

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫名稱：比較餵食不同劑量與製程的兒茶素類物質對小鼠的毒理性與機能性評估。

計畫編號：

執行期間：88年9月1日至89年6月30日。

計畫類別：個別型。

主持人：葉東柏

協同研究：陳師瑩

摘要

本實驗的主要目的是在探討小鼠於餵食不同劑量及製程的兒茶素類物質後，比較所可能發生的毒性耐受度及機能性效應；並藉此評估適當之餵食劑量與大量製備之製程改良；將體重約 20 公克的雄性小成鼠 30 隻，隨機分成五組。各組每天分別以每單位老鼠體重強迫飲用 0(控制組)、0.5(台灣製低劑量組；LDM)、50(台灣製高劑量組；HDM)、0.5(大陸製低劑量組；LDP)、50(大陸製高劑量組；HDP) 毫克經部份純化的兒茶素類物質。二週實驗期完成後，檢測與評估小鼠在餵食不同劑量下之毒理性及機能性評估。就生化分析的結果得知，高劑量組 (HDM 及 HDP) 的茶素類物質皆具嚴重的肝毒性且其抗氧化力也未因此而增加，顯示提高攝取較多的茶素類物質並未帶來可預期的好處；在製程方面，也有顯著差異，大陸購買的產品 (LDP) 顯示有相當不良的副作用且未見其抗氧化功效；但以本實驗室之製作方式 (LDM)，不僅其肝毒性小亦有顯著抗氧化功效。

關鍵詞：兒茶素類物質、劑量、毒理性評估、機能性評估。

前言

茶可以說是古今中外均非常普遍的天然飲料，台灣茶葉年產量在兩萬公噸以上，1984 年起，台灣省茶葉改良場開始研發我國罐裝茶飲料的產製，並在食品業界的積極配合下，使得其銷售市場從 1987 年佔國人飲料市場 2.65 % 的銷售值起到 1994 年達到 36.3% 的高峰。1996 年其銷售額超過一百二十億元新台幣以上；估計每年茶飲料工廠所需茶葉約為四、五千公噸。依據茶的製程與發酵程度，可分為不發酵茶（如：綠茶、龍井茶等）、部份發酵茶（如：凍頂茶、烏龍茶等）與全發酵茶（如：紅茶）。對於這些茶的主要成分中的多酚類（茶多酚），一般將之區分為四大類，即黃烷醇類（flavanols）、黃酮醇類（flavonols）及其配體、無色花青素（leucoanthocyanins）以及酚酸（phenolic acids）及縮酚酸（depsides），此約佔乾燥茶重量的 30% 左右；本實驗材料主要便是從不發酵茶（綠茶）中部份純化出的兒茶素類物質（catechins；屬於黃烷醇類）進行研究，為茶多酚中主要成分，約佔 70-80 %；茶及茶所含成分對於生理作用，已報導的有抗菌、抗病毒、抗炎、抗突變、抗氧化性，甚至有促進 T 和 B 淋巴球以及 natural killer cells 的增生，甚至還可以降低血中三酸甘油酯與膽固醇的量；因此，在眾多的健康食品市場中，可說是最具有開發與應用價值，但相對的則更需要進一步的探索其生物活性的作用機制與劑量效應，以確保人體健康與生命的保障。尤其對兒茶素的適當食用劑量（dose）及其生物利用率（bioavailability）不是瞭解很多的情況，且市售罐裝茶飲料種類繁多又參差不齊下，政府衛生單位又未能及時有效的訂定檢驗標準，因此各製造商通常僅標示咖啡因及維生素 C 含量，對於茶葉本身的主要成分--catechins 均未提及，就茶飲料的保健功能與品管而言，確實是一項缺憾。

