

中國醫藥大學中國醫學研究所碩士論文

編號：GICMS-320

指導教授：蔡金川 教授

共同指導教授：林昭庚 教授

論文題目

補氣方劑(四君子湯)與補血方劑(四物湯)對大鼠部分肝切除後  
肝再生之影響

Effect of Chinese Medicine for Supplementing Qi and Blood on  
Liver Regeneration of Rat after Partial Hepatectomy

研究生：馬易世

中華民國九十六年六月二十六日

# 目錄

第一章	前言	1
第二章	文獻探討	3
2.1	肝臟的再生	3
2.2	肝細胞的增殖	4
2.3	部分肝切除	5
2.4	再生標誌	6
2.4.1	肝重	7
2.4.2	PCNA 增殖標記	7
2.4.3	BrdU 增殖標記	9
2.5	四君子湯與四物湯	10
2.5.1	四君子湯	10
2.5.2	四物湯	11
第三章	材料與方法	13
3.1	實驗動物	13
3.2	中藥材與配製	13
3.3	實驗動物組數分配	14
3.4	實驗步驟	14
3.5	2/3 部分肝切除手術步驟	15
3.6	實驗動物犧牲：	16
3.7	石蠟組織切片製作步驟：	16
3.8	免疫組織化學染色(Immunohistochemistry stain)步驟：	16
3.8.1	PCNA 免疫組織化學染色步驟：	16
3.8.2	BrdU 免疫組織化學染色步驟：	17
3.9	血清生化值檢測：	18
3.10	肝質量評估方法：	18

3.11	細胞計數規則：	18
3.11.1	PCNA LI 計數：	19
3.11.2	PCNA GF 計數：	19
3.11.3	BrdU LI 計數：	19
3.12	統計方法：	19
第四章	結果	20
4.1	存活率：	20
4.2	肝重/體重比結果：	20
4.3	PCNA 增殖標誌結果：	24
4.4	BrdU 增殖標誌結果：	29
4.5	血清生化值檢測結果：	33
4.5.1	GOT 與 GPT：	33
4.5.2	白蛋白(Albumin)和球蛋白(Globulin)：	33
4.5.3	總膽紅素 (Total Bilirubin)：	34
4.5.4	$\gamma$ -丙氫胺醯轉移酶 (gamma glutamyl transpeptidase, $\gamma$ -GT)：	34
4.5.5	鹼性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, ALP)：	35
4.6	組織學觀察(H&E 染色)結果：	41
第五章	討論	44
第六章	結論	51
參考文獻		52
英文摘要		59
謝辭		60

# 圖目錄

圖 2.1	部分肝切除後肝質量、肝細胞與非實質細胞 DNA 的改變 .....	4
圖 4.1	部分肝切除後 3 小時之肝重/體重比 .....	22
圖 4.2	部分肝切除後 72 小時之肝重/體重比 .....	22
圖 4.3	部分肝切除後 168 小時之肝重/體重比 .....	22
圖 4.4	餘肝葉檢體 .....	23
圖 4.5	部分肝切除後 3 小時之 PCNA GF 值 .....	26
圖 4.6	部分肝切除後 72 小時之 PCNA GF 值 .....	26
圖 4.7	部分肝切除後 168 小時之 PCNA GF 值 .....	26
圖 4.8	部分肝切除後 3 小時之 PCNA LI 值 .....	27
圖 4.9	部分肝切除後 72 小時之 PCNA LI 值 .....	27
圖 4.10	部分肝切除後 168 小時之 PCNA LI 值 .....	27
圖 4.11	部分肝切除後之 PCNA IHC 染色 .....	28
圖 4.12	部分肝切除後 3 小時之 BrdU LI 值 .....	30
圖 4.13	部分肝切除後 72 小時之 BrdU LI 值 .....	30
圖 4.14	部分肝切除後 168 小時之 BrdU LI 值 .....	31
圖 4.15	部分肝切除後之 BrdU IHC 染色 .....	31
圖 4.16	部分肝切除後之 GOT 值 .....	39
圖 4.17	部分肝切除後之 GPT 值 .....	39
圖 4.18	部分肝切除後之 Albumin 值 .....	39
圖 4.19	部分肝切除後之 Globulin 值 .....	40
圖 4.20	部分肝切除後之 Total Protein 值 .....	40
圖 4.21	部分肝切除後之 Total Bilirubin 值 .....	40
圖 4.22	部分肝切除後之 $\gamma$ -GT 值 .....	41
圖 4.23	部分肝切除後之 Alkaline phosphatase 值 .....	41
圖 4.24	部分肝切除後之 H&E 染色 .....	42

圖 5.1 肝細胞再生相關分子簡圖 .....	48
圖 5.2 肝再生相關分子與細胞週期的關係 .....	48



# 表目錄

表 3.1	實驗動物組數分配 .....	14
表 4.1	手術死亡數 .....	21
表 4.2	各組死亡數 .....	21
表 4.3	肝重/體重比 .....	21
表 4.4	PCNA GF (Groth Fraction) .....	25
表 4.5	PCNA LI (Labeling Index) .....	25
表 4.6	BrdU LI (Labeling Index) .....	30
表 4.7	GOT .....	36
表 4.8	GPT .....	36
表 4.9	Albumin .....	36
表 4.10	Globulin .....	37
表 4.11	Total Protein .....	37
表 4.12	Total Bilirubin .....	37
表 4.13	$\gamma$ -GT .....	38
表 4.14	Alkaline phosphatase .....	38

# 補氣方劑(四君子湯)與補血方劑(四物湯)對大鼠部分肝切除後肝再生之 影響

研究生：馬易世

指導教授：蔡金川 教授

共同指導教授：林昭庚 教授

中國醫藥大學中國醫學研究所

肝病的相關研究，一直以來便是國內外研究的焦點。肝臟相關的疾病很多，但除了積極治療病因之外，肝細胞的再生與各種肝臟疾病的治療或復原亦有密切的關係。中醫擁有完整的治療理論，臨床上對於肝臟疾病的治療也擁有不錯的經驗與療效。而傳統中醫的治療理論架構於氣血之上，氣主煦之，血主濡之，兩者與個體的生存發育可說是息息相關的。其中，四君子湯為中醫補氣代表方劑，而四物湯則為中醫補血代表方劑，兩者亦是臨床常用的基礎方劑。

因此本實驗便欲以四君子湯和四物湯作為研究對象，藉由肝重/體重比與內源性再生標記 PCNA、外源性再生標記 BrdU 之免疫組織化學染色法，來評估兩者對於大鼠部分肝切除後的肝細胞再生是否具有促進之作用。

結果發現，在中醫方劑促進部分肝切除後肝再生方面，不管是從肝重/體重比、PCNA GF、PCNA LI 與 BrdU LI 都可發現，中醫補氣代表方劑四君子湯具有促進大鼠部分肝切除後肝再生的傾向，並且此促進作用應會在肝臟重量逐漸恢復後減緩。

關鍵詞：肝再生 部分肝切除 四君子湯 四物湯 補氣 補血

## 第一章 前言

在醫學進步的今天，我們雖然已經擁有了進步與完善的醫療資源，然而肝病長期以來依然是困擾國人的重大疾病。根據民國 94 年衛生署發布的資料顯示，在民國 80~93 年間，慢性肝病及肝硬化(chronic liver disease and cirrhosis)一直是國人的十大死因之一，而肝癌(Liver and intrahepatic bile ducts cancer)亦為所有惡性腫瘤死亡原因之第一或第二項<sup>[1]</sup>。因此肝病的相關研究，長久以來便是國內外研究的焦點。

肝臟相關的疾病很多，包括肝炎、肝纖維化、肝硬化與肝癌等。但最近的研究指出，除了積極治療疾病的病因之外，肝細胞的再生在各種肝臟疾病的治療或復原過程中亦扮演著重要的角色<sup>[2,3]</sup>。另外，了解肝臟的再生有助於解釋肝臟對於酒精、藥物過量或感染等傷害時的反應，亦有助於肝癌、肝臟移植等相關研究<sup>[4]</sup>。因此肝再生便成了當前肝病研究的一個重要議題。

話說希臘神祈普羅米修士(Prometheus)因幫人類竊取火的秘密，因而每日需受老鷹啄食肝臟之罰責。神話中普羅米修士的肝臟日復一日的損失卻能一再的恢復，從這個神話中可看出，人類早在古希臘時就已經發現肝臟具有特殊的再生能力，甚至賦予它如神話般的故事<sup>[5]</sup>。事實上，相較於其他臟器，肝臟的確具有相當良好的再生能力，遭受 2/3 的部分肝切除後，僅需 7~10 天幾乎就可以恢復到原有大小。而肝臟具有如此優異的再生能力，便是為了保護動物在野外生活時因食物毒素等因素所導致肝臟損傷之危害<sup>[5]</sup>。

雖然說肝臟具有相當好的再生能力，然而成熟個體的肝臟基本上是一個靜止的器官(quiescent organ)，此時的肝細胞僅具有非常小的增殖能力。可是一旦給予適當的生長刺激之後，例如部份肝切除、感染或藥物傷害等，原本成熟且靜止的肝細胞便會重新進入細胞週期而開始進行增殖<sup>[6]</sup>。現代的研究證明，肝臟幾乎擁有無限(unlimited)的再生能力，因此可說成熟的肝細胞並不屬於完全分化的細胞，它們具有幾

乎無限的增殖能力以確保個體的生存<sup>[5]</sup>。

中醫擁有完整的治療理論，臨床上對於肝臟疾病的治療也擁有不錯的經驗與療效。因此，隨著肝臟再生的過程逐漸被明瞭，臨床上有明顯療效的中醫藥方劑也應藉此而深入探討。傳統中醫的治療理論架構於氣與血之上，氣主煦之，血主濡之，兩者和個體的生存發育可以說是息息相關的。其中，四君子湯為中醫補氣代表方劑，而四物湯則為中醫補血代表方劑，兩者亦是臨床常用可隨證加減的基礎方劑。

雖然有關四君子湯和四物湯的研究已相當豐富，包含了免疫、消化與血液等方面，然而對於肝再生的相關研究卻仍未被探討。因此本研究便欲以四君子湯和四物湯作為研究對象，藉由肝重/體重比與內源性再生標記 PCNA、外源性再生標記 BrdU 之免疫組織化學染色法，來評估兩者對於大鼠部分肝切除後的肝細胞再生是否具有促進作用。同時，並佐以血清學檢查與組織學之相關觀察。



## 第二章 文獻探討

### 2.1 肝臟的再生

雖然肝臟擁有絕佳的再生能力，然而肝臟的大小仍然準確地取決於個體的需求<sup>[4]</sup>。例如，將大型狗的肝臟移植至小型狗後，移植後的肝臟將逐漸減小至適合於新個體的大小。相反地，倘若將狒狒(baboo)的肝臟移植至人類後，則移植後的肝臟則會在幾週內逐漸增大至人類原有肝臟的大小。這些研究說明肝臟的質量大小會被精確地調控，而由身體需求的訊息將可正向或負向地影響肝臟質量直至適當的大小<sup>[5]</sup>。

但在這裡要釐清的觀念是，用”再生(regeneration)”來形容肝臟的再生現象並不恰當，因為被切除的部分肝臟並不會像兩棲類被切除下肢般地長出來<sup>[4]</sup>。生物學上的”再生”意指被切除組織結構(structure)的重組(reconstitution)，例如蠐螬(newt)下肢包含皮膚、肌肉與足趾完整地再生長(re-growth)，而這個過程是起始於斷面處出芽(blastema)的形成。相對地，被切除的肝臟並不會長回來，亦不需經由去分化(dedifferentiated)的細胞來執行，而是經由剩餘的肝臟細胞代償性(compensate)地增殖來取代損失的部份<sup>[7]</sup>。因此，學界認為將肝臟的再生作用稱之為代償性生長(compensatory growth)應較為貼切。

雖然被切除的肝葉不會再長回來，但殘餘的肝葉將會增大以補償(make up for)失去的肝葉質量。根據測量，部分肝切除可誘導肝臟中將近 95%的肝細胞進行再生以恢復原有肝臟之質量<sup>[4]</sup>。而肝臟質量增加的速率在第 3 天左右達到最大，並且整個代償性再生的過程僅需 5 至 7 天便幾乎可恢復至原有肝臟之大小(圖 2.1)<sup>[4,5]</sup>。

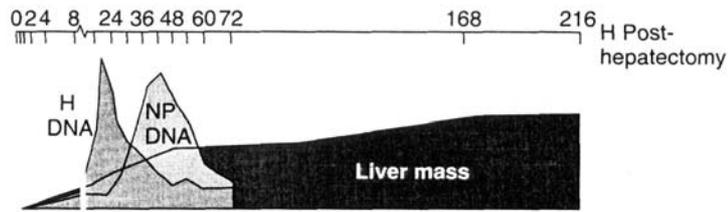


圖 2.1 部分肝切除後肝質量、肝細胞與非實質細胞 DNA 的改變。

摘自 David Zakim, Thomas D. Boyer. Hepatology: a textbook of liver disease. Saunders 2003

而組織學上的觀察發現，部分肝切除後的肝再生，是由組成原有肝臟之所有已存在的成熟肝細胞群體(mature cellular populations)所執行。這些細胞包括了肝細胞(hepatocytes)、膽管上皮細胞(biliary epithelial cells)、裂孔內皮細胞(fenestrated endothelial cells)、庫氏細胞(Kupffer cells)與星狀細胞(Ito cells)等都會增殖來參與肝臟組織的重建<sup>[5]</sup>。

雖然有些研究指出，在大部分慢性肝臟疾病患者身上都可觀察到前驅細胞的活化現象，並且如卵圓細胞(oval cell)或骨髓幹細胞(bone marrow stem cell)也具有分化成肝細胞、膽道細胞與內皮細胞的能力<sup>[4,8]</sup>。但相對於其他再生組織(骨髓、皮膚)，除了在大量成熟肝細胞之增殖作用被抑制時，否則肝臟的再生並不需要依賴這一小群的前驅(progenitor)細胞或幹細胞的參與<sup>[5,9]</sup>。

## 2.2 肝細胞的增殖

在正常成熟個體的肝臟中，肝細胞很少被觀察到細胞分裂的狀況，大多處於細胞週期之  $G_0$  期。然一旦接受了部分肝切除後，肝細胞是所有肝臟細胞中最早開始增殖的，有接近 95% 的靜止肝細胞會快速地進入細胞週期<sup>[4]</sup>。大部分殘餘的肝細胞(年輕大鼠約 95%，非常老的大鼠約 75%)會參與增殖過程(proliferative events)<sup>[5]</sup>。

在大鼠肝中，肝細胞的 DNA 合成 (S 期)增加開始於部分肝切除後約 10~12 小時，並於 24 小時達到最大值，且在 36 和 48 小時間有較

小的高峰<sup>[4,5]</sup>。隨後的 DNA 合成作用將減少，因為對所有細胞而言，要完全恢復肝的質量僅需 1.66 個 DNA 合成週期<sup>[4]</sup>。另外有許多變數(parameters)，包括日照刺激(diurnal light stimuli)與餵食模式(feeding patterns)等都會影響部分肝切除至肝細胞合成 DNA 的持續間隔(duration of the interval)<sup>[5]</sup>。

2/3 部分肝切除後，理論上殘餘的肝細胞僅需經歷 1.5 次的增殖週期(proliferative cycles)便可完全恢復手術前的肝細胞數目<sup>[5,8]</sup>。相對之下，CCl<sub>4</sub> 或 Fas ligand 誘導之肝再生造成大量肝細胞壞死(necrosis)或凋亡(apoptosis)後，其細胞週期的反應則非同步的<sup>[4]</sup>。

另外，肝細胞可提供分裂性(mitogenic)刺激促使肝臟中其他細胞的增殖<sup>[5]</sup>，而其他細胞如肝竇內皮細胞(hepatic sinusoidal endothelial cells)分泌的 cytokines 和活化之自然殺手 T 細胞(natural killer T cells)分泌的 TNF 等亦能刺激再生過程中肝細胞的增殖<sup>[10,11]</sup>。非實質(non-parenchymal)肝細胞的數目約佔整體肝細胞的 40%，而非實質(non-parenchymal)肝細胞的 DNA 合成誘導發生較晚<sup>[4]</sup>。肝臟其他細胞進入 DNA 合成的時間比肝細胞晚約 24 小時，並在 48 小時後達到高峰<sup>[5]</sup>。其中，Kuffer cell 約為 48 小時、endothelial cell 約為 96 小時，而 biliary endothelial cell 則約為 48 小時<sup>[4]</sup>。

### 2.3 部分肝切除

如同前面的敘述，肝再生可藉由手術與化學藥物導致的肝實質損失所誘導，而肝實質的損失將快速地誘導一波肝臟細胞的增殖，最終補充損失的肝臟質量。雖然使用化學藥物，例如 CCl<sub>4</sub> 等也可引起肝臟小葉中央區之壞死而誘發肝細胞的再生，但卻可能影響肝再生的過程，因此在研究中最常被使用的肝再生模型依然為 2/3 部分肝切除<sup>[9]</sup>。

2/3 部分肝切除(partial hepatectomy)模型於 1931 年首度由 Higgins 與 Anderson 所提出，這是經由一個簡單手術切除 2/3 之大鼠肝臟來誘導殘餘肝細胞的增殖。長久以來已成為一個被廣泛接受、簡單且能清楚證明肝細胞再生能力的實驗模型<sup>[4,5,12]</sup>。部分肝切除模型之所以最

常被用於肝細胞再生的研究，是因為與毒性、病毒性、癌化與硬化等損傷方法相比，部分肝切除之創面小、誘導再生反應強、死亡率低、不易造成組織與細胞的損害與發炎、不損害再生能力的，且對於再生刺激的起始點亦可被精確地定義<sup>[4,5,13]</sup>。

## 2.4 再生標誌

由於肝細胞再生對於肝臟疾病的發病率(morbidity rate)與死亡率(mortality rates)有相當的關係，因此，能準確地證明肝再生活性的存在和程度是必要的。

而長期以來，如何評估人類或動物之肝細胞增殖能力一直是科學界努力的目標，在研究中常被用來評估肝再生的方法<sup>[14]</sup>有：

- A. Liver mass
- B. Mitosis
- C. DNA synthesis
  - 1. Thymidine labelling
  - 2. Bromodeoxyuridine incorporation (BrdU)
  - 3. Flow cytometry (combined method)
- D. Immunohistochemical methods
  - 1. PCNA (Proliferating cell nuclear antigen)
  - 2. DNA polymerase alpha
  - 3. Ki-67
  - 4. NOR proteins
- E. Endogenous gene expression
  - 1. H3 histone mRNA
- F. Liver tissue, enzyme and protein levels
  - 1. Thymidine kinase
  - 2. Ornithine decarboxylase and putrescine
- G. Blood determinations
  - 1. Thymidine kinase and ornithine decarboxylase

