

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

## 中醫藥對肝再生能力之影響(2/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2320-B-039-014-

執行期間：92年08月01日至93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：林俊清, 陳悅生, 黃志揚, 梁秀蓮, 吳嘉平, 蘇啟成

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 5 月 31 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫期中成果報告

## 中草藥對肝再生能力之影響

計畫類別： 個別型計畫          整合型計畫

計畫編號：NSC 92-2320-039-014

執行期間：92 年 08 月 01 日至 93 年 07 月 31 日

計畫主持人：蔡金川 副教授

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：中國醫藥大學 學士後中醫學系

中 華 民 國 93 年 5 月 31 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## Preparation of NSC Project Reports

計畫編號：NSC92-2320-039-014

執行期限：92年08月01日至93年07月31日

主持人：蔡金川 副教授

計畫參與人員：林俊清, 陳悅生, 黃志揚, 吳嘉平, 梁秀蓮, 蘇啟

成

### 一、中文摘要:

肝病是國人常見的疾病，其相關病變：慢性肝炎、肝硬化、肝癌久為台灣地區十大死亡原因之一。在其病變當中，包括化學性及生物性之傷害，肝細胞的再生扮演著重要功能修復角色且在肝硬化、肝癌病變或其他腫瘤移轉，需進行手術切除、或則肝臟移植後，此時肝細胞之再生絕對重要且必要。為研究中草藥在肝細胞再生階段中所扮演之角色，並探討中醫學理之實質，進而開發中草藥之醫療願景，而進行本實驗。本研究以：益氣中藥-「黨參」、活血中藥-「丹參」、清熱民間藥-「丁豎朽」、本土產和解藥-「高氏柴胡」，進行對肝再生能力之評估，以及作用機制之探討。現代醫學試圖對此有所突破，因此具有多方面的嘗試及探討被提出，包括：Glutamine、Vit D<sub>3</sub>、酒精對肝切除後再生的影響，甚至碳水化合物、脂肪、胺基酸的營養調控也被研究。我們的探討將包括：存活率、肝重的改變率(再生肝重量/原本起始肝重量)。並同時探討(1)肝細胞增生之相關分子訊息途徑，含 HGF-c-MET-Cell cycle factors 及 TGF-EGFR-MEK-ERK 途徑，並同時分析細胞生存增生途徑，IGFs-IGFIR-Akt-Bcl 2 等分子訊息途徑。(2)及結痂 (scar) 途徑，FGF-2-UPA-MMPs。(3)促結痂及纖維化途徑，TGF s-TGFR-Smads。(4)並將偵測增生/纖維化 markers, -SMG 及 procollagen

之變化。期望藉肝切除 3 天及 7 天 models, 比較出(1)快速促肝生長之中草藥及較晚期

作用之中草藥。(2)探討具療效之不同中草藥，其所透過之不同及共同分子訊息途徑。將採用(1)dot-blotting 及 RTPCR 分析 mRNA level 之變化(2)Western blotting 分析 protein 含量及活性之改變。

### 二、前言:

肝病是國人常見的疾病，其相關病變：慢性肝炎、肝硬化、肝癌久為台灣地區十大死亡原因之一。在其病變當中，包括化學性及生物性之傷害，肝細胞的再生變演著重要修復工作。尤其是在肝硬化、肝癌變或其他腫瘤移轉，手術切除、或則肝臟移植是必要的，在此階段肝細胞之再生更凸顯重要。

為研究中醫藥是否再肝細胞再生之階段中所扮演之角色，並探討中醫學理之實質，進而開發中草藥之醫療願景，而進行本實驗。此研究以：益氣中藥-「黨參」、活血中藥-「丹參」、清熱民間藥-「丁豎朽」、本土產和解藥-「高氏柴胡」，進行對肝再生能力之作用，以及作用機制之探討。現代醫學試圖對此有所突破，因此具有多方面的嘗試及探討被提出，包括：Glutamine、Vit D<sub>3</sub>、酒精對肝切除後再生的影響，甚至碳水化合物、脂肪、胺基酸的營養調控也被研究。其探討包括：存活率、肝重的改變率(再生肝重量/原本起始

肝重量)、肝臟再生之特殊基因表現(包含:HGF, c-met, TGF- $\beta$ , cyclin D1, cyclin A, procollagen, TGF- $\beta$  1 等), 以觀察細胞週期進入 S phase 表現情形。

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  $\alpha$ -chain 及 34kDa 的  $\beta$ -chain 所組成, 而  $\alpha$ -chain 則為具有一個 hairpin domain 的 N 端;  $\beta$ -chain 則為具有四個 Kringle domains 的 Serine protease。同時 HGF 大多位於 Kidney, mammary gland, lung and tooth 等基質組織(stromal tissue)中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 促使肝細胞增生是透過 c-met 之相關分子訊息途徑, 進入 Cell cycle 中活化 Rb 及 E2F 並促進細胞的增生。而增生的另一途徑 IGF-1 主要在肝臟中製造分泌可行 Endocrine 及在部分組織中, 可自行分泌行 Paracrine 和 Autocrine, 對細胞造成影響。Insulin-like growth factors I 於 1960 年代被發現, 且已被證實 IGFs 能調節 Growth、Development、Cell survival 和 Tissue differentiation 的發生 (72,73)。IGF-I 是一 70 Amino acid 的 Single-chain basic protein (74); 而 IGF-I 主要是透過 IGF-IR 造成 Cellular actions, 而 IGF-I receptor (IGF-IR) 為一 Tyrosine kinase receptor, 是一個 Heterotrimeric glycoprotein, 由兩個 706 胺基酸的  $\alpha$ -subunits 和兩個 627 胺基酸的  $\beta$ -subunit 行成一個四聚體(78), 而  $\alpha$ -subunits 為 Ligand 結全的區域, 而 Ligand 主要結全在  $\beta$ -subunits extracellular domain 的

