

編號：CCMP95-RD-207(2-1)

## 應用蛋白質體學研究中藥茵陳蒿湯對保肝作用的分子調控機制(2-1)

李宗諺  
長庚大學

### 摘要

肝纖維化是許多慢性肝臟疾病的共同特徵，導因於肝臟慢性損傷合併細胞外基質蛋白的堆積。研究發現茵陳蒿湯具有的保肝特性對於不同類型的肝臟疾病存在可能的作用。

以蛋白質晶片分析，實驗結果發現在膽道結紮的大鼠血清，茵陳蒿湯可以有效地降低 MCP-1 和 TIMP-1 等物質的分泌。我們也利用蛋白質體學的方法研究膽道結紮大鼠餵食茵陳蒿湯後的蛋白質變化，用二維電泳法分析蛋白質的變化，在 pH 值 4-7 的範圍內偵測蛋白質點，再利用 MALDI-TOF 質譜分析確認出 14 個蛋白質，其中和細胞骨架相關的蛋白質如 Plectin-1 (PLTN)、Keratin 8 及 19、Dynein heavy chain, cytosolic (DYHC) 和 Tubulin alpha-6 chain 的表現都是降低的，而影響脂質代謝的蛋白質如 Low-density lipoprotein receptor-related protein 2 precursor (Glycoprotein 330) 與 Apolipoprotein A-I precursor (ApoA-I) 都呈現增加的現象。此外，Regucalcin (Senescence marker protein 30) and Inositol 1,4,5 - trisphosphate receptor type 1 (IP-3-R) 這兩個蛋白質在茵陳蒿湯給予後表現減少。

這些結果都支持我們過去發表的論文，並且對於蛋白質的表現及茵陳蒿湯的作用提供新的指標，顯示蛋白質體學對於在中草藥研究上找到新的指標是一個非常有力的工具，以促進對於慢性肝臟疾病進展的了解，同時利用此工具可以找出一些肝纖維化過程中可供評估的非侵入性指標作為臨床研究所用。

**關鍵詞【至少三項】：**肝纖維化，茵陳蒿湯，蛋白質體學

編號：CCMP95-RD-207(2-1)

# **Application of Proteomics on Hepatoprotection Effect of Chinese Herb Medicine Yin-Chen-Hao-Tang (2-1)**

Lee, Tzung-Yan  
Chang Gung University

## **ABSTRACT**

Liver fibrosis results from chronic damage to the liver in conjunction with the accumulation of ECM proteins, which is a characteristic of most type of chronic liver disease. Yin-Chen-Hao-Tang (YCHT) decoctions have been recognized as a hepatoprotective agent for various types of liver diseases.

Interesting, YCHT shown a dramatic down-regulation in the secretion of MCP-1 and TIMP-1 in bile duct ligation (BDL) rats in protein array chip. Here, we also describe a proteomics approach to study protein expression changes in BDL rats following YCHT treatment. Two-dimensional gel electrophoresis was used to analyse proteome changes. Protein spots were detected within the proteome, within the pH 4-7 range. Of these proteins, 14 were identified by means of MALDI-TOF mass spectrometry. Among the down-regulation proteins, cytoskeleton related to Plectin-1 (PLTN), Keratin8, 19, Dynein heavy chain, cytosolic (DYHC), Tubulin alpha-6 chain. Several upregulation of proteins involved in metabolism of lipids were shown as Low-density lipoprotein receptor-related protein 2 precursor (Glycoprotein 330), Apolipoprotein A-I precursor (ApoA-I). Additionally, Regucalcin (Senescence marker protein 30) and Inositol 1,4,5 - trisphosphate receptor type 1 (IP-3-R), two proteins were decrease in expression has been conducted to YCHT administration treatment.

Results from both technologies support our previous publications and provide possible new markers that correlation between protein expression

and YCHT application. These findings illustrated that proteomics is a useful approach to find markers for herb medicine intervention, which could contribute to the comprehension of the process of chronic liver diseases. In addition, the current effort to develop noninvasive markers to assess liver fibrosis is expected to facilitate the design of clinical trials.

Keywords 【至少三項】: Liver fibrosis , Yin-Chen-Hao-Tang, Proteomics

## 壹、前言

基因體科學乃起始於一個為了加速分子生物學研究為目標的計劃，更貼切的說基因體學是一種結合大量資料統計與生物資訊等學門來全面性探討生物系統的新技術。這股整體性的整合趨勢，驅使生命科學轉變為定量描述和預測的科學，已經在預測(predictive)醫學、預防(preventive)醫學與個人化(personalized)醫學領域得到應用。例如用代謝組學的生物指紋預測冠心病人的危險程度和腫瘤診斷與療程的監控；用基因多樣性圖譜預測病人對藥物的反應，包括毒副作用與療效。因此基因體學在後基因體時代研究中便具有重要的應用價值，是當前生命科學研究的方向之一。應用蛋白質體學的特性，開發傳統醫藥中的寶藏，選擇有特色的中藥作為研究方向，建立中草藥研究資料庫，為“中藥基因體計劃”和中醫現代化提供理論和技術平台，實為不刻容緩之事。不僅能造福人類的健康，同時也可以讓基因體的資訊，做為台灣未來中醫藥持續發展的基礎。

台灣的肝病防治工作歷經多年努力，年輕一代因有了疫苗注射，得以遠離 B 型肝炎的威脅。值得注意的是，92 年國人十大死因排行榜「慢性肝病及肝硬化」仍居十大死因第六位，其標準化死亡率還較去年增加 5.2%。尤其肝病對中年人健康的威脅增大，去年 45~64 歲國人每十萬人口死亡率，就以「慢性肝病及肝硬化」增加最多，佔所有中年死亡人數之 7.42%，顯示肝病防治工作仍存在很大的空間。除了加強衛教宣導，督促高危險群民眾定期追蹤檢查，以期早日發現、早期治療；積極的作為則是進行新療法之研究，才是吾人應重視的課題。各種原因引起的慢性肝炎都具有肝細胞發炎、壞死與肝纖維化的特徵，肝纖維化是慢性肝炎發展為肝硬化的中間環節。因此，阻止纖維化的行成，對肝硬化的防治有重要的意義。中醫並無纖維化一詞，根據文獻考據結合臨床證據，發現纖維組織增生的疾病，都具有中醫所描述的“瘀症”或“痞塊”的特性，因此傳統上的治則以“活血化瘀，通絡養肝”為主。然而中醫複方成份複雜，基源不一，同時建構在中醫理論體系下驗證其療效，因此不利於中藥抗纖維化多方面作用的機制探討與解釋。故中藥不論單複方的研究，唯有更進一步著手在全面性的分析，來詮釋細胞內動態的反應機制，方可較為清楚的說明中藥作用的整體層次。

肝纖維化(hepatic fibrosis)的發生機制已從病理組織學的研究，發

展到了細胞學的研究、細胞因子及其分子機轉的研究。在引起肝損傷壞死的各種因素下，纖維化的形成和發生是一個多因素相互促進、相互制約的結果，機制極為複雜。近年來，隨著肝纖維化的分子機制被闡明(3)，加上醫學分生技術的成熟，使人們對這項疾病的癒後前景有較客觀的態度，在美國著名的肝臟學專家 Friedman 博士提出發展中的肝纖維化可以逆轉(reverse)(3,4)的觀念後，世界各國的肝臟學學者便將注意力放在逆轉肝纖維化病程的機制上。下列三種主要的機制與肝纖維化的行成有較密切的關係。

### 1、細胞外基質ECM的代謝失衡

在單胺氧化酶作用下，膠原纖維共價形成穩定的不溶性膠原，參與細胞外基質形成(5,6)。研究發現，肝纖維化時間質膠原酶活性降低，而細胞外基質表現增加 (7,8)。

### 2、細胞激素(cytokine)的刺激

肝纖維化發生和形成有關的細胞激素，主要有轉化生長因子(transforming growth factor, TGF)、腫瘤壞死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白細胞介素1(interleukin-1, IL-1)和干擾素(interferon, IFN)。其中以TGF為最重要，它的主要生物學功能是調節細胞外基質的形成，尤其是促進膠原物質的形成 (7-10)。

整體而言，TGF- $\beta$ 1在肝纖維化中的作用可以概括為：1、刺激FN合成與分泌；2、降低ECM蛋白酶的活化、膠原酶的活性和FN的降解；3、提高血小板衍生生長因子(PDGF) mRNA和細胞粘附受體的表達；4、使纖維母細胞(fibroblast)發生趨化作用。

### 3、自由基(free radical)與氧化性損傷(oxidative stress)

氧化性傷害與肝疾病的關係，是近來肝疾病研究上一個受到重視的課題。例如：(1)過量的 ROS 或抑制細胞內抗氧化的系統會導致肝細胞損傷(11-12)。(2)粒腺體電子傳遞鏈中的高能電子若流失時，會導致超氧自由基(superoxide anion)的產生，也會引發肝細胞凋亡(13)。

N-acetylcystein (14,15)，Vitamins E (16,17)及 taurine (18)等，這些抗氧化劑和自由基清除者都可避免肝損傷的進行。綜合以上這些證據顯示，機體內氧化還原狀態或 ROS 的產生及 ROS 解毒(detoxification)之間的平衡，因此，調節肝內的抗氧化狀態，對於決定肝損傷的保護，是相當重要的一個環節。

中醫藥著重整體的辨症論治和扶正去邪，長久以來一直是建立再以人為基礎的實證醫學，同時一些複方中的組成藥，也隨著時間與經驗而被廣泛的使用，所以複方的研究實有其必要性。德國著名的肝臟

學專家 Schuppan 也認為草藥中的某些成分確實對防止肝纖維化有一定程度的裨益(19)。例如小柴胡湯(20-22)、茵陳蒿湯(23-27) 或單味藥如丹參(28-31)對肝纖維化的病人或實驗動物都有文獻報告給予正面的評價，說明中藥對於保肝防禦的前景(32)。

茵陳蒿湯(*Artemisiae capillaries* 茵陳; *Gardenia jasminoides* Ellis 梔子; *Rheum officinale* Baill 藥用大黃)，根據醫方集解(1)的註解主治：傷寒陽明病，但頭汗出，腹滿口渴，二便不利，溼熱發黃，脈沉實者主之。以茵陳為君，梔子為臣，大黃為佐。中華本草(2)一書上所收集的較為早期的文獻記載茵陳、梔子、大黃，三種單味藥都具有保肝與利膽的作用。加上近期的文獻表示以茵陳蒿湯加上黃芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)或是茵陳蒿的純化成分 6,7-二甲氧基香豆精(6,7-Dimethylesculetin)可以活化肝臟核受體(nuclear receptor)加速膽紅素的清除速率(33)。因此藉由西方科學方法的印證來介紹中藥方劑對保肝作用的可能療效，並做一較為全面性的機轉探討，則不啻是經驗也具實際推行的價值。

細胞體內的蛋白質體(proteome)是實際的功能分子，直接參與細胞之生長與分化，參與特定疾病的進程。所以蛋白質體學的技术可以有效率的觀察蛋白質的表現量與疾病演進的關係，並了解用藥前後特定蛋白質的表現，與蛋白質間的相互關係。基因體科學乃起始於一個為了加速分子生物學研究為目標的計劃，更貼切的說基因體學是一種結合大量資料統計與生物資訊等學門來全面性探討生物系統的新技術。這股整體性的整合趨勢，已經在預測(predictive)醫學、預防(preventive)醫學與個人化(personalized)醫學領域得到應用。例如用代謝組學的生物指紋預測冠心病人的危險程度和腫瘤診斷與療程的監控；用基因多樣性圖譜預測病人對藥物的反應，包括毒副作用與療效。由於基因體生物學具有如此的特色，在基因體學和後基因體時代研究中便具有重要的應用價值，是當前生命科學研究的方向之一。因此應用此一特性，開發傳統醫藥中的寶藏，選擇有特色的中藥作為研究方向，建立中草藥研究資料庫，為“中藥基因體計劃”和中藥現代化提供理論和技術平台，實為不刻容緩之事。不僅能造福人類的健康，同時也可以讓中草藥基因體的資訊，做為台灣未來生技產業持續發展的基礎。

藉由本計劃蛋白質體學的執行分析可以完備中草藥在肝疾病防治的整體圖譜資料，並篩選出標的蛋白質作為中草藥應用在保肝作用的臨床療效評估機制。此一實驗所建立的相關知識與實驗流程，對未

來中草藥的研究模式，除了建立一套可供保肝中藥臨床研究的基因體學工程平台外，尚可以較為清楚的勾勒中草藥保肝藥物試驗觀察的完整資訊，對肝疾病的防治實深具意義。

## 貳、材料與方法

### 一、肝纖維化大鼠模型

以外科手術對麻醉狀態的大鼠進行膽道結紮，使膽汁逆流回到肝臟，造成慢性肝臟損傷，四週後便出現肝纖維化的現象(30)。大鼠總膽管結紮，造成鼠膽管阻塞性肝纖維化，相當於人體膽汁淤積性肝硬化。膽汁淤積造模的動物分別為正常組(n=6)、膽管結紮鼠(n=10)、茵陳蒿湯餵食組(250 mg/kg, n=10)

### 二、藥材水抽物的製備與成分界定

茵陳蒿湯(*Artemisiae capillaries* 茵陳; *Gardenia jasminoides* Ellis 梔子; *Rheum officinale* Baill 藥用大黃)浸膏由台灣 GMP 中藥廠提供。製備方法依照先前的論文報告(33)，分別依 4:3:1 的組成製備以供實驗用。茵陳蒿主要成分 capillarisin, 梔子主要成分 geniposide, 大黃主要成分 emodin, 實驗所使用茵陳蒿湯複方 HPLC 圖譜如先期結果，分別有 geniposide, capillarisin, emodin 分別為梔子, 茵陳和大黃的指標成分，茵陳蒿湯高效層析圖譜如附圖一。

### 三、穀胱甘肽(Glutathione, GSH)濃度之分析

取肝組織約 0.2 克，加入 4ml 的 5% MPA(Metaphosphoric Acid)緩衝液(pH 7.0)，均質 1 分鐘，得肝臟均質液樣品。肝臟均質後，MPA 能使將樣品中還原態 GSH 充分溶出，然後，於 4°C 下以 3,000g 離心 10 分鐘，取上層液待測。準備 96 well microplate 和 standard (0.5 mM stock solution of GSH in 5% MPA)，採用 Calbiochem GSH Assay Kit，依照產品說明指示，依序加入指示混合液之後，於避光下，25°C 反應 10 分鐘，以波長 400nm 讀出測量值，藉由標準曲線來進一步計算肝組織內所含的穀胱甘肽。

### 四、脂質過氧化物分析

肝臟脂質過氧化物濃度依 Fraga 等人的分析方法(37)。稱 0.2 克肝臟組織，加入 9 倍體積均質液 (50mM 磷酸鉀緩衝溶液，pH7.4)均質，取出均質液 500  $\mu$ l，於冰浴中依序加入 0.5 ml 3% sodium dodecyl sulfate (SDS)、2 ml 0.1 N HCl、0.3 ml 10% phosphotungstic acid，混合均勻後再加入 1 ml 0.7% thiobarbituric acid 與之發生反應，置於沸水

中加熱 30 分鐘，冷卻後再加入 5 ml 1-butanol 萃取 thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)，然後以 1100g 離心 15 分鐘，取出上層液於 excitation 515 nm 及 emission 555 nm 下，利用螢光光譜儀測吸光值，所得的數值再與標準溶液 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMP) 所做出來的標準曲線比較，求出肝臟脂質過氧化物濃度，表示方法為 nmol/g liver。

### 五、反轉錄多鏈聚合酶反應(RT-PCR)

文獻報告認為茵陳蒿湯減緩肝纖維化的機轉與降低轉運生長因子(TGF-β)的表現有關。實驗動物肝組織，加入適量的 Triazol 溶液，加入 300μl chloroform 混合均勻，離心十五分鐘。取上清液置入新的離心管中同時加入等倍體積的 isopropanol 混合均勻，離心，移除上清液，加入 ethanol 離心後，於室溫下風乾。用 TE 緩衝液溶解 RNA pellet，測其吸光值。混合 1-5μg 的 total RNA、1μl 的 oligo d(T)<sub>16</sub>，及 DEPC 水共 4μl，70°C 加熱 10 分鐘，加入 15μl 緩衝溶液，在 42°C 加熱 2 分鐘，再加入 1μl MuLV Reverse transcriptase，接著 42°C 反應 15 分鐘將 RNA 反轉錄成 cDNA，最後再以 99°C 加熱 5 分鐘破壞 reverse transcriptase 活性，完成後將 cDNA 保存於-20°C。利用 cDNA 為模版，以事先設計好的引子轉化生長因子 β1(TGF-β1) 引子為 5'-TATAGCAACAATTCCTGGCG-3' (sense)、5'-TGCTGTACAGGAGCAGTG-3' (antisense)；前膠元一型蛋白 5'-TACTACCGGGCCGATGATGC-3' (sense)、5'-TCCTTGGGGTTCGGGCTGATGTA-3' (antisense)；組織抑鐵蛋白 5'-CCACAGATATCCGGTTCGCCTACA-3' (sense)、5'-GCACACCCACAGCCAGCACTAT-3' (antisense)，如我們之前的論文(28)進行反應。基因放大反應使用 GeneAmp PCR System 2400 熱循環儀，以 2% 洋菜膠並加入 0.5μg/ml ethidium bromide 於 running buffer 中進行電泳，再利用數位化影像分析系統在 UV 燈下依據染色強度與 G3PDH 5'-CCCTTCATTGACCTCAACTACATGG-3' (sense)、5'-CATGGTGGTGAAGACGCCAG-3' (antisense) 做定量比較。

