

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(1/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2320-B-039-036-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：中國醫藥學院學士後中醫系

計畫主持人：蔡金川

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 6 月 2 日

中醫藥對肝再生能力之影響

(一)部分肝切除模式之建立

一.實驗材料

1.1 實驗動物

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，自由飲水及餵養標準飼料。

1.2 實驗試劑

total protein, albumin, globulin, bilirubin, GOT, GPT, γ -GT, ALP, total

bile acid

(Roche diagnostic system, Inc. Branchburg, New Jersey, USA.)

5-bromo-2'-deoxy-uridine(Sigma,St,Louis,MO)

1.3 實驗器材

a.高速冷凍離心機 (BACKMAN GS-6R, USA)

b.全自動生化分析儀 (COBAS mira plus, Roche, New Jersey, USA)

c.真空減壓濃縮機 (EYELAN-1, Tokyo Rikakikai Co, LTD, Japan)

d.冷凍乾燥機 (Dura-Top MP, Microprocessor control bulk tra Y Dryer,
FTS system)

e.分光光度計(Hitachi U-2000 Spectrophotometer)

1.4 管制藥品登記證

實驗動物於肝切除手術前以麻醉管制藥品 Sodium pentobarbital 麻醉處理，並依規定申請管制藥品登記證；管證字號 HRR091000001 號。

二、實驗步驟

2.1 手術前不給予任何藥劑，正常供水及飲食，禁食 18hrs 後，進行部分肝切除手術，切除 70% 的肝臟組織。

2.2 所有組別在術後之第 6、12、24、36、72 及 168 小時犧牲動物 (5~9 隻)。由頸動脈採血，取血清以檢測生化值 (total protein, albumin, globulin, bilirubin, GOT, GPT, γ -GT, ALP, total bile acid)。

2.3 解剖取下剩餘的肝臟，秤量肝重以計算肝重的改變率(再生肝重量/原本起始肝重量)

2.4 採下的肝組織再分成兩部分，一部分急速以液態氮冰凍並保存於 -80°C 中，此將進一步比較分析關於肝臟再生之特殊基因表現情形(包含 HGF, c-met, TGF- α , c-fos, cyclin D1, cyclin A; p53, prohibitin, TGF- β 1 等)，以及進行肝組織自由基含量測定(glutathione, GSH)及抗氧化酶(GPx, GR)活性分析。

2.5 另一部分肝組織則以 10% 福馬林固定以即將進行免疫組織化學染色分析。(immunohistochemical assay)。

2.6 於動物犧牲前半小時由腹腔注入 20mg/kg 的 5-Bromo-2-deoxyuridine solution(BrdU)，由酵素抗體法以 DAB 染色觀察 S phase 的細胞核比例(labeling index)以評估肝組織 DNA 合成的情形。

三、實驗方法

3.1 GSH peroxidase

GSH peroxidase 活性分析是採用 Lawrence and Burk(1976)之方法。

取 25 μ l 夾 x 組織均質液與 925 μ l 之反應液(含有 1mM EDTA、1mM NaN₃、1U/ml GSH-Rd 及 1mM GSH 和 100mM potassium phosphate, pH7.4) 混合, 再加入 25 μ l, 6mM β -NADPH(溶於 0.5%之 NaHCO₃ 中), 最後再加入 25 μ l, 10mM H₂O₂ 起始反應, 於 37°C 下測定 A_{340nm} 三分鐘內之變化情形, 以 β -NADPH 之下降量換算酵素活性。

($E_{340}=6.22 \times 10^3 M^{-1} cm^{-1}$)。

3.2 NPSH 的測定

NPSH 的測定步驟為: 取 0.2ml 組織均質液, 加入 0.8ml 之 0.5% TCA 冰浴 5 分鐘, 再以 10,000g 離心 3 分鐘後, 取 0.3ml 之上清液加入 0.7ml 之 Tris/EDTA 溶液(pH8.9), 均勻混合後再加入 20 μ l 之 10mM DTNB(in MrOH)混合均勻後置於室溫下反應 5 分鐘, 並偶加以搖晃, 最後測定分光光度計 412nm 之吸光值。另需作一組以 0.3ml 之 5%TCA 溶液代替上清液者為空白組。

3.3 蛋白質含量的測定:

利用 Bio-Rad Protein Assay kits 分析。Coomassie Brilliant blue 試劑會與蛋白質結合產生藍色反應，再以分光光度計測定 590nm 之吸光值，並以 BSA (bovine serum albumin) 作為標準品。

3.4 BrdU stain :

切片 deparaffinization and rehydration → trypsin 處理後與 formamide/trisodium citrate 70°C incubation 45 mins → rinse with PBS → 5% BSA 25 mins → 切片 incubated with 3% hydrogen peroxide for 5 mins → rinse with PBS → 切片 incubated with anti-BrdU 1hr → rinse with PBS → incubation with biotinylated anti-mouse antiserum 20 mins → rinse with PBS → incubation avidin dehydrogenase-biotinylated horseradish peroxidase complex 20 mins → rinse with PBS → incubation with DAB 5 mins → rinse with distilled water → hematoxylin 2 mins → rinse with distilled water 10 mins → dehydration → mounting → Mitotic Indicer.