Cystein-rich 的區域, 並活化 Cytoplasmic  $\beta$ -domain 上的 Tyrosine kinase (78)。而  $\beta$ -subunit 為 Transmembrane 的 protein。 $\alpha$ -subunits 和  $\beta$ -subunit 之間以 Disulfide 相連接(78)。IGF-IR 的基因在人類 Chromosome 15q25-q26(79)。當 IGF-I 結合在 IGF-IR 後會活化 Insulin receptor substrate 1(IRS), 其下游路徑包括: IRS、Akt、Bcl 2 等分子訊息途徑。

未開發有潛力中藥及本土性中草藥, 本實驗將現代外科與中醫結合, 探討中醫藥之療效與作用機轉, 以期對中醫藥作深入之探討。將來更可提供一個良好的模式來篩選及開發有效之中藥。

### 三、研究方法:

#### 1、組織研磨液的製備:

肝臟先以 ddH<sub>2</sub>O 清洗之後, 再以每 100mg 組織 1ml 的 PBS ( 0.14M NaCl, 3mM KCl, 1.4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 14mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ) 研磨。以均質機 ( KNEMATICA, PT2100, 瑞士 ) 研磨約 5 分鐘。研磨液在冰上靜置 10 分鐘之後, 以 12,000rpm 離心 30 分鐘, 取上清液並且放置在 -20 冰箱中備用。

#### 2、肝臟組織中蛋白定量分析:

以蛋白標準品 bovin serum albumin (BSA) 在紫外線光譜儀波長 595 nm 所測得的標準曲線來計算肝臟組織中蛋白質的濃度(如下表)。將肝臟蛋白樣品稀釋 10 倍後加入 1ml 1:5 稀釋的 Bradford protein assay reagent 充分混合均勻, 以紫外線光譜儀在波長 595 nm 測定其吸光值, 利用此標準曲線來計算肝臟組織中蛋白質的濃度。

	blank	1	2	3	4	5	6	7	8
BSA(ul)	0	4	8	12	16	20	24	28	32
濃度	0	1.6	3.2	4.8	6.4	8	9.6		12.8

0.4mg/ul)									11.2	
DdH <sub>2</sub> O	200								172	168
		196	192	188	184	180	176			
DdH <sub>2</sub> O	500									
PBS	100									
Dye	200									

### 3、西方墨點分析 ( Western Blotting Analyses )

取 40ug 的肝臟蛋白萃取液,加入適量的 PBS ( 0.14M NaCl, 3mM KCl, 1.4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6H<sub>2</sub>O, 14mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> )及 4ul 的 dye,在 95 °C 下作用 10 分鐘使蛋白質變性,然後將蛋白樣品以 1.2 % polyacrylamide gel ( 附圖 二 )以 110 伏特,進行蛋白電泳 90 分鐘。電泳完成後,將凝膠平舖在以 transfer

buffer ( 24.7mM Tris-base,192mM glycine 及 20 % methanol ,最後補 ddH<sub>2</sub>O 到 1L,PH 8.3

~

8.4 )潤濕的濾紙,蓋上 PVDF membrane 之後,再蓋上一層濾紙,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: IGF-I ( Santa Cruz Biotechnology,1:500 ), IGF-IR( Upstate biotechnology,1:500 ), bcl-2

( Transduction Laboratories,1:500 ),

$\alpha$ -tubulin ( Neo Markers,1:500 )。 HGF

( Santa Cruz Biotechnology,1:500 ), UPA

( Santa Cruz Biotechnology,1:500 ), PAI-I

( Santa Cruz Biotechnology,1:500 ), FAK

( Santa Cruz Biotechnology,1:500 ), Rb

( Santa Cruz Biotechnology,1:500 )。

在 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

(Antibodies Incorporated,1:1000) , anti-mouse IgG( Antibodies Incorporated,1:1000 ) , anti-

goat IgG ( Antibodies Incorporated, 1:1000 ) , 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<sub>2</sub>,

6H<sub>2</sub>O ) , 2.5ul H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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)。

4、18srRNA , IGF-I , IGF-R , COXvb 探針 (prob)之製備:

a. 大腸桿菌的培養: 將 LB(Luria-Bertani)medium 加入 15g 的 agar 之後,再加 ddH<sub>2</sub>O 到 1L。並在 121 °C 下 autoclave 50 分鐘,待稍微冷卻之後,再加入 1ml 的 ampicilim 稍微混勻之後再將 agarose medium 緩緩地倒入培養皿中,靜置使其慢慢冷卻,製作成 plate。凝固後的 plate 再將 clone 有 pGEMI-IGFI DNA 及 COX vb DNA 的 E coli ,劃到 plate 上,並在 37 °C 的 oven 中培養 24 小時。再將培養出來的 E coli 菌株,從其中挑出一小菌株在 10ml 的 LB medium 中,培養另 24 小時

b.取 DNA plasmid : 取 1~5 ml E coli LB(Luria-Bertani) medium ,在 3,000rpm 下離心 5 分鐘,倒掉上清液。再將剩餘沉澱下來的 E coli ,以 QIAprep Spin Miniprep kit

