

編號：CCMP93-RD-001

補益類中藥及其方劑 對於人體幹細胞之系統分析研究

施子弼

台北醫學大學 細胞及分子生物研究所

摘要

臨床上傳統中藥對人體疾病已有廣泛應用，而在許多重大疾病 的西醫治療上，中藥亦具有輔助效果。例如中藥對於輔助癌症化療後的生理系統恢復，具有一定成效。此外在人體組織修復過程中，幹細胞調節顯得格外重要。但是目前對於中藥對幹細胞再生修復組織生理功能的影響，了解仍非常有限。因此本計畫旨在以系統分子醫學的角度，應用藥物基因體醫學之分析，探討補益類中藥在癌症醫療過程中，對人體組織幹原細胞受損之保護及修復藥理，並藉而建立補益類中藥對人體組織幹原細胞基因體表達影響之資訊。

在過去的研究中，本實驗室已建立人體組織幹細胞分離鑑定及培養之平台—從骨髓、脂肪、臍帶血、包皮、頭皮、羊膜等組織來源分離取得幹細胞，有效率地提供各組織幹細胞之生長、分化及分析檢測，並已針對黃耆、西洋參、三七、柴胡、紅景天等活血化癥單方藥材對於保護造血功能及促進間質幹細胞生長及分化作探討。本計畫進一步針對補益類中藥方劑—包括補中益氣湯、四物湯及生脈散等補血養氣、增進細胞生理機能之複方藥材，探討此三方藥劑對血液前驅/幹細胞中的造血群落生成活性之影響。並研究補益類中藥對臍帶造血幹細胞增殖或分化的影響。針對分化各期之專一性細胞抗原及功能蛋白之變化進行分析。並研究在補益類複方藥材的作用下，多種幹原組織細胞增殖及分化相關調控基因之表達變化，以及評估補益類中藥於活體中修復 5-FU 化療藥物引起之傷害，降低白血球減少副作用之療效。藉此建立評估中藥對於細胞生理與功能影響之資訊。

本計畫所執行之研究成果中發現，補益類複方中藥的生脈散可促進造血

前驅/幹細胞增殖，但不影響整體細胞的增殖比例，也不會改變臍帶血球細胞之分化潛能。補益類中藥複方中的生脈散、四物湯及補中益氣湯對於多種造血群落生成細胞各自呈現不同形式的刺激功效。三種複方對 5-FU 化療藥物引起之白血球減少副作用，都具有保護及修復造血機能之功效。本研究對中藥在個體幹細胞於生理調節上有更完整了解，提供中藥醫療作用於人體組織幹細胞之分子級生理效用的評估技術平台，建立一現代化中藥藥理鑑定的新方向，有助於中藥之國際化發展。

關鍵詞：補益類中藥方劑、人體造血前驅/幹細胞、組織再生修復、系統分子醫學研究

Number:CCMP93-RD-001

A Systematic Biological Evaluation of Some Bu-Yi Chinese Herbs' Pharmacogenomic Effect on Human Tissue Stem/ Progenitor Cells

Daniel Tzu-Bi Shih

Taipei Medical University

Institute of Cell and Molecular Biology

ABSTRACT

In clinic, Chinese traditional drugs have been widely prescribed for human diseases, and shown helpful in treatment of many major illnesses. For an example, Chinese drugs have been found significant effect on the recovery rate of chemotherapeutically treated cancer patients' health. Furthermore, Recent studies on stem cells have shown that many adult tissue stem cells are not only capable of maintaining and renewing the catabolized tissue cells in organs but also responsible for our body tissue injury repairs. However, the physical- pharmacological understanding of their effects in tissue progenitor/stem cells are very limited. The objective of this study is to investigate the molecular pharmacologic effect of the traditional chinese Bu-Yi medicine on protecting and repairing of cancer therapeutically damaged normal tissue stem/progenitor cells by means of pharmacogenomic analytical approaches, and at mean time, to initiate the molecular data collection for establishing a human tissue stem cell pharmacologic informatics of Chinese drugs.

