

編號：CCMP95-RD-207(2-2)

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(2-2)

李宗諺

長庚大學

摘要

肝臟組織受損與肝纖維化是人類慢性肝臟疾病的兩項主要病徵。細胞凋亡(apoptosis)是細胞死亡的典型變化，研究認為它在肝臟組織受損與肝纖維化的病程中可能扮演著重要的角色。因此調控上述機制與保肝作用有密切關係。細胞實驗以 glycochenodeoxycholic acid (100 μ M, 4 小時)引發初代培養的大鼠肝細胞產生氧化性損傷，透過流式細胞儀來觀察茵陳色黃酮對氧化損傷引發肝細胞內粒線體膜電位改變中動態變化與胞內 ROS 的調控。茵陳色黃酮降低脂質過氧化產物 thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 與提升麩光甘肽 (Glutathione)含量；同時影響細胞凋亡重要指標酵素 caspase-3 的活性與細胞色素 *c* 及血色素基質(heme oxygenase 1)蛋白質的變化。此機轉與由轉錄因子 nuclear factor-kappa B (NF- κ B)與 activator protein-1 (AP-1)的表現有關。

動物實驗也證實總膽管結紮的大鼠來探討茵陳蒿湯對肝臟細胞外基質的影響，及其對肝纖維化過程中蛋白質的影響。組織切片染色的結果顯示膽道結紮後大鼠肝臟有明顯纖維化，而茵陳蒿湯有顯著改善作用。茵陳蒿湯同時抑制肝臟組織中因膽道結紮手術引起的 TIMP-1 及 MMP-2 增加，也抑制血清中 MCP-1 的過度表現。蛋白質體學研究結果顯示有 14 個蛋白質因膽道結紮或茵陳蒿湯的作用而有所變化，其中包括和細胞凋亡相關的細胞骨架蛋白質，膽道結紮引起的 Plectin-1 減少及 Keratin-8、Keratin19 的過度表現都會因茵陳蒿湯的給予而改善。此外，茵陳蒿湯也會影響脂質代謝路徑的相關蛋白質，肝臟纖維化過程中減少的 ApoA-I 及過度表現的 Glycoprotein33 都因茵陳蒿湯而改善。茵陳蒿湯對於膽道傑直引起的 Regucalcin 降低則沒有明

顯的影響。

茵陳蒿湯在之前的研究也證實其可抑制肝細胞凋亡、減少肝臟中氧化壓力與治療肝纖維化。本實驗目的之一為探討肥胖引起肝臟中氧化壓力上升及血液中 EPC 的下降的現象，可否因為茵陳蒿湯的給予而具保護作用。流式細胞儀結果顯示，茵陳蒿湯恢復在給予高脂飼料後 EPC 減少的情形。肝臟 GSH/GSSG 比值在給予茵陳蒿湯治療後皆獲得改善。蛋白質體學分析發現 24 個蛋白質在肥胖的肝臟中表現降低，包含與氧化壓力有關的 peroxiredoxin-6, glutathione S-transferase, and regucalcin，與葡糖糖代謝有關的 fructose-1,6-bisphosphatase 等。茵陳蒿湯治療後，上述肝臟中減少的蛋白質都有增加的表現。總上所述，茵陳蒿湯可以改善肥胖中肝臟氧化壓力的增加，與恢復血液中受損的 EPC 表現，同時也改善醣類與脂質的代謝。

編號：CCMP95-RD-207(2-2)

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

Lee, Tzung-Yan
Chang Gung University

Abstract

The accumulation of hydrophobic bile acids plays a role in the induction of apoptosis and necrosis of hepatocytes during cholestasis. Thus, factors that effect apoptosis may be used to modulate liver fibrosis.

We therefore investigated whether the antioxidant bioactivity of capillarisin (Cap) prevents GCDC-induced hepatocyte damage. Isolated rat hepatocytes were co-incubated with GCDC 100 μ M and Cap 0.5 mg/ml for 4 hours. GSH depletion and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS, measure of lipid peroxidation) increased after GCDC exposure but were markedly suppressed by Cap treatment. Cap protected hepatocytes from GCDC-induced an increase in reactive oxygen species (ROS) generation and mitochondria membrane potential induction by flow cytometry analysis. In addition, Cap has shown to inhibit GCDC-mediated NF- κ B activation by using electrophoretic mobility shift assays (EMSA). In contrast to GCDC, Cap not only significantly decreased cytochrome c release and caspase-3 enzyme activity but also suppressed heme oxygenase-1 protein and mRNA expression in hepatocytes.

On the other hand, Yin-Chen-Hao-Tang (YCHT) is recognized as a hepatoprotective agent for various types of liver diseases. Proteomics approaches were used to study hepatic and serum protein expression changes in bile duct ligated (BDL) rats following YCHT treatment for 27 days. The major effect of YCHT was evident in cytoskeleton related

protein, plectin-1. In addition, proteins involved in metabolism of lipids were also shown to be affected, including low-density lipoprotein receptor-related protein 2 precursor (glycoprotein 330) and apolipoprotein A-I precursor (ApoA-I). Significant up-regulation of keratin 8 and 19 was found in liver tissue of BDL rats. Interestingly, YCHT treatment caused a statistically significant down-regulation in the secretion of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in BDL rats with fibrosis.

Another aim of this study was to determine whether YCHT can ameliorate obesity-related liver oxidative stress and inflammation. Flow cytometry analysis revealed that YCHT could reverse HFD-induced circulating EPC decreasing. GSH/GSSG ratio in liver also decreased significantly in HFD group, and it was reversed by YCHT. Proteomic analysis shown that oxidative stress-related proteins such as peroxiredoxin-6, glutathione S-transferase, and regucalcin and the expression of proteins related to glucose metabolism, such as glucose-regulated protein and fructose-1,6-bisphosphatase, were also decreased in obese hamsters. YCHT reversed the expressions of proteins in the liver. Our results suggested that YCHT may be useful for treatment of liver fibrosis because of its possible anti-apoptotic properties, and the therapeutic effects of YCHT on liver diseases might be associated with its lipid biosynthesis regulation.

壹、前言

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；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，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；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。

本計畫在第一年的研究成果中以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。因此茵陳蒿湯有可能影響肝臟脂質代謝路徑。

肝臟脂質代謝路徑與肥胖的盛行率越來越高度相關，肥胖與疾病的關聯性也讓世界先進國家開始重視肥胖所帶來健康方面的議題。肥胖影響的範圍包含了許多的器官與組織，是屬於系統性的傷害，由於茵陳蒿湯有可能影響肝臟脂質代謝路徑或肝臟功能的表現，文獻也論述肥胖是造成脂肪浸潤肝炎與脂肪肝的主要原因之一，因此，我們在第一年的研究成果中發展此一新方向，探討肥胖與肝臟中氧化壓力，內皮前驅細胞 EPC 三者間的關聯性，釐清肥胖中可能產生的變化，並評估給予茵陳蒿湯後對於肝臟在肥胖中可能的保護機制。

目前肥胖是二十一世紀世界上人類面臨威脅健康最嚴重的問題之一，根據美國西元 2000 年的統計，超過半數的成人有體重過重的問題，截至西元 2007 年為止，BMI (Body Mass Index)指數超過 30 的成人也增長 61%，除了成人的問題之外，同時也有越來越多的青少年與兒童面臨了肥胖的問題，所以這個問題是值得我們去思考與正視的。肥胖產生原因很多，最直接的起因是能量的儲存與利用，在進食後，多餘的能量會被脂肪細胞(Adipocyte)以脂肪(Fat)的方式儲存在脂肪組織中(Adipose tissue)，或是以三酸甘油脂(Triglycerides, TG)的形式堆積在肝臟中，形成肥胖或是脂肪肝(Jernas et al., 2006)。肥胖的存在

可視為健康的危險因子，其所引起代謝症候群(Metabolic syndrome)的疾病包含了胰島素阻抗、高血壓(Knight et al., 2007)、第二型糖尿病等。

除此之外，發現許多發炎因子在肥胖的個體中都有增加的現象，包含 IL-1、IL-6、MCP-1、TGF- β 、Resistin...等(Wellen and Hotamisligil, 2005)，同時在肥胖個體內也因為保護因子如 Adiponectin (Kadowaki et al., 2006)、PPAR α 、PPAR γ (Semple et al., 2006)...等表現降低，所以在受損與保護機制不平衡的情況下，肥胖本身就是處於一種慢性發炎的情形，持續的發炎可能是引起代謝症候群的主要原因。儘管由肥胖形成脂肪性肝疾病的機制還未完全清楚，但是經過許多基礎及臨床的實驗證明，歸納出兩個主要的方向，肝臟的 First hit 與 Second hit (Parekh and Anania, 2007)。First hit 主要是指多餘的脂肪與脂肪酸囤積在肝臟，造成脂肪浸潤(steatosis)的情形，產生 First hit 主要有五個主要的途徑，(1)過多的飲食攝取造成熱量過高而轉為脂肪 (2)肝臟內對於脂肪酸的氧化能力降低(3)增加肝臟中脂肪酸與三酸甘油脂的形成與儲存 (4)增加血液中脂肪酸流入肝臟與 (5)損害肝細胞對於脂肪酸的排出與減少 Apolipoprotein B (ApoB)或是減少肝臟中 very-low-density lipoprotein(VLDL)的轉換，以上原因導致肝臟中胰島素利用敏感度降低，進而造成肝臟中葡萄糖及脂肪代謝失常而產生肝臟的脂肪浸潤造成肝臟的 First hit。Second hit 指的是伴隨著肝臟的 First hit 與肥胖本身由脂肪細胞釋出有關發炎的細胞激素(Wellen and Hotamisligil, 2005)，當發炎激素與訊號傳入肝臟，造成肝臟中(1)氧化壓力上升 (2)有關發炎細胞激素的釋放 (3)肝細胞中粒線體的功能喪失，使肝臟受損而發炎，而形成脂肪浸潤性肝炎。當肝臟處於發炎的狀態下，使氧化壓力的傷害不斷上升，造成肝細胞的凋亡與星狀細胞的活化，在 Second hit 持續啟動的情形下，脂肪浸潤性肝炎將更進一步導致肝纖維化、肝硬化(Farrell and Larter, 2006)或是肝癌的產生，探討以上更為惡化的情況又可稱為肝臟的 Third hit。

脂肪性肝疾病或是脂肪浸潤性肝炎的形成與肥胖有密切的關係，其中氧化壓力扮演很重要的角色(Tamura and Shimomura, 2005)，其成因是因肥胖造成脂肪細胞持續發炎，產生的細胞激素或是由脂肪細胞流出的脂肪酸傳導發炎訊號到肝臟中，此訊號的刺激會使肝臟中氧化壓力升高，造成肝臟對於平衡 ROS 的能力失調而形成氧化壓力的傷害，同時也使肝臟處於慢性發炎的情況。肝臟中氧化壓力的形成與肝臟中 Glutathione (GSH)及其他抗氧化之酵素減少有關，包含了 Catalase(CAT)、Superoxide dismutase (SOD) 等等。這些酵素的產生與

粒線體的功能有很大的關聯性，在肥胖個體中的肝臟，因為脂肪的堆積與慢性的發炎會使粒線體的功能下降(Browning and Horton, 2004)。Kohli R.等人利用長鏈脂肪酸培養液誘導肝細胞，證實了 ROS 的來源與肝細胞中粒線體有關，且 ROS 會造成脂肪堆積在肝細胞中；Pan M.等人發現氧化壓力的上升會導致肝臟中低密度脂蛋白的產生而使脂質過氧化物表現過量而傷害肝臟；Yahagi N.等人在肥胖小鼠上也發現肥胖會造成肝臟中氧化壓力上升同時也使肝臟產生發炎；Ikura Y.等人在臨床試驗上也發現肥胖病人併發脂肪肝疾病的比率超過 50%，而且肝臟中氧化壓力的表現也較正常患者高，而且患有脂肪肝疾病的人也伴隨著其他代謝症候群疾病如糖尿病、高血脂的比例也高達 30%，除上所述，Wieckowska Anna 指出肝臟中氧化壓力上升時造成肝細胞粒線體功能喪失，此時粒線體產生的 ROS 會造成發炎活化 Kuffer Cell，持續分泌發炎的細胞激素，除此之外，肝細胞也會因為 Cytochrome C 活化 Caspase Family 而開始凋亡，此兩條路徑皆會活化星狀細胞，導致肝損傷而形成肝纖維化(Wieckowska et al., 2007)。綜上所述，肥胖造成肝臟中氧化壓力的上升，是造成肝損傷最重要的原因，若能在傷害產生前將氧化壓力消除，可能是治療肥胖產生脂肪性肝疾病或是代謝症候群疾病的重要方向。

內皮前趨細胞(Endothelial progenitor cell, EPC)最早是由 Asahara T 等人發現，由骨髓(Bone marrow)製造的血管幹細胞(Vascular stem cell)，在分化成內皮細胞的過程中會先分化成內皮前趨細胞(EPC)，EPC 藉血液循環至全身，當有內皮組織受損時，組織所釋放的血管內皮生長因子(VEGF)會使 EPC mobilization 並 Homing 在受損部位，其能分化為血管內皮細胞，促進血管新生(Vasculogenesis)，恢復受損組織血流通透性，除此之外，endothelial nitric oxide synthase(eNOS)與 AKT 的訊號傳遞對 EPC 的表現也有很大的影響。EPC 除了本身的功能外，有許多的因子或細胞也會影響 EPC 的功能表現，包含上述的血管內皮生長因子(VEGF)外，CD34、CD133、CD31、CD45、Tie-2...等等(Ueno et al., 2006)，這些因子也是目前測量 EPC 表現重要的標記。EPC 目前在基礎或是臨床的研究上主要集中在心血管方面，有兩個主要大的方向，其一為血管再生(Vascular regeneration)，另一則為血管新生(Angiogenesis)(Werner and Nickenig, 2006)，在研究中也提出 EPC 可當作判斷早期動脈粥狀硬化(Atherosclerosis)的標記，臨床上發現增加 EPC 的表現可以預防不正常的血管收縮(Vasoconstriction)與血栓形成(Thrombosis)(Verma and Anderson,