萃取，首先加入 250ul 的 buffer P1，使其溶解之後再將其置換到 1.5ml 的 eppendorf 中。加入 250ul 的 buffer P2，上、下 invert 4 到 6 次之後，再加入 350ul 的 buffer N3，並且再上、下 invert 4 到 6 次之後，以 12,000rpm 離心 10 分鐘。將其上清液倒入 QIA prep column 之中，離心 30 秒，再加入 0.5ml 的 buffer PB，離心 30 秒，再加入 0.75ml 的 buffer PE wash 並離心 1 分鐘。再加入 50ul 的 ddH<sub>2</sub>O 使其 DNA 溶解出來。儲藏於-70。

c.環形 DNA 切割成線形 DNA：將抽出的 DNA 取 2ul，加 98ul 的 ddH<sub>2</sub>O 稀釋 50 倍，測吸光度(OD<sub>260</sub>)值。IGF-I (OD<sub>260</sub>值), COX(OD<sub>260</sub>值)再利用公式  $OD_{260} \times 50 \times$ 稀釋倍數 50，計算出 IGF-I DNA 濃度 (ng/ul)，COX DNA 濃度(ng/ul)，IGF-R 濃度(ng/ul)，18sRNA 濃度(ng/ul)。取 DNA 16ul(約 2~3ug)，10×React 3 10ul，(10 ug/ul) Bam H1 3ul，ddH<sub>2</sub>O 70ul，在 37 下，培養 5 個小時。

d.DNA 純化：取 200ul 的 phenol 及 chloroform 以 1:1 等比例混合，再取 100ul 的線形 DNA 在 37 下，培養 5 分鐘之後再與混合後的 phenol-chloroform 以等量混合之後，再離心 1 分鐘。取上清液，重覆上一步驟 3 次。將上清液 100ul 的 DNA 補 ddH<sub>2</sub>O 到 200ul。加入 20ul 的 Na acetate (3M,PH5.2)，500ul 的 100% EtOH，培養在-20 下，24 小時。取出後，在 4 下，以 12,000rpm 離心 15 分鐘，倒掉上清液。加入 70% 酒精 spin 幾次之後，在 8,000rpm 下離心 5 分鐘，重覆上步驟。倒掉上清液，讓白色沉澱物自然乾燥。再加入 20ul 的 ddH<sub>2</sub>O 將 DNA 溶解出來。

e. 轉錄 (Transcription):DNA template

(COXvb, IGF-I, IGF-R, 18srRNA)，10× DIG RNA labeling buffer, 10×transcription buffer, Rnase Inhibitor, T7 RNA polymerase 及 DEPC H<sub>2</sub>O。在 37 下，培養 5 小時。之後，加入 2ul 的 EDTA (0.2M,PH8.0) 以停止反應的繼續進行，再加入 2ul 的 DNAase I Rnase free，然後在 37 下，培養 15 分鐘。再加入 20ul 的 Na acetate (3M,PH5.2)，500ul 的 100% 乙醇，在-70 下反應 24 小時。取出後在 37 下 incubate 5 分鐘，再以 12,000 rpm 離心 15 分鐘，倒掉上清液，以 70% 的酒精 wash 2 次，自然乾燥後，再加入 50ul 的 DEPC H<sub>2</sub>O，將 RNA 溶出，儲藏在-70 中。

#### 5、RNA 的萃取:

0.1g 的左心室組織蛋白，加入 1ml 的 Ultraspec RNA reagent (BIOTECX,USA)，在 4 下以均質 (KINEMATICA,SWITZERLAND)均質 5 分鐘再置換 eppendorf 之中，加入 0.2ml 的 chloroform 上、下搖晃 15 秒鐘。使上層的組織萃取液與下層的 chloroform 均勻混合。並放置在 4 冰上 5 分鐘。於 12,000 rpm，離心 15 分鐘，取上層澄清透明液。再加入等量的 isopropanol 並靜置在 4 冰上，十分鐘。再於 12,000rpm 4 下，離心十分鐘。倒掉上清液，便可以看到底部殘留的白色沉澱物。加入 75% 的酒精，washing 沉澱物再以 12,000rpm 離心 4 分鐘，倒掉上清液。重覆以上 wash 的步驟。將上清液倒掉之後，再將 eppendorf 倒放等它晾乾。但不要過度乾燥。之後，再溶解於 50ul 的 DEPC H<sub>2</sub>O 中，於 60 下，靜置十分鐘，再測其 RNA 濃度。濃度的測量乃取 5ul 的 RNA 到 eppendorf 中，再

加入 995ul 的 ddH<sub>2</sub>O 稀釋成 200 倍後，測 OD<sub>260</sub> 吸光值。並以公式  $OD_{260} \times 40(\text{ug/ml}) \times \text{稀釋倍數}(200)$ ，計算出 RNA 濃度。

