

編號：CCMP97-RD-022

以間葉系幹細胞之肝臟細胞分化技術測試固有方保肝中藥之療效驗證

李光申

國立陽明大學

摘 要

肝病為我國之國病，其盛行率於我國始終居高不下。肝病造成之死亡率，多年來亦高居十大死因之前幾位。西醫對於肝臟疾病的治療始終束手無策，只能採取支持性的保守療法，對於肝功能有具體促進效用的西藥，更是寥寥可數。在中草藥相關之古籍記載中，對於保肝則有相當清楚的認識，民間亦有許多口耳相傳，對於肝功能促進及回復具有療效的中草藥。在講求中醫藥科學化的今日，若能夠使用西洋生物醫學的研究方法，建立出一套技術平台，證明中草藥具有保肝藥物的療效，對中草藥在肝疾的應用能有所助益。本實驗室數年前即已建立自骨髓間葉系幹細胞分化成肝臟細胞之技術平台。本研究之目的，即在更進一步的利用這個平台技術，測試各種具有保肝成分的中草藥，是否確實能促進這些肝臟細胞的功能，如白蛋白的製造、肝糖的儲存、胺基酸的代謝及尿素的產生等。綜上所述，本研究計畫使用幹細胞之肝臟細胞分化技術作為中草藥篩選及確認療效的平台，在國內外實屬創新，相信本研究所得之結果，將有助於中草藥之全球化使用，使得中草藥得以發揚光大於世界，並且造福更多病患。

關鍵詞：間葉系幹細胞、肝臟細胞分化、中藥

Application of Hepatic Defferentiation of Mesenchymal Stem cells as a Screening Platform to Validate the Therapeutic Effects of Traditional Chinese Medicine Prescription for Liver Diseases

Oscar K Lee

National Yang-Ming University

ABSTRACT

High prevalence of liver diseases in Taiwan has resulted in a high death rate in these patients and made liver diseases the top leading causes of death for many years. Western medicine has no cure for these diseases but conservative and supportive treatments. There are also very limited western medications which demonstrate specific effects on improving liver functions. Traditional Chinese medicine has clearly recorded knowledge of liver protection. The public is also aware of traditional Chinese medications which promote and repair liver functions. With pursuit of modernization of traditional Chinese medicine, the application of traditional Chinese medicine to liver diseases would be advanced by using western medical research methodology to establish a platform technology which can validate the liver protecting effects of traditional Chinese medicine. Our lab has demonstrated the differentiation potential of bone marrow derived mesenchymal stem cells into hepatocytes. The aim of this project is to further apply this platform technology to examine whether various traditional Chinese medicine prescriptions with liver protecting ingredients would enhance liver specific functions of these hepatocytes, including albumin secretion, glycogen storage, metabolism of amino acids, and production of urea. In conclusion, this project applies hepatic differentiation technology of mesenchymal stem cells as a platform to screen and validate traditional Chinese medicine prescriptions. This innovative application should promote the globalisation of traditional Chinese medicine hence benefit more patients with liver diseases.

Keywords: mesenchymal stem cells, hepatic differentiation, traditional Chinese medicine

壹、前言

肝病長久以來在我國相當盛行，其所造成的死亡率在十大死因中高居前幾位。中國的傳統中醫藥講究「保肝」的概念，因此市面上也出現許多種類不同的「保肝中藥」。但是市面上所流傳的各種中藥方大多未經過嚴謹的毒性試驗。傳統中藥成方的使用大多是經過千年流傳，缺乏科學的佐證。由於正常肝細胞的體外培養相當不容易，無法維持一定的細胞品質。經由細胞表面抗體的篩選，顯示從骨髓中分離純化的細胞是間葉系幹細胞，並且可以利用不同的生長因子調控使得間葉系幹細胞分化為具有肝臟功能的肝臟細胞。這種間葉系幹細胞所分化出的肝細胞在測試中草藥的療效時，了解傳統中藥成方對肝細胞的分化影響。

過去利用動物實驗來進行生物體的藥物毒性或是藥物動力學試驗，需要大量的動物的餵食，管理，並且犧牲，才能得到藥物作用的結果。不僅在道德上受到相當大的爭議，在人力調度以及動物的管理上也需要耗費相當大的心力。相反地利用細胞實驗觀察時，則因為正常肝細胞的體外培養不易，必須使用特殊處理過 transform 的細胞或是原本就是在形態上不正常的肝細胞來觀察藥物對細胞的作用，造成得到之結果與正常細胞可能發生的現象有所差異。

本計畫的目的即是利用本實驗室所發展出的間質性幹細胞分化之肝臟細胞，其具有幾項優點可以來驗證這些市面上保肝中草藥的保肝療效。第一，只需要犧牲少數的動物取出骨髓間葉系幹細胞，確認其幹細胞的特性後即可以進行往後的各項實驗。第二，骨髓幹細胞可以在適當的培養環境下經由不同生長因子的調控，往後分化為不同的成體細胞，對於不同的實驗目的可以有所適應。第三，分化後的成體幹細胞，肝臟細胞具有正常肝細胞的功能，並且容易培養在組織培養盤中進行實驗。第四，只要冷凍保存得宜，所取得之骨髓間葉系幹細胞可以在體外增殖培養至二十幾代以進行實驗。

結合間葉系幹細胞與中草藥的研究尚未見於文獻或是產業應用，是相當少見的跨領域合作。若能利用間葉系幹細胞所分化的肝臟細胞證明中草藥中的保肝藥物確實能增加肝臟細胞功能，則應該不僅對於未來衛生政策的立法，同時對於民眾保健觀念的宣導有所助益。

貳、材料與方法

一、骨髓間葉系幹細胞分離與培養

沖洗股骨取得之骨髓，經 negative immuno-depletion 套組與密度分層離心處理後取得細胞。將細胞種入組織培養盤隔夜讓細胞貼附，間葉系幹細胞培養液為 Iscov's modified Dulbecco's medium (IMDM) 及含有 10 % 胎牛血清，並添加生長因子 10 ng/mL EGF 與 10 ng/mL bFGF, 100 U penicillin, 1000 U streptomycin 與 2 mM L-glutamine。培養時種入組織培養盤中細胞密度約為 3000 cells/cm²，培養液約每周更換兩次。

二、間葉系幹細胞之分化

依照 Lee 等人的方法，於骨髓間葉系幹細胞之分化依培養液中添加入不同的成長因子促進其分化為骨細胞，軟骨細胞，脂肪細胞，以及肝臟細胞。

骨細胞分化：以骨分化培養液培養三週，每週更換兩次培養液。培養液中除了基礎培養液 IMDM 外，還含有 0.1 uM dexamethasone, 10 mM beta-glycerol phosphate 以及 0.2 mM ascorbic acid。

軟骨分化：將 5 x10⁵ 個間葉系幹細胞和培養液一起轉移至 15 mL 的離心管中，以 200 g 離心 5 分鐘，形成一團塊於離心管底部，將離心管蓋鬆開直接放入培養箱中，隔天換成軟骨分化培養液。每星期更換兩次軟骨分化培養液。軟骨分化用培養液為 high-glucose DMEM，還含有 0.1 uM dexamethasone, 50 ug/mL ascorbic acid, 100 ug/mL sodium pyruvate, 40 ug/mL proline, 10 ng/mL TGF-β1, 和 50 mg/mL ITS⁺ premix。

脂肪細胞分化：取間葉系幹細胞以脂肪分化培養液培養三週，每週更換兩次培養液。脂肪分化培養液中除了 IMDM 外還有 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1 uM hydrocortisone, 0.1 mM indomethacin, 以及 10% rabbit serum。

肝臟細胞分化：取間葉系幹細胞培養於培養盤中，先以 IMDM 加入 20 ng/mL EGF 和 10 ng/mL bFGF 培養兩天。接著以階段性肝臟細胞培養液培養，第一階段目的為促進間葉細胞分化為肝臟細胞，以 IMDM 添加 20 ng/mL HGF, 10 ng/mL bFGF, 0.61 g/L nicotinamide, 培養一週後換成第二階段培養液，使分化的肝臟細胞熟成。培養液同樣以 IMDM 為基礎培養液，添加 20 ng/mL oncostatin M, 1 umol/L dexamethasone, 以及 50 mg/mL ITS⁺ premix。