2. Fibronectin
3. Alpha fetoprotein
4. Early pregnancy factor (EPF or chaperonin 10)

其中最常被使用的方法有肝重(Liver mass)、PCNA(Proliferating cell nuclear antigen)與 BrdU(5-bromo-2-deoxyuridine)。

#### 2.4.1 肝重

對於肝再生實驗，測量殘餘肝重可說是最直接的評估方法。常見的評估公式有：

1. 殘餘肝重體重百分比 = 殘餘肝重 / 體重<sup>[3]</sup>
2. 估最初肝重百分比 = A / E<sup>[15]</sup>

A= 犧牲時的殘餘肝重

E= 部分肝切除前的全肝重 = 部分肝切除時切除的肝重/0.636

然而，實際上肝臟的重量會受到許多內在及外在因素所影響，因此僅僅由肝重改變率來評估肝細胞的再生程度往往是不足的<sup>[16]</sup>。

#### 2.4.2 PCNA 增殖標記

如前述的原因，為了更精確地標定出肝臟中處於增殖階段的細胞，科學界最初便利用 <sup>3</sup>H-thymidine 來評估肝細胞的再生能力，但因其可能具有肝內與肝外分流(shunting)作用，以及接觸放射性同位素(radioisotopes)的不便等因素，使得 <sup>3</sup>H-thymidine 在使用上有所限制<sup>[11]</sup>。

而增殖細胞核抗原(PCNA, Proliferating cell nuclear antigen)是一種內源性核蛋白(endogenous nuclear protein)，常被用來確認人類和鼠類組織的複製細胞(replicating cells)<sup>[17]</sup>。PCNA 的氨基酸序列在老鼠和人類之間僅有四個殘基(residues)的不同，這顯示出其高度保守的分子特性(highly conserved molecule)<sup>[17]</sup>。PCNA 蛋白的命名起因於它在高度分裂活性細胞的細胞核中被發現，而其最初被視為系統性紅斑性狼瘡

(systemic lupus erythematosus)患者血清中的一種自體抗原<sup>[18]</sup>。

在具有增殖細胞的組織中可辨認出 PCNA 陽性細胞，例如淋巴結的生發中心、腸上皮細胞、基底細胞、皮膚的鱗狀上皮細胞和精原細胞(spermatogonia)等<sup>[19]</sup>。並經由免疫組織化學染色法染色之 PCNA 陽性細胞亦可顯示出細胞核與一部分細胞質的免疫反應活性(immunoreactivity)<sup>[20]</sup>，而其不同染色強度亦具有細胞週期的特異性。因此，偵測 PCNA 表現用於定量肝細胞增殖是個可靠的(reliable)辦法，並能藉以進行細胞動力學的研究<sup>[21]</sup>。

由於 PCNA 的表現會於 G<sub>1</sub> 期中增加，在 S 期達到最大值，而在 G<sub>2</sub> 和 M 期間降低。因此，藉由偵測增值細胞的 PCNA 與染色的表現便可分辨出處於細胞週期中 G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub>、M 期和靜止期(G<sub>0</sub>)中的細胞<sup>[17,19,20]</sup>。

PCNA 抗體的出現，使得免疫組織化學檢測以及利用這個內源性細胞週期相關蛋白作為細胞複製標記的評估成為可能<sup>[14,17]</sup>。利用 PCNA 單株抗體運用於福爾馬林固定、石蠟包埋的組織中，使得利用 PCNA 陽性細胞比例來評估組織的增值能力(proliferative capability)獲得大大進步<sup>[19]</sup>。

而以內源性 PCNA 作為增殖之標記有一些優缺點。例如，PCNA 的優點包括無需投與標記化合物，因此並不需進行其他手術、麻醉或額外的處理<sup>[17]</sup>。因此以 PCNA 取代 BrdU 來評估細胞增殖的主要優點是不需任何預處理步驟，且避免致畸胎劑(teratogenic agent)的使用<sup>[22]</sup>。另外，不僅可由新鮮的檢體快速地獲得實驗結果，PCNA 的免疫染色技術亦可用於檔案材料(archival material)的研究，從而用於回顧性研究(retrospective studies)的執行<sup>[14,17]</sup>。由於可由各個細胞週期獲得 Growth fraction 的結果，因此可獲得更多的增殖資訊<sup>[17]</sup>。

然而其缺點則包括染色強度的變異性、長達 20 小時的半衰期<sup>[14]</sup>，以及不適用於緩慢變化的組織(slow turnover tissue)<sup>[17]</sup>。對於增殖活性高的組織與型態較小的細胞而言，要利用 PCNA 來明確區分出 S 期與非 S 期之增殖細胞亦是困難的以及不準確的<sup>[20]</sup>。另外，PCNA 也參與 DNA 之修復，因此 PCNA 表現細胞並不一定處於細胞週期之狀態

下<sup>[20]</sup>。

### 2.4.3 BrdU 增殖標記

雖然測量分裂中細胞(mitotic figures)數目來評估細胞增殖是最傳統也最簡單的方法，然而要精確測量出有絲分裂指數(mitotic index)卻不是那麼容易<sup>[23]</sup>。並且在細胞週期中，屬於 DNA 合成的 S 期佔了較長的時間，理論上以此作為標記指數(labeling index, LI)應能更精確地測量，因此利用嘧啶的修飾類似物於體內試驗中(in vivo)標記 DNA 一直以來就是黃金標準<sup>[20]</sup>。然而，雖然 tritiated thymidine 最早曾廣泛地被做為這個指數的測量方法，但現已多被 BrdU 所取代<sup>[23]</sup>。

與 PCNA 屬於內源性(endogenous)細胞複製標記相較，BrdU 屬於一種外源性(exogenous)之細胞複製標記<sup>[24]</sup>，結構上則為一種 thymidine 的鹵化衍生物(halogenated derivative)<sup>[20]</sup>。因為是外源性的標記，因此 BrdU 須經腹腔注射(IP)的脈衝式方式(pulse-label)或經滲透泵(osmotic pumps)的連續標記方式(continuous-label)運用於實驗動物之上<sup>[20]</sup>。由於 BrdU 為 thymidine 類似物，因此其可於 DNA 合成期間(S 期)併入細胞之 DNA 中，並可利用特異性抗體之免疫組織化學染色法或流式細胞法來偵測<sup>[14,20]</sup>。免疫組織化學染色法可將 BrdU 標記細胞染出褐色(brown)的細胞核，但其染色亦可能會呈現出不同的染色強度<sup>[20]</sup>。

BrdU 的主要優點為可在短時間內獲得實驗結果<sup>[14]</sup>、避免接觸放射性物質<sup>[25]</sup>。而 BrdU 的缺點則因需要注射或額外的處理步驟，所以不適合存檔之材料(archival material)。另外，BrdU 也參與了 DNA 的修復步驟。而由於 BrdU 為一致突變劑(mutagen)，因此並不適於基因毒理學(genetic toxicology)試驗。

此外，客觀計數是困難的，並容易造成結果上的誤差<sup>[20,23,25]</sup>。有鑒於此，以自動化影像分析系統評估 BrdU 陽性細胞數早在 1977 年就被提出，至今也已逐漸發展出穩定且能精確計數與區分細胞型態的分析能力。而如何提升自動化分析系統計算增殖細胞的精確度，區分增殖與炎症細胞，並利用自動化分析來取代枯燥及傷眼(eye-strain)的

計數過程則是未來努力的目標<sup>[26]</sup>。另外，利用墨點法(Dot blot)偵測 BrdU 來取代傳統 IHC 之 BrdU LI 法評估細胞增殖力，亦具有快速、效率高與可靠的結果<sup>[25]</sup>。

## 2.5 四君子湯與四物湯

在中醫的理論中，氣者，屬陽，主生氣蓬勃與溫煦也；血者，屬陰，主物質增長與潤澤也。因此，氣與血和個體的生存發育可說是息息相關的。其中，四君子湯為臨床常用的補氣中醫藥方劑，一般用於治療陽虛氣弱、飲食少思、體瘦面黃等方面<sup>[27]</sup>。而四物湯則為臨床常用的補血中醫藥方劑，為補血調經的基礎方劑<sup>[28]</sup>。

### 2.5.1 四君子湯

四君子湯出自《和劑局方》，其組成為甘草、白朮、茯苓與人參。《醫方集解》稱其主治一切脈來細軟、陽虛氣弱、脾衰肺損、飲食少思、體瘦面黃、皮聚毛落<sup>[27]</sup>。張璐曰：甘溫益胃，有健運之功，具沖和之德，故為君子。人生以胃氣為本，胃旺則五臟受蔭，而胃氣傷則百病叢生。故凡病久虛不癒，諸藥不效者，用四君子湯隨證加減，先培中土，使藥氣四達，機運流通，水穀精微敷布，則何患其藥之不效哉<sup>[29]</sup>！因此四君子湯臨床常運用於因脾胃氣虛引起的營養不良、浮腫、腸炎、出血等疾病，並為氣血虛弱的基礎方劑。例如久病氣虛體弱，可用本方加桂枝、附子；而脾虛濕盛，可用本方加澤瀉、牡蠣、桂枝；脾虛浮腫，可用本方加苡仁、澤瀉、桂枝；脾虛失統之出血，可用本方加黃耆、阿膠、牡蠣<sup>[30]</sup>。

現代研究指出，四君子湯有良好拮抗自由基損傷作用，並能提高 d-Gal 衰老模型小鼠心、腦組織中端粒酶活性<sup>[31]</sup>。亦可促使衰老小鼠臟器組織 SOD 的活性增強，抑制 MDA 形成而具有抗小鼠衰老的作用<sup>[32]</sup>。四君子湯也可改善老齡家兔的下丘腦調控機能，延緩甲狀腺軸機能的老年性變化<sup>[33]</sup>。對大鼠胃及十二指腸四君子湯均具有抑制收縮

的作用<sup>[34]</sup>，並具有明顯早期保護嚴重燒傷後腸黏膜的屏障功能<sup>[35]</sup>。

在 d-Gal 小鼠肝損傷模型中，四君子湯對腸道微生態失衡有調整作用，也能夠減少內毒素的產生和吸收，對肝臟具有保護作用<sup>[36]</sup>。而對於培養肝細胞而言，四君子湯與四物湯皆有促進細胞生長的作用，其中四物湯的效果優於四君子湯<sup>[37]</sup>。

免疫方面，四君子湯可以增加空腸內 TGF- $\beta$  表現、降低 TNF- $\alpha$  表現<sup>[38]</sup>。四君子湯並可促使 IL-2、IL-4、IL-5、TNF- $\alpha$ 、IgE 低下，且淋巴細胞 IL-4、IL-5、CD2 mRNA 表現較弱患者之各項指標恢復正常<sup>[39]</sup>。也能夠促進腸粘膜損傷修復，並恢復因抗生素或輻射等抑制的正常菌群生長，從而使腸道菌叢恢復平衡<sup>[40,41]</sup>。

## 2.5.2 四物湯

四物湯亦出自《和劑局方》，其組成為當歸、地黃、芍藥和川芎。原書稱其主治衝任虛損、月水不調、臍腹作痛等，而《醫方集解》則記載其主治一切血虛，及婦人經病<sup>[28]</sup>。方中當歸甘溫和血，川芎辛溫活血，芍藥酸寒斂血，地黃甘平補血，四物具有生長收藏之用，能使營氣安行於經隧也<sup>[42]</sup>。全方具有補血、活血與止血之效，為理血劑之基礎方劑。例如熱邪壅實者，以本方熟地改生地，再加入大黃、黃芩、黃連；血虛頭痛，以本方加蒿本、鉤藤、菊花；胞宮虛冷，月經不調，以本方加阿膠、艾葉、附子；血瘀重者，以本方加桃仁、紅花；血虛有寒，以本方加肉桂、炮薑；血虛有熱，以本方加黃芩、丹皮等<sup>[43]</sup>。

四物湯為傳統的補血基本方劑，因此造血相關的研究亦相當豐富。例如，四物湯具有提高因急性失血性貧血所致 Hb 和 RBC 降低之作用<sup>[44]</sup>。四物湯能促進腎組織 EPO mRNA 的表現<sup>[45]</sup>，亦可顯著促進骨髓造血前驅細胞的增殖，並可通過調節多種造血生長因數而促進造血機能<sup>[46]</sup>。四物湯可刺激 Peyer's Patch 產生細胞因子而刺激骨髓細胞的增殖<sup>[47]</sup>，也可通過 IL2-RA、NF- $\kappa$ B、TPO 基因表達而促進人骨髓基質細胞系細胞增殖<sup>[48]</sup>。另外，四物湯組能顯著提高小鼠紅血球中的 SOD 含量，亦能顯著降低血漿中 LPO 的含量<sup>[49]</sup>，也可提高 HDL 膽

固醇含量和降低 LDL 膽固醇含量<sup>[50]</sup>。

生殖方面，四物湯對正常小鼠子宮的平滑肌有興奮作用，而對收縮、妊娠小鼠子宮的平滑肌則顯示出抑制作用<sup>[51]</sup>。護肝方面，四物湯能降低 CCl<sub>4</sub> 所致肝損後的 GPT 升高，也能降低撲熱息痛(paracetamol) 所致的 ALP 活性和 TG 含量<sup>[52]</sup>。

抗癌方面的研究指出，四物湯具有抗癌細胞轉移<sup>[53]</sup>以及良好的抗突變作用<sup>[54]</sup>，亦具有抑制經 COX-2、c-fos、IL-1 $\alpha$  和 TNF- $\alpha$  表現之雌激素相關內膜致癌作用<sup>[55,56]</sup>。

而免疫方面，四物湯能促進小鼠脾臟細胞分泌 IL-6 及提高 IL-6 mRNA 的表現<sup>[57]</sup>，且隨著四物湯劑量的增加，其促進脾臟與胸腺增重的作用會更加明顯<sup>[58]</sup>。四物湯能增強 T 細胞功能，亦可促進 LPS 刺激巨噬細胞進而產生 IL-1 的活性<sup>[59]</sup>。另外，四物湯可顯著促進脾臟淋巴細胞分泌 IL-3 和 IL-2，並能明顯促進 IL-3 mRNA 的表現<sup>[60]</sup>。



## 第三章 材料與方法

### 3.1 實驗動物

動物品系：Wistar 品系雄性大白鼠(Wistar Albino Rats)，共 120 隻

動物來源：樂斯科實驗動物公司

動物週齡：4~6 週，體重約在 180~220 g 間

飼養方式：空調房間，溫度維持  $22\pm 5$  °C，半日照環境，分籠飼養，自由飲水及餵養標準飼料

### 3.2 中藥材與配製

四君子湯<sup>[27]</sup>：

組成	基源植物	藥用部位	比例
人參	<i>Panax ginseng</i> C. A. Mey	乾燥根	2
茯苓	<i>Poria cocos</i> (Schw.) Wolf	菌核	2
白朮	<i>Atractylodes macrocephala</i> Koidz.	乾燥根莖	2
甘草	<i>Clycyrrhiza uralensis</i> Fisch.	乾燥根及根莖	1

四物湯<sup>[28]</sup>：

組成	基源植物	藥用部位	比例
當歸	<i>Angelica sinensis</i> (Oliv.) Diels,	乾燥根	6
芍藥	<i>Ligusticum chuanxiong</i> Hort.	乾燥根莖	1
赤芍	<i>Paeonia lactiflora</i> Pall.	根	4
地黃	<i>Rehmannia glutinosa</i> Libosch.	根莖	6

水抽出物之製備：秤重，各藥加水煮沸 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，秤重並計算產率。

基源鑑定：藥材部分委託中國醫藥大學附設醫院中藥局收集並鑑定基源。所有生藥、抽出物、冷凍乾燥得乾燥粉末都會保留樣品於本校中國醫學研究所樣品保存室。

四君子：生藥材總重 5.2 kg，水煎取液重 21.5 kg，冷凍乾燥粉末重 1.36 kg。產率=26.15%

四物湯：生藥材總重 4.8 kg，水煎取液重 20.0 kg，冷凍乾燥粉末重 1.63 kg。產率=33.96%

### 3.3 實驗動物組數分配

實驗動物分為 3、72 與 168 小時三大組，每大組再分為偽實驗組、肝切除對照組、Silymarin 組、四君子實驗組與四物湯組。(表 3.1)

表 3.1 實驗動物組數分配

	3 小時	72 小時	168 小時
偽實驗組(sham)	5	5	8
肝切除對照組	8	8	5
Silymarin 組	9	9	9
四君子實驗組	9	9	9
四物湯組	9	9	9
總數	40	40	40

### 3.4 實驗步驟

實驗動物適應七天後，依上表將實驗動物分為(a)(b)(c)(d)(e)五組：組(a)為偽實驗組

- 組(b)為肝切除對照組  
 組(c)為水飛薊素(Silymarin)組  
 組(d)為四君子組  
 組(e)為四物湯組

其中，

- (c)組以胃管投與水飛薊素，連續給予七天。(0.025 g/kg)  
 (d)組以胃管投與四君子湯，連續給予七天。(冷凍乾燥粉末 1.0 g/kg)  
 (e)組以胃管投與四物湯，連續給予七天。(冷凍乾燥粉末 1.0 g/kg)  
 (a)、(b)組則給予同體積之生理食鹽水(normal saline)，連續給予七天。  
 (b)(c)(d)(e)組於第八天進行部份肝切除手術。  
 (a)組切開肚皮後即縫合肚皮。

各組大鼠分別於部份肝切除手術完成後 3 小時、72 小時與 168 小時後犧牲，並於犧牲前 30 分鐘以腹腔注射 BrdU(20 mg/kg)。



### 3.5 2/3 部分肝切除手術步驟

1. 實驗動物以酚巴比妥(Phenobarbital)麻醉後將腹部細毛剔除，並使其平躺於手術台上。
2. 以酒精局部消毒後，以手術刀延腹部中線處下刀。
3. 毛皮層開口由劍突軟骨至大約腹部中點。
4. 肌肉層開口則由劍突軟骨至大約肝臟下方。