### 六、二維電泳分析與質譜分析

主要的過程是經過二維凝膠電泳來分離蛋白質。接著再利用質譜儀(Mass spectrometer)來鑑別、辨識蛋白質。主要步驟有(一)、Solubilise protein from tissue，(二)、2D-gel electrophoresis，(三)、Image analysis of gel，(四)、Isolation of spots of interest，(五)、Trypsin digestion of protein，(六)、Mass spectrometry of tryptic fragments，(七)、Identification of



proteins。取肝組織在 $-20^{\circ}\text{C}$ 進行蛋白質沉澱，離心去除上清液後定量。取蛋白質和 rehydration buffer 混和，進行一維電泳 isoelectric focusing (IEF)，條件如下： $20^{\circ}\text{C}$ 進行 rehydration 12 小時，接下來 focusing 步驟分三階段，500V 進行 1 小時、1000V 進行 1 小時、8000V 進行 6 小時，接著進行 12.5% SDS-PAGE，條件為 25W/gel 進行 30 分鐘，40mA/gel 進行 6 小時，最後進行 coomassie blue stain，影像使用 Z3 High Throughput 2D-Gel analysis system V2.0(Compugen)分析，找出 up-regulated、down-regulated、constant 表現的點，在  $37^{\circ}\text{C}$  下進行 in-gel trypsin digestion 16 小時，經 ZipTip 做蛋白質萃取純化後，進一步做基質輔助雷射脫附離子化-飛行時間(MALDI-TOF) 質譜儀分析，來對肝組織特定蛋白質進行進一步的研究。以 Mass Spectrometry 的圖譜加以搜尋比對，符合者則定義為生物標誌蛋白。配合 Genomics / Protein Sequence Databank 的資料庫，利用 Bioinformatics Program 加以轉譯及計算後，儲存後得到新的資料庫。

為了減少人為實驗誤差所帶來的不一致訊息，我們在二維蛋白質電泳(2-DE)分析的實驗，每次只做兩組間的比較，就是先進行正常組與膽道結紮組(每組隨機取 3 個檢體混合)，等這兩組蛋白質分析完成後，再進行膽道結紮組與中藥餵食組(每組一樣隨機取 3 個檢體混合)的分析。上述實驗都會各別進行 2 次獨立的分析。

### 七、蛋白質細胞激素陣列分析

使用大白鼠的細胞激素蛋白質晶片(Rat cytokine array)。實驗過程均依照供應商所提供之建議步驟，過程所須的各種材料均附在配件中。血清經離心( $20^{\circ}\text{C}$ ,  $1100\times\text{g}$ , 6 分鐘)後將與 blocking buffer 以 1:1 的比例混合，直接加入已經點上不同細胞激素抗體(capture antibodies)的薄膜上(薄膜必須先在室溫下 blocking 半小時)，在室溫下進行雜交一小時，洗去殘餘的培養液，加入 biotin-接合的細胞激素抗體後，再加入 HRP-conjugated streptavidin 進行反應，接著以 ECL 呈色，最後再以 ImageMaster 2D platinum 影像分析軟體對各個點的訊號進行分析，每張薄膜上的每種細胞激素抗體之蛋白質點均為二重複。

### 八、統計分析

實驗結果以單向變異數分析(one-way analysis of variance, one-way ANOVA)來決定多組間差異。若具顯著性，則再進行 Student Newman-Keuls 之多變性分析。兩組間的差異則以學生氏(Student's)  $t$  值之統計方式分析組間差異的顯著性。實驗數據以平均值 $\pm$ 標準差(standard error of mean)表示。顯著性以  $p$  值小於 0.05 表示。

### 三、結果

#### 3-1 病理組織切片

肝臟組織中的細胞核經染色後呈現黑色；細胞質、細胞骨架 keratin 及 muscle fiber 等均染成紅色；膠原蛋白及 mucin 則染成藍色。正常組(圖一)當中的肝細胞交通板(anastomosing plates)完整，sinusoids 清晰，肝細胞呈多角體形，細胞核較大，為卵圓形，核仁明顯。膽道結紮後出現肝細胞腫脹，肝細胞結構紊亂，中央靜脈區的 sinusoid 內有大量的膠原纖維束沉積，給予茵陳蒿湯後則看到肝細胞大小接近正常，排列較整齊，且中央靜脈區僅見少量膠原纖維。

#### 3-2 膽道結紮手術及茵陳蒿湯對大鼠肝臟 TIMP-1 及 MMP-2 的影響

利用膽道結紮手術及給予茵陳蒿湯對大鼠肝臟中 TIMP-1 及 MMP-2 的影響可以從 mRNA (RT-PCR—圖二及圖三)及蛋白質(蛋白質晶片—圖四)兩個方面的表現來看。

從 RT-PCR 的結果可以知道，在正常老鼠肝臟中 TIMP-1 及 MMP-2 的 mRNA 均有微弱的表現，經過膽道結紮手術後兩者表現都明顯增強，餵食茵陳蒿湯可以有效抑制肝臟中 TIMP-1 和 MMP-2 mRNA 的表現。

由蛋白質晶片分析的結果(圖四)也顯示在 TIMP-1 蛋白質的表現和其 mRNA 的變化相符合：TIMP-1 蛋白質在正常肝臟有其基本表現，膽道結紮手術會大量增加大鼠肝臟中的 TIMP-1 蛋白質，茵陳蒿湯在蛋白質的層次也同樣達到抑制的效果，因此膽道結紮手術及茵陳蒿湯的給予不只作用在 mRNA 的層級，也同時影響了蛋白質的表現。

蛋白質晶片的分析結果還突顯出茵陳蒿湯對 MCP-1 的影響；MCP-1 這個星狀細胞及發炎反應的趨化因子在膽道結紮後 MCP-1 的表現量上升，茵陳蒿湯的給予使 MCP-1 的蛋白質減少。

#### 3-3 蛋白質體學

經過二維電泳分離後以影像分析軟體比對，比較個別兩組間蛋白質表現的差異如圖五(肝臟組織)及圖六(血漿)，圖中藍色實心點代表 reference 沒有的點，藍色空心點表示 reference 與 comparison 相符合的點，綠色點則為蛋白質表現增加 2 倍的點，蛋白質表現降低 2 倍的點以黃色點表示。

利用 MALDI-TOF 及 Tandem MS 質譜儀針對表現量有增加或減少的蛋白質進行鑑定；在肝組織中鑑定出十一個蛋白質如表二，在血漿中則鑑定出六個蛋白質如表三。

### 3-4-1 膽道結紮及茵陳蒿湯對肝臟蛋白質表現的影響

在肝臟組織中，膽道結紮手術後表現降低的蛋白質是 Regucalcin (Senescence marker protein 30)、Formimidoyltransferase-cyclodeaminase (FTCD) (放大圖如圖八)、protein piccolo 和 plectin-1 (PLTN) (放大圖如圖九)，給予茵陳蒿湯治療後使 FTCD、piccolo 及 plectin-1 蛋白質表現恢復，但是 regucalcin 的表現在餵食茵陳蒿湯後並沒有增加。

膽道結紮手術會使一些蛋白質在肝臟中表現增加，包括 keratin 8 (K8)、keratin 19 (K19) (放大圖如圖十)、low-density lipoprotein receptor-related protein 2 precursor (Glycoprotein 330, gp330)(放大圖如圖十一)、synaptonemal complex protein 1 (SCP-1) (放大圖如圖十二)、breast cancer type 2 susceptibility protein homolog (BRCA) (放大圖如圖八)、tubulin alpha-6 chain (放大圖如圖十三)和 cytosolic dynein heavy chain (DYHC) (放大圖如圖九)；其中 K8、K19、gp330、SCP-1、BRCA 和 tubulin alpha-6 chain 均在給予茵陳蒿湯後受到抑制，DYHC 則沒有受到茵陳蒿湯的影響。

### 3-4-2 膽道結紮及茵陳蒿湯對血漿蛋白質表現的影響

血漿的蛋白質體學實驗結果顯示，low-density lipoprotein receptor-related protein 2 precursor (Glycoprotein 330, gp330)、plectin-1 (PLTN) (放大圖如圖十五)、apolipoprotein A-I precursor (apoA-I) (放大圖如圖十六)、haptoglobin precursor(放大圖如圖十七)，在膽道結紮後表現較正常減少，茵陳蒿湯可以恢復這些蛋白質在血漿中的表現。相反的，inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 (IP-3-R)和 spectrin beta chain, brain 2 (SPNB-3) (放大圖如圖十八)，在正常大鼠血漿中幾乎沒有表現，在膽道結紮後有增加的現象，給予茵陳蒿湯後這兩個蛋白質的表現更加強烈。

## 四、討論與結論

### 4-1 膽道結紮手術及茵陳蒿湯對大鼠肝臟 TIMP-1 及 MMP-2 的影響

在本實驗中，膽道結紮手術引起的肝纖維化會伴隨肝臟組織中 TIMP-1 的 mRNA 及蛋白質表現增加，肝臟中 MMP-2 的 mRNA 表現也增加，說明肝纖維化和肝臟中 TIMP-1、MMP-2 的變化有關，肝纖維化的進展會使 TIMP-1、MMP-2 增加的論點(34)在本研究利用膽道結紮手術的動物模型得到印證；Knittel 等人利用四氯化碳引起肝臟損傷也同樣看到 TIMP-1 和 MMP-2 兩者 mRNA 及蛋白質表現的明顯增加(35)，他們同時證實 MMP-2 的活性會加強。

本實驗室過去的研究也發現在膽道結紮後大鼠肝臟中 TGF- $\beta$  1 mRNA 表現明顯上升(36)，正符合 Knittel 等人的研究結果：活化的星狀細胞會受 TGF- $\beta$ 1 的刺激而更增加 TIMP-1 mRNA 的表現(37)。茵陳蒿湯可能是透過減少 TGF- $\beta$ 1 (36)以達到抑制 TIMP-1 增加的作用。茵陳蒿湯中的大黃其代表成份 emodin 也已被證實可以抑制星狀細胞中由 TGF- $\beta$ 1 誘發的 TIMP-1 表現(38)。TIMP-1 的減少也可代表已活化的星狀細胞因細胞凋亡而減少(39,40)，因此在本研究中茵陳蒿湯有可能透過誘發活化的星狀細胞往凋亡的方向進展(41)而使 TIMP-1 下降，達到抑制肝纖維化的作用。

星狀細胞被活化後會使 MMP-2 的產生增加，MMP-2 會分解正常的細胞外基質使其被 fibrillar collagen 所取代(42)，且可活化星狀細胞上的 discoidin domain tyrosine kinase receptor 2 (DDR2 受體)而促進星狀細胞增生(43)。本研究中膽道結紮後星狀細胞活化使 MMP-2 產生增加，茵陳蒿湯因為抑制星狀細胞的活化及促進星狀細胞死亡而降低 MMP-2 的表現，這也使正常細胞外基質的破壞得到緩解。

### 4-2 膽道結紮及茵陳蒿湯對大鼠肝臟 MCP-1 表現的影響

Monocyte chemotactic peptide-1 (MCP-1) 是屬於  $\beta$  (C-C) chemokine 家族的成員，許多細胞遭受內毒素(lipopolysaccharide)或細胞激素如腫瘤壞死因子(TNF- $\alpha$ )、介白素-1 (IL-1)等的刺激時會分泌 MCP-1，MCP-1 的作用是活化及趨化單核球、巨噬細胞和 T 淋巴球(44)，造成巨噬細胞對組織的浸潤而產生發炎反應(45)，所引起的相關疾病包括粥狀動脈硬化(46)、肺部發炎及纖維化(47,48)及風濕性關節炎(49)等。

在正常肝臟中，膽道上皮細胞會分泌少量的 MCP-1 至膽汁中，所

以對正常肝臟並不會造成發炎浸潤，這說明了本研究中正常老鼠肝臟中 MCP-1 蛋白質為何有表現的緣故；動物模型及人體試驗證明當肝臟受到損傷時，細胞激素(如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$ 、TGF- $\beta$ )(50,51)、蛋白酶(如 thrombin)和氧化壓力(52,53)等都可以刺激活化的星狀細胞大量產生 MCP-1(50,52,54)；在四氯化碳造成慢性肝損傷的動物其肝臟中 MCP-1 mRNA 的表現增加(53)，慢性 C 型肝炎合併肝硬化的病人的肝臟 MCP-1 mRNA 表現亦有增加的現象(55)，膽道閉鎖的病人若出現肝功能異常者，血清中的 MCP-1 比肝功能正常者明顯高出許多，且合併肝門靜脈高壓的病人的 MCP-1 又明顯比沒有門靜脈高壓者高，這些結果說明 MCP-1 在肝纖維化的進展上扮演重要角色(56)；本研究結果顯示在膽道結紮大鼠肝臟中 MCP-1 表現比正常組多，在之前的實驗也發現膽道結紮大鼠血漿中 TNF- $\alpha$  明顯上升(57)，肝臟中重要的抗氧化因子 glutathione 比正常老鼠少(57)，脂質過氧化的產物 MDA 則較正常高(57)，正合理解釋細胞激素及氧化壓力誘發 MCP-1 產生的機轉；而茵陳蒿湯透過減少 TNF- $\alpha$  (36)，增加 glutathione (57)及降低氧化壓力(36)而使 MCP-1 恢復正常表現，也因為減少 MCP-1 的表現而達到抑制肝纖維化的作用。

MCP-1 會使單核球及淋巴球向受損的肝臟組織聚集(58)。研究顯示在罹患慢性肝臟疾病患者的肝臟組織中，會增加肝細胞及單核球 MCP-1 的表現(59)，白血球釋放出來的細胞激素會加速肝纖維化的進展(60,61,62)，本研究看到膽道結紮及茵陳蒿湯對於 MCP-1 的影響，是否因此影響後續發炎反應，還有茵陳蒿湯對於巨噬細胞、Kupffer cell、T 淋巴球等的作用及機轉尚待後續研究的進行。

#### 4-3 膽道結紮及茵陳蒿湯對 keratin 的影響

Keratin 是 intermediate filament (IF) protein (構成細胞骨架的組成之一)，主要存在上皮細胞和上皮附屬器官(epidermal appendages)中(63)；主要的 keratin 有二十種(keratin 1-20, K1-20)，其中 keratin 9-20 屬於第一型，keratin 1-8 屬於第二型，不同的細胞擁有其特定的 keratin。

肝臟中的肝細胞、cholangiocyte、Kupffer cells、星狀細胞、內皮細胞等都分別有其特定的 IF 蛋白質。因為肝細胞及膽道上皮細胞占了肝臟中最大比例，所以和 IF 相關的肝臟疾病主要和這兩種細胞所含有的 keratins 變化較有關聯。成熟肝細胞含有 keratin 8 和 18 (63)，兩者以 1:1 的比例結合後在肝細胞的細胞質中形成 filamentous network (64)；cholangiocyte 所表現的 keratin 則比較複雜，除了 K8 及 K18 之外還包括的 K7 和 K19 (65)，正在發育而尚未成熟的膽小管上皮細胞

則會表現出 K7 和 K19。

越來越多的證據顯示，keratin 除了扮演細胞結構蛋白質的角色，還可以和細胞中的其他蛋白質結合而影響胞內訊號傳遞及細胞凋亡(63,64,66)。Keratin 可以透過調控細胞訊息傳遞，調節肝細胞對細胞凋亡的耐受程度(63,67)。從 K8- null 小鼠的肝臟可以得到印證，這些小鼠的肝臟較易受到損傷並發生較嚴重的細胞凋亡(68,69)，因為 Fas 結合到肝細胞膜增加的緣故，以致肝細胞對於 Fas 所引發的細胞凋亡的敏感度較正常老鼠高三到四倍(70)。Keratin 還可以調控腫瘤壞死因子的訊號，keratin 8/18 會和腫瘤壞死因子第二型受體(tumor necrosis factor receptor 2, TNFR2)結合而刺激由 TNF- $\alpha$  所活化的 Jun NH2-terminal kinase (JNK)及 NF- $\kappa$ B (68)，而啟動抗細胞凋亡的機制；這個訊息傳遞路徑在非酒精性及酒精性脂肪肝都扮演重要角色(71)。