#### 6、RNA hybridization and detection :

將萃取出來的 RNA sample 加入適量的 denature buffer (formamide, 37 % formaldehyde

, 10×MOPS) 稀釋到濃度為 80 ng/ul, 並在 65

下培養 15 分鐘。取 3ul (240ng) 稀釋過的 RNA sample 點到 nylon membrane (

boehringer mannheim, USA) 上，以 pump sucking 5 分鐘之後再將 membrane 放入 80

的 oven 之中培養 10 分鐘，將 nylon membran 反置，使 sample 面向光源再以 UV

transilluminator ( VILBER, Lourmat ) cross linking 5 分鐘，讓 sample RNA 能夠完全固定在 membrane 上。將 membrane 放入塑膠

膜袋之中，加入 3 到 5ml prehybridization buffer [ 50 % formamide ( sigma, USA ) , 5×

SSC ( 3M NaCl, 0.3M sodium citrate, PH 7.0, sigma, USA ) , 2 % blocking reagent ( sigma, USA ) , 0.1 % N-lavroyl sarcosine ( sigma, USA ) , 0.02 % SDS ( sigma, USA ) ] 到

塑膠膜袋之中，密封之後放入 68 的 oven 之中培養 70 分鐘之後。取出 membrane 放入另一個塑膠膜袋之中，加入 hybridization

buffer [ prehybridization+RNA probe ( IGF-I ( 800 ng/ml ) / COX vb ( 800 ng/ml ) / 18sRNA ( 150 ng/ml ) / IGF-1R ( 800 ng/ml ) ) 密封之後，在 68 之中，反應 24 小時。取出

membrane 之後，以 2×Washing solution [ 2×SSC ( 3M NaCl , 0.3M sodium citrate ) , 0.1 % SDS ] wash 7.5 分鐘，再以 0.5×Washing

solution [ 0.5×SSC ( 3M NaCl, 0.3M sodium citrate ) , 0.1 % SDS ] 20 分鐘。之後，再以 0.1

% ×Washing solution [ 0.1 % ×SSC ( 3M NaCl, 0.3M sodium citrate ) , 0.1 % SDS ] wash 20 分鐘，最後再以 rinse buffer [ buffer

I ( 0.1M Maelic acide, 0.15M NaCl, PH

7.5 ) + 0.3 % Tween 20 ] wash 2 分鐘。wash 之後再加入 buffer II ( buffer I + blocking stock solution ) blocking 60 分鐘，使 membraner

上附上一層薄薄的 blocking reagen，再加入 2ul Ab ( anti-DIG Ab conjugated AP, Roch, USA ) , 20ml buffer II ( buffer I+blocking stock solution ) 為 buffer，在室溫中反應 60 分鐘，以 rinse buffer ( buffer I+0.3

% Tween 20) wash 20 分鐘，2 次，再加入 buffer III ( 0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub> , PH 9.5 ) 反應 25 分鐘，以平衡 PH 值。將 membrane 取出後將 membrane 放入

密封袋之中

，加入 5ml 的 buffer III，50ul 的 CDP-star ( BOEHRINGER MANNHEIM )，密封

。反應 5 分鐘。取出 membrane 進行晾乾之後，以底片 ( BOEHRINGER MANNHEIM, USA ) 壓片及以 densitometer ( KODA, USA ) 相對密度測量 ( relative density measurement )。

7、primer ( 引子 ) 設計：

首先進入 NCBI ( [http : //www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) ) 網站，並在網頁上的 search 處選擇 Nucleotide；接著再 for 後

鍵入所要搜尋的 mRNA 之字串及屬性 ( 例如 : BNIP3 mRNA and rat )，接著按 “ go ”，然後盡量選擇句尾含 “ complete cds. ” 例如 Rat Bcl2 E1B 19 kDa/ Bcl2 interacting

protein-3 mRNA 的 mRNA 序列；將 mRNA 序列的起始至終止密碼複製。下一步進入 NTHU Bioinformatics Center 選擇 “ link ”，接著進入 “ The Biology WorkBench ”，點選 “ Enter the Biology WorkBench 3.2 ”，輸入各人密碼；再點選 “ Nucleic Tools ”，接著選擇 Add New Nucleic Sequence，貼在 NCBI 所複製的 mRNA 序列並輸入名稱及儲存，接著點選

量 ( relative density measurement )。

量 ( relative density measurement )。

量 ( relative density measurement )。

量 ( relative density measurement )。

量 ( relative density measurement )。

量 ( relative density measurement )。

量 ( relative density measurement )。

量 ( relative density measurement )。

量 ( relative density measurement )。

量 ( relative density measurement )。

量 ( relative density measurement )。

量 ( relative density measurement )。

量 ( relative density measurement )。

量 ( relative density measurement )。

量 ( relative density measurement )。

primer 3 進行設計，輸入所需條件：產物長度範圍（400-600 bp），primer（20-30 個鹼基），黏合溫度（50-60 °C），GC 含量（50-60 %）；最後，將所設計的 5' 及 3' primer 到 NCBI 中的 BLAST 進行比對確認，即可將 primer 序列送出訂購。

#### 8. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Reverse Transcriptase Reaction :

RT (reverse transcriptase) : 取 4 ug 的 RNA 加入 DEPC-H<sub>2</sub>O 17.75  $\mu$ l，以 70 °C 處理 5 分鐘。加入 0.25  $\mu$ l RNase inhibitor (Promega ; 40 U/ $\mu$ l)，10  $\mu$ l 5X RT buffer (Promega ; 50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub> 和 10 mM DTT) 以及 4  $\mu$ l dNTP (Promega ; 2.5 mM)，和 5  $\mu$ l Oligo dT 後，於溫度循環機處理 42 °C，5 分鐘後加入 RT 酵素 (Promega) 1  $\mu$ l，繼續在 42 °C 反應，1 小時之後再以 99 °C 作用 5 分鐘後以 4 °C 保存。