We have previously established several human tissue stem/progenitor cell primary cultures for molecular studies on their lineage specific differentiation

potentials. *In vitro* cell lineage specific differentiation culture studies on hematopoietic stem/progenitor cells (peripheral blood, umbilical cord blood, and fetal liver) and on mesenchymal stem/progenitor cells derived from various tissues (bone marrow, peripheral blood, fat, scalp, foreskin, and amniotic membrane tissue) have been examining. We have also initiated a series of test on some selected chinese drugs such as *Astragalus membranaceus* Bge., *Panax quinqueflum* L., *Panax notoginseng* F.H.Chen, *Bupleurum chinense* DC., *Coix lachryma-jobi* L. and *Rhodiola kirilowii*., and analyzing their influences on hematopoietic erythroid maturation, mesenchymal tissue cell differentiations and proliferation for determining their tissue protection and repairing functions. In this study, we focus on investigating the molecular pharmacology of some Bu-Yi complex formula (such as Bu-Zon-Yi-Chi-Tang, Su-Wu-Tang and Son-Mai powder) which are well known their components in promoting human body physiological performance by repair and renew function on tissue cells. To evaluate the pharmaceutic effect of these three prescriptions, Colony-forming assays were performed to determine their nourishing activity in improving hematopoietic/progenitor cells growth and differentiation. By comparison and substructional analyses of gene expression and protein profile changes under influences of Bu-Yi drugs, the drug effect on the proliferation and differential patterns in the primary culture of hematopoietic stem/progenitor cells will be qualitatively and quantitatively evaluated by immuno-fluorescent, and transcriptional (RT-PCR) analyses. Furthermore, the pharmaceutic effects of Bu-Yi Chinese herbs in repairing and protecting hematopoietic cells from damages were studied in 5-FU induced leukopenia mice. The molecular influences of the drug effect on tissue specific stem/progenitor cell function will be collected and the information will be organized for a pharmacogenomic evaluation reference.

Current studies indicate the aqua-phase extract of Son-Mai powder can further enhance the expansion fold of hematopoietic stem/progenitor cells in stromal co-culture system. While no significant differences are observed in the differential potential and cell-cycle control. All of three Bu-Yi formula exert their nourishing activity in improving distinct hematopoietic/progenitor cells growth analyzed by colony-forming assays. Furthermore, all of three Bu-Yi formula increase the leukocyte number near to normal level in 5-FU induced leukopenia mice. These results will enhance our better insights into the Chinese drug prescription function by means of the molecular pharmacological understanding on their influences to the targeting tissue stem/progenitor cells. The successful of this study may show the feasibility of using tissue progenitor based primary cell

culture drug testing system as an additional useful platform for Chinese drug analysis which will be also aid to the Chinese drug development.

Keywords : Chinese Drug Bu-Yi Formula, Human Tissue Stem/Progenitor Cells, Tissue Repair and Renew, System Biology Studies

壹、前言

人體大多組織是靠其前驅/幹細胞(Progenitor/Stem Cell)不斷增生分化出新的細胞來代替衰敗老死的細胞，研究顯示具多功能性之幹細胞在成年時期也一直存在，並參與身體組織之正常修補與替換，如在骨髓、皮膚、中樞神經系統、乳腺及肌肉都已找到含有再生能力之組織幹原細胞。由於幹原細胞具有多潛能性，是個體組織器官發育之起源，因此透過幹原/前驅細胞對於損傷時器官機能回復的藥物療效研究，可增加我們對中藥作用機理了解，並擴大醫療上應用範圍。有效利用中藥來活化個體組織器官幹原細胞的活性，與加速創傷組織的修復是本計畫的最終目標。

本實驗室已利用新生兒臍帶血，建立造血幹原細胞經體外培養分化紅血球模式，將早期幹原細胞分化為成熟去核紅血球。也初步利用群落生成方法測試數種單方中藥之甲醇萃取物對於造血幹原細胞之分化潛能與細胞增生能力之影響。本計畫中進一步使用初級培養之人體幹原前驅細胞進行複方中藥之功效性研究，可避免因採用癌化細胞株(cell line)造成機轉背景值差異而誤導研究方向。同時並以動物模式分析造血幹細胞更新及修復特性，研究成果更可反應出活體中細胞分子級的療效性驗證。