三、成方中藥

購買市面上販售之保肝中藥方：小柴胡湯、加物逍遙散、養肝丸(SP)、養肝丸(ST)、五味子芝麻錠、Hepato-care、Silymarin、賜肝寧、黃金蜆錠、

靈芝。以上幾種成方中藥的成分表如下。將丸狀顆粒磨碎後秤重經計算濃度後溶於培養液中，或是將膏狀的成分經計算濃度後直接溶於培養液中，兩者皆利用 0.22 μm 濾膜過濾除菌後使用。

中醫藥成分(摘自廠商公告成分)

養肝丸 (SP) [Lot: ACV 有效期限: 20110702]

組成 (每丸 300 mg): 當歸 24 mg, 川芎 24 mg, 白芍 24 mg, 車前子 24 mg, 防風 24 mg, 楮實子 24 mg, 蕤仁 24 mg, 熟地黃 24 mg, 蜂蜜 108 mg

養肝丸 (ST) [Lot: 049 有效期限: 20090901]

組成 (每丸 500 mg): 當歸 41 mg, 川芎 41 mg, 白芍 41 mg, 車前子 41 mg, 防風 41 mg, 楮實子 41 mg, 蕤仁 41 mg, 熟地黃 41 mg, 蜂蜜 172 mg

加味逍遙散 [Lot: 0519 T020]

組成 (每 12 g 含有): 當歸 4 g, 白芍 4 g, 白朮 4 g, 柴胡 4 g, 茯苓 4 g, 炙甘草 2 g, 牡丹皮 2.5 g, 山梔子 2.5 g, 煨薑 4 g, 薄荷 2 g。以上生藥製成浸膏 7.0 g (生藥與浸膏比例 33:7=4.7:1)。

小柴胡湯 [Lot: 1092 0307H]

組成 (每 9 g 含有): 柴胡 8 g, 黃芩 3 g, 人參 3 g, 炙甘草 3 g, 半夏 5 g, 生薑 3 g, 大棗 2 g。以上生藥製成浸膏 5.2 g (生藥與浸膏比例 27:5.2=5.2:1)。

五味子芝麻錠 [有效期限: 20100527]

成分: 甘露醇, 五味子萃取物, 明膠, 硬脂酸蔗糖酯, 蟲膠, 乾燥維他命 E 醋酸鹽 (維他命 E 醋酸鹽, 明膠, 矽酸鈣, 二氧化矽), 芝麻萃取物, 棕櫚蠟

Hepato-care 優倍多 [Lot: 10202 有效期限: 20110228]

成分: 薑黃 100 mg, 維他命 C 50 mg, 磷酸氫鈣 43 mg, 維他命 B6 37.5 mg, 維他命 B2 35 mg, 維他命 B1 25 mg, 肝粉(來自豬) 25 mg, 氧化鎂 20.83 mg, 葡萄糖酸鋅 17.34 mg, 五味子 10 mg, 菸鹼醯胺 15 mg, 本多酸鈣 2.72 mg, 牛磺酸 2.5 mg, 茯苓抽出物(含羊毛蘭烷三萜類) 0.84

mg，肌醇 0.75 mg，重酒石膽鹼 1.8 mg，葉酸 200 ug，生物素 150 ug，維他命 B12 25 ug

Silymarin [Lot：7G013 有效期限：201007]

成分：150 mg Silymarin 80%

賜肝寧

成分：280 公絲 Extr. Fructus Cardui Mariae Extract，相當於 150 公絲 Silymarin

黃金蜆錠

組成：蜆錠粉(鳥胺酸、牛磺酸、膽鹼、新鈣磷等礦物質、優質蛋白、18 種胺基酸群、肝醣、維生素 B2.B6.B12、精胺酸等等) 380 mg，乳糖及賦形澱粉 17 mg，硬脂酸鎂 3 mg。

靈芝

每一份量 (2 顆)

保健功效相關成分含量，每份含：靈芝多醣體 135 毫克、三萜類 60 毫克

原料：靈芝萃取粉末、靈芝孢子粉、明膠、水分。

四、肝細胞功能評估

在 10 公分細胞培養盤培養已分化 3 週的肝臟細胞，各加入含有 10 種藥物 10 μ g/mL 的培養液培養一週後，(a)利用免疫螢光染色評估低密度脂蛋白(LDL)表現量。細胞培養於 10cm 培養盤，加藥處理一週後，將培養液吸掉，PBS wash 一次，加入 3 ml 培養液及 10 μ g/ml Dil-LDL，於 37°C 培養箱反應 8 小時，之後將 medium 吸掉，PBS 洗三次，以螢光顯微鏡觀察並以影像紀錄。(b)收集處理藥物後第 3 天以及第 7 天的培養液，利用 ELISA 評估分泌到培養液中白蛋白(albumin)表現量。

五、肝臟特有基因表現量評估

在 6-wells plate 中培養已分化 3 週的肝臟細胞，各加入含有不同濃度(10 ng/mL, 100 ng/ml, 1 μ g/mL, 10 μ g/mL, 100 μ g/mL)藥物的培養液接著培養一週。一週後將要分離純化的培養盤以 PBS 清洗細胞一次，去除培養盤中的液體，再依據套組抽出 RNA 之步驟，抽出細胞的 total RNA 後利用反轉錄酶將之轉成 cDNA。利用 Real-Time PCR 評估數種肝臟特有基因表現。設計所需評估的 primers 包括有以下幾項：Albumin (ALB), cytokeatin 18 (CK18), tyrosine aminotransferase (TAT), serpin, transthyretin (TTR), glutamate-ammonia ligase (GLUL), dipeptidyl peptidase IV (DPP4),

cytochrome P450 2E1 (CYP2E1), alkaline phosphatase (ALPL), glycogen synthase 2 (CYS2), tryptophan dioxygenase (TDO2)。以 house-keeping gene (GAPDH)作為內在基因對照組。

Albumin (ALB)

F: aatggtgccaagctgctga

R: cttcccttcatcccgaagtt

Probe: use #27, cat.no. 04687582001

Multiplex with: ACTB sold separately by Roche

Amplicon: 71bp

Cytokeratin 18 (CK18)

F: tgatgacaccaatatcacacga

R: ggctttaggccttttacttcc

Probe: use #78, cat.no. 04689011001

Multiplex with: ACTB sold separately by Roche

Amplicon: 112bp

Tyrosine aminotransferase (TAT)

F: ccatgattccctgtccatt

R: ggatggggcatagccattat

Probe: use #37, cat.no. 04687957001

Multiplex with: ACTB sold separately by Roche

Amplicon: 122bp

Serpina

F: aatggggctgacctctcc

R: gtcagcacagccttatgcac

Probe: use #82, cat.no. 04689054001

Multiplex with: ACTB sold separately by Roche

Amplicon: 77bp

Transthyretin (TTR)

F: gccgtgcatgtgttcaga

R: gctctccagactcaactggtttt

Probe: use #66, cat.no. 04688651001

Multiplex with: ACTB sold separately by Roche
Amplicon: 79bp

Glutamate-ammonia ligase (GLUL)

F: tctcgcggcctagctttac

R: agtgggaacttgctgaggtg

Probe: use #31, cat.no. 04687647001

Multiplex with: ACTB sold separately by Roche
Amplicon: 80bp

Dipeptidyl peptidase IV (DPP4)

F: ccaaagactgtacgggttcc

R: acaaagaactttacagttggattcac

Probe: use #51, cat.no. 04688481001

Multiplex with: ACTB sold separately by Roche
Amplicon: 65bp

Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1)

F: caagccattttccacagga

R: caacaaaagaaacaactccatgc

Probe: use #67, cat.no. 04688660001

Multiplex with: ACTB sold separately by Roche
Amplicon: 73bp

Alkaline phosphatase (ALPL)

