

編號：CCMP94-RD-047

利用基因微陣列圖譜與動物之離體及活體 模式評估中藥 ZC008 抗肝臟纖維化之功效 (2-1)

徐士蘭、黃奇英

台中榮總教學研究部、國家衛生研究院癌症組

摘 要

研究目的：

雖然醫療技術一直在進步，但台灣地區因罹患肝疾病而致死之人數仍然高居不下。在肝疾病中除肝癌外，最常發現的即為病毒性肝炎及肝硬化。而肝纖維化是各種慢性肝病進展為肝硬化的必經途徑，其實質是肝內細胞外基質(Extracellular matrix)的合成與降解失去平衡，導致細胞外基質尤其是膠原蛋白的過渡沈積和分佈異常。隨著肝纖維化程度加重，異常增生的纖維束包纏形成假小葉，使正常肝臟的小葉結構和功能被破壞，即形成肝硬化。肝纖維化是可逆轉的，因此，抗肝纖維化治療是十分重要的。體內、外研究證實肝星狀細胞(Hepatic stellate cell)及其活化形式即轉變成纖維細胞是細胞外基質的主要來源，活化的肝星狀細胞，釋放 TGF- β 1 等多種細胞因子，從而促進細胞外基質的異常合成，抑制其降解。故肝星狀細胞的活化是肝纖維化形成過程的中心環節。據此，人們提出了針對形成肝星狀細胞活化的多個環節進行治療的策略。目前國內外有關肝纖維化治療的研究多處於實驗階段，尚乏有效療法。近年政府對中醫藥及天然藥物之研發工作日趨重視，也明訂中藥科學化與新藥研究開發列為國家重點發展項目。更選定中草藥為具有發展潛力之生物科技優先支持項目。本研究計畫是針對過去本研究室發現之具有治療肝硬化功效之中草藥代號 ZC008，以培養之大鼠肝星狀細胞探討 ZC008 抗肝纖維化作用於肝星狀細胞之分子機轉。期能藉由建立之離體細胞培養模式，給予中草藥科學化之驗證。

研究方法：

本研究將以初代培養之大鼠肝星狀細胞為研究模式，以細胞數目測定、TUNEL 凋亡分析、Caspase 活性分析、西方點墨蛋白質分析、及免疫螢光染色分析等技術，探討肝星狀細胞處理 ZC008 後其細胞的活化轉型之抑制及細胞凋亡等

分子作用，藉此離體培養方式快速找到 ZC008 具有治療肝硬化之分子作用機制。同時使用大鼠肝纖維化動物模式，結合基因微陣列分析。

結果與討論：

結果發現，中草藥 ZC008 在低濃度時具抑制肝星狀細胞生長之能力，而高濃度 ZC008 處理可促進肝星狀細胞凋亡之作用。此 ZC008 誘發之肝星狀細胞凋亡，是經由活化內生性的粒腺體致死路徑，因為活化了 Caspase-3 及-9。同時 ZC008 處理肝星狀細胞可抑制 alpha smooth muscle actin 及 collagen I 分子的表現。肝臟中之星狀細胞被活化轉型而成為肌纖維化之細胞，此細胞大量在肝臟中增殖，破壞了正常肝組織的結構，使肝臟功能不足，導致患者死亡。因此若能抑制肝星狀細胞的活化轉型及增生，即可有效的抑制肝纖維化，可抑防止肝硬化。目前國內外有關肝纖維化治療的研究雖然不少，但多處於實驗階段，尚乏有效療法。本研究探討已知有抗肝纖維化作用之中藥 ZC008，是可藉由促進肝星狀細胞之凋亡，達到治療之效應。將大鼠肝纖維化動物模式，以現代化之科學技術，結合基因微陣列分析對此藥治療肝纖維化之功效給予科學化之驗證，此研究結果可使 ZC008 之醫藥價值受到國際醫界之認同。本研究計畫實驗模式之建立，亦可當作是中藥科學化平台架構之範本。

關鍵詞：肝硬化、肝星狀細胞、中草藥、ZC008、細胞凋亡、基因微陣列

Number:CCMP94-RD-047

Microarray Profiling Delineates Molecular Portrait of the Anti-Fibrosis Effects of a Chinese Herbal Medicine, ZC008, by Using *in vivo* and *in vitro* Models (2-1)

Shih-Lan Hsu¹, Chi-Yin Huang²

¹Taichung Veterans General Hospital, Department of Education & Research

²National Health Research Institute, Cancer Research Center

ABSTRACT

Aim:

Hepatic fibrosis, a precursor of cirrhosis, is a consequence of severe liver damage that occurs in many patients with chronic liver disease, and involves the abnormal accumulation of extracellular matrix (ECM), particularly collagens. It has been shown that the activation of stellate cells in injured livers leads to their proliferation and transformation into myofibroblast-like cells. The activated hepatic stellate cell is now well established as the key cellular element involved in the development of hepatic fibrosis. Herbal medicines that have been used in China for thousands of years are now being manufactured in China as drugs with standardized quality and quantity of ingredients. In the present study, the *in vitro* cultured rat hepatic stellate cells were used to examine the biological and molecular actions of ZC008 (a selected herbal medicine which has been presently found by our laboratory to be the most safety and effective drug in treatment with chronic liver diseases, especially those with chronic hepatitis and liver fibrosis). The goal of this study is to evaluate the hepatoprotective effect of ZC008 on *in vitro* cultured hepatic stellate cells.

Methods:

Hepatic stellate cells from rat liver were treated with various concentrations of ZC008 extract for different duration. Cell death were assessed by direct cell number counting and TUNEL assay. Caspase activity was measured using specific fluorogenic substrates. The expression and cellular distribution of alpha smooth muscle actin and collagen I were examined by Western blotting and immunostaining. Dimethylnitrosamine

(DMN)-induced liver fibrosis model was performed. Liver samples were immediately removed after sacrifice and prepared for histopathological staining. Blood samples, collected from the animals at autopsy, were used to measure serum concentrations or activity of biomarkers. Gene expression profilings were examined by Affymetrix GeneChip system (RG-U34A chip) and analysis by GeneSpring software 7.3.

Results & Discussion:

We found that ZC008 extract is the most potency drug among the tested drugs to treat of hepatic stellate cells. Treatment with ZC008 decreased the expression of alpha smooth muscle actin and collagen I in primary cultured stellate cells. DNA fragmentation and caspase activation were detected in ZC008-treated stellate cells, suggesting that ZC008 extract triggered a apoptotic cell death through a intrinsic mitochondrial pathway in this primary cultured hepatic stellate cells. The current results indicate that curing the liver fibrosis by ZC008 may be due to direct elimination of the activated fibrotic cells by the agent. This study intends to build a hypothesis-driven research on liver fibrosis at the system level by implementation of diverse research approaches with the goal to elucidate novel insights into the effect of ZC008 on liver fibrosis. We used dimethylnitrosamine (DMN) to induce rat necroinflammatory and hepatic fibrosis in a 6-week time course. Using the Affymetrix RG-U34A chip, 256 differentially expressed genes, including 44 necroinflammatory- related and 62 fibrosis-related, were demonstrated from the liver injury tissues. Moreover, ZC008, a Chinese herbal medicine, were validated to be an excellent anti-liver damage candidate drug by histopathological, biochemical and microarray analysis. Our proposed research model may provide a new exploratory modality for traditional Chinese medicine research.