Keratin 也是 caspase 的結合目標，caspase 會使 keratin 分解導致 keratin IF network 的破壞並形成小圓球形的細胞質包涵體（裡面包含被分解及過度磷酸化的 keratin 及活化的 caspase）(72)。K18 和 K19 在細胞凋亡發生時都是 caspase 的受質(73,74)；在發生細胞凋亡的肝細胞中，caspase 3 會將 K18 分解產生 neo-epitope of K18，可以利用特殊的 M30 抗體偵測出來當作細胞凋亡的 marker (75)。

Keratin 另外一個減少組織傷害的機轉是透過影響氧化壓力及蛋白質的折疊，蛋白質要執行正常功能必需要經過折疊產生特定的結構，細胞質內的蛋白質經過折疊後疏水性端的氨基酸會位在蛋白質的中央(76,77)，當遭受到氧化壓力時因為自由基的作用，使這些氨基酸產生變化而使蛋白質結構改變，疏水性端的氨基酸於是暴露出來，蛋白質因此失去功能，並且容易聚集在一起(78)。某些細胞內的蛋白質可以影響新合成蛋白質的折疊或是對折疊錯誤蛋白質的重新折疊及分解。這些蛋白質可以和折疊錯誤的蛋白質結合並且促進重新折疊(例如 heat shock protein 70, HSP70)，預防凝集(例如 HSP25/27,  $\alpha$ B-crystallin)，透過 proteasome (ubiquitin)促進蛋白質的分解，或是 associate with ubiquitinated misfolded proteins as aggregates (p62)(77,78,79)。

許多肝臟疾病包括酒精性脂肪肝、非酒精性脂肪肝、藥物肝毒性、Wilson disease、primary biliary cirrhosis 等都會形成 Mallory bodies (MBs) (80)，MBs 主要含有 keratins、ubiquitinated keratin、the stress-induced and ubiquitin binding protein p62、Hsp70 及 25(66,81)，當 K8 過度表現時會促進 Mallory body 的形成(82)。

當 K8/K18 發生突變時，會導致肝硬化及肝臟疾病惡化的風險提高(83,84)。根據在德國的一項大型 patient cohort 研究顯示，慢性 C 型肝炎的病人進展到肝硬化和 exonic K8 變異有明顯相關性(83)；機轉可能是因為 K8 突變會導致肝臟較容易發生細胞凋亡 (85)。

在膽汁淤積性肝臟疾病，機械性及毒性損傷會影響所有的細胞骨架系統，包括微小管(microtubules)、微絲體(microfilaments)及 keratin IF。Primary biliary cirrhosis (PBC) 會使 keratin 的性質改變，在肝硬化結節周圍會出現具有 clear cytoplasm (cholatestasis)的肝細胞，這些肝細胞的細胞膜上膽酸的傳送器 NTCP 會減少，而 MRP3 會增加，細胞質內的 keratin IF network 會減少或甚至喪失(86)。在膽道結紮小鼠的動物實驗證實 keratin 是膽酸毒性作用的標靶，在膽道結紮後膽道上皮細胞及肝細胞中的 keratin 會增加(87)。在膽汁淤積性肝病及酒精性脂肪肝，肝細胞還會表現出膽道上皮細胞型態的 keratins (K7 及 K19)；有些肝細胞癌也會表現出 K19，通常和肝內轉移及較差的預後相關(88)。

在本實驗中，蛋白質體學結果顯示 keratin 8 在正常大鼠肝臟中有微弱的表現，經過膽道結紮手術後肝臟中的 K8 明顯增加，這樣的結果和 Ficket 等人的研究結果相同(87)，也符合之前臨床的觀察，在慢性肝臟疾病過程中 K8 會增加且可能和過度磷酸化有關係(69,89)，K8 增加會促進 Mallory body 的形成(90)。而茵陳蒿湯對 K8 的增加有抑制的作用，是否也會影響到 K8 的磷酸化就須要進一步用特定的抗體去偵測。要研究 K8/18 的磷酸化可以利用 mouse monoclonal 及 rabbit polyclonal site specific anti-phospho/non-phospho K8/18 antibodies (91)

Keratin 19 的表現也看到相同的趨勢，推測其原因是膽道結紮手術後，膽道阻塞造成的膽道上皮增生使 K19 表現增加(92)，茵陳蒿湯抑制膽道上皮的過度增生，所以可以抑制 K19 的過度表現。

#### 4-4 膽道結紮及茵陳蒿湯對 plectin-1 表現的影響

Plectin-1 是約 500kDa 的大分子蛋白質，在二十年前被分離出來，佔了細胞蛋白質的 1%(93)。Plectin-1 是許多細胞內的細胞骨架連結蛋白，負責細胞骨架之間的連接，包括 hemidesmosomes (94,95)及膽小管(96)等都含有 plectin-1，自體隱性遺傳性皮膚疾病 epidermolysis bullosa simplex 合併肌肉萎縮 (EBS-MD)的病人就是因為缺乏 plectin 的基因而導致嚴重的皮膚水泡、晚期肌肉萎縮及神經病變(97,98,99)。但後續的研究逐漸了解到 plectin-1 並不只單純扮演維持細胞結構的角色，它同時還可以調節 actin 的動態變化以及影響細胞訊息的傳遞

(100,101)。

Plectin-1 和其他細胞骨架蛋白質的結合主要是由蛋白質的磷酸化所調節(102)，當細胞分裂時 plectin-1 在 Thr<sup>4542</sup> 的位置會被 cyclin-dependent protein kinase CDK-1/Cdc2 磷酸化而使其可以和 vimentin 分離(103,104)。其他 protein kinases 也可以使 plectin-1 磷酸化，當細胞處在 interphase 時被 PKC 磷酸化會使 plectin-1 和 vimentin 分離，PKA 則可以使 plectin-1 和 vimentin 結合(105)。對於大鼠的肝細胞，毒素所引發的細胞凋亡是由於 keratin 過度磷酸化及 plectin-1 變化導致細胞骨架解體(106,107,108)。因為 Plectin-1 對分解蛋白質的 calpain 及 caspase 很敏感，所以在死亡受體如 Fas 或腫瘤壞死因子受體所引發的細胞凋亡早期就會被分解(109,110)，細胞凋亡時活化的 caspase 8 轉位到 plectin-1 上導致 plectin-1 被分解而影響細胞骨架的完整性(100,110)。

根據本次蛋白質體學研究的結果發現 plectin-1 在肝臟組織及血漿中均有變化，在膽道結紮後肝臟及血漿中的 plectin-1 都比正常少，推測是因為膽汁淤積造成肝細胞凋亡(57)，活化的 caspases 將細胞中的 plectin-1 分解，導致 plectin-1 的減少；茵陳蒿湯可以抑制 caspases 的活性(57)，所以使 plectin-1 的含量恢復；另一個重點是 plectin-1 的變化不只出現在肝臟組織中，相同的結果也出現在血漿中，所以 plectin-1 在血漿中的變化也許可以當作一個檢測肝纖維化進展及恢復的血液標誌。

#### 4-5 膽道結紮手術及茵陳蒿湯對 ApoA-I 的影響

過去研究證實血漿中高密度脂蛋白膽固醇 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-c) 及 apolipoprotein A-I (apoA-I) 的濃度和罹患粥狀動脈硬化性心血管疾病的風險成反比(111)；ApoA-I 占了 HDL 所含的 apolipoprotein 的 70% 左右，所以血漿中 apoA-I 的濃度就相當於 HDL 的濃度(112)，apoA-I 會啟動 "reverse cholesterol transport"，將周邊組織過多的膽固醇利用 HDL 送至肝臟，同時 apoA-I 還有抑制發炎及抗氧化的作用(113,114)，但是 Corsetti 等人也提出氧化壓力或其它因素可能會使具有抗粥狀動脈硬化作用的 apoA-I 轉變成促粥狀動脈硬化的作用(115)，可見所有的 HDL subparticles 並不都有同樣的生理角色(116)；ApoA-I 是以 lipid-poor apoA-I 的型式由肝臟及小腸所分泌，未成熟的 apoA-I/HDL 須要額外的磷脂質及膽固醇才能形成成熟態。

根據人體試驗結果，在不同種族間影響血中 HDL-c 及 apoA-I 濃



度的最重要因素是 apoA-I 的清除而非製造速度(117,118,119)，但對於同一族群而言，apoA-I 的製造速度就顯得重要。高三酸甘油血症合併低 HDL-c 的病人其 apoA-I 的清除率明顯上升(120,121)。Lipid-poor apoA-I 在腎絲球過濾後經由腎小管上的 cubilin/megalin 系統排除(122,123,124)也是造成 apoA-I 減少的原因。

本實驗利用蛋白質體學方法分析大鼠血漿蛋白質變化發現，原本在正常大鼠血漿中有較多的 apoA-I 前趨物，在經過膽道結紮手術四週後 apoA-I 前趨物明顯減少，茵陳蒿湯餵食組的 apoA-I 前趨物有恢復的現象，推論因膽道結紮後肝臟受損嚴重導致製造 apoA-I 前趨物的功能降低，因此血漿中的含量較少，茵陳蒿湯因為改善肝臟功能而使肝臟製造蛋白質能力恢復；膽道結紮後血中 apoA-I 減少可能因此影響膽固醇的代謝，增加了罹患心血管疾病及代謝綜合症的風險，茵陳蒿湯透過增加 apoA-I 的產生有可能影響脂質代謝路徑。

同樣的結果也出現在不同的動物模型中，Yokoyama 等人利用骨髓細胞移植的方式改善四氯化碳引起的小鼠肝纖維化，由蛋白質體學及西方墨點法均證實肝臟及血中的 apoA-I 在骨髓移植後表現增加，說明脂質代謝在肝臟組織再生可能扮演重要角色(125)。

#### 4-6 膽道結紮及茵陳蒿湯對 regucalcin 的影響

Regucalcin 又名 Senescence marker protein-30 (SMP30)(126)，分子量是 30kDa。這個蛋白質主要存在大鼠的肝臟及腎臟中(127)，而且主要分布在肝細胞的細胞質及近端腎小管上皮細胞的細胞質及刷狀緣；在小鼠則只存在肝臟中(128)；在人體組織中分布較廣，但是以肝臟中表現特別強(129)。根據氨基酸序列的分析顯示，大鼠的 regucalcin 和人類的相似度達 88.9%，和小鼠的相似度更高達 94.3%(128,129)。

Regucalcin 的基因是位在 X 染色體的 p11.3-q11.2 上，可能和性聯遺傳疾病有相關性(129)。在大鼠肝臟中從胚胎第十八天就可以偵測到 regucalcin mRNA，出生後第七天肝臟中的 regucalcin 蛋白質開始增加直到第十天達到高峰，持續維持 3-6.5 個月才開始下降(130)。過去的研究利用二維電泳發現 regucalcin 會隨年齡增加而減少。但是這個蛋白質的表現並不因性別而有所差異，因此和性腺激素沒有相關性。

Regucalcin 的功能之一是和細胞內鈣離子濃度的調控有關；鈣離子是維持細胞功能的重要因子，但是當細胞質內的鈣離子濃度過高時反而會導致細胞死亡，所以在正常生理情況下會透過鈣離子幫浦將多餘的鈣離子傳送到細胞外或特殊的胞器如內質網及微小體(microsome)中，根據 Fujita 等人的研究發現 regucalcin 會影響鈣離子幫浦的功能

(131), regucalcin 可以活化鈣離子幫浦酵素( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase)而活化肝臟微小體及粒線體上鈣離子傳送器, 促進這些胞器吸收鈣離子(132,133,134)。亦可刺激大鼠肝臟微小體上的 inositol 1,4,5-trisphosphate(IP3)受體而使微小體釋出鈣離子(135)。

Regucalcin 另一個作用是抑制肝細胞中受鈣離子調控的 protein kinases (包括  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase、protein kinase C、及 tyrosine kinase)(136)、protein phosphatases (137,138)及一氧化氮合成酶(139,140)。Regucalcin 可以作用在蛋白質分解酶活化位置的 SH groups(141,142,143)。

當肝臟再生時, regucalcin 會從肝細胞質進入細胞核(144,145)使核中的含量增加(146), 透過抑制細胞核中 DNA 合成酶及 RNA 合成酶以達到抑制肝細胞增生和肝癌細胞增生的作用(146,147,148), 表示 regucalcin 在維持細胞恆定上有其重要影響(149)。

動物實驗證實缺乏 regucalcin 的小鼠其肝細胞對腫瘤壞死因子或 Fas 的敏感度較正常高, 較易發生細胞凋亡, 說明 regucalcin 在肝臟中可以預防肝細胞凋亡(150), 可能是透過 Regucalcin 對鈣離子調控的作用, 因為腫瘤壞死因子和細胞膜上的受體結合會使細胞中的鈣離子濃度增加, regucalcin 可以透過降低細胞質中的鈣離子而抑制細胞凋亡(151), 過去針對初代培養肝細胞進行蛋白質體學的研究也發現, 腫瘤壞死因子的刺激會誘發細胞中 regucalcin 的表現(152)以減少細胞凋亡; 此外, regucalcin 可以抑制肝細胞核中鈣離子所引發的 DNA 斷裂(132), 因為 regucalcin 可以抑制肝細胞核上的鈣離子-ATPase 的活性, 且可以抑制 calmodulin 對此酵素的活化(145)。因此當肝臟及腎臟中的 regucalcin 蛋白質隨年紀增加而減少時, 可能會使組織較易受到傷害而影響到肝腎功能(131)。除了年齡的因素, 高血壓(hypertensive state)及慢性肝臟損傷也會使肝臟及腎臟的 regucalcin 基因表現降低(153)。因為肝臟損傷時, 肝細胞中的 regucalcin 會被釋放至血液中(154,155), 因此 regucalcin 可以當作慢性肝病的一個檢測標誌(156)。

在抗氧化作用上, regucalcin 可以增加大鼠肝細胞中 superoxide dismutase (SOD)的活性(157)以提高肝細胞的抗氧化能力。

從本實驗的結果得知 regucalcin 在正常大鼠肝臟中有一定的表現, 經過膽道結紮手術一個月後其蛋白質量明顯下降, 這樣的變化不只出現在膽道結紮大鼠, 過去利用 thioacetamide (TAA)、四氯化碳或 galatosamine 誘發大鼠肝纖維化的研究均證實肝臟組織中的 regucalcin 會減少(154,155)。因為 regucalcin 存在肝細胞質中, 肝纖維化的過程

中肝細胞大量死亡而被細胞外基質取代，所以存在肝組織中的 regucalcin 含量減少。茵陳蒿湯的餵食雖然明顯抑制肝細胞凋亡(57)，卻無法恢復肝臟中的 regucalcin 蛋白質含量，說明 regucalcin 減少最重要的因素不是肝細胞大量死亡，可能是細胞內含量的大量降低所引起。

## 伍、結論與建議

本實驗的結果也說明，在肝纖維化這樣一個複雜的疾病發展過程中，影響的因子非常多，並非利用單一藥物或甚至單一方劑就可以逆轉所有的變化，這也是目前西方醫學雖然不斷研究新的治療方法卻仍不甚令人滿意的可能原因，中醫在治療肝纖維化的過程中是根據病人不同的表現及病程轉變來辨證論治，而不會局限在單一處方，此蛋白質體學的結果正好說明了這方面的重要性(如彩色附錄圖三)。

## 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:CCMP95-RD-207)提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 伍、參考文獻

1. 汪昂(原著) 醫方集解 志遠書局
2. 中華本草 1998, 國家中醫藥管理局編委會, 上海科學技術出版社
3. Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol* 2003; 38 :S38-53.
4. Bonis PA, Friedman SL, Kaplan MM. Is liver fibrosis reversible? *N Engl J Med* 2001; 344:452-4.
5. Ito K, Nakagawa J, Minakuchi C, Fukase M. A clinical evaluation of serum monoamine oxidase, with special reference to hepatic fibrosis. *Digestion* 1971; 4:49-58.
6. Siegel RC, Page RC, Martin GR. The relative activity of connective tissue lysyl oxidase and plasma amine oxidase on collagen and elastin substrates. *BBA-Mol Basis Dis* 1970; 222:552-555.
7. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275: 2247-2250.
8. Friedman SL, Maher JJ, Bissell DM. Mechanisms and therapy of hepatic fibrosis: report of the AASLD Single Topic Basic Research Conference. *Hepatology* 2000; 32:1403-1408.
9. Friedman SL. Cytokines and fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 1999; 19:129-1401.
10. Bonis PA, Friedman SL, Kaplan MM. Is liver fibrosis reversible? *New Engl J Med* 2001; 344:452-454.
11. Yau MH, Che CT, Liang SM, Kong YC, Fong WP. An aqueous extract of *Rubus chingii* fruits protects primary rat hepatocytes against tert-butyl hydroperoxide induced oxidative stress. *Life Sci* 2002; 72:329-338.
12. Taniguchi K, Umeshita K, Sakon M, Miyoshi H, Tokunaga M, Ariyoshi H, Yamano T, Kaneda Y, Monden M. Suppression of oxidative stress-induced hepatocyte injury by calpain antisense. *J Surg Res* 2003; 111:23-27.
13. Sumbayev VV, Sandau KB, Brune B. Mesangial cells but not hepatocytes are protected against NO/O<sub>2</sub>(-) cogeneration: mechanistic considerations. *Eur J Pharmacol* 2002; 444:1-11.