F: agaaccccaaaggcttcttc

R: ctggcttttccttcatggt

Probe: use #31, cat.no. 04687647001

Multiplex with: ACTB sold separately by Roche
Amplicon: 74bp

Glycogen synthase 2 (CYS2)

F: agcttttccagataaattccatgt

R: ggcctgggatatttaaactctt

Probe: use #9, cat.no. 04685075001

Multiplex with: ACTB sold separately by Roche

Amplicon: 72bp

Tryptophan dioxygenase (TDO2)

F: cgatgacagccttgacttc

R: cggaattgcaaactctgga

Probe: use #67, cat.no. 04688660001

Multiplex with: ACTB sold separately by Roche

Amplicon: 76bp

house-keeping gene (GAPDH)

F: agccacatcgctcagacac

R: gcccaatacgaccaaacc

Probe: use #60, cat.no. 04688589001

Amplicon: 66bp

六、肝臟細胞中白蛋白表現量評估

在 10 cm plate 中培養已分化 3 週的肝臟細胞，各加入含有 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度藥物的培養液接著培養一週。一週後將培養盤以 PBS 清洗細胞一次，去除培養盤中的液體，再以 lysis buffer 破壞細胞膜後離心，收集上層液為水溶性蛋白並測定濃度。利用 8% acrylamide gel 進行電泳後將蛋白轉到 PVDF 膜上，再以抗體 (anti-albumin) 加以處理。

參、結果

一、骨髓間葉系幹細胞分離與培養

自骨髓分離取得之細胞，經數度更換培養液後收集得貼附型細胞，具同質性及纖維母細胞型態(圖 1)。

二、骨髓間葉系幹細胞之特性

分離培養得之細胞以螢光標記之抗體染色，使用流式細胞儀檢視其細胞表面抗原表現型為 CD73(+)、CD90(+)、CD44(+)、CD105(+)、C166(+)、CD45(-)、CD117(-)。由流式細胞儀篩選出符合以上細胞表面抗原條件之骨髓中間葉系幹細胞而加以培養利用。

三、骨髓間葉系幹細胞之分化能力

對培養之細胞利用添加不同的生長因子進行骨分化(圖 2)、軟骨分化(圖 3)、脂肪分化(圖 4)、肝臟細胞(圖 5)。結果如圖所示，經由不同染色標定確認其細胞分化特性。

將數種中藥方加入分化後的肝臟細胞之培養液中同時培養一週時，細胞的型態變化如圖 6，不同的藥物濃度對於分化後的肝臟細胞並沒有觀察到影響細胞型態的變化。

四、肝細胞功能評估

(一)利用免疫螢光染色評估低密度脂蛋白(LDL)表現量時，在螢光顯微鏡下未分化之間葉系幹細胞不具有紅色螢光之表現，只有分化為肝臟細胞具有攝入低密度脂蛋白功能才會有紅色螢光產生。將分化之後的肝臟細胞經過一週的藥物處理後發現，小柴胡湯、加味逍遙散、養肝丸(ST)、養肝丸(SP)、五味子芝麻錠、Hepato-care、Silynarin、賜肝寧、黃金蜆錠、靈芝(圖 7a~k)均可使分化而來的肝臟細胞有低密度脂蛋白攝入的功能而有紅色螢光顯示。其中五味子芝麻錠(圖 7-f)的紅色螢光減少表是低密度脂蛋白的攝入降低；而養肝丸(SP) (圖 7-e)相較於對照組出現較多的紅色螢光則顯示有提高低密度脂蛋白攝入的現象。

(二)利用 ELISA 方法測試間葉系幹細胞分化為肝臟細胞 3 週後處理藥物 10 ug/mL 時不同時間點(3 天以及 7 天)的培養液中白蛋白表現量。圖 8 中以第 3 天對照組為基準時，可觀察到所處理的中草藥除了靈芝以外，小柴胡湯，五味子芝麻錠，加味逍遙散，黃金蜆錠都於第 7 天時有分泌較多的白蛋白於培養液中。其中加味逍遙散所刺激分泌的白蛋白量為最高。靈芝所刺激分泌之白蛋白量與對照組所

產生分泌量為相當。

五、肝臟細胞特有基因表現評估

將處理過各種中草藥 1 週後的肝臟細胞抽出 total RNA 並且反轉錄為 cDNA。所設計的 primer 經過測試可以作用後利用 real time PCR 來評估各種中草藥對分化後肝細胞中特有基因的表現影響。作為評估的幾組基因中 GLUL(圖 9-2)、DPP4(圖 9-3)、CYP2E1(圖 9-3)、ALPL(圖 9-3)此四組都受到中草藥處理而上升，這幾種基因是在較為成熟的肝細胞才会有表現，因此顯示該幾種中草藥對於促進肝臟成熟的功能有增加。另外有幾組基因 albumin、CK18、Serpina、CYS2 僅有部分中草藥有見到上升之情形；而 TDO2 此組基因表現則是於中草藥處理後有下降的現象。

六、肝臟細胞中白蛋白表現量評估

收集處理藥物後的肝臟細胞之水溶性蛋白，利用西方墨點法偵測細胞中白蛋白之生成量。圖 10 表示將結果加以量化後發現，加味逍遙散所促進的生成量為最大。此結果與 real time PCR 所偵測到的基因表現量相似，加味逍遙散都有明顯地增加。同時五味子芝麻錠，黃金蜆錠也有促進細胞中白蛋白生成之作用。

肆、討論

- 一、將骨髓間葉系幹細胞分化 3 週後處理中藥成方一週時，各個濃度都未對細胞有所傷害。由於本實驗中所使用的中藥成方是將其溶於培養液中使用，因此只有水溶性成分會對細胞有所作用。本計畫中未評估不同的溶劑所溶出的成分對細胞的影響。若是計畫有延長時，也許可以測試其他不同萃取方式所提出之成分對於分化肝臟細胞的影響，來加以比較同一種藥物利用各種溶劑所溶出的成分對於分化肝臟細胞的差異影響。
- 二、骨髓細胞分化成肝臟細胞需要較長的時間（至少 3 週以上）使其能形成為成熟肝臟細胞，因此在實驗的進行時需要較多的時間觀察細胞的型態變化。在加入中藥方後需經過一週以上的處理，對於分化的程度的影響由實驗結果看來並沒有對細胞產生型態上的影響，細胞均保持正常的生長狀態。
- 三、由低密度脂蛋白攝入結果得知，對照組與實驗組均有低密度脂蛋白攝入的情形。在過去的研究顯示，已分化的肝臟細胞越成熟時低密度脂蛋白的攝入量越多，紅色螢光就會表現越強，因此由本計畫的結果可得知養肝丸(SP)應該具有促進肝臟分化細胞成熟的功能。同樣的養肝丸成方於不同廠商的製作時可見到結果雖然類似，但是效果有所強弱，可能是因為不同製程的緣故所造成。另外五味子芝麻錠可以使得分化的肝臟細胞降低低密度脂蛋白的攝入，在其他含有五味子成分（生脈散）的文獻結果看到具有降低肝臟脂質氧化的功能。
- 四、利用 ELISA 方法偵測中醫藥物對已分化的肝細胞之白蛋白產生之表現量時發現表現量相當低，有可能只有處理一週的藥物所以對白蛋白產生量的影響不大，或是加入藥劑的濃度相當低，不足以影響白蛋白的大量產生，以至於在資料收集時所見到的結果是不具有影響力。有關這點需要進一步地修正討論。同時利用 real time PCR 以及西方墨點法偵測中草藥物對於肝臟細胞中白蛋白基因表現量或是蛋白表現量時，可以驗證到加味逍遙散以及五味子芝麻錠，黃金蜆錠具有增加細胞中白蛋白表現量的作用。
- 五、在文獻檢索中可以發現加味逍遙散大多用於女性更年期或經前症候群等作為減輕憂鬱病徵的中藥方，中藥典籍中將這類憂鬱引起的各種不適症狀視為肝鬱脾虛。本實驗中測試加味逍遙散時可發現對肝臟分化細胞有作用。
- 六、其他一部分的藥方在成分上多為維他命 C 或 E，維他命 B 群或是必需胺基酸。這一類藥物的次要作用在抗氧化劑(維他命 C 或維他命 E)，對於受到傷害的肝細胞具有減緩傷害的抗氧化作用，並且必需胺基酸對細胞的修補與保存是必要的成分。