#### 9. 聚合酵素連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction) :

取 10  $\mu$ l cDNA 加入 39  $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O，加入 5  $\mu$ l forward primer 和 5  $\mu$ l reverse primer，再加入 5  $\mu$ l dNTP (10 mM) 以及 5  $\mu$ l 10X PCR buffer (DyNa ; 10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl 和 0.1% Triton X-100)，和加入 1  $\mu$ l DNA polymerase (DyNa, 2U/ $\mu$ l) 於溫度循環機前處理 94 °C，5 分鐘後再進入第 1 個循環處理 94 °C 1 分鐘，annealing 溫度 1 分鐘，並於 72 °C 反應 2 分鐘，此循環次數 30 cycle，最後再處理 72 °C 反應 20 分鐘，4 °C 保存。

加入 DNA marker 和取 10  $\mu$ l 的 PCR

產物加入 2  $\mu$ l 的 6 倍 loading dye，加到電泳膠片。電壓 100 V，跑電泳膠片 30 分鐘，於 UV 光下對照 DNA marker 位置，檢查所要的位置是否有所表現。

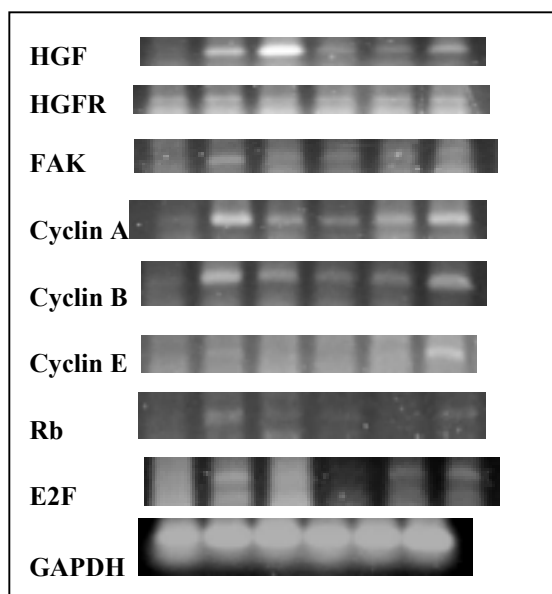
#### 四、研究結果:

##### (1) 肝細胞增生相關分子訊息途徑:

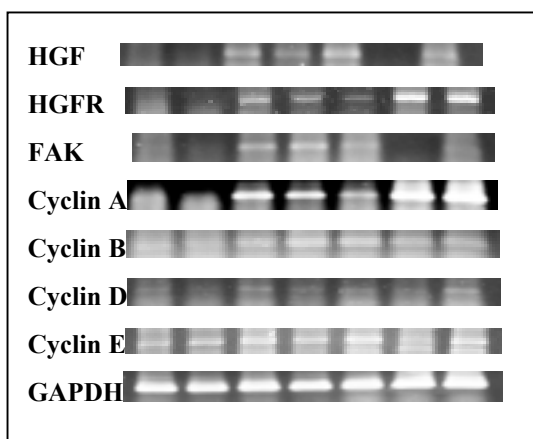
在早期的三天肝再生中，觀察肝臟生長因子 HGF 與其下游之 HGFR、FAK、Cyclin A、Cyclin B、Cyclin E、E2F、Rb 的 mRNA 表現量(圖一)。由結果中得知，在餵食中草藥丹參、丁豎朽、高氏柴胡、黨參及保肝藥 (Silymarin) 的肝臟再生中，其丹參、高氏柴胡、黨參之 mRNA 的表現量尚未有顯著的增加，而丁豎朽及保肝藥(Silymarin)的 mRNA 的表現量卻已有顯著的增加情形。而在部分肝切除之後的七天再生肝中，肝臟生長因子 HGF 與其下游之 HGFR、FAK、Cyclin A、Cyclin B、Cyclin D、Cyclin E 的 mRNA 表現量(圖二)。由實驗結果中得知，餵食中草藥丹參、丁豎朽、高氏柴胡、黨參及保肝藥 (Silymarin) 的 mRNA 的表現量均在部分肝切除之後的七天再生肝中，已有顯著的增加趨勢。唯讀其丁豎朽及保肝藥(Silymarin) 的 mRNA 表現量具有較顯著的增加。經由 RNA 的表現量中得知肝細胞增生的分子訊息途徑，為了更準確的知道其 mRNA 確實有表現，並且能夠轉譯出具有功能的蛋白，因此更進一步的以 Western Blot 做偵測，偵測出其相關的分子訊息途徑之蛋白質表現量。因此以偵測肝臟生長因子 HGF 及其相關之分子訊息途徑蛋白 FAK 及 Rb 蛋白質的表現量(圖三)，在早期的三天肝再生中，丁



