



中國醫藥大學
中國醫學研究所
碩士學位論文

編號:GICMS-326

中藥黃耆刺激周邊神經膠細胞 Rsc 96 增生之分子機轉

Mechanisms of the proliferate effects of Huangqi on
Rsc 96 peripheral Schwann cells

指導教授：黃志揚 博士 (Chih-Yang Huang, Ph. D.)

協同指導教授：林昭庚 博士(Jaung-Geng Lin, Ph. D.)

陳悅生 博士(Yueh-Sheng Chen, Ph. D.)

研究生:柯富揚

中華民國九十七年七月

中 文 摘 要

中藥黃耆刺激周邊神經細胞 Rsc 96 增生之分子機轉

研究生:柯富揚

指導教授:黃志揚 教授

協同指導教授:林昭庚 教授

陳悅生 教授

中國醫藥大學 中國醫學研究所

黃耆為坊間經常使用之中藥材，其傳統的療效為增強心臟收縮力、擴張血管以及抗病毒等功能。而近年來則有文獻指出，黃耆具有促進軸突成熟、保固神經以及刺激血管內皮細胞生長之作用；因此，我們可以合理的猜測黃耆似乎具有促進神經細胞再生的作用。本實驗採用 Rsc 96 史旺細胞株，加入不同濃度之黃耆(1.25 $\mu\text{g/ml}$ ，12.5 $\mu\text{g/ml}$ ，125 $\mu\text{g/ml}$ ，250 $\mu\text{g/ml}$ ，500 $\mu\text{g/ml}$)；由 MTT 及傷口癒合實驗得知，黃耆具有促進史旺細胞增生的能力，細胞增生抗原 PCNA 的蛋白表現量亦隨著加藥濃度增加而上升。在分子傳遞路徑方面，以 RT-PCR 及 western blot 偵測 cell cycle 以及 FGF-2-UPA 訊息因子的表現量；結果發現，這兩條路徑之調控因子之 mRNA 及蛋白質表現量皆被明顯活化；而 UPA 的抑制蛋白 PAI-1 的表現量則被抑制。以 zymography 和 migration assay 實驗結果得知，黃耆會經由活化 MMP 9 刺激 Rsc 96 史旺細胞的轉移能力。除此之外，我們更以 MEK、JUK 以及 P38 之化學抑制劑證明出，黃耆同時亦會經由活化 ERK 和 P38 蛋白，刺激史旺細胞增生。統整以上之實驗結果，可知黃耆會經由活化

FGF-2 pathway，刺激史旺細胞的轉移能力；並同時活化了 MAPK 及 Cell cycle signaling，進而刺激史旺細胞之細胞增生的能力；因此促進了神經細胞的再生作用。

Abstract

Mechanisms of the proliferate effects of Huangqi on Rsc 96
peripheral Schwann cells

Student: Fu-Yang Ke

Adviser : Chih-Yang Huang Ph D

Co-advisor : Jaung-Geng Lin Ph D

Yueh-Sheng Chen Ph D

Institute of Chinese Medical Science of

China Medical University

The aim of the present study was to evaluate the proliferative effects of huangqi on neuron regeneration. RSC96, Schwann cells. We investigate the molecular mechanisms, which include :(1) proliferative signaling, HGF-cMET-Cell cycle factors and EGFR-MEK-ERK pathways, and survival signaling. (2) anti-scar signaling, FGF-2-UPA-MMPs. After treat with different concentrations (1.25 μ g/ml , 12.5 μ g/ml , 125 μ g/ml , 250 μ g/ml , 500 μ g/ml) of Huangqi, we confirmed it can increase Rsc 96 cell proliferation in the best concentration of 12.5 μ g/ml(P<0.01) by MTT and wound healing test. In addition , examined by RT-PCR and western blotting assay , Huangqi enable to stimulate FGF-2-UPA-MMPs pathway regulator and cell cycle controlling protein mRNA and protein expression , and then excite MAPK signaling pathway to promote the proliferation. Using chemical inhibitors, U0126, SB203580, and SP600125, the proliferative effects of huangqi on RSC cells were identified to be ERK signaling-dependent. On the basis of the results, applying appropriate dose of huangqi with biomedical materials would be a potential approach for enhancing neuron regeneration.

目 錄

| | |
|---------------------------------|-----|
| 中文摘要----- | I |
| 英文摘要----- | III |
| 第一章 前言----- | 1 |
| 第二章 文獻探討----- | 2 |
| 第一節 神經系統----- | 2 |
| 第二節 周邊神經損傷與神經再生----- | 3 |
| 第三節 史旺神經細胞與神經再生----- | 5 |
| 第四節 黃耆----- | 7 |
| 第五節 神經再生的訊息傳遞路徑----- | 9 |
| 第三章 材料與方法----- | 14 |
| 第一節 實驗材料----- | 14 |
| 1.1 細胞培養----- | 14 |
| 1.2 MTT----- | 15 |
| 1.3 細胞 mRNA 萃取----- | 15 |
| 1.4 RT-PCR----- | 15 |
| 1.5 DNA 電泳----- | 16 |
| 1.6 蛋白質定量----- | 16 |
| 1.7 西方墨點(Western blotting)----- | 16 |

| | |
|------------------------------------|----|
| 1.8 細胞移動實驗(Migration assay) | 18 |
| 1.9 蛋白分解酵素膠電泳法(Gelatin Zymography) | 19 |
| 第二節 實驗方法 | 20 |
| 2.1 細胞培養 | 20 |
| 2.2 冷凍保存細胞 | 20 |
| 2.3 黃耆之萃取 | 21 |
| 2.4 藥劑處理時間點 | 21 |
| 2.5 MTT (細胞存活測定) | 22 |
| 2.6 傷口癒合實驗(Wound healing assay) | 22 |
| 2.7 細胞 mRNA 萃取 | 23 |
| 2.8 反轉錄作用(RT) | 23 |
| 2.9 引子合成 (Primer Synthesis) | 24 |
| 2.10 聚合酵素連鎖反應(PCR) | 25 |
| 2.11 DNA 電泳 | 25 |
| 2.12 細胞總蛋白萃取 | 26 |
| 2.13 蛋白質定量 | 26 |
| 2.14 西方墨點(Western blotting) | 27 |
| 2.15 細胞移動實驗(Migration assay) | 28 |
| 2.16 蛋白分解酵素膠電泳法(Zymography) | 29 |

| | |
|---|----|
| 2.17 分析膠原蛋白酵素定量法----- | 29 |
| 2.18 統計分析----- | 30 |
| 第四章 實驗結果----- | 31 |
| 第一節：黃耆能促進 Rsc 96 細胞的增生能力----- | 31 |
| 第二節：黃耆能活化細胞週期蛋白(Cell cycle protein)的 mRNA 以及蛋白質表現量----- | 33 |
| 第三節：黃耆經由活化 MAPK signaling pathway 促進 Rsc 96 史 旺神經膠細胞增生----- | 35 |
| 第四節：黃耆經由活化抗結痂(scar)FGF-2-UPA-MMPs 途徑因子促 進 RSC 96 史旺神經膠細胞的移動作用----- | 38 |
| 第五章 討論----- | 42 |
| 第六章 結論----- | 47 |
| 參考文獻----- | 49 |

圖目錄

| | |
|---|----|
| 圖 2.1 細胞週期(Cell cycle) | 10 |
| 圖 2.2 MAPK 訊息路徑 | 12 |
| 圖 4.1 黃耆刺激後 MTT 之實驗結果 | 31 |
| 圖 4.2 黃耆刺激後 PCNA 之表現量 | 32 |
| 圖 4.3 傷口癒合實驗 | 32 |
| 圖 4.4 傷口癒合實驗結果量畫圖 | 33 |
| 圖 4.5 RT-PCR 實驗偵測細胞週期調控因子之 mRNA 表現量 | 34 |
| 圖 4.6 西方墨點法偵測細胞週期調控因子之蛋白質表現量 | 35 |
| 圖 4.7 西方墨點法偵測 MAPK 訊息調控蛋白表現量 | 36 |
| 圖 4.8 加入 MAPK 抑制劑後 MTT 之實驗結果 | 37 |
| 圖 4.9 加入 MAPK 抑制劑後 PCNA 之表現量 | 37 |
| 圖 4.10 加入黃耆刺激後 RSC 96 細胞的移動情形 | 39 |
| 圖 4.11 移動細胞數目之量化圖 | 39 |
| 圖 4.12 RT-PCR 實驗偵測 FGF-2-UPA 調控因子之 mRNA 表現量 | 40 |
| 圖 4.13 西方墨點法偵測 FGF-2-UPA 調控因子之蛋白質表現量 | 40 |
| 圖 4.14 Zymography 實驗結果 | 41 |
| 圖 6.1 總結黃耆在 RSC96 史旺細胞株中，活化其增生及移動之分 | |

子機制-----48

表 目 錄

表 3.1 抗體詳細資料-----18~19

第一章

前言

神經再生的過程是相當複雜且漫長的。當週邊神經細胞發生損傷後，依個人年齡的不同，其神經生長速度約為每個月1到3公分不等。若神經發生損傷，卻沒有經過適當的處理，則很容易產生神經瘤，近而使得受損神經無法重整恢復；因此，多年來不斷有學者積極研究，如何提升週邊神經受損時的修補機制。中藥黃耆為藥膳中最常用的中藥之一，其主要生長於中國北方；在一般傳統療法中，常用於補益脾胃、強心、擴張血管、提高免疫功能等虛弱性所引起的疾病。近期有文獻指出，黃耆不但可以提昇癌症病患的免疫功能；其更有促進神經軸突的成熟，以及刺激血管上皮細胞生長的效用。因此，我們可以合理的推測，中藥黃耆對於神經細胞的生長機制，應該能有一定程度的刺激作用。為證明這個論點，在本篇論文中，我們使用了Rsc 96史旺神經膠細胞株，加入不同濃度的黃耆刺激(1.25、12.5、125、250 與 500 $\mu\text{g/ml}$)。同時偵測史旺神經膠細胞的增生作用以及移動情形，用來驗證黃耆對神經再生的刺激效果；並進一步的偵測與神經再生相關的訊息傳遞路徑，藉此探討出黃耆刺激神經再生的分子機制。

第二章

文獻探討

第一節：神經系統

人類的神經系統可以分為中樞神經系統 (Central Nervous System, CNS) 和周邊神經系統(Peripheral Nervous System, PNS) 兩大類。藉由複雜的神經纖維連結這兩個神經系統, 我們才能夠因應外界的環境變化而產生適當的身體反應, 並且有思考、記憶、情緒變化的能力。

而中樞神經系統包含了大腦以及脊髓, 在胚胎時期是由神經管 (Neural tube) 分化形成[1]; 由其構造與組成上可分為灰質 (Gray matter) 與白質 (White matter)。灰質負責心智運算與儲存記憶, 由神經細胞本體緊密組裝而成; 主要由神經元 (Soma)、神經膠細胞 (Neuroglia) 及血管所構成; 其在新鮮未染色狀態時呈灰色, 故稱灰質。大腦白質則由神經細胞的軸突組成; 一般認為大腦白質只是被動的基礎構造, 但最近的研究指出, 白質與學習或精神疾病有密切關係 [2]。大腦白質中大部份包有髓鞘; 並含有神經纖維, 神經膠細胞及血管 [3]。而白質組織因含高量之磷脂質, 在新鮮未染色狀態時呈白色, 故稱白質。

周邊神經系統也可以分為兩個主要的部份：軀體神經系統 (Somatic nervous system) 以及自主神經系統 (Autonomic nervous system)。軀體神經系統中的感覺神經纖維 (Sensory nerve fibers) 可將身體各部份的感覺器官所搜集到的視覺、嗅覺、味覺、觸覺等資訊傳送到大腦或脊髓。而運動神經纖維 (Motor nerve fibers) 則負責將中樞神經系統所下達的命令傳到骨骼肌以產生所需的運動。自主神經系統包含了交感神經系統 (Sympathetic nervous system) 以及副交感神經系統 (Parasympathetic nervous system)。其功能主要在於調控內臟的平滑肌運動以及內分泌腺體產生內分泌激素。

第二節：周邊神經損傷與神經再生

周邊神經損傷依嚴重程度可分為 5 級；第一級：僅神經傳導功能喪失，損傷當時雖可有神經功能的完全喪失，但在傷後數天或數週可完全恢復；第二級：軸突斷裂但神經髓鞘無斷裂；第三級：軸突和神經鞘均斷裂；第四級：神經束斷裂以及第五級：神經橫斷傷。若神經整個被截斷，則軸突的再生需要經由神經外膜的縫合，將被切斷端接合起來。但若神經損傷屬於壓碎性傷害，軸突雖然會斷裂，但神經束以及神經髓鞘中的結締組織保留完整；因此，此種傷害並不需要手術加以

復原[4, 5]。而以下敘述的神經再生程序乃應用於完全切除乾淨且重新修復神經中。

神經再生過程可分為三個階段：軸突芽生；再生軸突的生長、延伸以及恢復神經支配原靶器官 [6]。當神經被切斷時，許多的變質性變化 (Degenerative changes) 會發生，而干擾神經的傳導路徑。在受傷的前 3~5 天內，軸突 (Axon) 末梢到切斷部分會開始變質，並且分裂成許多不規則的片段；巨噬細胞和纖維母細胞會充斥於被切斷的神經端之間的空間中，並將變質的軸突片段清除。而連接細胞體的軸突部分，受傷之初亦會產生些微的變質，然後便會開始再生，產生球狀的肥大，並生成許多軸突芽 (Sprout)。在軸突芽生成的同時，史旺細胞則開始大量的增生，並移動到受損的部位；最後便形成替代軸突的細胞索套。大約在神經截斷後 2 週，這些軸突芽會被切斷部位生成的結痂所包裹，隨後連結上史旺神經膠細胞形成的細胞索套[7]。當連接完成之後，只有一個軸突芽可生成新的軸突，其餘的將會變質分解。隨後，史旺神經膠細胞便會生成新的髓鞘質，圍繞在新的軸突上，最後，整條神經再生完成[8]。