3.5 PCNA stain :

切片 deparaffinization and rehydration → trypsin 處理後與 formamide/trisodium citrate 70°C incubation 45 mins → rinse with PBS → 5% BSA 25 mins → 切片 incubated with 3% hydrogen peroxide for 5

mins → rinse with PBS → 切片 incubated with anti-PCNA 1hr →
rinse with PBS → incubation with biotinylated anti-mouse antiserum 20
mins → rinse with PBS → incubation avidin
dehydrogenase-biotinylated horseradish peroxidase complex 20 mins →
rinse with PBS → incubation with DAB 5 mins → rinse with distilled
water → hematoxylin 2 mins → rinse with distilled water 10 mins →
dehydration → mounting → PCNA Labeling

3.6 Hematoxylin & Eosin stain :

1. 融解臘:(xylene: 3min, 3 times ⇨ 100% alcohol: 3 min, 3 times
⇨ 95% alcohol: 3 min, 2 times ⇨ 70% alcohol: 3min. 2times)。
2. Haematoxylin 染色 (細胞核): 3 min。
3. 水洗: 10 min。
4. Eosin 染色 (細胞質): 1 min。
5. 70% alcohol: 3 sec, 1 time ⇨ 95% alcohol: 3 sea, 2 times ⇨
100% alcohol: 3 sed, 2 times ⇨ xylene: 3 sec, 3 times。
6. 蓋片、陰乾，並以顯微鏡觀察。

3.7 水抽出物之製備 (鑑定後的中藥材包括: 高氏柴胡; 丁豎朽; 丹參; 黨參)

中藥材: 秤重, 加水煮沸 1 小時, 趁熱過濾 (兩次), 得濾液, 真空

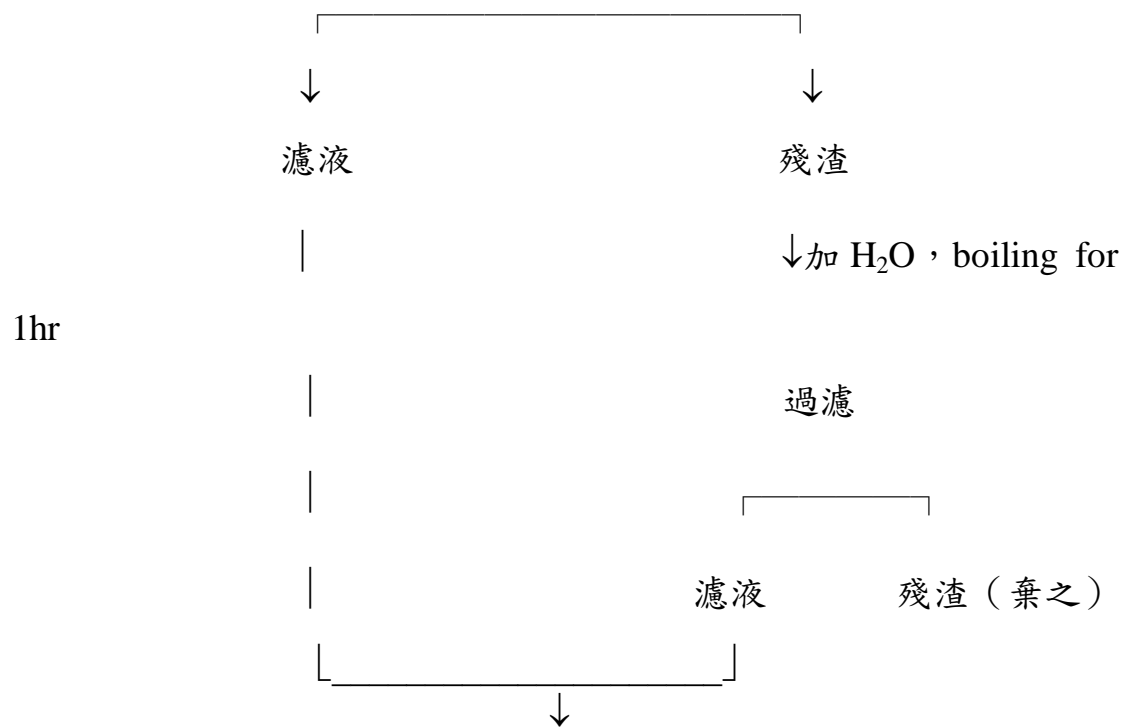
減壓濃縮，得濃縮液。濃縮液進行冷凍乾燥得乾燥粉末，秤重，計算產率 (yield)。

『中藥材』

↓加 H₂O，soaked for 30'