2002), 此外, EPC 與血管內皮及心血管的健康功能有很大相關性, 低密度脂蛋白(LDL)的堆積會傷害血管等組織, 實驗上發現 EPC 在人體或動物中存在的基礎量是為了去維持血管壁的正常功能, 而且與體內的高密度脂蛋白(HDL)調控有重要關係, 所以 EPC 數量減少可能就是產生心血管疾病的前兆, 如糖尿病(Hill et al., 2003)、高血壓, 在實驗中也發現缺血性疾病中 EPC 數量的表現明顯減少, 而給予藥物除了增加 EPC 的表現, 受傷害的組織或是細胞皆有明顯復原。文獻也指出, EPC 的數量與活性可能是未來疾病預防與治療可能的方向, Cubbon R.M.等人指出 EPC 的功能受損與胰島素阻抗的形成有關, 因為 EPC 的受損也導致內皮細胞的傷害(Cubbon et al., 2007), Gallagher K.A. 等人在實驗中也發現糖尿病小鼠血液中的 EPC 明顯的減少, 並推測與糖尿病患者末梢血液循環不良及傷口不易癒合有關, 經過治療發現 EPC 的表現上升且傷口復原加快。在有關心血管疾病的研究上, Galasso G.等人發現將 EPC 的抗氧化酵素 Peroxidase-1 抑制後, 會損害其本身的功能, 同時引起四肢的末梢缺血以及血管新生的功能也受損, Llevadot J. 與 Dimmeler S.等人在實驗中也證實當 EPC 表現增加, 在臨床上可改善冠狀動脈疾病, 在肝臟疾病中研究中, Nakamura T. 等人以四氯化碳(CCl₄)誘導 Wistar 大鼠肝損傷, 實驗中發現肝硬化時血液及肝臟中 EPC 表現下降, 而將內皮前趨細胞移植到大鼠體內之後, 各種發炎因子 mRNA 的表現與 α -SMA 也明顯降低, 同時生存率也有顯著性的增加。EPC 對於心血管疾病發展的重要性在許多研究中被證實, 但在有關肥胖在肝損傷後對於 EPC 變化的研究卻相對較少, 所以本實驗也試圖以肥胖的動物模型找出肥胖中肝臟與 EPC 變化的機制。EPC 對於心血管疾病發展的重要性在許多研究中被證實, 但在有關肥胖在肝損傷後對於 EPC 變化的研究卻相對較少, 所以本實驗也試圖以肥胖的動物模型找出肥胖中肝臟與 EPC 變化的機制。

對於肥胖的治療方式, 中醫著重於整體的辨證論治, 長久以來一直是建立在以「人」為基礎的實證醫學。「濕熱、痰瘀」為肥胖的病因病機, 其在肝臟中病理的演變可能由於濕熱薰蒸, 蘊結肝膽, 淤阻血絡, 脈道不通而導致排泄不暢, 或者為濕熱淤相互交阻, 而日漸形成痰飲積, 傷及脾胃肝膽與血脈, 也因為此病因病機在於的濕熱淤阻而損傷肝臟, 在中醫臨床治療上常用的治療方劑為茵陳蒿湯, 這也是本研究選擇肥胖動物模型及茵陳蒿湯治療的原由。

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(Stickel et al., 2002)。例如小柴胡湯(Taira et al., 2004; Kusunose et al., 2002; Shimizu, 2000)、茵陳蒿湯(Sakaida et al., 2003; Imanishi et al., 2004; Shoda et al., 2004; Yamamoto et al., 2000; Yamamoto et al., 1996) 或單味藥如丹參(Lee et al., 2003a; Lee et al., 2003b; Huang et al., 2001; Liu et al., 2002)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(Du and You, 2001)。

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(Huang et al., 2004)。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術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

2-1 動物實驗分組

實驗動物分為三組，每組 6 隻倉鼠：

- i. 正常組：給予正常飲食十五週，第十二週開始每天早上(9:00)一次經由胃管(gastric tube)餵食純水三週。
- ii. 高脂肪飼料組：每日灌食液體高熱量飲食三次(早 9:00、中 12:00、晚 17:00)，第十二週開始維持高熱量飲食並於每天早上(9:30)一次經由胃管(gastric tube)餵食純水三週。
- iii. 茵陳蒿湯治療組：每日灌食液體高熱量飲食三次(早 9:00、中 12:00、晚 17:00)，第十二週開始維持高熱量飲食並於每天早上(9:30)一次經由胃管(gastric tube)餵食茵陳蒿湯(250mg/Kg)三週。

2-2 動物實驗流程

實驗過程中在正常組、高脂肪飼料組及茵陳蒿湯治療組均自由攝取普通飼料及飲水；倉鼠進行灌食動作持續十二週到達體重上限，在清醒的狀態下經由胃管分別餵食純水或茵陳蒿湯三週。第十五週動物在麻醉的狀態下拍其外觀差異，犧牲後收取血液及肝臟組織作後續分析。分別切取倉鼠肝臟大葉及中葉，取相同位置的肝臟組織作病理切片，並以 H & E stain 染色；利用蛋白質體學(二維電泳及 MALDI-TOF 質譜分析)分析肝臟組織中蛋白質的表現及作蛋白質分析；以及利用流式細胞儀分析倉鼠血液中 EPC 的表現量。

2-3 液態高脂肪飼料的配置及給予

液態高脂肪飼料自雍立公司購買，此飼料為特殊飼料(編號 5D3H)，液態高脂飼料每份 175 克含 100 克 5D3H、35 克糖及 40 克純水，每公克熱量為 4.8 千卡，普通飼料為長庚大學動物中心提供，每公克熱量為 3.1 千卡，誘導倉鼠肥胖每次給予 2 克的液態高脂飼料，每日三次共 6 克，維持給予高脂肪飼料組與茵陳蒿湯治療組共十五週。

2-4 反轉錄多鏈聚合酶反應(RT-PCR)

實驗動物肝組織，加入適量的 Triazol 溶液，加入 300 μ l 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 1-5 μ g 的 total RNA、1 μ l 的 oligo d(T)₁₆，及 DEPC 水共 4 μ l，70 $^{\circ}$ C 加熱 10 分鐘，加入 15 μ l 緩衝溶液，在 42 $^{\circ}$ C 加熱 2 分鐘，再加入 1 μ l

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 做定量比較。

2-5、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°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°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°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。

2-6 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±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 動物外觀(如附圖 1)

照片左邊為餵食正常飼料倉鼠，右邊為餵食高脂肪飼料倉鼠，正常組倉鼠毛色光亮且排列整齊，餵食高脂肪飼料的肥胖倉鼠毛色較暗淡且混亂，而且肥胖組倉鼠體型比正常組倉鼠大，可從其臀圍以及腰圍大小觀察得知。

3-2 腹腔外觀(如附圖 2)

照片左邊為餵食正常飼料倉鼠，右邊為餵食高脂肪飼料倉鼠，正常組腹腔中脂肪較少且肝臟較小，餵食高脂肪飼料肥胖倉鼠腹腔中明顯有脂肪囤積且肝臟較正常組大。

3-3 肝臟外觀(如附圖 3)

照片左邊為餵食正常飼料倉鼠，右邊為餵食高脂肪飼料倉鼠，正常組老鼠肝臟顏色鮮紅且表面光滑，餵食高脂肪飼料肥胖倉鼠肝臟較正常倉鼠大且肝臟顏色較暗淡，無光亮血色的表現，且高脂肪飼料組肥胖老鼠的肝臟表面比較正常組也顯得較為粗糙。

3-4 血清生化檢驗數據(如表一)

檢驗三組倉鼠血清中各項生化值，ALT、AST、Creatinine、Cholesterol、Glucose 在三組織間無明顯變化。Triglyceride 在餵食高脂肪飼料組明顯高於正常組，給予茵陳蒿湯組治療組 Triglyceride 有比餵食高脂肪飼料組稍低的趨勢，但無明顯統計意義。

3-5-1 中央靜脈周圍(如附圖 4)

肝臟組織中的細胞核染色後呈現深藍色；細胞質與細胞骨架等均染成紅色，正常組(圖 A, D)中中央靜脈周圍的肝細胞呈多角形，細胞核較大，為卵圓形，核仁明顯且細胞排列整齊。餵食高脂肪飼料倉鼠肝臟切片(圖 B, E)顯示在中央靜脈周圍的肝細胞呈不規則狀，細胞核核仁出現空心狀且較不明顯，細胞質中出現脂肪堆積而造成的空洞，細胞的排列較正常組鬆散。給予茵陳蒿湯治療組(圖 C, F)則看到中央靜脈周圍肝細胞形狀趨於正常組表現，細胞核核仁較明顯，且細胞排列也較高脂肪飼料組整齊，整體表現趨近於正常組。

3-5-2 肝臟靜脈周圍(如附圖 5)

肝臟組織中的細胞核染色後呈現深藍色；細胞質與細胞骨架等均染成紅色，正常組(圖 A, D)肝門靜脈周圍的肝細胞呈多角形，細胞核較大，為卵圓形，核仁明顯且細胞排列整齊。餵食高脂肪飼料倉鼠肝臟切片(圖 B, E)顯示在肝門靜脈周圍的肝細胞呈不規則狀且周圍有顆粒球的浸潤，正常組的顆粒球表現則相對較少，給予茵陳蒿湯治療後

則趨近於正常組。

3-6 肥胖及茵陳蒿湯治療對肝臟蛋白質表現的影響

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，正常組 V.S 高脂肪飼料組(如附圖 6)、高脂肪飼料組 V.S 茵陳蒿湯治療組(如附圖 7)，經過電腦比對後在正常組 V.S 高脂肪飼料組中圈選出 27 個差異點，高脂肪飼料組的蛋白質量減少，低於正常組的一半(如附圖 8)，在高脂肪飼料組 V.S 茵陳蒿湯治療組中以同樣方式圈選了 33 個差異點，再給予茵陳蒿湯治療後減少的蛋白質有明顯的恢復，其量為高脂肪飼料組的兩倍以上(如附圖 9)。

再利用 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；在正常組 V.S 高脂肪飼料組中鑑定出 27 個蛋白質(如表二)，高脂肪飼料組 V.S 茵陳蒿湯治療組中鑑定出 33 個蛋白質(如表三)。

3-7 肥胖及茵陳蒿湯治療對血液中 EPC 的影響

利用流式細胞儀測量血液中 EPC 之表現，左下角為血液中所有細胞之表現，圖中利用 CXCR4 標定 X 軸，VEGFR2 標定 Y 軸，此兩抗體會與 EPC 結合並表現螢光，EPC 則表現在此兩抗體均呈現之雙陽性處(右上角)。A 圖為未加抗體之倉鼠血液，EPC 表現 0%；B 圖為正常組倉鼠血液，EPC 表現 0.49%；C 圖為高脂肪飼料組倉鼠血液，EPC 表現 0.23%；D 圖為茵陳蒿湯治療組倉鼠血液，EPC 表現 0.63%。(如附圖 10)

將流式細胞儀分析 EPC 表現之數據經過統計軟體分析，以正常組(n=5)為 100% 對照組，高脂肪飼料組(n=5)相較於正常組表現為 $42 \pm 0.3\%$ ，茵陳蒿湯治療組(n=4)則為 92%。餵食高脂肪飼料組倉鼠血液中 EPC 的表現量較正常組下降，給予茵陳蒿湯療後有恢復 EPC 表現的情形。

四、討論與結論

肝臟外觀上發現正常組肝臟顏色較為鮮紅，在高脂肪飼料組則較為黯淡，並顯得較為粗糙，對照肝臟切片的結果，顯示在中央靜脈周圍肝細胞排列較散亂，肝細胞出現脂肪浸潤。過去在 Han L.K. 等人及 Kim J.Y. 等人發現肥胖過程會導致血清內 TG 與 ALT、AST 明顯升高(Kim et al., 2007)，但本實驗結果 ALT、AST 在三組間無變化，僅 TG 在正常組與高脂肪飼料組有差異，給予茵陳蒿湯治療後 TG 有下降的趨勢。本實驗結果與目前所提出肝臟的 F1st hit 論點較為符合，肝臟可能因為高脂飼料的給予造成肝臟中過多的 TG 與 FFA 堆積，而產生脂肪性肝損傷，此時肝臟中某些特定保護的機制較正常組低落。

肥胖對肝臟中特定蛋白質的影響及茵陳蒿湯的作用

本實驗蛋白質體學結果顯示肥胖肝臟中有許多與特定功能相關蛋白質表現均較正常組低，與 Gerhard M. 等人以蛋白質體學分析肥胖小鼠脂肪組織、肌肉及肝臟結果有許多相同之處(Schmid et al., 2004)，以下將個別討論三組間變化之蛋白質對肝臟及心血管疾病之影響。

Regucalcin

Regucalcin 又名 Senescence marker protein-30 (SMP30)，分子量為 30kDa，與體內鈣離子調控及老化有關，於 1978 年首次被 Yamaguchi M. 等人發現(Yamaguchi and Yamamoto, 1978)。此蛋白質主要存在大鼠的肝臟及腎臟中，在小鼠則只存在肝臟中，而在肝臟中主要分布於肝細胞的細胞質(Fujita et al., 1996)。人體內亦有 Regucalcin 的存在，且在肝臟中表現特別明顯。根據胺基酸序列的分析顯示，大鼠的 Regucalcin 和人類相似度達 88.9%，小鼠的 Regucalcin 相似度更高達 94.3%(Fujita et al., 1995)。