第三節：史旺神經細胞與神經再生

一個完整的神經細胞包含了細胞本體(Cell body)、樹突(Dendrite)和軸突(Axon)；樹突負責將資訊帶回細胞；而軸突則是負責將訊息傳遞出去。而軸突的外部會有一層史旺神經膠細胞(Schwann cell)包覆，其可以隔離每個神經細胞間的電子傳遞作用，避免各種不同的神經傳導路徑相互干擾。

約在 20 年前，柏恩奇[9]提出了一個假說，質疑是否可將史旺神經膠細胞從自體神經組織中分離培養，並將培養後的史旺細胞植入於受損的神經組織中，以促進神經的再生。如今，史旺細胞對於受損神經中，軸突再生的促進作用，早已被肯定；而其在週邊神經結構組成中的特殊地位和作用，一直是研究的重點。史旺神經膠細胞促進神經再生的作用機制，可統整出以下兩點：

1. 史旺神經膠細胞可促進軸突再生一周邊神經受損時，史旺細胞會移動到受損的部位[10]；此時，史旺神經膠細胞會不斷分裂增殖，並對再生軸突起引導作用，誘導其生遷移之方向。其同時能分泌神經生長因子 (Nerve growth factor, NGF)、神經元營養因子 (Neurotrophic factors, NTFs)、促神經軸突生長因子 (Neurite promoting factor, NPFs)、基膜索 (Laminin) 和纖維連結素等

20 多種多肽類活性物質，誘導刺激和調控軸突的再生和髓鞘的形成[11]。

2 史旺神經膠細胞促進再生軸突的髓鞘化

在神經受損後，神經纖維變性的同時，包圍在軸突外之史旺神經膠細胞受損傷之刺激，會重新進行細胞分裂，並大量的增生；一旦變性的軸突及髓鞘被清除後，就形成了史旺神經膠細胞包圍而成之套管。損傷不嚴重的神經元不久會在切斷的軸突處產生許多小芽體，這些芽體漸漸生長，如其中一個芽體尋得且進入史旺神經膠細胞所形成之套管內，則繼續生長，最後到達其原來終止的區域或構造上，其他未進入史旺神經膠細胞套管之芽會消失；重新在新長出的軸突其上方之史旺神經膠細胞則會形成新的髓鞘[12-14]。另一方面，schwann cell 表達的細胞粘附分子(如 Neural cell adhesion molecule, NCAM 和 NCAM-L1)、髓磷脂相關糖蛋白(myelin-associated glycoprotein, MAG)和 P₀ 核糖蛋白均參與週圍神經系統的髓磷脂形成，其中 P₀ 核糖蛋白起核心作用，NCAM、NCAM-L1 和 MAG 則主要起穩定髓鞘的作用[15]。

近年來，有研究者便將截斷神經的兩斷端，縫入已事先填入史旺神經膠細胞之生醫材料製成的神經管中，並藉由史旺氏細胞的刺激來

促進神經的再生[16]。另外，有研究指出史旺細胞對於類似轉植的臨床應用來說是需要的；所需的史旺神經膠細胞也可從新生老鼠的周邊神經大量取得[17]。

第四節：黃耆

中藥黃耆為豆科植物蒙古黃耆（*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. Var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao）或膜莢黃耆（*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.）的乾燥根；其化學成分含多糖、單糖、黃酮類、生物鹼（膽鹼、甜菜鹼）、多種氨基酸、葡萄糖醛酸及微量葉酸等，及硒、硅等多種微量金屬元素[18, 19]。主要產於甘肅、陝西、蒙古、河北、山西等地 [19, 20]。

黃耆為常用中藥，始載於《神農本草經》。甘，微溫。歸肺、脾經。生黃耆具有能補氣升陽、興奮呼吸、利尿消腫、脫毒排膿、改善貧血的功能。常用於慢性衰弱症，中氣虛弱，體倦乏力，中氣下陷之脫肛，子宮脫垂，內臟下垂，周圍神經麻痺，慢性風濕關節炎，肩關節周圍炎，急性慢性腎炎，肢體浮腫，蛋白尿，糖尿病(消渴)等病症[20, 21]。而除了其傳統療法之外，如今已經有許多的學者研究出，黃耆對於現代臨床醫學的應用以及治療功效；在此將較為廣泛探討的

療效統整如下：

1. 具抗氧化能力：

已有實驗證明黃耆皂素(Astragalosides)可增加心肌細胞自由基的移除以及減緩脂質過氧化作用[22]。在動物實驗中發現，黃耆皂IV (Astragaloside IV) 可提升心臟中超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 的表現量，對於心臟缺氧(Myocardial ischemia) 具有保護作用[23]。黃耆皂苷(Astragalus saponin)因具有多酚結構，所以有抗氧化的效果，可以保護腦部神經細胞，免受腦部缺血時，其中組織所釋放出的自由基造成傷害[24]。

2. 增強免疫功能：

水煎黃耆可明顯促進自然殺手細胞 (Natural Killer Cells) 活性，其單一成份黃耆多醣體可以提昇人體中的免疫球蛋白的免疫能力，並活化B細胞和巨噬細胞[25, 26]；對細胞免疫和體液免疫均有增強作用。另外，黃耆更可以提升癌症病患其原本被抑制之T細胞以及巨噬細胞的作用能力[9, 26]。

3. 降血糖：

黃耆皂 I (Astragaloside I) 可降低糖尿病早期之大白鼠血中葡萄糖濃度[27]。由STZ(Streptozotocin)所誘導之第二型糖尿病鼠，長期服用黃耆後，可以降肌肉對胰島素接受的敏感性，進而間接降低

糖尿病的血糖[28]。

4. 其它:

其餘一些較不廣泛使用之黃耆療效簡述如下:

- (1) 促進大白鼠的腦下垂體分泌生長激素[29]。
- (2) 在大白鼠的實驗中，可以抑制特異性過敏皮膚炎[30]。
- (3) 可降低不孕症發生的機率，提升精蟲活動的能力[31]。
- (4) 可以有效降低長期菸癮患者，在戒斷時所造成的煙癮戒斷中不適的症狀[32]。
- (5) 黃耆同時能作為替代雌激素的植物荷爾蒙[33]。

近期則有文獻指出，黃耆有促進神經軸突的成熟，以及活化血管上皮細胞生長週期(Cell cycle)的效用[34]。因此，我們可以合理的推測，中藥黃耆對於神經細胞的生長機制，必定有相當程度的刺激作用。

第五節:神經再生的訊息傳遞路徑

因神經再生作用其中兩項重要機制為史旺細胞的增生作用以及其移動功能；因此，在本篇論文中，針對增生作用我們偵測了細胞週期(Cell cycle)以及有絲分裂原活化蛋白激酶(Mitogen-Activated Protein Kinase, MAPK)兩個與細胞生長極為相關的訊息路徑。再者，

從已經確定的動物模式中，在老鼠的坐骨神經之近端及遠端中間插入導管讓史旺細胞充填在其中之後，發現類纖維生長因子-2 (Fibroblast growth factor-2, FGF-2)大量表現[17]；由此我們針對史旺細胞的移動功能則偵測了FGF-2-MMPs 訊息路徑；希望能藉此找出黃耆對於神經細胞再生的分子調控機制。而以上所敘述之訊息傳導作用則詳述於下：

1. 細胞週期(Cell cycle)

細胞分裂週期分為幾個階段，依照其發生順序可分為 G1:DNA 合成前期、S: DNA 合成時期、G2: 有絲分裂(Mitosis)前期以及 M: 有絲分裂時期。細胞在 G1 時期會開始準備 DNA 複製的材料，接著進入 DNA 複製的 S 期；當 DNA 複製完全後，會進入 G2 時期準備細胞分裂的材料；最後進入有絲分裂時期，完成整個細胞週期[35]。

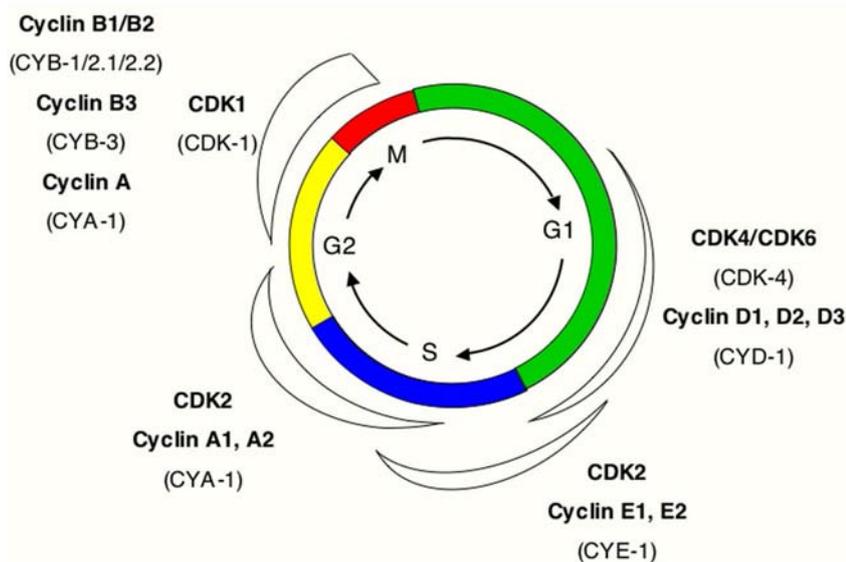


圖2.1 細胞週期(Cell cycle)

細胞週期的進行是由不同的週期素(Cyclin)所調控。週期素意味著這些蛋白質的表現量會隨著細胞週期的進行而有所變化，在G1期首先會大量表現週期素D (Cyclin D)，漸漸則由週期素E (Cyclin E)取代，而之後的變化則是E→A→B [36]。

在細胞進行複製週期時，Cyclin D1會在早期G1時期會大量表現，與依賴週期素激酶 (Cyclin-dependent kinase 4/6；CDK4/6)形成複合體後，進而磷酸化視網膜細胞瘤(Retinoblastoma；Rb) 蛋白，促使轉錄因子E2F從Rb上游離出來開啓基因的轉錄作用(Transcription)；刺激細胞週期由G1時期進入S時期[37]。Cyclin E 則會在G1末期開始表現，並大量生成於S時期；它的功能主要是協助調控細胞由G1時期進入S時期以及啟動DNA的複製作用[38]。其調控方式與Cyclin D1雷同；Cyclin E 亦會與Cyclin-dependent kinase (CDK) 之一的CDK2結合後，磷酸化視網膜細胞瘤(Retinoblastoma；Rb) 蛋白，開啓基因的轉錄作用(Transcription) [39]。而Cyclin A同時調控了S進入G2以及有絲分裂(Mitosis)時期，當Cyclin A會與CDK2結合，並受到Cyclin B的調節；Cyclin A與Cyclin B會共同調控細胞的有絲分裂[40]。

2. 有絲分裂原活化蛋白激酶(Mitogen-Activated Protein Kinase，MAPK)訊息傳遞路徑

當細胞受到生長因子(Growth factor)或細胞激素(cytokine)刺激後，MAPKKK (MAP kinase kinase kinase)，如C-RAF、ASK-1、MEKK1&4，會最先被活化；進而磷酸化MAPKK (MAP kinase kinase)，如MEK1/2、MKK3/6、MKK4/7；接著再進一步活化磷酸化MAPK(mitogen-activated protein kinase)，如ERK1/2、P38、JNK1/2。最後，細胞會透過MAPK的被活化，刺激細胞增生(proliferation)、分化(differentiation)、發炎反應(inflammation)以及凋亡作用(apoptosis) [41]。