↓加 H₂O，boiling for 1hr

↓過濾



濾液合併，減壓濃縮，冷凍乾燥，

得乾燥粉末，以備實驗使用

(產率：丁豎朽 11.84%；丹參 16.95%；黨參 21.34%；高氏柴胡 23.24%)

3.8 肝均質液之製備

肝臟秤重，以九倍的 0.02M EDTA 溶液磨碎即為均質液。

3.9 統計學的分析

在本研究中，實驗數值以平均值 \pm 標準誤差 (mean \pm S.E.M.) 表示。實驗組與正常組間活性差異的比較，是採用 Student's *t*-test。P 值小於 0.05，達統計學差異。

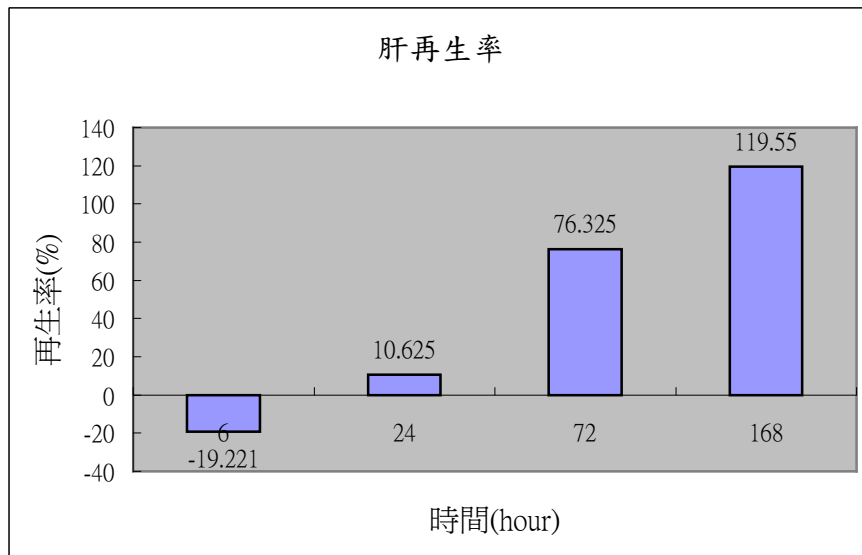
四、結果

		liver weight postoperati ve	2/3 hepatectom y	Estimated liver weight	Estimated remnant liver weight	Liver regeneratio n index(%)
A 組(7 天)	rat weight					
1	200	11.168	4.820	9	4.18	144.979
2	210	11.110	5.743	9.45	3.71	128.905
3	220	11.479	5.512	9.9	4.39	128.647
4	230	10.520	6.515	10.35	3.84	102.609
*5	225		6.474	10.125	3.65	
6	205	9.600	5.020	9.225	4.21	107.470
7	210	10.710	5.283	9.45	4.17	123.850
8	235	9.976	5.894	10.575	4.68	89.837
9	210	11.120	6.453	9.45	3.00	125.879
10	215	11.076	5.893	9.675	3.78	123.774
						119.550
B 組(3 天)						
1	250	8.944	7.846	11.25	3.40	70.609
2	200	11.120	7.087	9	1.91	129.914
3	240	8.820	6.916	10.8	3.88	71.371
4	240	7.743	7.536	10.8	3.26	59.435
5	250	9.028	8.770	11.25	2.48	74.664
6	255	10.894	8.358	11.475	3.12	93.049
7	220	6.940	7.358	9.9	2.54	59.772
8	220	6.318	7.430	9.9	2.47	51.790
						76.325
C 組(1 天)						
1	260	4.843	7.051	11.7	4.65	2.751
2	240	5.189	6.800	10.8	4.00	17.485
*3	265		6.625	11.925	5.30	
4	265	5.515	7.460	11.925	4.47	14.075
5	255	5.807	6.400	11.475	5.08	11.438

	6	270	5.203	7.500	12.15	4.65	7.373
							10.625
D組(6小時)							
	1	255	4.418	5.627	11.475	5.85	-25.413
	2	270	4.235	6.564	12.15	5.59	-20.582
	3	240	3.651	7.375	10.8	3.43	3.064
	*4	220		6.625			
	5	230	3.320	6.153	10.35	4.20	-14.253
	6	205	2.768	4.648	9.225	4.58	-38.920
							-19.221
E組(sham)							
	1	225	7.571		10.125	10.13	

