

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

中醫藥對肝再生能力之影響(3/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2320-B-039-004-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：中國醫藥大學學士後中醫系

計畫主持人：蔡金川

計畫參與人員：蔡金川,梁秀蓮,黃志揚,江俊緯,吳嘉平,武執中,李婷婷

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 10 月 31 日

中醫藥對肝再生能力之影響(3/3)

(93-2320-B-039-004-)

中文摘要:

將大白鼠肝臟利用 Thioacetamide 造成肝臟的損傷，再運用四種中草藥(包括:丹參、黨參、高氏柴胡、丁豎朽)及做為正控制組的 silymarin, 研究其損傷之後的肝臟在 1 天、3 天及 7 天之肝臟再生之作用機轉。並從增生訊息途徑之增生因子 HGF 及其下游之因子 FAK、Cyclin D、Cyclin E、Rb 之蛋白質表現量觀察其對肝臟增生作用的調控。從結果中我們發現，四種中藥在經 thioacetamide 誘毒後的肝臟再生情形中，會造成不同的時間對 HGF 增生途徑因而有所不同。在肝臟再生 1 天時，丹參對 HGF 途徑之誘導最大。然而，在 3 天及 7 天之肝臟增生中則以高氏柴胡對 HGF 途徑之促進為最大。

前言:

HGF 即為 scatter factor 主要扮演著肝臟增生(liver regeneration)角色(1)，在生物生長過程中主要調控胚胎生長、組織增生、癌細胞生長及管質增生等方面，另外透過 Receptor 能夠調節 Cell proliferation、survival、motility 及 morphogenesis(2)。肝細胞增生因子 HGF(Hepatocyte growth factor)為一個雙硫鍵結的 heterodimer, 是由 69 kDa 的 α -chain 及 34kDa 的 β -chain 所組成，而 α -chain 則為具有一個 hairpin domain 的 N 端； β -chain 則為具有四個 Kringle domains 的 Serine

protease(3,4)。同時 HGF 大多位於 Kidney, mammary gland, lung and tooth 等基質組織中(stromal tissue)並且具有增生及再生的作用。HGF 是一種具有生物活性的 growth factor, 以誘導細胞進行 survival, migration, proliferation 及 tubulogenesis。HGF 和其 receptor(c-met) 結合在各種組織中以 autocrine 及 paracrine 的作用，促使細胞的 mitogenic, motogenic, 及 morphogenic。HGF 是透過 c-met、FAK 之相關分子訊息途徑，進入 Cell cycle 中以促使肝細胞增生活化 Rb 及 E2F 來促進細胞的增生。

FAK 為細胞 Cell adhesion、migration、survival、及 proliferation 之訊息中間調節者(5)並且調節 cell cycle(6)。其中 Overexpression FAK 加速 Cyclin D1 的 Transcriptional Activation 用於細胞循環中之 G1 到 S 期的調節(7,8)。G1 到 S 期受到 Cyclin D、Cyclin E、Cyclin A 之調節。在早期之 G1 期，Cyclin D 結合 cdk4/6; 在晚期之 G1 期，Cyclin E 結合 cdk2; Cyclin A 則結合 cdk2 以調節早期之 S 期。之後再經由 Rb、E2F 等之 Transcription factors 調節基因現及 DNA 的合成(9)。

實驗材料:

動物品系: Wistar 品系雄性大白鼠 (Wistar Albino Rats)

動物來源: 國科會實驗動物中心

動物週齡:4~6 週，體重約在 180~220 克間。

飼養方式:空調房間、溫度維持在 $22 \pm 5^{\circ}\text{C}$ ，半日照環境，一隻一籠分籠飼養，自由引水及飼養標準飼料。

(B) 中草藥材

委託中國醫藥學院附設醫院中藥局主任張永勳博士收集並鑑定基源

益氣藥：黨參 (*Codonopsis pilosula* (Franch) Nannf, Complanulaceae)

活血藥：丹參 (*Salvia miltorrhiza* Bunge, Labiatae)

和解藥：高氏柴胡 (*Bupleurum kaoi*, Umbelliferae)