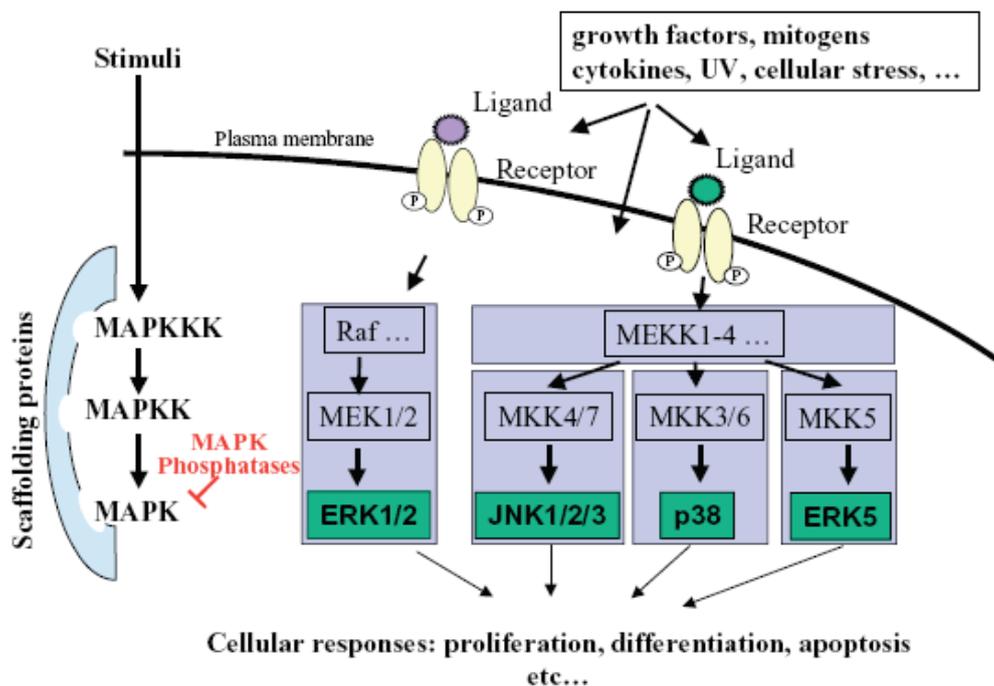
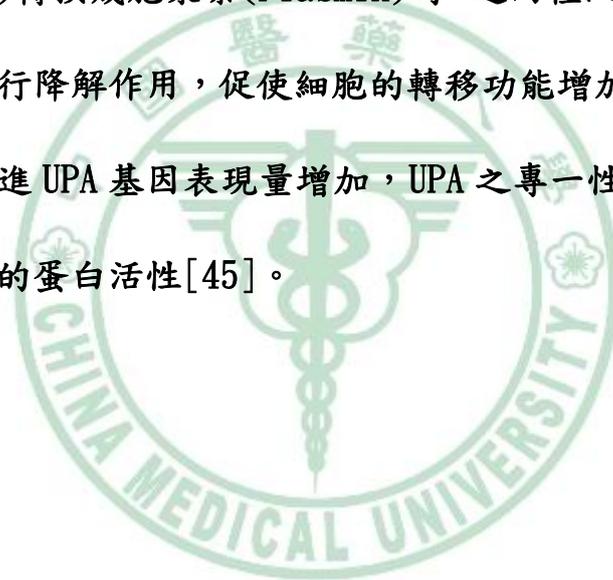


圖2.2 MAPK 訊息路徑

3. FGF-2-MMPs 訊息路徑

FGF-2 為纖維母細胞生長因子(Fibroblast Growth Factor)，經由腦下垂體分泌出，分子量為 18kDa。FGF-2 在 in vivo 及 in vitro 中為有效的血管增生因子，並且刺激平滑肌細胞的生長，負傷治癒，

及組織修補。除此之外，更已經有文獻指出，在受損的神經組織中，FGF-2 會大量表現，並促進神經修復的功能[42]。同時，在傷口癒合的過程中 UPA(Urokinase plasminogen activater)會活化基質金屬蛋白酶(Matrix metalloproteinase, MMP)調控細胞外基質(Extracellular matrix, ECM)的重建及參與傷口的復原及細胞的再生(43)。除此之外，UPA 若同時活化了 MMPs，以及促進胞漿素原(Plasminogen)轉換成胞漿素(Plasmin)時，這兩種細胞外基質的分解蛋白會不斷進行降解作用，促使細胞的轉移功能增加[44]。而 FGF-2 的活化亦能促進 UPA 基因表現量增加，UPA 之專一性抑制蛋白 PAI-1 則會抑制 UPA 的蛋白活性[45]。



第三章

材料與方法

第一節 實驗材料

1.1 細胞培養

DMEM (Gibco, 12100-046 ; USA)

DMEM ; No phenol red (Sigma, D2902 ; USA)

PBS (Gibco, 21600-010 ; USA)

CCS (Cosmic Calf Serum ; HyClone, DMK0096 ; USA)

Sodium bicarbonate (Sigma, S-5761 ; NaHCO₃ ; USA)

Non-essential amino acid (HyClone, SH30238.01 ; USA)

Antibiotic-Antimycotic (Gibco, 15240-062 ; USA)

Trypsin-EDTA(Gibco, 25200-056 ; USA)

DMSO (Sigma, D2650 ; USA)

處理用藥

U0126=MEK inhibitor (Promega, V1121 ; USA)

SB203580=p38 inhibitor (Promega, V1161 ; USA)

SP600125=JNK inhibitor (BIOMOL, EI-305 ; USA)

1.2 MTT

Thiazolyl blue tetrazilium bromide (MTT)(Sigma, M5655 ; USA)

1.3 細胞 mRNA 萃取

UltraSpec™ RNA reagent (Biotecx, BL-10500 ; USA)

Chloroform (Merck, 1.02445.1000 ; Germany)

2-Propanol (Sigma, I-9516 ; USA)

Ethanol (Merk, 1.00983.2500 ; Germany)

Diethyl pyrocabonate (DEPC ; Sigma, D-5758 ; USA)

1.4 RT-PCR

M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, M-170A ; USA)

M-MLV Reverse 5 × Buffer (Promega, M-531A ; USA)

Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor (Promega, N-251B ; USA)

Deoxynucleotide Triphosphate (dNTPs) (Promega, U-1240 ; USA)

Oligo - dT (明欣生物技術有限公司 ; 台灣)

Taq (DNA polymerase ; Finnzymes, F501L ; Finland)

10 × PCR Buffer (Finnzymes, F511L ; Finland)

1.5 DNA 電泳

Agarose (Amresco, 0710 ; USA)

100 bp ET marker (Progema, G-2101 ; USA)

Ethidium bromide (EtBr ; Progema, H-5041 ; USA)

5 × TBE solution (Amresco, J885 ; USA)

1.6 蛋白質定量

Lowry Protein assay

Na-K tartrate (Potassium Sodium Tartrate ; (Sigma, P-0165 ; USA)

CuSO₄ · 5H₂O (Copper[II] Sulfate Pentahydrate ; 和光, 030-04425)

Na₂CO₃ (Sodium Carbonate ; 和光, 199-01585 ; 台灣)

NaOH (Sigma, S-5881)

Folin - Ciocalteu phenol reagent (合光, 279-08895 ; 台灣)

1.7 西方墨點(Western blotting)

A. Cell lysis buffer

Tris-base (USB, T8600 ; USA)

NaCl (Sigma, S-7653 ; USA)

EDTA (Sigma, E-5134 ; USA)

β -mercaptoethanol (Pharmacia Bioetch, 17-1317-01 ; Sweden)

NP 40 (Sigma, I-3021 ; USA)

Glycerol (Angus, 07-52305 ; USA)

Protease inhibitor cocktail tablet(Roche, D68298 ; Switzerland)

B. Western blot buffer

40% Acrylamide / Bis Solution 29:1 (MDBio, Inc. 903039 ; USA)

Solution B

Tris-base(PH 8.8) (USB, T8600 ; USA)

Sodium dodecyl sulfate (SDS ; Sigma, S-5761 ; USA)

Solution C

Tris-base(PH 6.8) (USB, T8600 ; USA)

Sodium dodecyl sulfate (SDS ; Sigma, S-5761 ; USA)

Ammonium persulfate (APS ; Amresco, 0486-25G ; USA)

TEMED (platinum Plus 【CPG】 , P-E90051)

Glycine (USB, G-8165 ; USA)

Glycerol (Angus, 07-52305 ; USA)

Methanol (台灣聯工, 940103)

Tween 20 (Pharmacia Biotech, 17-1316-01 ; USA)

Sodium chloride (NaCl ; Sigma, S-7653 ; USA)

Ponceau S solution (Sigma, P-7170 ; USA)

Blocking buffer (安佳脫脂奶粉 ; Anchor New Zealand Milk)

Enhanced chemiluminescence(ECL) reagent (Santa Cruz

Biotechnology, C2604 ; USA)

C. 5x loading dye

Bromophenol Blue (Sigma, B-525 ; USA)

β -mercaptoethanol (Pharmacia Bioetch, 17-1317-01 ; Sweden)

Sodium dodecyl sulfate (SDS ; Sigma, S-5761 ; USA)

Glycerol (Angus, 07-52305 ; USA)

Tris-HCl (USB, T-8650 ; USA)

D. 抗體

| 1. st Ab | M. W. (KDa) | 2. st Ab | 廠牌 | 貨號 |
|-----------|-------------|----------|------------|----------|
| PCNA | 34~43 | rabbit | SANTA CRUZ | SC-7907 |
| FGF-2 | 19 | rabbit | Upstate | SC-79 |
| UPA | 29~36 | rabbit | SANTA CRUZ | SC-14019 |
| PAI-1 | 50 | rabbit | SANTA CRUZ | SC-8979 |
| Cyclin D1 | 36 | mouse | SANTA CRUZ | SC-246 |
| Cyclin E | 53 | mouse | SANTA CRUZ | SC-25303 |
| Cyclin A | 60 | rabbit | SANTA CRUZ | SC-751 |

| | | | | |
|-------------------|-------|--------|------------|---------|
| P38 | 38 | mouse | SANTA CRUZ | SC-535 |
| P-P38 | 38 | mouse | SANTA CRUZ | SC-7973 |
| ERK | 44 | rabbit | SANTA CRUZ | SC-94 |
| P-ERK | 44 | mouse | SANTA CRUZ | SC-7383 |
| JNK1/2 | 49/54 | mouse | SANTA CRUZ | SC-571 |
| P-JNK | 49/54 | mouse | SANTA CRUZ | SC-6254 |
| α -tubulin | 57 | mouse | SANTA CRUZ | SC-5286 |

表 3.1 抗體詳細資料

1.8 細胞移動實驗(Migration assay)

Boyden chamber

Polyvinyl-pyrrolidone-free polycarbonate membranes with $8\mu\text{m}$ pore (Neuro Probes, Inc. 249447 ; USA)

Giemsa stain (Sigma, GS-500 ; USA)

1.9 蛋白分解酵素膠電泳法 (Gelatin Zymography

Protease Assay)

Geletin (Sigma, G-9382 ; USA)

Triton X-100 (TEDIA, 612026)

Tris-HCl (USB, 22676 ; USA)

CaCl₂ (SHOWA, 0305-2250 ; Japan)

NaN₃ (Merck, 1.06688.0100 ; USA)

Coomassie blue R-250 (BIOLOGICAL, C. I. 42660, USA)

第二節：實驗方法

2.1 細胞培養

以含有 10% 胎牛血清、1.5 g/l Sodium bicarbonate、0.1 mM Nonessential amino acid、0.1 mM Sodium pyruvate 及 1% 抗生素之 DMEM 培養液培養 RSC96 史旺神經膠細胞株。將 RSC96 培養於 37 °C，5% 二氧化碳的環境之下；每隔兩天更換一次培養液，並於細胞生長至八分滿時，先以 PBS 清洗細胞兩次，再用 1% Trypsin 將細胞從培養皿上游離下來，取約 1/5~1/10 之細胞量至新的培養皿做繼代培養。

2.2 冷凍保存細胞

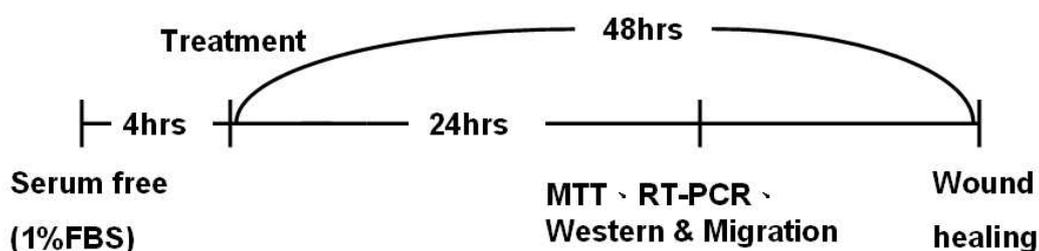
以 10 公分培養皿培養細胞至八~九分滿，並在準備凍細胞的前一天先換上新鮮的培養液。先用 PBS 清洗細胞兩次，並以 1% Trypsin 將細胞從培養皿上游離下來，裝入 15 ml 離心管中；離心 800rpm、5 分鐘後吸掉上清液，再用 10% 的 DMSO-DMEM 稀釋液回溶細胞並均勻打散；最後各取 1ml 含有細胞的稀釋液至冷凍管中，置入 -80°C 冰箱

overnight，隔天放入液態氮桶中保存。若要解凍細胞，則將細胞快速的從液態氮桶中取到 37°C 水浴槽中回溫溶解；培養於 10 公分培養皿，並在隔天更換新的培養液即可。

2.3 黃耆之萃取

本實驗所使用的中草藥黃耆皆冷凍乾燥完成之粉狀藥物，平常保存在-80°C 冰箱；要拿去作細胞加藥處裡前是先秤取所需的量再到無菌操作台中，用滅菌過的二次水來稀釋成 1.25 $\mu\text{g/ml}$ ，12.5 $\mu\text{g/ml}$ ，125 $\mu\text{g/ml}$ ，250 $\mu\text{g/ml}$ ，500 $\mu\text{g/ml}$ 的濃度裝在 1.5ml 的 Eppendorf 中；並以 0.8 μm 之 filter 過濾。為避免污染，稀釋好的中草藥用 Parafilm 膜將 Eppendorf 的蓋子封好，可以放置 -20°C 冰箱保存。

2.4 藥劑處理時間點



2.5 MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-terazolium bromide, 細胞存活測定)

將 Rsc96 神經膠細胞株培養在 24 孔盤中，加藥前先將細胞以沒有酚紅及胎牛血清(FBS)的培養基培養 4 小時，使細胞飢餓；再分別加入不同濃度的黃耆反應 24 小時。接著去掉培養基，用 PBS 清洗細胞 2 次，加 1 ml 0.5mg/ml MTT(1x)；培養在 37°C，5%CO₂，4hrs。去掉 DMEM(不要吸到紫色物質)，加 Isopropanol 1 ml 搖 10 分鐘後，取出放入 eppendorf 中，離心 1000rpm，4°C，5 分鐘；取 200 μ l 到 96well 測 570nm 的吸光值。

2.6 傷口癒合實驗(Wound healing assay)