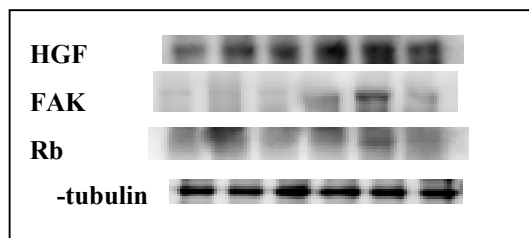
豎朽及保肝藥(Silymarin)的蛋白質表現量與其他的中草藥丹參、高氏柴胡、黨參的蛋白質表現量有較顯著的增加情形。



圖(一) 增生因子 HGF 及其增生途徑 HGFR, FAK, cyclin A, Cyclin B, Cyclin E, E2F, Rb 之 mRNA 的表現量。在早期的三天肝臟再生中，餵食中草藥丹參、丁豎朽、高氏柴胡、黨參、Normal Saline 及保肝藥品(Silymarin)，而以餵食中草藥丁豎朽及保肝藥品(Silymarin)之 mRNA 的表現量具有顯著的增加。



圖(二)、增生因子 HGF 及其增生途徑 HGFR, FAK, Cyclin A, Cyclin B, Cyclin D, Cyclin E 之 mRNA 的表現量。觀察在七天的肝臟再生中，Control、Sham、保肝藥品(Silymarin)及餵食中草藥丹參、丁豎朽、高氏柴胡、黨參等之 RNA 的變化。而以餵食中草藥之丹參、丁豎朽、高氏柴胡、黨參及保肝藥品(Silymarin)之 mRNA 的表現量均具有顯著的增加。

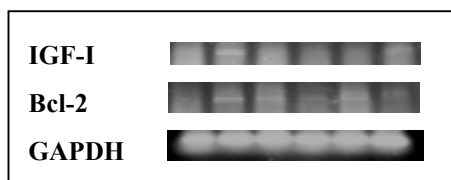


圖(三)、增生因子 HGF 及其增生途徑 FAK、Rb 之蛋白質的表現量。在早期的三天肝臟再生中，餵食 Saline 及中草藥丹參、高氏柴胡、黨參、丁豎朽及 Silymarin。而以丁豎朽及保肝藥品(Silymarin)之蛋白質表現量具有明顯的增加。

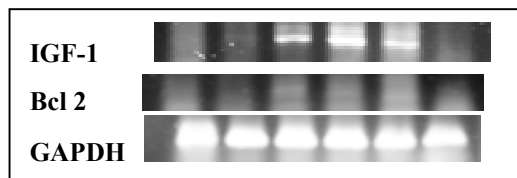
## (2) 肝細胞存活增生途徑:

在早期的三天肝再生中，觀察細胞存活增生途徑 IGF-I 及 Bcl 2 之 mRNA 的表現量(圖四)。由結果中得知，餵食中草藥丹參、丁豎朽、高氏柴胡、黨參、Saline 及保肝藥(Silymarin)的 mRNA 之表現量中。以丁豎朽及保肝藥(Silymarin)的 mRNA 之表現量具有明顯增加的趨勢。而再切除肝臟之後的七天肝再生中，RNA 的表現量在餵於中草藥高氏柴胡、黨參

及保肝藥(Silymarin)的 mRNA 之表現量具有明顯增加的趨勢(圖五)。為了更進一步的確定，此途徑是否真的具有表現，因此以蛋白值得表現量做更進一步的確認。由(圖六)結果中得知，IGF-IR 及其 Receptor IGF-IR 的蛋白質表現量，在早期的三天肝再生中，以餵食中草藥丁豎朽及保肝藥(Silymarin)的蛋白質之表現量具有明顯增加。相同的，在七天的肝再生之後，給於中草藥丁豎朽及保肝藥(Silymarin)的蛋白質之表現量具有顯著增加的趨勢(圖七)。

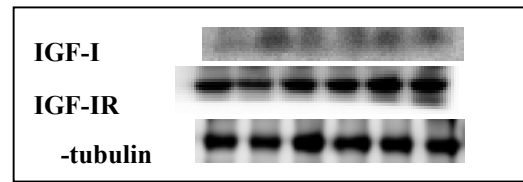


圖(四)、細胞存活及增生途徑 IGF-I 及 Bcl 2 之 mRNA 的表現量。在早期的三天肝臟再生中，餵食中草藥丹參、丁豎朽、高氏柴胡、黨參、Normal Saline 及保肝藥品(Silymarin)。而以餵食中草藥丁豎朽及保肝藥品(Silymarin)之 mRNA 的表現量具有顯著的增加。

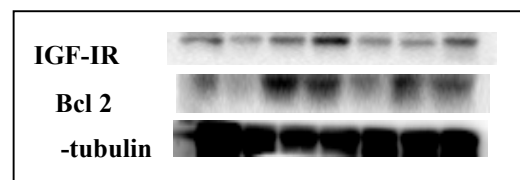


圖(五)、細胞存活及增生途徑 IGF-I 及 Bcl 2 之 mRNA 的表現量。觀察在七天的肝臟再生中，Control、丹參、高氏柴胡、黨參及保肝藥品(Silymarin)等之 RNA 的變化。而以餵食中草藥之高氏柴胡、黨參及保肝藥品(Silymarin)之 mRNA 的

表現量均具有顯著的增加。



圖(六)、細胞存活及增生途徑 IGF-I 及 IGF-IR 之蛋白質的表現量。在早期的三天肝臟再生中，餵食 Saline 及中草藥丹參、高氏柴胡、黨參、丁豎朽及 Silymarin。而以丁豎朽及保肝藥品(Silymarin)之蛋白質表現量具有明顯的增加。