清熱藥：丁豎朽 (*Elephantopus scaber* L., Compositae)

水抽出物之製備：稱重，加水煮沸 1 小時，趁熱過濾兩次，得濾液，真空減壓濃縮，得濃縮液。濃縮液進行冷凍乾燥得乾燥粉末，秤重，並計算產率(yield)。

實驗方法與步驟：

1. 動物

將動物隨機分為 6 組，分別為：控制組、益氣組、活血組、和解組、清熱組以及西藥對照組。除控制組外，經由腹腔注射投予 Thioacetamide 100mg/kg 連續 14 天，並在初次投藥後第 8 天，開始連續口服中藥及西藥對照。第 15 日開始執行部分肝切除手術，並在術後 1、3、7 天犧牲取內臟以供後續實驗。

2. 組織研磨萃取：

將肝臟組織(0.1g)以 PBS 清洗後，以 1 ml 之 PBS Buffer 均質。接以 12,000rpm 離心 30 分鐘，取上清液。

3. 西方墨點分析 (Western Blotting Analyses)

取 20ug 的肝臟蛋白萃取液，加入適量的 PBS (0.14M NaCl, 3mM KCl, 1.4mM KH_2PO_4 、 $6\text{H}_2\text{O}$, 14mM K_2HPO_4) 及 4ul 的 dye，在 95°C 下作用 10 分鐘使蛋白變性。然後將蛋白樣品以 12% polyacrylamide gel 以 110 伏特，進行蛋白電泳 90 分鐘。電泳完成後，將凝膠平鋪在以 transfer buffer (24.7mM Tris-base, 192mM glycine 以及 20% methanol, 最後補 ddH₂O 到 1L, PH 8.3 ~ 8.4) 潤濕的濾紙，蓋上 PVDF membrane 之後，蓋上一層濾紙，放入 transfer tank 之中，以 150mA 電流，transfer 2 個小時。然後將 PVDF membrane 取出，依照各種不同分子量抗體位置，剪成一小長條狀，在放入含有 0.1% Tween 20 的 5% 脫脂牛奶中，blocking 一個小時之後，將 membrane 取出放入密封袋中，加入 2ml 含有 0.1% Tween 20 的 5% 脫脂牛奶，及一次抗體，包含： α -tubulin, HGF, FAK, Cyclin D1, Cyclin E, Rb 等一級抗體(Santa Cruz Biotechnology) 置於 4°C 冰箱中，反應 24 小時。取出 membrane 以 TBS+Tween 20 wash 三次，每次 5 分鐘。

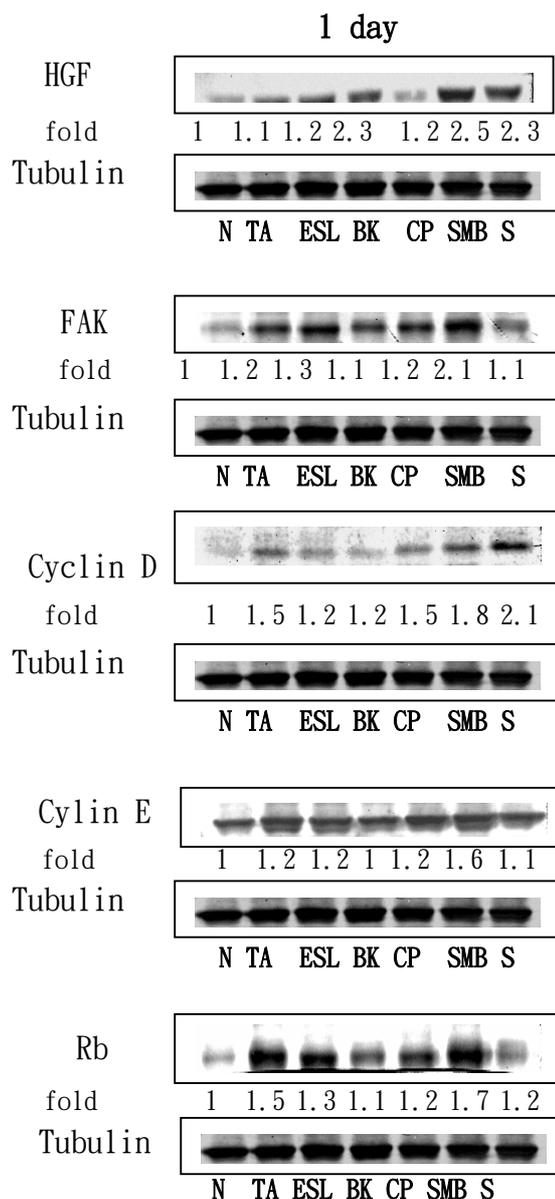
之後，再將 membrane 取出放入新的密封袋中，加入含有 0.1% Tween 20 的 5% 脫脂牛奶 2ml 及二次抗體，包含：anti-rabbit IgG, anti-mouse IgG, anti-goat IgG，在室溫中，反應 2 個小時。重覆 wash 步驟，最後加入 7.5ml 的 substrate buffer (76.8mM Tris-HCl, 1M NaCl, 5mM MgCl_2 、 $6\text{H}_2\text{O}$)，2.5ul H_2O_2 及 500ul DAB