14. Akbay A, Cinar K, Uzunalimoglu O, Eranil S, Yurdaydin C, Bozkaya H, Bozdayi M. Serum cytotoxin and oxidant stress markers in N-acetylcysteine treated thioacetamide hepatotoxicity of rats. *Hum Exp Toxicol* 1999; 18:669-676.
15. Lewerenz V, Hanelt S, Nastevska C, El-Bahay C, Rohrdanz E, Kahl R. Antioxidants protect primary rat hepatocyte cultures against acetaminophen-induced DNA strand breaks but not against acetaminophen-induced cytotoxicity. *Toxicology* 2003; 19:179-187.
16. Naziroglu M, Cay M, Ustundag B, Aksakal M, Yekeler H. Protective effects of vitamin E on carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. *Cell Biochem Funct* 1999; 17:253-259
17. Souza MF, Tome AR, Rao VS. Inhibition by the bioflavonoid ternatin of aflatoxin B1-induced lipid peroxidation in rat liver. *J Pharm Pharmacol* 1999; 51:125-129
18. Waters E, Wang JH, Redmond HP, Wu QD, Kay E, Bouchier-Hayes D. Role of taurine in preventing acetaminophen-induced hepatic injury in the rat. *Am J Physiol* 2001; 280: G1274-1279
19. Stickel F, Brinkhaus B, Krahmer N, Seitz HK, Hahn EG, Schuppan D. Antifibrotic properties of botanicals in chronic liver disease. *Hepato-Gastroenterol* 2002; 49:1102-8.
20. Taira Z, Yabe K, Hamaguchi Y, Hirayama K, Kishimoto M, Ishida S, Ueda Y. Effects of Sho-saiko-to extract and its components, Baicalin, baicalein, glycyrrhizin and glycyrrhetic acid, on pharmacokinetic behavior of salicylamide in carbon tetrachloride intoxicated rats. *Food Chem Toxicol* 2004; 42:803-7.
21. Kusunose M, Qiu B, Cui T, Hamada A, Yoshioka S, Ono M, Miyamura M, Kyotani S, Nishioka Y. Effect of Sho-saiko-to extract on hepatic inflammation and fibrosis in dimethylnitrosamine induced liver injury rats. *Biol Pharm Bull* 2002;25:1417-21.
22. Shimizu I. Sho-saiko-to: Japanese herbal medicine for protection against hepatic fibrosis and carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: D84-90.
23. Sakaida I, Tsuchiya M, Kawaguchi K, Kimura T, Terai S, Okita K. Herbal medicine Inchin-ko-to (TJ-135) prevents liver fibrosis and enzyme-altered lesions in rat liver cirrhosis induced by a

- choline-deficient L-amino acid-defined diet. *J Hepatol* 2003; 38:762-9.
24. Imanishi Y, Maeda N, Otagawa K, Seki S, Matsui H, Kawada N, Arakawa T. Herb medicine Inchin-ko-to (TJ-135) regulates PDGF-BB-dependent signaling pathways of hepatic stellate cells in primary culture and attenuates development of liver fibrosis induced by thioacetamide administration in rats. *J Hepatol* 2004; 41:242-50
  25. Shoda J, Miura T, Utsunomiya H, Oda K, Yamamoto M, Kano M, Ikegami T, Tanaka N, Akita H, Ito K, Suzuki H, Sugiyama Y. Genipin enhances Mrp2 (Abcc2)-mediated bile formation and organic anion transport in rat liver. *Hepatology* 2004; 39:167-78.
  26. Yamamoto M, Miura N, Ohtake N, Amagaya S, Ishige A, Sasaki H, Komatsu Y, Fukuda K, Ito T, Terasawa K. Genipin, a metabolite derived from the herbal medicine Inchin-ko-to, and suppression of Fas-induced lethal liver apoptosis in mice. *Gastroenterology* 2000;118:380-9.
  27. Yamamoto M, Ogawa K, Morita M, Fukuda K, Komatsu Y. The herbal medicine Inchin-ko-to inhibits liver cell apoptosis induced by transforming growth factor beta 1. *Hepatology* 1996; 23:552-9.
  28. Lee TY, Wang GJ, Chiu JH, Lin HC. Long-term administration of *Salvia miltiorrhiza* ameliorates carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats. *J Pharm Pharmacol* 2003; 55:1561-8.
  29. Lee TY, Mai LM, Wang GJ, Chiu JH, Lin YL, Lin HC. Protective mechanism of *salvia miltiorrhiza* on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats. *J Pharmacol Sci* 2003; 91:202-10.
  30. Huang YT, Lee TY, Lin HC, Chou TY, Yang YY, Hong CY. Hemodynamic effects of *Salvia miltiorrhiza* on cirrhotic rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2001; 79:566-72.
  31. Liu P, Hu YY, Liu C, Zhu DY, Xue HM, Xu ZQ, Xu LM, Liu CH, Gu HT, Zhang ZQ. Clinical observation of salvianolic acid B in treatment of liver fibrosis in chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2002; 8:679-85.
  32. Du B, You S. Present situation in preventing and treating liver fibrosis with TCM drugs. *J Trad Chin Med* 2001; 21:147-52.
  33. Huang W, Zhang J, Moore DD. A traditional herbal medicine enhances bilirubin clearance by activating the nuclear receptor CAR. *J. Clin.*

- Invest 2004; 113: 137 – 143.
34. Roeb E. et al. TIMP expression in toxic and cholestatic liver injury in rat. *J Hepatol* 1997; 27: 535-544
  35. Knittel T. et al. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat. *Histochem Cell Biol* 2000; 113: 443-453.
  36. Lee TY. et al. Herb medicine Yin-Chen-Hao-Tang ameliorates hepatic fibrosis in bile duct ligation rats. *J Ethnopharmacol* 2007; 109: 318-324.
  37. Knittel T. et al. Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: regulation by TNF-alpha and TGF-beta 1. *J Hepatol* 1999; 30: 48-60.
  38. Min G. et al. Inhibitory effect of emodin on tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) expression in rat hepatic stellate cells. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 200-207.
  39. Iredale JP. et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis : hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1998; 102: 538-549.
  40. Murphy FR. et al. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem* 2002; 277: 11069-11076.
  41. Ikeda H. et al. The herbal medicine inchin-ko-to (TJ-135) induces apoptosis in cultured rat hepatic stellate cells. *Life Sci* 2006; 78: 2226-2233.
  42. Arthur MJP. et al. Secretion of 72kDa type IV collagenase/gelatinase by cultured human lipocytes. Analysis of gene expression, protein synthesis and proteinase activity. *Biochem J* 1992; 287: 701-707.
  43. Olaso E. et al. DDR2 receptor promotes MMP-2-mediated proliferation and invasion by hepatic stellate cells. *J Clin Invest* 2001; 108: 1369-1378.
  44. Taub DD. et al. Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1), -2, and -3 are chemotactic for human T lymphocyte. *J Clin Invest* 1995; 95: 1370-1376.
  45. Leonard EJ. et al. Human monocyte chemoattractant protein-1

- (MCP-1). *Immunol Today* 1990 ; 11 : 97-101.
46. Yia-Herttuala S. et al. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5252-5256.
  47. Antoniades HN. et al. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 mRNA in human idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 5371-5375.
  48. Paine P III. et al. MCP-1 expression by rat type II alveolar epithelial cells in primary culture. *J Immunol* 1993; 150: 4561-4570.
  49. Koch AE. et al. Enhanced production of monocyte chemoattractant protein 1 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1992; 90: 772-779.
  50. Xu Y. et al. Regulation of monocyte chemoattractant protein 1 by cytokines and oxygen free radicals in rat hepatic fat-storing cells. *Gastroenterology* 1996; 110: 1870-1877.
  51. Sprenger H. et al. Differential expression of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) in transforming rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 1999; 30: 88-94.
  52. Marra F. et al. Cultured human liver fat-storing cells secrete monocyte chemotactic protein-1 : regulation by proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1993; 92: 1674-1680.
  53. Czaja MJ. et al. Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) expression occurs in toxic rat liver injury and human liver disease. *J Leukocyte Biol* 1994; 55: 120-126.
  54. Marra F. et al. Thrombin stimulates proliferation of liver fat-storing cells and expression of monocyte chemotactic protein-1: potential role in liver injury. *Hepatology* 1995; 22: 780-787.
  55. Muhlbauer M. et al. A novel MCP-1 gene polymorphism is associated with hepatic MCP-1 expression and severity of HCV-related liver disease. *Gastroenterology* 2003; 125: 1085-1093.
  56. Kobayashi H. et al. The role of monocyte chemoattractant protein-1 in biliary atresia. *J Pediatr Surg* 2006; 41: 1967-1972.
  57. Lee TY. et al. Yin-Chen-Hao-Tang ameliorates obstruction-induced hepatic apoptosis in rats. *J Pharm Pharmacol* 2007; 59: 1-8.
  58. Marra F. et al. Monocyte chemotactic protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999 ; 29 : 140-148.



59. Fisher NC. et al. Serum concentrations and peripheral secretion of the beta chemokines monocyte chemoattractant protein 1 and macrophage inflammatory protein 1 alpha in alcoholic liver disease. *Gut* 1999; 45: 416-420.
60. Bernuau D. et al. A quantitative ultrastructural analysis of the leukocytes in contact with hepatocytes in chronic active hepatitis, with a cytochemical detection of mononuclear phagocytes. *Am J Pathol* 1982; 109: 310-320.
61. Gressner AM. et al. Cellular communications and cell-matrix interactions in the pathogenesis of fibroproliferative disease: liver fibrosis as a paradigm. *Ann Biol Clin* 1994; 52: 205-226.
62. Gressner AM. et al. Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fat-storing cells. *J Hepatol* 1995; 22: 28-36.
63. Coulombe PA. et al. “Hard” and “soft” principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14: 110-122.
64. Herrmann H. et al. Functional complexity of intermediate filament cytoskeletons: from structure to assembly to gene ablation. *Int Rev Cytol* 2003; 223: 83-175.
65. Moll R. et al. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982; 31: 11-24.
66. Zatloukal K. et al. Cytokeratin 8 protects from hepatotoxicity, and its ratio to cytokeratin 18 determines the ability of hepatocytes to form Mallory bodies. *Am J Pathol* 2000; 156: 1263-1274.
67. Toivola DM. et al. Beyond cellular integrity: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *Trends Cell Biol* 2005; 15: 608-617.
68. Caulin C. et al. Keratin-dependent, epithelial resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Cell Biol* 2000; 149: 17-22.
69. Zatloukal K. et al. The keratin cytoskeleton in liver disease. *J Pathol* 2004; 204: 367-376.
70. Gilbert S. et al. Simple epithelium keratin 8 and 18 provide resistance to Fas-mediated apoptosis. The protection occurs through a receptor-targeting modulation. *J Cell Biol* 2001; 154: 763-773.

71. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Eng J Med* 2002; 16: 1221-12318.
72. MacFarlane M. et al. Active caspases and cleaved cytokeratins are sequestered into cytoplasmic inclusions in TRAIL-induced apoptosis. *J Cell Biol* 2000; 148: 1239-1254.
73. Caulin C. et al. Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J Cell Biol* 1997; 138: 1379-1394.
74. Ku NO. et al. Mutation of human keratin 18 in association with cryptogenic cirrhosis. *J Clin Invest* 1997; 99: 19-23.
75. Leers MP. et al. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J Pathol* 1999; 187: 567-572.
76. Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 1996; 381: 571-580.
77. Wickner S. et al. Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* 1999; 286: 1888-1893.
78. Grune T. et al. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J* 1997; 11: 526-534.
79. Zatloukal K. et al. p62 is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases. *Am J Pathol* 2002; 160: 255-263.
80. Fickert P. et al. Mallory body formation in primary biliary cirrhosis is associated with increased amounts and abnormal phosphorylation and ubiquitination of cytokeratins. *J Hepatol* 2003; 38: 387-394.
81. Zatloukal K. et al. High molecular weight component of Mallory bodies detected by a monoclonal antibody. *Lab Invest* 1990; 62: 427-434.
82. Nakamichi I. et al. Keratin 8 overexpression promotes mouse Mallory body formation. *J Cell Biol* 2005; 171: 931-937.
83. Strand P. et al. Keratin variants associate with progression of fibrosis during chronic hepatitis C infection. *Hepatology* 2006; 43: 1354-1363.
84. Strand P. et al. Denaturing temperature selection may underestimate keratin mutation detection by DHPLC. *Hum Mutat* 2006b; 27: 444-452.

85. Ku NO. et al. A disease- and phosphorylation-related nonmechanical function for keratin 8. *J Cell Biol* 2006; 174: 115-125.
86. Zollner G. et al. Role of nuclear bile acid receptor, FXR, in adaptive ABC transporter regulation by cholic and ursodeoxycholic acid in mouse liver, kidney and intestine. *J Hepatol* 2003; 39: 480-488.
87. Fickert P. et al. Cytokines as targets for bile acid induced toxicity. *Am J Pathol* 2002; 160: 491-499.
88. Ding SJ. et al. From proteomic analysis to clinical significance. Overexpression of cytokeratin 19 correlates with hepatocellular carcinoma according to hepatocellular carcinoma metastasis. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3: 73-81.
89. Toivola DM. et al. Keratin 8 and 18 hyperphosphorylation is a marker of progression of human liver disease. *Hepatology* 2004; 40: 459-466  
\*
90. Nakamichi I. et al. Keratin 8 overexpression promotes mouse Mallory body formation. *J Cell Biol* 2005; 171: 931-937
91. Ku NO. et al. Studying simple epithelial keratins in cells and tissues. *Methods Cell Biol* 2004; 78: 489-517.
92. Slott PA. et al. Origin, pattern, and mechanism of bile duct proliferation following biliary obstruction in the rat. *Gastroenterology* 1990; 99: 466-477.
93. Herrmann H. et al. Specific in situ phosphorylation of plectin in detergent-resistant cytoskeletons from cultured Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1983; 258: 14610-14618.
94. Niessen CM. et al. A minimal region on the integrin beta4 subunit that is critical to its localization in hemidesmosomes regulates the distribution of HD1/plectin in COS-7 cells. *J Cell Sci.* 1997; 110: 1705-1716.
95. Okumura M. et al. Identification of the hemidesmosomal 500 kDa protein (HD1) as plectin. *J Biochem* 1999; 126: 1144-1150.
96. Wiche G. et al. Occurrence and immunolocalization of plectin in tissues. *J Cell Biol* 1983; 97: 887-901.
97. Gache Y. et al. Defective expression of plectin/HD1 in epidermolysis bullosa simplex with muscular dystrophy. *J Clin Invest* 1996; 97: 2289-2298.

98. McLean WH. et al. Loss of plectin causes epidermolysis bullosa with muscular dystrophy: cDNA cloning and genomic organization. *Gene Dev* 1996; 10: 1724-1735.
99. Smith FJ. Plectin deficiency results in muscular dystrophy with epidermolysis bullosa. *Nat Genet* 1996; 13: 450-457.
100. Wiche G. Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. *J Cell Sci* 1998; 11: 2477-2486.
101. Steinböck FA. et al. Plectin: a cytolinker by design. *Biol Chem* 1999; 380: 151-158.
102. Larsen AKR. et al. Naringin-sensitive phosphorylation of plectin, a cytoskeletal cross-linking protein, in isolated hepatocytes. *J Biol Chem* 2002; 277: 34826-34835.
103. Foisner R. et al. M-phase-specific phosphorylation and structural rearrangement of the cytoplasmic cross-linking protein plectin involve p34cdc2 kinase. *Mol Biol Cell* 1996; 7: 273-288.
104. Malecz N. et al. Identification of plectin as a substrate of p34cdc2 kinase and mapping of a single phosphorylation site. *J Biol Chem* 1996; 271: 8203-8208.
105. Foisner R. et al. Protein Kinase A- and Protein Kinase C-Regulated Interaction of Plectin with Lamin B and Vimentin. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 3812-3816.
106. Berven G. et al. Effects of the diarrhetic shellfish toxin, okadaic acid, on cytoskeletal elements, viability and functionality of rat liver and intestinal cells. *Toxicon* 2001 ; 39 : 349-362.
107. Blankson H. et al. Disruption of the Cytokeratin Cytoskeleton and Inhibition of Hepatocytic Autophagy by Okadaic Acid. *Exp Cell Res* 1995 ; 218 : 522-530.
108. Blankson H. et al. Prevention of toxin-induced cytoskeletal disruption and apoptotic liver cell death by the grapefruit flavonoid, naringin. *Cell Death Differ* 2000 ; 7 : 739-746.
109. Muenchbach M. et al. Proteolysis of liver plectin by mu-calpain. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 249: 304-306.
110. Stegh AH. et al. Identification of the cytolinker as the major early in vivo substrate for caspase 8 during CD95- and tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 5665-5679.