目前中藥對於幹原/前驅細胞之造血系統/血管生成基礎研究指出許多臨床上癌症醫療中，常於放射線或化學療程中同時產生會傷害造血細胞，降低血球數量，使患者易受感染及復原力差等副作用。因此促進癌症患者體內血球生成系統復原及增加免疫細胞數量，將可提供腫瘤治療過程中一種緩解副作用的輔助療法。目前研究指出人蔘、當歸、黃耆、三七等各種中藥對於心臟血管及造血功能提昇有一定程度的幫助。本計畫中針對補血養氣類複方中藥探討其作用於造血幹細胞的機制。分三項目標執行：

- 一、探討補中益氣湯、生脈散及四物湯等補益類中藥，刺激造血幹細胞產生造血群落生成之活性。
- 二、研究於基質細胞共培養系統中，補益類中藥刺激造血幹細胞增殖或分化之能力；並分析幹細胞特定、細胞週期及凋亡等相關基因表達量。
- 三、分析以 5-FU 藥物誘發小鼠白血球減少的動物模式中，補益類中藥對於防護幹細胞受損，或修復之效用測試。本計畫之成果以補血、補氣功用之中藥複方為目標，探討對於幹細胞之更新及修復作用之細胞分子機制，並以小鼠動物模式之實驗數據相互映證中藥方劑之療效。所得成果預期將可應用於中藥有效成份分析及細胞醫療技術等方向。

貳、材料與方法

一、天然藥物成分萃取

自衛生署藥檢局取得單方藥材。依據藥典調配成為補中益氣湯，生脈散及四物湯等複方劑後，於 60°C 萃取純水溶性成分，經離心去除不溶之固態物質之後於 45°C 水浴中經減壓濃縮約 1~2 hr，濃縮體積至原萃取液體積之百分之一，冷凍凝結後使用真空冷凍乾燥機除去水分，儲存於乾燥箱中。使用前秤重加入 1ml ddH₂O 以 0.22 µm filter 過濾成無菌溶液。調整濃度至 0.1 µg/µl，0.5 µg/µl，2.5 µg/µl，10 µg/µl 後存放於 4°C。施以不同劑量檢測中藥物對於體外培養細胞生長的影響。

二、藥物對於造血幹原前驅幹細胞數量與活性影響之測試

經由藥物濃度處理後所觀察之典型血球群落，以藥物濃度為 x 軸；群落數目為 y 軸，用迴歸分析比較實驗組與控制組織斜率值。其值為正代表促進負值為抑制作用。觀察不同的藥物及濃度對造血前驅/幹細胞的影響由群落數目 作為判斷藥物之作用是促進或是抑制生長，若群落的數目下降代表造血功能受阻反之若上升則代表造血功能有所提升。

三、體外群落培養分析 (*In Vitro* Colony Formation Assay)

觀察造血幹原/前驅細胞在各種細胞激素(IL-3，SCF，GM-CSF，Epo)存在下的半固體培養基(Semi-Solid Methylcellulose Medium)中，形成群落的數量和種類。觀察群落的數量和大小來評估藥物對於早期幹原/前驅細胞的影響。將 MethoCult™ 分裝成 3 ml 一管(15ml tube) 存放於-20°C 備用，使用時將 MethoCult™ 置於 37°C 水浴回溫之後將單核球細胞置於 37°C 水浴中迅速解凍以 10 ml 37°C 緩衝液中清洗，取出 10 µl 與 trypan blue 染劑 10 µl 混合後計數活細胞。取 3×10⁴ 活細胞加於 300 µl PBS 中，再將 3×10⁴ 細胞加入 3 ml MethoCult™ 中以震盪器混合均勻後以 1 ml 針筒裝上 18G 針頭分注 0.3 ml MethoCult™ 至 24 well 中，分別加入不同濃度 0.1 µg/µl，0.5 µg/µl，2.5 µg/µl，10 µg/µl 之中藥 3 µl，用膠帶固定上蓋以震盪器混合 2 min 之後在 24 well 周圍加入無菌水於 37°C，5% CO₂ 培養 14 天後，觀察紀錄藥物劑量多寡對於細胞生長與群落之型態影響。