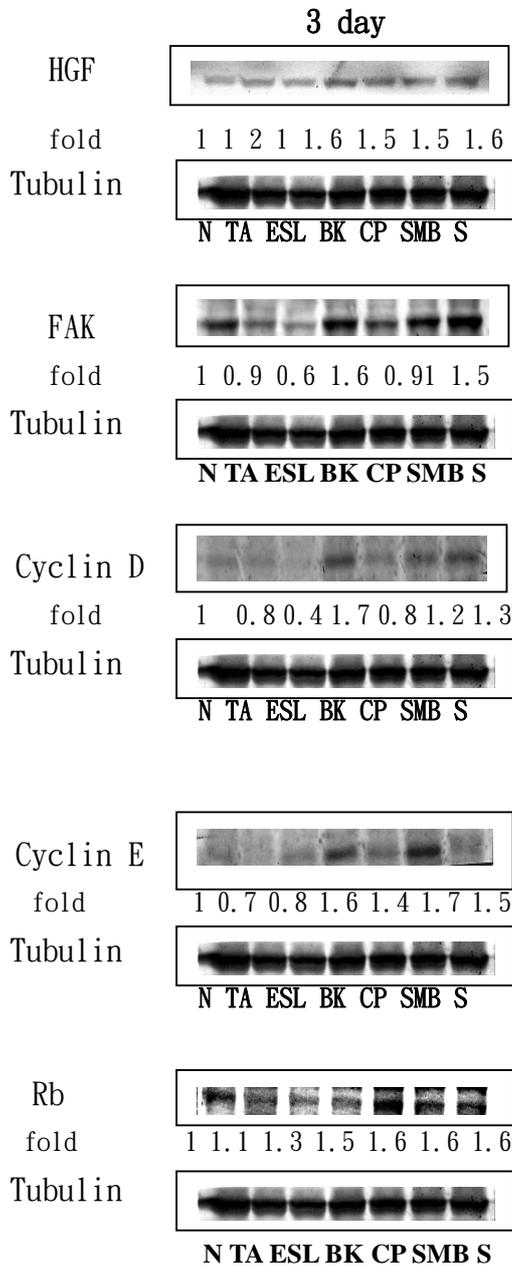
(3,3'-diaminobenzidine)染色約5分鐘。觀察結果並做相對密度測量(relative density measurement)。

結果:

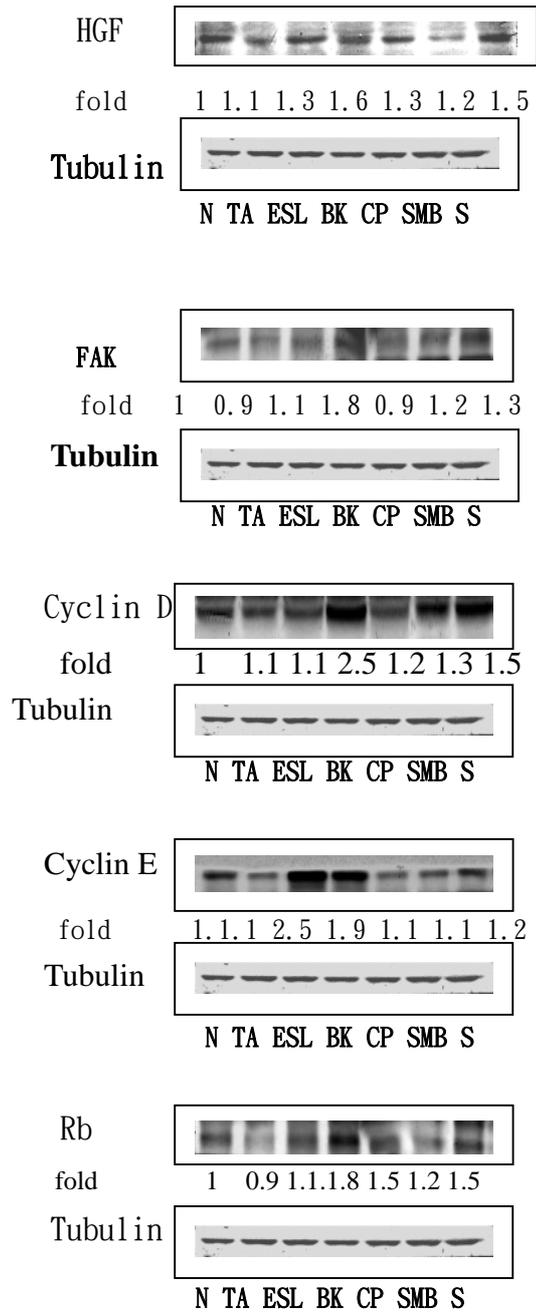
大白鼠經由餵以 Thioacetamide 之後，會造成肝臟的慢性損傷。而本研究投予中草藥並觀察肝臟誘導增生與中草藥之間的相關性，主要探討增生因子 HGF 的相關訊息途徑。從短時間的實驗中做觀察，中草藥丹參能誘導並且促進 HGF 之蛋白質表現量之增加。同時，其下游之相關訊息因子蛋白，FAK 則對黨參、高氏柴胡、丁豎朽等中草藥均具有相當的蛋白表現。然而丹參對 FAK 之促進並無相當顯著的表現。但 FAK 所誘導之下游蛋白 Cyclin D、Rb 均有增加的趨勢。另外，丹參對 Cyclin E 之蛋白誘導並無相當顯著的表現。因此，更進一步的觀察肝臟再生 1 天後，發現丹參對 HGF 之蛋白呈現量則有增加的趨勢。而下游之相關蛋白 FAK、Cyclin D、Cyclin E、Rb 之蛋白質表現量均有增加。相同的，更進一步的觀察，以 thioacetamide 使肝臟受損後，經過肝臟的 3 天再生，觀察增生因子途徑之蛋白質表現量。從結果中得知，HGF 之蛋白質表現量以高氏柴胡為最高。其下游之蛋白質因子 FAK、Cyclin D、Cyclin E、Rb 均有增加的現象。然而，Cyclin E 則以丹參對其蛋白質呈現量為最高。Rb 方面，則以黨參之蛋白質之表現量為最高。但高氏柴胡對 Rb 蛋白質之誘導與對照組之比較亦有增加的現象。然而，在長期的 7 天肝臟增生中，高氏柴胡對其增生因子 HGF 及其下游之相關訊息因子 FAK、Cyclin D、Cyclin E、

Rb 均能促進其蛋白質量的增加。相同的，正對照組 silymarin 亦有相對的增加。





7 day



討論:

大白鼠利用 thioactamide 造成肝臟損傷後，再餵以中草藥丹參、黨參、高氏柴胡、丁豎朽等中草藥。觀察四種中草藥對肝臟再生之功效，及其所透過的作用機制。從對增生因子(HGF)的誘導及促進作用中，在最初期的1天丹參能促進HGF的蛋白質表現。而其下游之FAK因其他機制的互相調控，如MEK、ERK2等MAPK之調節而影響。然而，透過FAK所調節之細胞循環