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，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(Fujita, 1999)，Regucalcin 可以活化鈣離子幫浦酵素(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。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(Yamaguchi and Mori, 1990)。

Regucalcin 另一個作用是抑制肝細胞中受鈣離子調控的 Protein

kinases(包括 Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase、Protein kinase C、及 Tyrosine kinase) (Omura and Yamaguchi, 1999b)、Protein phosphatases(Omura and Yamaguchi, 1999a)及一氧化氮合成酶，Regucalcin 可以作用在蛋白質分解酶活化位置的 SH groups。

Regucalcin 存在肝細胞中，當肝臟再生時，Regucalcin 會從細胞質進入細胞核，使核中的含量增加，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；且其對於肝癌細胞增生也有抑制的作用，表示 Regucalcin 在維持細胞恆定上有其重要影響。

動物實驗證實缺乏 Regucalcin 的小鼠其肝細胞對腫瘤壞死因子 (TNF α)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，可能是透過 Regucalcin 對鈣離子調控的作用，因為 TNF α 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，過去針對初代培養肝細胞進行蛋白質體學的研究也發現，TNF α 的刺激會誘發細胞中 Regucalcin 的表現以減少細胞凋亡；此外，Regucalcin 可以抑制肝細胞核中鈣離子所引發的 DNA 斷裂，因為 Regucalcin 可以抑制肝細胞核上的鈣離子-ATPase 的活性。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(Fujita, 1999)。除了年齡的因素，慢性肝臟損傷也會使肝臟及腎臟的 Regucalcin 基因表現降低(Yamaguchi, 2000)。因為肝臟損傷時，肝細胞中的 Regucalcin 會被釋放至血液中，因此 Regucalcin 可以當作慢性肝病的一個檢測標誌。

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

本實驗結果顯示 Regucalcin 在正常倉鼠肝臟中有一定的表現，以高脂肪飼料誘導倉鼠肥胖之後，Regucalcin 表現量明顯下降。過去在 Thioacetamide (TAA)、四氯化碳(CCl_4)誘發大鼠肝纖維化的研究，肝臟中氧化壓力升高，使肝細胞在纖維化的過程中大量死亡而被細胞外基質取代，導致肝臟中 Regucalcin 減少(Isogai et al., 1994)。本實驗發現茵陳蒿湯對於肥胖小鼠肝臟中減少的 Regucalcin 有明顯的恢復作用，原因可能是降低氧化壓力，促進肝細胞再生，所以茵陳蒿湯對於肥胖所引起的肝損傷可能具有保護作用。

熱休克蛋白(Heat shock protein)

熱休克蛋白(Heat Shock Protein, HSP) 最早由 Ritossa F. 發現，研究發現當果蠅受熱刺激時，其唾液腺細胞染色體出現蓬鬆現象，在該

細胞內含有一種特殊類型的蛋白質，因與熱刺激有關，故取名為熱休克蛋白。

HSP 是分子量在 7~200kD 之間的蛋白大家族，根據其分子量大小可分為：110kD 的 HSP，位於細胞質或細胞核中；90kD 的 HSP 家族，包括 HSP90 和 Grp94，前者位於細胞質，後者位於內質網；70kD 的 HSP 家族，包括 HSC70、Grp78 和 Grp75，分別位於細胞質，內質網和線粒體；60kD 的 HSP，位於線粒體；低分子量 HSP，分子量 20000~30000，位於細胞漿或細胞核中；10kD 的 HSP，位於線粒體；泛素 (ubiquitin)，分子量為 8000，位於細胞質或細胞核(Schlesinger, 1990)。

HSP 種類繁多，且其共同的顯著特點是結構的保守性，從昆蟲到人類所產生的 HSP 有共同的形態結構，其基因的編碼序列與人類有很多相同之處，為人類發現最為保守的蛋白質。生物在長期進化中，HSP 是保留下來對抗損害進行自我保護的重要機制之一。

HSP 在細胞內的含量相當高，約占細胞總蛋白質的5%，是一種維持細胞生命所需的蛋白質，主要是維持細胞之生理機能，如幫助細胞內蛋白質轉位、協助變性蛋白質形成正確的三度空間折疊結構及聚集組合維持其生理功能，達到保護細胞的作用(Lindquist and Craig, 1988)，故又稱為molecular chaperoner。細胞於正常情形下即有固定的表現量，一但動物細胞受到逆境，如高溫、高滲透壓、化學藥物即病毒感染刺激時，細胞就會迅速合成大量的各種HSP以阻止細胞內突變型蛋白質p53、p21的累積以及修補突變蛋白質，增加細胞免疫能力，即抗病源能力。當細胞內在的變化或外在的刺激造成細胞傷害時，HSP 會大量表現保護細胞免於凋亡(Mailhos et al., 1993)。細胞內在物質的改變主要包含粒線體外膜透化 (mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP)、cytochrome C 的釋放，以及caspase 家族的活化，可能是透過AKT 與JNK 路徑而活化)；外在刺激造成細胞死亡主要是因為Fas-associated death domain-dependent(FADD-dependent)，活化caspase-8 以及NF- κ B 而引起TNF 的表現造成細胞死亡。HSP 可以直接抑制引起細胞凋亡的訊號傳遞及NF- κ B的表現，藉此促進細胞的存活能力(Beere H.M. 2005)。

目前探討 HSP 與疾病關聯的研究相當多，主要集中在肝臟疾病(肝纖維化)、心血管疾病、代謝症候群及癌症方面，但對於肥胖與初期肝損傷的論述相對較少。本實驗結果顯示 HSP70 及 HSP60 在三組間有明顯的變化，在肥胖組中 HSP70 明顯減少，給予茵陳蒿湯治療之後 HSP70 及 HSP60 皆恢復正常的表現量。

熱休克蛋白-70 (Heat shock protein 70, HSP70)

HSP70為位置表現在70kDa的熱休克蛋白，存在體內各組織中。過去的研究指出HSP70為與氧化壓力相關的蛋白質，且可調控粒線體的功能(Beere, 2005)。Calabrese V. 實驗證實HSP70影響體內iNOS表現，且與氧化及抗氧化平衡的機制有關。HSP70可抑制粒線體釋放cytochrome C到細胞質中，因此可阻斷因下游caspase活化引起的細胞凋亡。Song J.Y. 使用剔除HSP70基因表現的老鼠，發現其面對CCl₄所引起的急性肝損傷時，受損的情況較正常老鼠嚴重，此外，Xu Q. 在實驗中證實HSP70對於血管具有保護作用(Xu et al., 1997)，且在肝臟缺血性損傷中也有其重要的保護角色。而肥胖導致肝臟HSP70表現下降，可能使肝臟面對氧化壓力上升時，保護能力降低，進而引起肝細胞的凋亡，活化肝纖維化路徑，及肥胖可能造成的心血管疾病。

熱休克蛋白-60 (Heat shock protein 60, HSP60)

HSP60為表現位置在60kD的熱休克蛋白(Cheng et al., 1990)，結構為由胺基酸單體構成，並以疏水端相斥作用構成雙圓環(Fenton et al., 1994)，是典型存在粒線體中的熱休克蛋白(Itoh et al., 2002)。最早由Gupta R.S. 於1995年發現HSP60存在於哺乳類動物的粒線體中(Gupta, 1995)，Itoh H. 等人在2002年時更進一步證實HSP60在細胞質中也會表現，並與許多生理調控有關(Itoh et al., 2002)。

與HSP60表現相關的生理功能很多，除了調節粒線體中ATP的降解與能量的生成外(Koll et al., 1992)，亦會調控粒線體DNA使正常表現(Kaufman et al., 2003)；HSP60在免疫的調控扮演重要的角色，同時對於癌細胞也有抑制的作用。

探討HSP60與心血管疾病間的關聯，Puijvelde G.H. 等人發現HSP60的表現可增加體內調節T細胞的數量，藉此減少LDLr^{-/-}小鼠發炎的現象，並改善動脈粥狀硬化；Chan J.Y. 實驗證實HSP60可抑制iNOS的表現，以及阻斷因傷害造成粒線體釋出cytochrome C活化caspase而產生細胞凋亡的路徑，而達到心血管的保護作用；此外HSP60的減少可能與內皮細胞功能喪失，甚至動脈粥狀硬化等心血管疾病的形成有關。糖尿病導致氧化壓力上升會使HSP60降低；在Lai H.C. 等人實驗中發現糖尿病小鼠HSP60減少，且可能降低胰島素受體的表現；臨床上發現糖尿病人血循中HSP60較正常人少，而HSP60的減少與糖尿病衍生的其他併發症，如末梢循環不良，高血壓等心血管疾病可能有關，更進一步證實HSP60在心血管疾病或是代謝症候群都可能扮演重要的調控角色。

HSP60 在肝臟中亦扮演重要的角色，對於肝臟移殖後可能產生的缺血性傷害，HSP60 可減少傷害的程度(Faybik et al., 2004)；Motoyama S. 等人發現肝臟在缺氧的情況，HSP60 會表現上升並促進粒線體活化以供給更多的能量；實驗證實 HSP60 可降低因 LSP 而活化的 Kupffer cell 之活性，進而減少肝臟因發炎而造成的損傷。

綜上所述，HSP60 及 HSP70 對於生理調控扮演重要的角色，本實驗中發現肥胖倉鼠 HSP60 及 HSP70 皆表現降低，且觀察組織切片染色，發現肝臟與胸主動脈有受損之情形，而給予茵陳蒿湯治療後，HSP60 與 HSP70 表現量皆增加，且肝臟組織與胸主動脈受損情況均獲得改善，所以 HSP60 與 HSP70 可能與肝臟氧化壓力的上升及內皮組織的功能有重要的相關性。

麩胱甘肽硫轉移酶(Glutathione S-transferase, GST)

麩胱甘肽硫轉移酶(Glutathione S-transferase, GST)是生物轉換系統 Phase II 中重要的酵素，分子量約為 50kDa，在哺乳動物中分為六大類，主要存在細胞質與粒線體中。

GST 的主要功用是催化 Xenobiotics 與 GSH 的結合作用，增強產物與水的親和力，以利排除(Norppa et al., 1995)，同時其也可透過非催化的化學結合方式排除傷害細胞與組織的化學物質。GST 的受質包括許多氧化產物，其抗氧化壓力的表現與 SOD 以及 Glutathione peroxidase 類似，其機制可能是透過抑制 JNK 的活性(Adler et al., 1999)，調節 ROS 導致氧化壓力的傷害(Strange and Fryer, 1999)。

GST 可抑制肥胖的形成，減少肥胖個體因氧化壓力導致的傷害，同時也可增加胰島素利用的敏感度；此外，GST 在脂肪及醣類代謝上也扮演重要的角色，Shrilatha B. 等人證實糖尿病鼠對於脂肪及醣類代謝功能喪時的情形與 GST 的活性下降有關，臨床上也發現 GST 可保護因糖尿病所導致的傷害(Hori et al., 2007)；GST 可活化 GSH 去除 ROS，避免內皮細胞的凋亡，抑制動脈粥狀硬化的形成(Ranganna et al., 2007)。

GST 能夠代謝肝臟脂質過氧化物 MDA，避免肝臟受到氧化壓力的傷害(Tong et al., 2005)；此外，GST 對於肝臟中脂質代謝及抑制肝細胞凋亡皆有作用，本實驗結果顯示 GST 在肥胖組中明顯減少，同時也偵測到肝臟氧化壓力上升，給予茵陳蒿湯治療後 GST 與氧化壓力則恢復相似於正常組倉鼠的表現，顯示茵陳蒿湯的保肝效果及 GST 對於肝臟的重要性。

Electron transfer flavoproteins (ETFs)

Electron transfer flavoproteins(ETFs) 是電子傳遞鏈反應中重要的蛋白質，其可催化黃酮類蛋白質的電子轉移，主要存在動物的粒線體(Thorpe, 1991)。哺乳類動物的 ETFs 為 heterodimer 的結構，包含輔助因子 FAD (flavin adenine dinucleotide) 與 AMP (Adenosine monophosphate)，可促進電子轉移到 electron transfer flavoprotein dehydrogenase (Roberts et al., 1996)。

ETFs 在粒線體中主要與脂肪酸、胺基酸、膽鹼(choline)等物質的代謝成黃酮類化合物有關，又稱為 ETF-CoQ oxidoreductase，且 ETF 輔因子 FAD 可與 NADH 結合，催化其代謝，減少粒線體膜上氧化壓力增加，可抑制因粒線體 ROS 釋出所導致的細胞凋亡(Wieckowska et al., 2007)。

肥胖源自於脂肪的堆積，是因為 ETFs 代謝脂肪酸的能力受損，進一步引起脂肪性病變，造成氧化壓力上升及發炎反應的傷害(Kahn and Flier, 2000)，此可能導致如糖尿病等代謝症候群的產生(Boudina et al., 2007)；肥胖同時也是導致心血管疾病的重要因子(Cao, 2007)，而脂肪性病變引起 NADPH 上升而造成氧化壓力的傷害是疾病形成的主要原因之一(Cai and Harrison, 2000; Cubbon et al., 2007)，所以 ETFs 在肥胖可能導致的代謝症候群及心血管等疾病上可能扮演重要的角色。