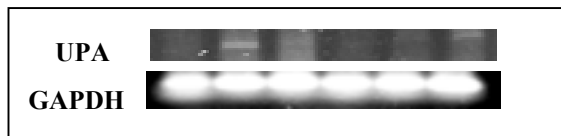


圖(七)、細胞存活及增生途徑 IGF-IR 及 Bcl 之蛋白質的表現量。在七天肝臟再生中，Control、Sham 及餵食中草藥丹參、高氏柴胡、黨參、丁豎朽及保肝藥品(Silymarin)。而以丁豎朽及保肝藥品(Silymarin)之蛋白質表現量具有明顯的增加。

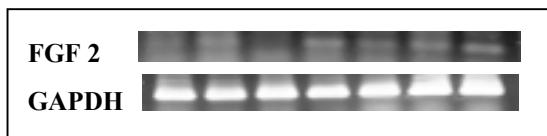
### (3) 經由抗結痂因子(UPA)，觀察肝臟再生:

由(圖八)的結果中觀察在早期的三天肝再生中抗結痂因子(UPA)的 mRNA 表現量。由結果中得知，給予中草藥丹參、丁豎朽、高氏柴胡、黨參及保肝藥(Silymarin)之 mRNA 的表現量中，以丁豎朽及保肝藥(Silymarin)的 mRNA 之表現量具有明顯增加的趨

勢 而將肝臟切除後的七天再生肝中，由餵食中草藥丹參、高氏柴胡、黨參、丁豎朽及保肝藥(Salymarín)中，其中草藥高氏柴胡、黨參、丁豎朽及保肝藥(Salymarín)之 mRNA 的表現量具有顯著增加的趨勢(圖九)。而由結痲因子(PAI-I)的蛋白質表現量中，可以觀察得知，丁豎朽及保肝藥(Salymarín)之 PAI-1 的蛋白質表現量，在早期三天肝再生中有顯著降低的現象(圖十)。然而更進一步的觀察七天肝再生中抗結痲因子 UPA 的蛋白質表現量(圖十一)，在中草藥丹參、高氏柴胡、丁豎朽及保肝藥(Salymarín)之蛋白質表現量，以丁豎朽及保肝藥(Salymarín)之蛋白質的表現量具有顯著增加的趨勢。

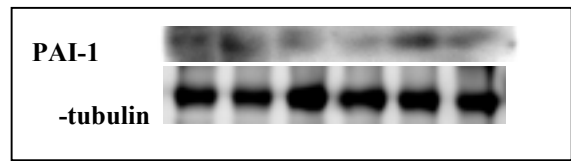


圖(八)、抗結痲因子 UPA 之 mRNA 的表現量。在早期的三天肝臟再生中，餵食中草藥丹參、丁豎朽、高氏柴胡、黨參、Normal Saline 及保肝藥品(Silymarín)，而以餵食中草藥丁豎朽及保肝藥品(Silymarín)之 mRNA 的表現量具有顯著的增加。



圖(九)、抗結痲因子 FGF 2 之 mRNA 的表現量。觀察在七天的肝臟再生中，Control、Sham 及餵食中草藥丹參、高氏柴胡、黨參、丁豎朽及保肝藥(Silymarín)等之 RNA 的變化，而以餵食中草藥之高氏柴胡、黨參、丁豎朽及保肝藥(Silymarín)之 mRNA 的表現

量均具有顯著的增加。



圖(十)、結痲因子 PAI-1 之蛋白質的表現量。在早期的三天肝臟再生中，餵食 Saline 及中草藥丹參、高氏柴胡、黨參、丁豎朽及 Silymarín。而以丁豎朽及保肝藥品(Silymarín)之結痲因子 PAI-1 的蛋白質的表現量具有明顯降低的情形。



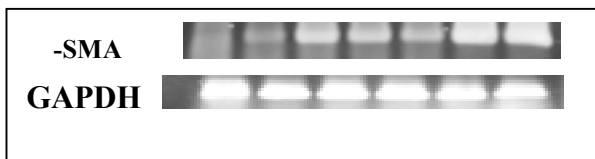
圖(十一)、抗結痲因子 UPA 之蛋白質的表現量。在七天肝臟再生中，Control、Sham 及餵食中草藥丹參、高氏柴胡、黨參、丁豎朽及保肝藥(Silymarín)。而以丁豎朽及保肝藥品(Silymarín)之蛋白質表現量具有明顯的增加。

#### (4)透過早期 Proliferative 指標:

在早期的增值 proliferative 過程中，藉由早期的 proliferative 指標，觀察早期三天再生肝中 -SMA 的蛋白質表現量(圖十二)，而在給予中草藥丹參、丁豎朽、高氏柴胡、黨參、Normal Saline 及保肝藥(Salymarín)中，以丁豎朽及保肝藥(Salymarín)之 mRNA 表現量具有明顯增加的趨勢。而在七天肝再生中，Control、Sham 及給予中草藥丹參、高氏柴胡、黨參、丁豎朽及保肝藥(Salymarín)之 mRNA 表現量具有明顯增加(圖十三)。



圖(十二)、早期 Proliferative 指標  $\alpha$ -SMA 之 mRNA 的表現量。在早期的三天肝臟再生中，餵食中草藥丹參、丁豎朽、高氏柴胡、黨參、Normal Saline 及保肝藥品(Silymarin)。而以餵食中草藥丁豎朽及保肝藥品(Silymarin)之 mRNA 的表現量具有顯著的增加。