儘管已有大量的研究資料，顯示茶具有抗氧化及抗腫瘤等等效應，但更有必要清楚瞭解這些生物活性的作用機制。針對茶及其所含的成分對免疫相關機能上的影響之研究，瞭解的就並不很多；因此不免令人好奇茶在經過去除咖啡因與單寧酸的初步純化後的兒茶酚類，對免疫機能的影響是否會受到生命期的轉變（胸腺退化前後）下而有差異；儘管茶對於免疫機能已有一些正面報導，然而過量食用茶所可能導致的有害效應是不能忽略，根據最近文獻，發現斷奶老鼠當飼養經不適當的高溫加熱，造成梅納反應產生的膳食時，會有明顯的胸腺細胞萎縮與免疫機能衰退的現象，其原因之一是其梅納反應的產物降低了食物消化率與蛋白質的利用率；另外，在一些研究蛋白質攝取不良的研究報告中，也發現對胸腺的發育有負面的影響，當然其免疫機能也一樣衰退；Williamson, M. P. 實驗中發現，多酚類物質不僅會沈澱口腔中唾液蛋白並產生收斂性感覺，且與膳食中的營養物質（主要是蛋白質）以及腸道的消化酵素產生結合反應，進而造成一些營養物質的利用率下降，或一些毒性效應。因此，兒茶素類物質對動物胸腺及其生理機能影響之探討，亟需進一步的探索，尤其應針對茶及其所含的成分的生物利用率和劑量效應，以提供較完整的背景資料及確保人體健康與生命的保障。有鑑於茶葉中成分複雜，而真正對人體具有保健功效的成分，又不是很明確，故本實驗主要是針對茶中主要成分（兒茶酚類）進行部份純化，又因純化量的限制和在腸道消化吸收率的問題，以及避免兒茶素類物質與食物在口腔與腸道內所發生的交互作用，吾人擬以注射的方式，直接觀察兒茶素類對生理、免疫機能的作用，評估有無直接或間接的關係。

結果

一、從小鼠初体重並無顯著差異下開始，經灌食兒茶素製品後的体重變化觀察：(圖一)

由實驗開始至實驗結束為止，整組 CK (控制組) 組小鼠的體重一直就是呈現穩定的成長狀況，最後一次測量的結果是整組小鼠的平均體重比原來的體重增加了 3.77g。LDM 與 LDP 組之小鼠體重在實驗前期(第 0 至第 9 天)是呈現一個負成長的現象，顯示對該食品成分有顯著不適應之現象；但約在 15 天後體重的變化始有正成長，顯示漸趨適應。HDM 組自實驗開始後，一直是呈現出一個負成長的趨勢，平均體重的下降量很嚴重，體重下降量雖有趨緩之勢，但小鼠的身體狀況明顯不佳。HDP 組整組平均體重的起始下降量為各組之最($-5.85 \pm 0.11g$)，且自實驗進行到第 9 天時，即已有兩隻小鼠因而猝死，小鼠身體狀況極度不佳，故於第十天起即終止 HDP 組灌食試驗，並於隨後可以發現體重呈現一個迅速回升的趨勢。

二、餵食效率比較(圖二)：

自實驗開始自第 0 天至第三天為止，這三天各組的餵食效率呈現一個很懸殊的差異，直到第九天之後則各組的餵食效率值則漸趨於一致，直到實驗結束為止，顯示此次灌食兒茶素製品試驗，小鼠約需 9 天的適應期。

三、小鼠各器官重量比較 (表一)：

CK 組的相對腎重 (1.53 ± 0.16) 明顯低於 HDM 組(1.91 ± 0.37)，LDP 組(1.88 ± 0.16) 及 HDP 組(1.90 ± 0.25)($p < 0.05$)，顯示對腎臟機能有若干影響；而在相對肝重和相對脾重方面，CK 組和 LDM 組、HDM 組、LDP 組及 HDP 則沒有明顯的差異。

四、小鼠血液、肝臟的 GPT 及 GOT 活性測定(表二)：

實驗上發現血液 GPT 及 GOT 測定值，各組皆無顯著差異；但肝臟之 GPT 及 GOT 測定值，除了 LDM 組與控制組無差異外，其餘各組則皆比控制組高，且有明顯差異，顯示 LDP、HDM 及 HDP 對肝具有若干肝毒性。

五、小鼠血液、肝臟的抗氧化活性測定(表三)：

就抗氧化活性測定的結果得知，高劑量組 (HDM 及 HDP) 其抗氧化力未因量的增加而增加，顯示提高攝取較多的茶素類物質並未帶來可預期的好處；在製程方面，也有顯著差異，大陸購買的產品 (LDP) 顯示未沒有抗氧化功效；但以本實驗室之製作方式 (LDM)，則有顯著抗氧化功效。

