

第三章 樟芝菌株發酵過濾液對 dimethylnitrosamine 誘發 大鼠肝臟纖維化之改善作用

前 言

前章的結果顯示大鼠先以四氯化碳誘發產生慢性肝炎後，投予樟芝菌株發酵過濾液(以下簡稱樟芝發酵液)對四氯化碳最終誘發的肝纖維化有改善效果，此與民間認為樟芝能用於肝硬化相符合。因此在本章實驗，使用另一種誘發肝纖維化的動物實驗模式，進一步確認樟芝發酵液對肝硬化的效果。

Dimethylnitrosamine (DMN)是一種具強力肝臟毒性、致癌性及誘導有機體突變的物質 (Haggerty and Holsapple, 1990)。第一次有關其肝臟毒性的報導是由 Barnes 與 Magee (1954)指出的，導因於一工廠的意外事件。DMN 本身不具有肝毒性，其經由肝臟微粒體酵素 cytochrome P-450IIE1 作用的代謝物引起肝毒性 (Anderson *et al.*, 1992 ; Yang *et al.*, 1985, 1990 ; Yoo *et al.*, 1988)。大鼠投予 DMN 會引起嚴重的肝臟壞死，導致肝臟細胞外之基質蛋白 (extracellular matrix protein ; ECM) ，尤其是膠原 (collagen) 大量沉積 (Ala-Kokko *et al.*, 1987 ; Savolainen *et al.*, 1988)。DMN 誘導的大鼠肝損傷是肝臟纖維化研究很好的動物模式 (Ala-Kokko L, 1987)。

本章研究使用 DMN 誘發大鼠肝纖維化的模式進一步探討樟芝發酵液的護肝效果，並以反 (reverse transcriptase polymerase chain reaction; RT-PCR) 來觀察核酸 (mRNA)中 type I與 type III 膠原分子之表現差異。

材料及方法

一、樟芝菌株發酵過濾液(簡稱樟芝發酵液)之製備

詳第二章材料與方法

二、動物

使用 Wister 品系雄性大白鼠，5-6 週齡，購自國家實驗動物繁殖及研究中心。飼養環境維持 22 ± 3 °C，相對濕度 $55 \pm 5\%$ ，明、暗各十二小時的環境。飼食標準飼料(福壽公司)，自動飲水系統供水。

三、DMN 誘發大鼠肝纖維化

隨機將大鼠分成四組，每組 10-12 隻，一組為正常組，其他三組為 DMN 誘導肝纖維化組。大鼠以每 100 公克體重腹腔注射 DMN $1 \mu\text{l}$ (與 0.15 mol/L NaCl 以 1:100 [體積/體積] 方式稀釋) 的劑量，每星期連續三天，持續四週來誘發肝纖維化。其中二組，從實驗開始誘發肝臟纖維化至結束，每天經口投予樟芝菌株菌絲體發酵液 0.5 或 2.0 g/kg。正常組與 DMN 肝損傷組，每天經口投予相等體積之去離子水。28 天後，大鼠在乙醚麻醉下由腹腔動脈採血，並取出肝臟及脾臟，以冰冷食鹽水洗淨後，吸乾稱重。部分肝臟即刻以液態氮低溫儲存為抽取 RNA 使用；另一部份肝臟切取相同部位，固定於 10% 中性福馬林溶液中，供病理切片觀察。其餘肝臟依解剖相關位置分成四袋，儲存於 -80 °C，分別檢測肝臟膠原蛋白、脂質過氧化(LPO)，及抗氧化酵素 SOD、GSH-Px 和 Catalase 活性。

實驗中每週記錄大鼠體重變化，作為當週投予試驗物質之體重依據。

四、肝功能測定

五、肝臟膠原蛋白 (Hydroxyproline) 含量測定

六、肝臟 Superoxide dismutase、catalase 及 glutathione peroxidase 活性測定

七、病理檢驗

以上四至七方法詳第四章材料與方法。

八、反轉錄聚合 鏈鎖反應 (reverse transcriptase polymerase chain reaction ; RT-PCR)

(一) RNA 之萃取:

詳第二章材料與方法。

(二) Primer (引子) 的設計與合成

進行反轉錄聚合 鏈鎖反應時所需之引子,是參考表 3-1 所列之文獻設計的。引子的合成,則是委託生工有限公司 *MDBIO Inc.*製造的。

(三) RT-PCR:

取 0.2ml 之微量離心管,將 One-Step RT-PCR 試劑加入如下:

	Components	Volume
1	2X Reaction Mix	25 μ l
2	RT/PLATINUM <i>Taq</i> Mix	1 μ l
3	Sense Primer (10 μ M)	1 μ l
4	Anti-sense Primer (10 μ M)	1 μ l
5	Template RNA (1 μ g/ μ l)	1 μ l
6	Autoclaved distilled water	to 50 μ l

將上述物質離心混合均勻，置入 GeneAmp PCR system 2400 (PERKIN ELMER)進行 RT-PCR，反應條件如下：

cDNA synthesis and pre-denaturation:

Perform 1 cycle of: 50 for 30 mins

94 for 2 mins

PCR amplification:

Perform 35 cycles of: 94 for 1 min

60 for 1 min

72 for 1 min

Final extension:

1 cycle of 72 for 7 mins

試劑:

1. TRI Reagent®(MRC, Molecular Research Center)
2. SUPERSCRIPT™ One-Step RT-PCR with PLATINUM®Taq (Invitrogen)
3. Agarose (J. T Baker)
4. 100 bp DNA Ladder(Gene Mark)
5. TBE Buffer (Sigma)
6. Ethidium bromide (Sigma)

(四)洋菜凝膠電泳(Gel electrophoresis):

以 0.5X TBE buffer 配製 2 % agarose gel，以微波爐加熱直到完全融化，待微溫(約 50)造膠 趕氣泡，待膠硬化加入 running buffer-0.5X TBE buffer，將 DNA 及 marker 分別置入 well 中以 100 伏特電壓進行電泳分析，約 100 分鐘後將膠取出以 ethidium bromide 染色，在紫外光燈下觀察，並以拍立得相機照相；將照片掃描後以 Scion Image 電腦軟體分析影像定量其光密度。我們以 β -actin 作為內部對照，以其表現的量當作相對標準，將 RT-PCR 產物之 OD (Optical Density)值當分子， β -actin 之 OD 值當分母，求其相對於 β -actin 的 m-RNA 量。

九、統計方法

以單尾變異數分析(One-Way analysis of variance; ANOVA)方法分析，並進行 Dunnett 測試，以 P 值小於 0.05 認為有顯著差異。

結 果

一、對體重的影響

DMN 誘發肝臟纖維化之大鼠，其最後平均體重與正常組比較明顯降低，其重量分別 398.0 ± 8.9 、 333.7 ± 10.6 公克 ($P < 0.01$)。樟芝發酵液的處理對於 DMN 大鼠的體重減輕作用沒有影響。

二、對肝臟和脾臟重量的影響

如圖 3-1(A)所示，DMN 處理的的大鼠肝臟重量明顯低於正常控制組，對於 DMN 的肝臟重量減輕作用，樟芝發酵液有增加作用。

如圖 3-1(B)所示，DMN 處理的的大鼠脾臟重量明顯高於正常控制組，對於 DMN 的脾臟重量增加作用，樟芝發酵液(2g/kg)有減輕作用。

三、血清生化值的影響

DMN 誘發肝臟纖維化之大鼠，其最終血清 GOT 及 GPT 值明顯高於正常組(圖 3-2)。樟芝發酵液對 DMN 所提升的 GOT 值有降低的趨勢，但不具統計意義。樟芝發酵液(2.0 g/kg)可以明顯降低 DMN 所提升的 GPT 值。

DMN 誘發肝臟纖維化大鼠，其最終血清白蛋白含量、白蛋白 / 球蛋白比值明顯低於正常組(圖 3-3)，投予樟芝發酵液(2.0 g/kg) 對 DMN 誘發肝臟纖維化所降低的血清白蛋白含量有增加作用，對白蛋白 / 球蛋白比值僅有增加傾向。

四、對肝臟蛋白質及 Hydroxyproline 含量的影響

DMN 誘發肝臟纖維化之大鼠其肝臟蛋白質含量明顯減少，樟芝菌株發酵液的處理，對 DMN 降低的肝臟蛋白質含量有明顯增加的作用(圖 3-4A)。

DMN 誘發肝臟纖維化大鼠其肝臟 hydroxyproline 含量顯著高於正常組，投予樟芝發酵液(2.0 g/kg)可以明顯降低 DMN 所增加的肝臟 hydroxyproline 含量(圖 3-4B)。

五、對肝臟 SOD、Catalase、GSH-P_x 活性的影響

如表 3-2 所示，DMN 誘發肝臟纖維化的大鼠，其肝臟中 SOD、catalase 的活性明顯下降，樟芝發酵液(0.5、2.0 g/kg)的處理，對肝中 SOD、catalase 的活性沒有影響。DMN 誘發肝臟纖維化的大鼠，其肝臟中 GSH-P_x 的活性與正常組比較沒有差異，樟芝發酵液的處理，對肝中 GSH-P_x 的活性沒有影響。