肝臟是能量代謝重要的臟器，經由肝臟中粒線體的電子傳遞鏈過程產生 ATP。當 ETFs 活性降低時可能導致粒線體功能喪失，使其產生 GSH 抗氧化壓力的表現下降(Piecznik and Neustadt, 2007)，同時也使其代謝脂肪酸的重要機制 β -oxidation 減弱(Zhang et al., 2007)，而形成脂肪肝，所以 ETFs 在粒線體正常生理功能扮演重要的調控作用。本實驗結果發現肥胖組 ETFs 的較正常組明顯下降，顯示肥胖組對於脂肪的代謝可能產生問題，同時也伴隨著氧化壓力的上升，而茵陳蒿湯組 ETFs 則恢復正常表現，顯示茵陳蒿湯對於此肥胖造成肝臟代謝脂肪受損情形有改善的效果。

Peroxiredoxins 6 (Prdx6)

Peroxiredoxins 是哺乳類動物細胞中常見的抗氧化酵素家族，可調控因細胞激素引起過氧化的訊號傳遞刺激，其主要有六個成員，Peroxiredoxins 6 (Prdx6)為其中之一(Hofmann et al., 2002)。Prdx6 在細胞主要的功能是催化 H_2O_2 的代謝，Manevich Y. 及 Wang Y. 等人發現 Prdx6 可抑制 ROS 的表現，減少細胞毒性造成組織或細胞的損傷；在 Prdx6 基因剔除小鼠發現對於氧化性傷害的情形會比正常小薯更為嚴重(Wang et al., 2003)，說明了 Prdx6 在抗氧化的重要性。

肥胖個體中氧化壓力造成組織的損傷，進一步引起發炎反應，可能是造成糖尿病、心血管疾病及肝炎的主要原因(Shoelson et al., 2006)。Prdx6 在氧化壓力的平衡中扮演了重要的角色，本實驗結果發現肥胖倉鼠中 Prdx6 明顯減少，此發現與 HSP70 的表現相同，顯示肝細胞抗氧化能力降低，肝臟氧化壓力升高，可能使肝臟的代謝功能受損，給予茵陳蒿湯治療後，Prdx6 的表現恢復正常，顯示茵陳蒿湯保肝的作用與提升肝臟抗氧化的機制可能有關。

醛脫氫酶(Aldehyde dehydrogenase, ALDH)

醛去氫酶(Aldehyde dehydrogenase, ALDH)是能夠催化醛類氧化的酵素，在哺乳動物中主要有三種不同的形式，第一型(ALDH1)主要表現在細胞質中、第二型(ALDH2)存在於粒線體、第三型(ALDH3)則於內質網中表現(Lindahl and Petersen, 1991)，此三種不同形式的 ALDH 主要都是透過 $RCHO + NAD(P)^+ + H_2O \leftrightarrow RCOOH + NAD(P)H + H^+$ 此途徑催化芳香族(Aromatic)與脂肪族(Aliphatic)之醛類，使之轉變成酸類，幫助細胞對抗有毒醛類的傷害。

ALDH 的基因家族到目前為止已知有 16 個基因，但絕大多數基因的表現具有高 Km 值，或是僅存於少數的人種。ALDH1 及 ALDH2 在身體各組織皆存在，但在肝臟中的活性最高，而人類體內乙醛之代謝主要由低 Km 之 ALDH2 負責(Goedde et al., 1992)。所以目前在關於 ALDH 研究上發現主要集中於探討 ALDH2 的功用。

ALDH2 在許多疾病當中都扮演重要的角色，Hui P. 等人在臨床上的研究發現過量飲酒病人血液中 ALDH2 的減少是自發性高血壓形成的重要因素；Wenzel P. 等人在 ALDH2 基因剔除的小鼠發現，其心臟粒線體的 ROS 大量釋放造成氧化壓力的上升，可能是造成損傷的主要原因，證實 ALDH2 具有抗氧化的能力以及保護心血管的功用。此外，ALDH2 與血糖恆定的研究中，發現其與胰島素的訊號傳遞有關，Murata C. 等人在臨床上發現 ALDH2 的活性下降會造成胰島素阻抗的情形，而造成血糖過高(Murata et al., 2000)；所以 ALDH2 的減少可能是產生糖尿病或者代謝症候群等疾病的危險因子(Dakeishi et al., 2008)。

肝臟醣質新生與醣類代謝的過程中 ALDH2 皆扮演關鍵性的角色(Lindahl and Petersen, 1991)；Boon 等人發現 ALDH2 可代謝因氧化壓力造成脂質過氧化產生之毒性產物；同時也抑制因 ROS 而引起的肝細胞凋亡；此外，ALDH2 可調控許多醣類及脂肪代謝之酵素，在肥胖

個體中表現下降可能會導致非酒精性脂肪肝及代謝症候群等疾病的形成(Murata et al., 2000)。

本實驗結果發現肝臟 ALDH 在肥胖倉鼠中明顯減少，可能導致肝臟抗氧化壓力能力下降，給予茵陳蒿湯後肝臟 ALDH 表現明顯恢復，推測茵陳蒿湯可能改善氧化壓力的傷害，進而恢復肝臟對醣類及脂肪的代謝能力。

果糖 1,6-二磷酸酶(Fructose-1,6-bisphosphatase, FBPase)

果糖 1,6-二磷酸酶(Fructose-1,6-bisphosphatase, FBPase)在 1983 年首次被 Tejwani 發現，存在於哺乳動物的肝臟及肌肉組織中，其可催化碳水化合物水解及調控乳酸的代謝，是糖質新生過程中重要的酵素。

Pérez J.X. 等人在肥胖大鼠中發現 FBPase 與體內胰島素的利用有關，且可調控肝臟中葡萄糖產物的形成，與肥胖及代謝症候群的形成有明顯的相關性，臨床上也發現 FBPase 表現失衡導致醣類代謝功能喪失，是引起肥胖而導致糖尿病的可能原因。

FBPase 是肝臟中重要的酵素，其主要的功能是藉由調節 glycerol 而調控肝臟中的糖質新生與糖質分解，其重要性在各種動物模式，包含 New Zealand Obese(NZO) mice(Andrikopoulos and Proietto, 1995)，db/db mice(Chang and Schneider, 1970)，ob/ob mice(Seidman et al., 1967)，fa/fa rat(Taketomi et al. 1975)以及高脂肪誘導小鼠中均發現 FBPase 的減少會導致肝臟對於醣類的生合成無法正常運作，減少葡萄糖的耐受性及胰島素利用的敏感度，而增加內生性葡萄糖產物(endogenous glucose production, EGP)，進而可能造成糖尿病與心血管疾病的產生。此外，Liu S.P. 等人在 Glycine N-methyltransferase 基因缺乏小鼠發現肝臟有明顯的損傷，同時也發現小鼠肝臟中 FBPase 明顯減少，其推測 FBPase 對於肝損傷也有保護的作用。

本實驗中發現在肥胖組倉鼠肝臟中 FBPase 較正常組明顯減少，且肥胖組肝臟切片顯示可能有輕微發炎與脂肪浸潤的現象，與過去研究肝臟中 FBPase 表現降低時，可能造成醣類代謝失常而影響脂肪代謝結果相似，說明了 FBPase 對保護肝臟的重要性，而給予茵陳蒿湯治療後，FBPase 在肝臟中明顯恢復，顯示茵陳蒿湯可能是透過 FBPase 影響肝臟中醣類與脂肪的代謝，而達到保護的作用。

肥胖對心血管的影響及茵陳蒿湯的作用

肥胖除了影響肝臟的功能之外，許多研究證實也肥胖與心血管疾病之關係(Knight et al., 2007)，本實驗也評估肥胖對心血管的損傷，胸

主動脈切片顯示肥胖倉鼠內皮細胞受損，過去許多研究已證實了 EPC 與內皮細胞功能之關聯，本實驗結果顯示 EPC 在高脂肪飼料組中明顯減少，EPC 的減少與心血管之損傷有關，給予茵陳蒿湯治療之後，EPC 的表現明顯恢復與正常組相似(圖 12,13)，間接證實茵陳蒿湯可能對於心血管具有保護作用。

結論與建議

研究結果證實茵陳蒿湯對高脂肪飼料誘導之肥胖倉鼠肝臟中抗氧化與生理代謝功能相關之蛋白質表現有所影響，同時對於血液中 EPC 的表現也有恢復作用。

肥胖是造成脂肪肝的主要原因，更可能進一步惡化成為脂肪浸潤性肝炎，本實驗在肝臟切片與肝臟蛋白質體學結果的佐證下，推測肥胖經由脂肪細胞及血管病變產生的發炎訊號，使肝臟中 Regucalcin 及 HSP70 等抑制 ROS 表現之蛋白質減少，引起肝臟中氧化壓力上升，而導致如 GST、ETF、Prdx6 具抗氧化能力蛋白質減少，使肝臟調控醣類及脂肪代謝之能力降低，實驗結果也發現相關蛋白質之減少，而給予茵陳蒿湯後則改善了肥胖所造成肝臟的傷害。

本實驗研究重點著重在肥胖，研究結果可做出兩個重要的結論，(1)肥胖本身對於肝臟的損傷，其主因來自於脂肪組織發炎與血管病變的訊號，此兩者影響了肝臟中重要蛋白質的功能，減低了肝臟的抗氧化能力及對於醣類、脂肪的代謝功能，而造成肝臟的病變 (2)過去實驗中發現茵陳蒿湯可以改善藉由減少肝臟的氧化壓力而達到治療肝纖維化的效果，本實驗中發現茵陳蒿湯對於相對早期的肝損傷也具有預防的作用，同時其可恢復因肥胖而造成血液中 EPC 的減少，說明了茵陳蒿湯除了在保肝的效果外，對於心血管的臨床意義也值得進一步去探討。

本實驗的結果也說明，在肝疾病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，中醫在治療肝疾病或因為肝臟損傷引起的代謝異常機制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或我們的研究成果正好說明了中醫藥在此這方面的重要性與潛力(如彩色附錄圖 A)。

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. Adler V, Yin Z, Tew KD, Ronai Z. (1999) Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene*, 18: 6104-11.
2. Andrikopoulos S, Proietto J. (1995) The biochemical basis of increased hepatic glucose production in a mouse model of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, 38: 1389-96.
3. Beere HM. (2005) Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *J Clin Invest*, 115: 2633-39.
4. Browning JD, Horton JD. (2004) Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest*, 114: 147-152
5. Cai H, Harrison DG. (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*, 87: 840-844.
6. Cao Y. (2007) Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. *J Clin Invest*, 117: 2362-2368.
7. Chang AY, Schneider DI. (1970) Abnormalities in hepatic enzyme activities during development of diabetes in db mice. *Diabetologia*, 6: 274-278.
8. Cheng MY, Hartl FU, Horwich AL. (1990) The mitochondrial chaperonin hsp60 is required for its own assembly. *Nature*, 348: 455-8.
9. Cubbon RM, Rajwani A, Wheatcroft SB. (2007) The impact of insulin resistance on endothelial function, progenitor cells and repair. *Diab Vasc Dis Res*, 4: 103-11.
10. Dakeishi M, Murata K, Sasaki M, Tamura A, Iwata T. (2008) Association of Alcohol Dehydrogenase 2 and Aldehyde Dehydrogenase 2 Genotypes with Fasting Plasma Glucose Levels in Japanese Male and Female Workers. *Alcohol Alcohol*. 43: 143-7.
11. Du B, You S. (2001) Present situation in preventing and treating liver fibrosis with TCM drugs. *J Trad Chin Med*, 21:147-52.
12. Farrell GC, Larter CZ. (2006) Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology*, 43: S99-S112
13. Fenton WA, Kashi Y, Furtak K, Horwich AL. (1994) Residues in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and release. *Nature*, 371: 614-9.
14. Fujita T, Mandel JL, Shirasawa T, Hino O, Shirai T, Maruyama N. (1995) Isolation of cDNA clone encoding human homologue of senescence marker protein-30 (SMP30) and its location on the X

- chromosome. *Biochim Biophys Acta*, 1263: 249-52.
15. Fujita T, Shirasawa T, Maruyama N. (1996) Isolation and characterization of genomic and cDNA clones encoding mouse senescence marker protein-30 (SMP30). *Biochim Biophys Acta*, 1308: 49-57.
 16. Fujita T. (1999) Senescence marker protein-30 (SMP30): structure and biological function. *Biochem Biophys Res Commun*, 254: 1-4.
 17. Goedde HW, Agarwal DP, Fritze G, Meier-Tackmann D, Singh S, Beckmann G, Bhatia K, Chen LZ, Fang B, Lisker R. (1992) Distribution of ADH2 and ALDH2 genotypes in different populations. *Hum Genet*, 88: 344-6.
 18. Gupta RS. (1995) Evolution of the chaperonin families (Hsp60, Hsp10 and Tcp-1) of proteins and the origin of eukaryotic cells. *Mol Microbiol*, 15: 1-11.
 19. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. (2003) Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*, 348: 593-600.
 20. Hofmann B, Hecht HJ, Flohe L. (2002) Peroxiredoxins. *Biol Chem*, 383: 347-364.
 21. Hori M, Oniki K, Ueda K, Goto S, Mihara S, Marubayashi T, Nakagawa K. (2007) Combined glutathione S-transferase T1 and M1 positive genotypes afford protection against type 2 diabetes in Japanese. *Pharmacogenomics*, 8: 1307-14.
 22. Huang W, Zhang J, Moore DD. (2004) A traditional herbal medicine enhances bilirubin clearance by activating the nuclear receptor CAR. *J Clin Invest*, 113: 137 – 43.
 23. Huang YT, Lee TY, Lin HC, Chou TY, Yang YY, Hong CY. (2001) Hemodynamic effects of *Salvia miltiorrhiza* on cirrhotic rats. *Can J Physiol Pharmacol*, 79:566-72.
 24. Imanishi Y, Maeda N, Otagawa K, Seki S, Matsui H, Kawada N, Arakawa T. (2004) 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*, 41:242-50
 25. Isogai M, Shimokawa N, Yamaguchi M. (1994) Hepatic calcium-binding protein regucalcin is released into the serum of rats administered orally carbon tetrachloride. *Mol Cell Biochem*, 131: 173-9.

