

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

利用 cDNA 基因微陣列技術研究台灣金線連生物活性(1/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2317-B-039-001-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：中國醫藥學院醫學系

計畫主持人：林文川

共同主持人：吳金濱

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 5 月 14 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫期中報告(1/2)

藥用及保健植物○台灣金線連之開發與利用

利用 cDNA 基因微陣列技術研究台灣金線連生物活性

計畫編號：NSC91-2317-B-039-001

執行期間：91 年 8 月 1 日至 92 年 7 月 31 日

主持人：林文川

一、摘要

本實驗使用基因微陣列技術分析台灣金線連保肝有效分畫(AFEF; 1.5 g/kg) 對四氯化碳誘發大鼠慢性與急性肝炎的基因表現。我們發現 AFEF 能抑制急性肝炎相關的細胞凋亡基因的表現，也抑制慢性肝炎相關的纖維化基因的表現。這些結果進一步證實 AFEF 的保肝作用。另外，進行 AFEF (g/kg)對雄性鼯鼠 90 天餵食毒性試驗，同時分析肝臟與代謝相關的基因表現分析。AFEF 對 cytochrome P450 的基因表現沒有影響，此顯示 AFEF 經由 cytochrome P450 產生藥物相互作用的機會很低。

關鍵詞：台灣金線、保肝、cDNA 基因微陣列

Abstract

In this study, we used the cDNA microarray technology to analysis gene expression of hepatoprotective fraction from *Anoectochilus formosanus*.(AFEF; 1.5 g/kg) on both chronic and acute hepatitis induced by carbon tetrachloride (CCl₄) in rats. We found that AFEF suppressed the apoptosis related gene expression in acute hepatitis, and fibrosis related gene expression in chronic hepatitis. These results further confirmed that AFEF possessed the hepatoprotective action. In addition, toxicity study was carried by administrating orally daily doses of

2 g/kg of the AFEF to male mice for 90 days. Then liver metabolism related genes were also examined from AFEF treated mice. AFEF did not effect the gene expression of cytochrome P 450, suggesting the chance of drug interaction with AFEF via cytochrome P 450 is low.

Key words: *Anoectochilus formosanus*, hepatoprotection, cDNA microarray

二、緣由與目的

先前我們的研究確認台灣金線連粗萃取物具有多方面的保健功能，如保肝、降血糖、抗氧化、改善學習記憶等。在保肝方面已有廠商配合進入產學研究計畫，研發台灣金線連保肝健康食品。台灣金線連保肝材料的製備已適當的純化，此經過修飾的分畫簡稱為 AFEF。AFEF 具有保肝作用，但其保肝作用的機轉尚不清楚。另外，健康食品是可以長期服用的，因此其服用的安全性相當重要，也因長期服用，因此與其他藥物併用的機會相當高，因此 AFEF 可能會產生那些藥物相互作用有必要釐清。

基於上述，本實驗的目的是使用 cDNA 基因微陣列技術探討(一)鼯鼠投予四氯化碳(CCl₄)後，慢性期及急性期肝臟中那些基因表現受到影響，而 AFEF 的投予可修飾那些基因的表現。(二)雄性鼯鼠經口投予 AFEF 90 天後，在肝臟有那些基因表現被提升或

抑制，尤其是與藥物代謝相關的基因。

三、結果與討論

晶片操作委託百恩諾公司，使用 NIA 15000 點鼯鼠基因晶片。每組使用至少 6 隻動物抽取出的 mRNA 混合後進行實驗，對於表現相當有意義的基因也進行 RT-PCR 試驗來進一步支持這些發現。

(一) 鼯鼠每週經口投予 CCl₄ 兩次，為期 9 週，實驗期間 AFEF(0.5 ~ 1.5 g/kg)每日經口投予一次，AFEF 對肝炎的指標 GOT、GPT 有減輕作用。對肝纖維化的指標如脾臟重量、血清中白蛋白含量及肝臟驕原蛋白含量有減輕作用。進行兩對基因晶片試驗，比較分析 CCl₄ / Control 及 AFEF / CCl₄ 的基因表現，有關纖維化的基因表現如表一。Procollagen 基因的表現僅提升兩倍，與先前我們在大鼠的實驗上升 10 倍比較，顯示在本實驗僅誘發慢性發炎狀態，因此 AFEF 對 procollagen 的基因表現也沒有明顯作用。肝臟發炎兩個重要的細胞因子即 TGFβ 和 PDGF 放出，前者使星狀細胞轉為肌纖維母細胞，後者使星狀細胞增生。TGFβ 會使降解膠原蛋白的 MMP 活性下降，而造成膠原蛋白的積聚。AFEF 能抑制 TGFβ 的表現，而增加 MMP 的活性。但對 PDGF 的表現沒有影響。另外，肝臟受損，HGF 及 MAT1A 的基因表現下降，AFEF 的處理能提升 HGF 及 MAT1A 的基因表現，此顯示 AFEF 有一定的保肝功能。尚有很多的基因表現受到影響，這些是否與肝臟纖維化有關，尚待查證。