四、體外幹原/前驅細胞之體外培養及分析系統

造血性幹原/前驅細胞分離與培養:將抽取之臍帶血離心,以 ficoll paque 分離取 buffy coat 層中的低懸浮密度細胞,並以 10 μ M ammonium chloride 溶解法除去紅血球。加上 SCF, TPO, IL-3, IL-6, Flt-3L 等細胞激素,在基底細胞共同培養系統中,培養 9 天後。將懸浮性血球細胞收集於 1XPBS 中,加入欲觀測表面分子的單株抗體,避光培養後。利用流式細胞儀觀察特定表面分子被標定細胞,使用 fluorescence-activated cell sorting (FACS-Calibus; Becton Dickinson) 以及 CellQuest software 進行定量分析。自體外培養的臍帶血球細胞抽取 total RNA,以反轉錄酵素合成互補 DNA,使用基因特異性引子進行 PCR 反應以分析基因表現量。

五、5-FU 誘發白血球減少的小鼠模式

防護組於第一天取中藥方劑萃取液,以靜脈注射於 C57/B6 小鼠,第三天後以靜脈注射五一氟尿嘧啶(5-fluorouracil; 5-FU; 100 mg/Kg),第七天以心臟採血抽取小鼠周邊血;修復組則於第一天注射五一氟尿嘧啶,第三天注射中藥方劑萃取液。其餘步驟與防護組相同。周邊血收集後以 10 μ M ammonium chloride 溶解法除去紅血球,收集白血球細胞後懸浮於 PBS 中,加入結合 FITC 的 anti-CD3, anti-CD4 及 anti-CD19 的單株抗體,避光培養後。利用流式細胞儀分析特定表面分子被標定之細胞,使用 fluorescence-activated cell sorting (FACS-Calibus; Becton Dickinson) 以及 CellQuest software 進行定量分析。

參、結果

我們採購單方藥材，加入適當比例配置成四物湯、補中益氣湯、生脈散方劑後，進行熱水萃取。將萃取物濃縮後，依不同濃度與事先分離之造血幹細胞(攜帶有 CD34 抗原)培養，觀察血球群落生成數量變化為幹細胞活性影響之依據，得知上述複方藥劑是否調節其生長活性以及影響幹細胞分化趨勢。我們並應用間葉基質細胞與造血幹細胞共同培養來提供分泌性細胞因子(cell factors)，以協助幹細胞生長與分化之體外模式，探討此三類複方對於細胞增殖及分化影響。最後以動物模式，探討在對小鼠施打抗癌藥物五-氟尿嘧啶(5-fluorouracil; 5-FU)引起白血球數量下降後，此三方藥劑於活體中提升白血球數量的影響。

一、補益類中藥對臍帶血細胞中血球群落生成之影響

由圖一群落形成結果顯示四物湯對於發育早期爆增期紅血球群落數量並無明顯影響，但對於晚期紅血球群落(CFU-E)有促進生成的效用，顯示這些細胞由減少的成熟紅血球群落形成細胞(Mature BFU-E)而來。因此推論四物湯有增進晚期紅血球成熟速率的效果，使成熟紅血球群落形成細胞提早成熟為晚期群落形成細胞(CFU-E)的功用。此外四物湯對顆粒性群落形成(CFU-G)也有促進生成的效用。由此結果推論四物湯對特定造血幹細胞具有促進生成之藥效。

由圖二群落形成結果顯示補中益氣湯對成熟性爆增型紅血球及單核系細胞群落(Mature BFU-E and CFU-M)的形成有促進生成的效用。由圖三群落形成結果顯示生脈散對於紅血球系群落數量並無明顯影響，但對於顆粒性群落形成(CFU-G)具有促進生成的效用。

總論本研究成果可得知，上述三種補益類複方中藥對特定造血幹細胞都具有促進生成之藥效，但是所影響的細胞群落種類各不相同，因此於療效方面各有不同之應用。

二、補益類中藥對臍帶血細胞增殖及分化的影響

利用間葉基質細胞共同培養系統於體外增殖臍帶血球細胞，可增加總細胞數達 138 倍，CD34⁺血球幹細胞數達 92 倍及 CD34⁺38⁻血球早期幹細胞細胞數達 222 倍。分別加入上述三種中藥方劑後分析藥劑對臍帶血球細胞增殖倍率的影響。結果如圖四所示，加入四物湯及補中益氣湯對於臍帶血球細胞生長能力均並無明顯影響，其增殖倍率與未加藥的