六、肝臟病理切片觀察

肝臟病理切片的觀察發現，正常組的肝臟中幾乎無膠原蛋白束存在(圖 3-5A)。DMN 肝損傷組的肝組織嚴重受損，出現膠原蛋白含量增加、膽道增生、出血狀態和壞死現象(圖 3-5B)。樟芝發酵液(2.0 g/kg)的處理，可以明顯看出其組織膠原蛋白含量減少，及膽道增生情況明顯改善(圖 3-5C)。

七、反轉錄聚合 鏈鎖反應 (RT-PCR)

DMN 誘發肝臟纖維化之大鼠，其肝臟中 type I 與 type III 膠原分子的含量皆顯著增加(圖 3-6, 3-7)。樟芝菌株發酵液 0.5、2.0 g/kg 的處理，對於肝臟中增加的 type I、type III 膠原蛋白有減少的傾向。

討 論

DMN 誘發的大鼠肝臟損傷，其組織病理的特徵為出現嚴重中央小葉壞死、出血、膽道增生、細胞壞死和橋樑狀壞死，而肝臟纖維化是 DMN 肝損傷的最主要特徵 (Joseph George, 2001)。本實驗 DMN 肝損傷組的肝臟切片，在顯微鏡下的觀察結果及肝臟中 hydroxyproline 含量與其他研究者的實驗結果一致 (Pines *et al.*, 1997；Ala-Kokko *et al.*, 1989)。

肝細胞中富含酵素，會脫逸於血循環中，尤其是 GOT 和 GPT 急遽升高，變動頗為敏銳，常被用做評估標準。(Akahori A., 1978)。對於肝臟，GPT 比 GOT 更具專一性 (許朝添, 2002)。本實驗 DMN 誘發肝臟損傷，血清 GOT、GPT 的活性明顯上升，樟芝發酵液能明顯的降低血清中的 GPT 值，顯示其能減輕 DMN 對肝臟的傷害。

肝硬化的病人其血液流入肝臟會受到阻力，不僅造成肝臟壓力增加，在胃腸道甚至在脾臟其血流阻力亦會增加；因此，脾臟腫大為肝硬化一普遍的併發症 (Gill *et al.*, 1997)。本實驗結果顯示，DMN 會導致明顯的肝臟萎縮和脾臟腫大，投予樟芝發酵液能顯著改善 DMN 引起的肝臟萎縮及脾臟腫大現象。

血清中的白蛋白主要來自肝臟的合成，因此在肝纖維化時血清中白蛋白值下降 (Vandenberghe, 1996)。在本試驗 DMN 誘發肝纖維化，最後也出現血清中白蛋白下降、及肝臟蛋白質含量減少的情形。樟芝發酵液能有意義的提升血清白蛋白及肝臟蛋白質含量，顯示樟芝發酵液有提升肝功能的作作用。

肝臟中清除自由基的酵素有 SOD、catalase 和 GSH-P_x，本實驗以 DMN 誘導大鼠肝損傷，導致肝臟的 SOD、catalase、GSH-P_x 活性明顯降低，樟芝發酵液對 SOD、catalase、GSH-P_x 的活性皆沒有改善作用。由實驗結果推測樟芝發酵液的作用不是經由提升肝臟的抗氧化活性。

慢性肝炎會引起肝臟纖維化，即結締組織增生。結締組織主要由膠原蛋白構成，hydroxyproline 是膠原蛋白特有的成分，測定 hydroxyproline 的量可以反應膠原蛋白的量，可用來表示纖維化的程度(Hanauske-Abel, 1996)。在本試驗 DMN 造成的肝損傷，其肝臟 hydroxyproline 含量明顯增加，樟芝發酵液能使 hydroxyproline 含量有意義減少，顯示其可以減輕肝臟纖維化的作用。

肝臟纖維化主要的組成是膠原纖維(collagen)，膠原分子的每條多肽，被稱為是 鏈 (chain)，它們彼此纏結而形成一右旋的三股螺旋。組成螺旋體的 鏈並不完全相同，根據 鏈的不同，目前已發現了 19 種不同的膠原 (Olsen *et al.*, 1993)。已有文獻指出 DMN 誘導的大鼠肝纖維化以增加 type I 及 type III collagen 為主 (George and Chandrakasan, 1996)。在本研究以肝臟 mRNA 的表現量，也發現 DMN 能明顯增加 type I 及 type III collagen。樟芝發酵液的處理對此二種 collagen 的 mRNA 的表現僅有抑制的傾向。雖然樟芝發酵液對 DMN 誘發的 hydroxyproline 量有減少作用，但減少的比率不高因此在 mRNA 的表現不容易顯現出來。