【* 手術後沒有存活】

1. 大鼠肝臟再生率*

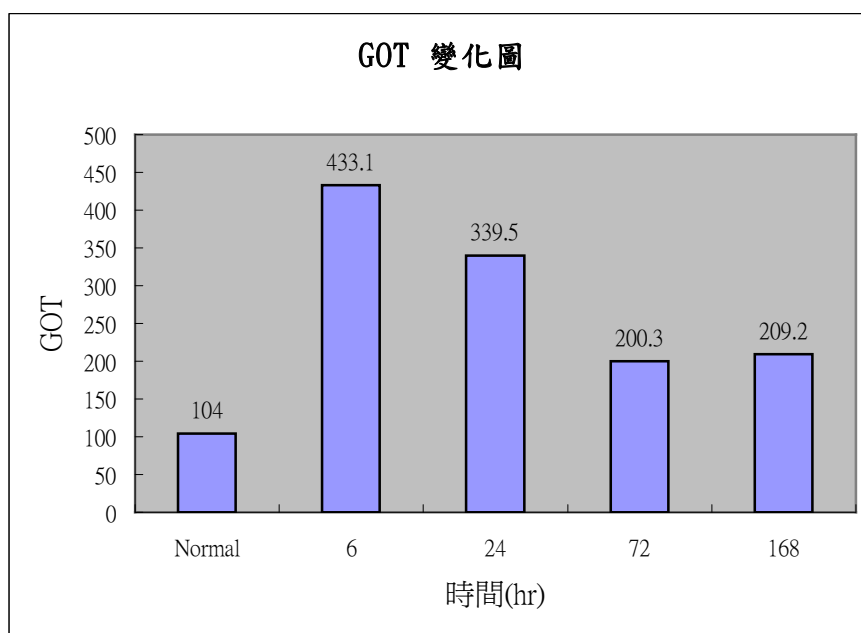


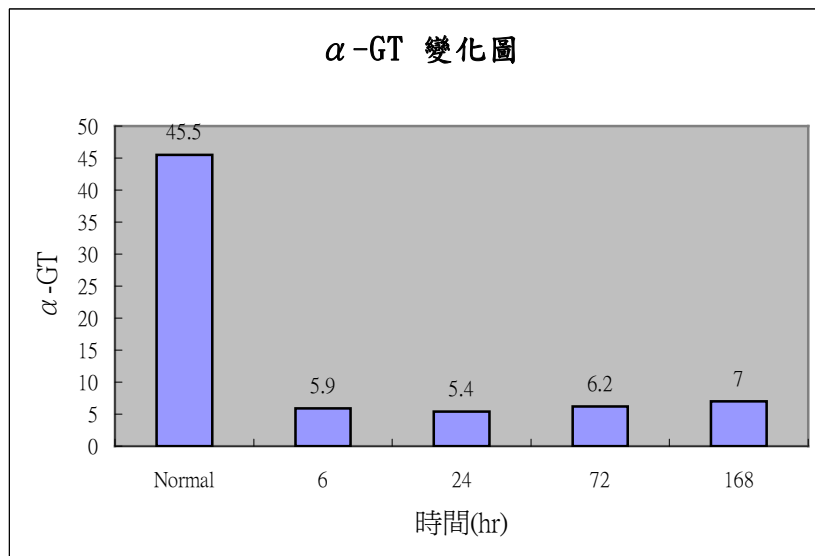
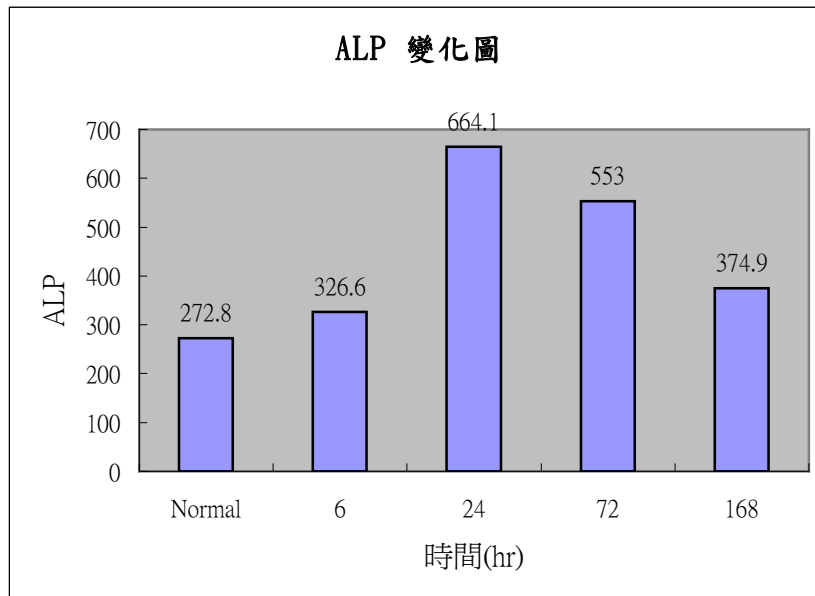
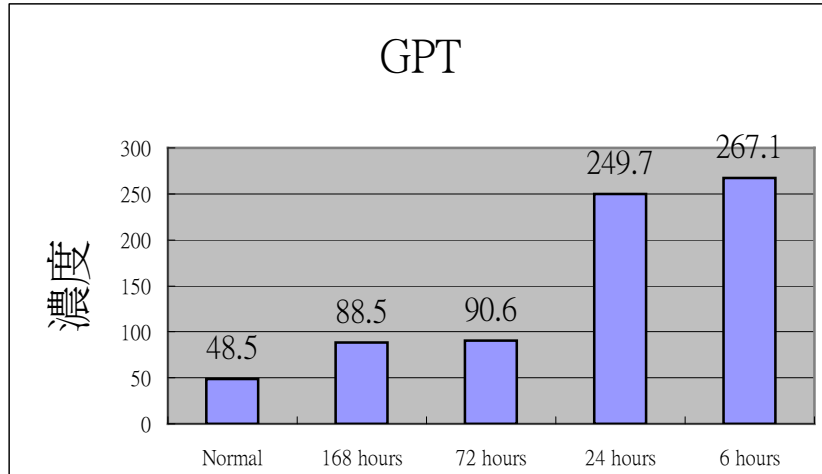
*肝再生率的計算公式：
$$\frac{\text{屍檢時的肝重量} - \text{手術時預計的殘肝重量}}{\text{切除的肝重量}} \times 100\%$$