首先將細胞培養至 8 分滿。隔天，以黃色 tip 的尖頭從培養皿正中央劃一條直線，然後以 PBS 清洗 3 次把漂浮的細胞清洗乾淨；隨後換上不含酚紅的培養液(內含 1% Charcoal 處理過之 FBS)，並將細胞依實驗需要做不同試劑處理。於 37°C，5% 二氧化碳的環境之下培養細胞 48 小時後以 PBS 清洗 3 次，最後再利用正相位差顯微鏡觀察及照相。

2.7 細胞 mRNA 萃取

將加藥處理後的細胞，除去培養液，以 PBS buffer 洗滌 2 次，加入 1ml UltraSpec (BIOTECH)，接著將細胞由培養皿刮下來，置於 1.5ml 之離心管(Eppendorf tube)，並於冰上(4°C)靜置 5 分鐘，而後加入 200 μ l 氯仿(Chloroform)並劇烈搖晃混合均勻後，於冰上靜置 5 分鐘，接著以 12000 rpm，4°C 條件離心 15 分鐘。離心後將上層液移至另一新的離心管，加入等體積之 Phenol-chloroform 混合液混合均勻，再以 12000 rpm，4°C 條件離心 10 分鐘。接著將上層液移至新離心管，加入等體積之 Isopropanol，混合均勻後於冰上靜置 10 分鐘，以 12000 rpm，4°C 條件離心 10 分鐘，接著將 Isopropanol 移除，所得之白色沈澱物(Pellet)再以 75%酒精(Ethanol)清洗兩次，每次皆以 12000 rpm，4°C 條件離心 5 分鐘。最後使移除酒精之沈澱物自然乾燥(約 20~30 分鐘)後，加入 50 μ l 之滅菌 0.1% DEPC-H₂O 溶解沈澱物，並於 55°C Incubator 中反應 10 分鐘，接著於 4°C 冰箱中貯存隔夜(Overnight)。最後測其吸光值(OD₂₆₀)以便換算所萃取之 RNA 濃度。

$$\text{RNA 濃度}(\mu\text{g/ml}) = \text{稀釋倍數} \times \text{OD}_{260} \times 40 (\mu\text{g/ml})$$

2.8 反轉錄作用(Reverse Transcription ,RT)

取 2 μ g 之 RNA，加入適量之 0.1% DEPC-H₂O 至體積為 25.75 μ l，以 70°C 處理 5 分鐘後，再分別加入 0.25 μ l RNase inhibitor (40U/ μ l)、10 μ l 5 \times RT buffer (Promega; 50mM Tris-HCl、75mM KCl、3mM MgCl₂ 及 10mM DTT)、4 μ l dNTP (Promega; 10mM)及 5 μ l Oligo dT，接著於溫度循環處理機 42°C 執行 5 分鐘後，加入 5 μ l 40U reverse

transcriptase (1 μ l 200U reverse transcriptase + 4 μ l 0.1% DEPC-H₂O), 並於 42°C 反應一小時後, 再以 99°C 執行 5 分鐘, 最後維持於 4°C 保存反轉錄所得之 cDNA 產物。

2.9 引子合成 (Primer Synthesis)

本實驗所需的引子(Primer)皆為生工公司製備, 各組引子之條件設定請參閱下述:

- (a) sense primer of FGF -2(5, -GCATCACTTCGCTTCCCGCA-3,)
antisense primer of FGF- 2 (5, -TCTGTCCAGGCCCGTTTTG-3,)
- (b) sense primer of UPA(5, -GTGCAGGACTGCTCTCTCAG-3,)
antisense primer of UPA(5, -GAGGTCCTCCTGAATCTCCC-3,)
- (c) sense primer of PAI-I (5, -TGAGATCAGTACTGCGGACG-3,)
antisense primer of PAI-I(5, -GAGGGGCACATCTTTTTCAA-3,)
- (d) sense primer of Cyclin A (5, -GCAGAGTTCTGATGGAGAGA-3,)
antisense primer of Cyclin A (5, -ACAGTCTTGCAGGTGACATC-3,)
- (e) sense primer of Cyclin B (5, -CTGCTGCAGGAGACCATGTA-3,)
antisense primer of Cyclin B (5, -CTCCGTGTGGGACAGGTAGT-3,)
- (f) sense primer of Cyclin D (5, -AGGAGACCATTCCCCTGACT-3,)
antisense primer of Cyclin D (5, -TTCTTCCTCCACTTCCCCTT-3,)
- (g) sense primer of Cyclin E (5, -CTTACCTGAGAGATGAGCAC-3,)

antisense primer of Cyclin E (5, -CACCCTGATAACCTGAGAC-3,)

(h) sense primer of GAPDH(5, -GGGTGTGAACCACGAGAAAT-3,)

antisense primer of GAPDH(5, -CCACAGTCTTCTGAGTGGCA-3,)

2.10 聚合酵素連鎖反應(polymerase Chain Reaction, PCR)

取 $5\ \mu\text{l}$ cDNA 加入 $11\ \mu\text{l}$ ddH₂O、 $2.5\ \mu\text{l}$ forward primer、 $2.5\ \mu\text{l}$ reverse primer、 $1\ \mu\text{l}$ dNTP (10 mM)、 $25\ \mu\text{l}$ 10 × PCR buffer (DyNA; 10 Mm Tris-HCl、1.5 mM MgCl₂、50 mM KCl 0.1% Triton X-100) 和 $0.5\ \mu\text{l}$ DNA polymerase (DyNA; 2U/ μl)，混合均勻後，再將樣品放回 PCR 機器中，以 94°C 反應 5 分鐘之後，進入 PCR 循環：94°C 一分鐘、primer 煉合(annealing)溫度，30 秒、72°C，一分鐘。其中循環次數依及煉合溫度則依 RNA 表現量及 primer T_m 值來決定，接著再以 72°C 反應 10 分鐘，最後以 4°C 保存。

2.11 DNA 電泳

依照不同產物的片段大小分別配製 0.8、1.2、1.6 % DNA 電泳膠片(agarose gel)。取 5 或 $10\ \mu\text{l}$ PCR 產物加入 1 或 $2\ \mu\text{l}$ 之 6 × DNA loading dye，混合均勻，再將其緩慢注入 DNA 電泳膠片之 well 中。

以 100 伏特強度之電壓進行約 35 分鐘電泳；最後以 Ethidium bromide (EtBr)作用於電泳膠片約 10~20 分鐘，利用 UV 光分析 PCR 產物其表現情形為何。

2.12 細胞總蛋白萃取

細胞依實驗需求處理過後，倒掉培養液，用 PBS 清洗細胞 2~3 次；再加入適量(150~200 μ l/dish)的 lysis buffer (50mM PH7.5 Tris- base、0.5M NaCl、1 mM pH8 EDTA、1 Mm beta-mercaptoethanol、1% NP40、1% Glycerol、protein kinase inhibitor 兩錠，溶於二次水中，總體積 20ml)，以細胞刮棒收集細胞。收集的細胞置於冰上反應 30 分鐘，每隔 5 分鐘震蕩一次，接著以 12000 rpm、4 $^{\circ}$ C 離心 20 分鐘，收取上清液即為細胞之總蛋白，可保存於-80 $^{\circ}$ C。

2.13 蛋白質定量

萃取好的蛋白以二次水做適量稀釋(10 公分培養皿培養之細胞以 200 μ l lysis buffer 收集的總蛋白約稀釋成 10~20 倍用以定量)同時以 Bovine Serum Albumin(BSA)做出蛋白質標準曲線當作對照，分別稀釋成 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/ml 的標準品。以相同體

積的標準品以及蛋白稀釋液，分別加入 250 μ l 之 Alkaline Copper reagent(2% Na-K tartrate、1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、2% Na_2CO_3 in 0.1N NaOH；三者以 1：1：98 之比例混合)，室溫作用 10 分鐘，接著加入 25 μ l 之 Folin - Ciocalteu phenol reagent，室溫作用 30 分鐘，抽取 200 μ l 至 96 孔盤中，以 750 nm 波長測定吸光值，待測蛋白之數值回歸到標準品所作出標準曲線，即可得知待測蛋白濃度。

2.14 西方墨點(Western blotting)

取樣品蛋白質 40~50 μ g，再加入 5 μ l loading dye，並用 1 倍的 PBS 將總體積補至 25 μ l；混合均勻後，將樣品蛋白以 99°C denature 5 分鐘，將水氣 spin down 後，即可進行 SDS-PAGE 電泳分析。SDS-PAGE 之上層膠為 4% 之 stacking gel，下層膠為 8%~15% (依所預測定之蛋白質分子量大小決定) 之 separating gel。把 denature 過的樣品蛋白 loading 至上層膠的 U 型槽(well)中，以 running buffer 跑膠 75 伏特、兩個小時。待電泳結束即可進行轉漬 (transfer)，以 transfer holder 的白色部份為底部，逐一平鋪浸濕之菜瓜布、Whatman 3M 濾紙、預先以甲醇浸泡的 PVDF 膜、下層膠 (separating gel)、Whatman 3M 濾紙、菜瓜布；要注意每層物質間不能含有氣泡。將 transfer holder 固定後，即可置於

electrotransfer tank，並注入 transfer buffer，於 4°C 下進行電轉漬 (transfer) 100 伏特、90 分鐘。轉漬完成後，取出 PVDF 膜並加入 blocking buffer 於室溫下搖動 1 小時；加入 1 級抗體 (2 μ l/ml with blocking buffer)，於 4°C 下反應 overnight；之後以 1 倍的 TBS buffer 清洗 PVDF 膜三次，每次 15 分鐘。而後加入 2 級抗體 (2 μ l/ml with TBS buffer)，並於室溫下反應 1 小時，再用 1 倍的 TBS buffer 清洗 PVDF 膜三次，每次 15 分鐘；最後以 ECL kit 進行冷光呈色反應。

2.15 細胞移動實驗 (Migration assay)

將細胞株培養在 6 公分培養皿，養至約 7 分滿時，換上不含酚紅的培養液，並將細胞做不同試劑處理。接著，把反應過後的細胞利用 PBS 清洗後，加入 1% Trypsin 將細胞從培養皿上游離下來，溶於 1 ml 含有 1% Charcoal FBS 的培養液中，計算細胞總數，並將每盤細胞稀釋成 1.5×10^4 cells / 50 μ l (30×10^4 cells / 1 ml) 之濃度。細胞的前處理完成之後，便可將 48 well Boyden chambers (Neuro Probe, MD, USA) 打開，於下層 chamber 注入含有 10% Charcoal FBS 的培養液；其含量為 32 μ l/well。下層 chamber 上再進一步依序放置 8 μ m pore size 的 polycarbonate filter、塑膠墊、上層 chamber

，用螺絲將 chamber 的 6 個角落都鎖緊後，於上層 chamber 加入 50 μ l 之前所稀釋的細胞溶液，過程中應注意避免氣泡的產生。用保鮮膜蓋上 chamber，在 37°C，5% 二氧化碳的環境之下培養 4~6 小時後，把 chamber 拆開，小心把 filter 拿出，將接近下層較粗糙的那面以甲醇固定 10 分鐘，再利用 0.5% Giemsa 染色 1 小時；用二次水退染，之後用拭鏡紙將 filter 背面擦拭乾淨，並將 filter 固定在新的培養皿上，在光學顯微鏡下觀察且計算移動之細胞數目。

2.16 蛋白分解酵素膠電泳法 (Gelatin Zymography Protease Assay)

將已經與黃耆反應 24 小時後的細胞培養液與 5 倍蛋白質 loading dye 混合後，置入 0.1 % gelatin - 8 % SDS-PAGE 中，在 120 V 下跑電泳 3~4 小時。接著將電泳膠片取下，以 2.5 % Triton X-100 溶液搖晃沖洗 30 分鐘兩次，使蛋白酵素功能還原。再將此電泳膠片培養於 200 ml 的反應液中 (40 mM Tris-HCl , pH 8.0 ; 10 mM CaCl₂ , 0.01 % NaN₃) , 37 °C、16 小時；最後以 0.25 % 的 Coomassie blue R-250 染色 30 分鐘，再以退色劑溶液 (875 ml dH₂O , 50 ml methanol , 和 75 ml 醋酸) 脫色。

2.17 分析膠原蛋白酵素定量法 (Quantitative Analysis of

Zymography)

表現出來的 92 kDa (proMMP-9)，72 kDa (proMMP-2) 和 62 kDa (活化 MMP-2) 膠原蛋白酶 bands，將以 AlphaImager 2000 密度儀測其相對密度結果，將以 student t-test 做統計分析， $P < 0.05$ 表現顯著差異。

2.18 統計分析

每個檢體的結果皆為三重複實驗之平均值，採用 student t-test 分析軟體； $P < 0.05$ 表示顯著性差異， $P < 0.01$ 表示極顯著性差異， $P < 0.001$ 表示超顯著性差異。



第四章

實驗結果

第一節：黃耆能促進 Rsc 96 細胞的增生能力。

先將史旺神經膠細胞 Rsc 96 轉殖至 24 孔盤培養皿中，經過隔夜使細胞貼盤，接著更換只含有 1% 胎牛血清的培養液與細胞反應 4 小時；使細胞飢餓；再加入不同濃度(1.25、12.5、125、250 與 500 $\mu\text{g/ml}$)的黃耆刺激 24 小時後；由圖 4.1 MTT 的實驗結果發現，Rsc 96 的細胞活性隨著黃耆的濃度增加，有明顯上升的趨勢；而於濃度為 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 時，效用最好 ($P < 0.01$)；而在高濃度(125~500 $\mu\text{g/ml}$)的黃耆刺激下，細胞活性雖然沒有低濃度(12.5 $\mu\text{g/ml}$)時佳，但與沒有加藥的控制組相比，其仍然有顯著性差異($P < 0.05$)。