26. Itoh H, Komatsuda A, Ohtani H, Wakui H, Imai H, Sawada K, Otaka M, Ogura M, Suzuki A, Hamada F. (2002) Mammalian HSP60 is quickly sorted into the mitochondria under conditions of dehydration. *Eur J Biochem*, 269: 5931-8.
27. Jernas M, Palming J, Sjöholm K, Jennische E, Svensson PA, Gabrielsson BG, Levin M, Sjögren A, Rudemo M, Lystig TC, Carlsson B, Carlsson LM, Lonn M. (2006) Separation of human adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression. *Faseb J*, 20: 1540-1542.
28. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. (2006) Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*, 116: 1784-92.
29. Kahn BB, Flier JS. (2000) Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*, 106: 473-48
30. Kaufman BA, Kolesar JE, Perlman PS, Butow RA. (2003) A function for the mitochondrial chaperonin Hsp60 in the structure and transmission of mitochondrial DNA nucleoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, 163: 457-61.
31. Kim H, Baumann H. (1999) Dual signaling role of the protein tyrosine phosphatase SHP-2 in regulating expression of acute-phase plasma proteins by interleukin-6 cytokine receptors in hepatic cells. *Mol Cell Biol*, 19: 5326-38.
32. Knight SF, Quigley JE, Yuan J, Roy SS, Elmarakby A, Imig JD. (2007) Endothelial Dysfunction and the Development of Renal Injury in Spontaneously Hypertensive Rats Fed a High-Fat Diet. *Hypertension*. 51: 352-9.
33. Koll H, Guiard B, Rassow J, Ostermann J, Horwich AL, Neupert W, Hartl, FU. (1992) Antifolding activity of hsp60 couples protein import into the mitochondrial matrix with export to the intermembrane space. *Cell*, 68: 1163-75.
34. Kusunose M, Qiu B, Cui T, Hamada A, Yoshioka S, Ono M, Miyamura M, Kyotani S, Nishioka Y. (2002) Effect of Sho-saiko-to extract on hepatic inflammation and fibrosis in dimethylnitrosamine induced liver injury rats. *Biol Pharm Bull*, 25:1417-21.
35. Lee TY, Mai LM, Wang GJ, Chiu JH, Lin YL, Lin HC. (2003) Protective mechanism of *salvia miltiorrhiza* on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats. *J Pharmacol Sci*, 91:202-10.

36. Lee TY, Wang GJ, Chiu JH, Lin HC. (2003) Long-term administration of *Salvia miltiorrhiza* ameliorates carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats. *J Pharm Pharmacol*, 55:1561-8.
37. Lindahl R, Petersen DR. (1991) Lipid aldehyde oxidation as a physiological role for class 3 aldehyde dehydrogenases. *Biochem Pharmacol*, 41: 1583-7.
38. Lindquist S, Craig EA. (1988) The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet*, 22: 631-677.
39. Liu P, Hu YY, Liu C, Zhu DY, Xue HM, Xu ZQ, Xu LM, Liu CH, Gu HT, Zhang ZQ. (2002) Clinical observation of salvianolic acid B in treatment of liver fibrosis in chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol*, 8:679-85.
40. Mailhos C, Howard MK, Latchman DS. (1993) Heat shock protects neuronal cells from programmed cell death by apoptosis. *Neuroscience*, 55: 621-627.
41. Murata C, Suzuki Y, Muramatsu T, Taniyama M, Atsumi Y, Matsuoka K, Watanabe T, Okazaki I. (2000) Inactive aldehyde dehydrogenase 2 worsens glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus who drink low to moderate amounts of alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*, 24: 5S-11S.
42. Norppa H, Hirvonen A, Jarventaus H, Uuskula M, Tasa G, Ojajarvi A, Sorsa M. (1995) Role of GSTT1 and GSTM1 genotypes in determining individual sensitivity to sister chromatid exchange induction by diepoxybutane in cultured human lymphocytes. *Carcinogenesis*, 16: 1261-4.
43. Omura M, Yamaguchi M. (1999a) Enhancement of neutral phosphatase activity in the cytosol and nuclei of regenerating rat liver: role of endogenous regucalcin. *J Cell Biochem*, 73: 332-341
44. Omura M, Yamaguchi M. (1999b) Regulation of protein phosphatase activity by regucalcin localization in rat liver nuclei. *J Cell Biochem*, 75: 437-445
45. Parekh S, Anania FA. (2007) Abnormal lipid and glucose metabolism in obesity: implications for nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 132: 2191-207.
46. Pieczenik SR, Neustadt J. (2007) Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Exp Mol Pathol*, 83: 84-92.
47. Ranganna K, Mathew OP, Yatsu FM, Yousefipour Z, Hayes BE, Milton SG. (2007) Involvement of glutathione/glutathione S-transferase

- antioxidant system in butyrate-inhibited vascular smooth muscle cell proliferation. *FEBS J*, 274: 5962-78.
48. Roberts DL, Frerman FE, Kim JJ. (1996) Three-dimensional structure of human electron transfer flavoprotein to 2.1-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 14355-60.
49. Sakaida I, Tsuchiya M, Kawaguchi K, Kimura T, Terai S, Okita K. (2003) 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*, 38:762-9.
50. Schlesinger MJ. (1990) Heat shock proteins. *J Biol Chem*, 265: 12111-12114.
51. Schmid GM, Converset V, Walter N, Sennitt MV, Leung KY, Byers H, Ward M, Hochstrasser DF, Cawthorne MA, Sanchez JC. (2004) Effect of high-fat diet on the expression of proteins in muscle, adipose tissues, and liver of C57BL/6 mice. *Proteomics*, 4: 2270-82.
52. Seidman I, Horland AA, Teebor GW. (1967) Hepatic glycolytic and gluconeogenic enzymes of the obese-hyperglycemic mouse. *Biochim Biophys Acta*, 146: 600-3.
53. Semple RK, Chatterjee VK, O'Rahilly S. (2006) PPAR gamma and human metabolic disease. *J Clin Invest*, 116: 581-9.
54. Shimizu I. (2002) Sho-saiko-to: Japanese herbal medicine for protection against hepatic fibrosis and carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 15: D84-90.
55. Shoda J, Miura T, Utsunomiya H, Oda K, Yamamoto M, Kano M, Ikegami T, Tanaka N, Akita H, Ito K, Suzuki H, Sugiyama Y. (2004) Genipin enhances Mrp2 (Abcc2)-mediated bile formation and organic anion transport in rat liver. *Hepatology*, 39:167-78.
56. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. (2006) Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*, 116: 1793-801.
57. Stickel F, Brinkhaus B, Krahmer N, Seitz HK, Hahn EG, Schuppan D. (2002) Antifibrotic properties of botanicals in chronic liver disease. *Hepato-Gastroenterol*, 49:1102-8.
58. Strange RC, Fryer AA. (1999) The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. *IARC Sci Publ*, 148: 231-249.
59. Taira Z, Yabe K, Hamaguchi Y, Hirayama K, Kishimoto M, Ishida S, Ueda Y. (2004) 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*, 42:803-7.
60. Tamura S, Shimomura I. (2005) Contribution of adipose tissue and de novo lipogenesis to nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*, 115: 1139-1142.
61. Tong V, Teng XW, Chang TK, Abbott FS. (2005) Valproic acid I: time course of lipid peroxidation biomarkers, liver toxicity, and valproic acid metabolite levels in rats. *Toxicol Sci*, 86: 427-35.
62. Ueno T, Nakamura T, Torimura T, Sata M (2006) Angiogenic cell therapy for hepatic fibrosis. *Med Mol Morphol*, 39: 16-21.
63. Verma S, Anderson TJ. (2002) Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation*, 105: 546-9.
64. Wang X, Phelan SA, Forsman-Semb K, Taylor EF, Petros C, Brown A, Lerner CP, Paigen B. (2003) Mice with targeted mutation of peroxiredoxin 6 develop normally but are susceptible to oxidative stress. *J Biol Chem*, 278: 25179-90.
65. Wellen KE, Hotamisligil GS. (2005) Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest*, 115: 1111-9.
66. Werner N, Nickenig G. (2006) Clinical and therapeutical implications of EPC biology in atherosclerosis. *J Cell Mol Med*, 10: 318-32.
67. Wieckowska A, McCullough AJ, Feldstein AE. (2007) Noninvasive diagnosis and monitoring of nonalcoholic steatohepatitis: present and future. *Hepatology*, 46: 582-89.
68. Xu Q, Hu Y, Kleindienst R, Wick G. (1997) Nitric oxide induces heat-shock protein 70 expression in vascular smooth muscle cells via activation of heat shock factor 1. *J Clin Invest*, 100: 1089-97.
69. Yamaguchi M, Mori S. (1990) Regucalcin-induced Ca²⁺ release from rat liver microsomes: the effect is inhibited by heparin. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 38: 2305-7.
70. Yamaguchi M, Yamamoto T. (1978) Purification of calcium binding substance from soluble fraction of normal rat liver. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 26: 1915-8.
71. Yamaguchi, M. (2000) Role of regucalcin in calcium signaling. *Life Sci*, 66: 1769-80.
72. Yamamoto M, Miura N, Ohtake N, Amagaya S, Ishige A, Sasaki H, Komatsu Y, Fukuda K, Ito T, Terasawa K. (2000) Genipin, a metabolite derived from the herbal medicine Inchin-ko-to, and suppression of Fas-induced lethal liver apoptosis in mice. *Gastroenterology*,

118:380-9.

73. Yamamoto M, Ogawa K, Morita M, Fukuda K, Komatsu Y. (1996) The herbal medicine Inchin-ko-to inhibits liver cell apoptosis induced by transforming growth factor beta 1. *Hepatology*, 23:552-9.
74. Zheng S, Qian Z, Sheng L, Wen N. (2006) Crocetin attenuates atherosclerosis in hyperlipidemic rabbits through inhibition of LDL oxidation. *J Cardiovasc Pharmacol*, 47: 70-6.

附圖 1. 動物腰圍外觀比較

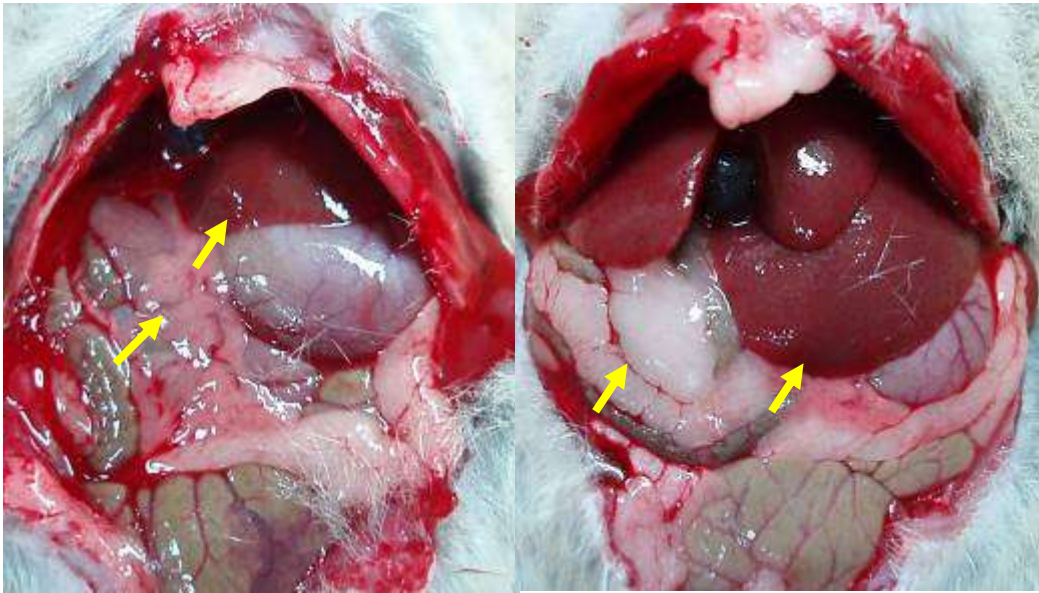


Normal

HF diet

正常組以長庚大學動物中心提供普通飼料飼養，HF diet 組以雍立公司 5D3H 飼料混合玉米油飼料餵養十五週。由左至右分別為正常組、高脂肪飼料組腰圍比較，正常組腰圍約為 5 公分，高脂肪飼料組腰圍約為 7 公分

