

編號：CCMP94-RD-047、CCMP95-RD-208

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

徐士蘭、黃奇英

台中榮總教學研究部、國家衛生研究院癌症組

## 摘 要

### 研究目的：

雖然醫療技術一直在進步，但台灣地區因罹患肝疾病而致死之人數仍然高居不下。在肝疾病中除肝癌外，最常發現的即為病毒性肝炎及肝硬化。而肝纖維化是各種慢性肝病進展為肝硬化的必經途徑，其實質是肝內細胞外基質(Extracellular matrix)的合成與降解失去平衡，導致細胞外基質尤其是膠原蛋白的過度沈積和分佈異常。隨著肝纖維化程度加重，異常增生的纖維束包纏形成假小葉，使正常肝臟的小葉結構和功能被破壞，即形成肝硬化。肝纖維化是可逆轉的，因此，抗肝纖維化治療是十分重要的。體內、外研究證實肝星狀細胞(Hepatic stellate cell)及其活化形式即轉變成纖維細胞是細胞外基質的主要來源，活化的肝星狀細胞，釋放 TGF- $\beta$ 1 等多種細胞因子，從而促進細胞外基質的異常合成，抑制其降解。故肝星狀細胞的活化是肝纖維化形成過程的中心環節。此外，肝受損發炎時，活化的 Kupffer 細胞分泌 TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$  及 PDGF 等因子，促進了肝星狀細胞的轉化、增生及合成細胞外基質，形成肝纖維化。因此，若能抑制 Kupffer 細胞的活化，也可有效降低肝纖維化的形成。據此，人們提出了針對形成肝星狀細胞活化的多個環節進行治療的策略，及針對抑制 Kupffer 細胞活化的治療的策略。目前國內外有關肝纖維化治療的研究多處於實驗階段，尚乏有效療法。而治療肝炎的藥物，除病毒性肝炎可使用抗病毒藥物外，其他如毒性物質或酒精中毒等非病毒性之肝炎，也尚無有效治療之藥劑。中草藥的使用已有幾千年的臨床經驗的累積為尋找有特殊療效之醫療資源庫。但因缺乏科學化之研究及驗證無法取信於國際醫學界。中醫藥的生物科技化研究是使中醫藥躍上國際生物醫學界的舞台，必走之途徑，也是目前世界潮流之趨勢。近年政府對中醫藥及天然藥物之研發工作日趨重視，也明訂中藥科學化與新藥研究開發列為國家重點發展項目。更選定中草藥為具有發展潛力之生物科技優先支持項目。本研究計畫是針對過去本

研究室發現之具有治療肝硬化功效之中草藥代號 ZC008，基因晶片分析、細胞實驗及疾病動物實驗等方法，探討 ZC008 抗肝纖維化作用之分子機轉。期能藉由建立之離體細胞培養模式，及並動物模式及基因晶片分析，給予中草藥科學化之驗證。

## 研究方法：

本研究將以初代培養之為研究模式，以細胞數目測定、TUNEL 凋亡分析、Caspase 活性分析、西方點墨蛋白質分析、及免疫螢光染色分析等技術，探討肝星狀細胞處理 ZC008 後其細胞的活化轉型之抑制及細胞凋亡等分子作用。又以初代培養之大鼠肝 Kupffer 細胞利用 LPS 激活此免疫細胞為研究模式，以細胞數目測定、細胞素 ELISA 分析、西方點墨蛋白質分析、RT-PCR 基因 mRNA 表現分析及免疫螢光染色分析等技術，探討被 LPS 激活的肝 Kupffer 細胞中與發炎相關之細胞素及 mediators 之活性及表現，是否會被 ZC008 抑制，藉此離體培養方式快速檢測 ZC008 是否具有抗發炎之功效，並且找尋 ZC008 抗發炎之分子作用機制。同時使用大鼠肝纖維化疾病動物模式，驗證 ZC008 治療肝炎及肝硬化之效果。並使用基因微陣列分析與肝發炎或肝纖維化相關之基因，並以 Q-PCR 確認其準確性。又以基因選殖技術，將特定的基因序列(Egr1、Cyr61、Id1)植入載體。或以 siRNA 序列 Knockdown 基因的表現。探討這些基因的生物功能，及在肝疾病中扮演的角色。

## 結果與討論：

中草藥 ZC008 在低濃度時具抑制肝星狀細胞生長之能力，而高濃度 ZC008 處理可促進肝星狀細胞凋亡之作用。此 ZC008 誘發之肝星狀細胞凋亡，是經由活化內生性的粒腺體致死路徑，因為活化了 Caspase-3 及-9。同時 ZC008 處理肝星狀細胞可抑制 alpha smooth muscle actin 及 collagen I 分子的表現。但是同樣的濃度對肝細胞的生長及存活卻無影響。而 ZC008 水層萃取物，是可以抑制 LPS 刺激的肝 Kupffer 細胞之發炎相關 cytokines(TNF- $\alpha$ , IL6)及 mediator (nitric oxide)之產生。LPS 誘發之肝細胞活化是經由活化 ERK/NFkB 路徑。而 ZC008 可抑制 ERK/NFkB 分子的活性，造成抑制 cytokines(TNF- $\alpha$ , IL6)及 mediator (nitric oxide)之產生，進而達到抑制肝發炎的功效。肝臟中之星狀細胞被刺激活化轉型而成為肌纖維化細胞，此細胞大量在肝臟中增殖，破壞了正常肝組織的結構，使肝臟功能不足，導致患者死亡。若肝臟中之 Kupffer 細胞被活化，除造成肝發炎外，其所釋放的發炎物質，也會刺激肝星狀細胞的轉型而成為肌纖維化之細胞，造成肝纖維化。因此若能有效的抑制肝 Kupffer 細胞的活化，及抑制肝星狀細胞的活化轉型及增生，是可以有效的防止肝纖維化。目前國內外有關肝纖維化的治療，尚乏有效藥物。而有關肝炎治療的藥物可用的也不多，僅病毒性肝癌有抗病毒之藥物可用，但療效只有五、六成。其他如酒精性肝炎、藥物中毒性肝炎、免疫疾病造成的肝炎、及代謝異常性肝炎，仍缺乏有效療法。本研究探討已知有抗肝炎及抗肝纖維化作用之中藥 ZC008，是可藉由抑制肝星狀細胞之凋亡及抑制肝 Kupffer 細胞之發炎反應，達到治療肝炎及肝纖維化之效應。以大鼠肝纖維化動物模式配

合離體初代培養的細胞模式，以現代化之科學技術，結合基因微陣列分析，對 ZC008 治療肝纖維化之功效給予科學化之驗證，此研究結果可使 ZC008 之醫藥價值受到國際醫界之認同。本研究計畫實驗模式之建立，亦可當作是中藥科學化平台架構之範本。目前進一步構築基因載體，將基因晶片分析所得與疾病及治療相關的三個分子 Egr1、Cyr61、及 Id1，的功能做進一步探討。

關鍵詞：肝炎、肝纖維化、肝纖維細胞、肝 Kupffer 細胞、中草藥、ZC008、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10、Egr1、Cyr61、Id1

Number: CCMP94-RD-047、CCMP95-RD-208

# **Microarray Profiling Delineates Molecular Portrait of the Anti-fibrosis Effects of a Chinese Herbal Medicine, ZC008, by Using in vivo and in vitro Models (Final Report)**

Shih-Lan Hsu<sup>1</sup>, Chi-Yin Huang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Taichung Veterans General Hospital, Department of Education & Research

<sup>2</sup>National Health Research Institute, Cancer Research Center

## **ABSTRACT**

### **Aim:**

Hepatic fibrosis, a precursor of cirrhosis, is a consequence of severe liver damage that occurs in many patients with chronic liver disease, and involves the abnormal accumulation of extracellular matrix (ECM), particularly collagens. It has been shown that the activation of stellate cells in injured livers leads to their proliferation and transformation into myofibroblast-like cells. The activated hepatic stellate cell is now well established as the key cellular element involved in the development of hepatic fibrosis. In addition, accumulating evidence indicates that inflammation plays a central role in the current paradigm of liver fibrosis. Kupffer cells, which represent the largest population of resident macrophages in the liver, are uniquely positioned as the predominant primary inflammatory effector cells to initiate the inflammatory cascade leading to tissue remodeling and fibrosis. For this reason, the presence of increased population of kupffer cells together with the bulk release of inflammatory mediators by these macrophages are considered to be critical events during the early stages of liver inflammation and fibrosis. Herbal medicines that have been used in China for thousands of years are now being manufactured in China as drugs with standardized quality and quantity of ingredients. In previous study, we found that ZC008, a Chinese herbal medicine which exhibits the beneficial effects for treatment of patients with liver cirrhosis, reduces inflammatory effect and induces apoptotic cell death in activated hepatic stellate cells. The goal of this study is to evaluate the hepatoprotective effect of ZC008 on in vitro cultured cells and in vivo disease animal model.

## Methods:

Hepatic stellate cells from rat liver were treated with various concentrations of ZC008 extract for different duration. Cell death were assessed by direct cell number counting and TUNEL assay. Caspase activity was measured using specific fluorogenic substrates. The expression and cellular distribution of alpha smooth muscle actin and collagen I were examined by Western blotting and immunostaining. Dimethylnitrosamine (DMN)-induced liver fibrosis model was performed. Liver samples were immediately removed after sacrifice and prepared for histopathological staining. Blood samples, collected from the animals at autopsy, were used to measure serum concentrations or activity of biomarkers. Gene expression profilings were examined by Affymetrix GeneChip system (RG-U34A chip) and analysis by GeneSpring software 7.3. Moreover, LPS-stimulated Kupffer cells were treated with various concentrations of ZC008 water soluble extract for different duration. Cell viability were assessed by direct cell number counting. Inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL10) or mediator (nitric oxide, NO) production was measured using ELISA assay and Gress reagent analysis. The expression of inducible NO synthase (iNOS) and phosphorylated ERK were examined by Western blotting. DNA-binding activity of NFkB was determined by electrophoretic mobility shift assay.

## Results & Discussion:

We found that ZC008 extract is the most potency drug among the tested drugs to treat of hepatic stellate cells. Treatment with ZC008 decreased the expression of alpha smooth muscle actin and collagen I in primary cultured stellate cells. DNA fragmentation and caspase activation were detected in ZC008-treated stellate cells, suggesting that ZC008 extract triggered a apoptotic cell death through a intrinsic mitochondrial pathway in this primary cultured hepatic stellate cells. The current results indicate that curing the liver fibrosis by ZC008 may be due to direct elimination of the activated fibrotic cells by the agent. However, ZC008 water soluble extract is the most potency fraction among the tested fractions to treat of LPS-stimulated Kupffer cells. Treatment with ZC008 decreased the LPS-induced TNF- $\alpha$ , IL6 and NO production in primary cultured Kupffer cells, while increased the LPS-enhanced IL10 expression. Moreover, ZC008 inhibited the LPS-induced ERK phosphorylated activation and NFkB-DNA binding activity in Kupffer cells, suggesting that water soluble extract of ZC008 exhibited an anti-inflammmtory effect through an ERK/NFkB-dependent signaling pathway in this primary cultured Kupffer cells. Based on our previous and the current results, we suggest that curing the liver fibrosis by ZC008 may be due to direct elimination of the activated fibrotic cells and inhibition of Kupffer cell activation by the agent. This study intends to build a hypothesis-driven research on liver fibrosis at the system level by implementation of diverse research approaches with the goal to elucidate novel insights into the effect of ZC008 on liver

fibrosis. We used dimethylnitrosamine (DMN) to induce rat necroinflammatory and hepatic fibrosis in a 6-week time course. Using the Affymetrix RG-U34A chip, 256 differentially expressed genes, including 44 necroinflammatory-related and 62 fibrosis-related, were demonstrated from the liver injury tissues and ZC008-treated cultured hepatic stellate cells and hepatic Kupffer cells. Among them, Egr1, Cyr61 and Id1 were cloned and functionally analyzed in hepatic stellate cells and Kupffer cells. Taken together, ZC008 was validated to be an excellent anti-liver damage candidate drug by histopathological, biochemical and microarray analysis. Our proposed research model may provide a new exploratory modality for traditional Chinese medicine research.