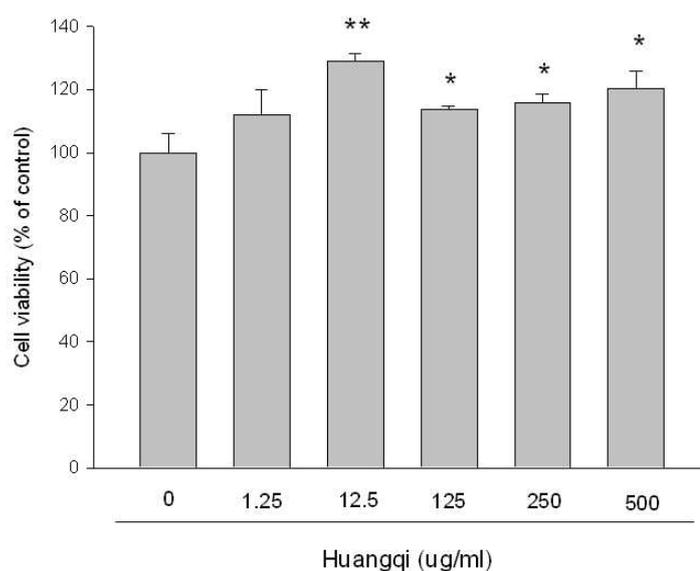


圖 4.1 黃耆刺激後 MTT 之實驗結果

我們同時也偵測了細胞增生之標定因子，細胞增生抗原 PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) 的蛋白質表現量；由西方墨點法的實驗結果得知，同樣在濃度 1.25~500 $\mu\text{g/ml}$ 的黃耆刺激之下，PCNA 蛋白的表現量有逐漸增加的趨勢，圖 4.2。

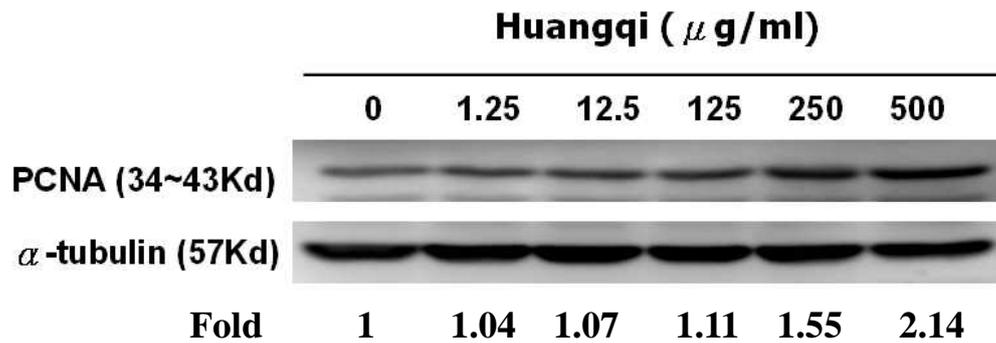


圖 4.2 黃耆刺激後 PCNA 之表現量

最後，利用傷口癒合實驗(wound healing assay) 偵測在 1.25~500 $\mu\text{g/ml}$ 的濃度之黃耆刺激之下，Rsc 96 史旺神經膠細胞的增生情形；由圖 4.3 實驗結果則觀察黃耆可明顯促進 Rsc 96 細胞快速生長。

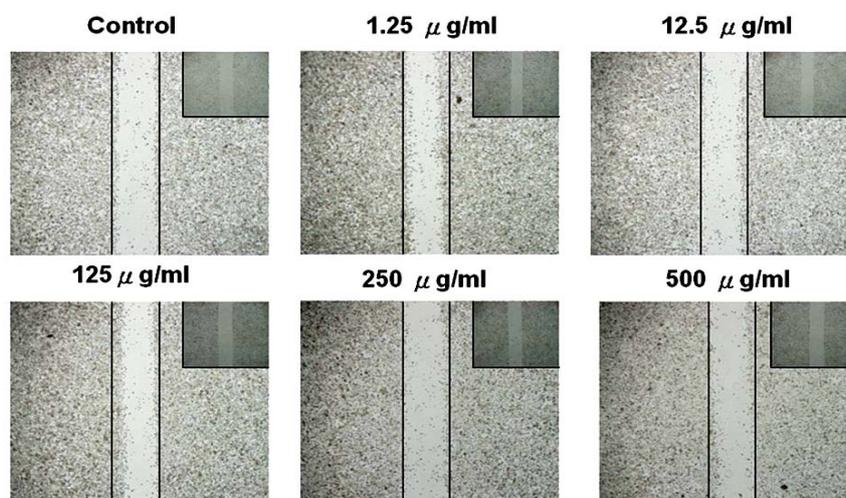


圖 4.3 傷口癒合實驗

將傷口癒合實驗中，每個組別的移動細胞數目進行統計後發現，黃耆對於促進 Rsc 96 細胞增生的作用，有超顯著性的差異($P < 0.001$)

圖 4.4。

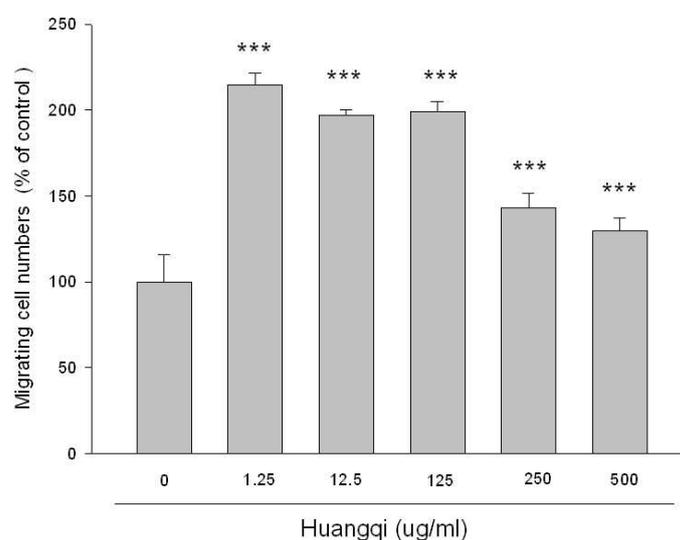


圖 4.4 傷口癒合實驗結果量畫圖

第二節：黃耆能活化細胞週期蛋白(Cell cycle protein)的 mRNA 以及蛋白質表現量。

將 Rsc 96 史旺細胞培養在 10 公分的培養皿中，當培養至 8 分滿時，更換只含有 1% 胎牛血清的培養液與細胞反應 4 小時；使細胞飢餓；再加入不同濃度(1.25、12.5、125、250 and 500 $\mu\text{g/ml}$)的黃耆刺激 24 小時；接著抽取細胞 mRNA，利用 RT-PCR 觀察細胞週期蛋白，Cyclin D1、Cyclin E 和 Cyclin A 之 mRNA 表現量。抽取細胞總蛋白質，利用西方墨點法觀察細胞週期蛋白，Cyclin D1、Cyclin E 和

Cyclin A 的蛋白質表現量。在圖 4.5 之 RT-PCR 實驗結果發現，在濃度為 1.25~125 $\mu\text{g/ml}$ 時，Cyclin D1、Cyclin E 以及 Cyclin A 的 mRNA 表現量明顯上升，但在 250 和 500 $\mu\text{g/ml}$ 的黃耆刺激下，mRNA 的表現量則開始下降。

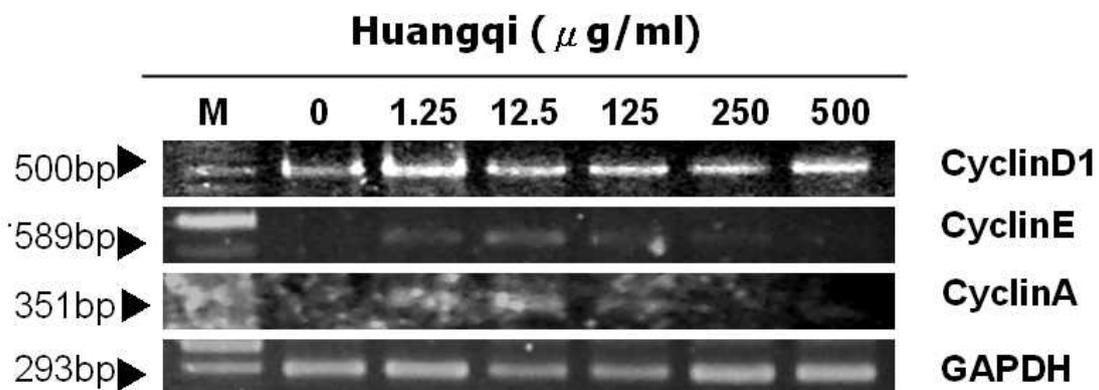


圖 4.5 RT-PCR 實驗偵測細胞週期調控因子之 mRNA 表現量

而由西方墨點法的實驗結果中則發現，Cyclin D1、Cyclin E 以及 Cyclin A 的蛋白質表現量有逐漸上升的趨勢，但唯獨 Cyclin E 的蛋白質 500 $\mu\text{g/ml}$ 的黃耆刺激下的表現量則有稍微下降的情形，圖 4.6。

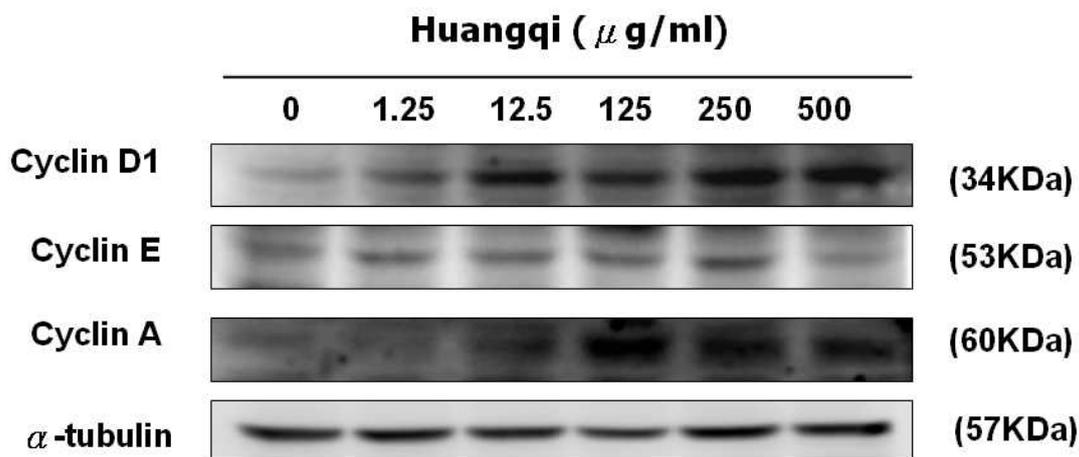


圖 4.6 西方墨點法偵測細胞週期調控因子之蛋白質表現量

第三節：黃耆經由活化 MAPK signaling pathway 促進 Rsc 96 史旺神經膠細胞增生。

我們利用 Western blot 觀察，以 1.25-500 $\mu\text{g/ml}$ 的黃耆刺激後，MAPK signaling Pathway 中主要的訊息傳遞因子 ERK1/2, JNK1/2, P38 以及其磷酸化態的蛋白表現情形。由實驗結果得知，在濃度在 12.5~500 $\mu\text{g/ml}$ 的黃耆刺激下，可活化磷酸化態的 ERK1/2 和 P38 蛋白，使其大量表現；而在濃度為 125~250 $\mu\text{g/ml}$ 時，則可促使磷酸化態的 JNK1/2 蛋白表現量上升。同時，在濃度高達 500 $\mu\text{g/ml}$ 的黃耆刺激後，則因生長活性被抑制了，其使磷酸化態的 JNK1/2 及 P38 蛋白質表現量也因此下降，圖 4.7。

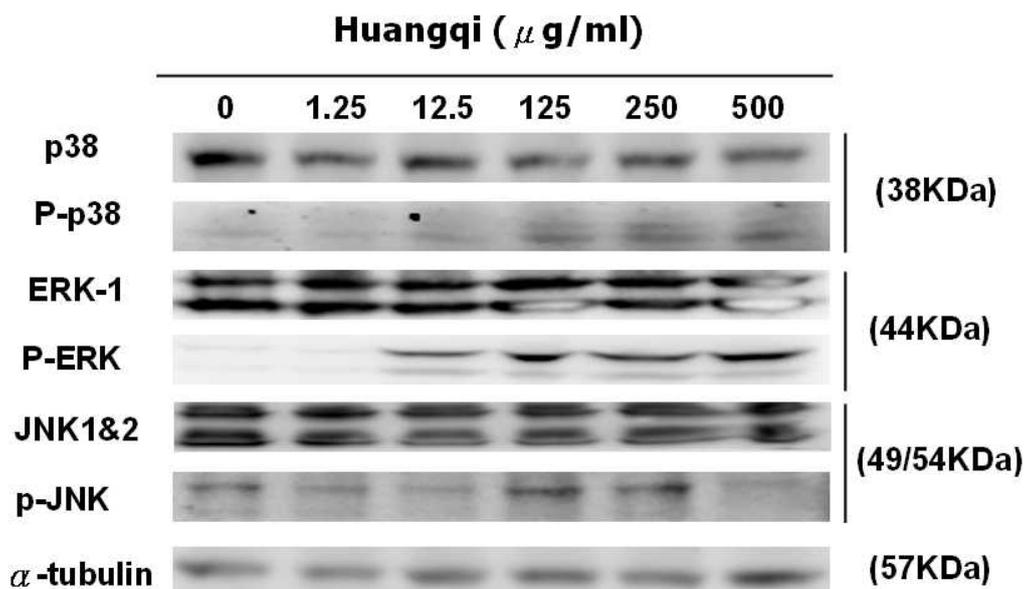


圖 4.7 西方墨點法偵測 MAPK 訊息調控蛋白表現量

接著，為了要進一步的確定黃耆促進 Rsc 96 細胞增生確實是經由活化 MAPK signaling pathway 而產生的；我們將細胞處理 125 μ g/ml 濃度的黃耆刺激後，再分別加入 MEK 的抑制劑 U0126、P38 的抑制劑 SB203580，以及 JNK 的抑制劑 SP600125，抑制上述三種蛋白的表現量；最後用 MTT 偵測細胞的活性，並以西方墨點法偵測 PCNA 的蛋白表現情形。而由圖 4.8 中 MTT 的實驗結果發現，利用 MEK 的抑制劑 U0126，抑制 MEK 蛋白表現後，原本被黃耆刺激的細胞活性明顯降低($P < 0.001$)；同樣的，加入 P38 的抑制劑 SB203580 後，細胞活性也有被抑制的情形($P < 0.05$)。