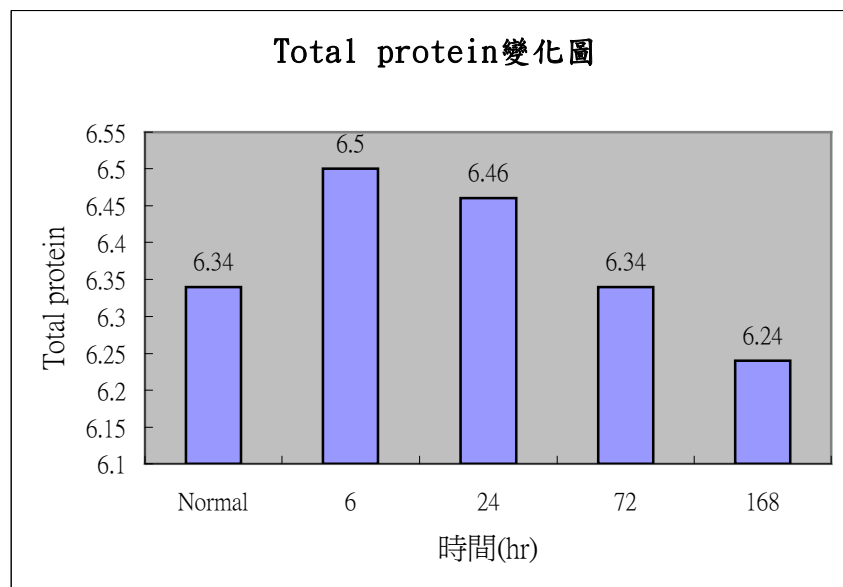
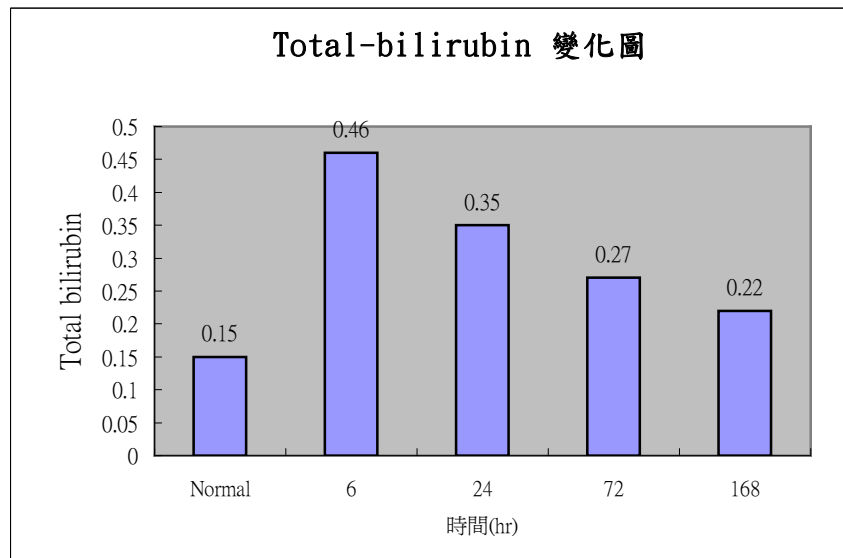
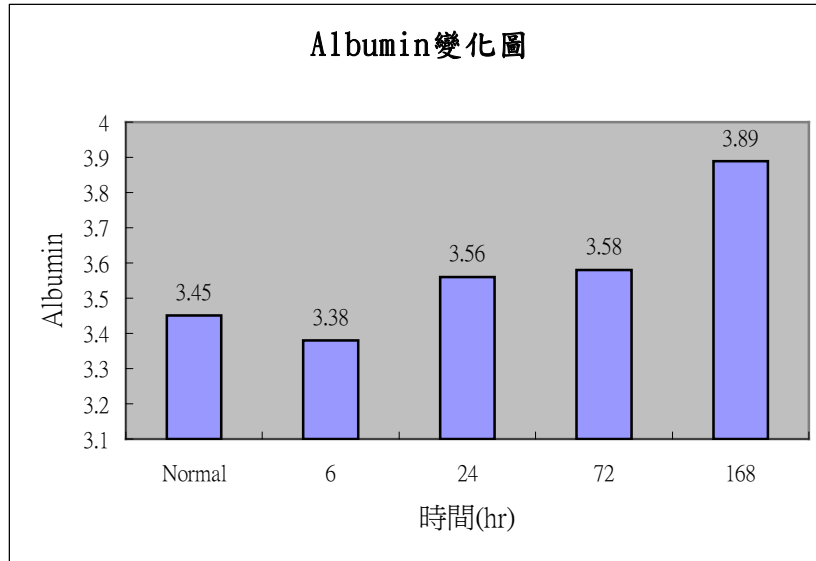
2. 肝功能生化指數