Keywords: Liver fibrosis, hepatic stellate cell, herbal medicine, apoptosis, microarray

壹、前言

肝纖維化是各種慢性肝病發展為肝硬化的必經過程，慢性的肝損傷，不管是慢性活動性肝炎，長期接觸藥物或毒物引起的，皆會導致肝細胞的變性、壞死、肝纖維組織增生，導致肝纖維化，甚至肝硬化。在肝纖維化的過程中，肝星狀細胞(hepatic stellate cell)的活化扮演極關鍵的角色。當肝受損時，肝細胞，Kuffer cell，內皮細胞，及免疫細胞等分泌出來的分子，如各種 cytokine 及 growth factor (PDGF, TGF- β_1) 等皆會激活肝星狀細胞，被激活的肝星狀細胞會增生轉化成為肌纖維樣之肝星狀細胞，並分泌大量的細胞外間質(extracellular matrix)，尤其是 collagen I, III，大量累積及分布異常，造成細胞外間質分解及合成失衡，大量的細胞外間質累積在細胞外，形成更多的纖維組織，逐漸造成肝纖維化。但在肝纖維化復原的過程中，可觀察到活化的肝星狀細胞凋亡及細胞外間質的瓦解。

事實上，目前對肝纖維化的治療尚無有效的策略，但隨著對肝纖維化分子病理學及肝星狀細胞被激活的途徑及其作用的深入了解，針對星狀細胞為標的，掌控其活性及作用途徑，無疑為治療肝纖維化及肝硬化提供一可行的研發治療肝硬化的方向。

一般來說，針對肝星狀細胞為標的，來治療肝纖維化有下列幾個可行途徑：

- 一、抑制肝星狀細胞的活化：如利用抗氧化劑丹參乙酸(Salviarolic acid B)來抑制肝星狀細胞的增生；或降低 PDGF, TGF- β_1 ，的釋放，或阻斷其訊息的傳遞，使肝星狀細胞無法被激活。尤其 TGF 是各類型肝硬化中，致纖維化最強力的細胞因子。再者，加強 HGF 的表達，當人鼠表現大量的 HGF，可顯著抑制肝硬化的發生，同時 TGF 降低，活化的肝星狀細胞減少，肝纖維化現象減少。
- 二、阻斷肝星狀細胞的作用途徑：活化的肝星狀細胞合成大量的細胞外間質，尤其是 collagen I, III，控制 collagen 的合成途徑，以及降低組織金屬蛋白酶抑制劑(TIMP)的量皆可達到抑制纖維化的目的。再者，活化的肝星狀細胞產生各種 cytokine，包括 IL-6, CINK, MCP-1, MIP-2 及 ICAM-1 而這些因子皆含 NF-kB 的效應分子，因此抑制活化的肝星狀細胞細胞內的 NF-kB 亦是一可行途徑。
- 三、誘導活化星狀細胞的凋亡：過去的研究證明活化的肝星狀細胞易受藥物的處理而凋亡，靜止的肝星狀細胞則否，而凋亡伴隨著膠原蛋白的瓦解，使得已纖維化的肝逆轉為正常的肝組織。

在全球醫學界針肝硬化疾病束手無策之際，對於肝纖維化形成之分子病理以及肝星狀細胞被激活途徑及作用途徑的相關研究越顯得重要，使得

許多生物醫學研究者以肝星狀細胞為標的，尋找合適的藥物控制這些與肝星狀細胞活化有關分子的表達，或改變纖維化作用途徑。針對肝星狀細胞活化的研究及抑制之方法等資料將是提供研發治療肝硬化的重要策略。

目前國內外有關肝纖維化治療的研究多處於實驗階段，尚無發現有效治療肝纖維化之藥劑。中草藥的使用已有幾千年的臨床經驗的累積為尋找有特殊療效之醫療資源庫。但因缺乏科學化之研究及驗證無法取信於國際醫學界。中醫藥的生物科技化研究是使中醫藥躍上國際生物醫學界的舞台，必走之途徑，也是目前世界潮流之趨勢。若預期由中草藥取得有效成分之研究，必先建立能確認藥物活性之特定生物檢測系統，如離體之細胞培養模式或活體之動物模式。在本實驗中，我們探討過去幾年本研究室研發的一具有治療肝纖維化之中草藥 ZC008，利用已建立之離體肝星狀細胞之培養技術，檢測中草藥 ZC008 萃取物對肝星狀細胞之活化、生長及致死之效應，並分析藥物對肝星狀細胞 alpha smooth muscle actin、collagen I 及細胞致死分子 Caspase 等基因表達及蛋白質表現等作用。研究結果發現 ZC008 萃取物可抑制 alpha smooth muscle actin 及 collagen I 的表現，抑制肝星狀細胞的生長。並且活化 Caspase-3 及-9，造成 DNA 斷裂，促使肝纖維細胞凋亡，可能因殺死纖維細胞而呈現治療纖維化疾病之功效。同時建立大鼠肝纖維化之動物模式，不單是從組織病理學與血液生化學角度評估中草藥之抗纖維化之療效，更進一步利用基因微陣列分析與肝纖維化之相關基因並且使用此系列的基因評估藥物之治療成效。此項研究將建立完善的體外與體內藥物篩選評估系統，除可找尋到具有治療或抑制肝纖維化之中草藥有效成分外，亦可藉此細胞培養模式進行藥物作用之分子機轉探討。在學術及臨床應用上均可得到具體的成效。

貳、材料與方法

一、材料

大白鼠，pronase E，collagenase，DNase I，30% Nycodenz，Percoll。

二、溶液之配製：

前灌溶液：含 NaCl 136 mM, KCl 5.4 mM, NaH₂PO₄ 0.5 mM, Na₂HPO₄ 0.42 mM, Hepes 10 mM, EGTA 0.5 mM, NaHCO₃ 4.2 mM, glucose 5 mM, phenol red 6 mg pH 7.3。

酶配製液：(Enzyme Buffer)：NaCl 136 mM, KCl 5.4 mM, CaCl₂•2H₂O 5 mM, Na₂HPO₄ 0.42 mM, Hepes 10 mM, NaHCO₃ 4.2 mM, phenol red 6 mg, pH 7.3。

GBSS 溶液：KCl 4 mM, CaCl₂•2H₂O 1.5 mM, MgCl₂•6H₂O 1 mM, MgSO₄•7H₂O 0.28 mM, Na₂HPO₄ 0.8 mM, KH₂PO₄ 0.22 mM, NaHCO₃ 12 mM, glucose 5.5 mM pH 7.0。

Pronase E 溶液：100 mg pronase E 溶於 75 ml 的酶配製液中，pronase E 使用濃度為 0.13%。

Collagenase 溶液：15.5 mg collagenase 溶於 100 ml 的酶配製液，使 collagenase 最終濃度為 0.015%。

DNase I 溶液：1 mg Dnase I 溶於 25 ml 酶配製液。

Pronase E/collagenase：混合溶液：20 mg pronase E 及 25 mg collagenase 溶於 96 ml 酶配製液，續加入 4 ml Dnase I 溶液，pronase E 使用濃度為 0.02%，collagenase 使用濃度為 0.025%。

30% Nycodenz：30 g 之 Nycodenz 溶於 100 ml GBSS 溶液。

無鈣培養液：無鈣培養液含 Hepes 10 mM, NaHCO₃ 24 mM，pH 7.3。

L-15 清洗液：L-15 培養液含 Hepes 18 mM, BSA 0.1%，Glucose 0.15%，insulin 5 g/ml，pH 7.6。

肝細胞培養液：L-15 培養液添加 Hepes 18mM, BSA 0.2%，Dexamethasone 1 M, insulin 5 g/ml, Galactose 0.05%，pH 7.6。

三、星狀細胞之分離：

將前灌溶液 (pronase E 溶液及 collagenase 溶液) 預熱於 37°C 水浴中，灌注前放入 43°C 水浴中。450~550g 之大白鼠，以 CO₂ 窒息，迅速 U 型剖胸，並於肝門靜脈處插入留置針結紮。再於上腔靜脈處埋沒引流管結紮。實驗開始，從肝門靜脈處注入前灌溶液 (10 ml/min)，邊灌注邊按摩肝臟，讓前灌溶液充分流入肝臟每個角落，洗去血水，並由上腔靜脈流出，直至整個肝臟呈現淡褐色 (約 100~150 ml)。接著注入 pronase E 溶液約 6~8 分，