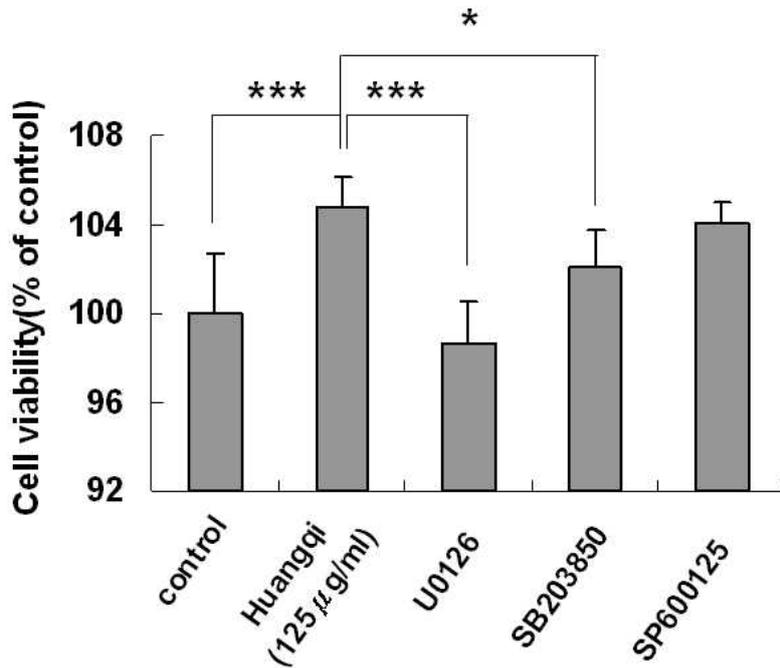


圖 4.8 加入 MAPK 抑制劑後 MTT 之實驗結果

以西方墨點法觀察到 PCNA 的蛋白表現量亦明顯下降，證明了黃耆確實是經由活化 MAPK signaling pathway 中的 P38 和 ERK 路徑來促進 Rsc 96 神經細胞增生，圖 4.9。

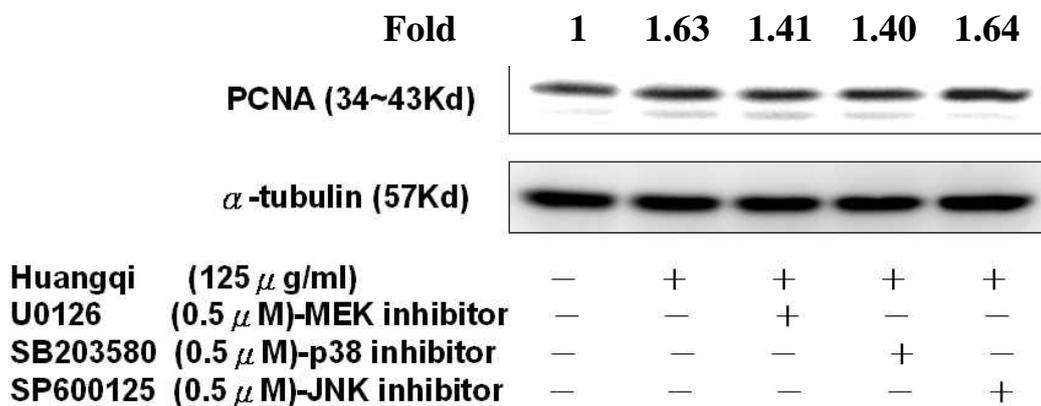


圖 4.9 加入 MAPK 抑制劑後 PCNA 之表現量

第四節：黃耆經由活化抗結痂(Scar)FGF-2-UPA-MMPs 途徑因子促進 RSC 96 史旺神經膠細胞的移動作用。

將 Rsc 96 史旺細胞培養在六孔盤的培養皿中，當培養至 8 分滿時，更換只含有 1% 胎牛血清的培養液與細胞反應 4 小時；使細胞飢餓；再加入不同濃度(1.25、12.5、125、250 and 500 $\mu\text{g/ml}$)的黃耆刺激 24 小時後；首先，蒐集細胞之培養液，利用 Zymography 實驗偵測基質金屬蛋白酶-9 & -2(MMP -9 & -2) 之活性。將細胞取下後，利用 Boyden chamber system 偵測 Rsc 96 史旺神經膠細胞的移動作用；接著抽取細胞 mRNA，利用 RT-PCR 觀察 FGF-2-UPA-MMPs 途徑因子，FGF-2、UPA 和 PAI-1 之 mRNA 表現量。抽取細胞總蛋白質，利用西方墨點法觀察 FGF-2-UPA-MMPs 途徑因子，FGF-2、UPA 和 PAI-1 的蛋白質表現量。由細胞移動實驗(Boyden chamber system)結果發現，加入黃耆的刺激後，Rsc 96 史旺神經膠細胞的移動作用有明顯增加，其中又以 1.25 $\mu\text{g/ml}$ 的效果最佳，圖 4.10。

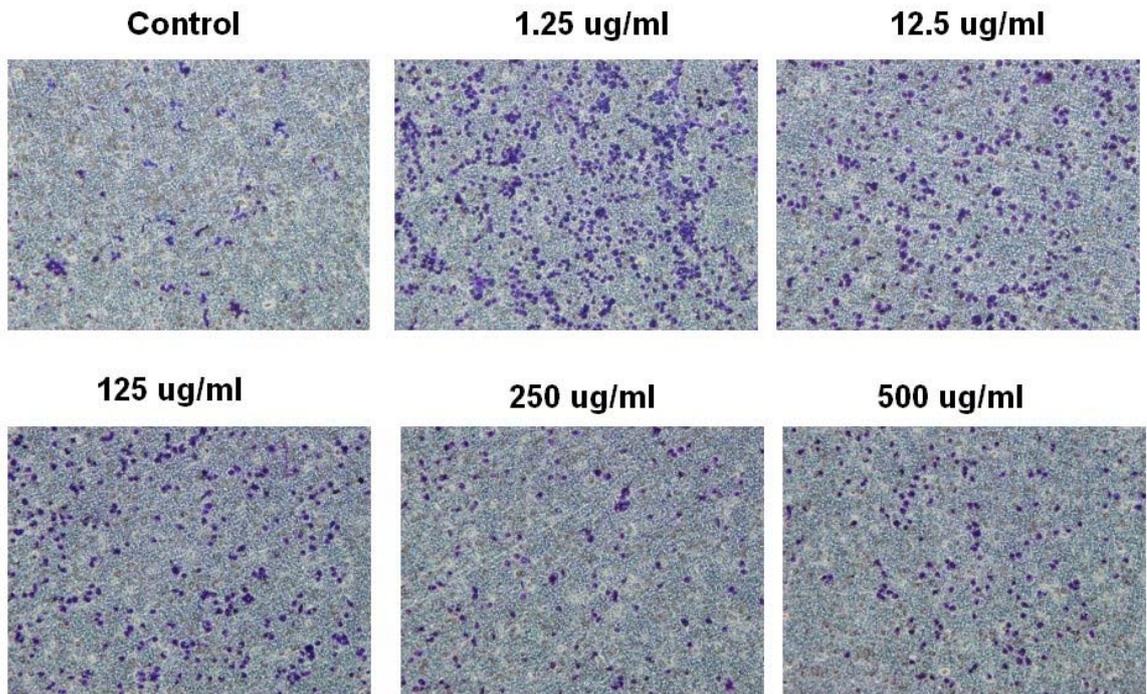


圖 4.10 加入黃耆刺激後 RSC 96 細胞的移動情形

將實驗中每個組別的移動細胞數目進行統計後可知，黃耆對於促進 Rsc 96 細胞的移動作用，有超顯著性的差異 $P < 0.001$ ，圖 4.11。

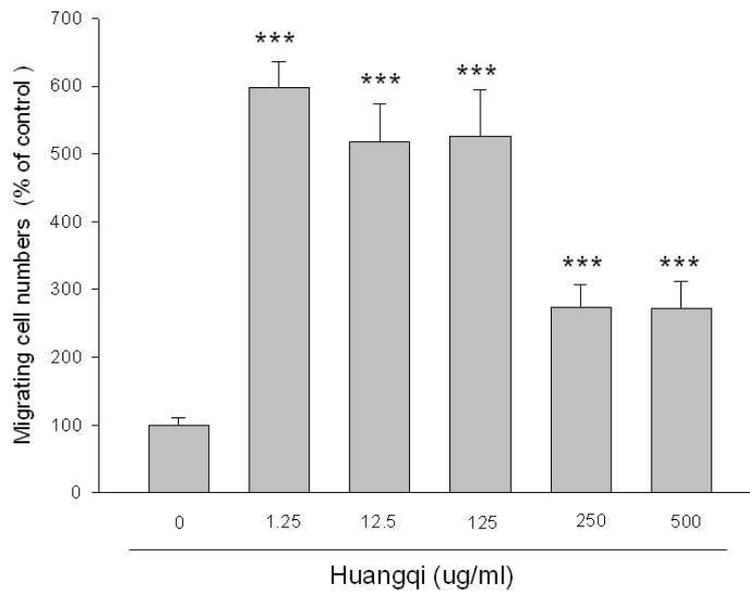


圖 4.11 移動細胞數目之量化圖

在 RT-PCR 實驗結果發現隨著黃耆的濃度增加， FGF-2 和 UPA 的 mRNA 表現量明顯上升；而 UPA 的抑制劑 PAI-1，其 mRNA 表現量則在 125-500 $\mu\text{g/ml}$ 的黃耆刺激後，有逐漸下降的趨勢，圖 4.12。