	GOT(u/l)	GPT(u/l)	ALP(u/l)	α -GT(u/l)
Normal	104.0 \pm 4.45	48.5 \pm 2.72	272.8 \pm 20.91	45.5 \pm 8.95
6 hours	433.1 \pm 34.09	267.1 \pm 63.79	326.6 \pm 38.80	5.9 \pm 0.86
24 hours	339.5 \pm 57.90	249.7 \pm 37.87	664.1 \pm 96.31	5.4 \pm 1.30
72 hours	200.3 \pm 13.36	90.6 \pm 4.56	553.0 \pm 26.29	6.2 \pm 0.74
168 hours	209.2 \pm 6.59	88.5 \pm 3.17	374.9 \pm 39.30	7.0 \pm 1.03

	Albumin(g/dl)	Total-bilirbin (mg/dl)	Total Protei(g/dl)
Normal	3.45 \pm 0.111	0.15 \pm 0.022	6.34 \pm 0.090
6 hours	3.38 \pm 0.131	0.46 \pm 0.060	6.50 \pm 0.210
24 hours	3.56 \pm 0.075	0.35 \pm 0.050	6.46 \pm 0.225
72 hours	3.58 \pm 0.083	0.27 \pm 0.024	6.34 \pm 0.130
168 hours	3.89 \pm 0.073	0.22 \pm 0.015	6.24 \pm 0.089

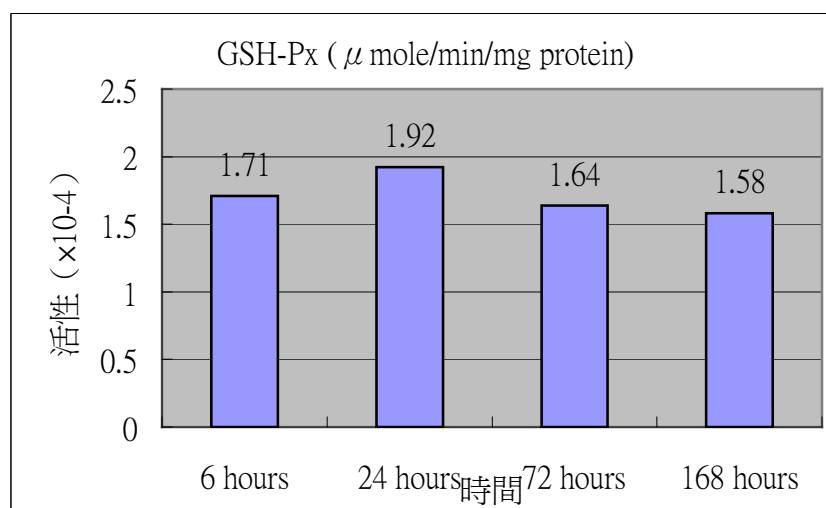
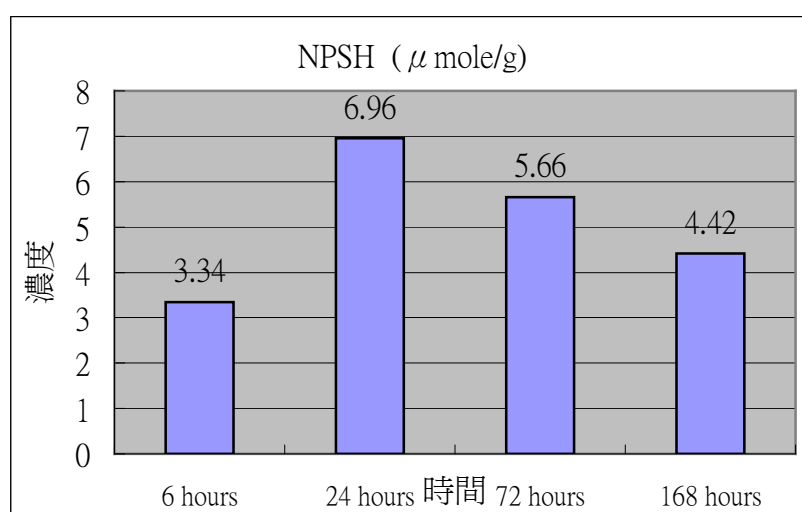