肝臟呈現柔軟鬆散狀，再注入 collagenase 溶液分段注入約 15~20 分鐘後，肝臟呈現解離化。迅速取出肝臟剪碎並放入 40 ml pronase E/ collagenase 混合液，於 37°C 下進行解離，10 分鐘後收集 supernatant，過濾，離心 500 g，7 分鐘。殘餘組織重新添加 40 ml pronase E/collagenase 溶液，繼續解離，重覆三次。每次離心後，輕輕吸棄上清液，直至接近細胞團塊上方 1 公分高處，添加 40 ml 無鈣培養液 1ml DNase I 溶液使細胞充分懸浮，再以上述條件離心，重複約 3~4 次，直至上清液澄清。將細胞團塊收集為一管，添加 30% Nycodenz，使其最終濃度約為 8.4% 混合均勻，保持離心管直立並於其上小心添加 1.5ml 無鈣培養液，進行密度梯度離心 3200 rpm，20 分鐘。垂直取下離心管小心吸取無鈣培養液及細胞懸浮液之間的細胞。放入新的離心管，添加無鈣培養液，離心，倒去上清液，重覆洗二次，將細胞培養在含 20% BCS 之 DMEM 培養液，24 小時後，細胞幾已完全貼附後，可換至 10% BCS。

四、生長及存活率及細胞凋亡之測定

肝星狀細胞，以一定的細胞密度植入 12 孔盤中，每孔含 1ml 培養液，繞細胞貼附 16~18 小時後，分別處理不同濃度之中草藥萃取液，繼續培養、觀察，待其生長或存活有顯著差異時，以血清計數器，佐以 Trypan blue 染色方法計算各處理的細胞數，並以各處理組織平均值作出生長或存活率之曲線圖。處理後之細胞亦可以 TUNEL 分析凋亡細胞數，被染上綠色螢光的細胞即表示有 DNA 斷片產生，為凋亡的細胞。

五、西方墨點印漬法（鑑定特定蛋白的表現）

肝星狀細胞經不同濃度 ZC008 中草藥萃取液處理後，收集細胞團塊，並以適量的解離溶液來萃取其中蛋白質。各個不同處理的等量蛋白質經聚丙烯醯胺的電泳分離後，轉漬於 PVDF 膜上，轉漬完成的 PVDF 膜先以 5% 脫脂奶粉做空白填充（blocking），再分別以 α -SMA (alpha-smooth muscle actin)，collage I、II、III 及 MMP、TIMP 之一次抗體結合，洗去多餘的一次抗體後，接者加入二級抗體作用一小時，經 TBST 清洗後，進行螢光 X 光片反應。以鑑定各特定蛋白質的含量。

六、免疫螢光染色分析 α -SMA 及 collagen

進行 α -SMA 及 collagen 免疫螢光染色，培養在玻片上的 HSC 細胞以酒精固定，依序加入 1:100 稀釋之抗 α -SMA 或 collagen 之一級抗體，待 PBS 洗去殘餘的一級抗體後，加入以 1:100 稀釋之結合 FITC 之二級抗體，以便在螢光顯微鏡以便在螢光顯微鏡下觀察。其中，陰性對照組可以兔子或老鼠的血清取代抗體，陽性對照組則以正常老鼠的心肌細胞染色。在螢光光學顯微鏡交叉觀察 α -SMA 或 collagen 的表現及在細胞內分佈情形。

七、Caspase 活性測定

肝星狀細胞，以一定的細胞密度植入 10 cm 培養盤中，細胞貼附 16~18 小時後，分別處理不同濃度之 ZC008 萃取液，繼續培養、觀察，待其生長或存活有顯著差異時，收集細胞後分解並製備細胞蛋白液。定量之細胞蛋白液與 caspase substrate 作用於 37°C，2 h 後。用微盤螢光光譜分析儀 (Thermo Labsystem, Finland) 於激發光 400 nm，釋放光 505 nm 之分析條件下偵測螢光強弱。因 substrate 被 caspase 分解後會產生螢光。反應之螢光越強表示 caspase 活性越強。

八、大鼠動物模式

動物模式是參考先前發表的文獻資料(Su, et al.)，每一週實驗有 4 到 9 隻大鼠，ZC008 (1.4g/kg)與 Silymarin (0.4g/kg)皆以鼻胃管途徑投與藥物。每週犧牲的大鼠皆將肝臟秤重並且切取肝右小葉作組織病理染色。同時收集血清在台中榮總檢驗科做血液生化值分析。其它肝臟以液態氮冷凍研磨備用。

九、基因微陣列分析

共有 54 隻大鼠肝臟被用來進行微陣列分析，包括 12 隻對照組、12 隻引發肝纖維化實驗組、10 隻 ZC008 治療組、10 隻 Silymarin 治療組、10 隻餵食 ZC008 實驗組。用來進行微陣列分析的 total RNA 使用 Spectra Max Plus (Molecular Devices) 以及利用分光光度計測定 OD260/OD280 比值 (1.9-2.1) 來確認其品質。微陣列實驗過程中之雜交(hybridization)、沖洗(washing)、和染色(staining)的試劑和流程都根據 Affymetrix 官方之實驗步驟手冊 (<http://www.affymetrix.com/support/technical/manuals.affx>)。在與 Affymetrix Human Genome U133A Array 進行雜交之前，先與 Affymetrix GeneChip Test 3 Array 進行雜交，來確認 cRNA 品質。我們使用 GeneSpring® 7.2 software (Silicon Genetics, Redwood City, CA) 進行每一晶片和每一基因的標準化校正。

十、統計分析

使用 SPSS 13 做組織病理與血液生化值之差異性分析，用 GeneSpring 7.3 作基因微陣列分析。

參、結果

一、ZC008 萃取物抑制肝星狀細胞中 alpha smooth muscle actin (α -SMA) 及 collagen I 的表現：

大鼠肝星狀細胞以 50 g/ml 的 ZC008 萃取物處理 12 小時後，以 FITC-結合的 α -SMA 抗體進行免疫螢光染色後，於螢光顯微鏡下觀察肝星狀細胞內 α -SMA 的表現。結果（如圖一），發現 ZC008 萃取物可以明顯的抑制活化的肝星狀細胞內的 α -SMA 的表現。我們進一步以西方墨點法分析 α -SMA 蛋白在細胞內的表現（如圖二），結果發現以 50 g/ml 的 ZC008 萃取物處理不同時間後， α -SMA 在肝纖維細胞中之表現量，隨著處理時間的增加而表現遞減，呈現時間負相關性。A549 為人類肺腺癌細胞，WI38 為人類正常肺纖維細胞。此兩種細胞並無 α -SMA 之表達，表示本實驗結果是有基因表現專一性。我們接著觀察 ZC008 萃取物處理對肝星狀細胞分泌 collagen I 能力的影響。結果顯示，無論以免疫螢光染色或以西方墨點法分析，均發現 ZC008 萃取物可顯著的抑制肝星狀細胞分泌 collagen I 的能力。

二、ZC008 萃取物抑制肝星狀細胞生長並促進細胞死亡：

大白鼠肝星狀細胞以 50 g/ml 的 ZC008 萃取物處理 1、2、4、8、及 24 小時後，以 Trypan blue dye exclusion 的方法直接計算存活細胞的數目。結果發現處理 ZC008 萃取物組，其存活細胞數目顯著降低（如圖三 A）。在相差顯微鏡下觀察細胞的外型變化，結果發現處理 ZC008 萃取物的細胞逐漸圓起，漂浮於培養液中，呈現細胞死亡的徵狀。

三、ZC008 萃取物誘發肝纖維細胞凋亡並活化 Caspase-2、-3 及 -9：

大白鼠肝星狀細胞以 50 g/ml 的 ZC008 萃取物處理 12 小時後，以 TUNEL 分析細胞內 DNA 斷片產生之現象，若呈現螢光綠色的細胞，即為凋亡之細胞。結果如圖四 A，發現處理 ZC008 萃取物的肝星狀細胞，大部分都呈現螢光綠色的細胞核，表示細胞核內的 DNA 已經被分解成斷片，此細胞已經凋亡。而對照組沒有處理 ZC008 萃取物的細胞核並沒有觀察到呈現綠色螢光，表示細胞核中 DNA 沒有斷裂，為正常存活之細胞。當細胞被誘發凋亡時，細胞質中之分解酵素 Caspase 會被活化。因此，以 50 g/ml 的 ZC008 萃取物處理大白鼠肝星狀細胞，12 小時後，萃取蛋白質分析細胞內各種與凋亡相關的 Caspase 的活性。結果顯示（如圖四 B），ZC008 萃取物處理後，可活化肝星狀細胞內的多種 Caspases，活化的倍率列舉如下：Caspase-2 活化倍率為對照組的 4 倍，Caspase-3 活化倍率為對照組的 4.5 倍，Caspase-6 活化倍率為對照組的 2.5 倍，Caspase-8 活化倍率為對照組的 1.5 倍，Caspase-9 活化倍率為對照組的 3 倍。由此結果可推測得知 ZC008 誘導的細胞凋亡，可能是經由粒腺體活化的凋亡路徑。