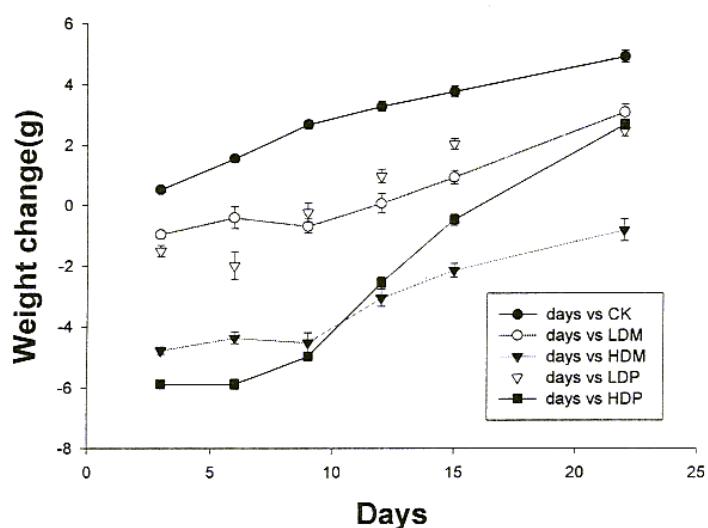
討論

在本實驗灌食兒茶素類物質予小鼠期間，觀察小鼠的毛色和情緒發現了 HDM 和 HDP 組的小鼠的毛色逐漸由原來的白色變化成棕色，而這兩組之小鼠情緒顯得特別的亢奮，而有躁動心悸的現象發生，也可見到相殘的現象，由實驗開始至實驗結束為止，共有四隻小鼠死亡分別是：LDM 組一隻(於第六天前死亡)，HDM 組一隻(於第六天前死亡)，HDP 組二隻(分別於第六天及第九天前死亡)，而造成這樣的結果可能是發生劑量依存效應，亦可能是兒茶素的製程出了問題。

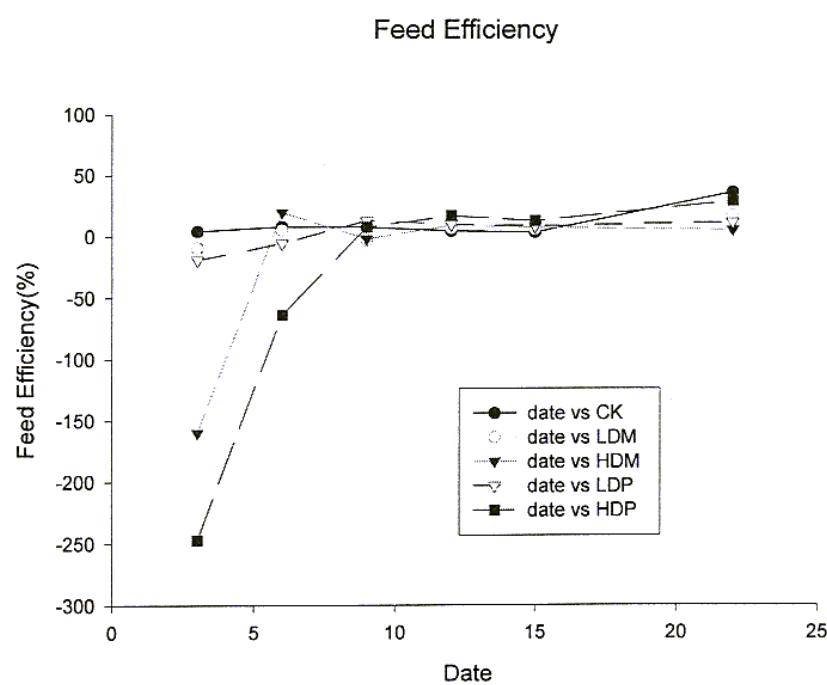
而若由每一組小鼠的平均體重的變化來分析，在實驗初期除了 CK 組外，其餘每一組(LDP 組，LDM 組，HDM 組，HDP 組)的小鼠平均體重均有明顯的下降，且分為 LDM 及 LDP 和 HDM、HDP 組等二個集因，這似乎又再一次印證了劑量依存效應的現象，因為使用高劑量兒茶素類物質的小鼠平均體重下降量都比食用低劑量兒茶素類物質小鼠的平均體重下降量來得大，而且餵食自行純化的兒茶素類物質小鼠的體重下降量都比餵食由大陸購買之兒茶素類物質的小鼠的體重下降量來得大，由於二種兒茶素類物質的純化方法可能有些差異，所以純化方法是否對結果有所影響，或是在純化過程中有來自外界的干擾因素進入，必需再深入研究。