控制組無明顯差異。加入生脈散於共同培養系統中可增加總細胞數近 247 倍，CD34⁺血球幹細胞數達 169 倍及 CD34⁺38⁻血球早期幹細胞細胞數達 403 倍，具明顯促進細胞生長的功效，而此效益並不會改變 CD34⁺血球幹細胞及早期幹細胞（CD34⁺38⁻）佔總細胞量之比例，因此生脈散對於臍帶血球細胞有相當於細胞生長因子功能的體外增殖效果，同時不影響血球幹/前驅細胞的自我更新特性。

造血幹細胞在體外生長增殖時常伴隨著往各前驅細胞分化的進行，我們將於共同培養系統中所增殖的 CD34⁺造血幹細胞與中藥方劑作用，檢測其各血球前驅細胞生成比例是否有差別，結果顯示此生脈散並不會明顯促進單一血球系細胞的生成（如圖五，CD71, GPA, CD36：紅血球系，CD33：早期髓性細胞，CD19：B 淋巴細胞，CD4：T 淋巴細胞，CD41a：血小板細胞）。

綜合以上結果我們認為生脈散經由增進臍帶血球細胞增殖，而具有整體提升細胞生長活性的功能。此三方補益類中藥方劑都不會引發造血幹細胞朝向特定血球前驅細胞譜系分化。

進一步檢測中藥處理對於早期造血幹細胞基因表達量變化之影響。於上述實驗發現三種補益類複方中藥中，只有生脈散能明顯提高造血幹細胞數量，故針對生脈散處理的臍帶血細胞進行基因表達量分析。在間葉基質細胞供養系統中，對於早期造血幹細胞施以不同劑量之生脈散，經一段時間後，測試藥物改變細胞生長及分化之基因表達變化。所分析的藥物影響基因包含調節細胞生長週期、細胞凋亡及幹細胞早期特定基因等（圖六）。結果顯示生脈散對早期幹細胞特定基因（如 CD34、BMP4 及 Oct 4）之表達量無明顯影響，此現象與生脈散不會改變 CD34⁺血球幹細胞及早期幹細胞（CD34⁺38⁻）佔總細胞量之比例的結果相互符合；不同劑量之生脈散所處理之臍帶血球細胞中，其細胞生長週期性基因（如 p53，p27，p21, Cyclin D1）表達量無明顯差異，在高劑量生脈散處理（100 µg/ml）只有 p53 及 p27 呈現極微量上升；分析生脈散對臍帶血細胞之細胞凋亡調控基因的影響，發現細胞凋亡抑制性基因（如 Bcl-2）及細胞凋亡促進性基因（如 Bax）均無明顯差異。由上述結果推論，生脈散萃取液可擴增臍帶血細胞之總細胞數，但不會影響細胞自我更新及分化趨性，也不會改變細胞生長調控機制。

本實驗室的過去研究中已發現，三七萃取物及成分可促進間質幹細胞之神經分化，本研究中則進一步發現，三七之合成衍生物成分 TFA14，5MIFA16 可增進頭皮間質幹細胞之神經分化效率（圖七）。

三、補益類中藥對小鼠白血球數量之影響

五-氟尿嘧啶(5-fluorouracil; 5-FU)是一種癌症治療藥物，可抑制快速生長分裂的細胞，因此於活體中除了癌細胞之外，也常會影響其他如白血球細胞及腸道表皮細胞等快速生長之細胞。本研究中以 5-FU 注射小鼠引起白血球減少之動物模式，研究補益類複方中藥對保護或修復造血幹細胞的影響。保護組實驗為對小鼠先行注射不同劑量的複方中藥萃取液後，再注射 5-FU 引起小鼠白血球減少症狀。以流式細胞儀分析 T 細胞(CD3⁺)、輔助型 T 細胞及單核/吞噬細胞(CD4⁺)和 B 細胞系(CD19⁺)於白血球細胞中所佔之比例，由圖八及表一結果可知，注射 5-FU 之小鼠周邊血中，上述三種代表性白血球數量比例都已下降至低於 1%。對小鼠先行注射中藥萃取液後，再施打 5-FU，發現先行注射高劑量補中益氣湯或生脈散及低劑量四物湯之小鼠，其 CD3⁺、CD4⁺、CD19⁺ 白血球數量比例已接近控制組小鼠。由此結果推論補益類中藥萃取液於活體中具有保護血液幹細胞，降低受 5-FU 傷害所引發的白血球減少副作用。