附圖 2. 腹腔中脂肪與肝臟比較

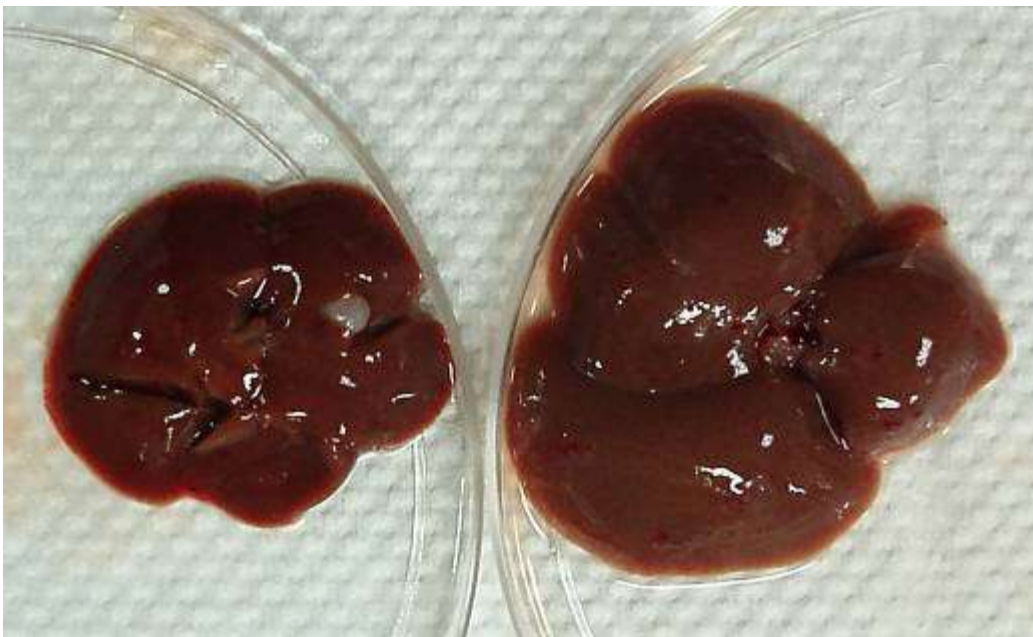


Normal

HF diet

由左至右分別為正常組、高脂肪飼料組。高脂肪飼料組腹腔脂肪對照正常組明顯增加，且肝臟在高脂肪飼料組也明顯較大

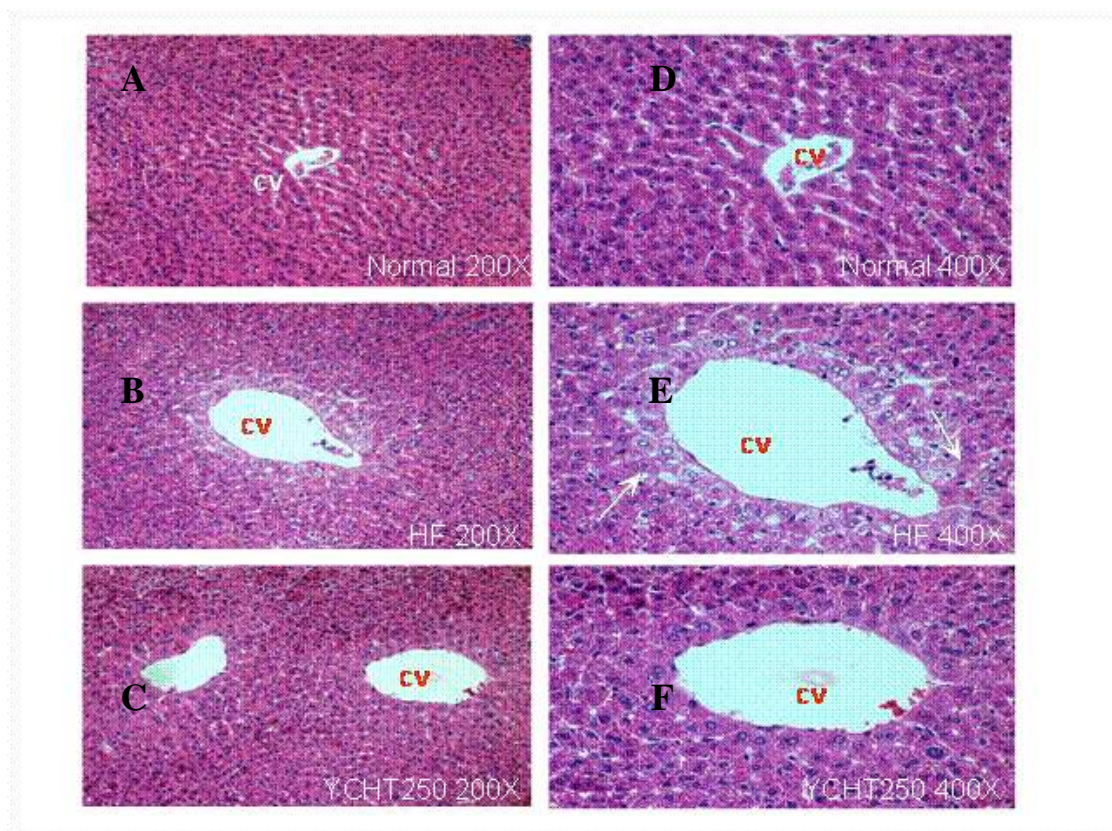
附圖 3. 正常組與高脂肪飼料組肝臟比較



Normal

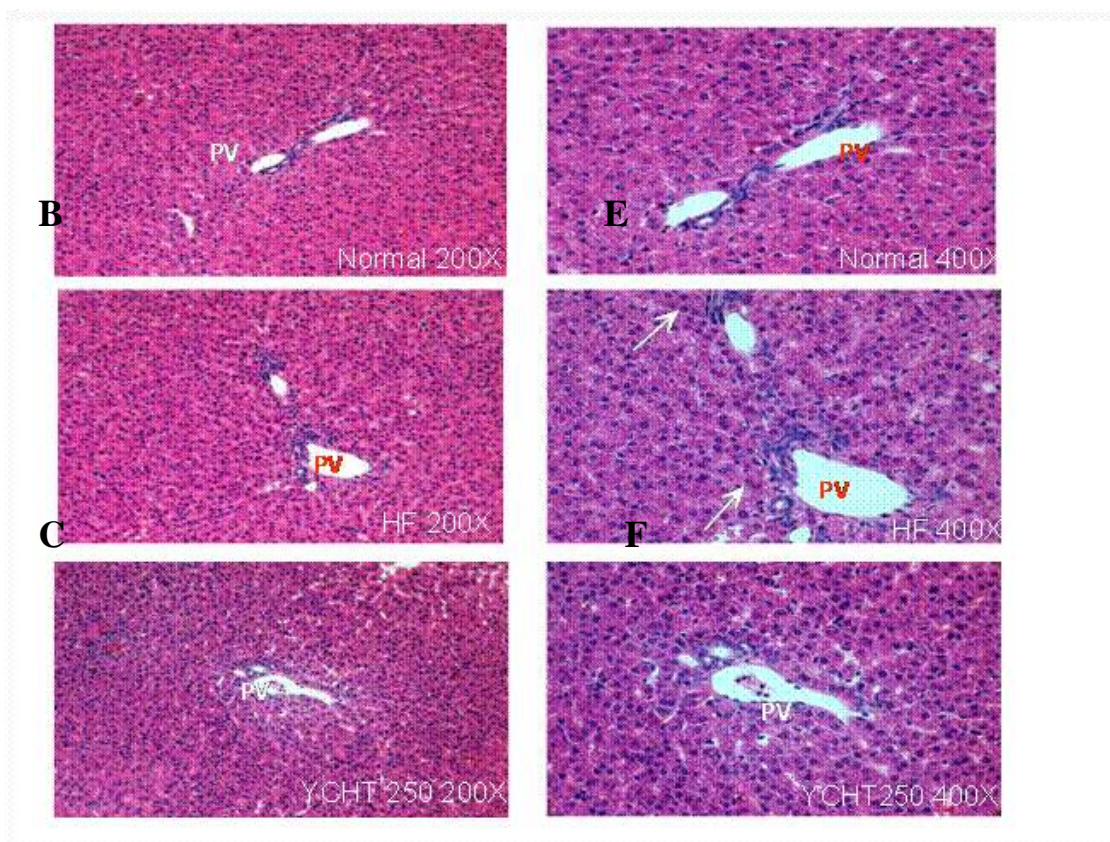
HF diet

附圖 4. 肝臟組織切片—H & E stain



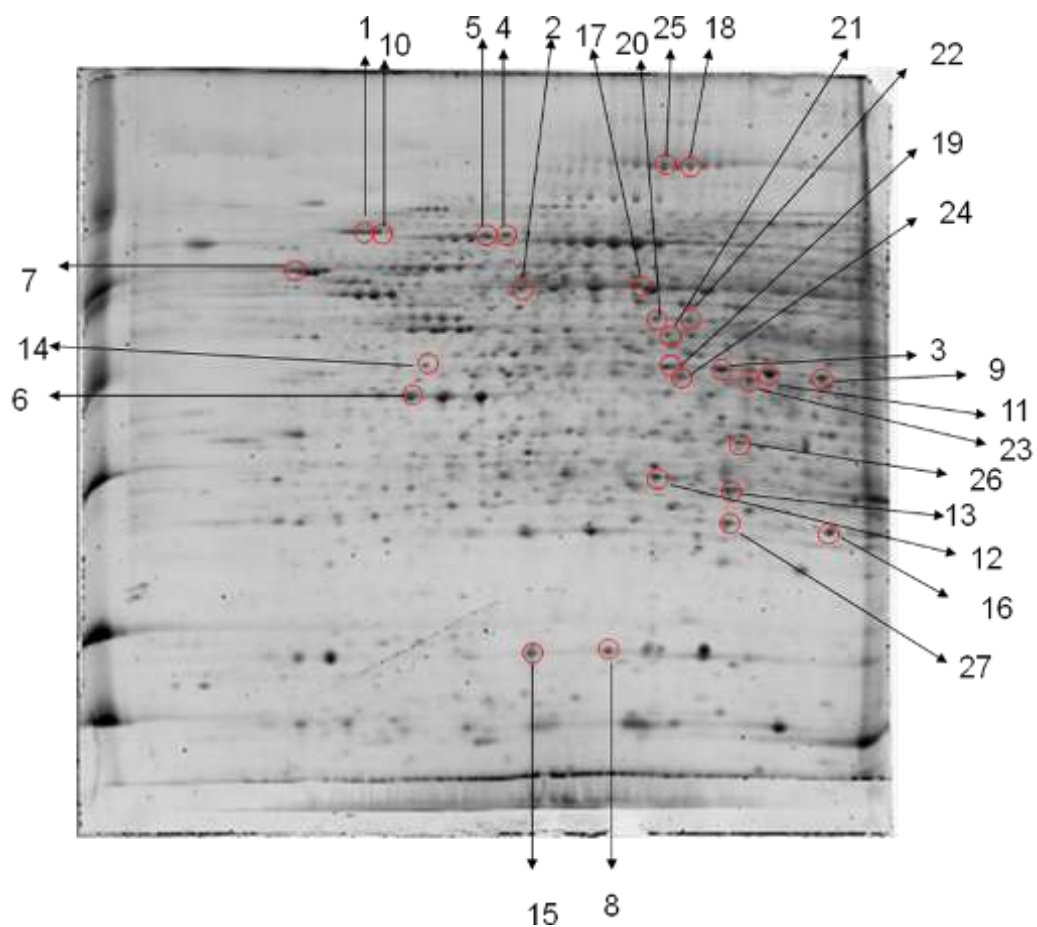
肝臟組織中的細胞核呈深藍色；細胞質與細胞骨架等均染成紅色，正常組(圖 A, D)中中央靜脈周圍的肝細胞呈多角形，細胞核較大，為卵圓形，核仁明顯且細胞排列整齊。高脂肪飼料組肝臟切片(圖 B, E)顯示在中央靜脈周圍的肝細胞呈不規則狀，細胞核核仁出現空心狀且較不明顯，細胞質出現脂肪堆積而造成的空洞，細胞的排列較正常組鬆散。茵陳蒿湯治療組(圖 C, F)則看到中央靜脈周圍肝細胞排列較整齊，細胞核核仁較明顯，整體表現趨近於正常組

附圖 5. 肝臟組織切片—H & E



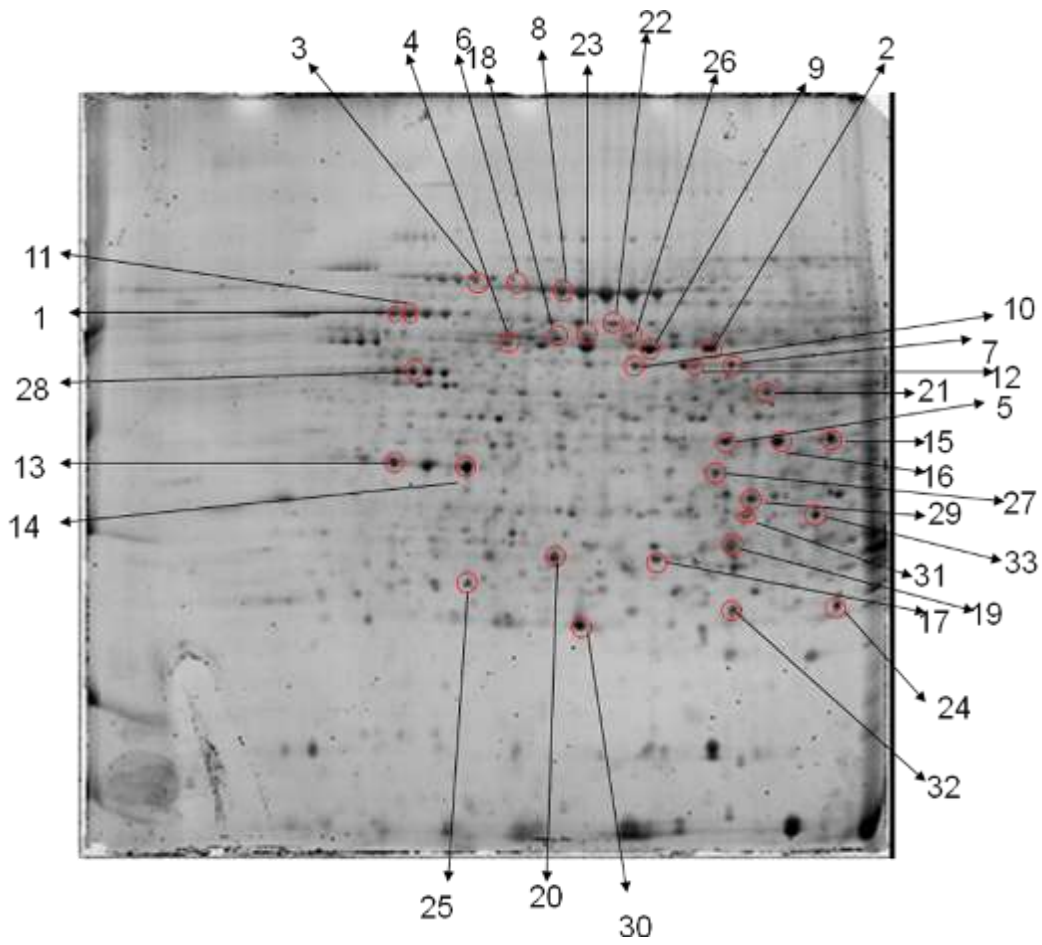
肝臟組織中的細胞核染色後呈現深藍色；細胞質與細胞骨架等均染成紅色，正常組(圖 A, D)肝門靜脈周圍的肝細胞呈多角形，細胞核較大，為卵圓形，核仁明顯且細胞排列整齊。餵食高脂肪飼料倉鼠肝臟切片(圖 B, E)顯示在肝門靜脈周圍的肝細胞呈不規則狀且周圍有顆粒球的浸潤，正常組的顆粒球表現則相對較少，給予茵陳蒿湯治療後則趨近於正常組的表現