四、利用肝纖維化之大鼠動物模式評估 ZC008

我們利用大鼠肝纖維化動物模式進一步評估 ZC008 療效(圖五)，實驗進行中，同時用作為 Silymarin 西藥對照組。先前大鼠存活曲線實驗得知 ZC008 之治療組是可以明顯增加肝臟受損大鼠之存活率。所以對於肝臟受損與 ZC008 治療之大鼠作更進一步組織病理學與血液生化值的分析。在肝臟總重統計分析上，ZC008 之治療組是明顯有抑制 DMN 引發肝臟受損時總重量減輕的現象(數據未呈現)，這顯示 ZC008 是有減緩肝臟受損現象。組織病理學方面研究，經由生物統計分析，在 DMN 所引發的肝臟受損，ZC008 是在第三到四週時明顯降低 31%發炎性細胞壞死，並且也在第五到六週降低 30%肝纖維化病理進程(表一)，圖六則顯示第四週發炎性細胞壞死與第六週的肝纖維化組織病理學結果。不僅如此，相較於西藥對照組，ZC008 比 Silymarin 更有效果(表一、圖六)。

血液生化質方面，一共做 14 項血液生化時實驗。生物統計分析後，有 11 項血液生化質會因受到 DMN 處理後明顯發生類似肝臟受損時之指數變化(Su, et al.)，例如 GOT，GPT，bilirubin 在血液濃度是上升。至於 ZC008 之治療組，則從 11 項明顯變化之血液生化質中有 8 項明顯回復。這 8 項包括 GPT、GOT、bilirubin、AKP、AFP、BUN、PT 和 PLT(表二)。(圖七)則是零床上經常使用肝功能之指標，相較於西藥對照組，GPT、GOT、bilirubin 明顯降低指數功能，Albumin 則是有稍微回復，換句話說，ZC008 是有保護肝細胞不被肝毒性化合物破壞的能力。

五、基因微陣列分析

在先前發表研究中，大鼠肝臟受到 DMN 破壞後，利用基因微陣列之統計分析，一共有 256 個基因是肝臟在發炎性細胞壞死與纖維化有關之基因(Su, et al.)，我們就進一步將 ZC008 之治療組與 Silymarin 西藥對照組作基因微陣列分析實驗。從基因圖譜中，我們發現已知肝纖維化之標記，例如 *Tgfb*、*Timp1* 與 *Timp2*，在 ZC008 處理後會顯著回復因肝臟受損時的表現(數據未呈現)。(圖八)則是結合先前發表與藥物治療組的實驗數據，256 基因所形成基因表現圖譜。在 256 受到改變的基因中，ZC008 之治療組 64% 基因顯著回復基因表現(圖九)，相較於西藥對照組(9%)，ZC008 在治療肝纖維化的過程中，是更全面也更有效的候選藥物。

肆、討論

由於中醫藥具有幾千年臨床使用之經驗，唯缺乏科學化之驗證，使用後之療效無法有具體之數據提供參考，因此推廣使用之成果緩慢。但近年來西藥之研發遭遇瓶頸，且西藥又常會造成不良副作用，對慢性疾病治療之成效亦有限。因此，由天然藥用植物中尋找有醫療價值的藥物，已獲得各國的重視，許多的專家學者也紛紛投入中草藥活性成分分離，及藥效作用之研究工作中。西方醫療研發團隊更視中國傳統藥材為極具潛力開發的醫藥研發方向。台灣這幾年在政府政策的引導下，中醫藥及天然物的開發研究工作也倍受重視。在世界各地肝病均是一發生普遍且造成嚴重傷亡的疾病。肝硬化及肝炎為較常發生的肝疾病，可因酗酒、病毒感染、藥物傷害及免疫系統之不正常等原因而誘發。在世界各地因罹患肝硬化而致死的病例有逐年增加的趨勢。過去的文獻報導肝臟中之星狀細胞被活化轉型並大量增殖是形成肝硬化之中心環節，原本在肝臟中作為儲存維生素 A 的肝星狀細胞因前述種種病理原因，被活化轉型而成為肌纖維化之細胞，此細胞大量在肝臟中增殖，破壞了正常肝組織的結構，使肝臟功能不足，導致患者死亡。因此，若能抑制肝星狀細胞的活化轉型及增生之即可有效的抑制肝纖維化，可防止肝硬化之病變。本研究室一直致力於研發具治療肝硬化功能之中草藥，利用初代培養之大鼠肝星狀細胞，快速有效的篩選出可以抑制肝星狀細胞生長，促進肝星狀細胞死亡的中草藥。先前本實驗室之研究發現，代號 ZC008 之藥劑萃取物治療肝纖維化之效果十分顯著。因此，本研究對 ZC008 萃取物為何造成活化型態的肝星狀細胞的死亡，有更深入之探討。肝星狀細胞中的 α -SMA 及 collagen I 的大量表達，是此細胞活性之顯示。但處理了 ZC008 明顯的造成肝星狀細胞 α -SMA 斷裂及分泌的 collagen I 大量減少，意味著 ZC008 可抑制肝星狀細胞的活性。

此外，實驗結果也發現 ZC008 可有效的抑制肝星狀細胞的生長並促進細胞的死亡，但同樣濃度之 ZC008 並不影響正常肝細胞之存活，對肝細胞無毒殺效應。我們進一步分析 ZC008 誘發活化的肝星狀細胞的死亡路徑，結果顯示 ZC008 處理肝星狀細胞可以活化 Caspase-2、-3 及 -9，並且造成 DNA 斷片之產生，此結果顯示 ZC008 是經由粒腺體活化細胞凋亡的路徑，誘導活化的肝星狀細胞的死亡。究竟 ZC008 觸動細胞內何種上游訊息傳遞路徑，催化了肝星狀細胞粒腺體活化致細胞凋亡的路徑，目前也有進一步的發現及初步研究結果，將繼續追蹤探討。

此項研究將建立完善的體外與體內藥物篩選評估系統(從細胞生物學、組織病理學、血液生化學到分子層面的基因微陣列分析)，除可找尋到具有治療或抑制肝纖維化之中草藥 ZC008 的有效成分外，亦可藉此細胞培養模式進行藥物作用之分子機轉探討。在學術及臨床應用上均可得到具體的成效。

伍、結論與建議

本研究計畫建立了抗肝纖維化之中草藥藥效評估之離體模式技術平台。藉由離體肝星狀細胞之體外培養模式，成功的作為分析具有抗肝纖維化功效之中草藥 ZC008 作用之分子機制。我們應用此建立之體外培養模式，並以分子生物學，或細胞生物學之知識及技術，探討 ZC008 對肝星狀細胞之生長抑制及致死效應之參與分子。發現 ZC008 會造成肝星狀細胞的凋亡作用，但對肝細胞毒性不大，未來應用在肝硬化的治療或許是個可期許的明日之星。以此研究模式，可將在臨床上用於治療病毒肝炎或肝硬化之中草藥，給予細胞學及分子生物學上的基礎研究，在臨床上也給予治療肝硬化之中草藥科學化之論證，使中草藥之療效及應用得到國際生物醫學界的認同。本研究計畫原本的規劃為至少三年執行一個段落，每一年至少需要約 300 萬元的研究經費。礙於通過之經費明顯不足，固定人力的缺乏，耗材費用的短絀，執行上困難重重，無法達到自訂的目標。原本預定晶片的分析及肝纖維化細胞致死機制的研究同時進行，以這一年所核定之經費，只能探討 ZC008 對肝纖維細胞生長抑制及細胞凋亡之作用分子變化與動物模式的建立與初步少量基因微陣列分析。希望下一年度能有足夠之經費，繼續完成定量性聚合酶連鎖反應進行驗證基因微陣列分析、ZC008 萃取物對免疫 KUPFFER 細胞之活化或抑制效應，並能有經費將 ZC008 對這些組織細胞的作用，以生物晶片分析其基因的整體表現差異。達到此計畫的長遠目標，釐清 ZC008 在肝纖維化過程中的功效機轉，及尋找全新之肝纖維化疾病的標記分子，以利臨床上對於早期肝纖維化之診斷。並期望能因本計畫一系列科學化之研究驗證，將 ZC008 推廣為國際醫學界可接受之有效治療肝纖維化之藥物。