5. 稍微撐開切口並切斷 suspensory ligament 使肝臟得以下垂。
6. 以手於切口附近靈活按壓以鬆動肝臟。
7. 另一手於肝臟下方之腹部往前上方按壓，兩手靈活使力而使肝臟之 median 葉與 left lateral 葉露出切口之外。
8. 以手輕輕地取出 median 與 left lateral 葉於紗布之上。
9. 於靠近血管處剪斷另外兩條韌帶。
10. 將露出的肝葉抬起，然後以縫線於其根部血管處打上兩個死結。
11. 於紗布之上對露出的肝葉切數刀以排除血液。
12. 以紗布包裹 median 與 left lateral 葉並給予適當的拉力。
13. 從打結處前方取下肝葉。
14. 縫合肌肉層與毛皮層。
15. 隨後將實驗動物送入恢復室中恢復<sup>[61]</sup>。

### 3.6 實驗動物犧牲：

1. 動物犧牲 30 分鐘前由腹腔注入 20 mg/kg 的 BrdU。
2. 動物以乙醚麻醉後由頸動脈採血，並取下剩餘的肝臟秤量以計算肝重改變率。
3. 採得的血液以 4°C 離心機離心後取得血清以供生化檢測。

### 3.7 石蠟組織切片製作步驟：

將摘取的肝臟浸於 10% 中性福馬林液中固定，一星期內粗修，厚度 2-3 mm，裝入塑膠包埋盒內，經組織自動脫水機(Processor 2LE)脫水，脫水後組織塊以石蠟包埋機(Leica, German)固定製成蠟塊，將蠟塊以手搖切片機(Leica, RM-2145, German)切成 2 μm 厚，經 H&E 染色法染色後，於一般光學顯微鏡下檢視每一種器官之組織病理變化。

### 3.8 免疫組織化學染色(Immunohistochemistry stain)步驟：

### 3.8.1 PCNA 免疫組織化學染色步驟：

1. 玻片置於玻片架上放入 60 °C 烘箱中融蠟 30 分鐘，之後將玻片置入 xylene 中脫臘。
2. 依序置入 100%、95%與 70%之酒精中回水，最後置入 DDW 中。
3. 玻片置入 citrate buffer 中復性，並以 95 °C 水浴鍋隔水加熱 20 分鐘後，再於室溫中冷卻 10 分鐘。
4. 玻片置於架上，並於檢體上滴 3%之 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 後靜置 15 分鐘。
5. 以 Wash solution 沖洗並覆蓋檢體 2 分鐘，此步驟重複兩次。
6. 於檢體上滴”Endogenous enzyme block, Dako”數滴，靜置 12 分鐘後，再以 Wash solution 沖洗玻片 2 次、各 2 分鐘。
7. 於檢體上滴”PCNA Primary antibody, Abcam” (以 Dako primary antibody diluent 稀釋 1300 倍)數滴，靜置 30 分鐘後，再以 wash solution 沖洗玻片 2 次、各 2 分鐘。
8. 於檢體上滴”Peroxidase labelled polymer, Dako”數滴，靜置 30 分鐘後，再以 wash solution 沖洗玻片 2 次、各 2 分鐘。
9. 於檢體上滴”DAB+, Dako”(以 Dako DAB+ substrate 稀釋 500 倍)數滴，避光靜置約 5 分鐘後，再以 DDW 沖洗玻片。
10. 於檢體上滴 Hematoxylin 數滴，靜置約 5 分鐘後，再以清水沖洗玻片。
11. 待檢體完全乾燥後再置入 xylene 中脫水。
12. 隨後以阿拉伯膠進行封片<sup>[62,63]</sup>。

### 3.8.2 BrdU 免疫組織化學染色步驟：

1. 玻片置於玻片架上放入 60 °C 烘箱中融蠟 30 分鐘，之後將玻片置入 xylene 中脫臘。
2. 依序置入 100%、95%與 70%之酒精中回水，最後置入 DDW 中。
3. 玻片置入 citrate buffer 中復性，並以 95 °C 水浴鍋隔水加熱 20 分鐘後，再於室溫中冷卻 10 分鐘。
4. 檢體以 2N HCl denature DNA30 分鐘，再以 0.1M Borate Buffer (pH

- 8.5)中和 2 次、各 5 分鐘。
5. 以 Wash solution 沖洗並覆蓋檢體 2 分鐘，此步驟重複兩次。
  6. 於檢體上滴”Endogenous enzyme block, Dako”數滴，靜置 12 分鐘後，再以 Wash solution 沖洗玻片 2 次、各 2 分鐘。
  7. 於檢體上滴”BrdU Primary antibody, Zymed” (以 Dako primary antibody diluent 稀釋 50 倍)數滴，靜置 60 分鐘後，再以 wash solution 沖洗玻片 2 次、各 2 分鐘。
  8. 於檢體上滴“Peroxidase labelled polymer, Dako”數滴，靜置 30 分鐘後，再以 wash solution 沖洗玻片 2 次、各 2 分鐘。
  9. 於檢體上滴“DAB+, Dako”(以 Dako DAB+ substrate 稀釋 500 倍)數滴，避光靜置約 5 分鐘後，再以 DDW 沖洗玻片。
  10. 檢體上滴 Hematoxylin 數滴，靜置約 5 分鐘後再以清水沖洗玻片。
  11. 待檢體完全乾燥後再置入 xylene 中脫水。
  12. 隨後以阿拉伯膠進行封片<sup>[62,64]</sup>。

### 3.9 血清生化值檢測：

經頸靜脈取得之血液於 4 °C 離心機中離心兩次，取得上清液後以 COBAS MIRA PLUS 自動生化分析儀搭配 ROCHE 試劑進行分析。

### 3.10 肝質量評估方法：

動物稱重、麻醉、採血與犧牲後，打開腹腔，摘取肝臟。肝臟取出後，清除多餘組織，經生理食鹽水沖洗，擦乾後稱取肝重。殘餘肝重比率以下列公式計算：

$$\text{肝重/體重比率(liver/body weight ratio)} = \text{殘餘肝重} / \text{體重}$$

### 3.11 細胞計數規則：

經 PCNA 或 BrdU 染色之檢體皆於 400 倍顯微鏡下觀察。隨機選取

相近之視野，並以肉眼觀察計數。BrdU 陽性細胞呈現出暗褐色細胞核，而 PCNA 陽性細胞依染色程度不同的分期標準如下：

$G_0$  期細胞之細胞核與細胞質無染色； $G_1$  期細胞之細胞核為片狀至均勻的淡褐色染色，細胞質則無染色；S 期細胞之細胞核為均勻的暗褐色染色，細胞質亦無染色； $G_2$  期細胞有瀰漫且斑點狀之細胞核與細胞質染色；M 期細胞有瀰漫之細胞質染色<sup>[17]</sup>。

### 3.11.1 PCNA LI 計數：

PCNA LI(labeling index)：是專注於 S 期肝細胞數目的計數方式，即以染有暗褐至黑色細胞核且無細胞質染色的肝細胞數量除以總肝細胞數目（每一檢體至少計數 1000 顆肝細胞）<sup>[17]</sup>。

### 3.11.2 PCNA GF 計數：

PCNA GF(growth fraction)：用於評估正處於細胞週期中的肝細胞數，即以所有染上顏色細胞核的肝細胞( $G_1$ +S+ $G_2$ +M 期)數目除以總肝細胞數目（每一檢體至少計數 1000 顆肝細胞）<sup>[17]</sup>。

### 3.11.3 BrdU LI 計數：

BrdU LI(labeling index)：即以所有染上暗褐色細胞核的肝細胞(S 期)數目除以總肝細胞數目(每一檢體至少計數 1000 顆肝細胞)。

## 3.12 統計方法：

實驗數據以 SAS 軟體執行統計，以 ANOVA 進行變異數分析，以 Bonferroni (Dunn) t Tests 進行事後檢定。結果以雙尾  $P < 0.05$  設為具統計意義。其中於肝重/體重比、PCNA GF、PCNA LI 與 BrdU LI 中比較各組間的差異，而於血清學檢查中僅比較各組與對照組間的差異。

## 第四章 結果

### 4.1 存活率：

實驗動物存活率 80.0 %，手術死亡數與各組死亡數列於下表(表 4.1)(表 4.2)，其中術後死亡 2 例皆於手術後一天之內。

### 4.2 肝重/體重比結果：

肝重/體重比是最直接也最普遍被使用來評估肝再生的方法。大鼠經過 2/3 部分肝切除之後，約在 7~10 天時便能以代償式再生的方式來恢復大部份的肝質量。

從本次實驗結果看來，部分肝切除 3 小時後，對照組、Silymarin 組與四物湯組的肝重/體重比基本相同，無顯著差異。但四君子湯組則較對照組略低，且達統計意義(表 4.3)(圖 4.1)。

部分肝切除 72 小時後，Silymarin 組與四君子湯組之肝重/體重比明顯較對照組、四物湯組為高，但各組間的差異尚未達統計意義(表 4.3)(圖 4.2)。

部分肝切除 168 小時後，四君子湯組肝重/體重比最高，與對照組間雖無顯著差異，但與 Silymarin 組和四物湯組間的差異則具有統計意義(表 4.3)(圖 4.3)。餘肝檢體圖列於(圖 4.4)。

表 4.1 手術死亡數

	3 小時	72 小時	168 小時
術前死亡數	0	1	1
術中死亡數	5	8	7
術後死亡數	0	1	1
總計	5/40	10/40	9/40

表 4.2 各組死亡數

	3 小時	72 小時	168 小時
偽實驗組	0	0	0
對照組	0	2	2
Silymarin 組	1	3	2
四君子實驗組	2	1	3
四物湯組	2	4	2

表 4.3 肝重/體重比

	3 小時	72 小時	168 小時
偽實驗組	4.3769 ± 0.00	3.9148 ± 0.38	3.1447 ± 0.33
對照組	1.3832 ± 0.00 *	2.6516 ± 0.54	3.1512 ± 0.39
Silymarin 組	1.1831 ± 0.00	3.2979 ± 0.70	2.9025 ± 0.24 **
四君子湯組	1.0974 ± 0.00 *	3.1783 ± 0.32	3.5777 ± 0.55 ** #
四物湯組	1.2387 ± 0.00	2.7086 ± 0.40	2.9151 ± 0.27 #

肝重/體重比之數值表示為平均值±標準差；\*：四君子湯組與對照組相較 p < 0.05；\*\*：四君子湯組與 Silymarin 相較 p < 0.05；#：四君子湯組與四物湯組相較 p < 0.05

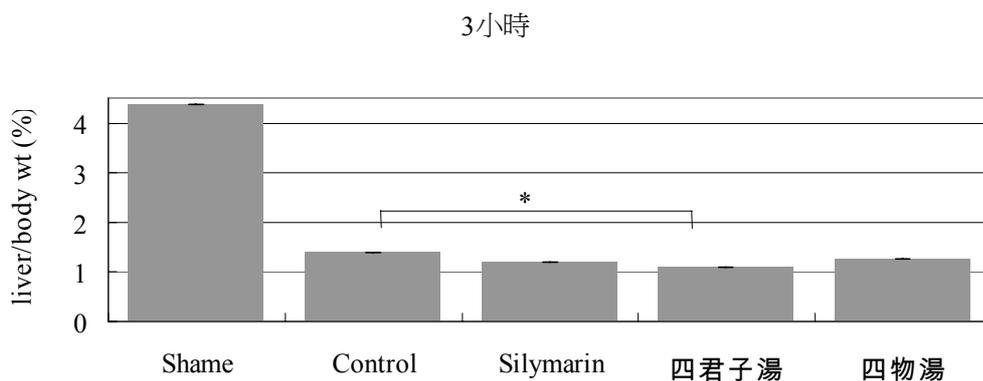


圖 4.1 部分肝切除後 3 小時之肝重/體重比

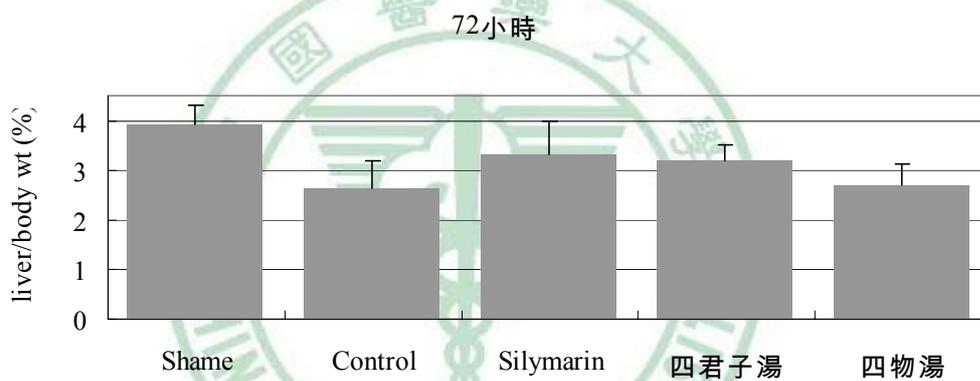


圖 4.2 部分肝切除後 72 小時之肝重/體重比

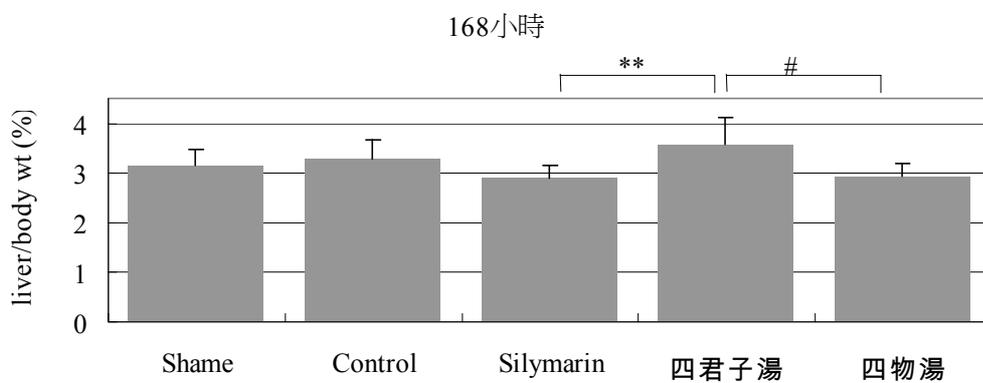


圖 4.3 部分肝切除後 168 小時之肝重/體重比

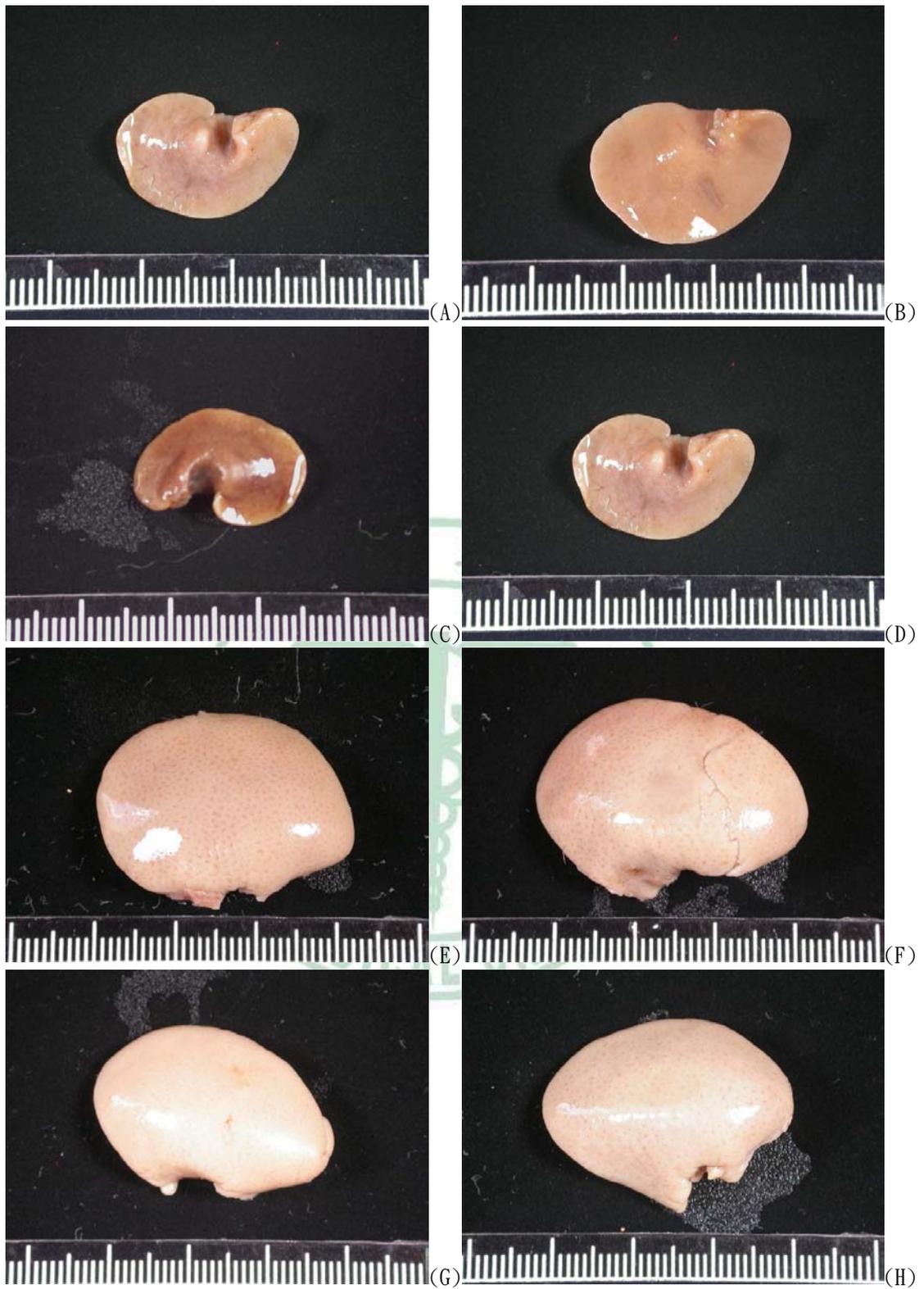


圖 4.4 餘肝葉檢體。3 小時：(A)對照組；(B)Silymarin 組；(C)四君子湯組；(D)四物湯組。72 小時：(E)對照組；(F)Silymarin 組；(G)四君子湯組；(H)四物湯組。168 小時：(I)對照組；(J)Silymarin 組；(K)四君子湯組；(L)四物湯組。



圖 4.4 (續)

#### 4.3 PCNA 增殖標誌結果：

實驗的結果發現，部分肝切除後 3 小時，四君子組之 PCNA GF 亦較對照組與其他各組為低，但各組間皆未達統計意義(表 4.4)(圖 4.5)。部分肝切除後 72 小時，四君子組之 PCNA GF 最高，但與對照組和 Silymarin 間並無統計意義。相對地，四物湯組於部分肝切除後 72 小時之 PCNA GF 較低，但僅與四君子湯組相較有達統計意義(表 4.4)(圖 4.6)。部分肝切除後 168 小時，四君子組之 PCNA GF 最高，而四物湯組與 Silymarin 組較對照組為低，但皆未達統計之意義(表 4.4)(圖 4.7)。