111. Boden WE. High-density lipoprotein cholesterol as an independent risk factor in cardiovascular disease: assessing the data from Framingham to the Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Intervention Trial. *Am J Cardiol* 2000; 86: 19L-22L.
112. Lewis GF. et al. New insight into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res* 2005; 96: 1221-1232.
113. Marcovina S. et al. Measurement and meaning of apolipoprotein AI and apolipoprotein B plasma levels. *J Intern Med* 2006; 259: 437-446.
114. Barter PJ. et al. The rationale for using apoA-I as a clinical marker of cardiovascular risk. *J Intern Med* 2006; 259: 447-454.
115. Corsetti JP. et al. Elevated HDL is a risk factor for recurrent coronary events in a subgroup of non-diabetic postinfarction patients with hypercholesterolemia and inflammation. *Atherosclerosis* 2006; 187: 191-197
116. Asztalos BF. et al. Comparing the effects of five different statins on the HDL subpopulation profiles of coronary heart disease patients. *Atherosclerosis* 2002; 164: 361-369.
117. Brinton EA. et al. Increased apoA-I and apoA-II fractional catabolic rate in patients with low high density lipoprotein-cholesterol levels with or without hypertirglyceridemia. *J Clin Invest* 1991; 87: 536-544.
118. Brinton EA. et al. Human HDL cholesterol levels are determined by apoA-I fractional catabolic rate, which correlated inversely with estimates of HDL particle size. Effects of gender, hepatic and lipoprotein lipases, triglyceride and insulin levels, and body fat distribution. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 707-720.
119. Horowitz BS. et al. Increased plasma and renal clearance of an exchangeable pool of apolipoprotein A-I in subjects with low levels of high density lipoprotein cholesterol. *J Clin Invest* 1993; 91: 1743-1752.
120. Vajo Z. et al. Increased intra-abdominal fat may lower HDL levels by increasing the fractional catabolic rate of Lp A-I in postmenopausal women. *Atherosclerosis* 2002; 160: 495-501.
121. Pont F. et al. High-density lipoprotein apolipoprotein A-I kinetics in

- obese insulin resistant patients. An in vivo stable isotopo study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; 26: 1151-1158.
122. Hammad SM. et al. Cubilin, the endocytic receptor for intrinsic factor-vitamin B(12) complex, mediates high-density lipoprotein holoparticle endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 10158-10163.
123. Hammad SM. et al. Megalin acts in concert with cubilin to mediate endocytosis of high density lipoproteins. *J Biol Chem* 2000; 275: 12003-12008.
124. Moestrup SK. et al. Cubilin, a high-density lipoprotein receptor. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11: 133-140.
125. Yokoyama Y. et al. Proteomic profiling of proteins decreased in hepatocellular carcinoma from patients infected with hepatitis C virus. *Proteomics* 2004; 4: 2111-2116
126. Fujita T. et al. Purification of senescence marker protein-30 (SMP30) and its androgen-independent decrease with age in the rat liver. *Biochem Biophys Acta* 1992; 1116 : 122-128.
127. Fujita T. et al. Isolation of cDNA clone encoding rat senescence marker protein-30 (SMP30) and its tissue distribution. *Biochem Biophys Acta* 1992; 1132 : 297-305.
128. Fujita T. et al. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones encoding mouse senescence marker protein-30 (SMP30). *Biochem Biophys Acta* 1996; 1308 : 49-57.
129. Fujita T. et al. Isolation of cDNA clone encoding human homologue of senescence marker protein-30 (SMP30) and its location on the X chromosome. *Biochem Biophys Acta* 1995; 1263 : 249-252.
130. Fujita T. et al. Gene regulation of senescence marker protein-30 (SMP30): coordinated up-regulation with tissue maturation and gradual down-regulation with aging. *Mech Ageing Dev* 1996; 87 : 219-229.
131. Fujita T. Senescence marker protein-30(SMP30): structure and biological function. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 254: 1-4.
132. Yamaguchi M. et al. Inhibitory effect of calcium-binding protein regucalcin on  $Ca^{2+}$ -activated DNA fragmentation in rat liver nuclei. *FEBS Lett* 1991 ; 279 : 281-284.

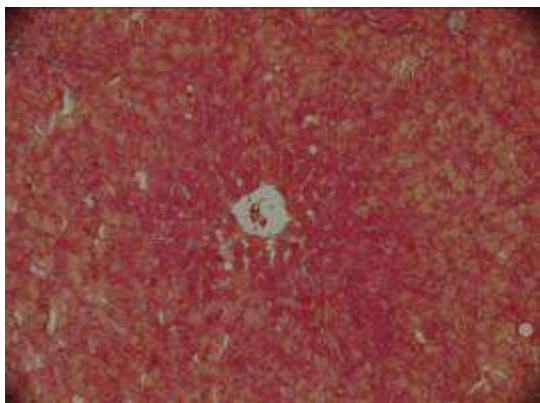
133. Takahashi H. et al. Role of regucalcin as an activator of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity in rat liver microsomes. *J Cell Biochem* 1999 ; 74 : 663-669.
134. Takahashi H. et al. Stimulatory effect of regucalcin on ATP-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  uptake activity in rat liver mitochondria. *J Cell Biochem* 2000; 78: 121-130.
135. Kraus-Friedman N. Calcium sequestration in the liver. *Cell Calcium* 1990; 11: 625-640.
136. Hamano T. et al. Inhibitory role of regucalcin in the regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  dependent protein kinases activity in rat brain neurons. *J Neurol Sci* 2001; 183: 33-38.
137. Omura M. et al. Regulation of protein phosphatase activity by regucalcin localization in rat liver nuclei. *J Cell Biochem* 1999; 75: 437-445.
138. Morooka Y. et al. Suppressive role of endogenous regucalcin in the regulation of protein phosphatase activity in rat renal cortex cytosol. *J Cell Biochem* 2001 ; 81 : 639-646.
139. Yamaguchi M. et al. Suppressive role of endogenous regucalcin in the enhancement of nitric oxide synthase activity in liver cytosol of normal and regucalcin transgenic rats. *J Cell Biochem* 2003 ; 88 : 1226-1234.
140. Izumi T. et al. Suppressive effect of endogenous regucalcin on nitric oxide synthase activity in cloned rat hepatoma H4-II-E cells overexpressing regucalcin. *J Cell Biochem* 2003; 89: 800-807.
141. Yamaguchi M. et al. Calcium-binding protein regucalcin increases calcium-independent proteolytic activity in rat liver cytosol. *Mol Cell Biochem* 1992; 112: 89-95.
142. Yamaguchi M. et al. Characterization of regucalcin effect on proteolytic activity in rat liver cytosol: relation to cysteinyl-proteases. *Mol Cell Biochem* 1995; 148: 67-72.
143. Baba T. et al. Stimulatory effect of regucalcin on proteolytic activity in rat renal cortex cytosol: involvement of thiol proteases. *Mol Cell Biochem* 1999; 195: 89-92
144. Omura M. et al. Regulation of protein phosphatase activity by regucalcin localization in rat liver nuclei. *J Cell Biochem* 1999; 75: 437-445.

145. Tsurusaki Y. et al. Translocation of regucalcin to rat liver nucleus : involvement of nuclear protein kinase and protein phosphatase regulation. *Int J Mol Med* 2000; 6: 655-660.
146. Tsurusaki Y. et al. Role of endogenous regucalcin in nuclear regulation of regenerating rat liver : suppression of the enhanced ribonucleic acid synthesis activity. *J Cell Biochem* 2002 ; 87 : 450-457.
147. Tsurusaki Y. et al. Suppressive role of endogenous regucalcin in the enhancement of deoxyribonucleic acid synthesis activity in the nucleus of regenerating rat liver. *J Cell Biochem* 2002 ; 85 : 516-522.
148. Misawa H. et al. Suppression of cell proliferation and deoxyribonucleic acid synthesis in the cloned rat hepatoma H4-II-E cells overexpressing regucalcin. *J Cell Biochem* 2002 ; 84 : 143-149.
149. Izumi T. et al. Overexpression of regucalcin suppresses cell death in cloned rat hepatoma H4-II-E cells induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  or thapsigargin. *J Cell Biochem* 2004; 92: 296-306.
150. Ishigami A. et al. Senescence Marker protein-30 knockout mouse liver is highly susceptible to tumor necrosis factor- $\alpha$ - and Fas-mediated apoptosis. *Am J Pathol* 2002; 161: 1273-1281.
151. Fujita T. et al. Senescence marker protein-30 (SMP30) rescues cell death by enhancing plasma membrane Ca(2+)-pumping activity in Hep G2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 250 : 374-380.
152. Chevalier S. et al. Proteomic analysis of differential protein expression in primary hepatocytes induced by EGF, tumor necrosis factor  $\alpha$  or the peroxisome proliferator nefenopin. *Eur J Biochem* 2000; 267: 4624-4634.
153. Yamaguchi M. et al. Role of regucalcin in calcium signaling. *Life Sci* 2000 ; 66 : 1769-1780.
154. Isogai M. et al. Hepatic calcium-binding protein regucalcin in released into the serum of rats administered orally carbon tetrachloride. *Mol Cell Biochem* 1994; 131: 173-179.
155. Isogai M. et al. Serum release of hepatic calcium-binding protein regucalcin by liver injury with galactosamine administration in rats. *Mol Cell Biochem* 1994; 136: 85-90.
156. Yamaguchi M. et al. Potential sensitivity of hepatic specific protein

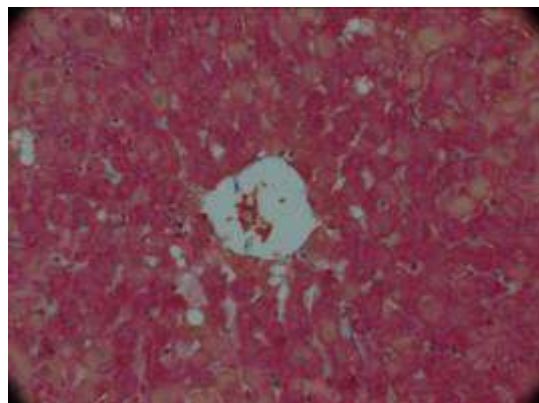


- regucalcin as a marker of chronic liver injury. *Mol Cell Biochem* 1997; 167: 187-190
157. Fukaya Y. et al. Regucalcin increases superoxide dismutase activity in rat liver cytosol. *Biol Pharm Bull* 2004; 27: 1444-1446.

陸：圖、表、附圖

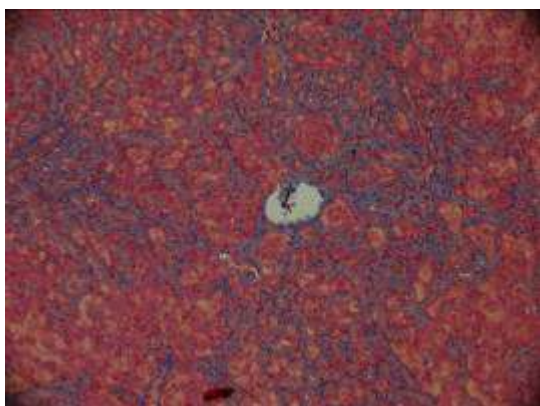


200X

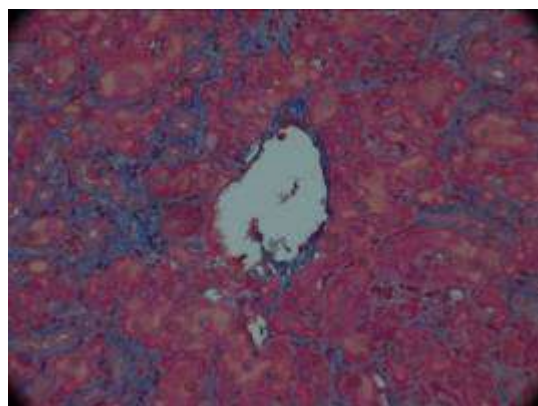


400X

圖一-1 正常大鼠肝臟組織切片

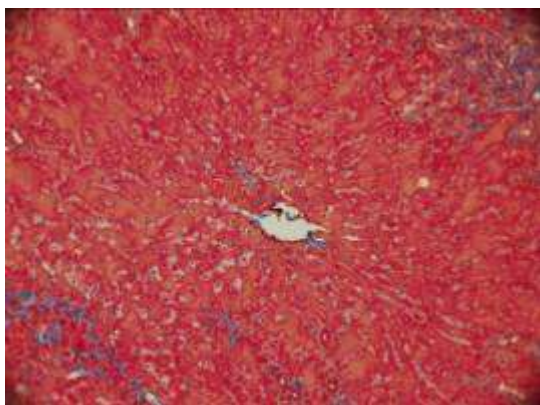


200X

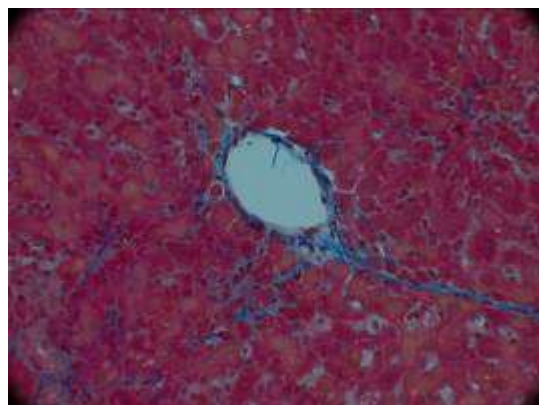


400X

圖一-2 膽道結紮大鼠肝臟組織切片

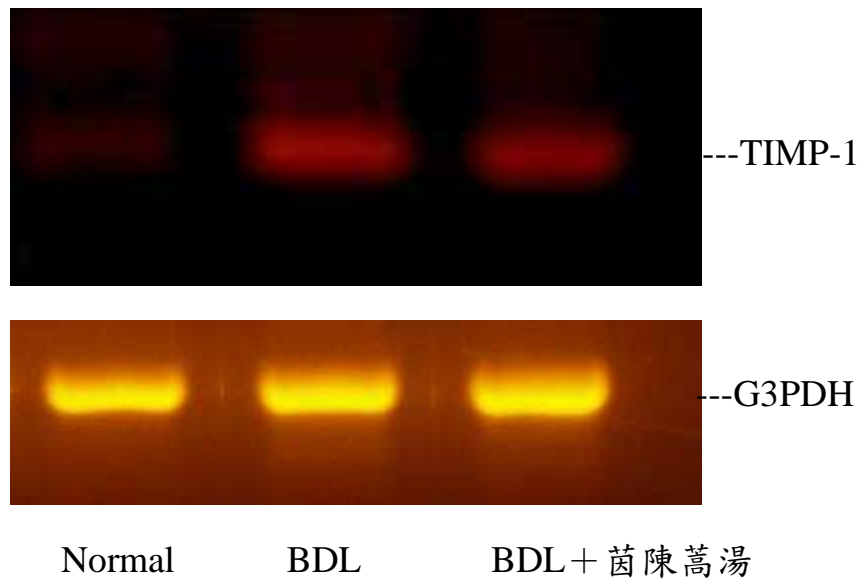


200X

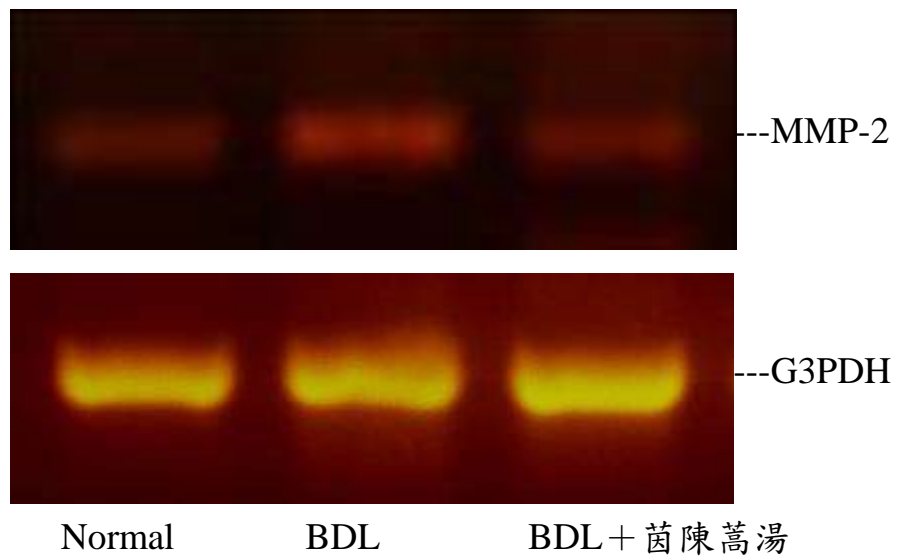


400X

圖一-3 膽道結紮大鼠餵食茵陳蒿湯組肝臟組織切片



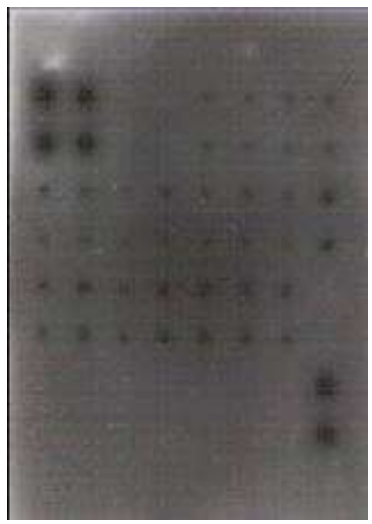
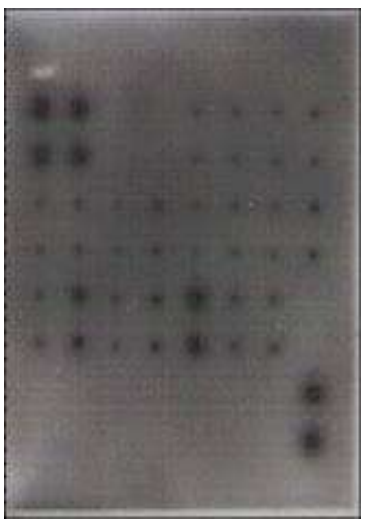