伍、結論與建議

結論

本實驗室所發展出的間質性幹細胞分化之肝臟細胞，其具有幾項優點可以來驗證這些市面上保肝中草藥的保肝療效。第一，只需要犧牲少數的動物取出骨髓間葉系幹細胞，確認其幹細胞的特性後即可以進行往後各項實驗。第二，骨髓幹細胞可以經由不同生長因子的調控，往後分化為不同的成體細胞，對於不同的實驗目的可以有所適應。第三，分化後的成體幹細胞，肝臟細胞具有正常肝細胞的功能，並且容易培養在組織培養盤中進行實驗。第四，只要冷凍保存得宜，所取得之骨髓間葉系幹細胞可以培養至二十幾代以進行實驗。本計畫中所使用的萃取溶劑為培養液，因此可能影響到細胞的成分以水溶性為主。固有成方保肝中藥的水溶性成分療效經由間葉系幹細胞分化成肝臟細胞評估，得到的結果可知本計畫中所測試的 10 種保肝中藥之不同水溶性成分對於肝細胞分化的確有所影響，但並不影響細胞的生長型態。綜合實驗結果看來，複方中草藥之加味逍遙散對於間葉系幹細胞分化為肝細胞時具有最大促進作用；另外五味子芝麻錠或是蜆精同樣具有促進作用，但其效果較小。

建議

從可持續培養間葉系幹細胞分化之肝臟細之優點，可積極利用間葉系幹細胞及其分化得之肝臟細胞用於治療肝臟疾病與作為藥物篩選平台。另外本計畫的實施期間若能稍微延長，不僅可以收集到較為完整之實驗資料，也許可以對於更多傳統中醫藥物與西醫藥物的實驗結果比較能有所觀察，而能進一步了解中國古老祖先智慧的藥物的真正作用意義。

誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會計畫編號CCMP97-RD-022 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

柒、參考文獻

1. Chang JS, Wang KC, Liu HW, Chen MC, Chiang LC, Lin CC. Sho-saiko-to (Xiao-Chai-Hu-Tang) and crude saikosaponins inhibit hepatitis B virus in a stable HBV-producing cell line. *Am J Chin Med* 2007, 35(2):341-51.
2. Eminzade S, Uraz F, Izzettin FV. Silymarin protects liver against toxic effects of anti-tuberculosis drugs in experimental animals. *Nutr Metab (Lond)*. 2008, 5:18.
3. Fujimoto M, Tsuneyama K, Kainuma M, Sekiya N, Goto H, Takano Y, Terasawa K, Selmi C, Gershwin ME, Shimada Y. Evidence-based efficacy of Kampo formulas in a model of non alcoholic fatty liver. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008, 233(3):328-37.
4. Halsted CH. Nutrition and alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis*. 2004 , 24(3):289-304.
5. Hamazaki T, Iiboshi Y, Oka M, Papst PJ, Meacham AM, Zon LI, Terada N. Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro. *FEBS Lett* 2001, 497(1):15-9.
6. Ikegami F, Fujii Y, Ishihara K, Satoh T. Toxicological aspects of Kampo medicines in clinical use. *Chem Biol Interact*. 2003, 145(3):235-50.
7. Iwata H, Tezuka Y, Kadota S, Hiratsuka A, Watabe T. Identification and characterization of potent CYP3A4 inhibitors in Schisandra fruit extract. *Drug Metab Dispos*. 2004, 32(12):1351-8.
8. Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol*. 2002, 30(8):896-904.
9. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002, 418(6893):41-9.
10. Kuo TK, Hung SP, Chuang CH, Chen CT, Shih YR, Fang SC, Yang VW, Lee OK. Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells. *Gastroenterology* 2008 , 134(7):2111-21, 2121.e1-3

11. Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004, 40(6):1275-84.
12. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*. 2004, 103(5):1669-75.
13. Liu CT, Wu CY, Weng YM, Tseng CY. Ultrasound-assisted extraction methodology as a tool to improve the antioxidant properties of herbal drug Xiao-chia-hu-tang. *J Ethnopharmacol*. 2005, 99(2):293-300.
14. Lowes KN, Croager EJ, Olynyk JK, Abraham LJ, Yeoh GC. Oval cell-mediated liver regeneration: Role of cytokines and growth factors. *J Gastroenterol Hepatol*. 2003, 18(1): 4-12.
15. Makino T, Mizuno F, Mizukami H. Does a kampo medicine containing schisandra fruit affect pharmacokinetics of nifedipine like grapefruit juice? *Biol Pharm Bull*. 2006, 29(10): 2065-9.
16. Makino T, Inagaki T, Komatsu K, Kano Y. Pharmacokinetic interactions between Japanese traditional Kampo medicine and modern medicine (IV). Effect of Kamisyoyosan and Tokisyakuyakusan on the pharmacokinetics of etizolam in rats. *Biol Pharm Bull* 2005, 28(2):280-4.
17. Masalkar PD, Abhang SA. Oxidative stress and antioxidant status in patients with alcoholic liver disease. *Clin Chim Acta*. 2005, 355(1-2): 61-5.
18. Nordmann R. Alcohol and antioxidant systems. *Alcohol Alcohol*. 1994 , 29(5): 513-22.
19. Nose M, Tamura M, Ryu N, Mizukami H, Ogihara Y. Sho-saiko-to and Saiko-keisi-to, the traditional Chinese and Japanese herbal medicines, altered hepatic drug-metabolizing enzymes in mice and rats when administered orally for a long time. *J Pharm Pharmacol*. 2003, 55(10): 1419-26.
20. Purohit V, Abdelmalek MF, Barve S, Benevenga NJ, Halsted CH, Kaplowitz N, Kharbanda KK, Liu QY, Lu SC, McClain CJ, Swanson C, Zakhari S. Role of S-adenosylmethionine, folate, and betaine in the treatment of alcoholic liver disease: summary of a symposium. *Am J Clin Nutr*. 2007, 86(1):14-24.
21. Reyes M, Verfaillie CM. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2001,

- 938:231-3; discussion 233-5.
22. Ruhnke M, Ungefroren H, Zehle G, Bader M, Kremer B, Fändrich F. Long-term culture and differentiation of rat embryonic stem cell-like cells into neuronal, glial, endothelial, and hepatic lineages. *Stem Cells*. 2003, 21(4):428-36.
 23. Sakaguchi S, Furusawa S, Iizuka Y. Preventive effects of a traditional Chinese medicine (Sho-saiko-to) on septic shock symptoms; approached from heme metabolic disorders in endotoxemia. *Biol Pharm Bull*. 2005, 28(1):165-8.
 24. Schulze M, Ungefroren H, Bader M, Fändrich F. Derivation, maintenance, and characterization of rat embryonic stem cells in vitro. *Methods Mol Biol*. 2006, 329:45-58
 25. Yao HT, Chang YW, Chen CT, Chiang MT, Chang L, Yeh TK. Shengmai San reduces hepatic lipids and lipid peroxidation in rats fed on a high-cholesterol diet. *J Ethnopharmacol* 2008, 116(1):49-57