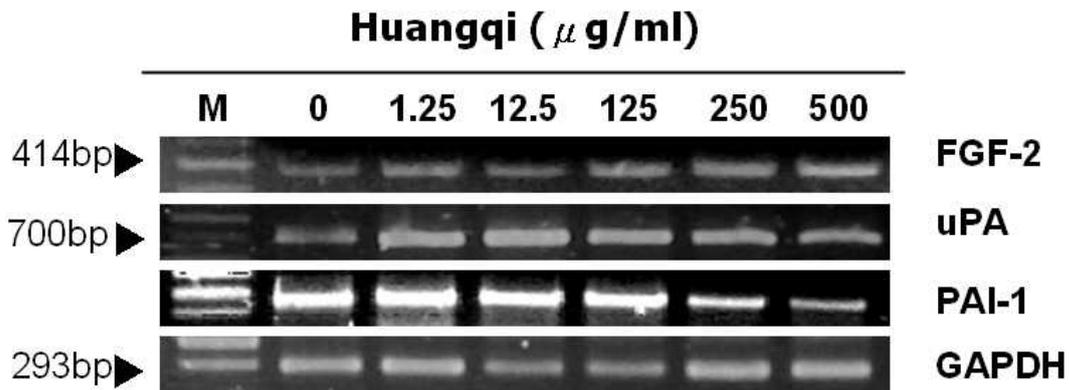


圖 4.12 RT-PCR 實驗偵測 FGF-2-UPA 調控因子之 mRNA 表現量
由西方墨點法觀察出的蛋白質表現量，也有相同的趨勢，圖 4.13。

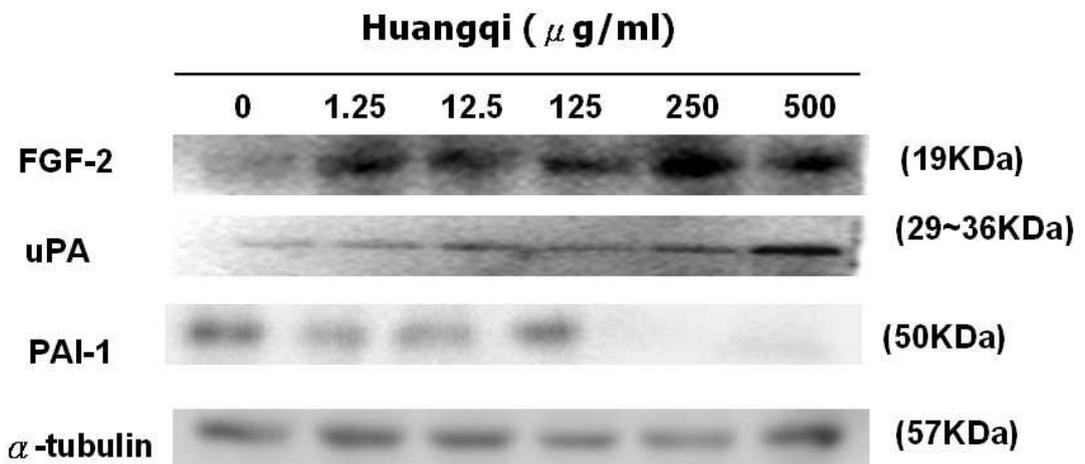


圖 4.13 西方墨點法偵測 FGF-2-UPA 調控因子之蛋白質表現量

最後，在 Zymography 實驗，我們更偵測到 MMP 9 的酵素活性，
隨著黃耆的藥物濃度增加，有逐漸上升的趨勢；至於在此作為實驗操

作之控制組的 MMP 2，酵素活性則沒有任何變化，圖 4.14。

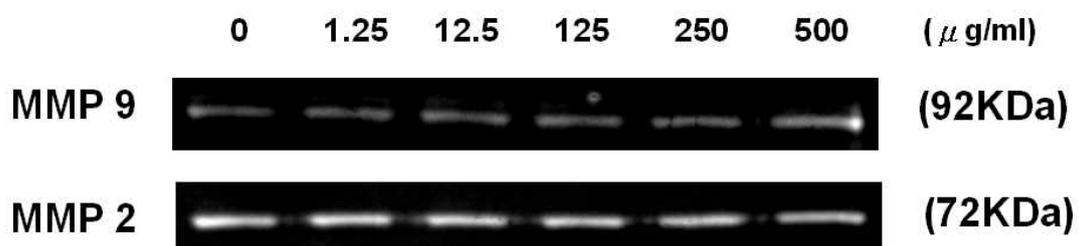


圖 4.14 Zymography 實驗結果



第 五 章

討 論

在早期的年代，中藥醫學一直被視為沒有科學根據的傳統療法；但由於研究技術的逐漸發達，許多的中草藥經由科學的方式，將有效成分加以分析並深入探討；中醫治療逐漸與臨床醫學結合，甚至在學術界佔有一席之地。近年來，以中草藥結合生醫材料，強化周邊神經受損後的治療作用；如此的創意研究，逐漸受到學術界之關注[46, 47]。依據之前所發表的文獻，已知史旺神經膠細胞所分泌的附著物質(Adhesion molecular)以及生長因子(Growth factor)，對於神經細胞受損後的修復和再生作用，有著關鍵性的調控功能[48]。而黃耆是自古以來最為熟知並廣泛應用的中藥材之一，常被用於補中益氣以及增強免疫力等；近期則有文獻指出，黃耆有促進神經軸突的成熟，以及活化血管上皮細胞生長、增加DNA合成的效用[49]。因此，在本篇論文中，我們將會偵測中藥黃耆對於神經膠細胞RSC 96的生長機制，是否有促進的功用，以及其生長調控機制之分子機制。

為了釐清黃耆對於神經細胞的增生機制是否有著加強的功效，我們首先利用細胞存活測試(MTT)實驗偵測處理黃耆後，RSC 96 史旺神經細胞的代謝活性。當細胞加入不同濃度(1.25、12.5、125、250 與 500 $\mu\text{g/ml}$)的黃耆刺激，由實驗結果發現，與控制組比較之 RSC 96

細胞活性明顯增加($P < 0.05$)；但所有的藥物濃度中，又以 $12.5 \mu\text{g/ml}$ 的藥效最佳($P < 0.01$)；由此可知，RSC 96 史旺神經膠細胞的代謝活性確實會因黃耆的刺激而增加。接著，我們也利用西方墨點法偵測了細胞增生之標定因子，細胞增生抗原 PCNA(Proliferating Cell Nuclear Antigen)的蛋白質表現量[50]；以此觀察黃耆對於促進神經細胞複製能力(replication)的效用。由實驗結果得知，隨著黃耆的加藥濃度增加，PCNA 蛋白的表現量有逐漸上升的趨勢。同時，我們更以另一個偵測細胞增生的相關實驗，傷口癒合實驗(wound healing assay)，再次測定黃耆促進 RSC 96 史旺神經膠細胞增生的能力。實驗發現，黃耆增加了神經細胞的複製(replication)效率，使細胞生長的速度明顯加快($P < 0.001$)，但其中又以 $1.25 \sim 125 \mu\text{g/ml}$ 的加藥濃度效果最為顯著。綜合 PCNA 的蛋白表現量以及傷口癒合實驗(wound healing assay)之結果，證明了黃耆有促進神經細胞增生的功能。

已知當細胞在進行複製(replication)作用時，會活化細胞週期(Cell cycle)(51)以及有絲分裂原活化蛋白激酶(Mitogen-Activated Protein Kinase, MAPK) [52] 訊息傳遞路徑。為了進一步探討黃耆對於 RSC 96 史旺神經膠細胞增生作用的分子機制，我們抽取細胞了細胞之 mRNA，利用 RT-PCR 觀察細胞週期蛋白，Cyclin D1、Cyclin E 和 Cyclin A mRNA 表現量。由實驗結果得知，在 $1.25 \sim 125$

$\mu\text{g/ml}$ 濃度的黃耆刺激之下，能有效促進這三個蛋白質的 mRNA 合成。接著，抽取細胞總蛋白質，並同時偵測細胞週期蛋白和 MAPK 訊息調控因子 ERK1/2, JNK1/2, P38 以及其磷酸化態的蛋白表現情形。實驗發現，Cyclin D1、Cyclin E 和 Cyclin A 的蛋白表現量會隨著黃耆的濃度增加而上升；代表著 RSC 96 史旺神經膠細胞的複製能力 (Replication) [37] 與有絲分裂能力 (Mitosis) [40] 皆能因黃耆的刺激而被活化。有絲分裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-Activated Protein Kinase, MAPK) 是一群經由磷酸化才能展現活性的蛋白酶 [53]，在加入黃耆的刺激後，結果顯示 12.5~500 $\mu\text{g/ml}$ 的藥物濃度，可使磷酸化態的 ERK1/2 和 P38 蛋白大量表現；而在濃度為 125~250 $\mu\text{g/ml}$ 時，則可促使磷酸化態的 JNK1/2 蛋白表現量上升；但若觀察這三個 MAPK 激酶原態蛋白的表現量，則發現它們並不會因黃耆的刺激而有所改變。由此可知，黃耆在活化 MAPK 訊息傳遞路徑時，是經由促進其蛋白活性而產生，而非蛋白質的生合成作用；其中又以磷酸化態的 ERK1/2 和 P38 蛋白的感受性最強。

接著，為了要確定黃耆促進 Rsc 96 細胞增生確實是經由活化 MAPK signaling pathway 而產生的；我們以 MEK 的抑制劑 U0126 [54]、P38 的抑制劑 SB203580 [55]，以及 JNK 的抑制劑 SP600125 [56]，抑制上述三種蛋白的表現量；接著以 MTT 偵測細胞的活性，並以西方墨點

法偵測 PCNA 的蛋白表現情形。而由 MTT 的實驗結果發現，當 MEK 以及 P38 的蛋白表現量被抑制之後，RSC96 史旺細胞的活性也有被抑制的情形；以西方墨點法觀察到 PCNA 的蛋白表現量亦明顯下降。另一方面，當我們以抑制劑抑制 JNK 蛋白時，不管是細胞活性或者是 PCNA 蛋白的表現量，皆未受到任何影響。綜合以上的實驗結果，證明了黃耆是經由活化 MAPK 訊息傳遞中的 P38 和 ERK 路徑來促進 Rsc 96 神經膠細胞增生，JUK 路徑並沒有參與其中。

當周邊神經受損時，史旺細胞會移動到受損的部位，經由其不斷的分裂增殖以及神經生長因子(NGF)之分泌，可誘導刺激軸突的再生和髓鞘的形成[57, 58]；因此我們下一步將探討史旺細胞之移動作用。在以 Boyden chambers 觀測 RSC96 史旺神經膠細胞之移動情形後，發現黃耆能明顯增加細胞的轉移功能(Migration)。然而，黃耆是經由何種分子機制調控 RSC96 史旺神經細胞的移動能力?在將近期發表之文獻做一番統整後發現，在受損的神經組織中，FGF-2 會大量表現，並提升 UPA 基因表現量；接著 UPA 會活化基質金屬蛋白酶(MMPs)以及刺激胞漿素原(Plasminogen)轉換成胞漿素(Plasmin)，這兩種細胞外基質的分解蛋白會不斷進行降解作用，促使細胞的轉移功能增加[44]。因此，本實驗同時以 RT-PCR 以及西方墨點法觀察 FGF-2-UPA-MMPs 途徑因子，FGF-2、UPA 和 UPA 的專一抑制蛋白 PAI-1 之 mRNA

及蛋白質表現量。實驗結果得知，黃耆能同時活化 FGF-2 和 UPA 的 mRNA 及蛋白質，使其大量表現；至於 PAI-1 則會因黃耆的作用而表現量下降。接著，已知 MMP 9 能活化 uPA/plasmin 系統，並促進細胞的移動性 [59]；我們以蛋白分解酵素膠電泳法 (Gelatin Zymography Protease Assay) 觀察到 MMP 9 的酵素活性會因為黃耆刺激濃度的上升而增加。透過以上分子機轉的偵測，可知黃耆確實會透過活化 FGF-2-UPA-MMPs 訊息傳遞路徑，增加 RSC96 史旺神經膠細胞之移動作用。

在眾多的細胞生長因子中，除了上述所提到之神經生長因子(NGF) 以及纖維母細胞生長因子(FGF)能刺激神經的再生作用，更有學者指出肝細胞生長因子(Hepatocyte growth factor, HGF)對於神經幹細胞的生長及分化有促進的功能[60]，它同時為史旺細胞的有絲分裂源 (Mitogen) [61]。類胰島素生長因子(Insulin-like Growth Factor-1, IGF-1)，則會透過活化Ras-Raf路徑增加cyclin D1蛋白質表現量，促進骨骼肌(Skeletal muscle)的再生作用[62]。未來，我們不但會將這兩個訊息傳遞路徑套用於黃耆對RSC96史旺神經膠細胞增生作用之分子機制，做進一步的探討；更會與陳悅生老師實驗室合作，將黃耆的功效套用到動物模式中，觀測其對於SD大鼠坐股神經的再生，是否也有刺激活化之功能。

第 六 章

結 論

已知MAPK訊息路徑可調控許多生理機制，如器官發展、細胞增生及分化等功能，而其中也包含了細胞週期(Cell cycle)的調節[63, 64]。因此，統整本篇所有的實驗結果後得知：黃耆促進RSC 96史旺神經膠細胞的再生機制可分為刺激細胞增生以及增加細胞移動性兩大路徑。如圖6.1所示，在刺激細胞增生的訊息路徑中，黃耆會活化磷酸化MAPK家族中的ERK及P38蛋白，接著調控細胞週期蛋白Cyclin D1、Cyclin E和Cyclin A，使其大量表現，促進了RSC 96史旺神經細胞的增殖(Replication)作用。而在細胞移動訊息路徑中，黃耆首先會刺激FGF-2蛋白大量表現，接著再透過UPA活化MMP 9的酵素活性，增加了RSC 96史旺神經細胞的移動作用；經由這兩方面的調節，黃耆便能有效的促進神經細胞的再生。