圖二 RT-PCR for TIMP-1



圖三 RT-PCR for MMP-2

Pos	Pos	Neg	Neg	CINC-2	CINC-3	CNTF	Fractakine
Pos	Pos	Neg	Neg	CINC-2	CINC-3	CNTF	Fractakine
GM-CSF	IFN- $\gamma$	IL-1 $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-4	IL-6	IL-10	LIX
GM-CSF	IFN- $\gamma$	IL-1 $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-4	IL-6	IL-10	LIX
Leptin	MCP-1	MIP-3 $\alpha$	$\beta$ -NGF	TIMP-1	TNF- $\alpha$	VEGF	Blank
Leptin	MCP-1	MIP-3 $\alpha$	$\beta$ -NGF	TIMP-1	TNF- $\alpha$	VEGF	Blank
Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Pos
Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Pos

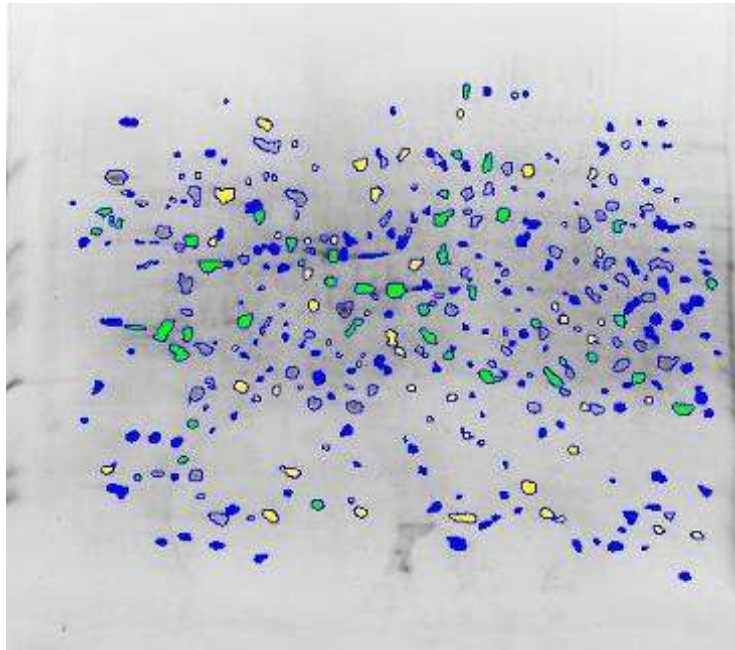
		
--	---	--

Normal

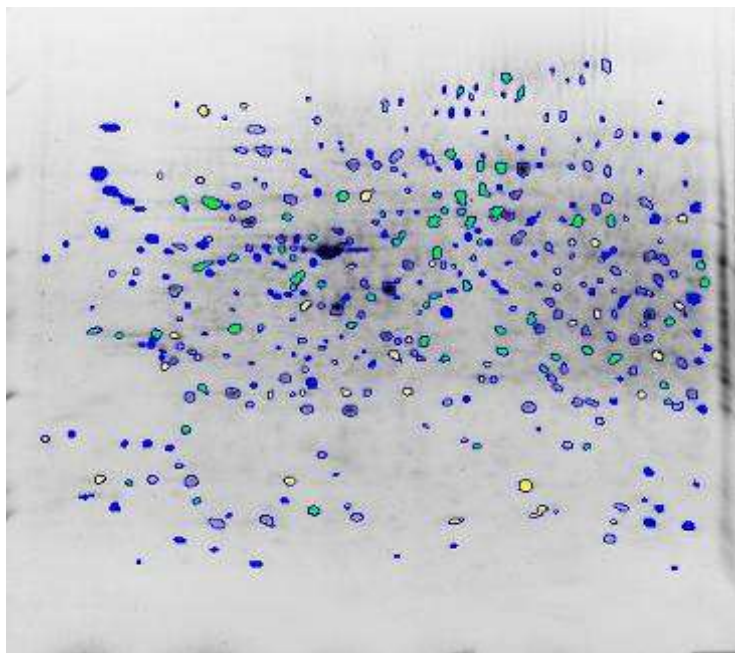
BDL

BDL+YCHT

圖四 蛋白質晶片



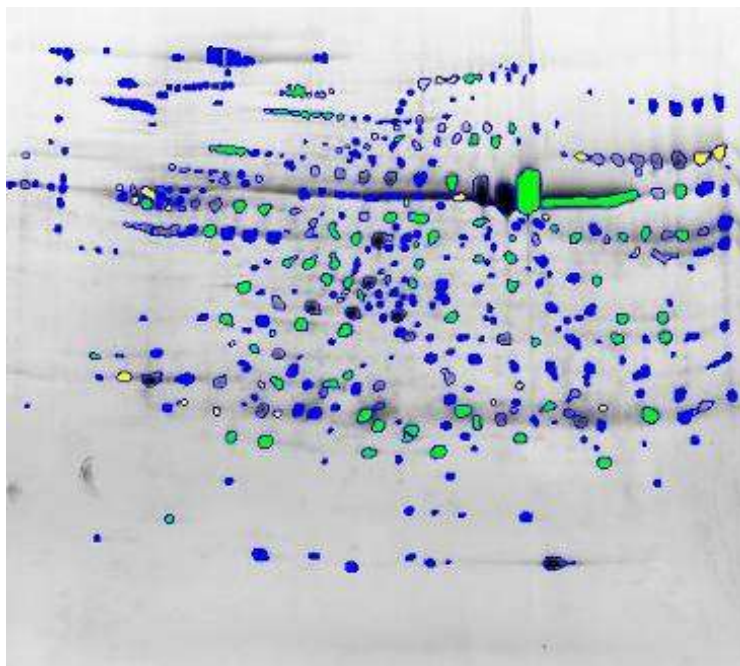
圖五-1 正常組與膽道結紮組比較



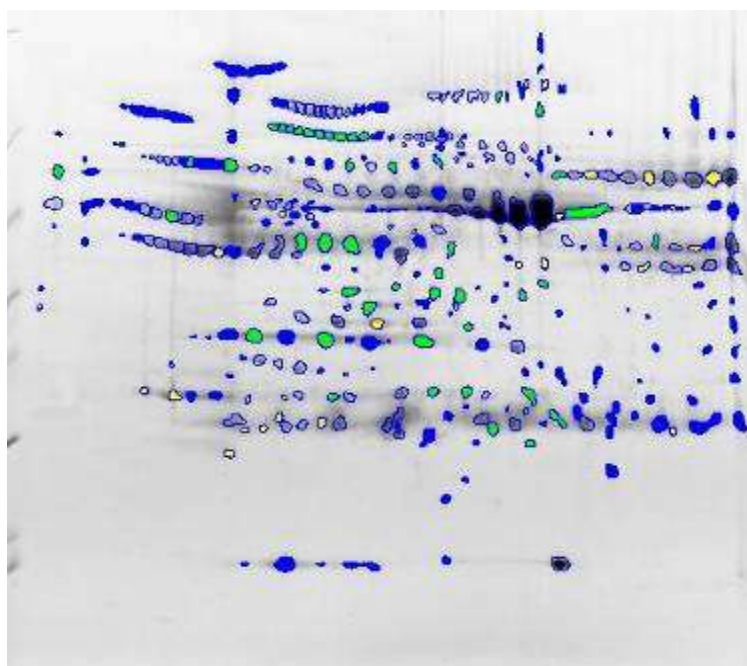
圖五-2 膽道結紮與茵陳蒿湯餵食組比較

### 圖五 肝臟組織蛋白質體學





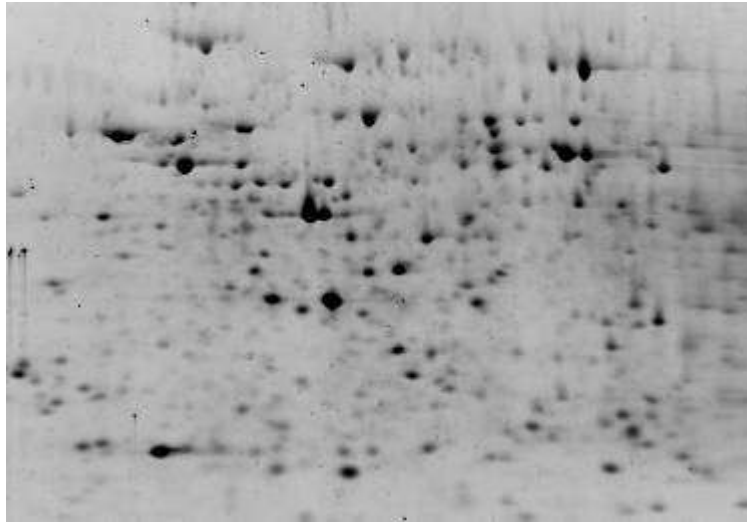
圖六-1 正常組與膽道結紮組比較



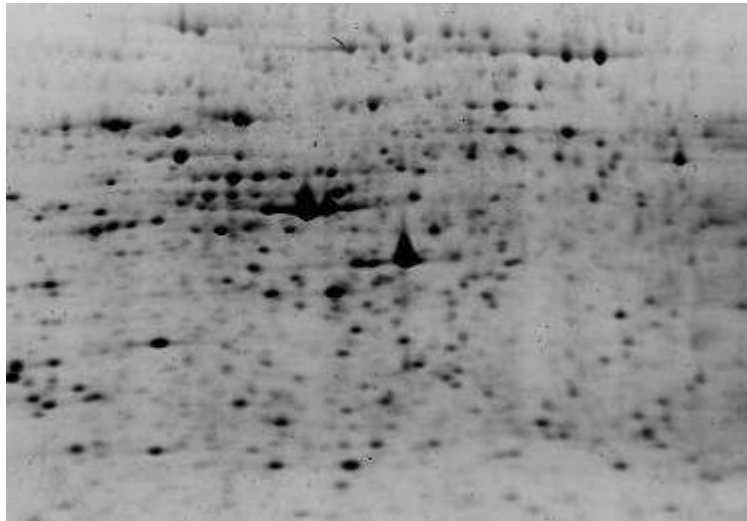
圖六-2 正常組與膽道結紮給茵陳蒿湯組比較

### 圖六 血漿蛋白質體學

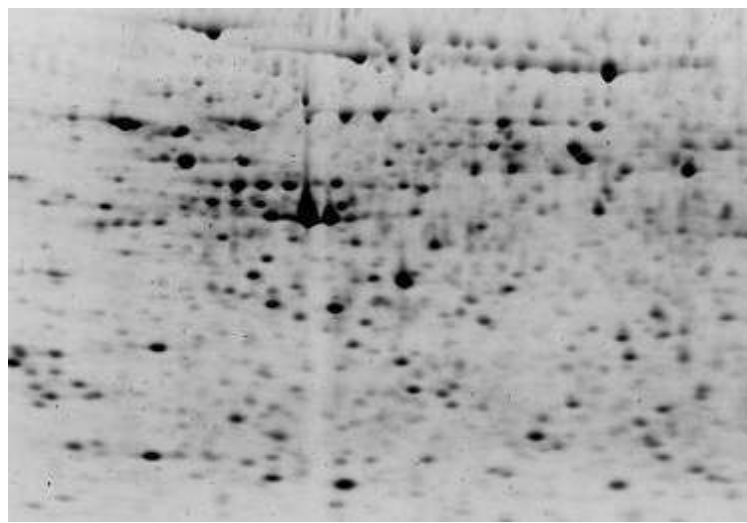
Normal



BDL

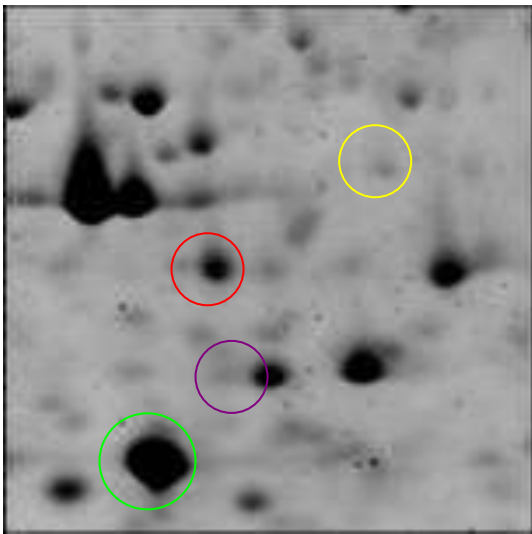


BDL-YCHT

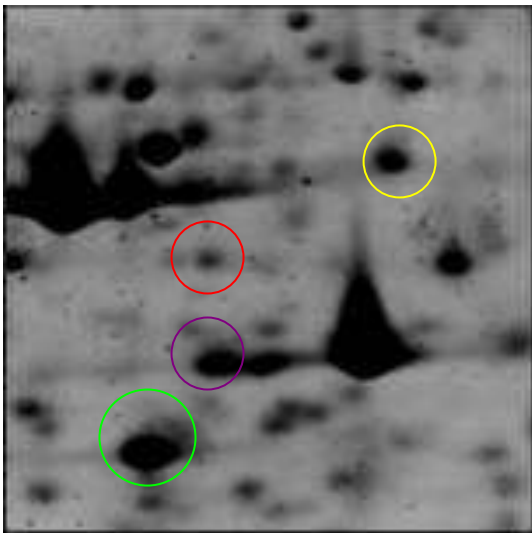


圖七 肝臟組織二維電泳 Sypro ruby 染色結果

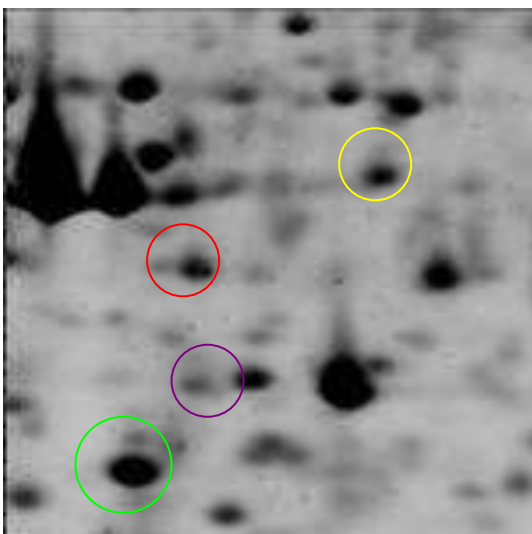
Normal



BDL



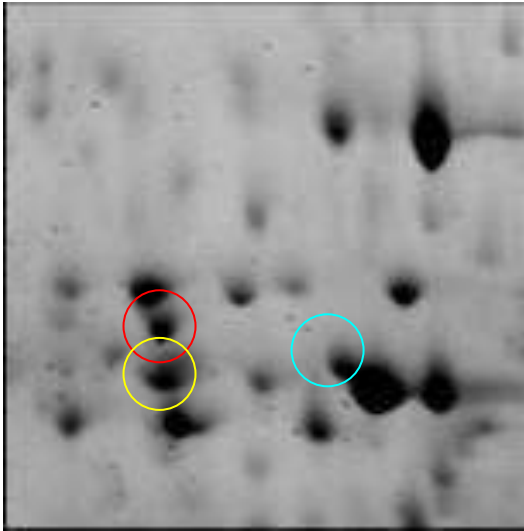
BDL-YCHT



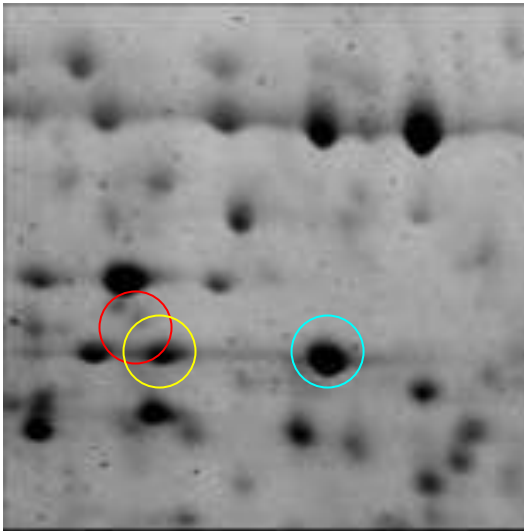
圖八 肝臟蛋白質體學-FTCD, SMP30, K8, BRCA



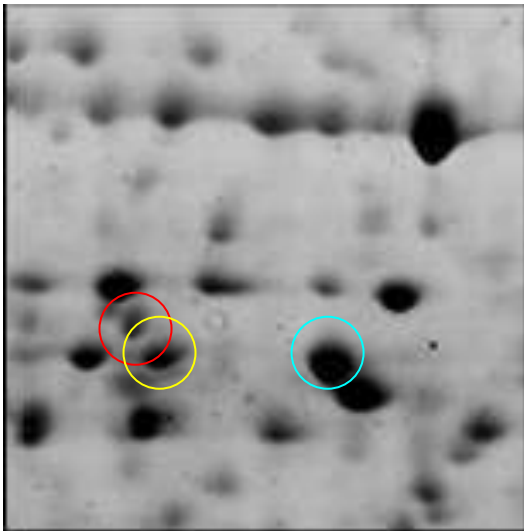
Normal



BDL

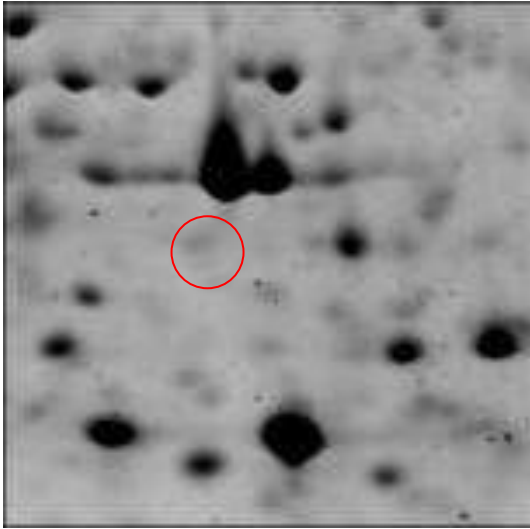


BDL-YCHT

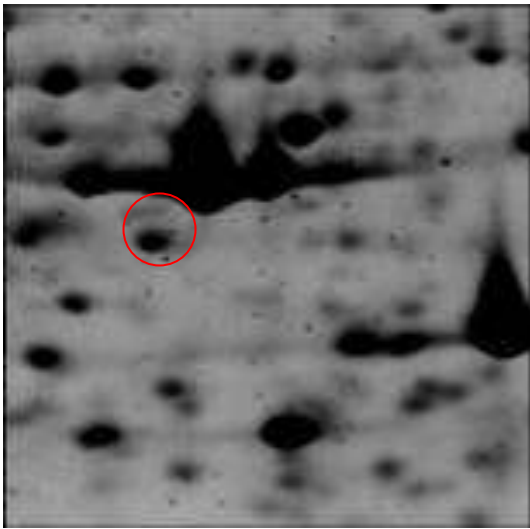