(二) 為進一步解明 AFEF 具保肝作用，而影響到肝臟纖維化基因的表現，因此進行急性肝炎試驗。探討 CCl₄

僅投予一週，產生肝臟急性病變時，AFEF 的效果。結果顯示 AFEF 能減少 GOT、GPT 的釋出。已知 CCl₄ 的肝臟急性病變遷連到一些細胞因子的釋出、自由基的傷害及引起細胞凋亡，因此基因晶片的結果分析以這些為主。AFEF 能降低某些與細胞凋亡相關基因的表現(表二)。CCl₄ 的處理可使抗氧化酵素的基因表現下降，AFEF 的投予可以改善這些基因的表現。CCl₄ 處理組在細胞因子方面如 TNFα、interleukin 等沒有發現有明顯表現的基因，或許與動勿犧牲的時間點有關，也因此 AFEF 在此方面的作用無法得知。尚有很多的基因表現受到影響，這些是否與肝臟急性發炎化有關，有待進一步查證。

(三) 鼯鼠經口投予 AFEF (2 g/kg) 90 天，在血液學的檢查未發現異常，在血清生化學的檢查，僅使血鈣濃度上升，其餘沒有影響。肝臟基因的表現被明顯提升(比值大於 2)有 60 個基因；被抑制的(比值小於 0.5)有 126 個。與代謝及訊息傳導相關的基因表現如表三。在藥物代謝上相當重要的 cytochrome P450 其基因表現不受 AFEF 長期投予的影響，顯示與 cytochrome P450 代謝相關的藥物之間發生相互作用的可能性低。AFEF 能提升 glutathione transferase 的作用，顯示其有提升肝臟解毒的作用。已有文獻指出台灣金線連能減輕 acetaminophen 的肝臟毒性，此作用應與促進 glutathione transferase 的作用有關。

結論：由上述結果推測 AFEF 應有保肝作用，進而減緩纖維化的進展。毒性低，長期服用產生藥物相互作用機會低。

表一、AFEF 對 CCl₄ 投予九週誘發鼯鼠肝纖維化肝臟基因表現的影響

Genes	CCl ₄ /Con	AFEF/CCl ₄
-------	-----------------------	-----------------------

Col3a1--procollagen, type III, alpha 1	BG086357	2.1	1.2
Tgfb2--transforming growth factor, bet	BG067564	3.7	0.5
Mmp9--matrix metalloproteinase 9		0.2	3.9
Pdgfra--platelet derived growth factor	BG078820	3.7	2.1
HK--Hgs--HGF-regulated tyrosine kinase		0.6	2.5
Mat1a--methionine adenosyltransferase	BG086604	0.2	3.1
Con: control			

表二、AFEF 對 CCl4 投予一週誘發鼯鼠急性肝炎肝臟基因表現的影響

Genes		CCl4/Con	AFEF/CCl4
Apoptosis			
Pdcd6--programmed cell death 6	BG077957	2.4	0.4
AI120141--expressed sequence AI120141	BG078034	2.4	0.3
Pdcd7--programmed cell death protein 7	BG0667102	2.1	0.4
RIKEN cDNA 0610041G12 gene	BG064850	2.0	0.4
Antioxidant			
Sod1--superoxide dismutase 1, soluble	BG074045	0.5	1.5
Cas1--catalase 1	BG076235	0.7	1.3
Gpx2--glutathione peroxidase 2	BG084322	0.7	1.6
Gsto1--glutathione S-transferase omega	BG084006	0.6	1.2
Gss--glutathione synthetase	BG067069	1.1	1.2
Con: control			

表三、鼯鼠連續經口投予 AFEF (2 g/kg) 天肝臟基因的表現

Genes		AFEF/CCl4
Energy/metabolism		
Mgst3--microsomal glutathione S-transf	BG088778	2.18
Tst--thiosulfate sulfurtransferase, mi	BG074498	2.36
Mtch1--pendin-mitochondrial carrier ho	BG087589	2.10
Xrn2--5'-3' exoribonuclease 2	BG065507	0.39
Gyg1--glycogenin 1	BG070855	0.41
Tpp2--tripeptidyl peptidase II	BG066807	0.49
Signal transduction		
Ramp2--receptor (calcitonin) activity	BG077117	0.172
Tgtp--T-cell specific GTPase	BG067921	0.26
Ly6a--lymphocyte antigen 6 complex, lo	BG072793	0.27

Igtp-interferon gamma induced GTPase	BG076245	0.32
G3bp-2-pendin-Ras-GTPase-activating pr	BG065817	0.47