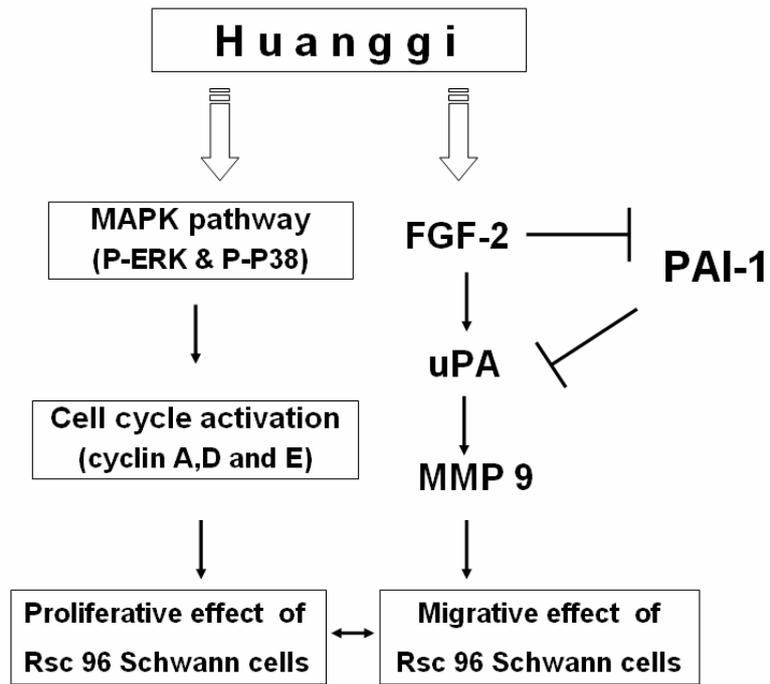


圖 6.1 總結黃耆在 RSC96 史旺細胞株中，活化其增生及移動之分子
機制



參 考 文 獻

1. Kjaer, I., Neuro-osteology. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998, 9, (2), 224-44.
2. Khwaja, O.; Volpe, J. J., Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2008, 93, (2), F153-61.
3. Goldberg, M. P.; Ransom, B. R., New light on white matter. *Stroke* 2003, 34, (2), 330-2.
4. Xu, Q. G.; Midha, R.; Martinez, J. A.; Guo, G. F.; Zochodne, D. W., Facilitated sprouting in a peripheral nerve injury. *Neuroscience* 2008, 152, (4), 877-87.
5. Kurtoglu, Z.; Ozturk, A. H.; Bagdatoglu, C.; Polat, G.; Aktekin, M.; Uzmansel, D.; Camdeviren, H.; Bagdatoglu, O.; Sargon, M., Effects of trapidil after crush injury in peripheral nerve. *Acta Med Okayama* 2005, 59, (2), 37-44.
6. Ide, C., Peripheral nerve regeneration. *Neurosci Res* 1996, 25, (2), 101-21.
7. Hall, S. M., Regeneration in the peripheral nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1989, 15, (6), 513-29.
8. Fawcett, J. W.; Keynes, R. J., Peripheral nerve regeneration. *Annu Rev Neurosci* 1990, 13, 43-60.
9. Rittenhouse, J. R.; Lui, P. D.; Lau, B. H., Chinese medicinal herbs reverse macrophage suppression induced by urological tumors. *J Urol* 1991, 146, (2), 486-90.
10. Gravvanis, A. I.; Lavdas, A. A.; Papalois, A.; Tsoutsos, D. A.; Matsas, R., The beneficial effect of genetically engineered Schwann cells with enhanced motility in peripheral nerve regeneration: review. *Acta Neurochir Suppl* 2007, 100, 51-6.
11. Kushima, Y.; Nishio, C.; Nonomura, T.; Hatanaka, H., Effects of nerve growth factor and basic fibroblast growth factor on survival of cultured septal cholinergic neurons from adult rats. *Brain Res* 1992, 598, (1-2), 264-70.
12. Xu, X. M.; Guenard, V.; Kleitman, N.; Aebischer, P.; Bunge, M. B., A combination of BDNF and NT-3 promotes supraspinal axonal regeneration into Schwann cell grafts in adult rat thoracic spinal cord. *Exp Neurol* 1995, 134, (2), 261-72.
13. Simons, M.; Trotter, J., Wrapping it up: the cell biology of myelination. *Curr Opin Neurobiol* 2007, 17, (5), 533-40.
14. Paivalainen, S.; Nissinen, M.; Honkanen, H.; Lahti, O.; Kangas, S. M.; Peltonen, J.; Peltonen, S.; Heape, A. M., Myelination in mouse dorsal root ganglion/Schwann cell cocultures. *Mol Cell Neurosci* 2008, 37, (3), 568-78.
15. Martini, R.; Carenini, S., Formation and maintenance of the myelin sheath

- in the peripheral nerve: roles of cell adhesion molecules and the gap junction protein connexin 32. *Microsc Res Tech* 1998, 41, (5), 403-15.
16. Pozzi, A.; Zent, R., Integrins: sensors of extracellular matrix and modulators of cell function. *Nephron Exp Nephrol* 2003, 94, (3), e77-84.
17. Molteni, R.; Fumagalli, F.; Magnaghi, V.; Roceri, M.; Gennarelli, M.; Racagni, G.; Melcangi, R. C.; Riva, M. A., Modulation of fibroblast growth factor-2 by stress and corticosteroids: from developmental events to adult brain plasticity. *Brain Res Brain Res Rev* 2001, 37, (1-3), 249-58.
18. Wu, F.; Chen, X., [A review of pharmacological study on Astragalus membranaceus (Fisch.) Bge.]. *Zhong Yao Cai* 2004, 27, (3), 232-4.
19. Ma, X. Q.; Shi, Q.; Duan, J. A.; Dong, T. T.; Tsim, K. W., Chemical analysis of Radix Astragali (Huangqi) in China: a comparison with its adulterants and seasonal variations. *J Agric Food Chem* 2002, 50, (17), 4861-6.
20. Bensky, A. S.; Meyer, R. A., An unusual coronary artery origin in a patient with anomalous left coronary artery. *J Pediatr* 1993, 122, (6), S100-3.
21. Astragalus membranaceus. Monograph. *Altern Med Rev* 2003, 8, (1), 72-7.
22. Meng, D.; Chen, X. J.; Bian, Y. Y.; Li, P.; Yang, D.; Zhang, J. N., Effect of astragalosides on intracellular calcium overload in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *Am J Chin Med* 2005, 33, (1), 11-20.
23. Zhang, W. D.; Chen, H.; Zhang, C.; Liu, R. H.; Li, H. L.; Chen, H. Z., Astragaloside IV from Astragalus membranaceus shows cardioprotection during myocardial ischemia in vivo and in vitro. *Planta Med* 2006, 72, (1), 4-8.
24. Zhu, S. Q.; Qi, L.; Rui, Y. F.; Li, R. X.; He, X. P.; Xie, Z. P., Astragaloside IV inhibits spontaneous synaptic transmission and synchronized Ca²⁺ oscillations on hippocampal neurons. *Acta Pharmacol Sin* 2008, 29, (1), 57-64.
25. Shao, B. M.; Xu, W.; Dai, H.; Tu, P.; Li, Z.; Gao, X. M., A study on the immune receptors for polysaccharides from the roots of Astragalus membranaceus, a Chinese medicinal herb. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 320, (4), 1103-11.
26. Cho, W. C.; Leung, K. N., In vitro and in vivo immunomodulating and immunorestorative effects of Astragalus membranaceus. *J Ethnopharmacol* 2007, 113, (1), 132-41.
27. Yin, X.; Zhang, Y.; Wu, H.; Zhu, X.; Zheng, X.; Jiang, S.; Zhuo, H.; Shen, J.; Li, L.; Qiu, J., Protective effects of Astragalus saponin I on early stage of diabetic nephropathy in rats. *J Pharmacol Sci* 2004, 95, (2), 256-66.
28. Wu, Y.; Ou-Yang, J. P.; Wu, K.; Wang, Y.; Zhou, Y. F.; Wen, C. Y., Hypoglycemic effect of Astragalus polysaccharide and its effect on PTP1B. *Acta Pharmacol Sin* 2005, 26, (3), 345-52.

29. Kim, C.; Ha, H.; Kim, J. S.; Kim, Y. T.; Kwon, S. C.; Park, S. W., Induction of growth hormone by the roots of *Astragalus membranaceus* in pituitary cell culture. *Arch Pharm Res* 2003, 26, (1), 34-9.
30. Lee, S. J.; Oh, S. G.; Seo, S. W.; Ahn, H. J.; Geum, D.; Cho, J. J.; Park, C. S., Oral administration of *Astragalus membranaceus* inhibits the development of DNFB-induced dermatitis in NC/Nga mice. *Biol Pharm Bull* 2007, 30, (8), 1468-71.
31. Hong, C. Y.; Ku, J.; Wu, P., *Astragalus membranaceus* stimulates human sperm motility in vitro. *Am J Chin Med* 1992, 20, (3-4), 289-94.
32. Lee, H. J.; Lee, J. H., Effects of medicinal herb tea on the smoking cessation and reducing smoking withdrawal symptoms. *Am J Chin Med* 2005, 33, (1), 127-38.
33. Zhang, C. Z.; Wang, S. X.; Zhang, Y.; Chen, J. P.; Liang, X. M., In vitro estrogenic activities of Chinese medicinal plants traditionally used for the management of menopausal symptoms. *J Ethnopharmacol* 2005, 98, (3), 295-300.
34. Lei, Y.; Wang, J. H.; Chen, K. J., [Comparative study on angiogenesis effect of *Astragalus membranaceus* and *Angelica sinensis* in chick embryo choriollantoic membrane]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2003, 28, (9), 876-8.
35. van den Heuvel, S., Cell-cycle regulation. *WormBook* 2005, 1-16.
36. Golias, C. H.; Charalabopoulos, A.; Charalabopoulos, K., Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *Int J Clin Pract* 2004, 58, (12), 1134-41.
37. Schafer, K. A., The cell cycle: a review. *Vet Pathol* 1998, 35, (6), 461-78.
38. Mazumder, S.; DuPree, E. L.; Almasan, A., A dual role of cyclin E in cell proliferation and apoptosis may provide a target for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2004, 4, (1), 65-75.
39. Donnellan, R.; Chetty, R., Cyclin E in human cancers. *Faseb J* 1999, 13, (8), 773-80.
40. Yam, C. H.; Fung, T. K.; Poon, R. Y., Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell Mol Life Sci* 2002, 59, (8), 1317-26.
41. Dhillon, A. S.; Hagan, S.; Rath, O.; Kolch, W., MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 2007, 26, (22), 3279-90.
42. Anderson, K. J.; Dam, D.; Lee, S.; Cotman, C. W., Basic fibroblast growth factor prevents death of lesioned cholinergic neurons in vivo. *Nature* 1988, 332, (6162), 360-1.
43. Harvey, M. B.; Leco, K. J.; Arcellana-Panlilio, M. Y.; Zhang, X.; Edwards, D. R.; Schultz, G. A., Roles of growth factors during peri-implantation development. *Hum Reprod* 1995, 10, (3), 712-8.
44. Andreasen, P. A.; Kjoller, L.; Christensen, L.; Duffy, M. J., The

urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* 1997, 72, (1), 1-22.

45. Witowsky, J.; Abell, A.; Johnson, N. L.; Johnson, G. L.; Cuevas, B. D., MEKK1 is required for inducible urokinase-type plasminogen activator expression. *J Biol Chem* 2003, 278, (8), 5941-6.

46. Cheng, C. Y.; Yao, C. H.; Liu, B. S.; Liu, C. J.; Chen, G. W.; Chen, Y. S., The role of astragaloside in regeneration of the peripheral nerve system. *J Biomed Mater Res A* 2006, 76, (3), 463-9.

47. Chen, Y. S.; Liu, C. J.; Cheng, C. Y.; Yao, C. H., Effect of bilobalide on peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 2004, 25, (3), 509-14.

48. Jessen, K. R.; Mirsky, R., Schwann cells and their precursors emerge as major regulators of nerve development. *Trends Neurosci* 1999, 22, (9), 402-10.

49. Lei, Y.; Gao, Q.; Li, Y. S., [Study on effects of Astragalus, Angelica and their combination on vascular endothelial cell proliferation in vitro]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 2003, 23, (10), 753-6.

50. Goldsworthy, T. L.; Butterworth, B. E.; Maronpot, R. R., Concepts, labeling procedures, and design of cell proliferation studies relating to carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 1993, 101 Suppl 5, 59-65.

51. Ide, T., [Mechanism of cell proliferation--cell cycle, oncogenes, and senescence]. *Yakugaku Zasshi* 2006, 126, (11), 1087-115.

52. Lin, C. C.; Shyr, M. H.; Chien, C. S.; Wang, C. C.; Chiu, C. T.; Hsiao, L. D.; Yang, C. M., Thrombin-stimulated cell proliferation mediated through activation of Ras/Raf/MEK/MAPK pathway in canine cultured tracheal smooth muscle cells. *Cell Signal* 2002, 14, (3), 265-75.

53. Weigel, N. L.; Moore, N. L., Kinases and protein phosphorylation as regulators of steroid hormone action. *Nucl Recept Signal* 2007, 5, e005.

54. Nishimoto, S.; Nishida, E., MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2. *EMBO Rep* 2006, 7, (8), 782-6.

55. Cuenda, A.; Rousseau, S., p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 2007, 1773, (8), 1358-75.

56. Bogoyevitch, M. A.; Arthur, P. G., Inhibitors of c-Jun N-terminal kinases: JuNK no more? *Biochim Biophys Acta* 2008, 1784, (1), 76-93.

57. Torigoe, K.; Tanaka, H. F.; Takahashi, A.; Awaya, A.; Hashimoto, K., Basic behavior of migratory Schwann cells in peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol* 1996, 137, (2), 301-8.

58. Anton, E. S.; Sandrock, A. W., Jr.; Matthew, W. D., Merosin promotes neurite growth and Schwann cell migration in vitro and nerve regeneration in vivo: evidence using an antibody to merosin, ARM-1. *Dev Biol* 1994, 164, (1),

133-46.

59. Legrand, C.; Polette, M.; Tournier, J. M.; de Bentzmann, S.; Huet, E.; Monteau, M.; Birembaut, P., uPA/plasmin system-mediated MMP-9 activation is implicated in bronchial epithelial cell migration. *Exp Cell Res* 2001, 264, (2), 326-36.

60. Kokuzawa, J.; Yoshimura, S.; Kitajima, H.; Shinoda, J.; Kaku, Y.; Iwama, T.; Morishita, R.; Shimazaki, T.; Okano, H.; Kunisada, T.; Sakai, N., Hepatocyte growth factor promotes proliferation and neuronal differentiation of neural stem cells from mouse embryos. *Mol Cell Neurosci* 2003, 24, (1), 190-7.

61. Krasnoselsky, A.; Massay, M. J.; DeFrances, M. C.; Michalopoulos, G.; Zarnegar, R.; Ratner, N., Hepatocyte growth factor is a mitogen for Schwann cells and is present in neurofibromas. *J Neurosci* 1994, 14, (12), 7284-90.

62. Philippou, A.; Halapas, A.; Maridaki, M.; Koutsilieris, M., Type I insulin-like growth factor receptor signaling in skeletal muscle regeneration and hypertrophy. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2007, 7, (3), 208-18.

63. Perdiguero, E.; Ruiz-Bonilla, V.; Serrano, A. L.; Munoz-Canoves, P., Genetic deficiency of p38alpha reveals its critical role in myoblast cell cycle exit: the p38alpha-JNK connection. *Cell Cycle* 2007, 6, (11), 1298-303.

64. Dhanasekaran, D. N.; Kashef, K.; Lee, C. M.; Xu, H.; Reddy, E. P., Scaffold proteins of MAP-kinase modules. *Oncogene* 2007, 26, (22), 3185-202.