PCNA LI (labeling index) 用於評估處於 S 期肝細胞數目的計數方式。即在 400 倍顯微放大下觀察，並以染有暗褐至黑色細胞核且無細胞質染色的肝細胞數量除以總肝細胞數目(每一檢體之總肝細胞數至少 1000 顆肝細胞)。

實驗的結果發現，部分肝切除後 3 小時，對照組、Silymarin 組、

四君子組與四物湯組之 PCNA LI 相近，四君子組雖略低，但各組間的差異尚未達統計意義(表 4.5)(圖 4.8)。部分肝切除後 72 小時，四君子組、四物湯組與 Silymarin 組之 PCNA LI 皆較對照組為高，其中又以四君子湯組最高，但各組間之差異依然未達統計之意義(表 4.5)(圖 4.9)。部分肝切除後 168 小時，四君子組之 PCNA LI 最高，Silymarin 組次之，對照組第三，而四物湯組則較對照組為低，但皆未達統計之意義(表 4.5)(圖 4.10)。部分肝切除後之 PCNA IHC 染色列於後(圖 4.11)。

表 4.4 PCNA GF (Groth Fraction)

	3 小時	72 小時	168 小時
偽實驗組	54.90% ± 19.26%	61.66% ± 9.33%	29.23% ± 15.30%
對照組	20.53% ± 14.87%	59.68% ± 7.32%	32.68% ± 26.86%
Silymarin 組	20.18% ± 18.05%	61.09% ± 6.44%	24.60% ± 20.52%
四君子湯組	5.51% ± 3.43%	70.35% ± 8.61% #	50.07% ± 19.26%
四物湯組	19.09% ± 14.75%	49.31% ± 7.91% #	21.00% ± 18.40%

PCNA GF 之數值表示為平均值±標準差；#：四君子與四物湯組相較 p < 0.05

表 4.5 PCNA LI (Labeling Index)

	3 小時	72 小時	168 小時
偽實驗組	3.07% ± 1.83%	3.23% ± 3.84%	1.31% ± 1.74%
對照組	0.73% ± 1.49%	1.95% ± 0.67%	0.87% ± 0.92%
Silymarin 組	0.36% ± 0.54%	3.13% ± 1.45%	0.99% ± 1.71%
四君子湯組	0.20% ± 0.32%	3.87% ± 2.62%	1.76% ± 1.04%
四物湯組	0.47% ± 0.69%	2.65% ± 1.98%	0.21% ± 0.16%

PCNA LI 之數值表示為平均值±標準差

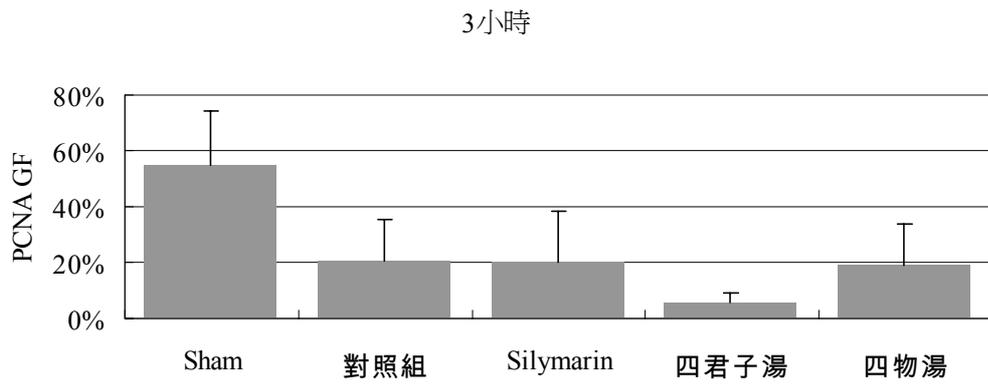


圖 4.5 部分肝切除後 3 小時之 PCNA GF 值

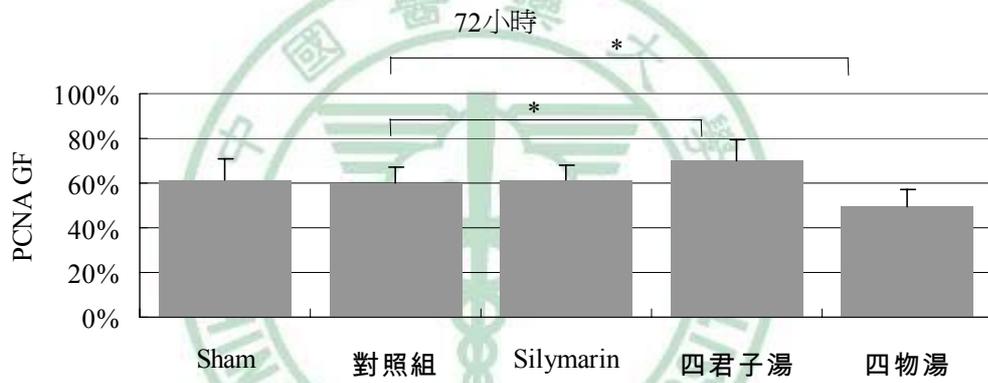


圖 4.6 部分肝切除後 72 小時之 PCNA GF 值

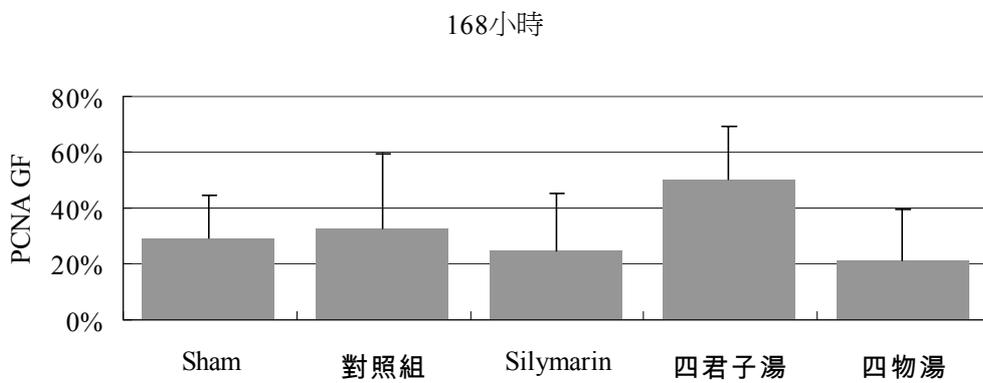


圖 4.7 部分肝切除後 168 小時之 PCNA GF 值

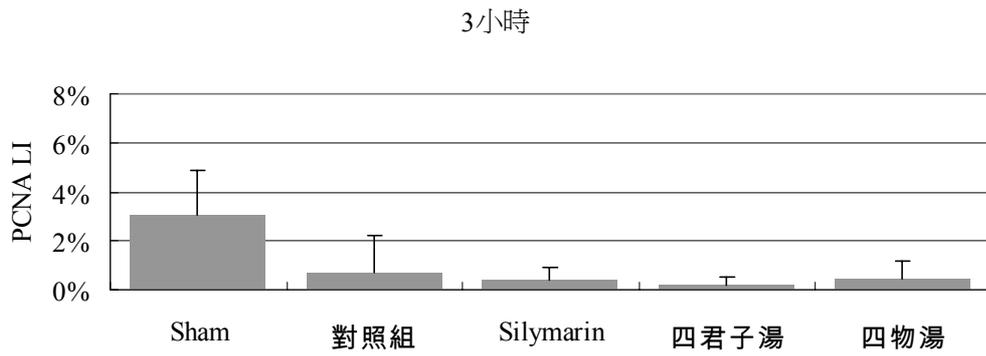


圖 4.8 部分肝切除後 3 小時之 PCNA LI 值

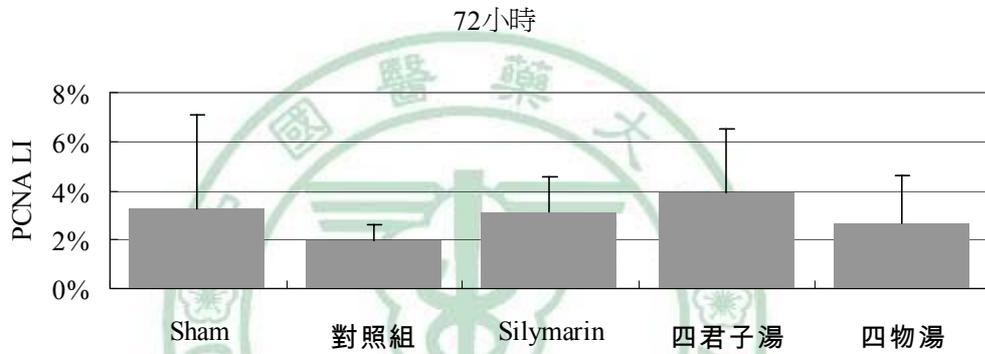


圖 4.9 部分肝切除後 72 小時之 PCNA LI 值

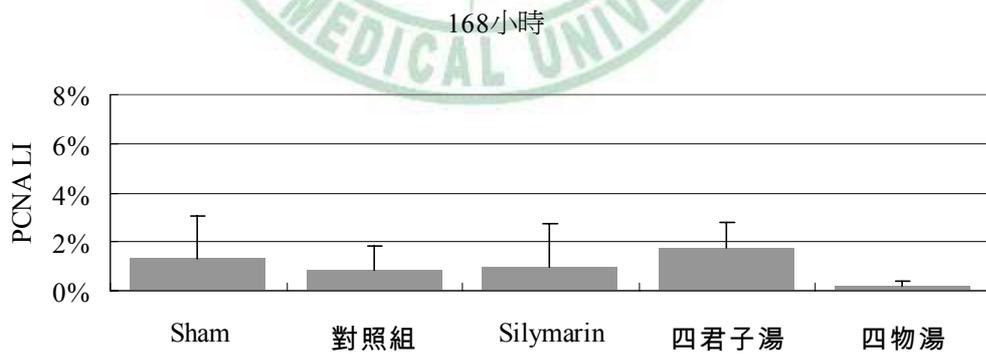


圖 4.10 部分肝切除後 168 小時之 PCNA LI 值

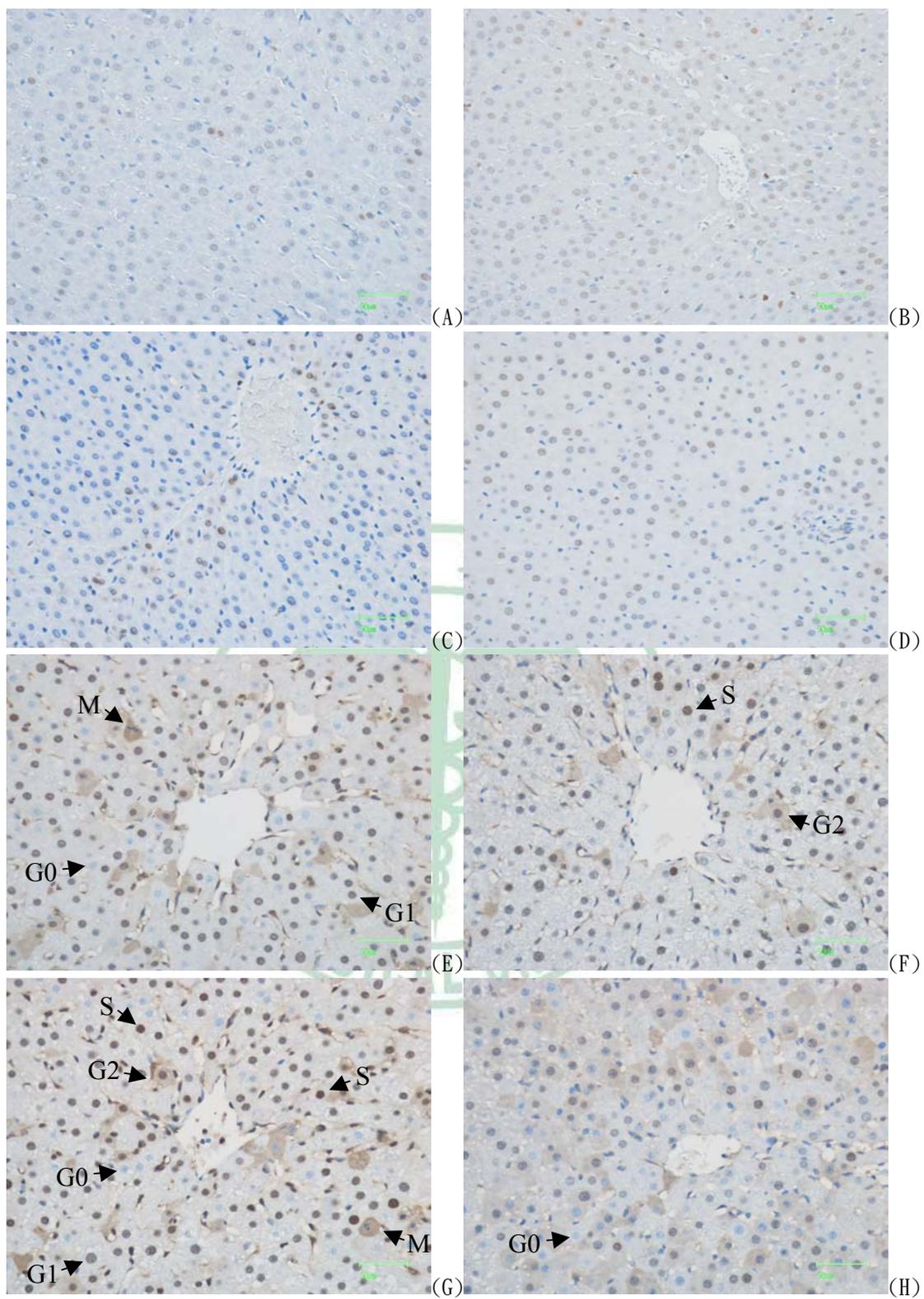


圖 4.11 部分肝切除後之 PCNA IHC 染色。3 小時：(A)對照組；(B)Silymarin 組；(C)四君子組；(D)四物湯組。72 小時之 PCNA IHC 染色：(E)對照組；(F)Silymarin 組；(G)四君子組；(H)四物湯組。168 小時之 PCNA IHC 染色：(I)對照組；(J)Silymarin 組；(K)四君子組；(L)四物湯組。(200X)

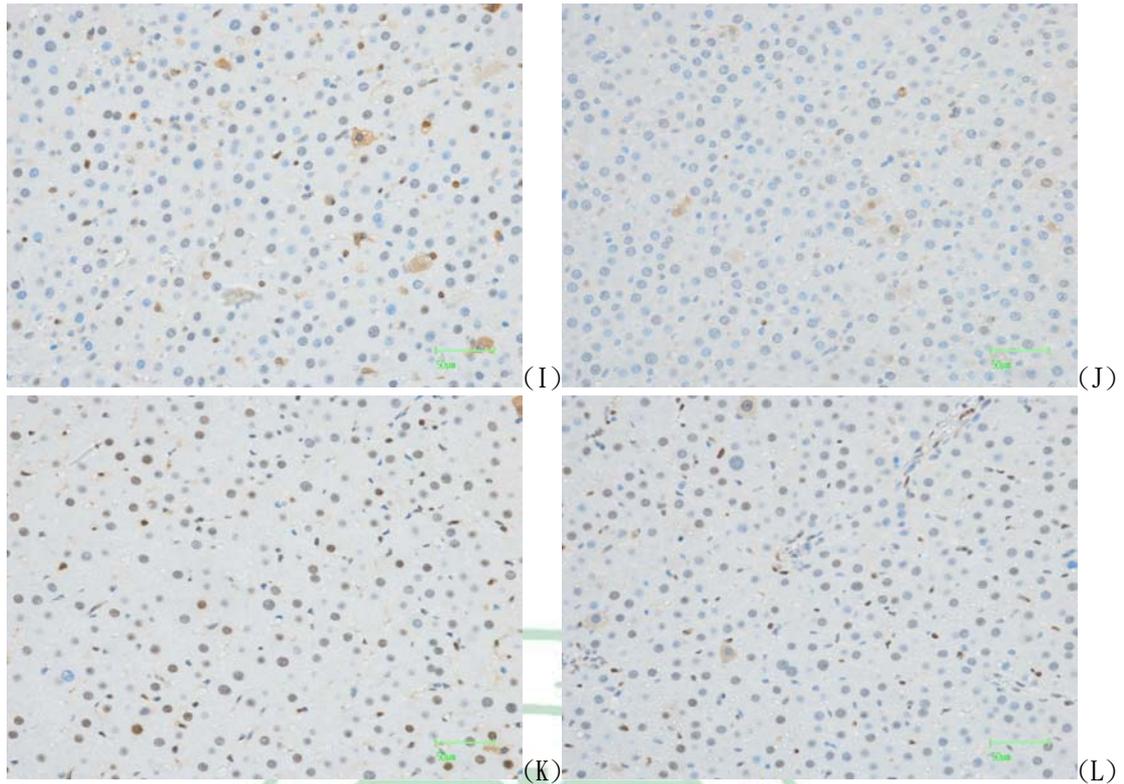


圖 4.11 (續)

#### 4.4 BrdU 增殖標誌結果：

BrdU LI (labeling index) 與 PCNA LI (labeling index) 類似，皆用於評估處於 S 期肝細胞數目的計數方式。即在 400 倍顯微放大下觀察，並以染有暗褐至黑色細胞核的肝細胞數量除以總肝細胞數目(每一檢體之總肝細胞數至少 1000 顆肝細胞)。

實驗的結果發現，部分肝切除後 3 小時，對照組、Silymarin 組、四君子湯組與四物湯組之 BrdU LI 相近，差異並未達統計意義(表 4.6)(圖 4.12)。部分肝切除後 72 小時，四君子組、四物湯組與 Silymarin 組之 BrdU LI 皆較對照組為高，其中四君子組最高，但各組間之差異尚未達統計之意義(表 4.6)(圖 4.13)。部分肝切除後 168 小時，四君子組之 BrdU LI 最高，四物湯組次之，對照組最低，但各組相較仍未達統計意義(表 4.6)(圖 4.14)。部分肝切除後之 BrdU IHC 染色列於後(圖 4.15)。

表 4.6 BrdU LI (Labeling Index)