肆、討論

由過去對四物湯的療效研究發現，其複方中的熟地黃、當歸補血養陰為主藥；白芍養血柔肝為輔藥；川芎活血行氣為佐藥。地黃有止血作用，其乙醇提取物可縮家兔凝血時間。當歸有抗貧血作用，可能與其所含維生素 B12、菸鹼酸及葉酸有關。川芎浸膏抑制家兔或正常人血小板凝聚作用，因此可增加本方之活血作用。此外白芍、川芎均有較明顯之鎮靜、解痙作用。綜視全方，四物湯既有補血作用，又有活血、止血及調經效能。由本研究中則進一步發現，四物湯作用於臍帶血幹細胞中時，有促進晚期紅血球群落(CFU-E)生成的效用，因此未來研究可分析四物湯中促進晚期紅血球群落(CFU-E)生成與活血或抗貧血的有效成份及作用機制，將可應用於病後補養加強癒療效果。

補中益氣湯的療效為調補脾胃，增強體力，抵抗疾病，病後補養，改善易感冒體質，增強免疫能力。脾臟是胎兒時期主要的造血器官，於成人則是轉變為儲存血液的器官及負責分解老化的紅血球，回收鐵質並經由血液運送到骨髓造血組織再利用。脾臟同時也是人體最大的淋巴器官，負責過濾外來的有害物質。於本研究中發現補中益氣湯對於早期幹細胞生長增殖並無明顯影響，但是可促進成熟型爆增性紅血球及單核系細胞群落(Mature BFU-E and CFU-M)的生成。此結果相互映證補中益氣湯對造血幹細胞的影響符合對活體組織生理的療效。

生脈散目前為普遍使用於治療中暑、心臟衰竭的病患。由國內多家研究單位的試驗發現，生脈散有擴張血管、降低周邊阻力的功效，對心臟衰竭患者提供連續治療，結果患者肥大的心臟明顯縮小，且沒有毒性副作用。於本研究中的初步成果則發現生脈散對於臍帶血球細胞的生長，有相當於細胞生長因子功能的增殖效果，特別是在研究結果中發現其細胞週期/凋亡調控基因及早期幹細胞基因的表達量，都未因生脈散萃取液處理而有明顯差異，由此可推論生脈散具調節細胞生長之效用，但不會改變調控細胞生長或分化等正常功能，因此對癌症患者而言將是較安全的癒後輔助療法。但是其有效成份及其如何影響幹細胞之生長分化活性則仍待進一步探討。

於本研究中發現，生脈散於基質細胞共同培養的體外增殖系統中，可放大總細胞及早期幹細胞數量的擴增倍數，但不影響造血前驅/幹細胞於總細胞數量中之比例(詳見圖四)，也不改變造血前驅/幹細胞分化趨性及潛能(詳見圖五)。據此推測於動物實驗中，生脈散可能藉由促進幹細胞增殖，增殖後之幹細胞於免疫力低下之活體中，大量分化成為淋巴系血球幹細胞，因此於補益類併用 5-Fu 實驗組中，可觀察到 CD3⁺及 CD19⁺細胞百分比提高。本研究中

活體外及活體中的實驗結果具一致性，但是其詳細機制仍待後繼進一步探討。

於間葉基質細胞共同培養系統中增殖臍帶血球細胞，由基質細胞所分泌之生長性因子及細胞間交互作用訊息可刺激整體臍帶血球細胞增殖。於本研究中則發現生脈散萃取液可進一步放大這種擴增效應。目前推測其作用機制可能是生脈散刺激基質細胞產生幹細胞生長因子，最重要的是這些生長因子可擴增幹細胞數量，但不影響其細胞週期之調控，也不改變幹細胞之分化潛能。本項研究成果在未來進一步瞭解其作用機制及有效成分後，將可應用於臍帶血幹細胞擴增技術中，並期望可突破目前臍帶血幹細胞數量不足以供給成人使用的醫療瓶頸。