Keywords: Hepatitis, cirrhosis, hepatic stellate cells, ZC008, Kupffer cell, TNF-A, IL6, IL-10, herbal medicine, Egr1, Cyr61, Id1,  $\alpha$ -smooth muscle actin



## 壹、前言

雖然醫療技術一直在進步，但台灣地區因罹患肝疾病而致死之人數仍然高居不下。在肝疾病中除肝癌外，最常發現的即為病毒性肝炎及肝硬化。而肝纖維化是各種慢性肝病進展為肝硬化的必經途徑，慢性的肝損傷，不管是慢性活動性肝炎，長期接觸藥物或毒物引起的，皆會導致肝細胞的變性、壞死、肝纖維組織增生，其實質是肝內細胞外基質(ECM)的合成與降解失去平衡，導致 ECM 尤其是膠原蛋白的過度沈積和分佈異常。隨著肝纖維化程度加重，異常增生的纖維束包纏形成假小葉，使正常肝臟的小葉結構和功能被破壞，即形成肝硬化。肝纖維化是可逆轉的，因此，抗肝纖維化治療是十分重要的。體內、外研究證實肝星狀細胞(HSC)及其活化形式即轉變成纖維細胞是 ECM 的主要來源，活化的 HSC，釋放 TGF- $\beta$ 1 等多種細胞因子，從而促進 ECM 的異常合成，抑制其降解。故在肝纖維化的過程中，肝星狀細胞(hepatic stellate cell)的活化扮演極關鍵的角色。當肝受損時，肝細胞，Kuffer cell，內皮細胞，及免疫細胞等分泌出來的分子，如各種 cytokine 及 growth factor (PDGF, TGF- $\beta$ 1)等皆會激活肝星狀細胞，被激活的肝星狀細胞會增生轉化成為肌纖維樣之肝星狀細胞，並分泌大量的細胞外間質(extracellular matrix)，尤其是 collagen I, III，大量累積及分布異常，造成細胞外間質分解及合成失衡，大量的細胞外間質累積在細胞外，形成更多的纖維組織，逐漸造成肝纖維化。但在肝纖維化復原的過程中，可觀察到活化的肝星狀細胞凋亡及細胞外間質的瓦解。

肝纖維化是一個涉及多種細胞和多種細胞因子的動態變化過程。肝臟本身是一個結構及功能複雜的實質性器官，由肝實質細胞(即肝細胞)和肝非實質性細胞組成。肝非實質性細胞佔肝體積的 10%，細胞量的 35%，主要是內皮細胞(44%)、Kupffer 細胞(33%)、儲脂細胞(22%)。其中肝 Kupffer 細胞是組成身體單核巨噬細胞系統最大的群體，佔總量的 80-90%，是身體細胞免疫的重要組成部分，同時也是腸道屏障功能的組成部分，在血液的廓清中有重要作用，特別是清除門脈循環中的感染細菌、內毒素以及免疫複合物等。當肝臟受到內生性或外緣性的刺激肝實質細胞損傷時，肝內 TGF- $\beta$ 、PDGF、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 等刺激因子相繼增多，這些細胞因子之間的相互協同或拮抗作用，構成了複雜的調控路徑。因此，細胞因子在肝纖維化中扮演重要角色，起重要作用，沒有細胞因子的參與，就沒有肝星狀細胞的增值與活化，亦沒有纖維素的過度沉積。肝 Kupffer 細胞是細胞因子的重要來源，其中尤以轉化生長因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1)、PDGF、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 及 IL-10 等，是諸多細胞因子的核心因子，可激活肝星狀細胞為纖維細胞，產生大量的細胞外間質纖維分子，造成肝纖維化。

目前全球醫學界針對肝硬化疾病尚無有效的治療策略，仍束手無策之際，對於肝纖維化形成之分子病理以及肝星狀細胞被激活途徑及作用途徑的相關研究，越顯得重要。但隨著對肝纖維化分子病理學及肝星狀細胞被激活的途徑及其作用的深入了解，針對星狀細胞為標的，掌控其活性及作用途徑，可提供研發治療肝纖維化及肝硬化藥物的明確方向。此外，針對抑制肝 Kupffer 細胞不當的活化，及調控其免疫細胞素及發炎因子的表現，無疑提供治療肝炎及肝纖維化另一可行的研發治療的方向。因此，許多生物醫學研究者以肝星狀細胞及肝 Kupffer 細胞為標的，尋找合適的藥物控制這些與肝星狀細胞活化及抑制肝 Kupffer 細胞誘導發炎相關分子的表達。期望能找到治療肝硬化的有效策略。

中草藥的使用已有幾千年的臨床經驗的累積為尋找有特殊療效之醫療資源庫。但因缺乏科學化之研究及驗證無法取信於國際醫學界。中醫藥的生物科技化研究是使中醫藥躍上國際生物醫學界的舞台，必走之途徑，也是目前世界潮流之趨勢。若預期由中草藥取得有效成分之研究，必先建立能確認藥物活性之特定生物檢測系統，如基因表達圖譜分析、離體之細胞培養模式或活體之動物模式。在本實驗中，我們探討過去幾年本研究室研發的一具有治療肝纖維化之中草藥 ZC008，在計劃執行的第一年，利用已建立之離體肝星狀細胞之培養技術，檢測中草藥 ZC008 萃取物對肝星狀細胞之活化、生長及致死之效應，並分析藥物對肝星狀細胞  $\alpha$  smooth muscle actin、collagen I、及細胞致死分子 Caspase 等基因表達及蛋白質表現等作用。研究結果發現 ZC008 萃取物可抑制  $\alpha$  smooth muscle actin 及 collagen I 的表現，抑制肝星狀細胞的生長。並且活化 Caspase-3 及-9，造成 DNA 斷裂，促使肝纖維細胞凋亡，可能因殺死纖維細胞而呈現治療纖維化疾病之功效。同時建立大鼠肝纖維化之動物模式，不單是從組織病理學與血液生化學角度評估中草藥之抗纖維化之療效，更進一步利用基因微陣列分析與肝纖維化之相關基因並且使用此系列的基因評估藥物之治療成效。

由於在以 DMN 或 CCl<sub>4</sub> 誘導之大鼠肝纖維化之動物模式實驗中，我們發現 ZC008 有抑制肝發炎的效果。因此，在計劃進行的第二年，我們藉由建立 Kupffer 細胞體外培養系統，利用 LPS 誘發 Kupffer 細胞進行發炎反應，並檢測 ZC008 的前處理下，是否使得發炎反應的指標激素如 TNF- $\alpha$ 、IL-6 及 NO 受到適當的調節，同時檢測抗發炎激素 IL-10 的分泌。由實驗中發現 ZC008 的水層對 TNF- $\alpha$ 、IL-6、NO 的 release 都有明顯的抑制作用，尤其對 TNF- $\alpha$  表達的抑制可達 70% 左右。至於抗發炎激素 IL-10 的 release，低劑量 ZC008 有較明顯的促進作用。此外，相較於許多的天然物，ZC008 在動物實驗中有極顯著的抗纖維化作用，除了過去實驗中我們證實 ZC008 中 30%DMSO 的萃取層可快速有效的造成肝星狀細胞的凋亡外，從本實驗



的結果 ZC008 的水層極有效的抑制 TNF- $\alpha$  release 可能亦是另一個主因。許多的研究證實 TNF- $\alpha$  除了是發炎反應的啟動子，影響 IL-6、NO 的產生之外，也與膠原蛋白 I、II、III 型及間質蛋白的合成與分泌息息相關。因此，由本實驗我們可以推測，ZC008 可顯著的逆轉肝纖維化甚至肝硬化，可能源自於有效的抗發炎，降低膠原蛋白、間質蛋白的合成與分泌及造成肝星狀細胞的凋亡等效應同時發生的結果。此項研究將建立完善的體外與體內藥物篩選評估系統，除可找尋到具有治療或抑制肝纖維化之中草藥有效成分外，亦可藉此細胞培養模式進行藥物作用之分子機轉探討。在學術及臨床應用上均可得到具體的成效。

## 貳、材料與方法

### 一、材料

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

### 二、溶液之配製：

前灌溶液：含 NaCl 136 mM, KCl 5.4 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.42 mM, Hepes 10 mM, EGTA 0.5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 4.2 mM, glucose 5 mM, phenol red 6 mg pH 7.3。

酶配製液：(Enzyme Buffer)：NaCl 136 mM, KCl 5.4 mM, CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O 5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.42 mM, Hepes 10 mM, NaHCO<sub>3</sub> 4.2 mM, phenol red 6 mg, pH 7.3。

GBSS 溶液：KCl 4 mM, CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O 1.5 mM, MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O 1 mM, MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 0.28 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.22 mM, NaHCO<sub>3</sub> 12 mM, glucose 5.5 mM pH 7.0。

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

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

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

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

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

無鈣培養液：無鈣培養液含 Hepes 10 Mm，NaHCO<sub>3</sub> 24 mM，pH 7.3。

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

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

### 三、星狀細胞之分離：

將前灌溶液 (pronase E 溶液及 collagenase 溶液) 預熱於 37°C 水浴中，灌注前放入 43°C 水浴中。450~550g 之大白鼠，以 CO<sub>2</sub> 窒息，迅速 U 型剖胸，並於肝門靜脈處插入留置針結紮。再於上腔靜脈處埋沒引流管結紮。實驗開始，從肝門靜脈處注入前灌溶液 (10 ml/min)，邊灌注邊按摩肝臟，讓前灌溶液充分流入肝臟每個角落，洗去血水，並由上腔靜脈流出，直至整個肝臟呈現淡褐色 (約 100~150 ml)。接著注入 pronase E 溶液約 6~8 分，

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

#### 四、Kupffer 細胞之分離：

將前灌溶液（pronase E 溶液及 collagenase 溶液）預熱於 37°C 水浴中，灌注前放入 43°C 水浴中。450~550g 之大白鼠，以 CO<sub>2</sub> 窒息，迅速 U 型剖胸，並於肝門靜脈處插入留置針結紮。再於上腔靜脈處埋沒引流管結紮。實驗開始，從肝門靜脈處注入前灌溶液（10 ml/min），邊灌注邊按摩肝臟，讓前灌溶液充分流入肝臟每個角落，洗去血水，並由上腔靜脈流出，直至整個肝臟呈現淡褐色（約 100~150 ml）。接著注入 pronase E 溶液約 6~8 分，肝臟呈現柔軟鬆散狀，再注入 collagenase 溶液分段注入約 15~20 分鐘後，肝臟呈現解離化。迅速取出肝臟剪碎並放入 40 ml pronase E/ collagenase 混合液，於 37°C 下進行解離，10 分鐘後收集 supernatant，過濾，離心 500 g，7 分鐘。殘餘組織重新添加 40 ml pronase E/collagenase 溶液，繼續解離，重覆三次。每次離心後，輕輕吸棄上清液，直至接近細胞團塊上方 1 公分高處，添加 40 ml 無鈣培養液 1ml DNase I 溶液使細胞充分懸浮，再以上述條件離心，重複約 3~4 次，直至上清液澄清。將細胞團塊收集為一管，添加 30% Nycodenz，使其最終濃度約為 8.4% 混合均勻，保持離心管直立並於其上小心添加 1.5ml 無鈣培養液，進行密度梯度離心 3200 rpm，20 分鐘。垂直取下離心管小心吸取無鈣培養液及細胞懸浮液之間的細胞。放入新的離心管，添加無鈣培養液，離心，倒去上清液，重覆洗二次，將細胞培養在含 20%BCS 之 DMEM 培養液，24 小時後，細胞幾已完全貼附後，可換至 10%BCS。

#### 五、生長及存活率及細胞凋亡之測定

Kupffer 細胞，以一定的細胞密度植入 12 孔盤中，每孔含 1ml 培養液，繞細胞貼附 48 小時後，以 ED2 進行免疫螢光染色確定分離之 Kupffer 細胞

純度。確定分離之 Kupffer 細胞分別處理不同濃度之中草藥萃取液，繼續培養、觀察，待其生長或存活有顯著差異時，以血清計數器，佐以 Trypan blue 染色方法計算各處理的細胞數，並以各處理組之平均值作出生長或存活率之曲線圖。

#### 六、西方墨點印漬法（鑑定特定蛋白的表現）

肝星狀細胞或肝 Kupffer 細胞，經不同濃度 ZC008 中草藥萃取液處理後，收集細胞團塊，並以適量的解離溶液來萃取其中蛋白質。各個不同處理的等量蛋白質經聚丙烯醯胺的電泳分離後，轉漬於 PVDF 膜上，轉漬完成的 PVDF 膜先以 5% 脫脂奶粉做空白填充 (blocking)，再分別以 TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、iNOS、Egr1、Cyr61 及 Id1 等蛋白之一次抗體結合，洗去多餘的一次抗體後，接者加入二級抗體作用一小時，經 TBST 清洗後，進行螢光 X 光片反應。以鑑定各特定蛋白質的含量。

#### 七、免疫螢光染色偵測 ED2 表現之細胞

進行 ED2 免疫螢光染色，培養在玻片上的 Kupffer 細胞以酒精固定，依序加入 1:100 稀釋之抗 ED2 之一級抗體，待 PBS 洗去殘餘的一級抗體後，加入以 1:100 稀釋之結合 FITC 之二級抗體，以便在螢光顯微鏡以便在螢光顯微鏡下觀察。其中，陰性對照組可以兔子或老鼠的血清取代抗體，陽性對照組則以正常老鼠的心肌細胞染色。在螢光光學顯微鏡交叉觀察 ED2 在細胞內的表現。