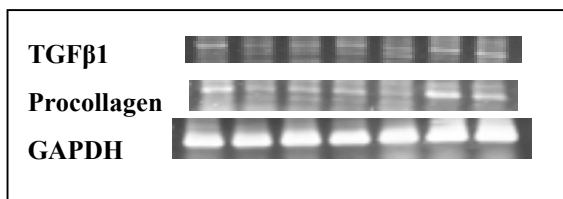


圖(十三)、早期 Proliferative 指標  $\alpha$ -SMA 之 mRNA 的表現量。觀察在七天的肝臟再生中，Control、Sham 及餵食中草藥丹參、高氏柴胡、黨參、丁豎朽及保肝藥品(Silymarin)等之 RNA 的變化。

而以餵食中草藥丹參、高氏柴胡、黨參、丁豎朽及保肝藥品(Silymarin)之 mRNA 的表現量均具有顯著的增加。

#### (5) 促結痂因子 TGF 及纖維指標 procollagen:

將部份肝切除七天後，觀察其是否因長期的肝臟再生中，以有結痂或纖維化的現象。因此，在七天的肝臟再生中，Control、Sham、保肝藥(Silymarin)及中草藥丹參、丁豎朽、高氏柴胡及黨參。其中以丁豎朽及保肝藥(Silymarin)之 mRNA 表現量具有明顯降低(圖十四)。



圖(十四)、促結痂因子 TGF  $\beta$  1 及纖維化

指標 procollagen 之 mRNA 的表現量。在七天的肝臟再生中，Control、Sham、保肝藥品(Silymarin)及餵食中草藥丹參、丁豎朽、高氏柴胡、黨參。而餵食中草藥之丁豎朽及保肝藥(Silymarin)之 mRNA 的表現量具有顯著的降低。

## 五、討論;

1. 在肝臟再生的初期三天，從肝細胞增生的相關途徑及細胞生存增生途徑中，可發現大多的中草藥丹參、高氏柴胡、黨參，尚未有顯著的促進肝臟再生的功能。唯獨丁豎朽已有明顯的促進肝臟再生的功能。然而在肝臟長期的七天再生作用中，其他中草藥丹參、高氏柴胡、黨參均已有明顯增加的趨勢。而丁豎朽在肝細胞增生的相關途徑及細胞生存增生途徑中，仍有顯著的增加。由此，可知丁豎朽確實可促進肝臟的再生。

2. 再增生過程中有可能因中草藥的藥性不同，而造成肝臟結痂及纖維化的現象。因此再觀察肝臟再生過程中其抗結痂途徑及結痂指標因子的作用情形。從 FGF-2R 及 UPA 的 RNA 及蛋白質表現量中可明顯指出，丁豎朽在三天及七天的肝再生中具有抗結痂及 proliferation 的作用。然而，再長期七天的肝再生作用中，是否造成肝的纖維化？須從纖維化指標 TGF 及 procollagen 之

RNA 及蛋白質表現量中得知，由結果中得知，在七天的中草藥作用中，丁豎朽尚不會造成肝臟的纖維化。因此，足以證明丁豎朽能夠促進肝臟的再生功能。

## 六、參考文獻:

1. Boros, P., and Miller, C. M.: Hepatocyte growth factor: a multifunctional cytokine.

- Lancet 345:293-295.1995.
- 2.Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro K, Shimizu S: Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor.Nature.342 (6248):440-3,1989 Nov 23.
- 3.Hashimoto O, Ueno T, Kimura R, Ohtsubo M, Nakamura T, Koga H, Torimura T,Uchida S , Yamashita K, Sata M.:Inhibition of proteasome-dependent degradation of Weel in G2-arrested Hep 3B cells by TGF beta 1. Molecular Carcinogenesis. 36(4):171-82, 2003 Apr.
- 4.Nakamura T, Tomita Y, Hirai R, Yamaoka K, Kaji K, Ichihara A.:Inhibitory effect of transforming growth factor-beta on DNA synthesis of adult rat hepatocytes in primary culture. Biochemical & Biophysical Research Communications. 133(3): 1042-50, 1985 Dec 31.
- 5.Braun L, Mead JE, Panzica M, Mikumo R, Bell GI, Fausto N: Transforming growth factor beta mRNA increases during liver regeneration: a possible paracrine mechanism of growth regulation: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 85(5):1539-43, 1988 Mar.
- 6.Zhao J, Bian ZC, Yee K, Chen BP, Chien S, Guan JL: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, 2003, Jun.
- 7.Cheng J, Gallagher JA, Zhu G, Slavin RE, Swanstrom LL, Hansen PD: Role of Bfgf And HGF in colon adenocarcinoma growth In liver. J Surg Res, 114(2), 275-276, 2003, Oct.
- 8.Owens MR, Cimino CD:Biosynthesis of plasminogen by the perfused rat liver. Journal of Laboratory & Clinical Medicine. 105(3):368-73, 1985, Mar.
- 9.Drixler TA, Vogten JM, Gebbink MF, Carmeliet P, Voest EE, Borel Rinkes IH. Plasminogen mediates liver regeneration and angiogenesis after experimental partial hepatectomy. British Journal of Surgery. 90 (11):1384-90, 2003, Nov.