伍、結論與建議

於[九十三年度研究計畫成果報告討論會議]中，審核委員所提問之議題，回答如下：

- 一、本計畫中所使用之中藥萃取物，均為自衛生署藥檢局取得單方藥材。依據藥典調配成為複方劑後，使用純水萃取之成分，經濃縮及冷凍乾燥處理而成(詳見材料與方法)。其中不含任何賦型劑成份。
- 二、五一氟尿嘧啶(5-fluorouracil; 5-FU)是一種癌症治療藥物，可抑制快速生長分裂的細胞，因此於活體中除了癌細胞之外，也常會影響其他如白血球細胞及腸道表皮細胞等快速生長之細胞。由於本計畫以研究補益類中藥對人體幹細胞之影響為主，其中本實驗室投入最多研究的血液前驅/幹細胞為主要目標，探討癌症治療過程中，補益類中藥保護或修復藥物對正常人體幹細胞的功效。因此以注射 5-FU 誘發小鼠白血球下降的動物模式進行研究。
- 三、本年度計畫執行期間，已針對三種補益類複方中藥對人體幹細胞之影響完成試驗，研究中自幹細胞基因表現之差異性、幹細胞群落形成功能性分析、幹細胞增殖分化特性分析到動物模式測試，已成功建立完整之系統分析平台。未來應可拓展此分析平台之研究方法，建立其它補益類中藥之功效性科學數據。

本研究中發現補益類中藥的生脈散於基質細胞共同培養的體外增殖系統中，可放大總細胞數量的擴增倍數，但不影響造血前驅/幹細胞於總細胞數量中之比例，也不改變造血前驅/幹細胞分化趨性及潛能。於補益類中藥影響造血群落生成細胞之活性研究中發現，生脈散促進顆粒系細胞群落(CFU-G)生成，四物湯促進晚期紅血球及顆粒系細胞群落 (CFU-E and CFU-G) 生成，補中益氣湯促進爆增型紅血球及單核系細胞群落 (BFU-E and CFU-M) 生成。於化療藥物 5-FU 引起小鼠之白血球減少之動物模式中，生脈散、四物湯及補中益氣湯都可防護造血幹細胞受化療藥物的傷害，使周邊血中 T 細胞、B 細胞及單核細胞等白血球數量回復正常。於本研究中所建立的中藥對幹細胞影響之分析系統，未來將可應用於藥物篩選平台，發展成為有效成份鑑定及品管技術。若未來可獲得更多資源及經費投入，將可進一步開發成醫療或商業用途，並有助於中藥之國際化發展。

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 CCMP93-RD-001 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. Bao Y, Li C, Shen H, Nan F. (2004) Determination of saikosaponin derivatives in *Radix bupleuri* and in pharmaceuticals of the chinese multiherb remedy xiaochaihu-tang using liquid chromatographic tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* 76:4208-16.
2. Chan K, Chui SH, Wong DY, Ha WY, Chan CL, Wong RN. (2004) Protective effects of Danshensu from the aqueous extract of *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) against homocysteine-induced endothelial dysfunction. 75:3157-71.
3. Daniel Tzu-Bi Shih. The Loss of BFU-E Colony Forming Potential in *Ex Vivo* Expansion of Hematopoietic CD34+ Progenitors Studied by 2D Electrophoretic Proteomic Analysis. 海峽兩岸細胞生物學學術研討會，武漢大學，May 16-18, 2001. (Oral Presentation)
4. Daniel Tzu-Bi Shih. A Human Stem/Progenitor Cells Culture System for Proteomic Studies of Normal Erythropoiesis and Disorders. 16th FAOBMB Symposium. September 21, 2002. (Oral Presentation)
5. Daniel Tzu-Bi Shih. An Erythropoiesis Culture System for Studying Neo-Vascularization & Erythropoietic Disorders. The 10th Sino-Japan Symposium on Cancer Treatment: Somatic Stem Cells/Regenerative Medicines. January 11, 2003. (Oral Presentation)
6. Daniel T.-b. Shih. Shih-Chen Chen. Siou-Chen Shih. Yi-Ning Chen. Chun-Sen Hsu.(2004) A Pharmacologic Evaluation of Chinese Herbs' Function Using Human Tissue Stem/Progenitor Cell Culture: (I) *Radix Panacis Quinquefolii*, *Radix Astragali*, *Radix Notoginseng* and *Semen Goicis*, *Radix Bupleuri* and *Rhodiola kirilowii*. 第七屆工程科技與中西醫藥應用討會。
7. Fujii Y. Imamura M. Han M. Hashino S. Zhu X. Kobayashi H. Imai K. Kasai M. Sakurada K. Miyazaki T. (1994) Recipient-mediated effect of a traditional Chinese herbal medicine, ren-shen-yang-rong-tang (Japanese name: ninjin-youei-to), on hematopoietic recovery following lethal irradiation and syngeneic bone marrow transplantation. *International Journal of Immunopharmacology.* 16(8):615-22.
8. Hsu HY. Ho YH. Lin CC. (1996) Protection of mouse bone marrow by Si-WU-Tang against whole body irradiation. *Journal of Ethnopharmacology.* 52(2): 113-7.