#### 八、免疫螢光染色分析 $\alpha$ -SMA 及 collagen

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

#### 九、Caspase 活性測定

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

#### 十、ELISA 測定

肝 Kupffer 細胞，以一定的細胞密度植入 12 孔盤培養盤中，細胞貼附



48 小時後，分別處理不同濃度之 ZC008 萃取液 20 分鐘後，再處理  $0.1 \mu\text{g/ml}$  的 LPS 繼續培養 24 小時，收集細胞培養液後。依據廠商提供之分析 TNF- $\alpha$ ，IL-6，IL10 含量之套組作用後。用微盤光譜分析儀(Thermo Labsystem, Finland)於 505 nm 之分析條件下偵測。因 OD 值越大表示所測試的分子含量越多。

#### 十一、Gress reagent 分析 NO 的含量

肝 Kupffer 細胞，以一定的細胞密度植入 12 孔盤培養盤中，細胞貼附 48 小時後，分別處理不同濃度之 ZC008 萃取液 20 分鐘後，再處理  $0.1 \mu\text{g/ml}$  的 LPS 繼續培養 24 小時，收集細胞培養液後。取定量細胞培養液加入 Gress reagent 作用後。用微盤光譜分析儀(Thermo Labsystem, Finland)於 595 nm 之分析條件下偵測。因 OD 值越大表示所測試的分子含量越多。

#### 十二、大鼠動物模式

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

#### 十三、基因微陣列分析

處理或不處理 ZC008 之大鼠肝星狀細胞被用來進行微陣列分析。用來進行微陣列分析的 total RNA 使用 Spectra Max Plus (Molecular Devices)以及利用分光光度計測定 OD260/OD280 比值 (1.9-2.1) 來確認其品質。微陣列實驗過程中之雜交(hybridization)、沖洗(washing)、和染色(staining)的試劑和流程都根據 Affymetrix 官方之實驗步驟手冊 (<http://www.affymetrix.com/support/technical/manuals.affx>)。在與 Affymetrix Human Genome U133A Array 進行雜交之前，先與 Affymetrix GeneChip Test 3 Array 進行雜交，來確認 cRNA 品質。我們使用 GeneSpring® 7.2 software (Silicon Genetics, Redwood City, CA)進行每一晶片和每一基因的標準化校正。

#### 十四、統計分析

使用 SPSS 13 做組織病理與血液生化值之差異性分析，用 GeneSpring 7.3 作基因微陣列分析。使用 *t* test 比較兩組間之差異性。以 ANOVA 進行 3 個以上的處理組之差異性分析。數據是以 Mean+SD 的方式表達，每一實驗至少四重複，結果相似。

## 參、結果

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

大鼠肝星狀細胞以  $50 \mu\text{g/ml}$  的 ZC008 萃取物處理 12 小時後，以 FITC-結合的  $\alpha$ -SMA 抗體進行免疫螢光染色後，於螢光顯微鏡下觀察肝星狀細胞內  $\alpha$ -SMA 的表現。結果(如圖 1)，發現 ZC008 萃取物可以明顯的抑制活化的肝星狀細胞內的  $\alpha$ -SMA 的表現。我們進一步以西方墨點法分析  $\alpha$ -SMA 蛋白在細胞內的表現(如圖 2)，結果發現以  $50 \mu\text{g/ml}$  的 ZC008 萃取物處理不同時間後， $\alpha$ -SMA 在肝纖維細胞中之表現量，隨著處理時間的增加而表現遞減，呈現時間負相關性。A549 為人類肺腺癌細胞，WI38 為人類正常肺纖維細胞。此兩種細胞並無  $\alpha$ -SMA 之表達，表示本實驗結果是有基因表現專一性。我們接著觀察 ZC008 萃取物處理對肝星狀細胞分泌 collagen I 能力的影響。結果顯示，無論以免疫螢光染色或以西方墨點法分析，均發現 ZC008 萃取物可顯著的抑制肝星狀細胞分泌 collagen I 的能力。

### 二、ZC008 萃取物抑制肝星狀細胞生長並促進細胞死亡：

大白鼠肝星狀細胞以  $50 \mu\text{g/ml}$  的 ZC008 萃取物處理 1、2、4、8、及 24 小時後，以 Trypan blue dye exclusion 的方法直接計算存活細胞的數目。結果發現處理 ZC008 萃取物組，其存活細胞數目顯著降低(如圖 3)。在位相差顯微鏡下觀察細胞的外型變化，結果發現處理 ZC008 萃取物的細胞逐漸圓起，漂浮於培養液中，呈現細胞死亡的徵狀。

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

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

#### 四、利用肝纖維化之大鼠動物模式評估 ZC008

我們利用大鼠肝纖維化動物模式進一步評估 ZC008 療效(圖 5)，實驗進行中，同時用作為 Silymarin 西藥對照組。先前大鼠存活曲線實驗得知 ZC008 之治療組是可以明顯增加肝臟受損大鼠之存活率。所以對於肝臟受損與 ZC008 治療之大鼠作更進一步組織病理學與血液生化值的分析。在肝臟總重統計分析上，ZC008 之治療組是明顯有抑制 DMN 引發肝臟受損時總重量減輕的現象(數據未呈現)，這顯示 ZC008 是有減緩肝臟受損現象。組織病理學方面研究，經由生物統計分析，在 DMN 所引發的肝臟受損，ZC008 是在第三到四週時明顯降低 31%發炎性細胞壞死，並且也在第五到六週降低 30%肝纖維化病理進程(表一)，圖六則顯示第四週發炎性細胞壞死與第六週的肝纖維化組織病理學結果。不僅如此，相較於西藥對照組，ZC008 比 Silymarin 更有效果(表一、圖 6)。

血液生化質方面，一共做 14 項血液生化時實驗。生物統計分析後，有 11 項血液生化質會因受到 DMN 處理後明顯發生類似肝臟受損時之指數變化(Su, et al.)，例如 GOT，GPT，bilirubin 在血液濃度是上升。至於 ZC008 之治療組，則從 11 項明顯變化之血液生化質中有 8 項明顯回復。這 8 項包括 GPT、GOT、bilirubin、AKP、AFP、BUN、PT 和 PLT(表二)。圖 7 則是零床上經常使用肝功能之指標，相較於西藥對照組，GPT、GOT、bilirubin 明顯降低指數功能，Albumin 則是有稍微回復，換句話說，ZC008 是有保護肝細胞不被肝毒性化合物破壞的能力。

#### 五、基因微陣列分析

在先前發表研究中，大鼠肝臟受到 DMN 破壞後，利用基因微陣列之統計分析，一共有 256 個基因是肝臟在發炎性細胞壞死與纖維化有關之基因(Su, et al.)，我們就進一步將 ZC008 之治療組與 Silymarin 西藥對照組作基因微陣列分析實驗。從基因圖譜中，我們發現已知肝纖維化之標記，例如 Tgfb、Timp1 與 Timp2，在 ZC008 處理後會顯著回復因肝臟受損時的表現(數據未呈現)。圖 8 則是結合先前發表與藥物治療組的實驗數據，256 基因所形成基因表現圖譜。在 256 受到改變的基因中，ZC008 之治療組 64%基因顯著回復基因表現(圖 9)，相較於西藥對照組(9%)，ZC008 在治療肝纖維化的過程中，是更全面也更有效的候選藥物。

#### 六、Kupffer 細胞的分離培養及鑑定：

利用二段式的肝臟灌流方式，依序加入前灌溶液以洗去血水，再經 pronase E 及 collagenase IV 作用，消化間質蛋白，我們成功的由 Sprague-Dawley rat 的肝臟分離出 kupffer cell，令其培養在 10% RPMI medium，經 2 小時的貼附後，輕輕沖去未貼附之雜細胞，即可得到大量且純度高達 95%的的 kupffer cell，在位相差顯微鏡下觀察，其型態明顯的與



肝細胞及肝星狀細胞有極大的差異（圖 10A）。利用其細胞膜上具特異性蛋白 ED2 的特性，用 ED2 抗體與含螢光的 2 級抗體的結合進行免疫螢光染色來進一步證實，Kupffer 細胞有明顯 ED2 的表現，對照組的肝細胞則無（圖 10B）。此外，kupffer cell 是位於肝臟的 macrophage 必然具備吞噬的能力，添加 latex 1  $\mu$ m bead 至培養液中檢測其是否具備 phagocytosis 的能力，結果顯示僅需 1 小時即可看到有大量 bead 被吞噬的情形（圖 10C），而其他細胞包括肝細胞、肝星狀細胞、內皮細胞、及其他癌細胞如 Hep 3B、A549、A2058 等即使經一天的靜置也沒有吞噬現象的產生。

#### 七、ZC008 對 Kupffer cell 的免疫調節作用

在偵測 ZC008 是否具抗發炎作用時，選用適當濃度的 ZC008 (0.1、0.3、1 mg) 對 Kupffer cell 進行前處理，在此濃度下 ZC008 並不會影響 Kupffer cell 的存活，對肝細胞亦沒有傷害。先將 ZC008 前處理 Kupffer 細胞 20 分鐘，再添加 0.1  $\mu$ g/ml LPS 誘發發炎反應的產生，視其對免疫的調節作用。分別在收取 4 小時上清液檢測 TNF- $\alpha$ ，24 小時上清液檢測 IL-6、IL-10 及 NO，由實驗結果顯示 ZC008 對 LPS 誘導的 Kupffer 細胞釋放 TNF- $\alpha$  有極強的抑制作用，且呈劑量效應，在 1mg/ml 濃度的使用下，可減少 TNF- $\alpha$  release 達 70% 左右之能力。（圖 11A）。至於 IL-6 release，ZC008 亦可明顯降低 LPS 誘發之 IL-6 release 達 30~40%（圖 11B）。相較於 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的發炎作用，IL-10 在免疫調節中是扮演抑制發炎的細胞激素，我們檢測 IL-10 的 release 發現前處理 ZC008 更能促進 IL-10 的 release（圖 11C），且與劑量成正相關，顯現 ZC008 可促進抗發炎激素 IL-10 的產生。至於 NO 的產生 ZC008 具抑制效果（圖 11D）。

#### 八、ZC008 阻斷 LPS 下游的訊息傳遞

過去的研究顯示 LPS 誘發 KC 產生發炎反應，引發一系列細胞激素的分泌與 NO 的產生，細胞內的訊息傳遞分子尤其是 p-ERK 會在很短的時間內迅速活化。既然 ZC008 對 LPS 誘發的發炎反應，有一定程度的抑制作用，是否是透過阻斷了 p-ERK 的活化來達到抗發炎的效果。在有無 ZC008 前處理的情況下，我們分別抽取處理了 LPS 20 分鐘及 1 小時的細胞蛋白質，進行西方墨點雜交。發現 KC 在 LPS 的刺激下，20 分鐘內 p-ERK 的量即有明顯增加，且於 1 小時後恢復正常的表達量。前處理了 ZC008 對 p-ERK 表達的增加有明顯的抑制作用（圖 12）。另外，LPS 誘發 Kupffer 細胞產生 NO 是透過 iNOS 作用在 L-arginine 及氧分子而達成。既然 ZC008 的前處理對 LPS 誘發 NO 產生有明顯的抑制作用，我們同樣偵測 ZC008 對 iNOS 的表達是否相對應的受到影響，同樣的，在有無 ZC008 前處理的情況下，我們分別抽取處理了 LPS 4 小時及 8 小時細胞蛋白質，進行西方墨點雜交，發現 KC 在 LPS 的刺激下，4 小時 iNOS 的表達尚無明顯增加，至 8 小時 iNOS 的表



達即明顯上升，若前處理 ZC008，8 小時 iNOS 表達增加的情形有被抑制下來(圖 13)。此外 NF- $\kappa$ B 是調控發炎反應之轉錄因子在 LPS 誘發發炎反應的狀態下核轉錄因子 NF- $\kappa$ B 在 30 分鐘內會被活化以調控發炎反應之進行，但前處理 ZC008，NF- $\kappa$ B 的表達明顯被抑制下來(圖 14)。

#### 九、利用基因晶片結果評估與 ZC008 作用於肝纖維細胞相關之基因

我們分析基因晶片之結果列於圖 15，進一步以 Q-PCR 及 Real-time PCR 確認 ZC008 作用於肝纖維化細胞之基因表現(圖 16)。我們找出 Egr1, Id1 及 Cyr61 這幾個基因有上下游互屬的關係(圖 17)。因此，就進一步將 ZC008 之治療組與肝硬化組及對照組以抗體，進行 Western blot，分析在肝臟組織中及肝臟細胞中，這些基因的產物蛋白質的表現量是否會受到 ZC008 之調控(圖 18)。