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 CCMP94-RD-047 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

陸、參考文獻

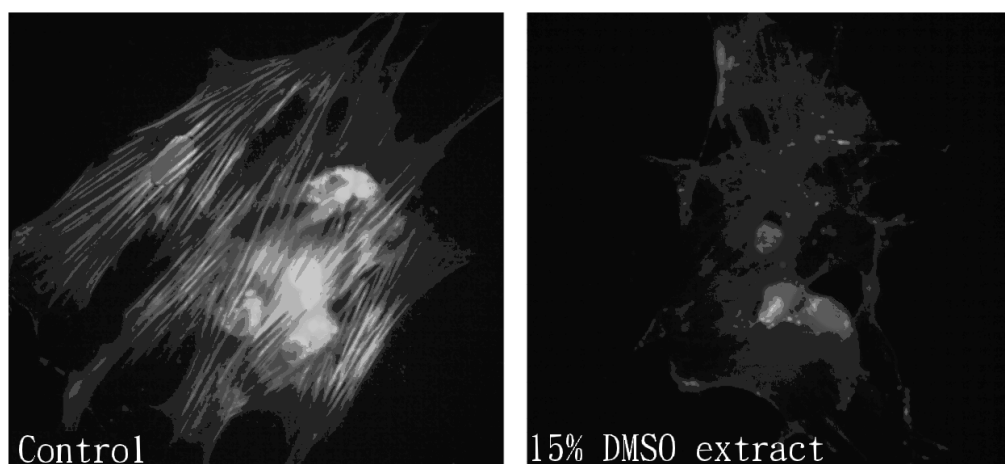
1. Bahr MJ, Vincent KJ, Arthur MJP, Fowler AV, Smart DE, Wright MC, Clark IM, Benyon RC, Iredale JP, Mann DA. Control of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promoter in culture-activated rat hepatic stellate cells: regulation by activator protein-1 DNA binding proteins. *Hepatology* 1999; 29:839-848.
2. Bhattacharjee A, Lappe VR, Rutherford MS, Schook LB. Molecular dissection of dimethylnitrosamine (DMN)-induced hepatotoxicity by mRNA differential display. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1998; 150:186-195.
3. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275:2247-2250.
4. Garcia-Trevijano ER, Iraburu MJ, Fontana L, Dominguez-Rosales JA, Auster A, Covarrubias-pinedo A, Rojkind M. Transforming growth factor β 1 induces the expression of α I procollagen mRNA by a hydrogen peroxide-C/EBPB-dependent mechanism in rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999; 29:960-970.
5. Inoue T, Jackson EK. Strong antiproliferative effects of baicalein in cultured rat hepatic stellate cells. *Eur. J. Pharmacol.* 1999; 378: 129-135.
6. Mann DA, Smart DE. Transcriptional regulation of hepatic stellate cell activation. *Gut* 2002; 50:891-896.
7. Miyahara T, Schrum L, Rippe R, Xiong S, Yee HF Jr, Motomura K, Anania FA, Willson TM, Tsukamoto H. Peroxisome proliferator-activated receptors and hepatic stellate cell activation. *J Biol Chem* 2000; 275:35715-35722.
8. Nakamura T, Sakata R, Ueno T, Sata M, Ueno H. Inhibition of transforming growth factor β prevents progression of liver fibrosis and enhances hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats. *Hepatology* 2000; 32:247-255.
9. Saile B, Matthes N, Armouche HE1, Neubauer K, Ramadori G. The bcl, NFkB and p53/p21WAF1 systems are involved in spontaneous apoptosis and in the anti-apoptotic effect of TGF- β or TNF- α on activated hepatic stellate cells. *Eur J Cell Biol* 2001; 80:554-561.
10. Shimizu I, Ma Y-R, Mizobuchi Y, Liu F, Miura T, Nakai Y, Yasuda M, Shiba M, Horie T, Amagaya S, Kawada, Hori H, Ito S. Effects of Sho-saiko-to, a Japanese Herbal medicine, on hepatic fibrosis in rats. *Hepatology* 1999; 29:149-160.

11. Shiratori Y, Kanai F, Ohashi M, Omata M. Strategy of liver-directed gene therapy: present status and future prospects. *Liver* 1999; 19:265-274.
12. Su, L-J, Hsu, S-L, Yang, J-S, Tseng, H-H, Huang, S-F and Huang, C-Y F Global gene expression profiling of dimethylnitrosamine induced liver fibrosis in a rat model; from histo-pathological and biochemical data to microarray analysis. *Gene Expr* 2006; in press.
13. Svegliati Baroni G, Patorelli A, Manzin A, Benedetti A, Marucci L, Solforosi L, Di Sario A, Brunelli E, Orlandi F, Clementi M, Macarri G. Hepatic stellate cell activation and liver fibrosis are associated with necroinflammatory injury and Th-1-like response in chronic hepatitis C. *Liver* 1999; 19:212-219.
14. Tang L, Tanaka Y, Marumo F, Sato C. Phenotypic change in portal fibroblasts in biliary fibrosis. *Liver* 1994; 14:76-82.

柒、圖、表

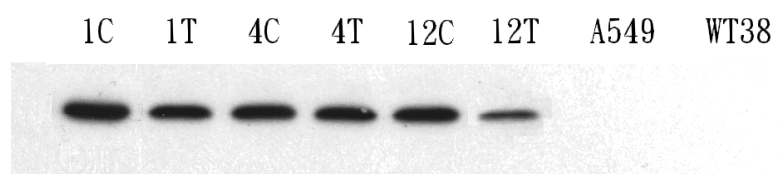
圖一 A

α -SMA expression



圖一 B

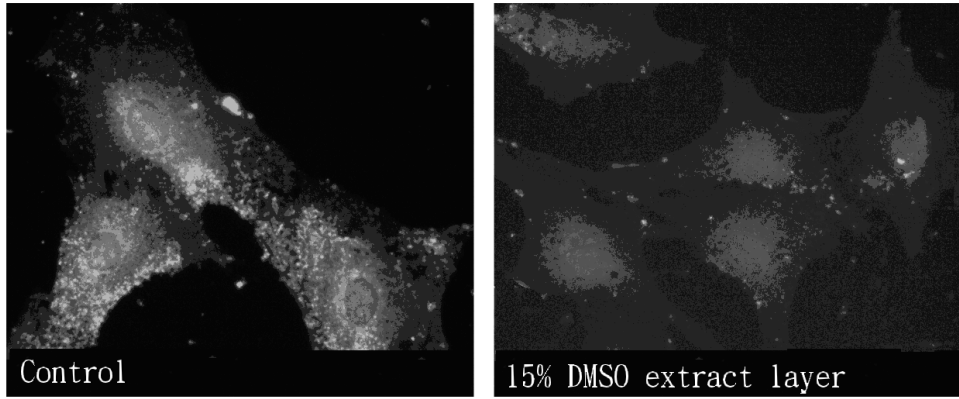
α -SMA western blot



圖一、ZC008 萃提取物抑制肝星狀細胞內 α -SMA 的表現。(A)免疫螢光染色。肝星狀細胞以 $50 \mu\text{g/ml}$ 的 ZC008 萃提取物處理 12 小時後，以 FITC-結合的 α -SMA 抗體處理後，於螢光顯微鏡下觀察肝星狀細胞內 α -SMA 的表現。(B)西方墨點法分析以 $50 \mu\text{g/ml}$ 的 ZC008 萃提取物，處理不同時間後， α -SMA 在肝纖維細胞中表現量。A549 為人類肺腺癌細胞，WI38 為人類正常肺纖維細胞。此兩種細胞並無 α -SMA 之表達。