4.NPSH 、GSH-Px

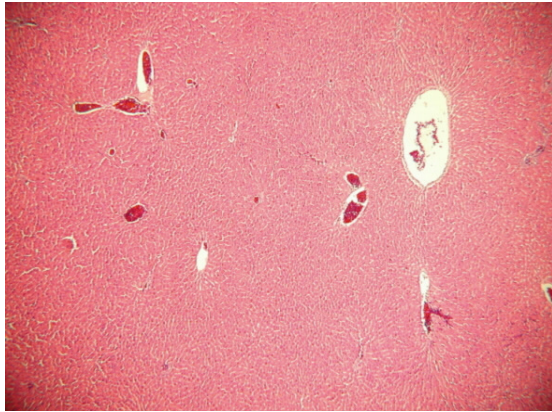
c	NPSH (μ mole/g)	GSH-Px (μ mole/min/mg protein)
168 hours	4.42 \pm 0.204	$1.58 \times 10^{-4} \pm 5.855 \times 10^{-6}$
72 hours	5.66 \pm 0.417	$1.64 \times 10^{-4} \pm 1.083 \times 10^{-5}$
24 hours	6.96 \pm 0.404	$1.92 \times 10^{-4} \pm 2.442 \times 10^{-5}$
6 hours	3.34 \pm 0.446	$1.71 \times 10^{-4} \pm 8.893 \times 10^{-5}$



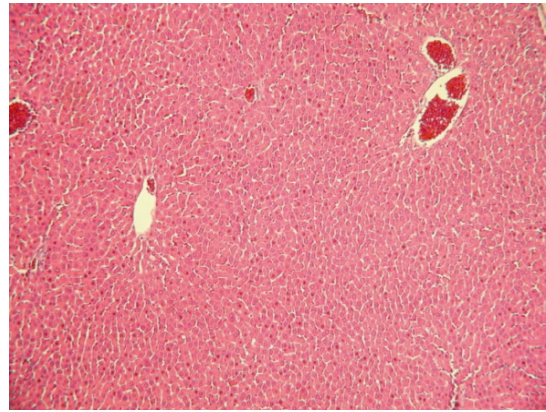
5. 病理組織染色

未進行肝切除（對照組）肝臟組織切片

A1. H&E stain (50×)

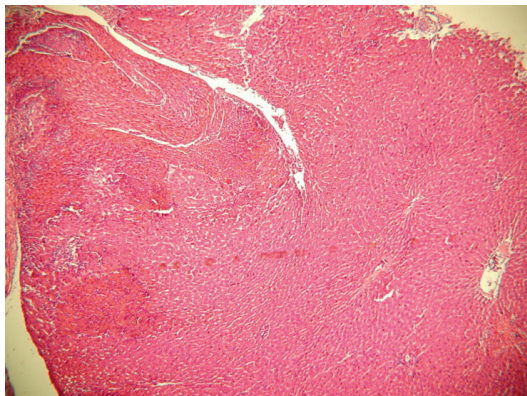


A2. H&E stain (100×)

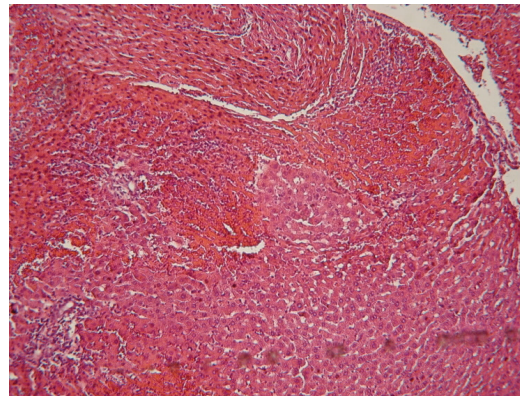


部分肝切除 6 小時肝臟組織切片

B1. H&E stain (50×)

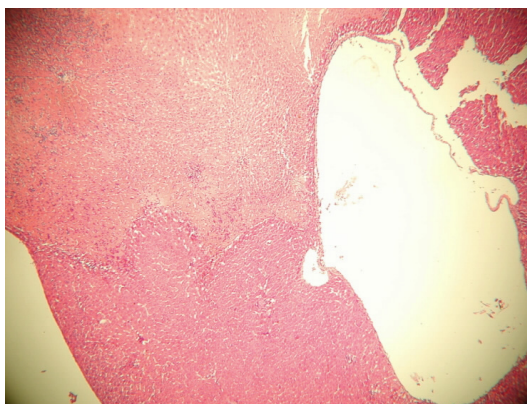


B2. H&E stain (100×)