## 肆、討論

肝病長久來一直是國人的首要疾病，如何使受損之肝臟回復到正常功能，且對症下藥是目前中西藥極力發展的方向。雖然傳統中草藥對於肝病的治療上已有悠久之歷史，但礙於中草藥成分複雜且作用機轉不明、缺乏科學上有力證據，使用後之療效無法有具體之數據提供參考，因此推廣使用之成果緩慢，無法在醫學界受到廣泛的應用及認同。但近年來西藥之研發遭遇瓶頸，且西藥又常會造成不良副作用，對慢性疾病治療之成效亦有限。因此，由天然藥用植物中尋找有醫療價值的藥物，已獲得世界各國的重視，許多的專家學者也紛紛投入中草藥活性成分分離，及藥效作用之研究工作中。西方醫療研發團隊更視中國傳統藥材為極具潛力開發的醫藥研發方向。台灣這幾年在政府政策的引導下，中醫藥及天然物的開發研究工作也倍受重視。在世界各地肝病均是一種發生普遍且造成嚴重傷亡的疾病。肝硬化及肝炎為較常發生的肝疾病，可因酗酒、病毒感染、藥物傷害及免疫系統之不正常等原因而誘發。在世界各地因罹患肝硬化而致死的病例有逐年增加的趨勢。過去的文獻報導肝臟中之星狀細胞被活化轉型並大量增殖是形成肝硬化之中心環節，原本在肝臟中作為儲存維生素 A 的肝星狀細胞因前述種種病理原因，被活化轉型而成為肌纖維化之細胞，此細胞大量在肝臟中增殖，破壞了正常肝組織的結構，使肝臟功能不足，導致患者死亡。因此，若能抑制肝星狀細胞的活化轉型及增生之即可有效的抑制肝纖維化，可防止肝硬化之病變。

本研究室一直致力於研發具治療肝硬化功能之中草藥，利用初代培養之大鼠肝星狀細胞，快速有效的篩選出可以抑制肝星狀細胞生長，促進肝星狀細胞死亡的中草藥。先前本實驗室之研究發現，代號 ZC008 之藥劑萃取物治療肝纖維化之效果十分顯著。因此，本計畫第一年之研究對 ZC008 萃取物為何造成活化型態的肝星狀細胞的死亡，有深入之探討。肝星狀細胞中的  $\alpha$ -SMA 及 collagen I 的大量表達，是此細胞活性之顯示。但處理了 ZC008 明顯的造成肝星狀細胞  $\alpha$ -SMA 斷裂及分泌的 collagen I 大量減少，意味著 ZC008 可抑制肝星狀細胞的活性。此外，實驗結果也發現 ZC008 可有效的抑制肝星狀細胞的生長並促進細胞的死亡，但同樣濃度之 ZC008 並不影響正常肝細胞之存活，對肝細胞無毒殺效應。我們進一步分析 ZC008 誘發活化的肝星狀細胞的死亡路徑，結果顯示 ZC008 處理肝星狀細胞可以活化 Caspase-2、-3 及 -9，並且造成 DNA 斷片之產生，此結果顯示 ZC008 是經由粒腺體活化細胞凋亡的路徑，誘導活化的肝星狀細胞的死亡。究竟 ZC008 觸動細胞內何種上游訊息傳遞路徑，催化了肝星狀細胞粒腺體活化致細胞凋亡的路徑，目前也有進一步的發現及初步研究結果，將繼續追蹤

探討。

第二年計畫執行之工作，主要是以 LPS 刺激培養的肝 Kupffer 細胞，形成肝發炎的細胞模式，再探討 ZC008 的抗發炎效果。結果發現 LPS 處理會刺激肝 Kupffer 細胞分泌發炎細胞素，如 TNF- $\alpha$  及 IL-6 等，可是併加 ZC008 可以有效的抑制 LPS 激發的 TNF- $\alpha$  及 IL-6 的表現，此抑制作用主要是因 ERK 的磷酸化被抑制，進而 NF- $\kappa$ B 的轉錄活性被抑制，而使得細胞素 TNF- $\alpha$  及 IL-6 蛋白表現量的減少，最終造成發炎反應被抑制。此離體的細胞學實驗結果與動物實驗結果類似，ZC008 在此兩實驗模式中均表現出抗發炎的效應。因為我們的研究，在以 DMN 或 CCl<sub>4</sub> 誘導之大鼠肝纖維化之動物模式實驗中，也發現 ZC008 可明顯抑制肝發炎及肝纖維化，並促進肝星狀細胞的死亡。

本研究計畫建立了完善的體外與體內抗肝纖維化之藥物篩選之技術平台(從細胞生物學、組織病理學、血液生化學到分子層面的基因微陣列分析)。我們應用此建立之離體肝星狀細胞及肝細胞之體外培養模式，有效的篩檢出具有抗肝纖維化功效之中草藥 ZC008。並以基因晶片分析、分子生物學，或細胞生物學之知識及技術，探討 ZC008 對肝星狀細胞之生長抑制及致死效應之參與分子。以此研究結果將在臨床上用於治療病毒肝炎或肝硬化之中草藥給予科學化之論證，使中草藥之療效及應用得到國際生物醫學界的認同。本研究建立之評估系統，除可找尋到具有治療或抑制肝纖維化之中草藥外，亦可藉此細胞培養模式進行藥物作用之分子機轉探討。在學術及臨床應用上均可得到具體的成效。

此外，在我們基因晶片的研究中，發現許多與肝纖維化或是與 ZC008 治療相關的分子，其中 Egr1、Cyr61 及 Id1 三者，在文獻中就指出與組織纖維化相關性大，目前正繼續研究中。Egr1 是一個屬於 early-response 的 zinc-finger 細胞轉錄因子，許多外在因子如：生長因子、荷爾蒙及神經傳導物質等，都可以快速的誘發 Egr-1 的表現。當 Egr-1 活化時，也可以調控許多下游基因的表現，影響細胞的生長分化及死亡。Egr1 接受細胞生長因子的調控，可以促進許多不同類型細胞的生長如：腎細胞、纖維母細胞、T 淋巴瘤細胞、腦瘤細胞等。但也有些研究發現 Egr1 可以經由增加 p53、PTEN 及 c-Jun 的表現，促進細胞的凋亡。最近的研究報告指出，TGF- $\beta$  可以經由增加 Egr1 基因的表現，進而增加第一型膠原蛋白(Collagen)的合成。因此，認為 Egr1 是一新發現且重要的纖維化形成的調控分子。

Cystein-rich angiogenic protein 61 (Cyr61) 是一個 cycte-in-rich heparin-binding 蛋白，屬於 connective tissue growth factor 家族的分。Cyr61 在所有的血管細胞均會表現，且與細胞外間質分子結合，具有許多生物功能，包括細胞的附著、轉移、生長、死亡、細胞外間質分子的生成及血管

的新生作用等。Cyr61 的這些生物效應，不但使得它在胚胎發育、細胞分化、傷口癒合等正常生理作用中具有重要性，亦在疾病發展的過程中，如腫瘤的形成或組織纖維化也扮演一定的調控角色。文獻報導指出，Cyr61 在軟骨形成、血管新生、組織纖維化過程中，擔任重要的調控角色。而 Cyr61 可結合與活化細胞膜表面特殊的 integrin 分子，將訊號傳送到細胞內，執行其特定的生物功能。文獻報告顯示，Cyr61 是受 Egr1 調控的分子。

Id1 是一個具有 helix-loop-helix domain (HLH) 的蛋白，具調控細胞分化及細胞週期進行的分子，其主要的的作用機制是直接抑制基因轉錄因子與 DNA 結合的能力。因為 Id1 的 HLH 的區域可與一羣 bHLH 的基因轉錄因子結合，使其失去與 DNA 結合的能力，而這群 bHLH 的基因轉錄因子，是調控細胞分化基因的轉錄因子，因此而抑制了細胞的分化。但是當 Id1 不再與 bHLH 結合時，bHLH 就可以活化，使細胞分化相關基因表現，促使細胞進行分化。文獻報導指出 Id1 受到 TGF-beta/Smad1 的調控，在肝纖維形成的過程中是一個重要的調控分子。另外的研究結果顯示，Id1 為 Egr1 下游受 Egr1 調控的分子。

在我們的實驗動物肝組織，或培養的活化肝纖維細胞的基因晶片分析結果中，發現 Egr1、Cyr61 及 Id1 基因的表現有同時增加的現象。目前正由一位博士班學生，利用肝纖維化細胞株及初代培養的活化肝纖維細胞，繼續處理 ZC008，研究其基因表現之情形，並進一步探討 Egr1，Cyr61 及 Id1 之功能與肝纖維化形成之關係。



## 伍、結論與建議

具有實際療效的許多傳統民間驗方之中草藥，是目前新藥研發的一大智庫寶藏，在過去缺乏現代醫療又窮困貧瘠的年代，民間承襲著數千年祖先的經驗智慧做為自身醫療保健的依據，只可惜先人的經驗傳承缺乏科學驗證，過去一直處在晦暗不明的地帶，甚至被斥之為無稽之談。如今藉著基因分子學及細胞學研究的蓬勃發展，從細胞的分離培養、藥物對細胞的存活所表現的促進或抑制作用甚或致死效果，以及其在細胞內訊息傳遞路徑的探討，很明確的提供治療的依據，不但賦予許多具有真正臨床價值卻又妾身未明之中草藥一個科學之論證，更藉由細胞內訊息傳遞路徑的探討，對於致病、治病的機制有更深入的瞭解。本研究建立了抗肝纖維化之中草藥藥效評估之離體模式技術平台。藉由離體肝星狀細胞、Kupffer 細胞、肝細胞之體外培養模式，成功的作為分析具有抗肝炎及肝纖維化功效之中草藥 ZC008 作用之分子機制。我們應用此建立之體外培養模式，並以分子生物學，細胞生物學及基因晶片等知識及技術，探討 ZC008 治療肝疾病的參與基因分子。發現 ZC008 會造成肝星狀細胞的凋亡作用，抑制被 LPS 激活的 Kupffer 細胞發炎效應，但對肝細胞毒性不大，此藥物極具潛力應用於肝炎及肝硬化的治療。未來透過更多發炎反應訊息傳遞路徑的探討，如 COX2、PGE2、ROS 等等，可更清楚明瞭各種藥物對抗發炎反應的調控是透過何種機制進行，以便更有效的掌控藥物的作用，及不同病程及誘病因素適用何種抗發炎藥物等等。而我們所使用的研究平台模式，可將在臨床上用於治療病毒肝炎或肝硬化之中草藥，給予細胞學及分子生物學上的基礎研究，在臨床上也給予治療肝炎及肝硬化之中草藥科學化之論證，使中草藥之療效及應用得到國際生物醫學界的認同。在如今西方化學合成新藥之研發面臨枯竭的瓶頸之際，由民間驗方之中草藥來擷取有治療價值之藥物無疑是對新藥的研發注入源頭活水。此計畫除了釐清 ZC008 在肝纖維化過程中的功效機轉，另一長遠的目標在尋找全新之肝纖維化疾病的標記分子，以利臨床上對於早期肝纖維化之診斷。並期望能因本計畫一系列科學化之研究驗證，將 ZC008 推廣為國際醫學界可接受之有效治療肝纖維化之藥物。

本研究計畫在執行的過程中，礙於各單位行政系統上的制度面配合困難，使計畫主持人及配合之研究助理人員在執行工作上困難重重，量費許多時間在協調溝通上。希望政府相關部門研擬具有人性化的計畫審核及追蹤制度，避免計畫執行人員常受不必要的干擾，如此才能讓計畫主持人及其助理或學生有足夠的精力完成研究。

## 誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會計畫編號 CCMP94-RD-047、CCMP95-RD-208 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 陸、參考文獻

1. Adachi Y, Bradford BU, Gao W, Bojes HK, Thurman RG. Inactivation of Kupffer cells prevents early alcohol-induced liver injury. *Hepatology* 1994; 20:453-460.
2. Arthur MJ, Bentley IS, Tanner AR, Saunders PK, Millward-Sadler GH, Wright R. Oxygen-derived free radicals promote hepatic injury in the rat. *Gastroenterology* 1985; 89:1114-1122.
3. Bahr MJ, Vincent KJ, Arthur MJP, Fowler AV, Smart DE, Wright MC, Clark IM, Benyon RC, Iredale JP, Mann DA. Control of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promoter in culture-activated rat hepatic stellate cells: regulation by activator protein-1 DNA binding proteins. *Hepatology* 1999; 29:839-848.
4. Bhattacharjee A, Lappe VR, Rutherford MS, Schook LB. Molecular dissection of dimethylnitrosamine (DMN)-induced hepatotoxicity by mRNA differential display. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1998; 150:186-195.
5. Chen Y-C, Shen S-C, Chen L-G, Lee TJ-F, Yang L-L. Wogonin, baicalin, and baicalein inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expressions induced by nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide. *Biochem Pharmacol* 2001; 61:1417-1427.
6. Chiu H, Brittingham JA, Laskin DL. Differential induction of heme oxygenase-1 in macrophages and hepatocytes during acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat: effects of hemin and biliverdin. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2002; 181:106-115.
7. Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* 1990; 192:245-261.
8. Edwards MJ, Keller BJ, Kauffman FC, Thurman RG. The involvement of Kupffer cells in carbon tetrachloride toxicity, *Toxicol Appl Pharmacol* 1993; 119:275-279.
9. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275:2247-2250.
10. Garcia-Trevijano ER, Iraburu MJ, Fontana L, Dominguez-Rosales JA, Auster A, Covarrubias-pinedo A, Rojkind M. Transforming growth factor  $\beta$ 1 induces the expression of  $\alpha$ I-procollagen mRNA by a hydrogen peroxide-C/EBPB-dependent mechanism in rat hepatic stellate cells.