染、圖、表

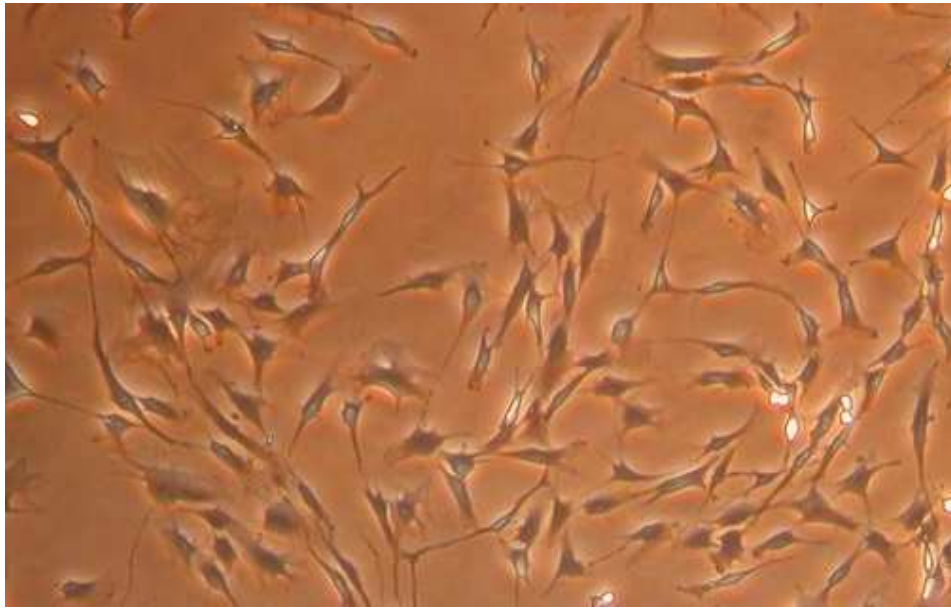


圖 1 從骨髓中分離出之間葉系幹細胞

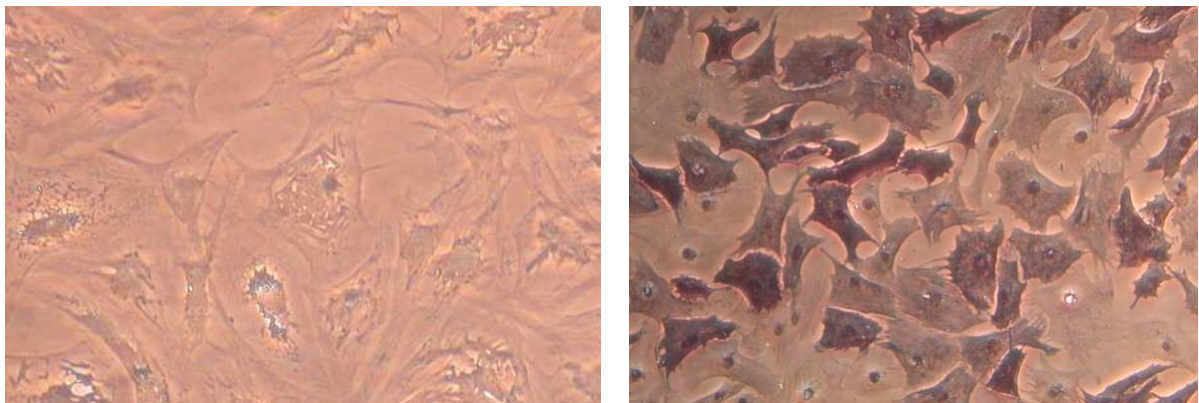


圖 2 骨分化
(左)未染色 (右)Alkaline phosphatase 染色

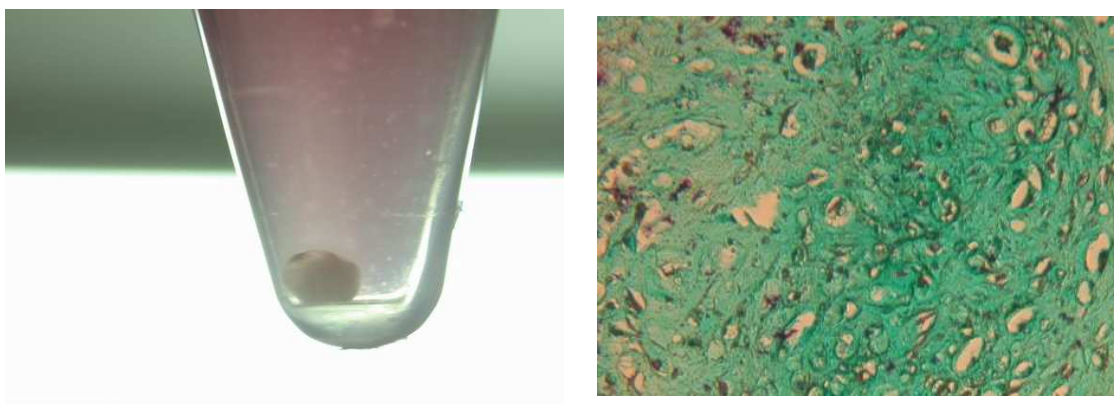


圖 3 軟骨分化
(左)pellet (右)Alcian blue 染色

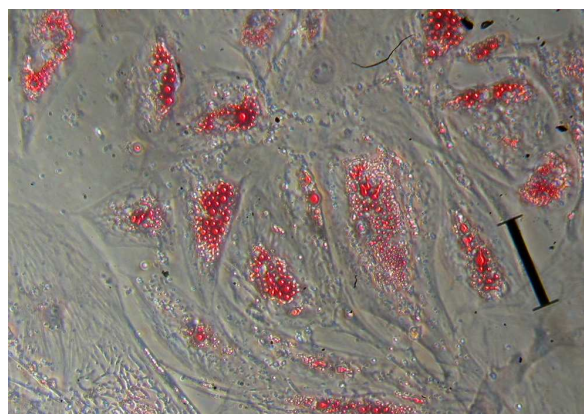
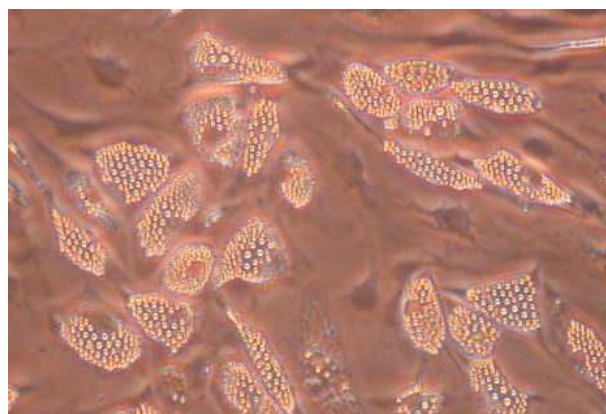