	3 小時	72 小時	168 小時
偽實驗組	0.02% ± 0.03%	0.10% ± 0.14%	0.02% ± 0.03%
對照組	0.01% ± 0.02%	0.30% ± 0.30%	0.02% ± 0.03%
Silymarin 組	0.01% ± 0.01%	0.56% ± 0.36%	0.05% ± 0.05%
四君子湯組	0.00% ± 0.00%	1.04% ± 0.76%	0.10% ± 0.08%
四物湯組	0.01% ± 0.01%	0.87% ± 0.86%	0.09% ± 0.07%

BrdU LI 之數值表示為平均值±標準差

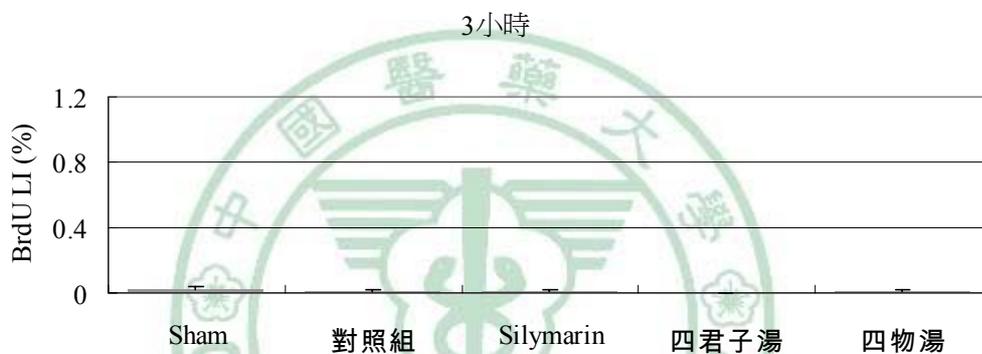


圖 4.12 部分肝切除後 3 小時之 BrdU LI 值

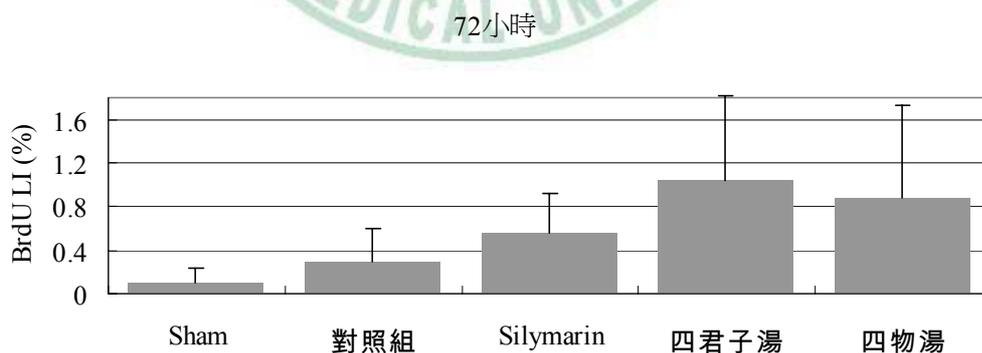


圖 4.13 部分肝切除後 72 小時之 BrdU LI 值

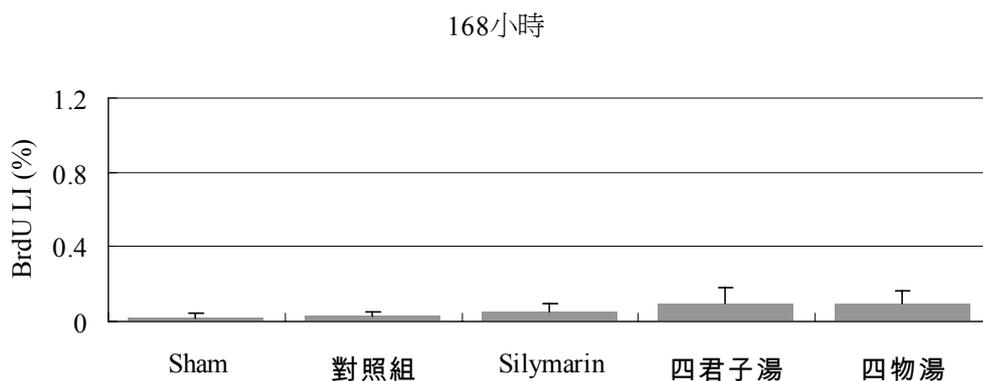


圖 4.14 部分肝切除後 168 小時之 BrdU LI 值

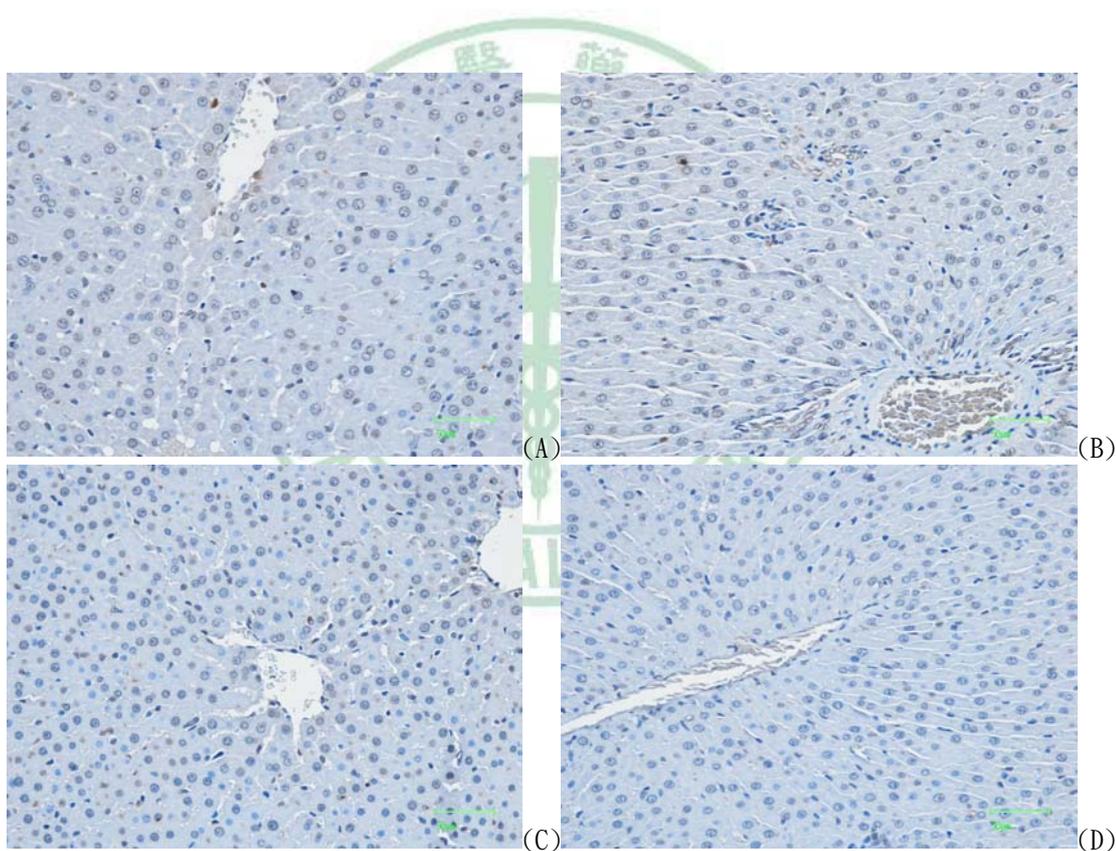


圖 4.15 部分肝切除後之 BrdU IHC 染色。3 小時：(A)對照組；(B)Silymarin 組；(C)四君子組；(D)四物湯組。72 小時之 BrdU IHC 染色：(E)對照組；(F)Silymarin 組；(G)四君子組；(H)四物湯組。168 小時之 BrdU IHC 染色：(I)對照組；(J)Silymarin 組；(K)四君子組；(L)四物湯組。(200X)

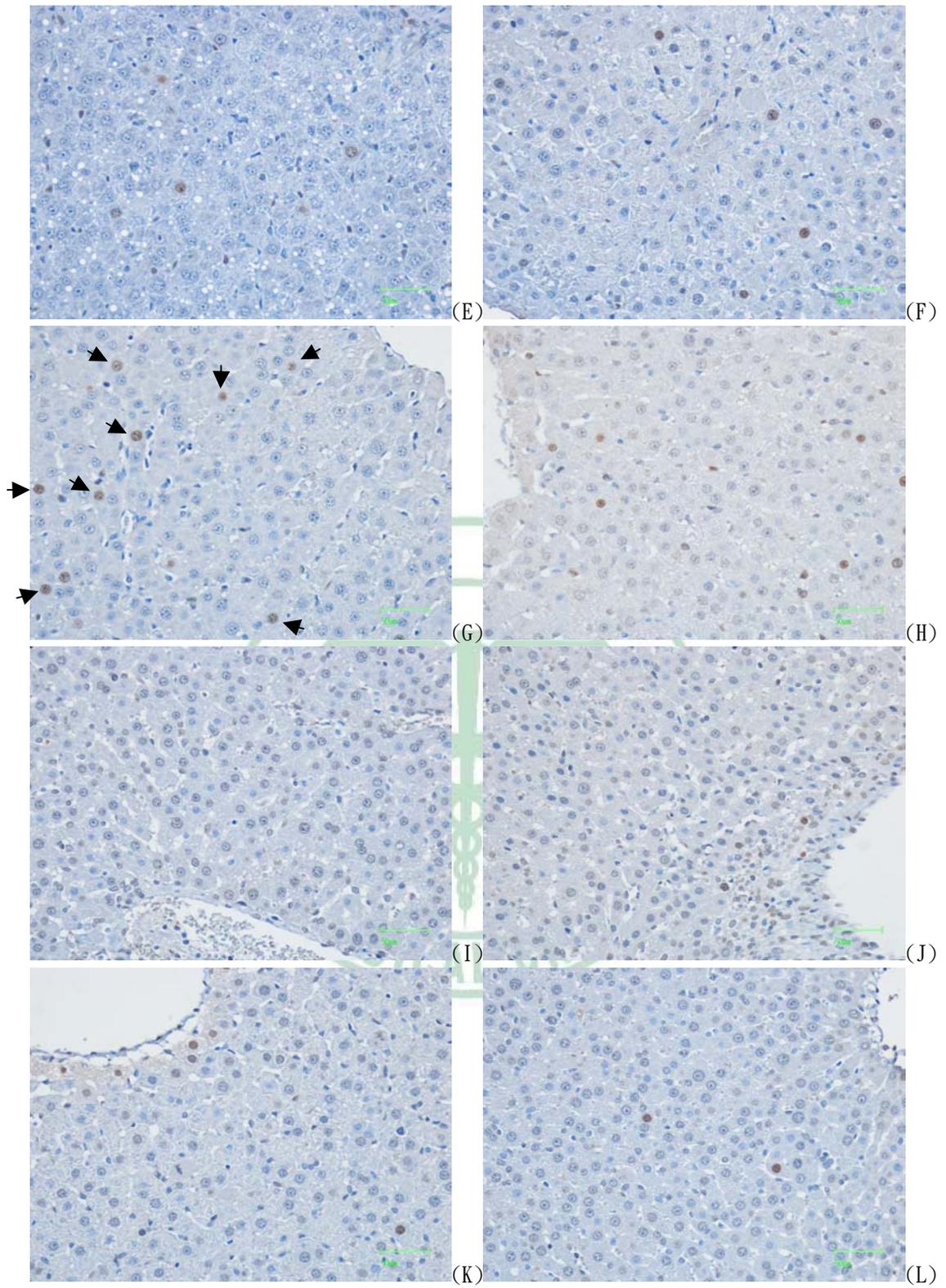


圖 4.15 (續)

## 4.5 血清生化值檢測結果：

### 4.5.1 GOT 與 GPT：

GOT 與 GPT 是血液中的兩種轉氨酶。GOT 可存在於肝臟以外的組織，而 GPT 的專一性較高，主要存在於肝細胞之中。因此，如肝炎、心肌梗塞、肌肉發炎或溶血等都可能導致 GOT 的上升，而 GPT 上升便可能是肝臟疾病所導致。

由實驗結果發現，部分肝切除後 3 小時時，四君子組與對照組相近，而四物湯組與 Silymarin 組之 GOT 較對照組為低，但各組與對照組間並未達統計意義。部分肝切除後 72 小時，四君子組、四物湯組與 Silymarin 組之 GOT 均較對照組為高，且各組與對照組間亦無統計意義。於部分肝切除 168 小時，各組與對照組相近，且無顯著的差異(表 4.7)(圖 4.16)。

相似的，部分肝切除後 3 小時，Silymarin 組、四君子組與四物湯組之 GPT 較對照組為低，但未達統計意義。而於部分肝切除後 72 小時與肝再生末期之 168 小時時，各組與對照組間的 GPT 相近，亦無顯著差異(表 4.8)(圖 4.17)。

### 4.5.2 白蛋白(Albumin)和球蛋白(Globulin)：

血中蛋白濃度可顯示出肝臟疾病和身體的營養狀態，而在血液中的主要蛋白為白蛋白(albumin)和球蛋白(globulin)。白蛋白主要功能是維持血液的滲透壓，而球蛋白則與身體的免疫和物質運送有關。一般來說，白蛋白的含量會高於球蛋白，但若因肝功能不佳而無法製造足夠的白蛋白，或因發炎而使免疫球蛋白增加時，將使得白蛋白的含量低於球蛋白的含量。

由實驗結果可知，除了 3 小時時各組的差異較大之外，於 72 小時與 168 小時時各組間的差異基本上不大。其中四君子湯組與四物湯組於部分肝切除後 3 小時時白蛋白較對照組為低，其中四君子湯組具統

計意義。而於 72 小時與 168 小時時，各組與對照組間之白蛋白含量已無顯著差異(表 4.9)(圖 4.18)。

在球蛋白方面，部分肝切除後 3 小時與 72 小時時，各組間之差異並不大，其中四君子湯與四物湯組均較對照組為低，但未達統計意義。而於部分肝切除後 168 小時，Silymarin 組、四君子湯與四物湯組之球蛋白均較對照組稍高，其中四君子湯與對照組間之差異有達統計意義(表 4.10)(圖 4.19)。

總蛋白質方面，3 小時時各組的差異較大，四君子湯組與四物湯組均較對照組為低，其中四君子湯組與對照組之差異達統計意義。而於 72 小時與 168 小時時各組間的差異基本上不大，其中僅四物湯於 72 小時時略低於對照組且達統計意義(表 4.11)(圖 4.20)。

#### 4.5.3 總膽紅素 (Total Bilirubin) :

膽紅素的主要來源是血紅素之代謝產物，這些游離膽紅素經由肝細胞進行結合(conjugation)作用後，再經由膽管注入腸道內而排出體外。如果若因紅血球破壞過快使得膽紅素形成過多，或因疾病等因素導致肝細胞受損或膽管阻塞，都可能造成膽紅素無法順利排除而使得血中膽紅素濃度上升。

實驗發現，除 3 小時時各組的差異較大之外，於 72、168 小時時各組的差異基本上不大。並經統計，Silymarin 組、四君子湯組與四物湯組在各時段與對照組間的差異皆無統計意義(表 4.12)(圖 4.21)。

#### 4.5.4 $\gamma$ -丙麩胺醯轉移酶 (gamma glutamyl transpeptidase, $\gamma$ -GT) :

當肝細胞受損、膽道阻塞或是膽汁滯留時會導致  $\gamma$ -GT 的上升，但  $\gamma$ -GT 不僅存於肝膽系統，人體許多器官亦含有大量的  $\gamma$ -GT。雖然  $\gamma$ -GT 對肝細胞受損是相當敏感的指標，可是缺乏專一性是使用的限制，因此可與鹼性磷酸酶結合作為鑑別評估。

實驗結果發現，不管是部分肝切除後 3 小時、72 小時，或 168 小

時時，各組於各時段之  $\gamma$ -GT 差異皆很大，僅四君子湯組較為穩定。經統計分析，Silymarin 組、四君子湯組與四物湯組在各時段與對照組間的差異皆無統計意義。另由標準差來看，各組的組內差異皆很大，就算是偽實驗組間之差異亦很大(表 4.13)(圖 4.22)。

#### 4.5.5 鹼性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, ALP)：

ALP 是存在於肝、膽和骨骼以及少量存在於胎盤中的一種酵素，因此當膽汁排除發生障礙時就會造成 ALP 的上升。此外包括骨骼病變、懷孕與甲狀腺機能亢進等，亦可能導致 ALP 上升。因此，ALP 搭配  $\gamma$ -GT 可作為肝臟異常之評估。

實驗結果發現，部分肝切除後 3 小時，Silymarin 組、四君子組與四物湯組的 ALP 濃度皆較對照組為低，其中四君子組與四物湯組達統計意義。但部分肝切除後 72 小時與 168 小時，Silymarin 組、四君子組與四物湯組的 ALP 濃度皆較對照組為高，其中僅四君子組於術後 168 小時時與對照組相較達統計意義(表 4.14)(圖 4.23)。

參照  $\gamma$ -GT 後，ALP 和  $\gamma$ -GT 較對照組皆升高者，包括部分肝切除後 72 小時之 Silymarin 組和四物湯組，以及 168 小時之 Silymarin 組、四君子湯和四物湯組。但由實驗數據也可發現，對照組之 ALP 和  $\gamma$ -GT 數值起伏亦很大。

表 4.7 GOT

	3 小時	72 小時	168 小時
偽實驗組	153.85 ± 21.3	87.40 ± 16.06	107.54 ± 12.98
對照組	343.20 ± 111.53	109.02 ± 16.09	116.63 ± 18.89
Silymarin 組	200.47 ± 49.12	130.28 ± 22.25	131.53 ± 24.77
四君子湯組	336.82 ± 375.93	141.40 ± 41.38	93.08 ± 28.06
四物湯組	222.43 ± 34.58	173.26 ± 55.23	138.76 ± 35.28

GOT 之數值表示為平均值±標準差

表 4.8 GPT

	3 小時	72 小時	168 小時
偽實驗組	66.10 ± 5.92	39.40 ± 6.54	40.56 ± 4.87
對照組	137.80 ± 26.66	58.28 ± 4.70	43.65 ± 5.27
Silymarin 組	77.90 ± 17.86	65.17 ± 4.99	43.29 ± 5.52
四君子湯組	103.27 ± 91.25	65.34 ± 11.92	53.60 ± 23.11
四物湯組	77.90 ± 22.60	71.52 ± 12.28	46.90 ± 6.97