- Hepatology 1999; 29:960-970.
11. Ham AW, Cormack DH. Histology. 8<sup>th</sup> edition Toronto: J.P. Lippincott Company. 1972.
  12. Inoue T, Jackson EK. Strong antiproliferative effects of baicalein in cultured rat hepatic stellate cells. Eur. J. Pharmacol. 1999; 378: 129-135.
  13. Jia J-D, Bauer M, Cho JJ, Ruehl M, Milani S, Boigk G, Riecken EO, Schuppan D. Antifibrotic effect of silymarin in rat secondary biliary fibrosis is mediated by downregulation of procollagen  $\alpha 1$  (I) and TIMP-1. J Hepatol 2001; 35:392-398.
  14. Klaasen CD Casarett and Doull's Toxicology. 5th edition. New York: McGraw-Hill. 1996.
  15. Klika E, Vacek Z, Dvofak M, Kapeller K. Histologie. Praha: Avicenum. 1986.
  16. Knolle P, Lohr H, Treichel U, Dienes HP, Lohse A, Schlaack J, Gerken G. Parenchymal and nonparenchymal liver cells and their interaction in the local immune response. Gastroenterol 1995; 33:613-620.
  17. Li N, Karin M. Is NF- $\kappa$ B the sensor of oxidative stress? FASEB J 1999; 7:1137-1143.
  18. Luckey SW, Petersen DR. Activation of Kupffer cells during the course of carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrosis in rats. Exp Mol Pathol 2001; 71:226-240.
  19. Mann DA, Smart DE. Transcriptional regulation of hepatic stellate cell activation. Gut 2002; 50:891-896.
  20. Miyahara T, Schrum L, Rippe R, Xiong S, Yee HF Jr, Motomura K, Anania FA, Willson TM, Tsukamoto H. Peroxisome proliferator-activated receptors and hepatic stellate cell activation. J Biol Chem 2000; 275:35715-35722.
  21. Myhrstad MCW, Carlsen H, Nordstrom O, Blomhoff R, Moskaug JO. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. Free Radical Biol Med 2002; 32:386-393.
  22. Nagakawa J, Hishinuma I, Hirota K, Miyamoto K, Yamanaka T, Tsukidate K, et al. Involvement of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the pathogenesis of activated macrophage-mediated hepatitis in mice. Gastroenterology 1990; 99:758-765.
  23. Nakamura T, Sakata R, Ueno T, Sata M, Ueno H. Inhibition of transforming growth factor  $\beta$  prevents progression of liver fibrosis and



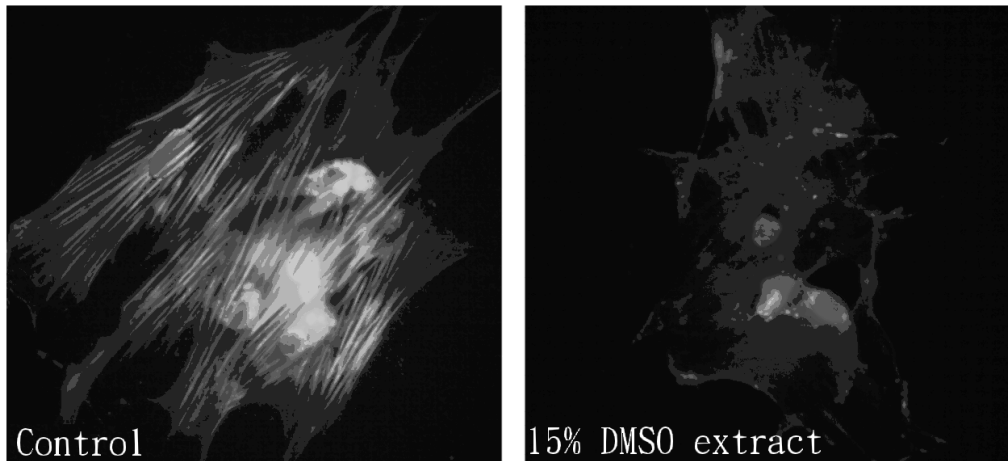
- enhances hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats. *Hepatology* 2000; 32:247-255.
24. Parola M, Robino G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J Hepatol* 2001; 35:297-306.
25. Patrick L. Hepatitis C: epidemiology and review of complementary/alternative medicine treatments. *Altern Med Rev* 1999; 4:220-238.
26. Poli G. P. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Molecular Aspects of Med* 2000; 21:49-98.
27. Przybicki JM, Reuhl KR, Thurman RG, Kauffman FC. Involvement of non-parenchymal cells in oxygen-dependent hepatic injury by allyl alcohol. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992; 115:57-63.
28. Ramadori G, Armbrust T. Cytokine in the liver. *Euro J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:777-784.
29. Rubin E, Farber JL Pathology. Philadelphia: J.P. Lippincott Company. 1988.
30. Saile B, Matthes N, Armouche HE1, Neubauer K, Ramadori G. The bcl, NFkB and p53/p21WAF1 systems are involved in spontaneous apoptosis and in the anti-apoptotic effect of TGF- $\Delta$  or TNF-a on activated hepatic stellate cells. *Eur J Cell Biol* 2001; 80:554-561.
31. Schultze RL, Gangopadhyay A, Cay O, Lazure D, Thomas P. Tyrosine kinase activation in LPS stimulated rat Kupffer cells. *Cell Biochem Biophys* 1999; 30:287-301.
32. Shimizu I, Ma Y-R, Mizobuchi Y, Liu F, Miura T, Nakai Y, Yasuda M, Shiba M, Horie T, Amagaya S, Kawada, Hori H, Ito S. Effects of Sho-saiko-to, a Japanese Herbal medicine, on hepatic fibrosis in rats. *Hepatology* 1999; 29:149-160.
33. Shiratori Y, Kawase T, Shiina S, Okano K, Sugimoto T, Teraoka H, et al. Modulation of hepatotoxicity by macrophages in the liver. *Hepatology* 1988; 8:815-821.
34. Shiratori Y, Kanai F, Ohashi M, Omata M. Strategy of liver-directed gene therapy: present status and future prospects. *Liver* 1999; 19:265-274.
35. Su, L-J, Hsu, S-L, Yang, J-S, Tseng, H-H, Huang, S-F and Huang, C-Y F Global gene expression profiling of dimethylnitrosamine induced liver fibrosis in a rat model; from histo-pathological and biochemical data to microarray analysis. *Gene Expr* 2006; in press.
36. Svegliati Baroni G, Patorelli A, Manzin A, Benedetti A, Marucci L,

- Solforosi L, Di Sario A, Brunelli E, Orlandi F, Clementi M, Macarri G. Hepatic stellate cell activation and liver fibrosis are associated with necroinflammatory injury and Th-1-like response in chronic hepatitis C. *Liver* 1999; 19:212-219.
37. Tang L, Tanaka Y, Marumo F, Sato C. Phenotypic change in portal fibroblasts in biliary fibrosis. *Liver* 1994; 14:76-82.
38. Thurman RG, Bradford BU, Iimuro Y, Knecht KT, Arteel GE, Yin M, et al. The role of gut-derived bacterial toxins and free radicals in alcohol-induced liver injury. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13(Suppl.):S39-S50.
39. Yata Y, Enosawa S, Suzuki S, Li XK, Tamura A, Kimura H, Takahara T, Watanabe A. An improved method for the purification of stellate cells from rat liver with dichloromethylene diphosphate (CL2MDP). *Methods Cell Sci* 1999; 21:19-24.

## 染、圖、表

圖一 A

$\alpha$ -SMA expression



圖一 B

$\alpha$ -SMA western blot

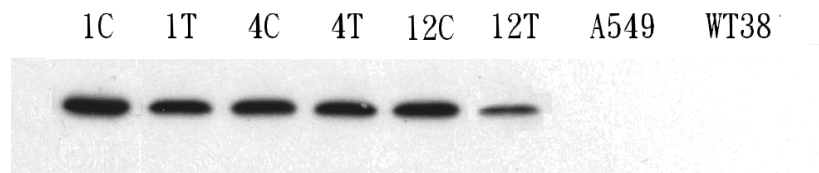
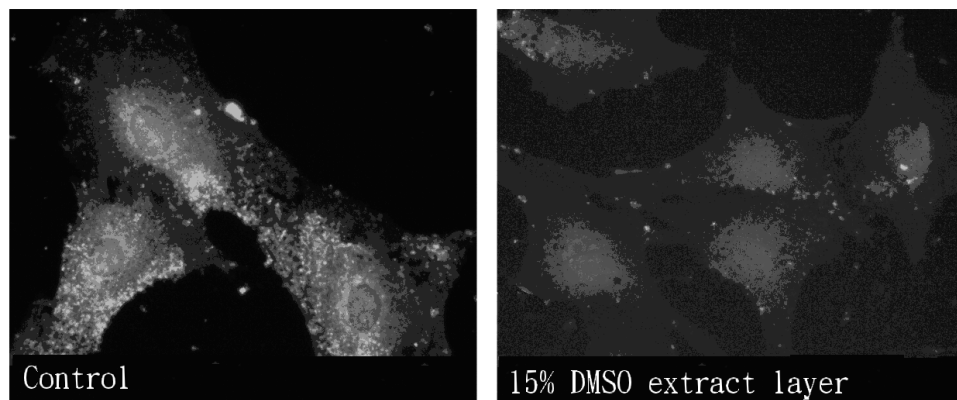


圖 1、ZC008 萃取物抑制肝星狀細胞內  $\alpha$ -SMA 的表現。(A)免疫螢光染色。肝星狀細胞以  $50 \mu\text{g/ml}$  的 ZC008 萃取物處理 12 小時後，以 FITC-結合的  $\alpha$ -SMA 抗體處理後，於螢光顯微鏡下觀察肝星狀細胞內  $\alpha$ -SMA 的表現。(B)西方墨點法分析以  $50 \mu\text{g/ml}$  的 ZC008 萃取物，處理不同時間後， $\alpha$ -SMA 在肝纖維細胞中表現量。A549 為人類肺腺癌細胞，WI38 為人類正常肺纖維細胞。此兩種細胞並無  $\alpha$ -SMA 之表達。

圖二 A

Collagen I expression



圖二 B

Collagen-I western blot

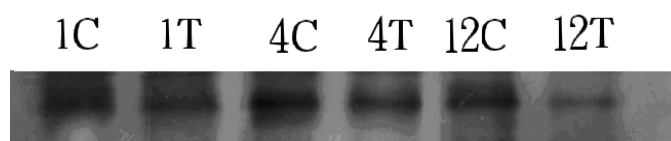


圖 2、ZC008 萃取物抑制肝星狀細胞中第一型膠原蛋白 collagen 的產生。肝星狀細胞處理  $50\mu\text{g/ml}$  的 ZC008 萃取物 12 小時後，細胞內第一型膠原蛋白 collagen 的表現量可以 (A) 免疫螢光染色法及 (B) 西方墨點法分析。



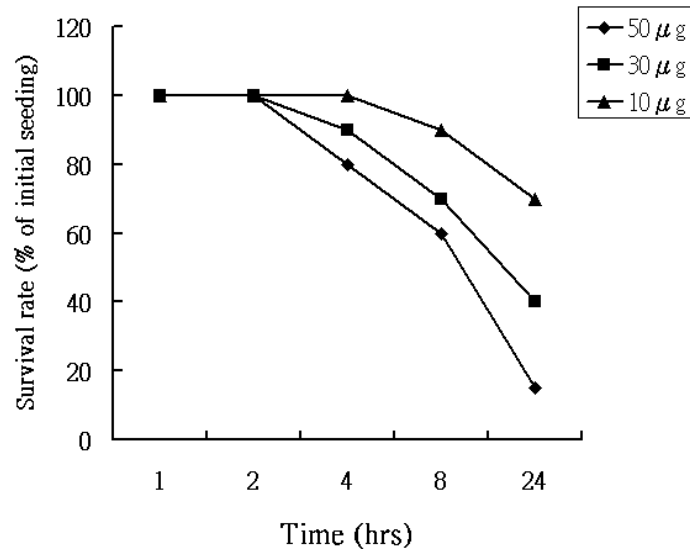
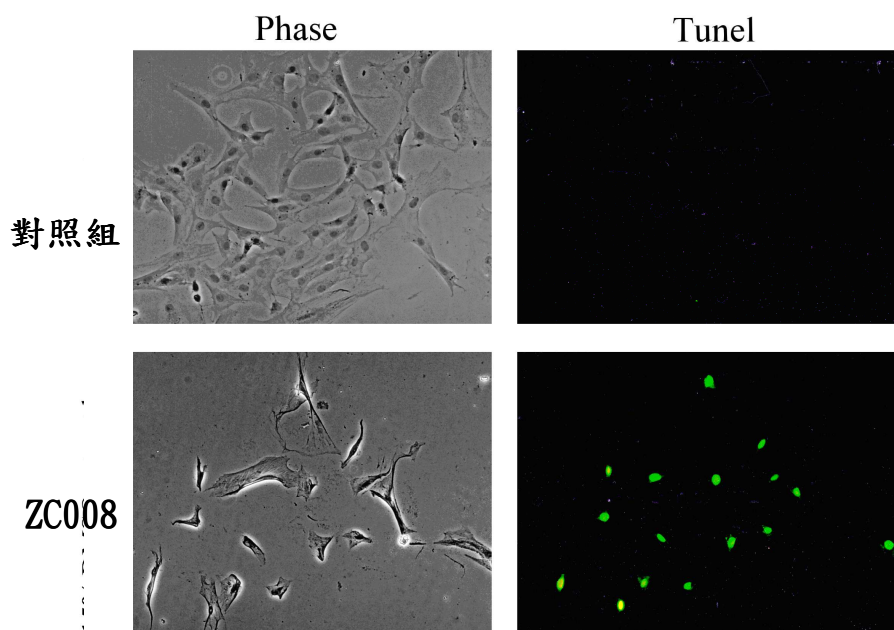