圖 4 脂肪分化
(左)未染色 (右) Oil red-O 染色



圖 5 肝臟細胞分化



圖 6 (1-a) 小柴胡湯 10 ng/mL

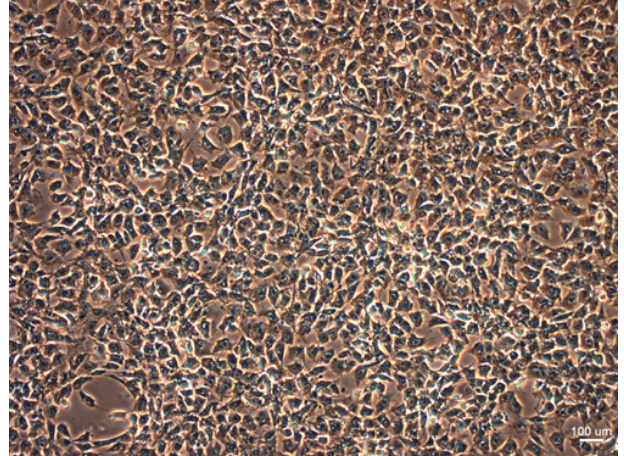


圖 6 (1-b) 小柴胡湯 100 ug/mL



圖 6 (2-a) 加味逍遙散 10 ng/mL



圖 6 (2-b) 加味逍遙散 100 ug/mL



圖 6 (3-a) 靈芝 10 ng/mL



圖 6 (3-b) 靈芝 100 ug/mL

圖 6 已分化肝臟細胞處理不同濃度中藥一週之細胞型態。

(1)小柴胡湯；(2)加味逍遙散；(3)靈芝。(a) 10 ng/mL；(b)100 ug/mL

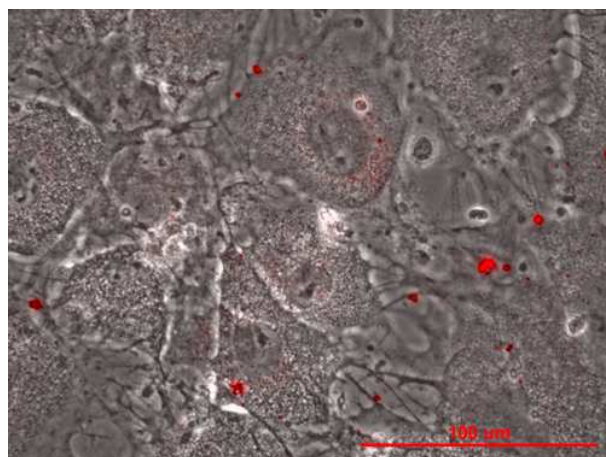


圖 7 (a)對照組

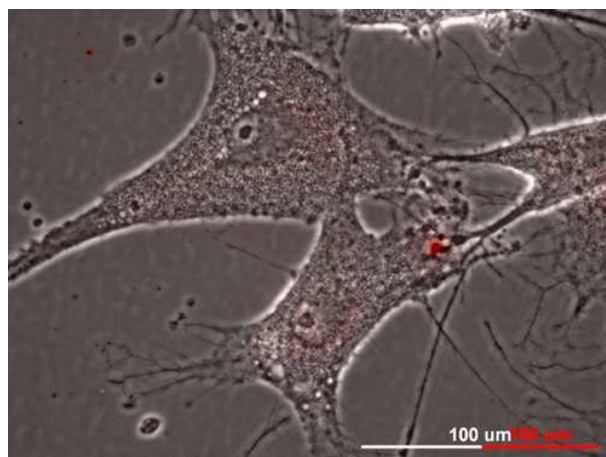


圖 7 (b)小柴胡湯

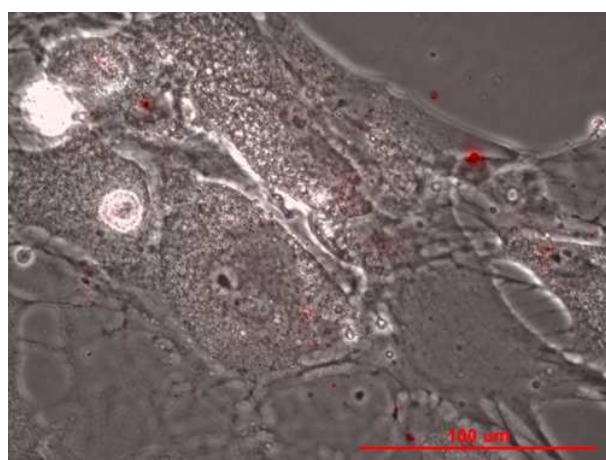


圖 7 (c)加味逍遙散



圖 7 (d)養肝丸(生達)

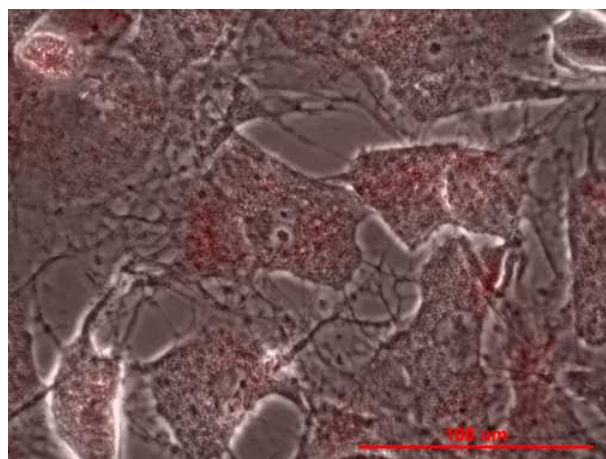


圖 7 (e)養肝丸(深浦)

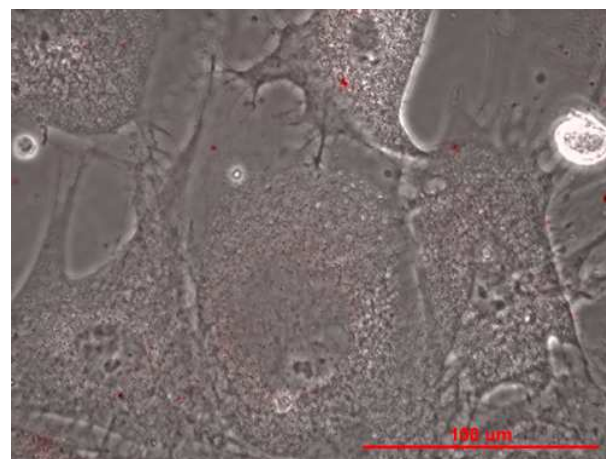


圖 7 (f)五味子芝麻錠



圖 7 (g)Hepato-care



圖 7 (h)Silymerin

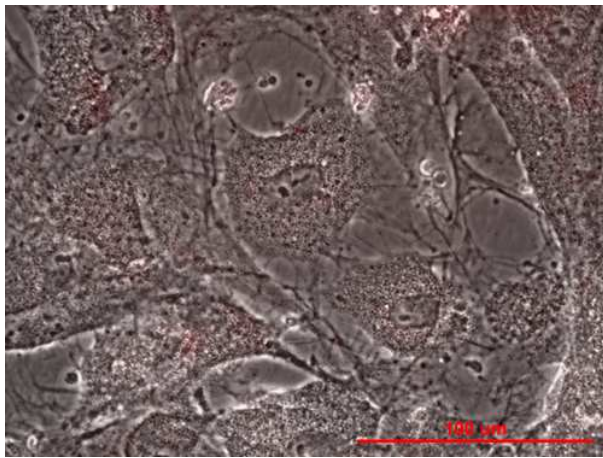


圖 7 (i)賜肝寧

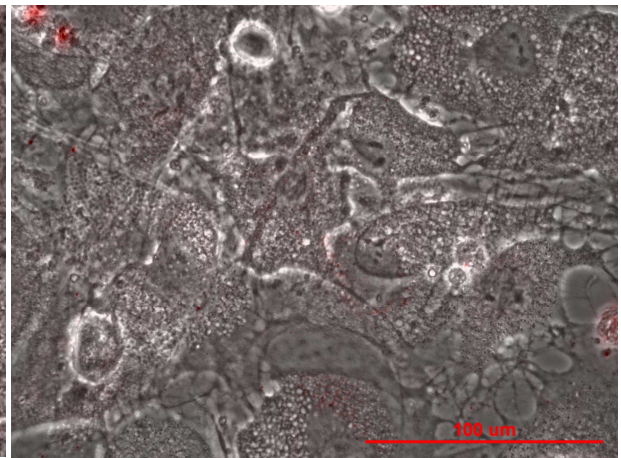


圖 7 (j)黃金蜆錠

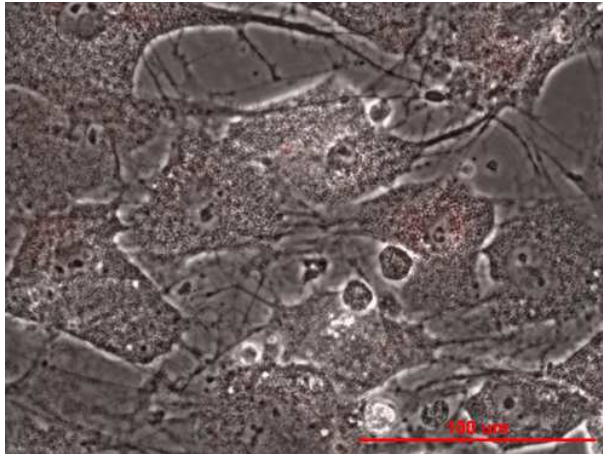


圖 7 (k)靈芝

圖 7-2 低密度脂蛋白攝入

(a) 對照組，(b) 小柴胡湯，(c) 加物逍遙散，(d) 養肝丸(生達)，(e) 養肝丸(深浦)，(f) 五味子芝麻錠，(g) Hepato-care，(h) Silynarin，(i) 賜肝寧，(j) 黃金蜆錠，(k) 靈芝。