附圖 6. 二維電泳分離→正常組 V.S 高脂肪飼料組



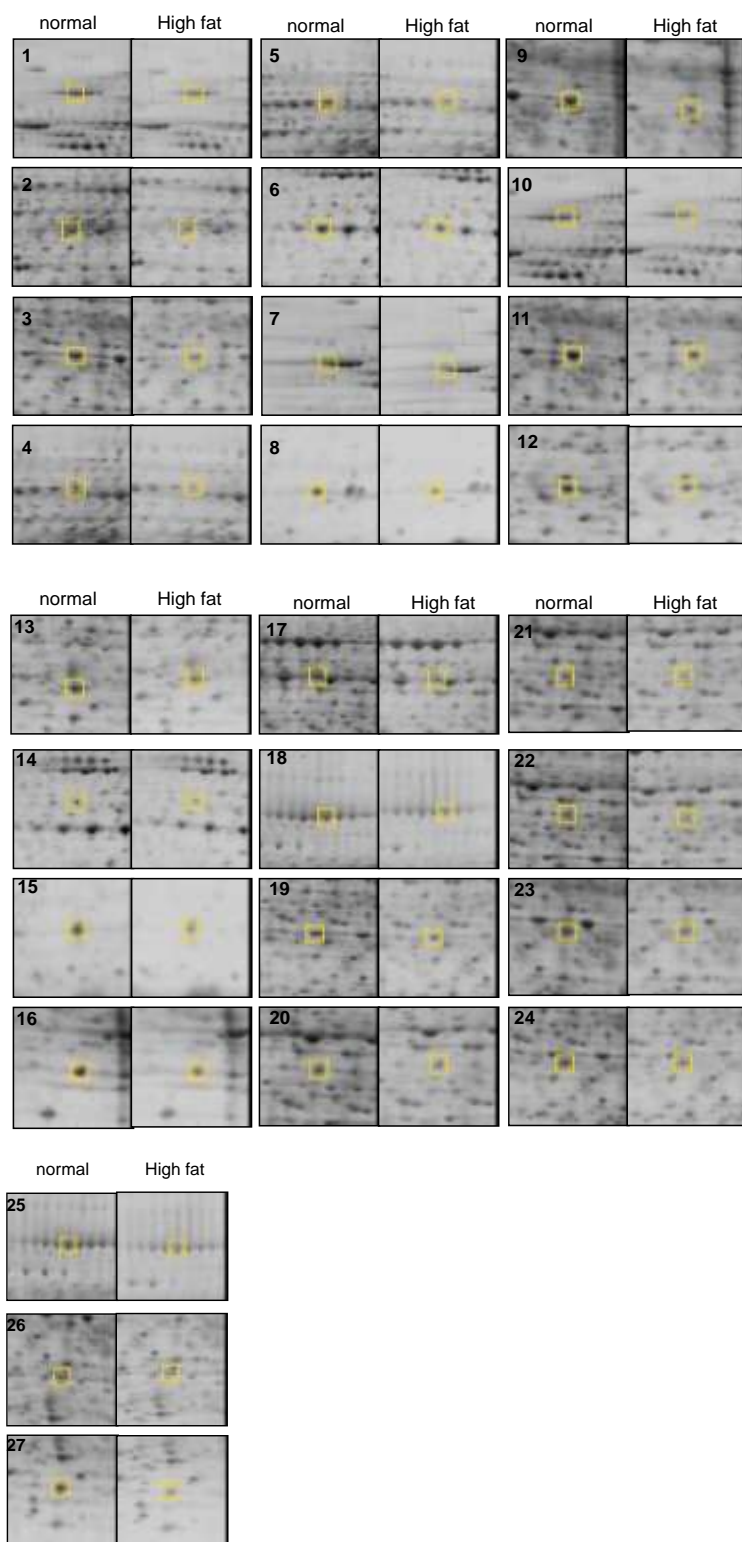
肝臟組織經過二維電泳分離後，以影像分析軟體比對，正常組 V.S 高脂肪飼料組，共圈選出 27 個差異點。

附圖 7. 二維電泳分離→高脂肪飼料組 V.S 茵陳蒿湯治療組

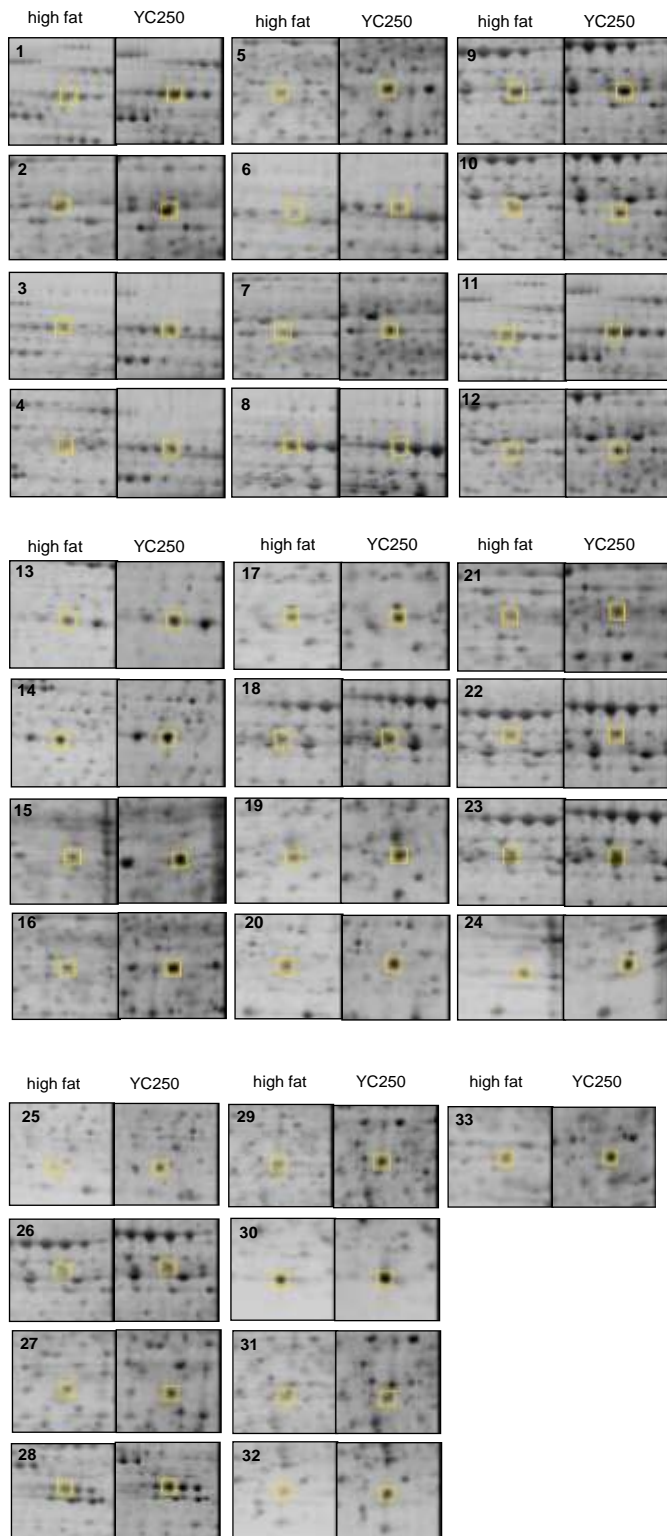


肝臟組織經過二維電泳分離後，以影像分析軟體比對，高脂肪飼料組 V.S 茵陳蒿湯治療組，共圈選出 33 個差異點。

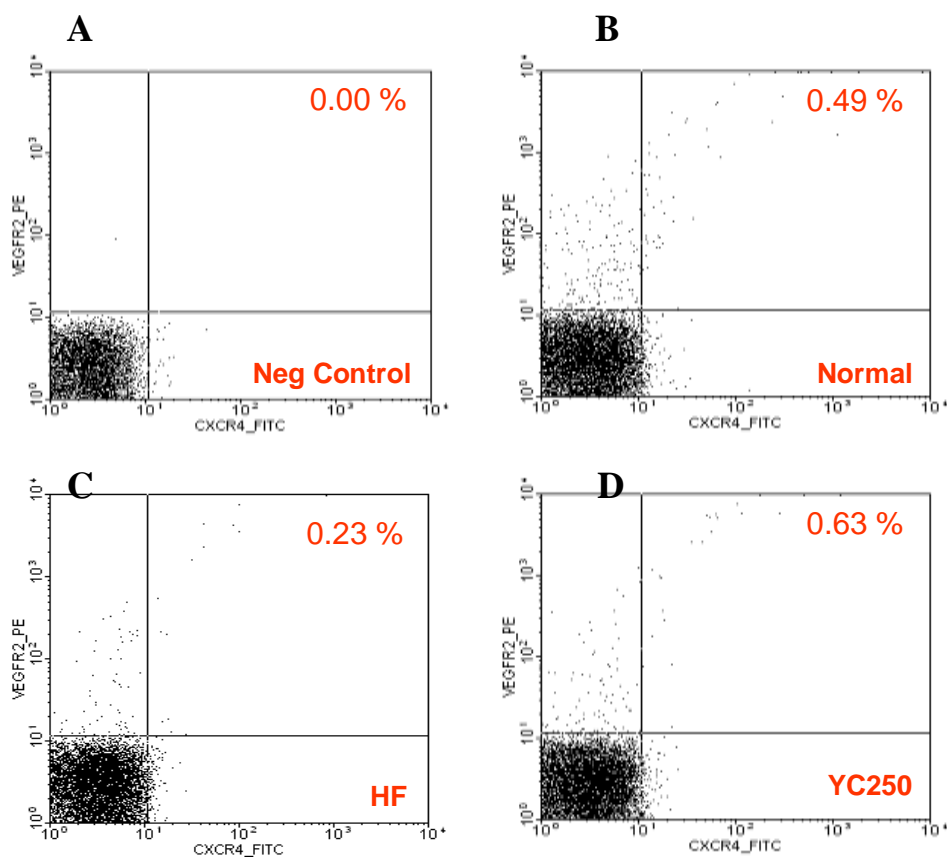
附圖 8. 正常組 V.S 高脂肪飼料組 → 高於兩倍之蛋白質表現量



附圖 9. 高脂肪飼料組 V.S 茵陳蒿湯治療組 → 低於二倍之蛋白質表現量



附圖 10. 血液中內皮前趨細胞的表現



用流式細胞儀測量血液中 EPC 之表現，左下角為血液中所有細胞之表現，圖中利用 CXCR4 標定 X 軸，VEGFR2 標定 Y 軸，此兩抗體會與 EPC 結合並表現螢光，EPC 則表現在此兩抗體均呈現之雙陽性處(右上角)。A 圖為未加抗體之倉鼠血液，EPC 表現 0%；B 圖為正常組倉鼠血液，EPC 表現 0.49%；C 圖為高脂肪飼料組倉鼠血液，EPC 表現 0.23%；D 圖為茵陳蒿湯治療組倉鼠血液，EPC 表現 0.63%

附表一. 正常組、高脂肪飼料組與茵陳蒿湯治療組生化檢驗值比較

TABLE 1
Effects of supplementing YCHT on the serum biochemical analysis of female mice fed a normal or HF diet

	Normal	HF diet	YCHT
N	6	5	5
ALT(U/L)	60±13	55±08	52±07
AST(U/L)	77±07	81±04	70±11
Glucose(mg/dL)	115±08	111±08	145±12
Creatinine(mg/dL)	0.37±0.02	0.4±0.02	0.45±0.04
Cholesterol(mg/dL)	78±05	75±10	58±05
Triglyceride(mg/dL)	65±04	129±07	113±06

檢驗三組倉鼠血清中各項生化值，ALT、AST、Creatinine、Cholesterol 在三組織間無明顯變化。Triglyceride 在餵食高脂肪飼料組明顯高於正常組，給予茵陳蒿湯組治療組 Triglyceride 有比餵食高脂肪飼料組稍低的趨勢，但無明顯統計意義。另外 Glucose 的生化值正常組與餵食高脂肪飼料組無明顯差異，但在給予茵陳蒿湯治療組的 Glucose 比餵食高脂肪飼料組稍高

附表二. Q-TOF 分析蛋白質→正常組 V.S 高脂肪飼料組-1。利用 Q-TOF 分析有變化之肝臟蛋白質，表為正常組與高脂肪飼料組中之表現，表 2 說明蛋白質名稱、變化及蛋白質之功能，>+2.0 表示蛋白質在正常組的表現量大於高脂肪飼料組兩倍以上