(Cell cycle)調控因子 Cyclin D 則亦為丹參所誘導之蛋白表現量為最高。Cyclin D 為結合 cdk4/6 調節早期的 G1 期，Cyclin E 則結合 cdk2 調控晚期之 G1 期。因此，丹參在晚期之 G1 則並無顯著的作用。但是丹參在 Rb 的蛋白質表現中亦有促進的作用。然而，在肝臟增生 3 天時，丹參之作用機制轉為次要，則其高氏柴胡對 HGF 的蛋白誘導已有增加的趨勢。而丹參此時則對 Cyclin E 之誘導具有相當高的蛋白質表現量。此時丹參對肝臟之再生作用則為 G1 晚期所調節。但抑癌因子 Rb 之蛋白質表現量則以黨參為最，丹參次之。所以，我們更進一步的觀察在長時間的七天肝臟再生中，肝臟促進再生的作用機制與 HGF 的相關性。從結果中得知，在七天的肝臟增生中，高氏柴胡能夠誘導 HGF 及其下游的 FAK、Cyclin D、Rb 之蛋白質表現量。已與三天之肝臟再生相同。然而，丁豎朽對 G1 晚期的 Cyclin E 之蛋白質量則在肝臟再生七天時亦有顯著的增加。因此，中草藥對肝臟再生之作用因作用在不同之細胞循環週期而有不同作用功效。

參考文獻：

1. Mars WM, Liu ML, Kitson RP, Goldfarb RH, Gabauer MK, Michalopoulos GK. (1995) *Immediate early detection of urokinase receptor after partial hepatectomy and its implications for initiation of liver regeneration*. Hepatology. 21(6); 1695-701.
2. Tatyana Merkulova-Rainon, Patrick England, Shunli Ding, Corinne Demerens, and Gerard Tobelem. (2003) *The N-terminal Domain of Hepatocyte Growth Gactor Inhibits the Angiogenic Behavior of Endothelial Cell Independently from Binding to the c-met Receptor*. The Journal of Biological Chemistry. Vol 278, No 39, 37400-37408.
3. Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmiecik TE, Vande Woude GF and Aaronson SA. (1991) *Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product*. Science 251, 802-804.
4. Naldini L, Weidner KM, Vigna E, Gaudino G, Bardelli A, Ponzetto C, Narsimhan RP, Hartmann G, Zarnegar R, Michalopoulos GK, Birchmeier W and Comoglio PM. (1991) *Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor*. EMBO J 10, 2867-2878.
5. Zhao J, Bian ZC, Yee K, Chen BP, Chien S, Guan JI. (2003) *Identification of transcription factor KLF8 as a downstream target of focal adhesion kinase in its regulation of cyclin D1 and cell cycle progression*. Mol Cell, 11(6), 1503-15.
6. Ji-He Zhao, Heinz Reiske, and Jun-Lin Guan. (1998) *Regulation*

- of the cell cycle by Focal Adhesion Kinase.* The Journal of cell Biology, volume 143, Number 7, 1997–2008.
7. Heinz R, Reiske, JiHe Zhao, Dong Cho Han, Lee Ann Cooper, Jun-Lin Guan. (2000) *Analysis of FAK-associated signaling pathway in the regulation of cell cycle progression.* FEBS Letters, 486, 275–280.
 8. Jihe Zhao, Richard Pestell, and Jun-Lin Guan. (2001) *Transcriptional Activation of Cyclin D1 Promoter by FAK Contributes to Cell Cycle Progression.* Molecular Biology of the Cell, Vol 12, 4066–4077.
 9. Lukas ER, Bartley SM, Graveel CR, Diaz ZM, Dyson N, Harlow E, Yamasaki L, Farnham PJ. (1999) *No effect of loss of E2F1 on liver regeneration or hepatocarcinogenesis in C57BL/6J or C3H/HeJ mice.* Mol Carcinog. 25(4), 295–303.