圖 3、ZC008 萃取物可抑制肝星狀細胞生長並促進細胞死亡。大白鼠肝星狀細胞以 50  $\mu\text{g/ml}$  的 ZC008 萃取物處理 1、2、4、8、及 24 小時後，(A) 以 TRYPAN BLUE 的方法直接計算存活細胞的數目。

圖四 A



圖四 B

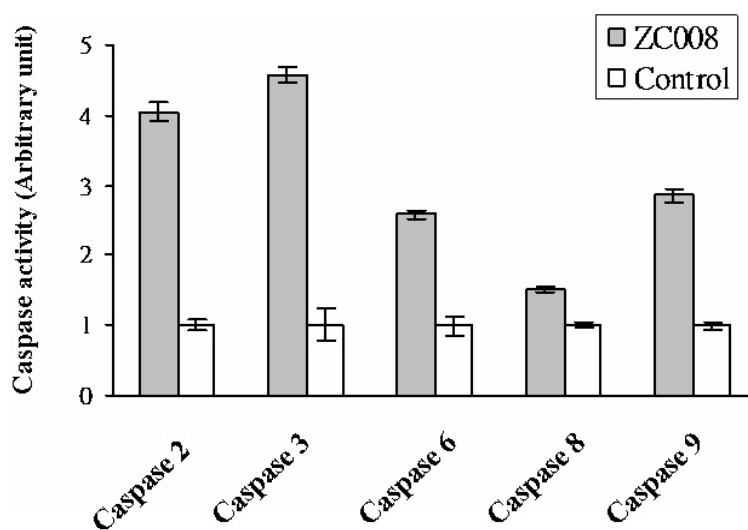


圖 4、ZC008 萃取物誘發肝纖維細胞凋亡並活化 Caspase-3 及-9。(A) 以 TUNEL 的方法分析細胞凋亡現象。大白鼠肝星狀細胞以  $50 \mu\text{g/ml}$  的 ZC008 萃取物處理 12 小時後，以 TUNEL 分析 DNA 斷片產生之現象，若呈現螢光綠色的細胞，即為凋亡之細胞。或 (B) ZC008 萃取物誘發 Caspase 活化。大白鼠肝星狀細胞以  $50 \mu\text{g/ml}$  的 ZC008 萃取物處理 12 小時後，萃取蛋白質分析細胞內各種與凋亡相關的 Caspase 的活性。

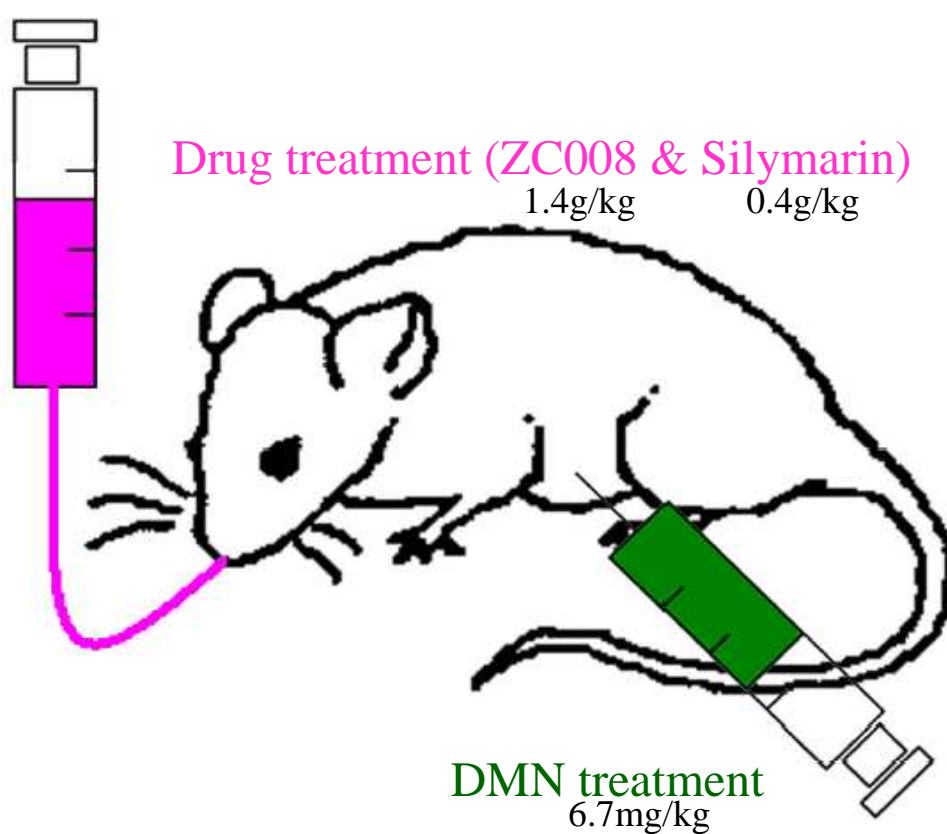


圖 5、ZC008 萃取物抗纖維化隻大鼠動物模式。二甲基亞硝酸胺(DMN)是利用腹腔注射進入大鼠，而中草藥實驗組(ZC008)與西藥對照組(Silymarin)則是使用鼻胃管餵食。這是觀察六週的實驗。

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

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

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

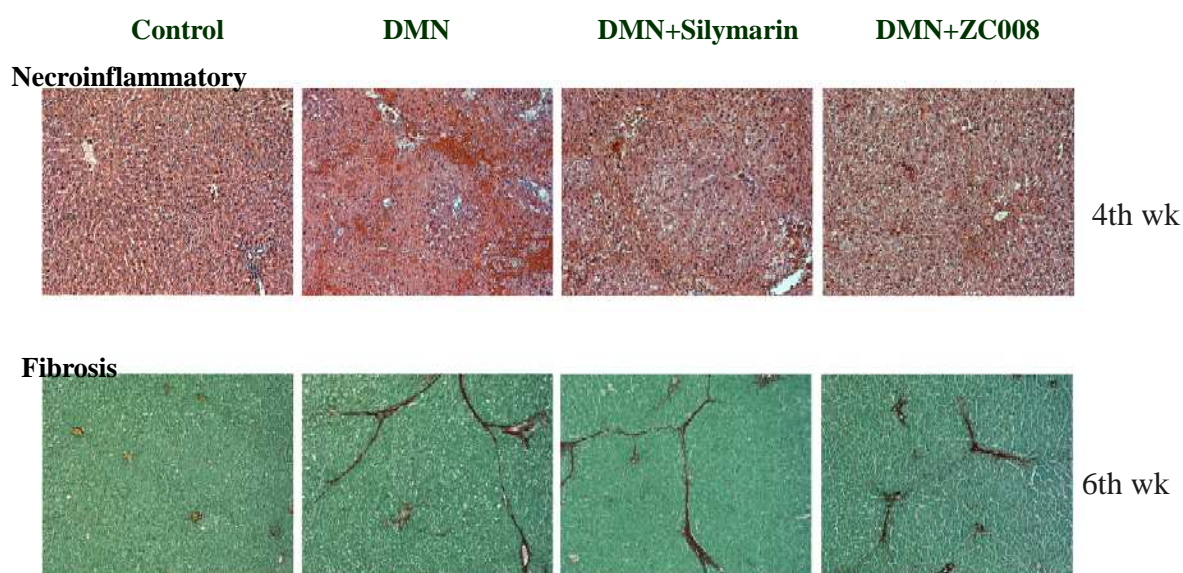


圖 6、ZC008 與 Silymarin 在抗肝纖維化之動物模式中，第四週與第六週之組織病理學結果。上層是 H&amp;E 染色，下層是 Fast Green 染色。



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

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

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

b: DMN or DMN+ZC008 treatment groups

c: Average<sub>DMN+ZC008</sub> - Average<sub>DMN</sub> in 1st to 2nd, 3rd to 4th or 5th to 6th week