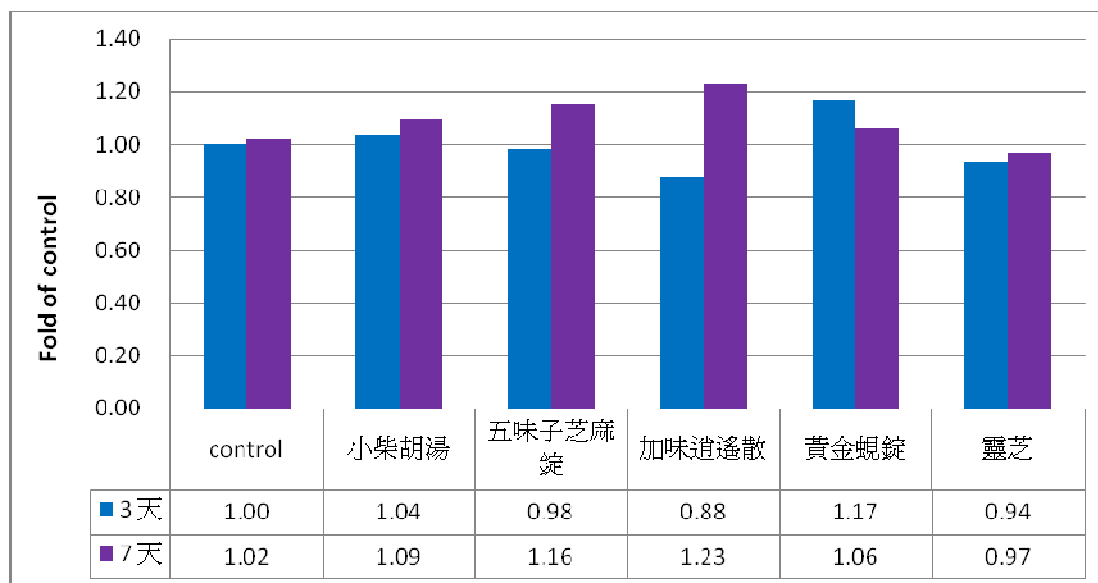


圖 8 培養液中白蛋白表現量 (ELISA)

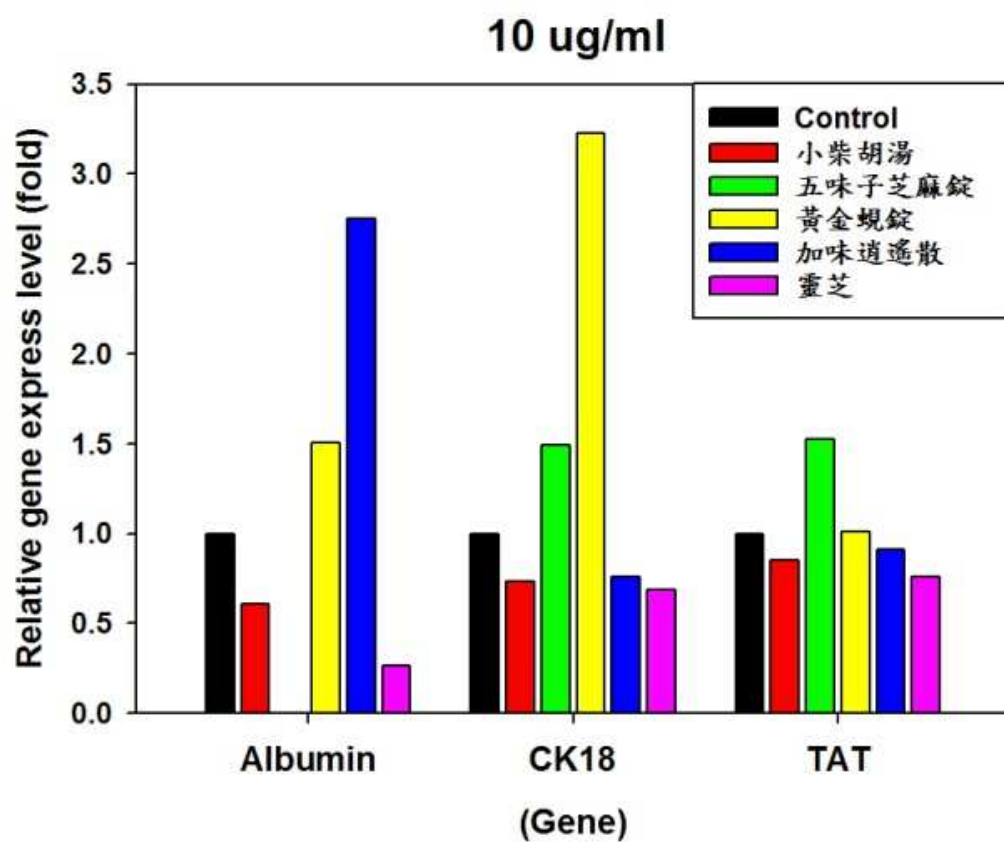


圖 9-1 中草藥對肝臟中相關基因表現量之影響 (Real Time PCR)

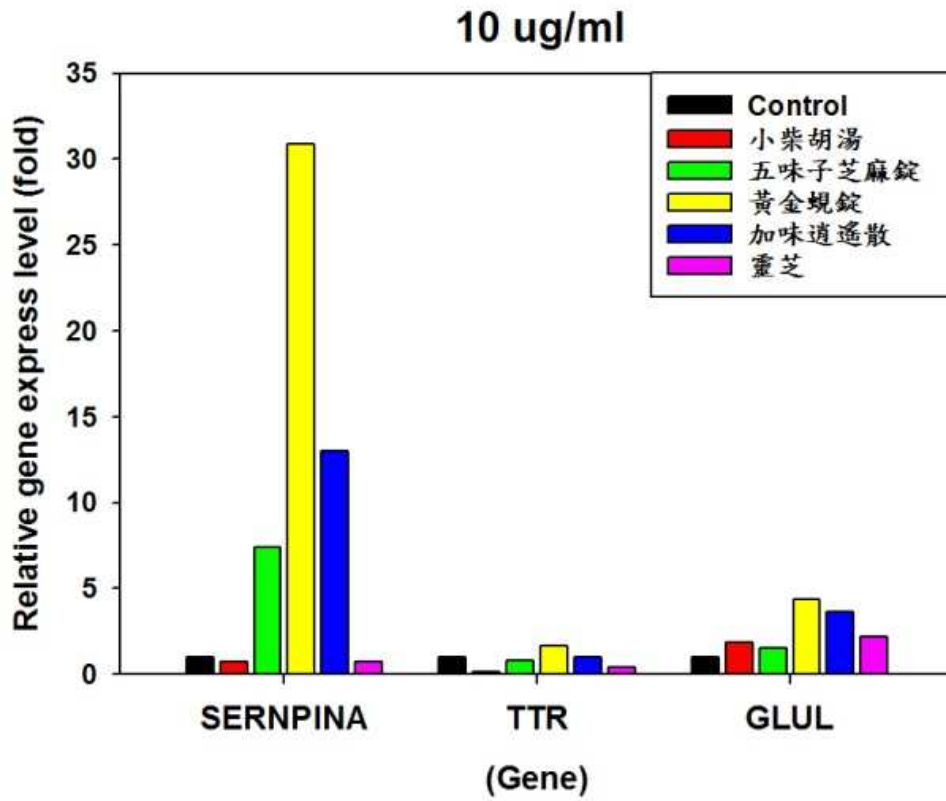


圖 9-2 中草藥對肝臟中相關基因表現量之影響 (Real Time PCR)