NO.	Accession no.	protein name	normal vs. High fat (fold-changes)	score	Function
1	P20029	78 kDa glucose-regulated protein	>+2.0	111	Probably plays a role in facilitating the assembly of multimeric protein complexes inside the ER, AND MASS SPECTROMETRY
2	P11884	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	>+2.0	111	An aldehyde + NAD ⁺ + H ₂ O = an acid + NADH
3	Q99LC5	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	>+2.0	111	The electron transfer flavoprotein serves as a specific electron acceptor for several dehydrogenases, including five acyl-CoA dehydrogenases, glutaryl-CoA and sarcosine dehydrogenase. It transfers the electrons to the main mitochondrial respiratory chain via ETF-ubiquinone oxidoreductase
4	P07724	Serum albumin	>+2.0	108	Serum albumin, the main protein of plasma, has a good binding capacity for water, Ca(3+), Na(+), K(+), fatty acids, hormones, bilirubin and drugs. Its main function is the regulation of the colloidal osmotic pressure of blood
5	P38647	Stress-71 protein, mitochondrial	>+2.0	91	Implicated in the control of cell proliferation and cellular aging. May also act as a chaperone
6	Q64374	Regucalcin	>+2.0	81	Calcium-binding protein which regulates Ca(2+) signaling by regulating Ca(2+)-dependent enzymatic activity in the liver and kidney. Decrease of RGN leads to the dysregulation of calcium signaling in the aged liver
7	P09103	Protein disulfide-isomerase	>+2.0	72	This multifunctional protein catalyzes the formation, breakage and rearrangement of disulfide bonds. At the cell surface, seems to act as a reductase that cleaves disulfide bonds of proteins attached to the cell. May therefore cause structural modifications of exofacial proteins. Inside the cell, seems to form/rearrange disulfide bonds of nascent proteins. At high concentrations, functions as a chaperone that inhibits aggregation of misfolded proteins. At low concentrations, facilitates aggregation (anti-chaperone activity). May be involved with other chaperones in the structural modification of the TG precursor in hormone biogenesis. Also acts a structural subunit of various enzymes such as prolyl 4-hydroxylase and microsomal triacylglycerol transfer protein MTTP
NO.	Accession no.	protein name	normal vs. High fat (fold-changes)	score	Function
8	P38647	Stress-71 protein, mitochondrial	+2.0	70	Implicated in the control of cell proliferation and cellular aging. May also act as a chaperone
9	Q61176	Arginase-2	+2.0	68	L-arginine + H ₃ O = L-ornithine + urea
10	P20029	79 kDa glucose-regulated protein	+2.0	66	Probably plays a role in facilitating the assembly of multimeric protein complexes inside the ER, AND MASS SPECTROMETRY
11	Q61176	Arginase-1	+2.0	66	L-arginine + H ₂ O = L-ornithine + urea
12	Q2PFL9	Peroxioredoxin-6	+2.0	65	Involved in redox regulation of the cell. Can reduce H(2)O(2) and short chain organic, fatty acid, and phospholipid hydroperoxides. May play a role in the regulation of phospholipid turnover as well as in protection against oxidative injury
13	P10649	Glutathione S-transferase Mu 1	+2.0	57	Conjugation of reduced glutathione to a wide number of exogenous and endogenous hydrophobic electrophiles
14	Q91X83	S-adenosylmethionine synthetase isoform type-1	+2.0	43	Catalyzes the formation of S-adenosylmethionine from methionine and ATP

NO.	Accession no.	protein name	normal vs. High fat (fold-changes)	score	Function
15	P10649	Glutathione S-transferase Mu 1	+2.0	37	Conjugation of reduced glutathione to a wide number of exogenous and endogenous hydrophobic electrophiles
16	P01899	H-2 class I histocompatibility antigen, D-B alpha chain	+2.0	36	Involved in the presentation of foreign antigens to the immune system
17	P17563	Selenium-binding protein 1	+2.0	31	Selenium-binding protein which may be involved in the sensing of reactive xenobiotics in the cytoplasm. May be involved in intra-Golgi protein transport
18	P61249	Retinal cone rhodopsin-sensitive cGMP 3',5'-cyclic phosphodiesterase subunit gamma	+2.0	25	Participates in processes of transmission and amplification of the visual signal. cGMP-PDEs are the effector molecules in G-protein-mediated phototransduction in vertebrate rods and cones
19	Q921Q3	Chitobiosyldiphosphodolichol beta-mannosyltransferase	+2.0	24	Participates in the formation of the lipid-linked precursor oligosaccharide for N-glycosylation. Involved in assembling the dolichol-pyrophosphate-GlcNAc(2)-Man(5) intermediate on the cytoplasmic surface of the ER
20	P35175	Stefin-3	+2.0	24	This is an intracellular thiol proteinase inhibitor
21	O70558	Small proline-rich protein 2G	+2.0	24	Cross-linked envelope protein of keratinocytes. It is a keratinocyte protein that first appears in the cell cytosol, but ultimately becomes cross-linked to membrane proteins by transglutaminase. All that results in the formation of an insoluble envelope beneath the plasma membrane

NO.	Accession no.	protein name	normal vs. High fat (fold-changes)	score	Function
22	P35175	Stefin-3	+2.0	24	This is an intracellular thiol proteinase inhibitor
23	Q9QXD7	Fructose-1,6-bisphosphatase 2	+2.0	22	D-fructose 1,6-bisphosphate + H ₂ O = D-fructose 7-phosphate + phosphate
24	Q9QXD6	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	+2.0	20	D-fructose 1,6-bisphosphate + H ₂ O = D-fructose 6-phosphate + phosphate
25	Q8C196	Carbamoyl-phosphate synthase	+2.0	20	Involved in the urea cycle of ureotelic animals where the enzyme plays an important role in removing excess ammonia from the cell
26	Q91YE7	RNA-binding protein 5	+2.0	20	Tumor suppressor protein that reduces cell proliferation and promotes apoptosis and cell cycle arrest
27	Q9CZV8	F-box/LRR-repeat protein 20	+2.0	20	Substrate-recognition component of the SCF (SKP1-CUL1-F-box protein)-type E3 ubiquitin ligase complex

附表三. Q-TOF 分析蛋白質→高脂肪飼料組 V.S 茵陳蒿湯治療組-1。
 利用 Q-TOF 分析有變化之肝臟蛋白質，表為高脂肪飼料組與茵陳蒿湯治療組中之表現，表說明蛋白質名稱、變化及蛋白質之功能，-2.0 表示蛋白質在高脂肪飼料組的表現量低於茵陳蒿湯治療組兩倍量

NO.	Accession no.	protein name	High fat vs. YC250 (fold-changes)	score	Function
1	P63038	61 kDa heat shock protein, mitochondrial	-2.0	143	Implicated in mitochondrial protein import and macromolecular assembly. May facilitate the correct folding of imported proteins. May also prevent misfolding and promote the refolding and proper assembly of unfolded polypeptides generated under stress conditions in the mitochondrial matrix
2	P47738	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	-2.0	121	Is capable of converting retinaldehyde to retinoic acid
3	P38647	Stress-70 protein, mitochondrial	-2.0	119	Implicated in the control of cell proliferation and cellular aging. May also act as a chaperone
4	P11884	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	-2.0	111	An aldehyde + NAD ⁺ + H ₂ O = an acid + NADH
5	Q99LC5	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	-2.0	111	The electron transfer flavoprotein serves as a specific electron acceptor for several dehydrogenases, including five acyl-CoA dehydrogenases, glutaryl-CoA and sarcosine dehydrogenase. It transfers the electrons to the main mitochondrial respiratory chain via ETF-ubiquinone oxidoreductase
6	P07724	Serum albumin	-2.0	108	Serum albumin, the main protein of plasma, has a good binding capacity for water, Ca(3+), Na(+), K(+), fatty acids, hormones, bilirubin and drugs. Its main function is the regulation of the colloidal osmotic pressure of blood
7	P17182	Alpha-enolase	-2.0	108	Multifunctional enzyme that, as well as its role in glycolysis, plays a part in various processes such as growth control, hypoxia tolerance and allergic responses. May also function in the intravascular and pericellular fibrinolytic system due to its ability to serve as a receptor and activator of plasminogen on the cell surface of several cell-types such as leukocytes and neurons
NO.	Accession no.	protein name	High fat vs. YC250 (fold-changes)	score	Function
8	P07724	Serum albumin	-2.0	107	Serum albumin, the main protein of plasma, has a good binding capacity for water, Ca(2+), Na(+), K(+), fatty acids, hormones, bilirubin and drugs. Its main function is the regulation of the colloidal osmotic pressure of blood
9	P47738	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	-2.0	99	Is capable of converting retinaldehyde to retinoic acid
10	P17182	Alpha-enolase	-2.0	97	Multifunctional enzyme that, as well as its role in glycolysis, plays a part in various processes such as growth control, hypoxia tolerance and allergic responses. May also function in the intravascular and pericellular fibrinolytic system due to its ability to serve as a receptor and activator of plasminogen on the cell surface of several cell-types such as leukocytes and neurons
11	P63038	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	-2.0	92	Implicated in mitochondrial protein import and macromolecular assembly. May facilitate the correct folding of imported proteins. May also prevent misfolding and promote the refolding and proper assembly of unfolded polypeptides generated under stress conditions in the mitochondrial matrix
12	P17182	Alpha-enolase	-2.0	84	Multifunctional enzyme that, as well as its role in glycolysis, plays a part in various processes such as growth control, hypoxia tolerance and allergic responses. May also function in the intravascular and pericellular fibrinolytic system due to its ability to serve as a receptor and activator of plasminogen on the cell surface of several cell-types such as leukocytes and neurons
13	Q64374	Regucalcin	-2.0	81	Calcium-binding protein which regulates Ca(2+) signaling by regulating Ca(2+)-dependent enzymatic activity in the liver and kidney. Decrease of RGN leads to the dysregulation of calcium signaling in the aged liver

NO.	Accession no.	protein name	High fat vs. YC250 (fold-changes)	score	Function
14	Q64374	Regucalcin	-2.0	80	Calcium-binding protein which regulates Ca(2+) signaling by regulating Ca(2+)-dependent enzymatic activity in the liver and kidney. Decrease of RGN leads to the dysregulation of calcium signaling in the aged liver
15	Q61176	Arginase-2	-2.0	68	L-arginine + H ₃ O = L-ornithine + urea
16	Q61176	Arginase-1	-2.0	66	L-arginine + H ₂ O = L-ornithine + urea
17	Q2PFL9	Peroxiredoxin-6	-2.0	65	Involved in redox regulation of the cell. Can reduce H(2)O(2) and short chain organic, fatty acid, and phospholipid hydroperoxides. May play a role in the regulation of phospholipid turnover as well as in protection against oxidative injury
18	Q10758	Keratin, type II cytoskeletal 8	-2.0	60	Together with KRT19, helps to link the contractile apparatus to dystrophin at the costameres of striated muscle
19	P10649	Glutathione S-transferase Mu 1	-2.0	57	Conjugation of reduced glutathione to a wide number of exogenous and endogenous hydrophobic electrophiles
20	Q2PFL9	Peroxiredoxin-6	-2.0	53	Involved in redox regulation of the cell. Can reduce H(2)O(2) and short chain organic, fatty acid, and phospholipid hydroperoxides. May play a role in the regulation of phospholipid turnover as well as in protection against oxidative injury

NO.	Accession no.	protein name	High fat vs. YC250 (fold-changes)	score	Function
21	O88844	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	-2.0	50	Isocitrate + NADP ⁺ = 2-oxoglutarate + CO ₂ + NADPH
22	P00762	Anionic trypsin-1	-2.0	47	Preferential cleavage: Arg- -Xaa, Lys- -Xaa
23	P11679	Keratin, type II cytoskeletal 8	-2.0	43	Together with KRT19, helps to link the contractile apparatus to dystrophin at the costameres of striated muscle
24	P01899	H-2 class I histocompatibility antigen, D-B alpha chain	-2.0	36	Involved in the presentation of foreign antigens to the immune system
25	Q8K3U4	Beta-defensin 36	-2.0	25	Has antibacterial activity
26	Q8K3U4	Beta-defensin 36	-2.0	25	Has antibacterial activity
27	P61249	Retinal cone rhodopsin-sensitive cGMP 3',5'-cyclic phosphodiesterase subunit gamma	-2.0	25	Participates in processes of transmission and amplification of the visual signal. cGMP-PDEs are the effector molecules in G-protein-mediated phototransduction in vertebrate rods and cones

NO.	Accession no.	protein name	High fat vs. YC250 (fold-changes)	score	Function
28	Q99N91	39S ribosomal protein L34, mitochondrial	-2.0	23	ribosomal protein L34P family
29	Q9QXD6	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	-2.0	22	D-fructose 1,6-bisphosphate + H ₂ O = D-fructose 6-phosphate + phosphate
30	P11352	Glutathione peroxidase 1	-2.0	21	Protects the hemoglobin in erythrocytes from oxidative breakdown
31	Q91YE7	RNA-binding protein 5	-2.0	20	Tumor suppressor protein that reduces cell proliferation and promotes apoptosis and cell cycle arrest
32	Q9CZV8	F-box/LRR-repeat protein 20	-2.0	20	Substrate-recognition component of the SCF (SKP1-CUL1-F-box protein)-type E3 ubiquitin ligase complex
33	Q3U962	Collagen alpha-2(V) chain	-2.0	20	Type V collagen is a member of group I collagen (fibrillar forming collagen). It is a minor connective tissue component of nearly ubiquitous distribution. Type V collagen binds to DNA, heparan sulfate, thrombospondin, heparin, and insulin. Type V collagen is a key determinant in the assembly of tissue-specific matrices

附錄

研究機制卡通圖

茵陳蒿湯對肥胖所引起之血循內皮前驅細胞 EPC 與肝臟 Oxidative stress 的變化所調控作用的影響