就生化分析的結果得知，高劑量組 (HDM 及 HDP) 的茶素類物質皆具嚴重的肝毒性且其抗氧化力也未因此而增加，顯示提高攝取較多的茶素類物質並未帶來可預期的好處；在製程方面，也有顯著差異，大陸購買的產品 (LDP) 顯示有相當不良的副作用且未見其抗氧化功效；但以本實驗室之製作方式 (LDM)，不僅其肝毒性小亦有顯著抗氧化功效。

在對於由小鼠所摘取內臟的重量分析，我們分別測量了肝重、腎重和脾重，應用相對臟器重量比值(臟器重/小鼠最終體重)來分析，在 $P < 0.05$ 的條件下，三種臟器的分析結果，並沒有明顯的差異，但在相對腎臟重量方面 ($P < 0.05$) 有顯著差異，須要有更進一步的研究，用以瞭解茶素類物質對腎臟是否有傷害。



圖一：每次測量期間各組小鼠平均體重與各組原始平均體重改變量



圖二：每次測量期間的各組小鼠平均攝食效率之比較

表一、灌食兒茶素製品之小鼠，其器官重量與相對重量

Treatment	n	Liver weight (g)	Kidney weight (g)	Spleen weight (g)	Relative Liver weight(%)	Relative Kidney weight (%)	Relative Spleen weight (%)
CK	6	1.52±0.19 ¹	0.38±0.03	0.09±0.02	7.06±1.87	1.53±0.16 ^{b2}	0.34±0.07
LDM	5	1.43±0.17	0.42±0.03	0.09±0.01	6.16±0.32	1.80±0.12 ^{ab}	0.43±0.05
HDM	5	1.10±0.26	0.36±0.04	0.07±0.02	5.53±0.65	1.91±0.37 ^a	0.36±0.10
LDP	6	1.31±0.27	0.41±0.06	0.08±0.01	5.89±0.95	1.88±0.16 ^a	0.39±0.07
HDP	4	1.57±0.28	0.43±0.07	0.08±0.01	6.96±1.35	1.90±0.25 ^a	0.35±0.04

1. Values are mean ± SD.

2. Values in the same column with different superscript letters are significantly different at p<0.05.

表二、灌食兒茶素製品之小鼠，其血液、肝臟的 GPT 及 GOT 活性測定。

Treatment	n	Liver(550nm)		Serum(550nm)	
		GPT	GOT	GPT	GOT
CK	6	1.01± 0.52 ^{b1,2}	1.21± 0.16 ^c	0.23± 0.12	0.24± 0.11
LDM	5	1.23± 0.28 ^b	1.21± 0.39 ^c	0.36± 0.26	0.36± 0.26
HDM	5	1.79± 0.63 ^{ab}	2.30± 0.5 ^{ab}	0.19± 0.01	0.20± 0.08
LDP	6	2.13± 0.70 ^a	2.72± 1.00 ^a	0.20± 0.07	0.20± 0.08
HDP	4	1.48± 0.43 ^{ab}	1.71± 0.30 ^{bc}	0.19± 0.03	0.20± 0.04

1. Values are mean ± SD.

2. Values in the same column with different superscript letters are significantly different at p<0.05.

表三、灌食兒茶素製品之小鼠，其血液、肝臟的抗氧化活性測定。

Treatment	n	Liver		Serum
		ABTS(conc/g)	ABTS(total)	ABTS(conc/c.c)
CK	6	18.42±9.3 ^{b1,2}	27.45±14.46 ^b	1940.03±195.70 ^{ab}
HDM	5	41.27±18.75 ^a	42.37±10.37 ^a	2697.50±109.69 ^a
LDM	5	10.72±5.26 ^b	15.20±7.08 ^b	1628.60±150.96 ^b
HDP	4	11.35±11.28 ^b	18.25±19.33 ^b	1539.29±180.12 ^b
LDP	6	12.20±5.75 ^b	15.23±8.20	1593.00±179.59 ^b

1. Values are mean ± SD.

2. Values in the same column with different superscript letters are significantly different at p<0.05.