圖九 肝臟蛋白質體學-piccolo, DYHC, plectin-1

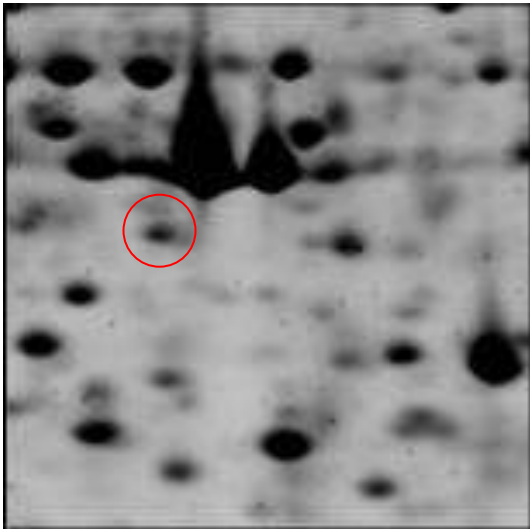
Normal



BDL

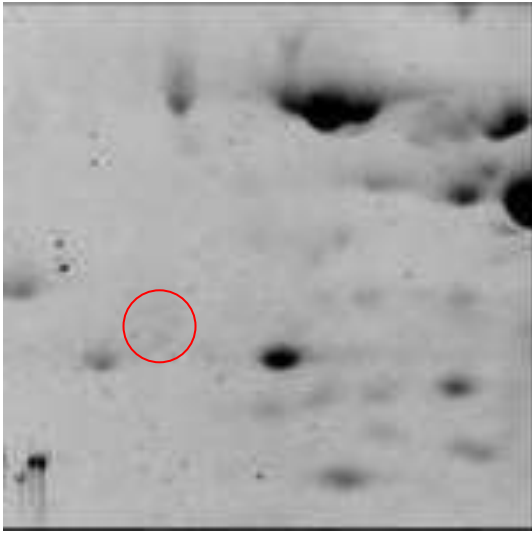


BDL-YCHT

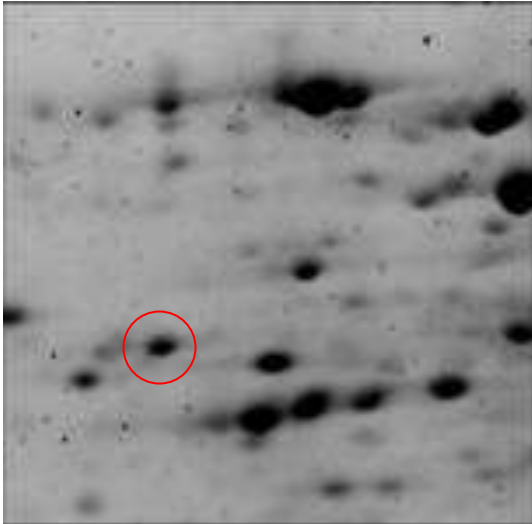


圖十 肝臟蛋白質體學-K19

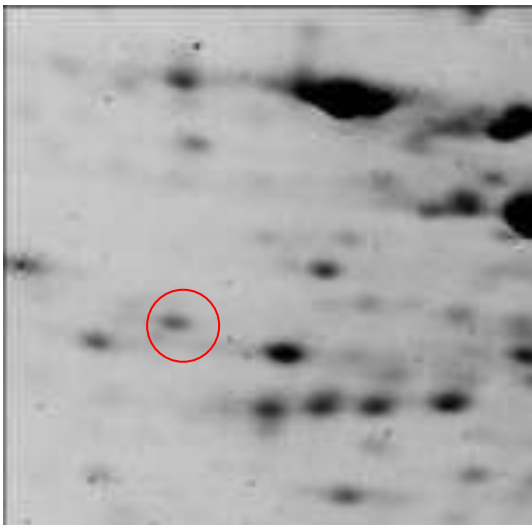
Normal



BDL

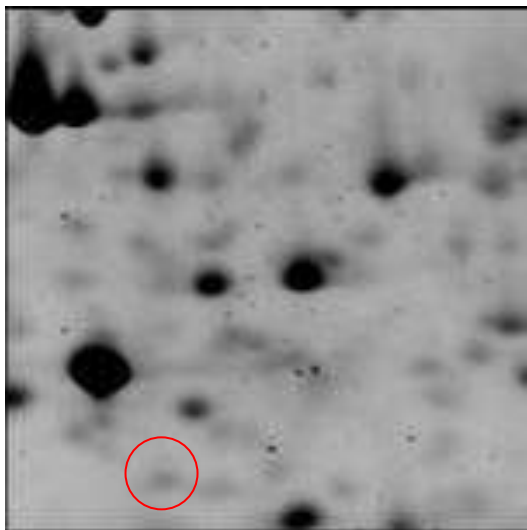


BDL-YCHT

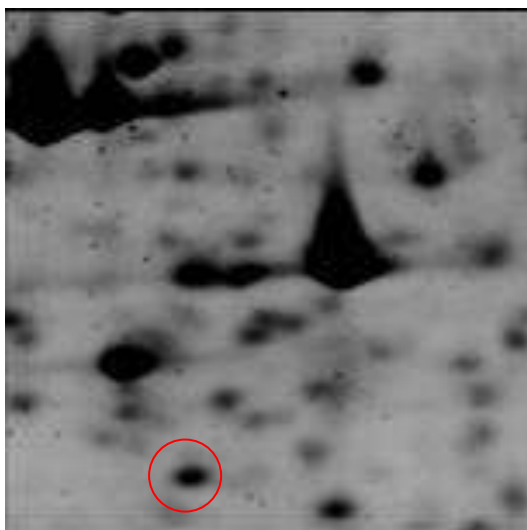


圖十一 肝臟蛋白質體學-gp330

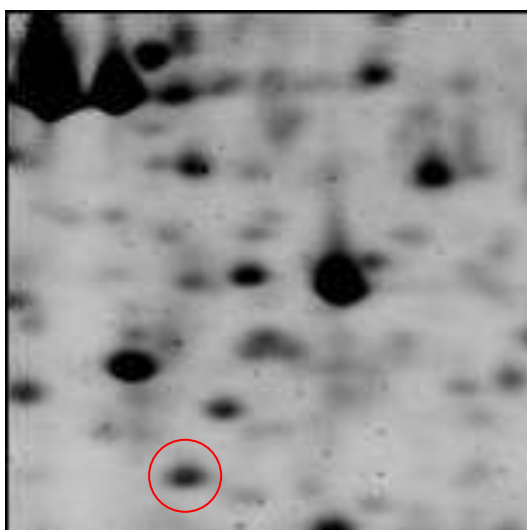
Normal



BDL

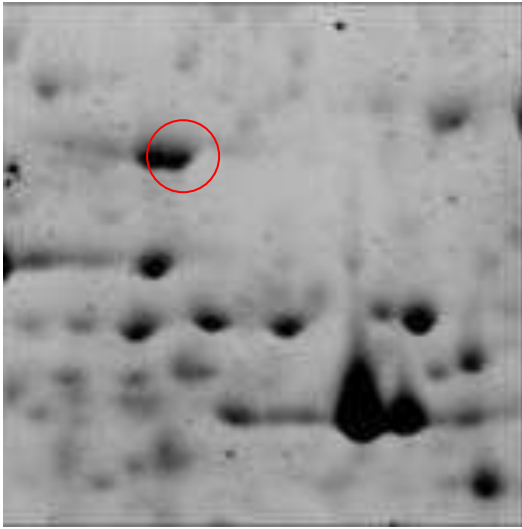


BDL-YCHT

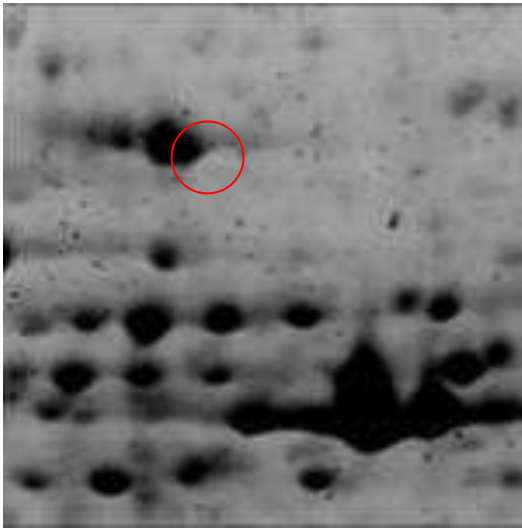


圖十二 肝臟蛋白質體學-SCP-1

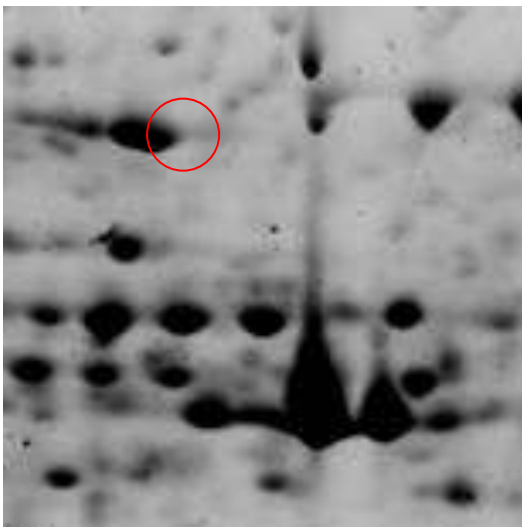
Normal



BDL

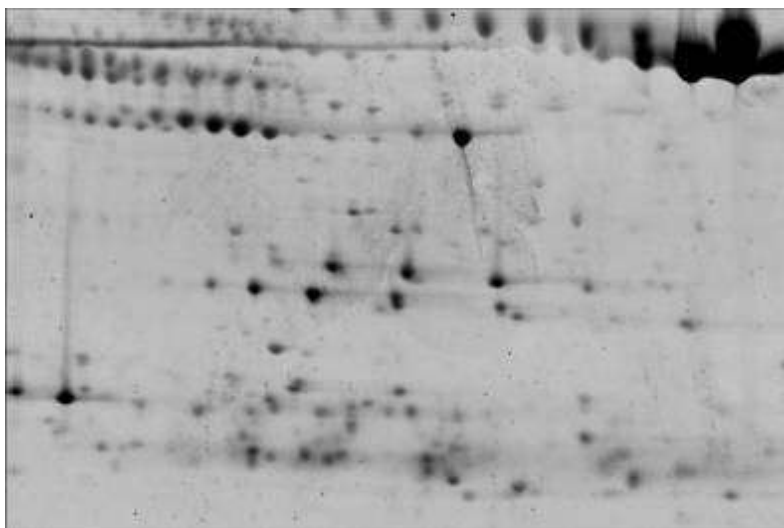


BDL-YCHT

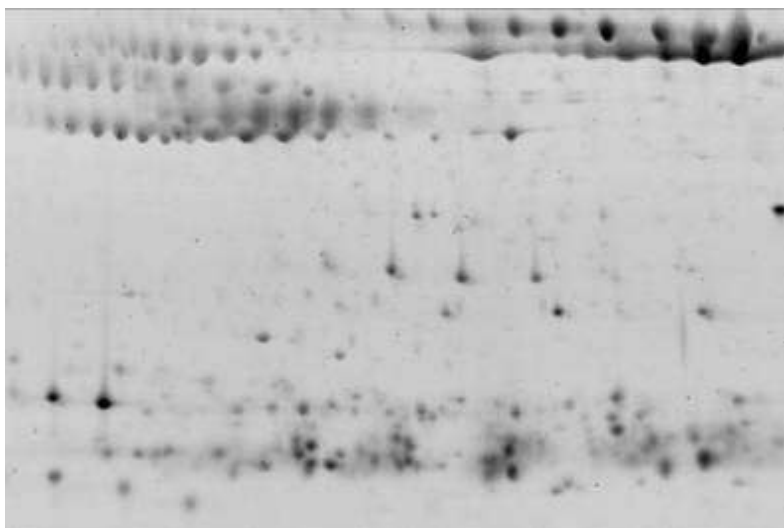


圖十三 肝臟蛋白質體學- $\alpha$ -tubulin-6

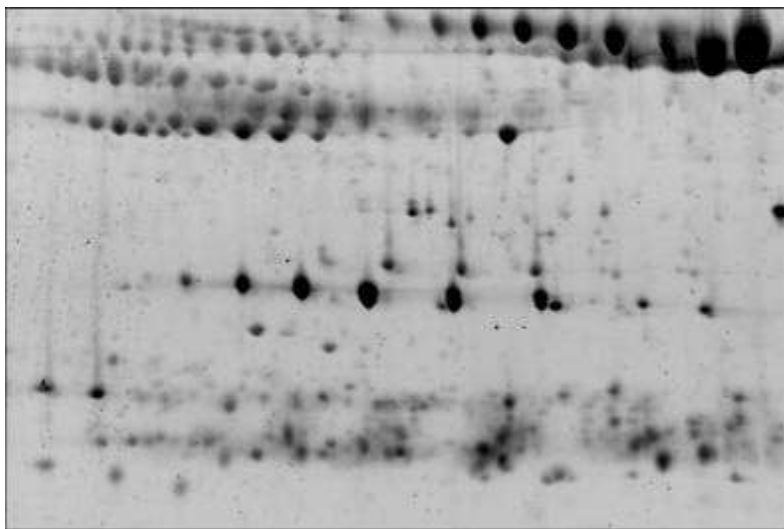
Normal



BDL

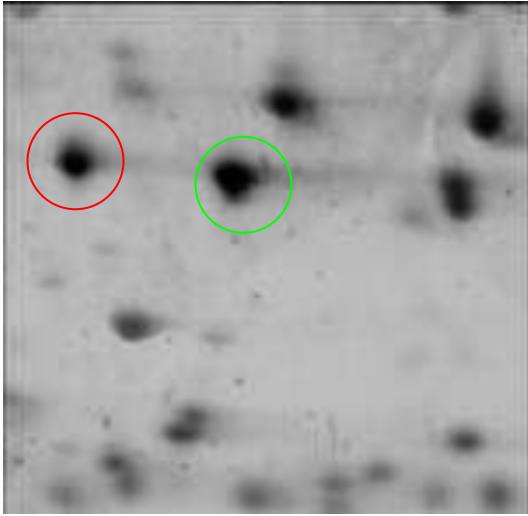


BDL-YCHT

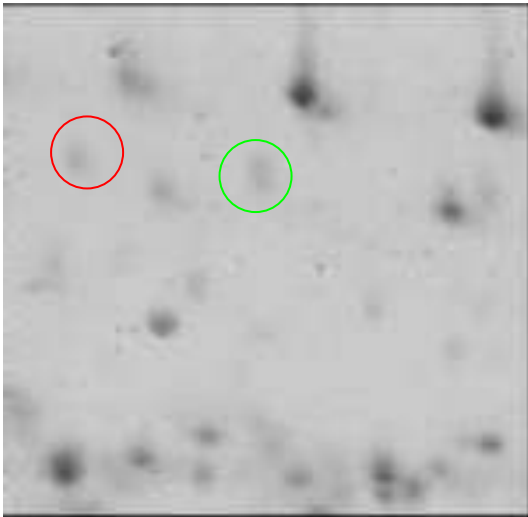


圖十四 血漿二維電泳 Sypro ruby 染色結果

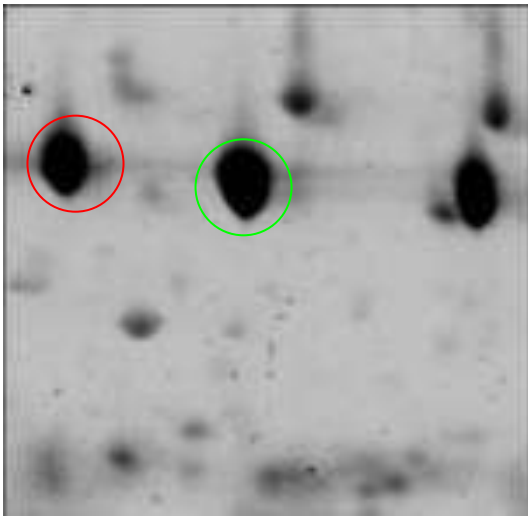
Normal



BDL

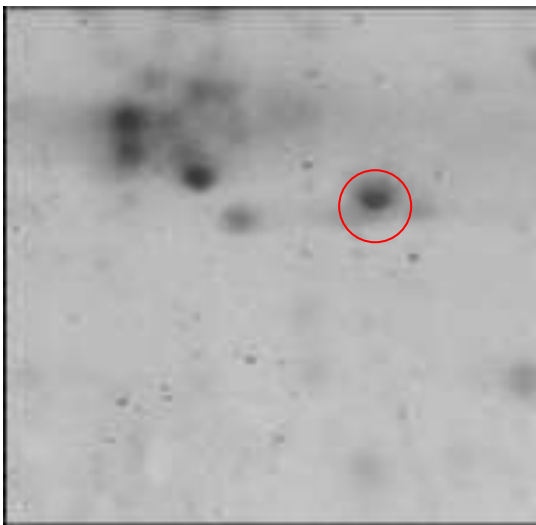


BDL-YCHT

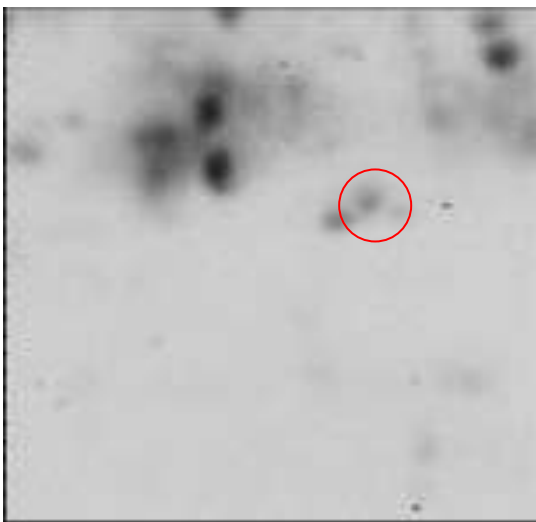


圖十五 血漿蛋白質體學-gp330, plectin-1

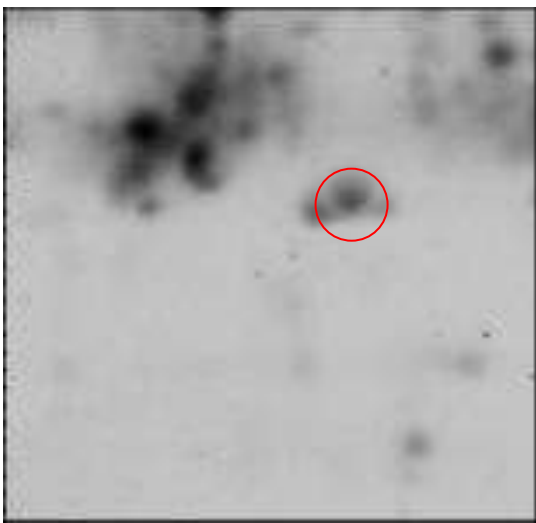
Normal



BDL



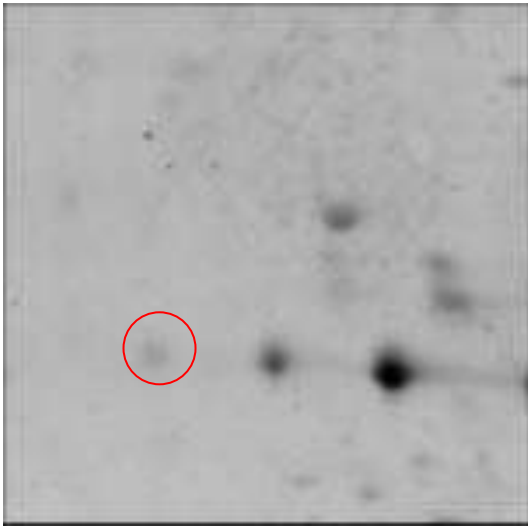
BDL-YCHT



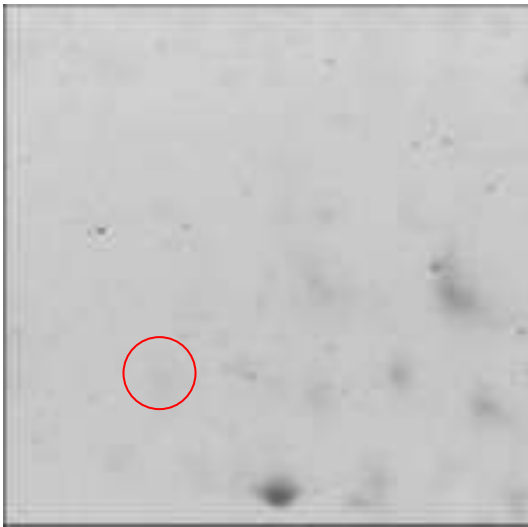
圖十六 血漿蛋白質體學-ApoAI



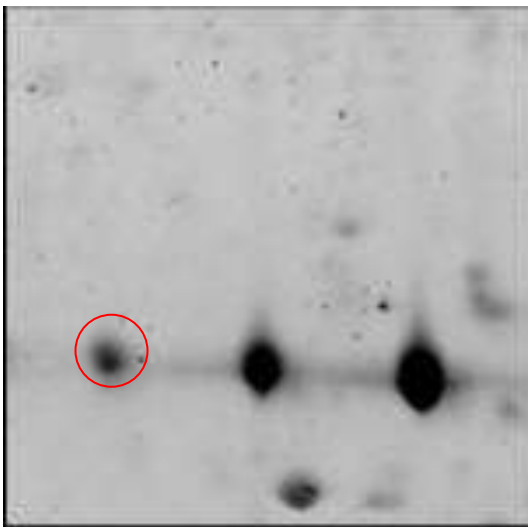
Normal



BDL

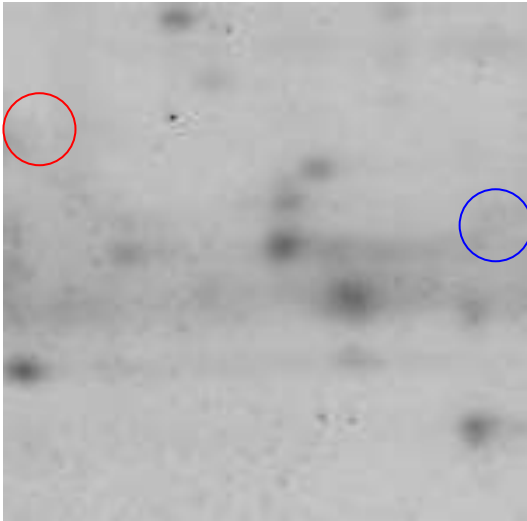


BDL-YCHT

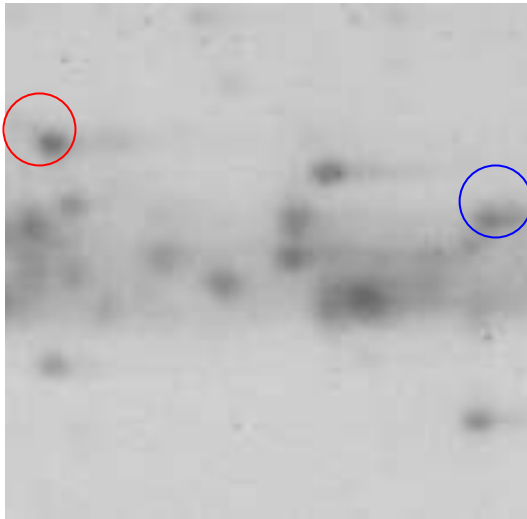


圖十七 血漿蛋白質體學-hepatoglobin

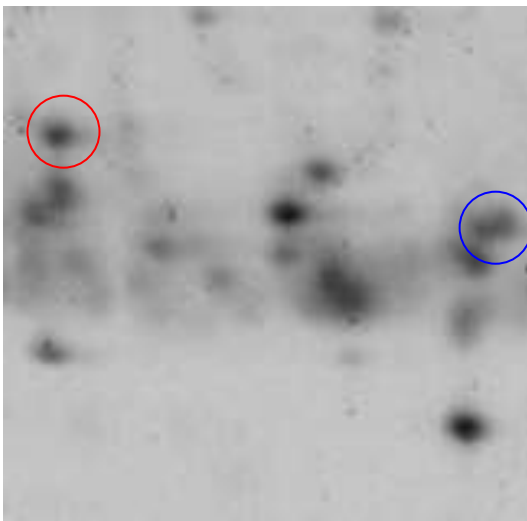
Normal



BDL



BDL-YCHT



圖十八 血漿蛋白質體學-IP3R, SPNB3

表一 RT-PCR primers

---