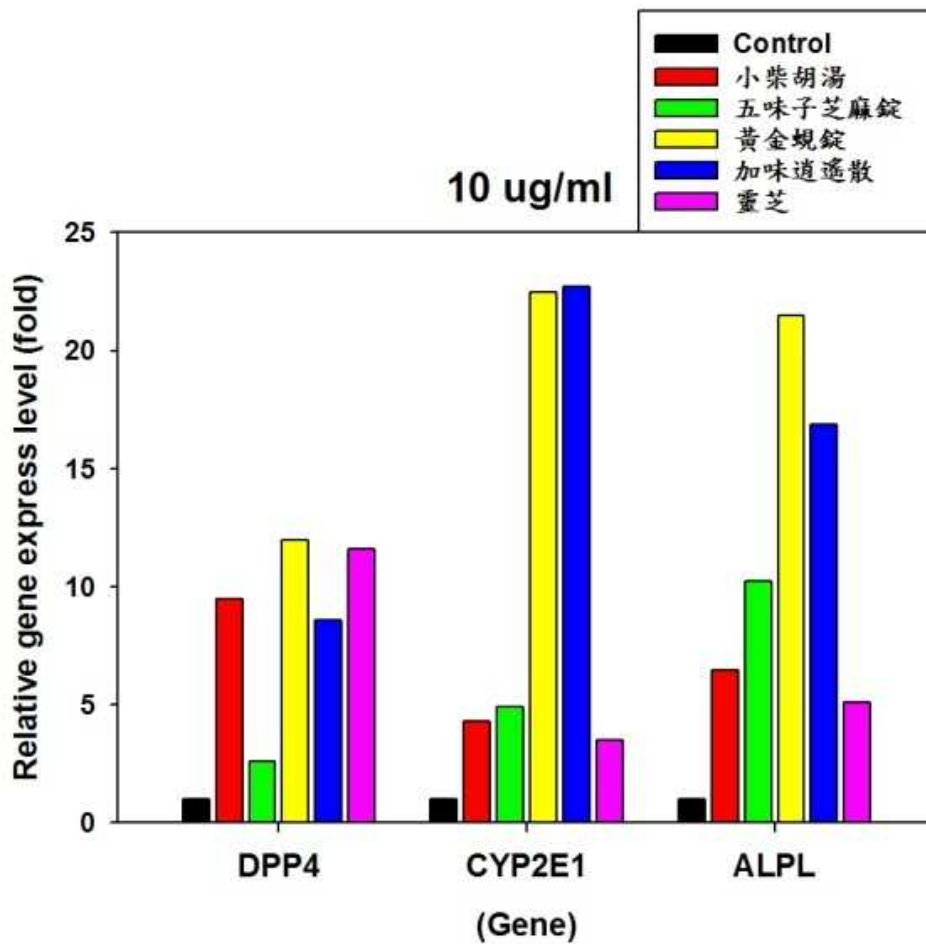


圖 9-3 中草藥對肝臟中相關基因表現量之影響 (Real Time PCR)

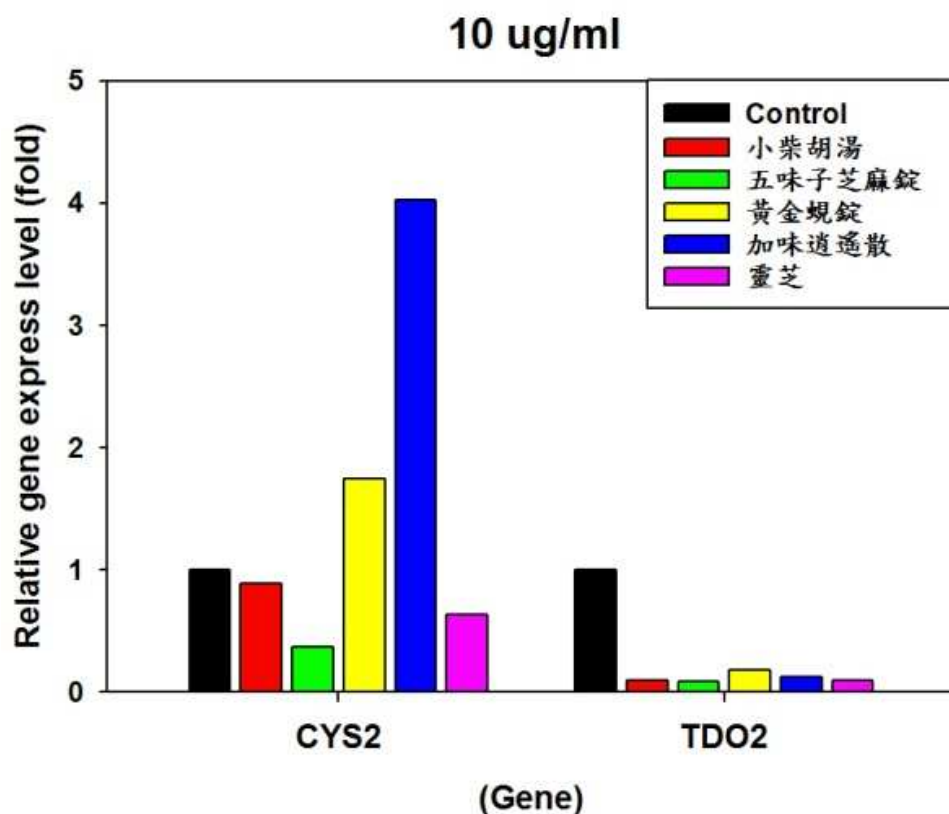


圖 9-4 中草藥對肝臟中相關基因表現量之影響 (Real Time PCR)

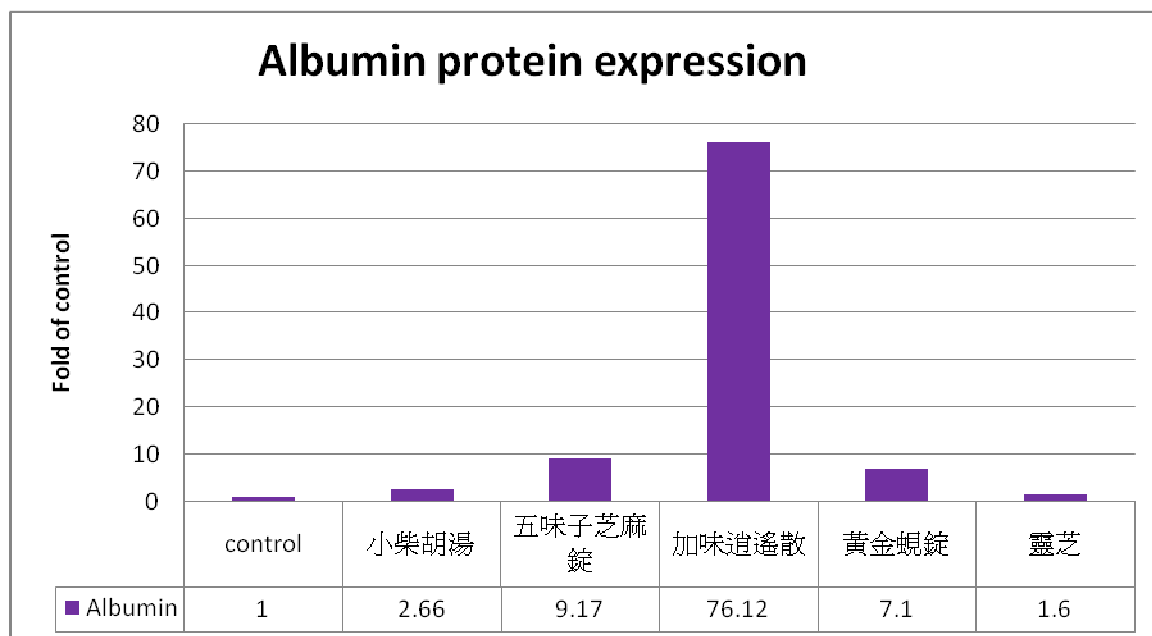


圖 10 中草藥對肝臟中白蛋白生成量之影響