GPT 之數值表示為平均值±標準差

表 4.9 Albumin

	3 小時	72 小時	168 小時
偽實驗組	4.00 ± 0.08	3.52 ± 0.17	3.56 ± 0.56
對照組	3.38 ± 0.28	3.68 ± 0.12	3.78 ± 0.26
Silymarin 組	3.62 ± 0.11	3.54 ± 0.24	3.64 ± 0.31
四君子湯組	2.53 ± 0.42 *	3.56 ± 0.11	3.34 ± 0.43
四物湯組	2.80 ± 0.63	3.40 ± 0.32	3.77 ± 0.15

Albumin 之數值表示為平均值±標準差；\*：與對照組相較 p < 0.05

表 4.10 Globulin

	3 小時	72 小時	168 小時
偽實驗組	1.96 ± 0.22	2.79 ± 0.26	1.93 ± 0.31
對照組	1.57 ± 0.23	2.19 ± 0.22	1.79 ± 0.24
Silymarin 組	1.71 ± 0.17	1.87 ± 0.18	1.88 ± 0.19
四君子湯組	1.43 ± 0.29	1.96 ± 0.37	2.18 ± 0.28 *
四物湯組	1.41 ± 0.17	1.88 ± 0.13	2.07 ± 0.21

Globulin 之數值表示為平均值±標準差；\*：與對照組相較 p < 0.05

表 4.11 Total Protein

	3 小時	72 小時	168 小時
偽實驗組	5.96 ± 0.19	6.30 ± 0.38	5.49 ± 0.86
對照組	4.95 ± 0.47	5.87 ± 0.34	5.57 ± 0.34
Silymarin 組	5.34 ± 0.25	5.41 ± 0.22	5.53 ± 0.41
四君子湯組	3.96 ± 0.61 *	5.52 ± 0.36	5.52 ± 0.69
四物湯組	4.21 ± 0.78	5.28 ± 0.31 *	5.84 ± 0.26

Total Protein 之數值表示為平均值±標準差；\*：與對照組相較 p < 0.05

表 4.12 Total Bilirubin

	3 小時	72 小時	168 小時
偽實驗組	0.15 ± 0.03	0.14 ± 0.02	0.16 ± 0.02
對照組	0.41 ± 0.25	0.18 ± 0.04	0.20 ± 0.06
Silymarin 組	0.26 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.22 ± 0.03
四君子湯組	0.41 ± 0.40	0.23 ± 0.06	0.16 ± 0.02
四物湯組	0.33 ± 0.09	0.25 ± 0.02	0.19 ± 0.02

Total Bilirubin 之數值表示為平均值±標準差

表 4.13  $\gamma$ -GT

	3 小時	72 小時	168 小時
偽實驗組	0.54 ± 0.51	0.02 ± 0.04	0.68 ± 0.94
對照組	0.47 ± 0.37	1.14 ± 1.48	0.23 ± 0.28
Silymarin 組	0.18 ± 0.24	1.89 ± 1.41	0.63 ± 0.45
四君子湯組	1.07 ± 1.53	1.10 ± 0.65	1.27 ± 1.08
四物湯組	0.24 ± 0.28	1.69 ± 1.42	2.12 ± 4.47

$\gamma$ -GT 之數值表示為平均值±標準差

表 4.14 Alkaline phosphatase

	3 小時	72 小時	168 小時
偽實驗組	250.98 ± 49.03	140.76 ± 12.81	164.00 ± 54.17
對照組	249.88 ± 38.03	298.02 ± 143.48	199.80 ± 32.73
Silymarin 組	185.27 ± 28.87	503.12 ± 96.46	229.07 ± 55.97
四君子湯組	90.35 ± 26.80 *	450.44 ± 70.53	294.08 ± 48.50 *
四物湯組	170.18 ± 54.11 *	435.22 ± 202.58	224.23 ± 46.58

Alkaline phosphatase 之數值表示為平均值±標準差；\*：與對照組相較  $p < 0.05$

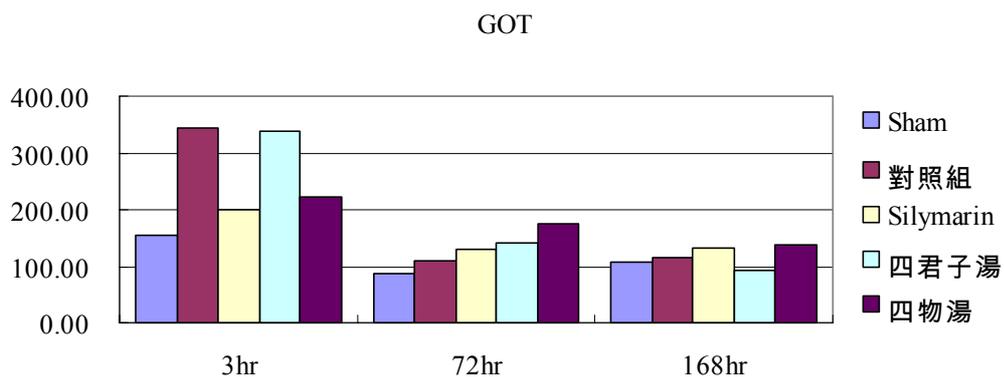


圖 4.16 部分肝切除後之 GOT 值

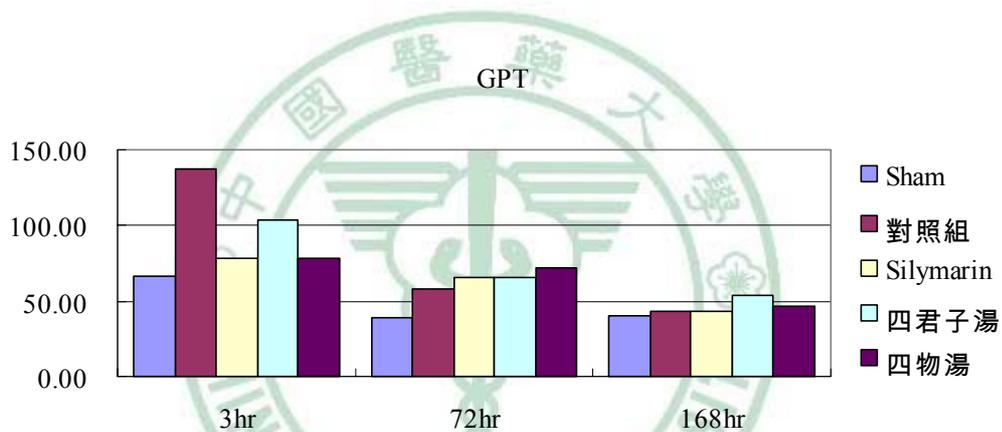


圖 4.17 部分肝切除後之 GPT 值

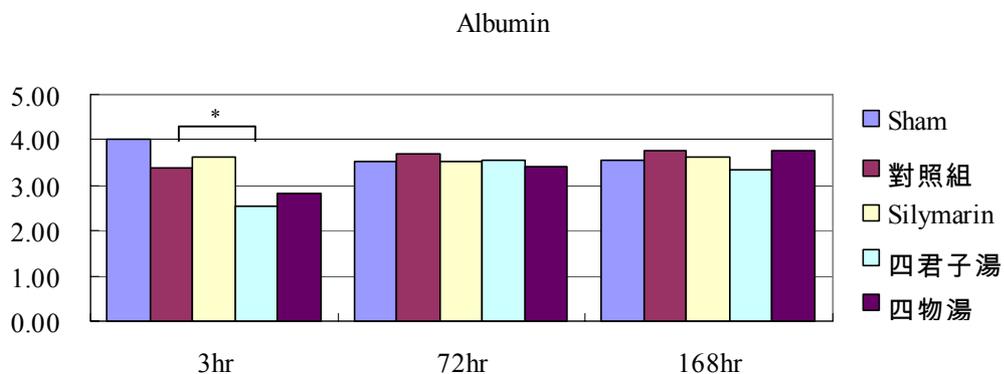


圖 4.18 部分肝切除後之 Albumin 值

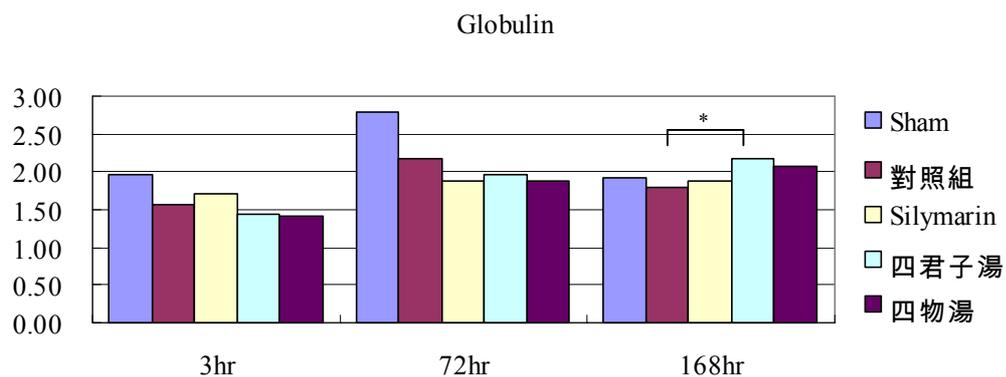


圖 4.19 部分肝切除後之 Globulin 值

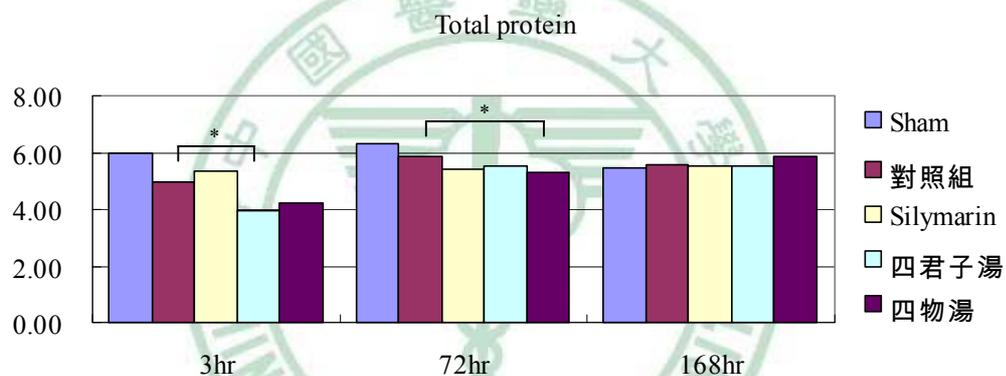


圖 4.20 部分肝切除後之 Total Protein 值

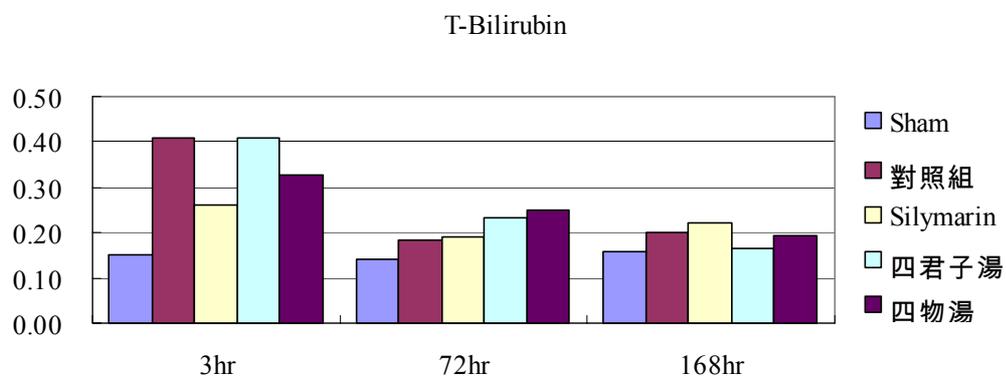


圖 4.21 部分肝切除後之 Total Bilirubin 值

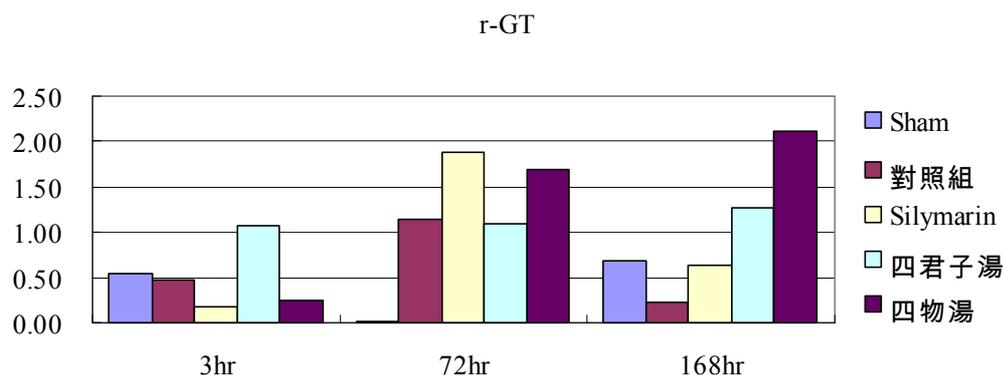


圖 4.22 部分肝切除後之  $\gamma$ -GT 值

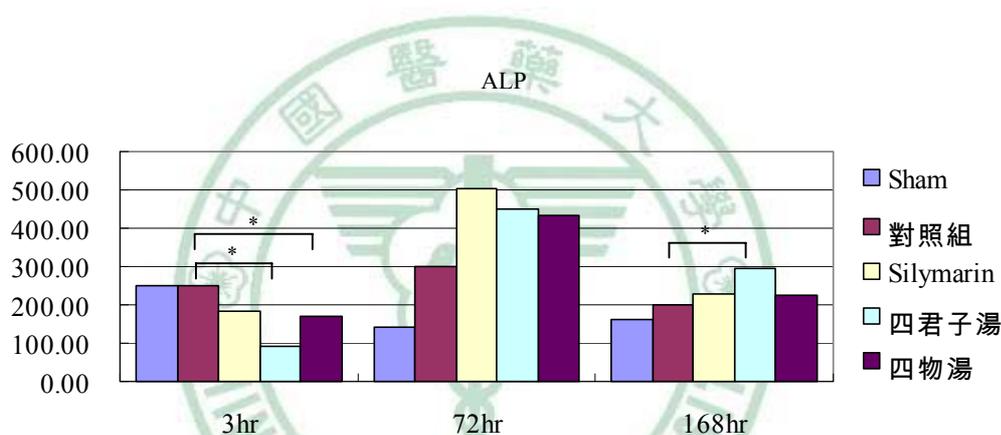


圖 4.23 部分肝切除後之 Alkaline phosphatase 值

#### 4.6 組織學觀察(H&E 染色)結果：

由組織學的 H&E 染色可發現，部分肝切除後 72 小時時，四君子湯組的組織再生明顯，細胞再生活性高，處於有絲分裂期(M 期)的肝細胞數明顯它組為多。而部分肝切除後 168 小時後，再生肝組織排列良好、細胞型態正常，且無明顯之膽道阻塞、纖維化及組織壞死現象。組織學觀察如下(圖 4.24)。

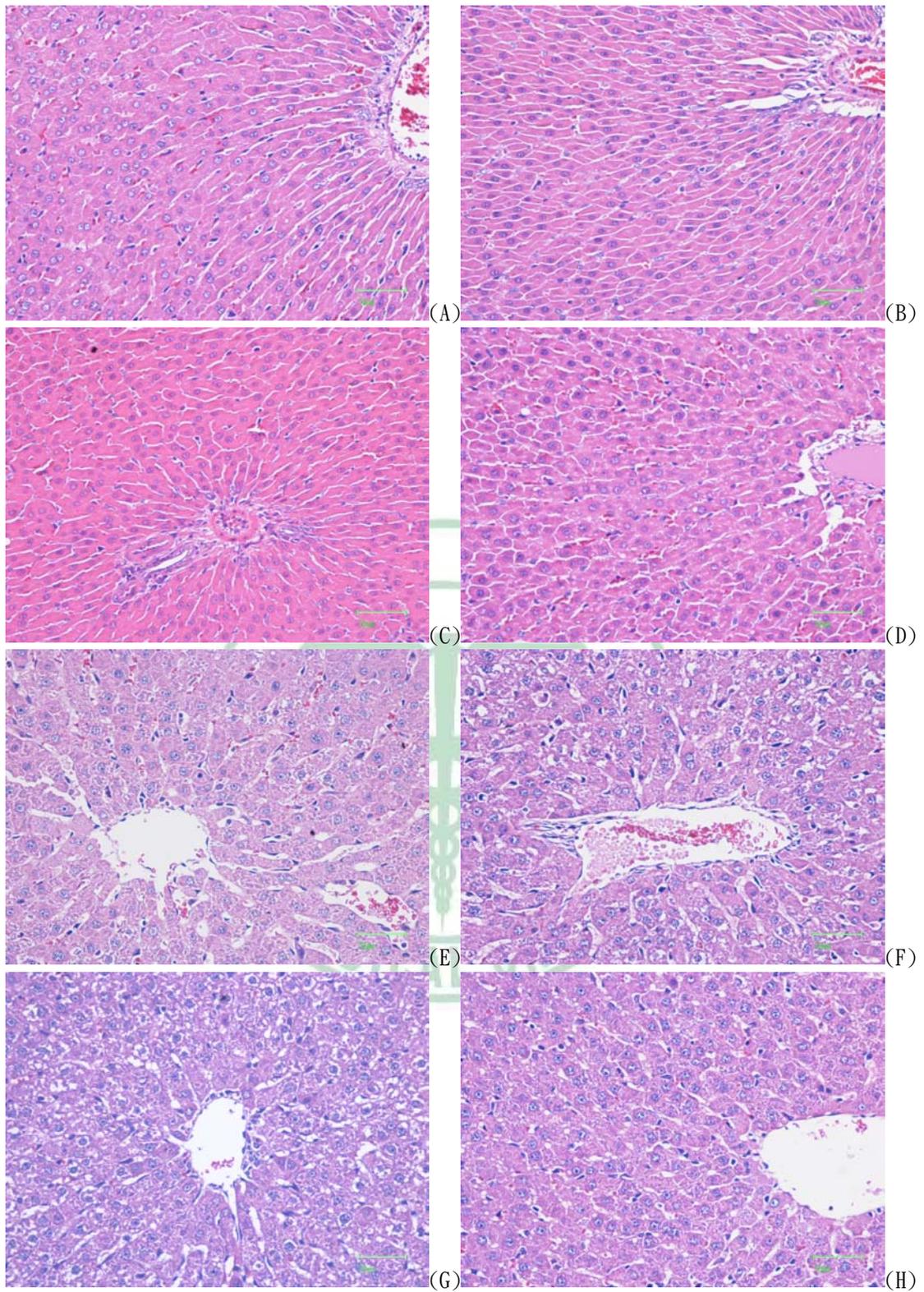


圖 4.24 部分肝切除後之 H&E 染色。3 小時：(A)對照組；(B)Silymarin 組；(C)四君子組；(D)四物湯組。72 小時：(E)對照組；(F)Silymarin 組；(G)四君子組；(H)四物湯組。168 小時：(I)對照組；(J)Silymarin 組；(K)四君子組；(L)四物湯組。(200X)