Target	Sequence
TIMP-1	F 5' CATGGAAAGCCTCTGTGGATATG 3' R 5'GATGTGCAAATTTCCGTTTCCTT 3'
MMP-2	F 5'GATACCCTCAAGAACATGCAGAAGTT 3' R 5'ACATCTTGGCTTCCGCATG 3'
G3PDH	F 5'CCCTTCATTGACCTCAACTACATGG 3' R 5'CATGGTGGTGAAGACGCCAG 3'

---

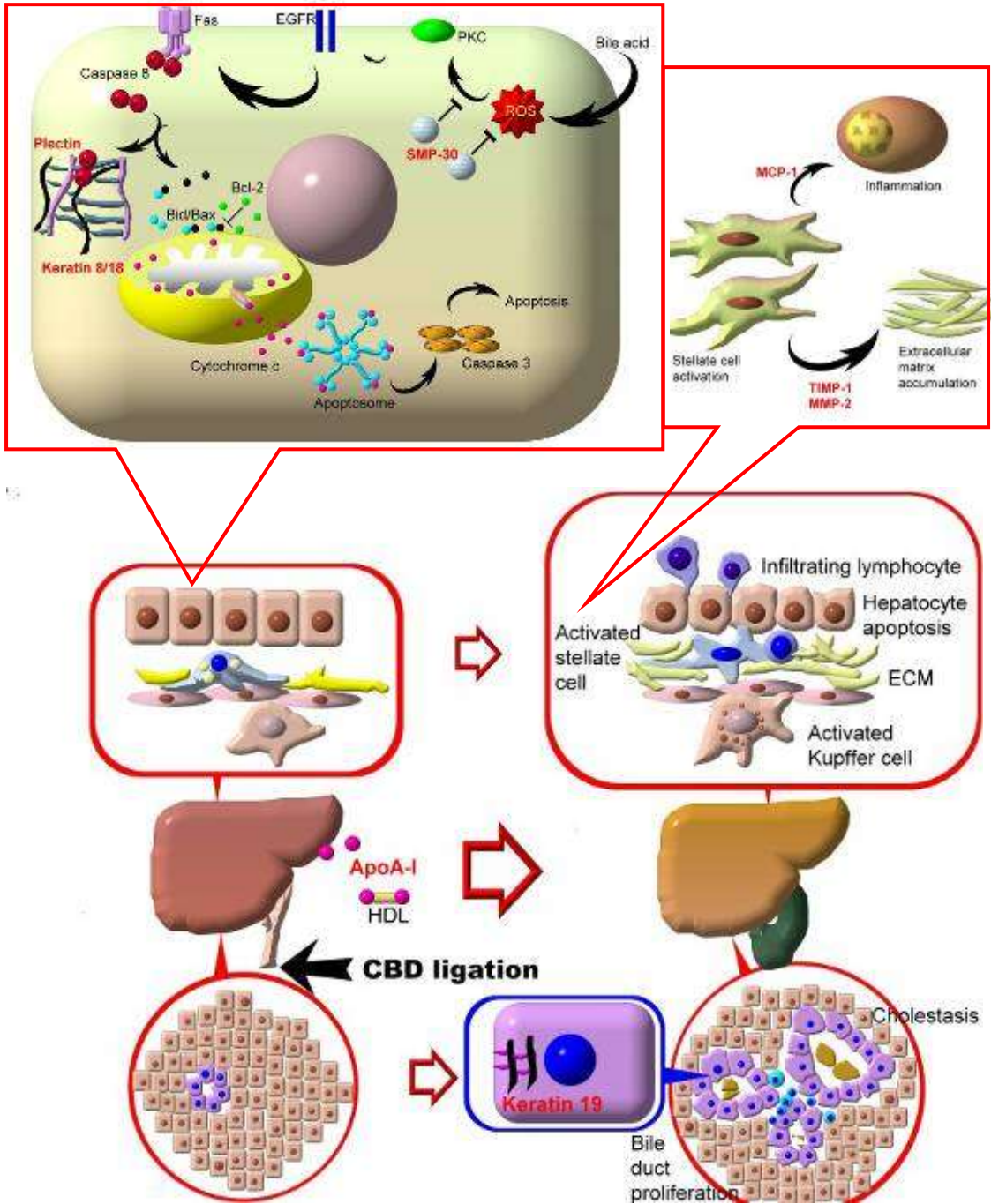
表二 肝臟組織二維電泳圖譜表現量發生變化之蛋白質

	Accession	名稱	分子量/pH	胞內分布
1	Q9JKS6	Protein piccolo (Aczonin) (Multidomain presynaptic cytomatrix protein)	552720/6.1	Cell junction; 突觸
2	O88618	Formimidoyltransferase-cyclodeaminase	58914/5.8	高基氏體
3	P30427	Plectin-1 (PLTN)	533544/5.7	細胞質
4	Q03336	Regucalcin (Senescence marker protein 30)	33390/5.3	細胞質
5	Q10758	Keratin, type II cytoskeletal 8	53888/5.8	細胞質及 細胞核
6	Q63729	Keratin, type I cytoskeletal 19	44636/5.2	細胞質
7	P98158	Low-density lipoprotein receptor-related protein 2 precursor (Glycoprotein 330)	519282/5.0	細胞膜
8	Q03410	Synaptonemal complex protein 1	116512/5.6	細胞核
9	O35923	Breast cancer type 2 susceptibility protein homolog (BRCA)	372220/6.1	
10	P38650	Dynein heavy chain, cytosolic (DYHC)	532256/6.1	細胞質
11	Q6AYZ1	Tubulin alpha-6 chain	49938/5.0	

a)蛋白質的 accession numbers 是從 NCBI 的蛋白質資料庫得到

表三 血漿二維電泳圖譜表現量發生變化之蛋白質

	Accession	名稱	分子量/pH	胞內分布
1	P98158	Low-density lipoprotein receptor-related protein 2 precursor (Glycoprotein 330)	519282/5.0	細胞膜
2	P30427	Plectin-1	533544/5.7	
3	P04639	Apolipoprotein A-I precursor (ApoA-I)	30088/5.5	分泌蛋白
4	P06866	Haptoglobin precursor	38550/6.1	分泌蛋白
5	P29994	Inositol 1,4,5 - trisphosphate receptor type 1 (IP-3-R)	313267/5.7	內質網
6	Q9QWN8	Spectrin beta chain, brain 2 (SPNB-3)	271066/5.6	



附錄圖三 實驗結果簡圖