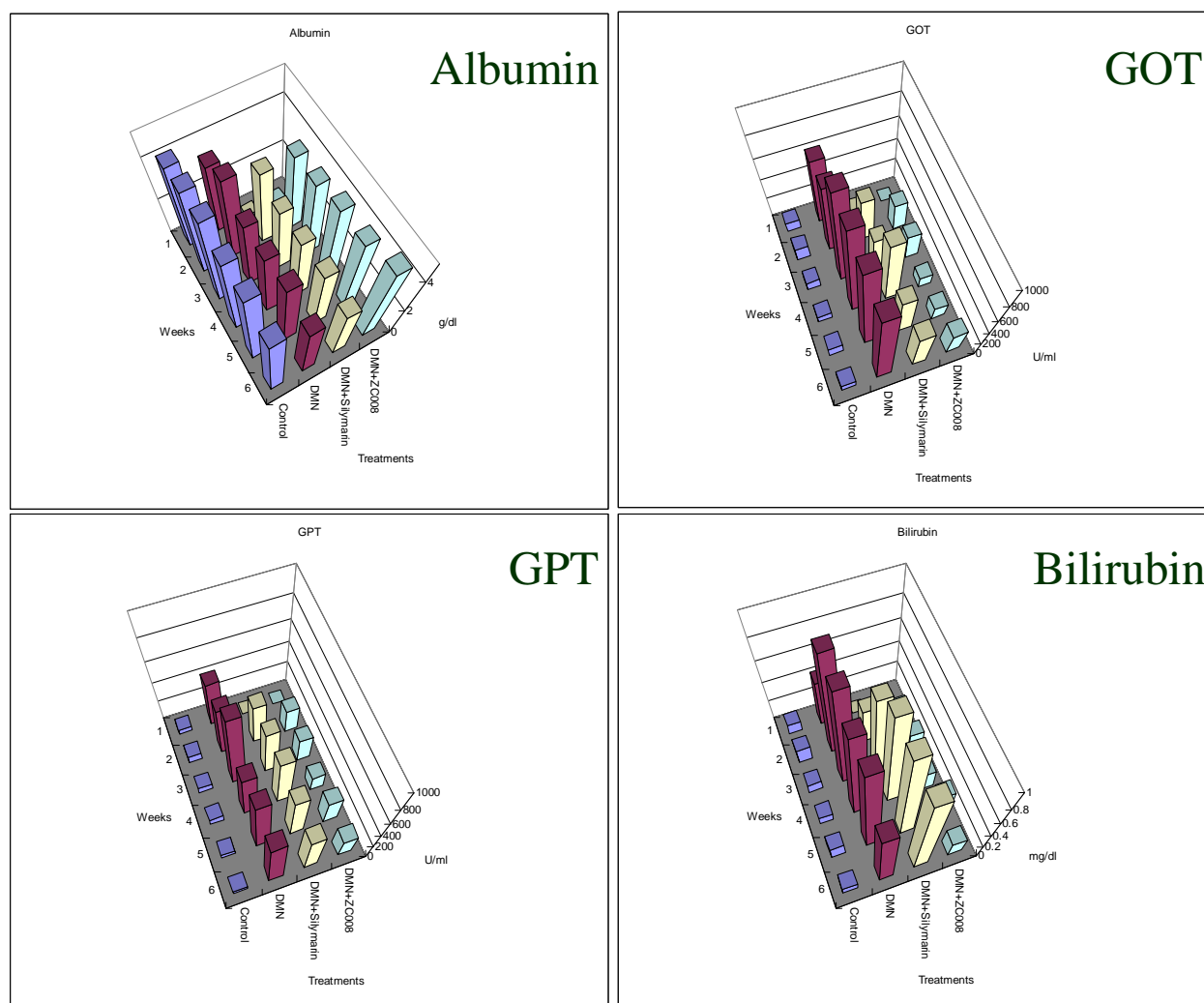


圖 7、ZC008 與 Silymarin 在抗肝纖維化之動物模式中，四項測定肝功能之血液生化學結果(Albumin、GOT、GPT 與 Bilirubin)。

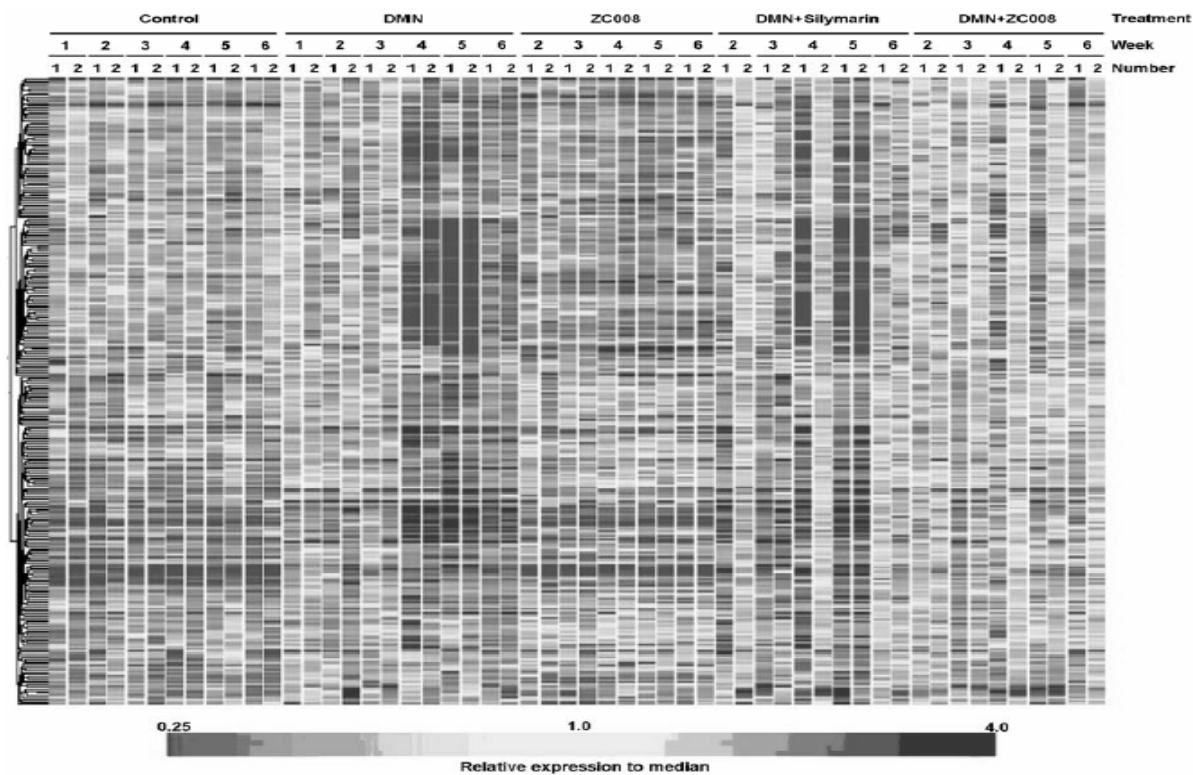


圖 8、ZC008 與 Silymarin 在抗肝纖維化之動物模式中，基因微陣列之分析結果。

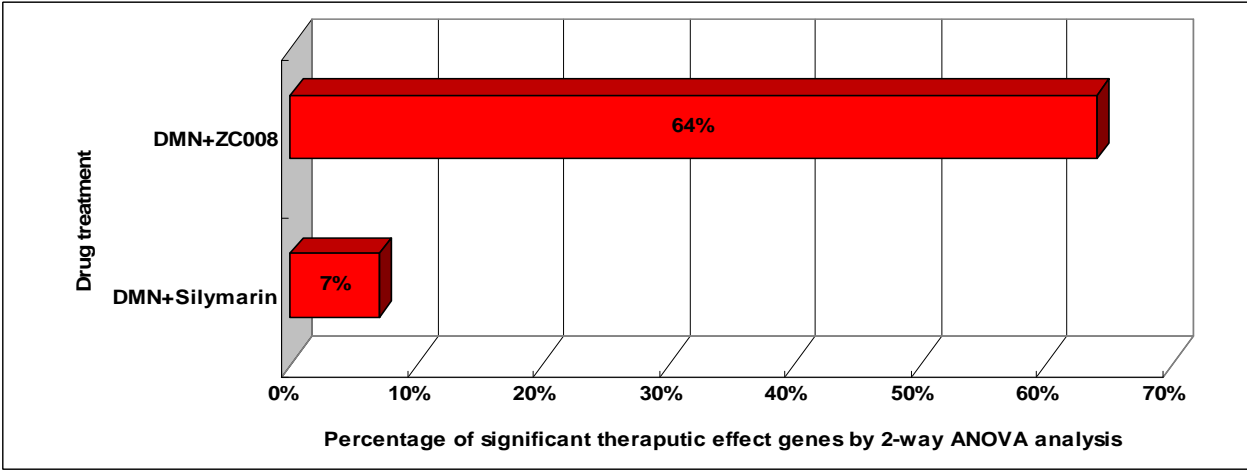


圖 9、以 256 個與肝纖維化相關基因，評估 ZC008 與 Silymarin 之抗纖維化之結果。

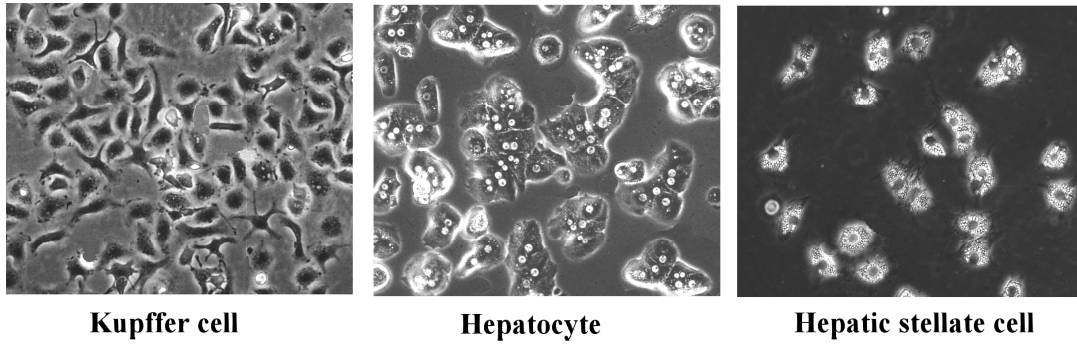


圖 10A、Kupffer cell 與 Hepatocyte 及 Hepatic stellate cell 在型態上有明顯的差異。

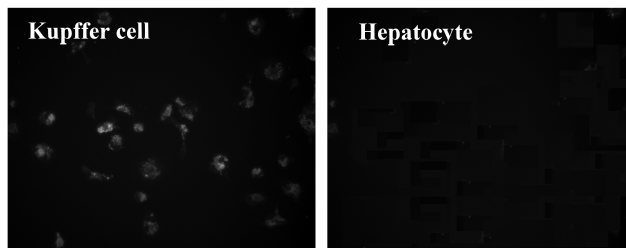


圖 10B、ED2 特異性螢光染色

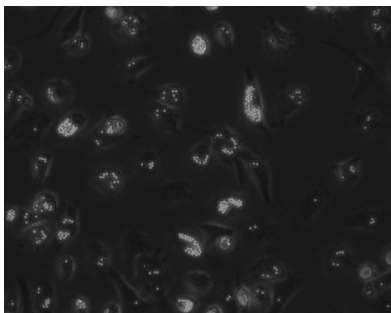


圖 10C、Kupffer cell 具備 macrophage 的吞噬作用

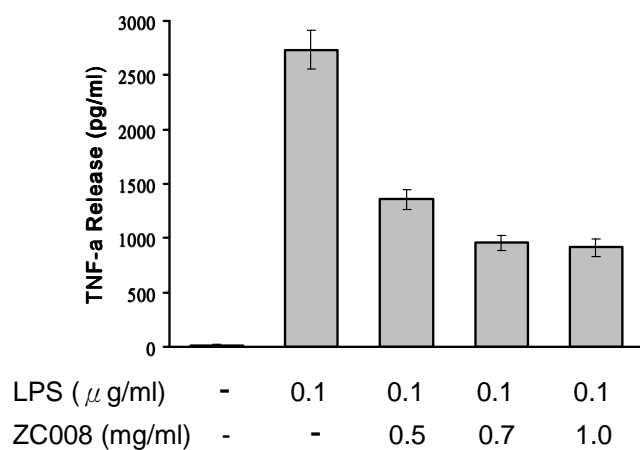


圖 11A、ZC008 的前處理下 LPS 誘發 Kupffer 細胞釋放 TNF- $\alpha$  的情形

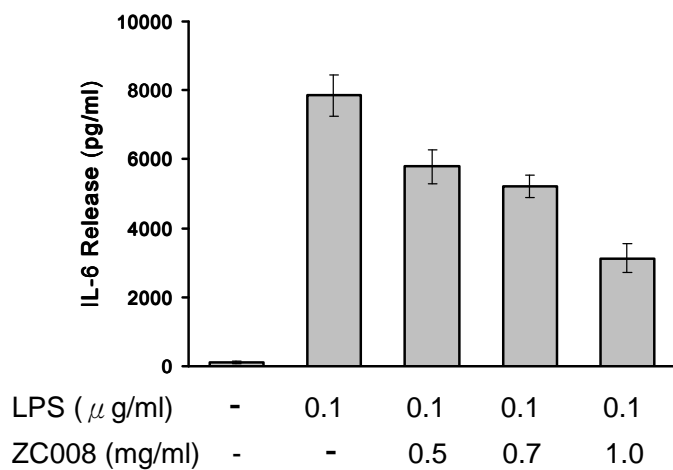


圖 11B、ZC008 前處理下 LPS 誘發 Kupffer 細胞釋放 IL-6 的情形



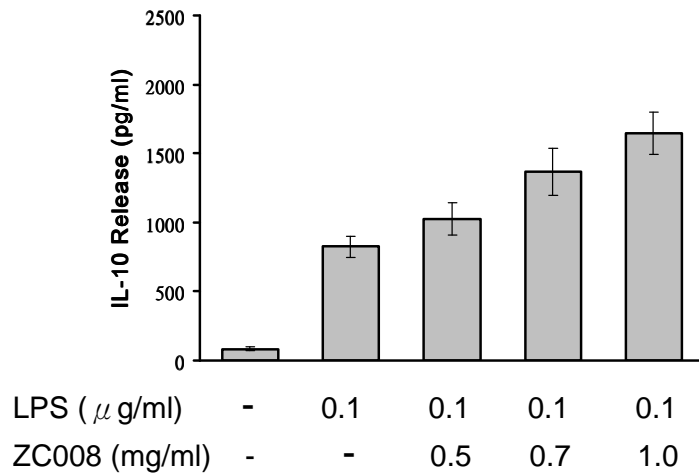


圖 11C、ZC008 前處理下 LPS 誘發 Kupffer 細胞釋放 IL-10 的情形

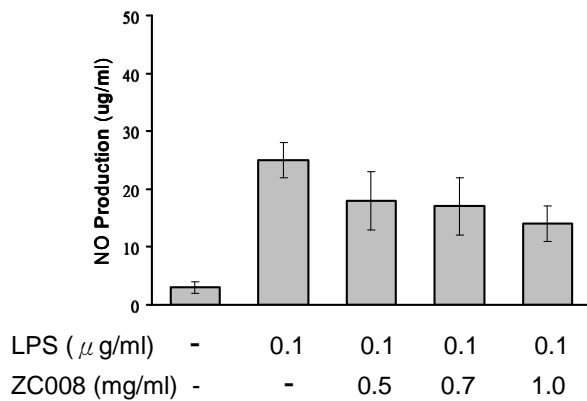


圖 11D、ZC008 前處理下 LPS 誘發 Kupffer 細胞產生 NO 的情形

圖 11、ZC008 對 LPS 誘發 Kupffer cell 發炎反應的調節作用將培養 O/N 的 Kupffer 細胞分別前處理 ZC008 (0.1、0.3、1 mg/ml) 20 分鐘，再添加 0.1 μg/ml LPS 誘發發炎反應的產生，收集 4 小時上清液檢測 TNF-α release，24 小時上清液檢測 IL-6、IL-10 及 NO 的表現。

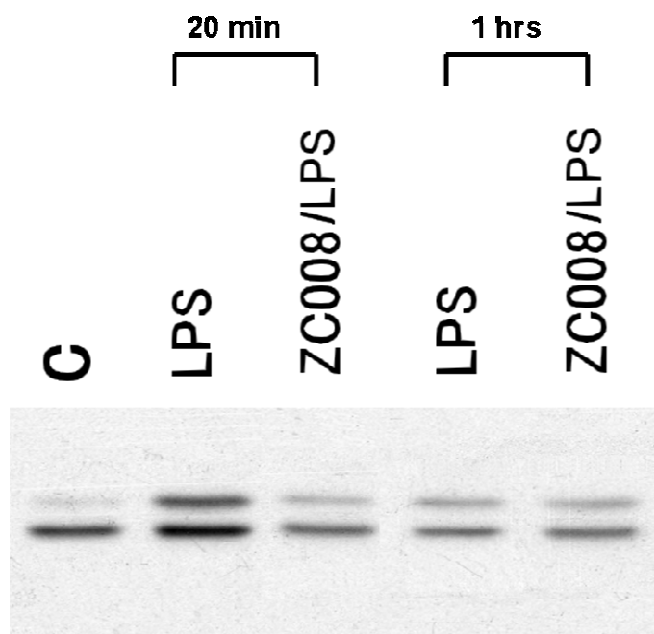


圖 12、ZC008 對 LPS 誘發 Kupffer 細胞 p-ERK 活化的調節作用。LPS 誘發 KC 產生發炎反應，引發細胞內的訊息傳遞分子 p-ERK 於 20 分鐘內迅速被活化，前處理了 ZC008 會使得 p-ERK 活化的現象受到抑制。