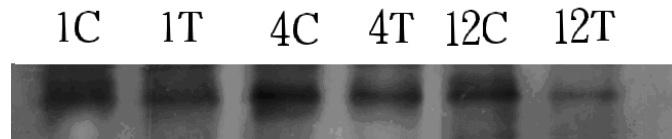
圖二 A

Collagen I expression



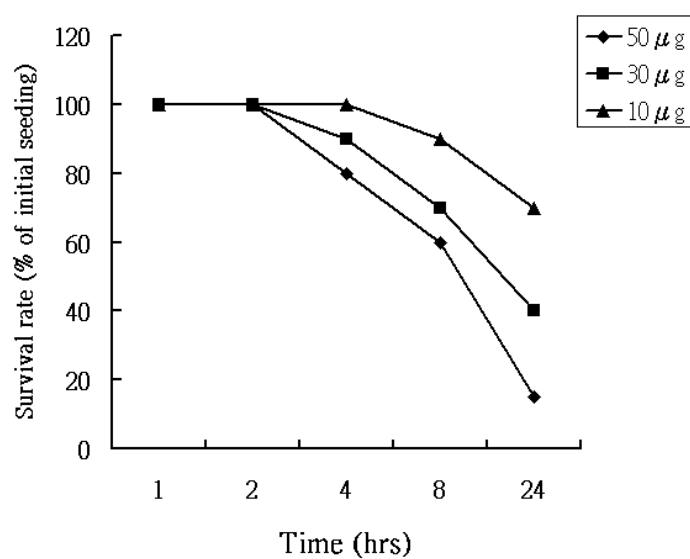
圖二 B

Collagen-I western blot

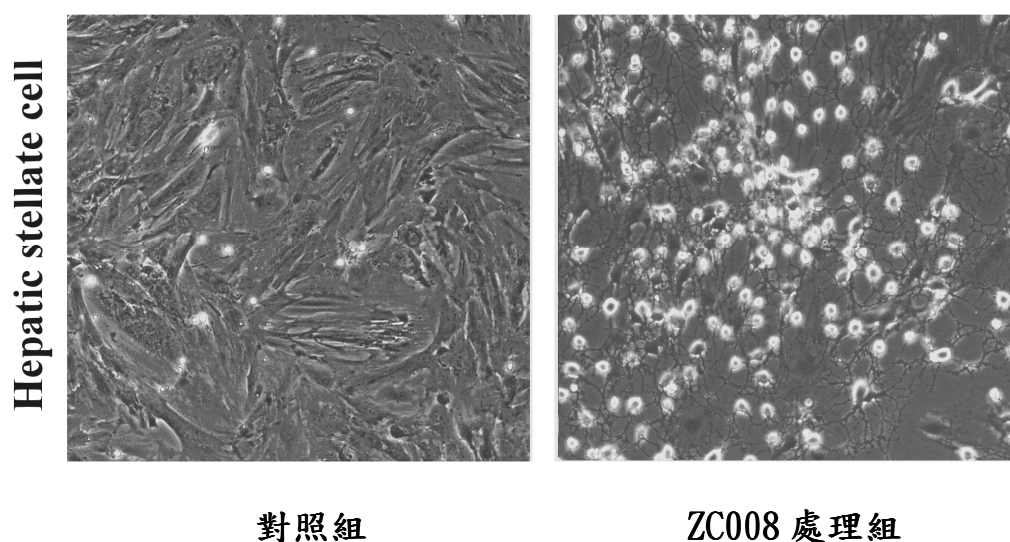


圖二、ZC008 萃取物抑制肝星狀細胞中第一型膠原蛋白 collagen 的產生。肝星狀細胞處理 $50 \mu\text{g/ml}$ 的 ZC008 萃取物 12 小時後，細胞內第一型膠原蛋白 collagen 的表現量可以 (A) 免疫螢光染色法及 (B) 西方墨點法分析。

圖三 A

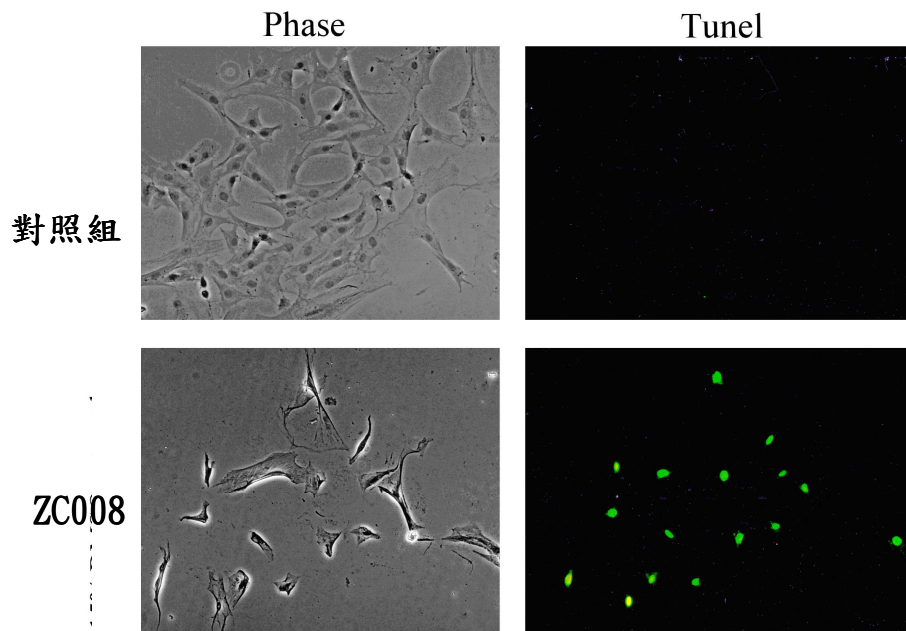


圖三 B

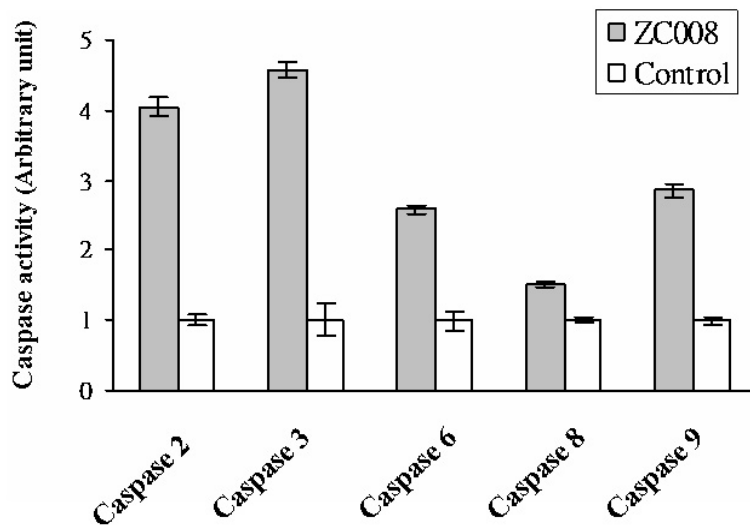


圖三、ZC008 萃取物可抑制肝星狀細胞生長並促進細胞死亡。大白鼠肝星狀細胞以 50 g/ml 的 ZC008 萃取物處理 1、2、4、8、及 24 小時後，(A) 以 TRYPAN BLUE 的方法直接計算存活細胞的數目。或 (B) 在位相差顯微鏡下觀察細胞的外型變化。原始放大倍數 200 倍。