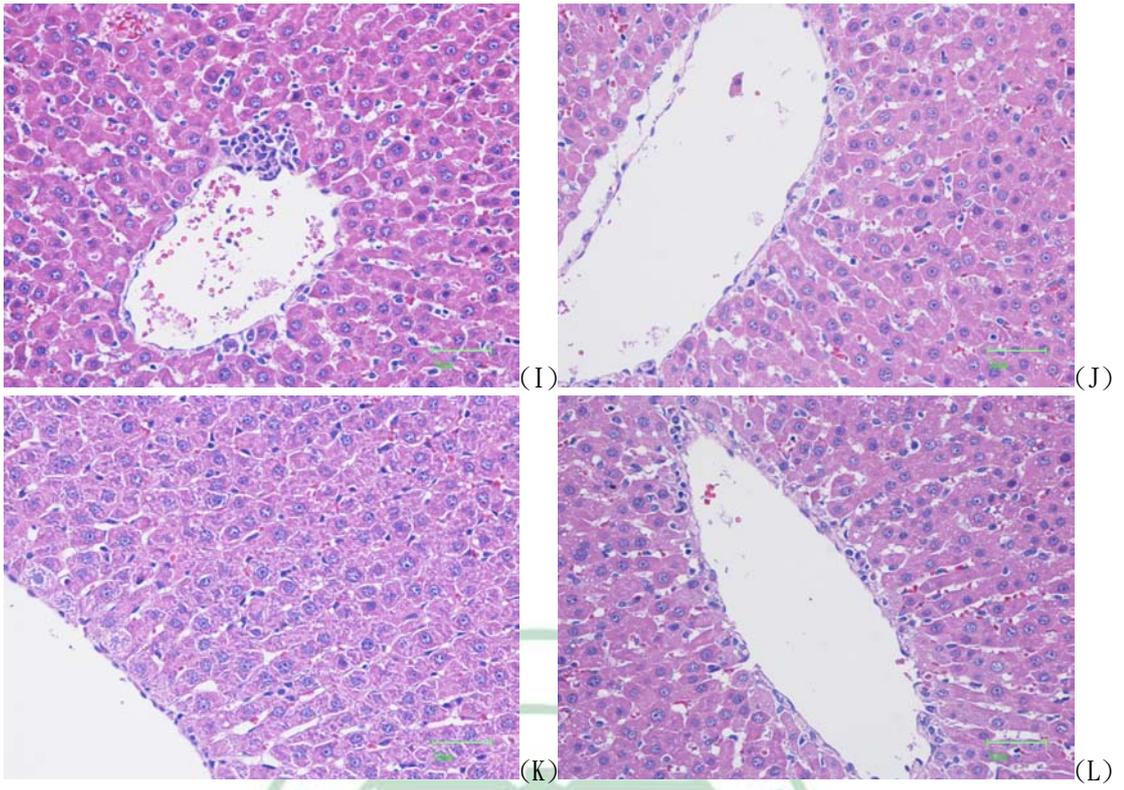


圖 4.24 (續)



## 第五章 討論

肝臟的生理作用包括儲存及過濾血液的功能、參與體內大部分代謝系統有關的代謝作用，以及負責膽汁形成及排泄的功能。血液方面，平均每分鐘有 1450mL 的血液流經肝臟，其中約有 1100mL 來自門靜脈，而約有 350mL 來自肝動脈。此外，肝臟中的 kuffer cells 的吞噬作用很強，可以在門靜脈血液流經肝竇狀隙前去除其中 99% 以上包括由腸道來的細菌。代謝方面，肝臟具有很高的代謝效率，並能與身體的其他代謝系統協同作用。其主要作用包含對碳水化合物、脂肪與蛋白質的代謝作用，亦包括藥物、荷爾蒙及礦物質的代謝。另外，膽紅素的代謝又牽涉到紅血球的破壞、血紅素的運送，以及膽汁的形成與分泌等作用<sup>[65]</sup>。由此可看出，肝臟作用的範圍相當廣泛，因此可說肝臟是人體相當重要的器官。

然而肝臟相關的疾病很多，包括病毒性肝炎、藥物性肝炎、肝纖維化、肝硬化與肝癌等，長期以來便為醫學界所關注的對象。根據統計，在民國 80~93 年之間，慢性肝病及肝硬化更一直位於國人的十大死因之內。因此除了積極尋求治療藥物，研究指出，肝臟具有驚人的再生能力，且肝細胞再生在許多肝臟疾病中都扮演著重要的修復角色，因此肝再生便成為肝臟相關研究的重要議題。

然而因為許多藥物誘導之肝損傷模型常會造成肝細胞壞死、炎細胞浸潤、細胞再生時間點不一等，加上部分肝切除所誘導的細胞再生環境單純且時間點明確，因此部分肝切除的模式是最常被用來評估肝細胞再生能力的研究題材。

相似的實驗模式已廣泛地被運用於肝再生實驗，例如，單一劑量之 Triiodothyronine( $T_3$ )可加強 70% 部分肝切除後的肝再生作用<sup>[66]</sup>。Fish oil 和 Vitamin E 等可增加肝細胞之 GSH 與 SOD，亦有明顯之促進 70% 部分肝切除後肝細胞再生的能力<sup>[67]</sup>。另外，100 和 200 mg/kg 之 *Sida cordifolia* 水提取物可刺激大鼠 67% 部分肝切除後的肝再生作用<sup>[68]</sup>。

以及 100 mg/kg 之 *Hyptis pectinata* 葉的水提取物亦可刺激大鼠 67% 部分肝切除後的肝再生作用，且 200 mg/kg 提取物可降低部分肝切除後的血清 AST 值<sup>[69]</sup>。這些實驗皆說明 2/3 部分肝切除是一個相當成熟的實驗模型。

中醫擁有完整的治療理論，臨床上對於肝臟疾病的治療也擁有不錯的經驗與療效。而傳統中醫的治療理論架構於氣與血之上，氣主煦之，血主濡之，兩者和個體的生存發育可說是息息相關的。其中，四君子湯為中醫補氣代表方劑，而四物湯則為中醫補血代表方劑，兩者亦是臨床常用的基礎方劑。

因此本實驗便欲以四君子湯和四物湯作為研究對象，藉由肝重與內源性再生標記 PCNA、外源性再生標記 BrdU 之免疫組織化學染色法，來評估兩者對於大鼠部分肝切除後的肝細胞再生是否具有促進作用。

在實驗的操作過程部分，部分肝切除手術後 3 小時，各組間的肝重/體重比基本相同，加上殘餘肝臟之組織學檢查無明顯膽道阻塞現象等，指出本次實驗於手術切除大鼠肝臟 median 葉與 left lateral 葉部分有不錯的穩定度。另外，本次實驗的動物存活率為 80%，與過去經驗相對較小。而損失的動物絕大部分是在麻醉後至手術期間，加上許多損失動物都有一次酚巴比妥注射無效而追加注射的紀錄，因此推估麻醉因素可能是本次實驗動物損失之主因。

在實驗結果方面，部分肝切除手術後 3 小時，四君子湯組在肝重/體重比、PCNA 與 BrdU 指標上都呈現出較各組略低的表現。而於部分肝切除後 72 小時時，四君子湯組在肝重/體重比、內源性 PCNA GF、內源性 PCNA LI 與外源性 BrdU LI 增殖指標中，四君子湯促進肝細胞再生的作用多表現出較對照組、Silymarin 組與四物湯組為佳，但大多未達統計意義。一般而言，2/3 部分肝切除後 7~10 天可恢復原有肝臟質量。而在本次實驗當中，部分肝切除後 168 小時時，四君子湯在肝重/體重比、PCNA GF、PCNA LI 與 BrdU LI 等指標上雖較各組為高，但統計上並無明顯差異。

這暗示四君子湯對於已恢復原有重量之肝臟應無明顯的促進肝細

胞再生之作用，但進一步的試驗可再藉由延長實驗天數、延長 BrdU 的作用時間，甚至運用其他試驗來佐證。但由目前的結果來看，中醫補氣方劑四君子湯具有促進大鼠部分肝切除後肝再生的傾向，而此作用應會在肝臟重量逐漸恢復後而減緩。

相對之下，部分肝切除後 72 小時時，中醫補血方劑四物湯雖在 PCNA LI 與 BrdU LI 可觀察到有促進部分肝切除後肝再生的傾向，但與對照組間的差異並未達顯著差異。另外，四物湯在肝重/體重比與 PCNA GF 卻顯示出相反的結果。因此，補血方劑四物湯是否具有促進肝再生的作用尚需進一步研究。

另外，相同的，四物湯於部分肝切除後 168 小時之 BrdU LI 也顯示出具有較多的增殖細胞。但與對照組相較並未達顯著差異，配合肝重/體重比、PCNA GF 與 PCNA LI 等指標，故亦可說四物湯對於已恢復原有重量之肝臟也應無明顯的促進肝細胞增生之作用。

水飛薊素(Silymarin)是 *Silybum marianum*(milk thistle)種子的萃取物，其最早於西元前四百年就已被當做藥用植物來使用，而於十六世紀時開始被用來治療肝膽相關疾病。而 Silymarin 是一種複雜的混合物，其具有四種 flavonolignan 的異構物成分，包括 silybin、isosilybin、silydianin 和 silychristin，其中 silybin 是含量最多(60~70%)亦是最主要的活性成分<sup>[70]</sup>。實驗室研究已經證明 Silymarin 具有代謝及細胞調節 (metabolic and cell-regulating effects)、抑制 5-lipoxygenase 路徑、清除 R-OH 形式活性氧(ROS)與參與 DNA 表現的作用。另外雖然缺乏嚴謹或明確的結果，但一些臨床研究依然顯示出 Silymarin 對於 *Amanita phalloides* 毒蕈中毒的死亡率、tacrine 的清除率、病毒性肝炎與酒精性肝臟疾病等皆有一定的益處<sup>[71]</sup>。

本實驗指出，部分肝切除後 72 小時時，Silymarin 在肝重/體重比、PCNA LI 和 BrdU LI 都顯示出較對照組有更佳的肝再生促進作用，但尚未達統計意義。而在血清學方面，部分肝切除後 3 小時時，Silymarin 在 GOT、GPT、T-Bilirubin、 $\gamma$ -GT 和 ALP 等方面都較對照組為低，然亦未達顯著差異。

而與四君子湯相較之下，四君子湯和 Silymarin 在部分肝切除後 72

小時的肝重/體重比相近。而在 PCNA GF、PCNA LI 與 BrdU LI 等方面，雖未達統計意義，但四君子湯卻都顯示出具較佳的肝再生促進作用。另外於部分肝切除後 168 小時時，四君子湯在肝重/體重比、PCNA GF、PCNA LI 與 BrdU LI 等方都顯示出較 Silymarin 為佳的肝再生促進作用，但其中僅肝重/體重比達統計意義。

在本實驗中發現，預防性投與四君子湯之大鼠，經 2/3 部分肝切除後之肝再生作用明顯，各項增殖指標亦優於對照組、Silymarin 組與四物湯組。而中醫理論認為，氣屬陽，血屬陰，氣主煦之，血主濡之。氣與陽有促進機體生氣蓬勃之作用，四君子湯臨床上亦常運用於胃氣虧虛、中氣不足之證。因此四君子湯是否會因促進個體氣機運行而影響肝細胞之蛋白質合成、細胞體積改變、酵素活性改變和細胞再生的區域(zone)不同等作用，進一步促進或參與肝細胞再生之作用則應再深入研究與探討。

在肝再生相關分子機轉方面，最近的研究指出，肝再生的相關分子機轉包含兩個重要的部份，一為 cytokine network、一則為 growth factors。Cytokine network 與肝再生的啟動有關，通常於部分肝切除後會立即反應，與其相關的因子有 TNF $\alpha$ 、IL-6 和 NF $\kappa$ B 等。另外，growth factors 則與接下來細胞週期的進行有關，而與其相關的因子則有 HGF、EGF 和 TGF $\alpha$  等<sup>[7]</sup>(圖 5.1)(圖 5.2)。相關的分子亦包括，在部分肝切除後 24 小時內，肝細胞之凋亡(apoptosis)降低一個星期。而 Fas ligand 亦在部分肝切除後 3 天內降低，而於 5~7 天後明顯上升。Bcl-2 則在部分肝切除後 24 小時出現高峰值，而在 5 天後降低等<sup>[72]</sup>。

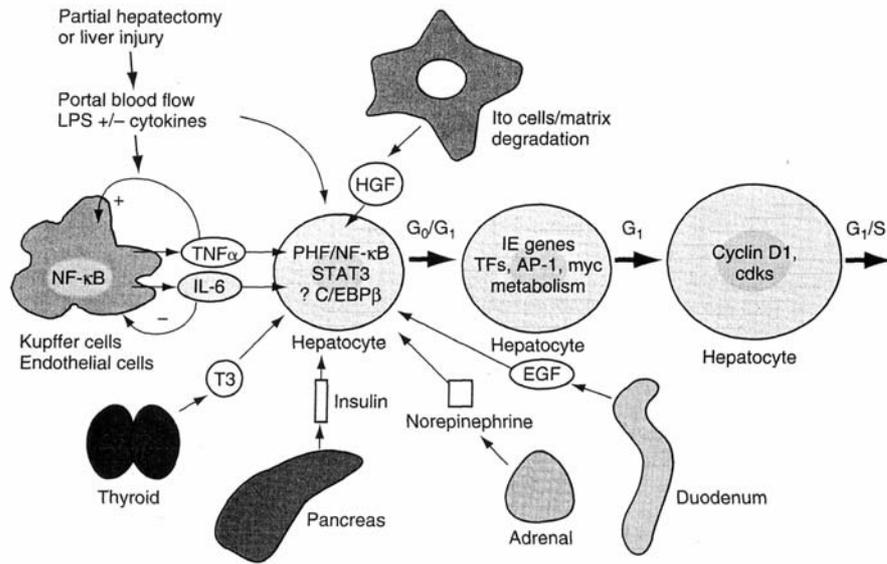


圖 5.1 肝細胞再生相關分子簡圖。摘自 David Zakim, Thomas D. Boyer. Hepatology: a textbook of liver disease. Saunders 2003

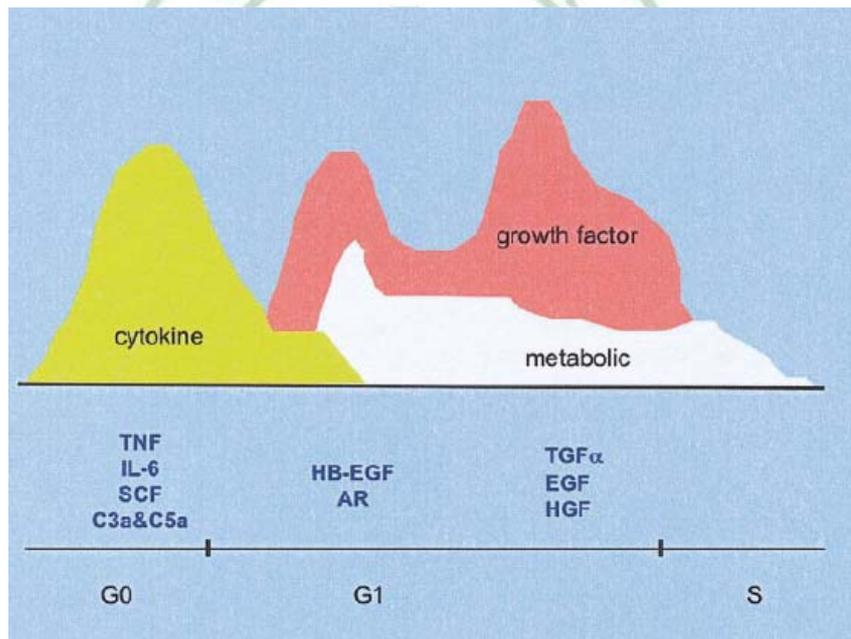


圖 5.2 肝再生相關分子與細胞週期的關係。摘自 Nelson fausto, et al. liver regeneration. Hepatology, 2006; 43(2): s45-s53

而研究亦指出，四君子湯並可促使 IL-2、IL-4、IL-5、TNF- $\alpha$ 、IgE 低下，且淋巴細胞 IL-4、IL-5、CD2 mRNA 表現較弱患者之各項指標恢復正常<sup>[39]</sup>。而四物湯能促進小鼠脾臟細胞分泌 IL-6 及提高 IL-6 mRNA 的表現<sup>[57]</sup>，且可促進 LPS 刺激巨噬細胞進而產生 IL-1 的活性

[59]。這些研究的結果是否與四君子湯促進肝再生的作用有關，仍應進一步研究與探討。

血清學檢查部分，GOT 和 GPT 可顯示出肝細胞損傷的狀況，其中又以 GPT 的專一性較高<sup>[73]</sup>。而 Silymarin 和四物湯對於部分肝切除後肝再生 3 小時時的 GOT 及 GPT 有降低作用。在 72 小時時，Silymarin、四君子湯和四物湯組的 GOT 及 GPT 都略高於對照組，然以上均無統計意義。然而隨後在 168 小時時，各組與對照組間僅有些微差異。

血中蛋白濃度可顯示出肝臟疾病、免疫、物質運送和身體的營養狀態，且白蛋白的減少似乎可刺激肝臟的再生作用<sup>[74]</sup>。而在白蛋白(Albumin)與球蛋白(Globulin)部份，四君子湯組的白蛋白在肝再生的過程中都略低於對照組，但僅有 3 小時時有統計意義。而在部分肝切除後 72 小時與 168 小時時，各組與對照組間已無顯著差異。球蛋白方面，除 168 小時時四君子湯組較對照組高且達統計意義外，各組與對照組間亦無顯著差異。總蛋白質(Total Protein)方面，四君子湯組於 3 小時且四物湯組於 72 小時時略低於對照組，且達統計意義。而於 168 小時時，各組與對照組間已無顯著差異。

