^b	48.67±16.50 ^a
GPT(U/L)	21.10±13.37 ^c	32.81±9.72 ^a	22.19±11.12 ^b	23.64±6.96 ^b

1. Each value represents mean ± SD.

2. Values not sharing common superscript letters are significantly different from one another among C (Control) , H (H-High Dose) , M (M- Medium Dose) , L(L- Low Dose) by one way ANOVA and Duncan's Multiple Range Tests ($p < 0.05$)

3. The detection methods of GOT and GPT are use the Randox AS1267 kit and Randox AL1268.

結論

本實驗的結果中發現，長期攝取低劑量的 sildenafil analogue 具有調節血脂的功效，而調節血脂的機制是否與 NO 濃度升高有關，有待進一步的探討；此外此 sildenafil analogue 對實驗大鼠會造成肝臟的 NO 濃度升高，在肝臟中因 NO 濃度升高而造成 oxidative stress，而 oxidative stress 可能會造成大鼠肝臟細胞產生氧化性的傷害。

謝誌

感謝冠文藥品股份有限公司提供本實驗所需 sildenafil analogue 及經費。

參考文獻

1. Coleman J. W. (2001) Nitric oxide in immunity and inflammation, *International Immunopharmacology*, 1, 1397-1406.
2. Forte P., Copland M., Smith L.M., Milne E., Sutherland J., Benjamin N. (1997) Basal nitric oxide synthesis in essential hypertension, *Lancet*, 349(9055), 837-842.
3. Gulbenkian S., Uddman R., Edvinsson L. (2001) Neuronal messengers in the human cerebral circulation. *Peptides*, 22(6), 995-1007.
4. Moro M.A., Michelena P., Sanchez-Garcia P., Palmer R., Moncada S., Garcia A.G. (1993) Activation of adrenal medullary L-arginine: nitric oxide pathway by stimuli which induce the release of catecholamines. *European journal of pharmacology*, 246(3), 213-218.
5. Tanus-Santos J.E., Michele M. C., Elen R., Ricardo R. R., Sabrina N., Lusiane M. B. (2004) Atorvastatin enhances sildenafil-induced vasodilation through nitric oxide-mediated mechanisms, *European Journal of Pharmacology*, 498, 189 – 194.
6. Moreland R. B., Goldstein I., Kim N. N., Traish A. (1999) Sildenafil Citrate, a Selective Phosphodiesterase Type 5 Inhibitor: Research and Clinical Implications in Erectile Dysfunction, *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 10(3), 97-104.
7. Venhuis B. J., Zwaagstra M.E., Berg J. D. J.V. d., Riel A. J. H. P.V., Wagenaar.W.G., Groothuis V., Barends D., Kaste D. D. (2010) Illicit erectile dysfunction products in the Netherlands; a decade of trends and a 2007-2010 product update,, *National Institute for Public Health and the Environment*, 75-81.
8. Goldenberg M. M. (1998) Safety and efficacy of sildenafil citrate in the treatment of male erectile dysfunction, *Clinical Therapeutics*, 20, 1033-1048.
9. Boyce E. G., Elena M. (2001) Sildenafil citrate: A

- therapeutic update, *Clinical Therapeutics*, 23, 2-23.
10. 林嘉慶、白美娟、黃維生、李婉嬪、李明鑫、陳惠芳。2012。100 年度中藥摻西藥(壯陽藥) 檢驗之能力試驗。食品藥物研究年報，3: 366-372。
11. 顧祐瑞、蔡麗瑤、林美智、賴國誌、范振一、王依婷、李蕙君、鄭守訓、劉宜祝、林哲輝、羅吉方。2010。保健食品檢出西藥成分之分析。藥物食品檢驗局調查研究年報，1:200-211。
12. 賴國誌、范振一、曾木全、林美智、顧祐瑞、楊禮安、蔡麗瑤、劉宜祝、林哲輝。2007。九十五年調製劑中藥檢出西藥成分之分析。藥物食品檢驗局調查研究年報，25: 80-89。
13. Laroux FS, Lefer DJ, Kawachi S. (2000) Role of nitric oxide in the regulation of acute and chronic inflammation, Antioxidants and redox signaling, 2(3), 391-396.
14. Oteiza P. I., Olin K. I., Fraga C. G., Keen C. L. (1995) Zinc deficiency causes oxidative damage to proteins, lipid, and DNA in rat testes, *Journal of Nutrition*, 125, 823-829.
15. Kang K. K., Jung H. G., Shin J.H., Kim K-W., Yu J.Y., Ahn B. O., Kwon J. W., Yoo M. (2007) Microarray analysis of gene expression profile in the corpus cavernosum of hypercholesterolemic rats chronic treatment with PDE5 inhibitor, *Life Sciences*, 80, 699-708
16. Yildiz H., Durmus A. S., Simsek H., Yaman I. (2011) Effect of sildenafil citrate on torsion / detorsion-induced changes in red blood cell and plasma lipid peroxidation, antioxidants, and blood hematology of male rats, *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 159, 359-363

The effects of sildenafil analogue on the generation of nitric oxide and oxidative stress in rat liver

Yi Hung Chen¹ Yu Han Tsao¹ Chia Jui Weng² Fang Ming Sun^{1*}

¹ Department of Health and Nutrition,

Chia-Nan University of Pharmacy and Science, Tainan, Taiwan 71710, R.O.C.

² Graduate Institute of Applied Science of Living, Tainan University of Technology

Abstract

The aim of this study was to investigate the effects of sildenafil analogue on the NO generation, oxidative stress, lipid metabolism, and liver function in the rat. Thirty-two male Sprague-Dawley (SD) rats (10-week-old) were randomly divided into four groups (n = 8), (1) Control group (C group) (2) High dose group (180 mg sildenafil analogue /Kg diet, H group) (3) Middle dose group (90 mg sildenafil analogue /Kg diet, M group) (4) Low dose group (36 mg sildenafil analogue /Kg/diet, L group). The rats were fed an AIN-93G diets with or without sildenafil analogue. After 30 days, the rats were sacrificed and samples were analyzed. The concentrations of nitric oxide in the liver were increased with the increasing of the dose of the sildenafil analogue supplemented. The concentrations of TC and TG in the plasma of the rats in L and M group were decreased significantly when compared with the rat in C group. The concentrations of TBARS and GOT of the rats in the experimental groups were significant higher than the rats in C group. The results from this study indicate that additional supplement of this new sildenafil analogue may increase the NO production in rats. Nitric oxide then increased the oxidative stress in rats liver and may impaired liver cells function.

Keywords: sildenafil analogue, nitric oxide, TBARS, liver function

*Correspondence: Department of Health and Nutrition, Chia-Nan University of Pharmacy and Science, Tainan, Taiwan 71710, R.O.C.

Tel: +886-6-2664911#3427

E-mail: fangming@mail.chna.edu.tw