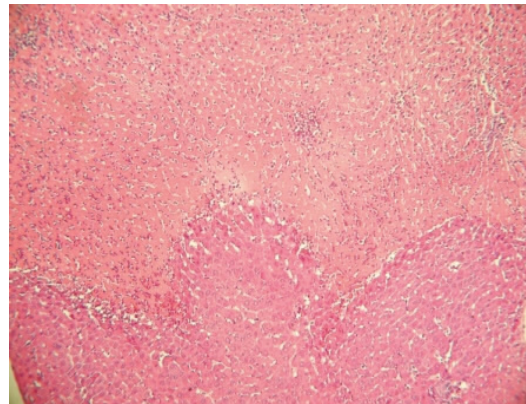


部分肝切除 24 小時肝臟組織切片

C1. H&E stain (50×)

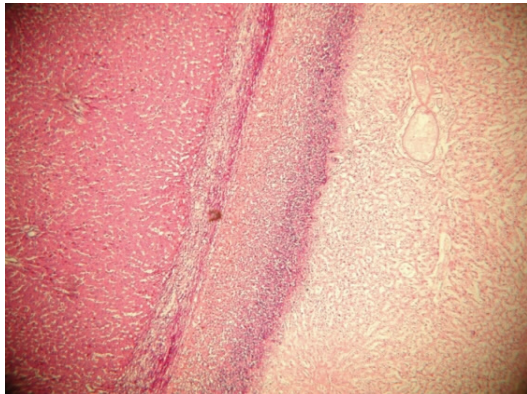


C2. H&E stain (100×)

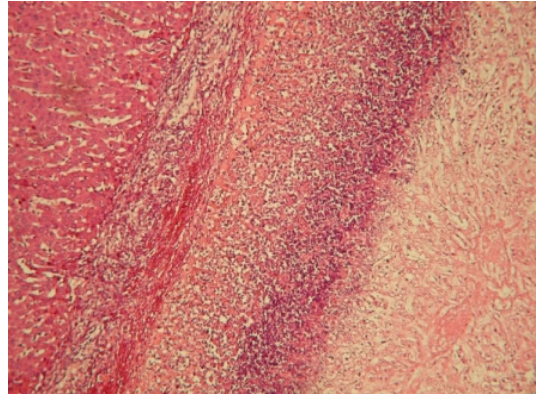


部分肝切除 72 小時後肝臟組織切片

D1. H&E stain (50×)

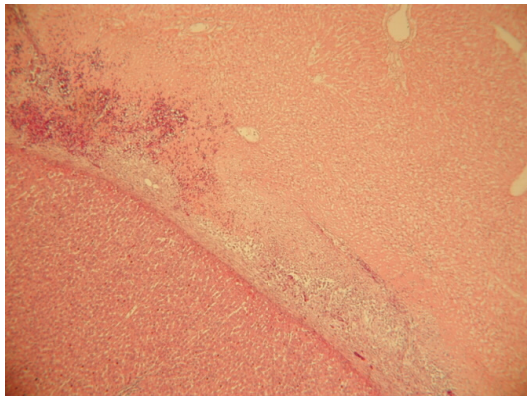


D2. H&E stain (100×)

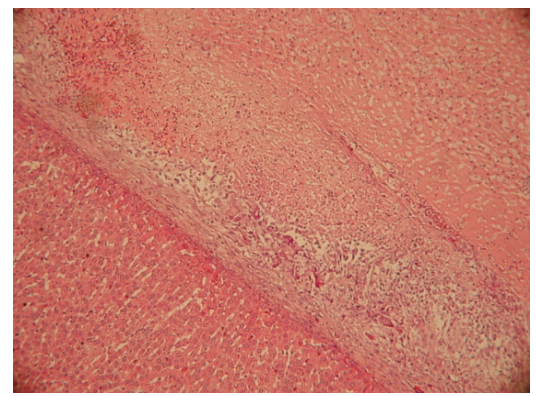


部分肝切除 168 小時後肝臟組織切片

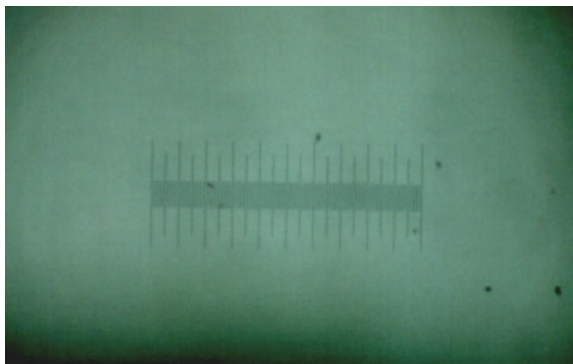
E1. H&E stain (50×)



E2. H&E stain (100×)



F1. Calibration Bar = 100 μ
(50×)



F2. Calibration Bar = 100 μ
(100×)