總膽紅素(Total Bilirubin)可顯示出溶血、肝細胞受損或膽管阻塞的狀況<sup>[75]</sup>。而在部分肝切除後肝再生 3 小時時各組的差異頗大，但與對照組相較皆無統計意義。並隨後在 72 小時與 168 小時時，各組與對照組間的些微差異已無統計意義。

$\gamma$ -丙氦胺醯轉移酶( $\gamma$ -GT)搭配鹼性磷酸酶(ALP)可作為肝臟異常之評估<sup>[73]</sup>。其中不管是在部分肝切除後 3 小時、72 小時與 168 小時時，各組與對照組間的差異頗大。但 ALP 和  $\gamma$ -GT 均較對照組為高者，包括 72 小時之 Silymarin 組和四物湯組，以及 168 小時之 Silymarin 組、四君子湯和四物湯組。但由實驗數據也可發現，對照組之 ALP 和  $\gamma$ -GT 數值起伏亦很大。

而由組織學的 H&E 染色可發現，部分肝切除後 72 小時，四君子湯組的再生明顯，處於有絲分裂期(M 期)的肝細胞數明顯它組為多。而部分肝切除後 168 小時後，再生肝組織排列良好、細胞型態正常，且無明顯之膽道阻塞、纖維化及組織壞死現象。

另外，雖然 PCNA 免疫組織化學染色法可區分出細胞週期中的特異階段，然而本次實驗中發現 PCNA 免疫組織化學染色的結果差異頗大，由淺褐色至深褐色間要明確區分各個細胞週期的差異確屬不易。因此不僅染色技術的純熟度會影響染色結果，檢體判讀的純熟度亦會影響實驗結果。另外，本次實驗結果亦發現，BrdU 標記之細胞較其他類似試驗為低，可能的原因推斷應與 BrdU 注射的時間較晚(犧牲前 30 分鐘)有關。



## 第六章 結論

本研究發現，中醫方劑促進部分肝切除後肝再生方面，不管是從肝重/體重比、PCNA GF、PCNA LI 與 BrdU LI 都可發現，中醫補氣代表方劑四君子湯具有促進大鼠部分肝切除後肝再生的傾向。另外，此促進作用應會在肝臟重量逐漸恢復後減緩。

而中醫補血方劑四物湯在 PCNA LI 與 BrdU LI 雖可觀察到有促進部分肝切除後肝再生的傾向，但在肝重/體重比與 PCNA GF 部份則顯出相反結果。因此，補血方劑四物湯是否具有促進肝再生的作用尚需進一步研究。

本研究利用部分肝切除、PCNA 與 BrdU 之免疫組織化學染色法等，成功地建立了中醫藥對肝再生影響的研究模式。運用這個研究模式將能快速且方便地評估中醫藥方劑對肝臟再生能力的影響。



## 參考文獻

1. 行政院衛生署：民國 93 年衛生統計(二)生命統計年報，行政院衛生署 2005: pp. 30-62.
2. Pahlavan PS, Feldmann RE, Zavos C, Kountouras J. Prometheus' challenge: molecular, cellular and systemic aspects of liver regeneration. *J Surg Res.* 2006;134(2):238-251.
3. Haga S, Ogawa W, Inoue H, Terui K, Ogino T, Igarashi R, Takeda K, Akira S, Enosawa S, Furukawa H, Todo S, Ozaki M. Compensatory recovery of liver mass by Akt-mediated hepatocellular hypertrophy in liver-specific STAT3-deficient mice. *J Hepatol.* 2005;43(5):799-807.
4. David Zakim, Thomas D. Boyer. *Hepatology: a textbook of liver disease.* Saunders, Philadelphia 2003; 1: 31
5. Michalopoulos G K, DeFrances M C. Liver regeneration. *Science.* 1997;276(5309):60-66.
6. Skarpen E, Oksvold MP, Grøsvik H, Widnes C, Huitfeldt HS. Altered regulation of EGF receptor signaling following a partial hepatectomy. *J Cell Physiol.* 2005;202(3):707-716
7. Nelson Fausto, Jean S. Campbell, Kimberly J. Riehle. *Liver Regeneration.* *Hepatology.* 2006;43:S45-S53.
8. Alison MR. Liver regeneration with reference to stem cells. *Semin Cell Dev Biol.* 2002;13(6):385-387.
9. Michalopoulos GK. Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. *FASEB J.* 1990;4(2):176-187.
10. Ping C, Xiaoling D, Jin Z, Jiahong D, Jiming D, Lin Z. Hepatic sinusoidal endothelial cells promote hepatocyte proliferation early after partial hepatectomy in rats. *Arch Med Res.* 2006;37(5):576-583.
11. Nakashima H, Inui T, Habu Y, Kinoshita M, Nagao S, Kawaguchi A,

- Miura S, Shinomiya N, Yagita H, Seki S. Activation of mouse natural killer T cells accelerates liver regeneration after partial hepatectomy. *Gastroenterology*. 2006;131(5):1573-1583.
12. Krähenbühl L, Feodorovici M, Renzulli P, Schäfer M, Abou-Shady M, Baer HU. Laparoscopic partial hepatectomy in the rat: a new resectional technique. *Dig Surg*. 1998;15(2):140-144.
  13. Marissa Rabelo Tarlál, Fernando Ramalho, Leandra Naira Zambelli Ramalho, Tiago Castro e Silva, Daniel Ferracioli Brandão, Juliana Ferreira, Orlando Castro e Silva, Sérgio Zucoloto. Cellular aspects of liver regeneration. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2006,21(1):63-66
  14. Assy N, Minuk GY. Liver regeneration: methods for monitoring and their applications. *J Hepatol*. 1997;26(4):945-952.
  15. Yin XY, Lai PB, Lee JF, Lau JW. Effects of hepatic blood inflow occlusion on liver regeneration following partial hepatectomy in an experimental model of cirrhosis. *Br J Surg*. 2000;87(11):1510-1515.
  16. Assy N, Gong Y, Zhang M, Pettigrew NM, Pashniak D, Minuk GY. Use of proliferating cell nuclear antigen as a marker of liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Lab Clin Med*. 1998;131(3):251-256.
  17. Foley J, Ton T, Maronpot R, Butterworth B, Goldsworthy TL. Comparison of proliferating cell nuclear antigen to tritiated thymidine as a marker of proliferating hepatocytes in rats. *Environ Health Perspect*. 1993;101 Suppl 5:199-205.
  18. Fairman MP. DNA polymerase  $\delta$ /PCNA: actions and interactions. *J Cell Sci*. 1990;95:1-4
  19. Al-Nafussi AI, Klys HS, Rebello G, Kelly C, Kerr G, Cowie V. The assessment of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining in the uterine cervix and cervical squamous neoplasia. *Int J Gynecol Cancer*. 1993;3(3):154-158.
  20. Levan Muskhelishvili, John R. Latendresse, Ralph L. Kodell, Eric B.

- Henderson. Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA. *J Histochem Cytochem.* 2003;51(12):1681-1688.
21. Lardelli P, Perentes E, Meier G, Navarro N, Ettl RA. Quantification of hepatocytic proliferation in the laboratory mouse. A comparative study using immunohistochemical detection of bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression. *Exp Toxicol Pathol.* 1994;46(2):95-100.
  22. Lee KS, Yang WI. Comparison of brain tumor growth kinetics by proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and bromodeoxyuridine (BrdU) labeling. *Yonsei Med J.* 1992;33(3):265-271.
  23. Alison M, Chaudry Z, Baker J, Lauder I, Pringle H. Liver regeneration: a comparison of in situ hybridization for histone mRNA with bromodeoxyuridine labeling for the detection of S-phase cells. *J Histochem Cytochem.* 1994;42(12):1603-1608.
  24. Eldrige SR, Butterworth BE, Goldsworthy TL. Proliferating cell nuclear antigen: a marker for hepatocellular proliferation in rodents. *Environ Health Perspect.* 1993;101 Suppl 5:211-218.
  25. Ueda J, Saito H, Watanabe H, Evers BM. Novel and quantitative DNA dot-blotting method for assessment of in vivo proliferation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;288(4):G842-G847.
  26. Soames AR, Lavender D, Foster JR, Williams SM, Wheeldon EB. Image analysis of bromodeoxyuridine (BrdU) staining for measurement of S-phase in rat and mouse liver. *J Histochem Cytochem.* 1994;42(7):939-944.
  27. 清 汪昂：醫方集解，文光圖書有限公司 1986;pp. 28.
  28. 清 汪昂：醫方集解，文光圖書有限公司 1986;pp. 144.
  29. 清 吳謙：刪補名醫方論，新文豐出版社 1985;pp. 5.
  30. 游士勳、張錦清：實用中醫方劑學，樂群文化公司 1992;pp. 369.

31. 楊靖、詹向紅、孫擘、李秀昌、李厚剛：四君子湯對 D-半乳糖衰老模型小鼠心、肝、腦組織 MDA 含量及端粒酶活性的影響。中國中西醫結合雜誌 2005;6(25):531-533.
32. 陳麗艷、劉君星、施曉光：中藥四君子湯抗衰老的實驗研究。黑龍江醫藥 2006;19(5):363-364.
33. 岑榮光、李溥、莫興菊、韋紹英、張靈、謝洪書：四君子湯對家兔下丘腦神經遞質-甲狀腺軸的調節作用及機理研究。放射免疫學雜誌 2005;1(18):43-44.
34. 葉富強、陳蔚文、李茹柳、張曼、徐頌芬、潘懷耿：四君子湯提取物對大鼠胃腸活動的影響。中藥藥理與臨床 2002;18(3):2-4.
35. 蔣靈芝、熊平、蔣任才：四君子湯修復燒傷後腸黏膜屏障的超微結構變化。中醫藥臨床雜誌 2004;1(16):80-81.
36. 李海燕、董禮陽、楊景云：四君子湯對急性肝損傷伴發菌群失調及內毒素血癥的保護作用。中國微生物學雜誌 2005;2(17):100-101.
37. 劉紅林、程牛亮、趙建濱、牛勃、覃秀桃、楊濤：中藥復方補益劑對不同細胞生長影響的實驗研究。山西醫科大學學報 2005;3:312-314.
38. 趙寧、張皖東、賈紅偉、吳志鵬、呂愛平：四君子湯對利血平所致脾虛大鼠腸道黏膜 TGF- $\beta$  和 TNF- $\alpha$  表達的影響。中國中醫基礎醫學雜誌 2007;13(1):44-46.
39. 章梅、夏天、張仲海、靳風燦、顏真、崔大祥：四君子湯對脾虛患者血漿細胞因子的影響。第四軍醫大學學報 2000;21(4):411-413.
40. 鞠寶玲、畢蕾、楊景云：四君子湯改善抗生素脫污染小鼠腸道菌群失調的研究。牡丹江醫學院學報 2003;24(1):4-6.
41. 楊春佳、蘇德望、楊龍友、王春敏、崔剛、李麗秋：四君子湯改善輻射小鼠腸道菌群失調的研究。黑龍江醫藥科學 2006;29(6):49-50.
42. 清 吳謙：刪補名醫方論，新文豐出版社 1985;pp. 8.
43. 游士勳、張錦清：實用中醫方劑學，樂群文化公司 1992;pp. 383-384.

44. 何永亮、王紅星、霍祥富、方素華、廖世平、鐘振東：四物湯對小鼠急性失血性貧血的治療作用。四川省生理科學雜誌 1998;20(2):40-42.
45. 范啟蘭、康光忠、葉金花、賴日勇、甘祝軍、許春鵬：四物湯對貧血小鼠腎促紅細胞生成素基因表達的影響。中國臨床康復 2005 ;9(3):168-169.
46. 郭平、王升啟：四物湯及其單味藥補血作用的研究進展。山東中醫雜誌 2005;24(2):121-123.
47. 譚洪玲、高月、馬增春、陶來寶、趙永紅：四物湯刺激 Peyer's Patch 促進骨髓造血的研究。中藥藥理與臨床 2001;17(2):1-3.
48. 李鷹飛、佟麗、梁乾德、王升啟：四物湯化學成分組合對人骨髓基質細胞系 HFCL 細胞增殖及造血相關基因表達的影響。中草藥 2005;3:386-389.
49. 楊勇、容蓉、盧克偉、袁久榮：四物湯及其各單味藥對小鼠自由基代謝及免疫功能影響的比較研究。山東中醫藥大學學報 2002;26(4):299-300.
50. 黃世領; 彭濤; 龔傳美; 管喜文; 四物湯對正常動物高密度脂蛋白膽固醇和低密度脂蛋白膽固醇的影響。臨床軍醫雜誌 1999;27(1):37-38.
51. 李愛媛：四物湯對子宮平滑肌的影響。雲南中醫中藥雜誌 2003;24(3):36-37.
52. 黃世領、管喜文、龔傳美、傅作申、王傳晶、趙喜桂：四物湯對實驗性肝損傷的保護作用。中藥藥理與臨床 1997;13(4):11-12.
53. ONISHI Yasuharu, YAMAURA Takeshi, TAUCHI Katsunori, SAKAMOTO Takashi, TSUKADA Kazuhiro, NUNOME Shinyu, KOMATSU Yasuhiro, SAIKI Ikuo. Expression of the anti-metastatic effect induced by Juzen-taiho-to is based on the content of Shimotsu-to constituents, Biol Pharm Bull. 1998;21(7):761-765
54. 周坤福、王明艷、陳全良、馬健、王興華、張旭、吳海濤：四物湯抗變作用的實驗研究。南京中醫藥大學學報 1998;14(1):23-24.

55. ZENGLIN LIANA, NIWA Kenji, JINGCHUN GAO, TAGAMI Keiko, HASHIMOTO Midori, YOKOYAMA Yasuhiro, MORI Hideki, TAMAYA Teruhiko. Shimotsu-to is the agent in Juzen-taiho-to responsible for the prevention of endometrial carcinogenesis in mice. *Cancer Lett.* 2002;182(1):19-26.
56. Tagami K, Niwa K, Lian Z, Gao J, Mori H, Tamaya T. Preventive effect of Juzen-taiho-to on endometrial carcinogenesis in mice is based on Shimotsu-to constituent. *Biol Pharm Bull.* 2004;27(2):156-161.
57. 鄭欽岳、曹蔚蔚、曹穎瑛、林文：四物湯增加小鼠脾細胞分泌 IL-6 及促進 IL-6 mRNA 的表達。第二軍醫大學學報 1998;19(3):290-292.
58. 張玉杰、張建明、宋敏：四物湯對小鼠免疫功能的影響。中國麻風皮膚病雜誌 2004;20(6):546-547.
59. 曹蔚蔚、鄭欽岳、王洪斌：四物湯對小鼠淋巴細胞增殖及巨噬細胞產生白細胞介素 1 的影響。第二軍醫大學學報 1998;19(1):91-92.
60. 曹蔚蔚、鄭欽岳、楊延莉：四物湯對小鼠脾細胞分泌 IL-3 和 IL-2 的促進作用。第二軍醫大學學報 2004;25:558-559.
61. H. Waynforth, Paul Flecknell: Experimental and surgical technique in the rat, second edition. Academic press 1992: pp. 241-246.
62. Dako 使用說明書
63. Abcam 使用說明書
64. Zymed 使用說明書
65. 李旺祚編譯：蓋統生理學，合計圖書出版社 1991:pp. 1061-1063.
66. Raza Malik, Neil Mellor, Clare Selden, Humphrey Hodgson. Triiodothyronine enhances the regenerative capacity of the liver following partial hepatectomy. *Hepatology.* 2003;37:79-86.
67. V. Kirimlioglu, H. Kirimlioglu, S. Yilmaz, D. Ozgor, S. Coban, N. Karadag, and S. Yologlu. Effect of fish oil, olive oil, and vitamin E on liver pathology, cell proliferation, and antioxidant defense system in

- rats subjected to partial hepatectomy. *Transplantation Proceedings*. 2006;38:564-567.
68. Silva RL, de Melo GB, de Melo VA, Antonioli AR, Michellone PR, Zucoloto S, Picinato MA, Franco CF, de Assis Mota G, de Castro e Silva O. Effect of the aqueous extract of *Sida cordifolia* on liver regeneration after partial hepatectomy. *Acta Cir Bras*. 2006;21(1):37-39.
69. Melo GB, Silva RL, Melo VA, Antonioli AR, Michellone PR, Zucoloto S, de Souza ME, Gomes MC, Correia RB, Castro-e-Silva O. Proliferative effect of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Acta Cir Bras*. 2006;21 Suppl 1:33-36.
70. S.C. Pradhan, C. Girish. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. *Indian Journal of Medical Research*. 2006;124(5):491-504.
71. Reinhard Saller, Remy Meier, Reto Brignoli. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs*. 2001;61(14):2035-2063.
72. K. Taira, S. Hiroyasu, M. Shiraishi, Y. Muto, T. Koji. Role of the fas system in liver regeneration after a partial hepatectomy in rats. *European Surgical Research*. 2001;33:334-341.
73. 黃嘉文編譯：Saint-Frances 各科門診醫學-評估、診斷、檢查與治療，合計圖書出版社 2005:pp. 246 -247.
74. 李旺祚編譯：蓋統生理學，合計圖書出版社 1991:pp. 1064.
75. 李旺祚編譯：蓋統生理學，合計圖書出版社 1991:pp. 1065-1067.

## 英文摘要

The liver diseases including viral hepatitis, drug induced hepatitis, cirrhosis and liver cancer is common in Taiwan. According the recent scientific literature, the regeneration of liver cell acts the important role to repair chemistry and biological injury, especially in liver cirrhosis, cancer, operation excision and transplant.

In order to understand the role of traditional chinese medicine in liver regeneration. This study drafts to explain the effects of qi-tonic and blood-tonic Chinese medicine recipes in liver regeneration.

120 rats were divided into five groups: sham, control, silymarin, si jun zi tang and si wu tang groups. All animals were submitted to oral administration of distilled water, silymarin and the aqueous extract of chinese medicine herbs, respectively. After a week, they underwent 2/3 partial hepatectomy. 3, 72 and 168 hours later, livers of each group were removed. Hepatic regeneration was assessed by liver/body weight ratio and immunohistochemical staining for PCNA and BrdU.

These results show that the qi-tonic chinese medicine si jun zi tang at oral doses of 1 g/kg causes a high liver regeneration rate in rats submitted to partial hepatectomy.

## 謝辭

感謝指導教授蔡金川老師以及林昭庚老師悉心的指導，並感謝本所侯庭鏞老師與中興大學獸醫病理所廖俊旺老師在實驗方面的協助。亦感謝李采娟老師在統計方面的指導與幫忙，最後還要感謝參與本研究的所有研究室成員。

謝謝你們！