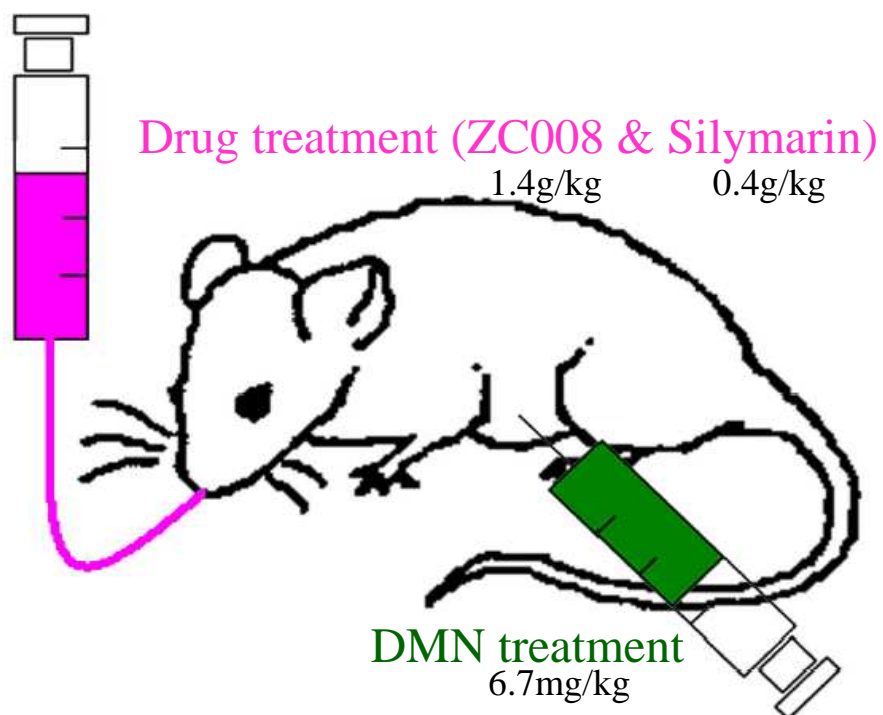
圖四 A



圖四 B



圖四、ZC008 萃取出誘發肝纖維細胞凋亡並活化 Caspase-3 及-9。(A) 以 TUNEL 的方法分析細胞凋亡現象。大白鼠肝星狀細胞以 50 g/ml 的 ZC008 萃取出處理 12 小時後，以 TUNEL 分析 DNA 斷片產生之現象，若呈現螢光綠色的細胞，即為凋亡之細胞。或 (B) ZC008 萃取出誘發 Caspase 活化。大白鼠肝星狀細胞以 50 g/ml 的 ZC008 萃取出處理 12 小時後，萃取出蛋白質分析細胞內各種與凋亡相關的 Caspase 的活性。



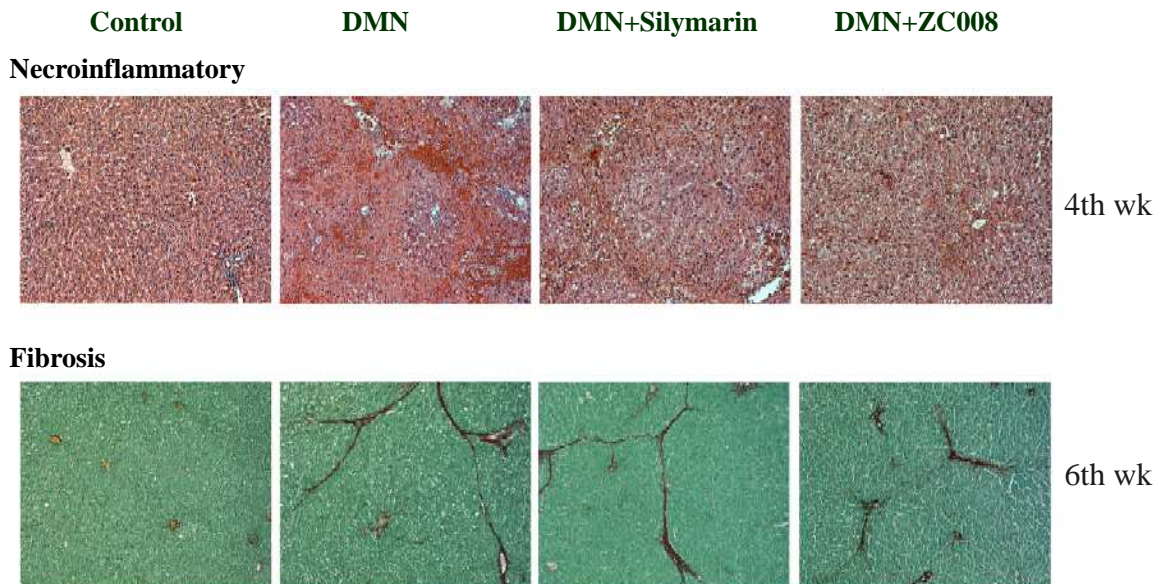
圖五、ZC008 萃提取物抗纖維化隻大鼠動物模式。二甲基亞硝胺(DMN)是利用腹腔注射進入大鼠，而中草藥實驗組(ZC008)與西藥對照組(Silymarin)則是使用鼻胃管餵食。這是觀察六週的實驗。

表一、ZC008 與 Silymarin 在抗肝纖維化之動物模式中，組織病理學之生物統計結果。

Table the pathological score in animal model

Factors	control			DMN		
	1-2 wk (%)	3-4 wk (%)	5-6 wk (%)	1-2 wk (%)	3-4 wk (%)	5-6 wk (%)
Necrosis (0-1/2-3)	100/0	100/0	100/0	50/50	36/64	87.5/12.5
Fibrosis(0-1/2-3)	100/0	100/0	100/0	75/25	9/91	25/75
Inflammation (0-1/2-3)	100/0	100/0	100/0	50/50	10/90	87.5/12.5
Fatty change (- / +)	100/0	100/0	100/0	87.5/12.5	100/0	100/0

Factors	DMN+ZC008			DMN+silymarin		
	1-2 wk (%)	3-4 wk (%)	5-6 wk (%)	1-2 wk (%)	3-4 wk (%)	5-6 wk (%)
Necrosis (0-1/2-3)	100/0	75/25	72/28	75/25	57/43	40/60
Fibrosis(0-1/2-3)	100/0	66/33	50/50	75/25	71/29	40/60
Inflammation (0-1/2-3)	100/0	75/25	72/28	75/25	57/43	40/60
Fatty change (- / +)	100/0	100/0	100/0	100/0	100/0	100/0



圖六、ZC008 與 Silymarin 在抗肝纖維化之動物模式中，第四週與第六週之組織病理學結果。上層是 H&E 染色，下層是 Fast Green 染色。

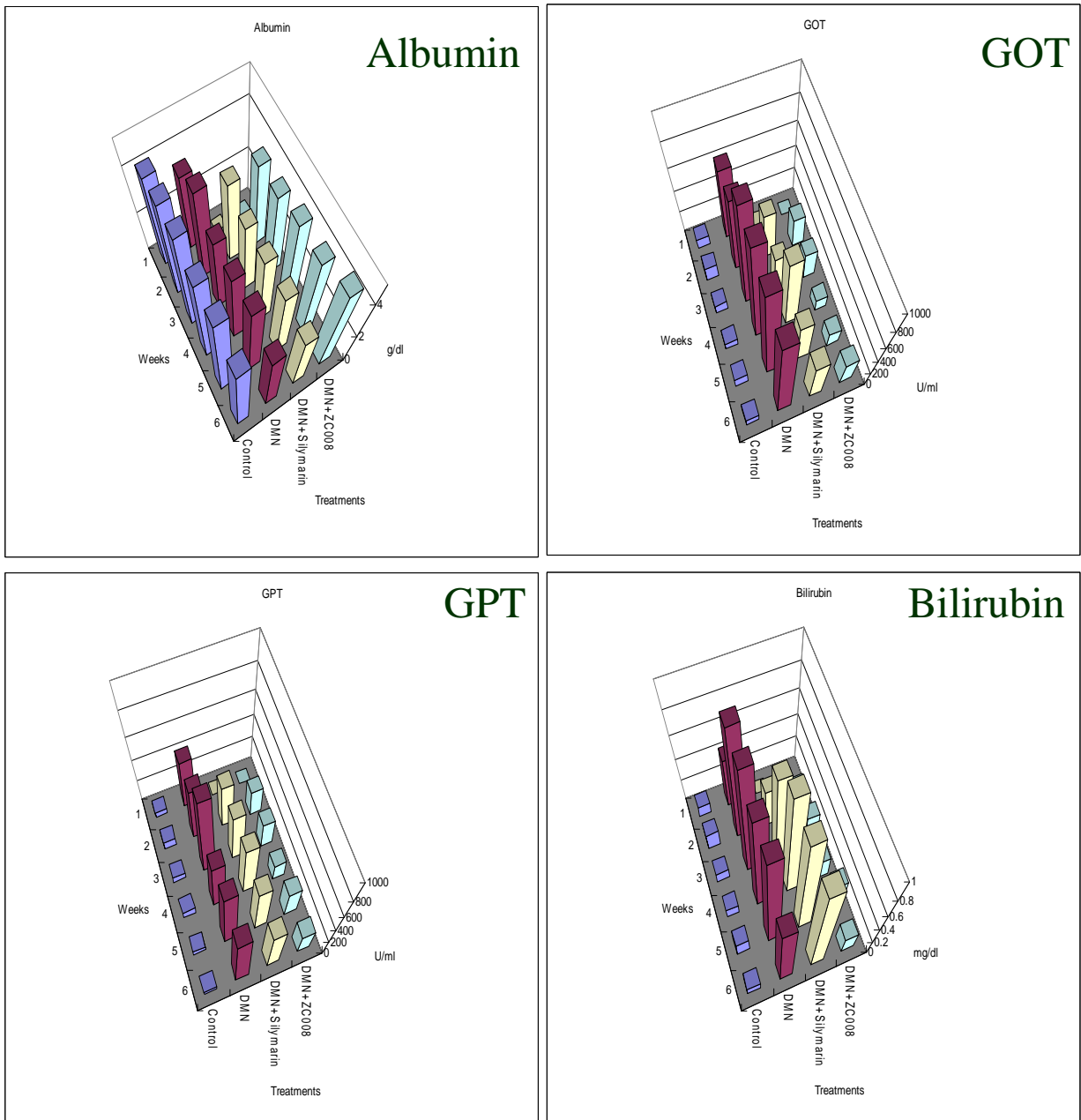
表二、ZC008 與 Silymarin 在抗肝纖維化之動物模式中，血液生化學之生物統計結果。