## iNOS

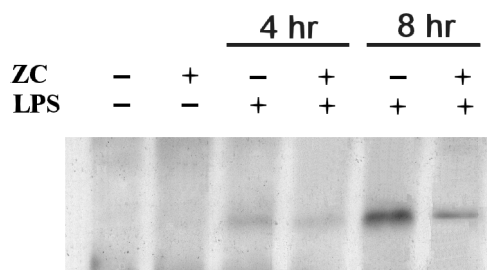


圖 13、ZC008 對 LPS 誘發 Kupffer 細胞 iNOS 表達的調節作用。LPS 誘發 KC 產生發炎反應，引發細胞內的訊息傳遞分子 iNOS 表達增加，若前處理 ZC008，8 小時 iNOS 表達增加的情形會被抑制下來。

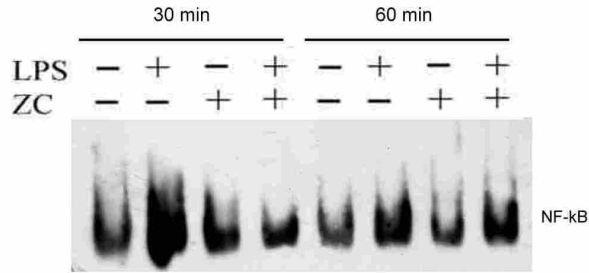


圖 14、LPS 誘發發炎反應造成轉錄因子 NF- $\kappa$ B 活化可被 ZC008 抑制下來。  
LPS 誘發 Kupffer cell 進行發炎反應時 NF- $\kappa$ B 會迅速被活化並進入細胞核內調控發炎相關基因的表達，若前處理 ZC008，30 分鐘內 NF- $\kappa$ B 被活化的情形即會被抑制下來。

**\*\* ZC008 treatment for 0.5 hr:**

Gene	Expression pattern
<i>Id1</i>	UP
<i>Egr1</i>	UP
<i>BTG2</i> (overlapping gene w/ in vivo model)	UP
<i>Nr4a1</i>	UP
<i>Orl1</i> (our fibrosis patent gene)	UP

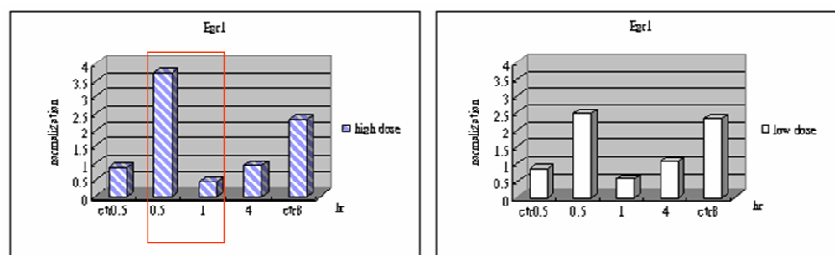
**\*\* ZC008 treatment for 4 hr:**

Gene	Expression pattern
<i>Tnnt2</i> <small>Tnnt2 is one of marker genes on HSC that were linearly up-regulated during fibrogenesis. <i>World J Gastroenterol</i> 2006 October 28; 12(40): 6473-6499</small>	DOWN
<i>HMGCS1</i> (overlapping gene comared w/ animal model)	DOWN
<i>Nrg1</i> (our fibrosis patent gene)	DOWN
<i>ID1</i>	DOWN
<i>Nr1d1</i>	UP

圖 15、ZC008 在肝纖維化細胞中，基因微陣列之分析結果。

### Microarray analysis of *Egr1* expression

(0.5hr zc-up) ; 1hr, zc-down)



### Q-PCR validation (Roche system)

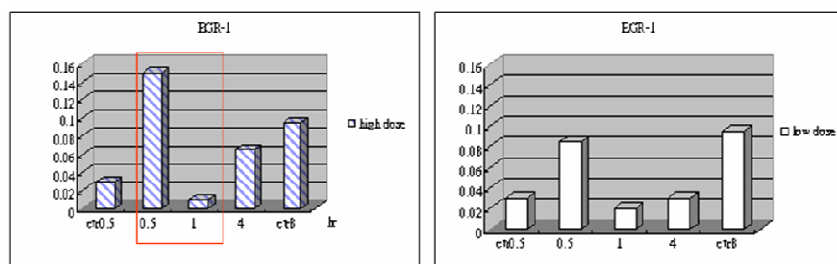
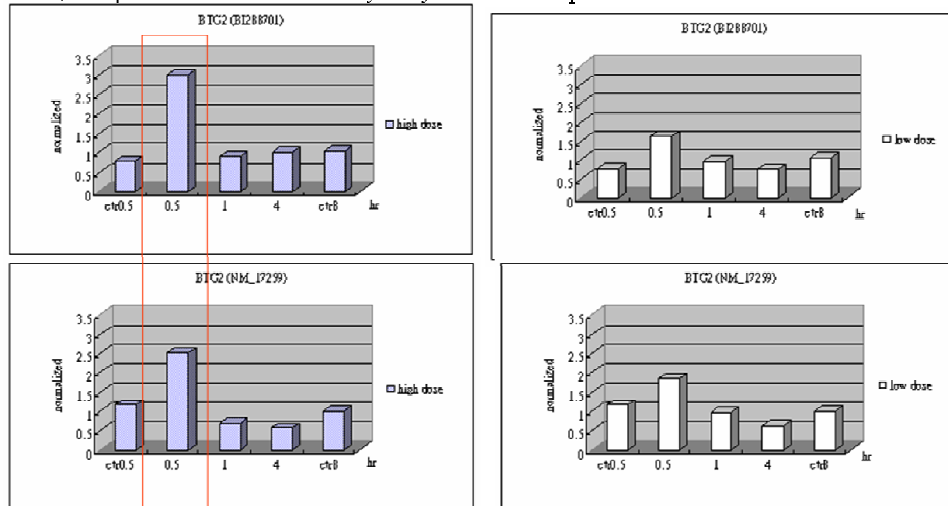


圖 16A、以 Real-time PCR 確認肝纖維化相關基因之表現

h0.5, zc-up

### Microarray analysis of *BTG2* expression



### Q-PCR validation (Roche system)

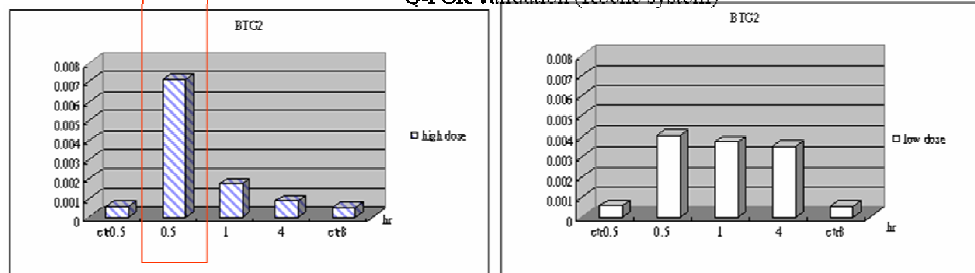
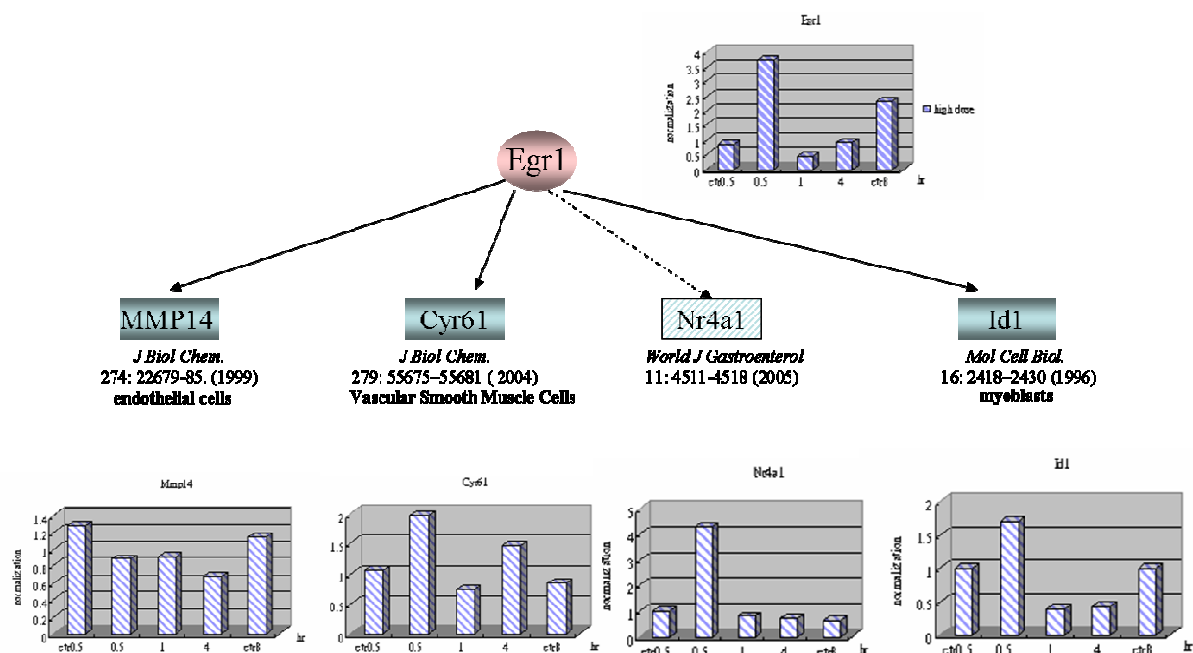


圖 16B、以 Real-time PCR 確認肝纖維化相關基因之表現





Gene expression patterns were obtained from microarray analysis

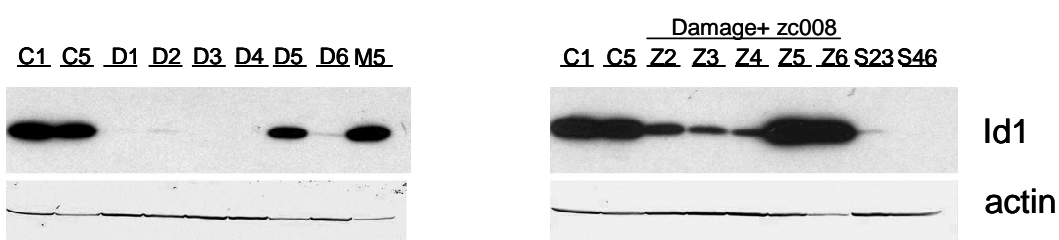
圖 17、探討肝纖維化相關基因之相互關係

### Antibodies test

Antigen	antibody	clone	M.W
ID1	Rabbit polyclonal IgG	C-20;Santa Cruz. SC-488	15 kDa.
EGR1	Rabbit monoclonal	cell signaling # 4153	75 kDa
Cyr61	Rabbit polyclonal IgG	H-78; Snta Cruz SC13100	40 kDa

### The expression of Id1 in rat liver extract

M5: zc008 ONLY



50 ug of liver tissue extract was loaded.

### ZC008 downregulates Egr1 and Cyr61 expression in rat hepatic stellate cells

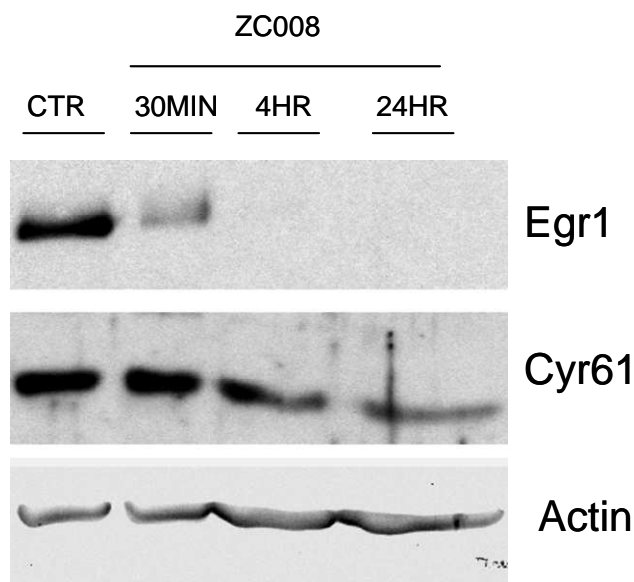


圖 18、肝纖維化相關基因 Egr1, Cyr61 及 Id1 在肝組織及細胞中之表現