Numeric variable	<i>P</i> ^a			Categorical variable		
	Drug ^b	Week	Drug * Week	1st to 2nd wk ^c	3rd to 4th wk ^c	5th to 6th wk ^c
albumin	0.1285	0.3895	0.2342	-0.17	0.38	0.83
GPT	0.0003*	0.6769	0.7826	-224	-359	-501
GOT	<0.0001*	0.3298	0.2164	-390	-816	-1355
bilirubin	<0.0001*	0.6728	0.7539	-0.48	-0.75	-1
AKP	<0.0001*	0.6172	0.1147	-303	-230	-107
LDH	<0.0001*	0.0132*	0.0013*	-63	-141	-363
globulin	0.1341	0.029*	0.0254	-0.75	0.58	1.65
triglyceride	0.0658	0.4116	0.355	-78	-84	-4.5
AFP	0.0031*	0.8992	0.6289	-0.2	-0.1	-0.106
CHOL	0.324	0.9847	0.3248	-16.5	-3.6	4.2
BUN	0.0444*	0.5896	0.4293	-13.7	-13.6	-1.6
ACP	0.097	0.0004*	0.0006*	1.8	-0.7	-3.6
PT	0.0285*	0.7278	0.9627	-2.4	-2.5	-5.3
PLT	0.0008*	0.3879	0.4526	129	249	476

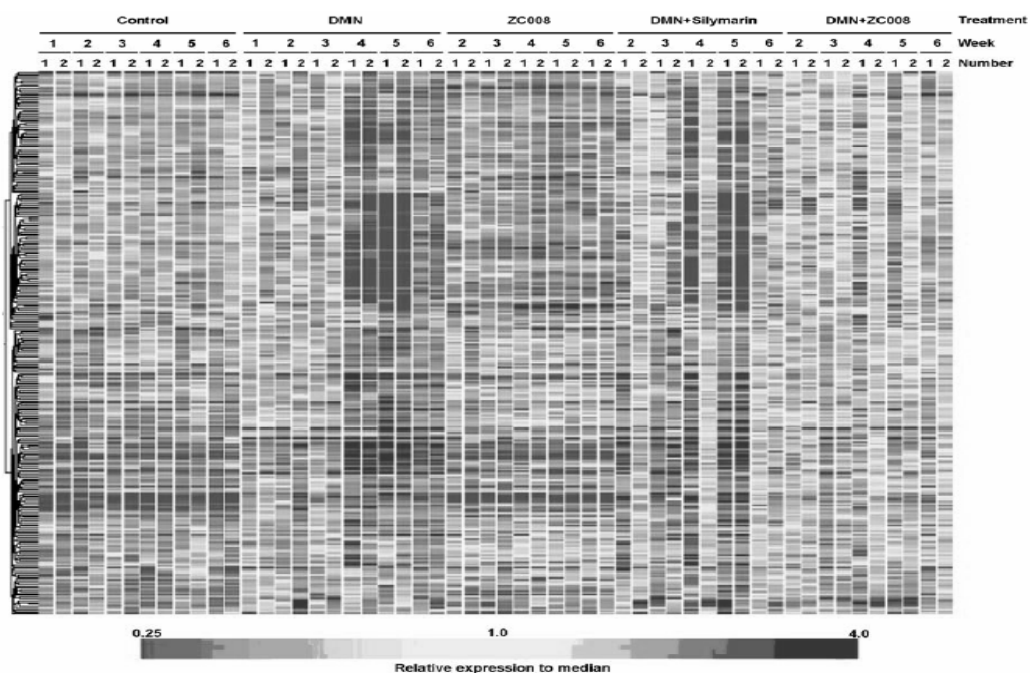
a: Correlation is significant at the 0.05 level by Two-Way ANOVA

b: DMN or DMN+ZC008 treatment groups

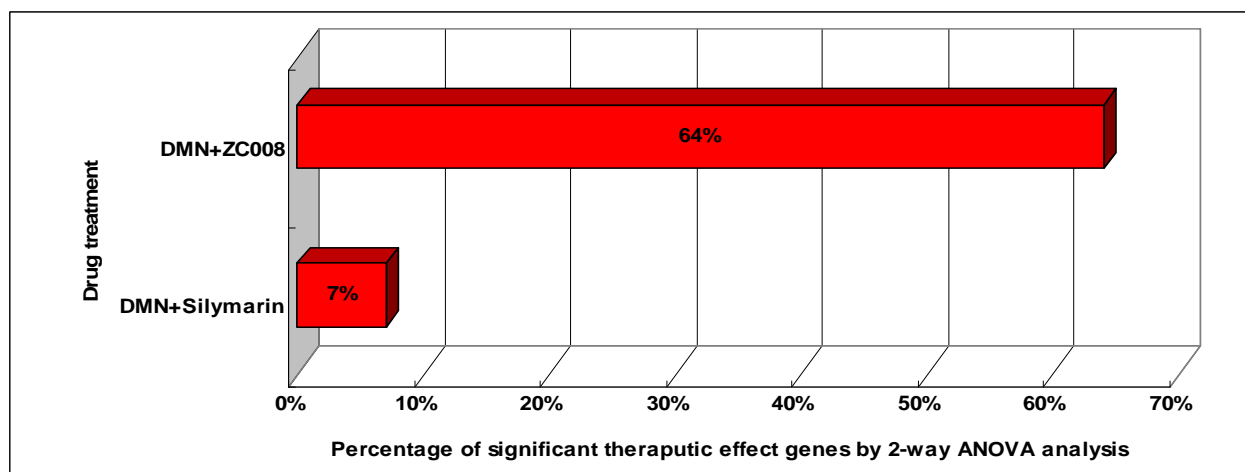
c: Average_{DMN+ZC008} - Average_{DMN} in 1st to 2nd, 3rd to 4th or 5th to 6th week



圖七、ZC008 與 Silymarin 在抗肝纖維化之動物模式中，四項測定肝功能之血液生化學結果(Albumin、GOT、GPT 與 Bilirubin)。



圖八、ZC008 與 Silymarin 在抗肝纖維化之動物模式中，基因微陣列之分析結果。



圖九、以 256 個與肝纖維化相關基因，評估 ZC008 與 Silymarin 之抗纖維化之結果。