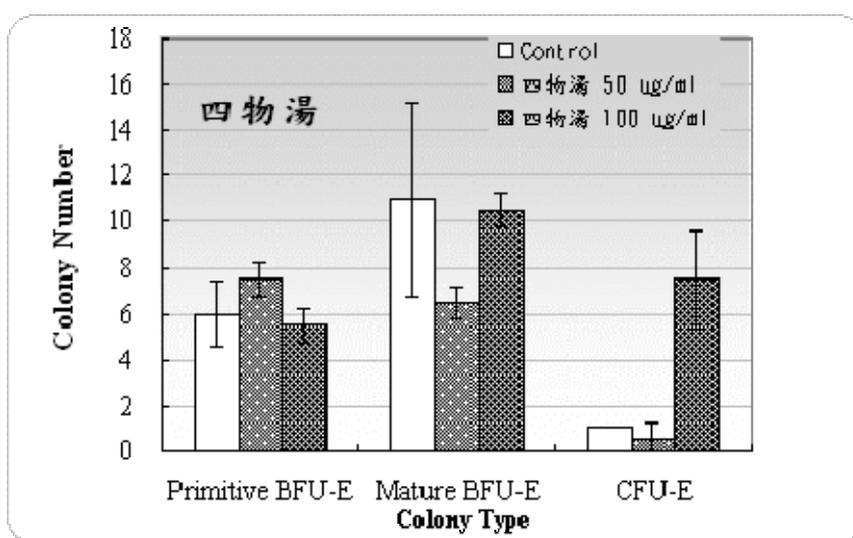
9. Lin SJ, Tsai JH, Tsai CH, Lin YC, Hsu HT, Xu FL, Yang CC. (2004) The in vivo effects of cytokines modulation for BALB/C mice fed with a traditional combined chinese herb-soaked solution, Yi-Fey Ruenn-Hou tea. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 26:435-44.
10. Shih-Chen Cen, Bo-Shun Su, Chen-Yi Wu, Chien-Ting Huang and Daniel Tzu-Bi Shih. A Proteomic Characterization of Early-Stage Erythropoietic Differentiation in Human Hematopoietic (CD34+) Progenitors. The 44rd Annual Meeting of The American Society of Hematology. Orlando, Florida, December 06~10, 2002. (Abstract)
11. Siu KM, Mak DH, Chiu PY, Poon MK, Du Y, Ko KM. (2004) Pharmacological basis of 'Yin-nourishing' and 'Yang-invigorating' actions of Cordyceps, a Chinese tonifying herb. *Life Sci.* 76(4):385-95.
12. Yi YD, Chang IM. (2004) An Overview of Traditional Chinese Herbal Formulae and a Proposal of a New Code System for Expressing the Formula Titles. *Evid Based Complement Alternat Med.* 1:125-132.
13. Zhu YZ, Huang SH, Tan BK, Sun J, Whiteman M, Zhu YC. (2004) Antioxidants in Chinese herbal medicines: a biochemical perspective. *Nat Prod Rep.* 21: 478-89.

柒、圖、表

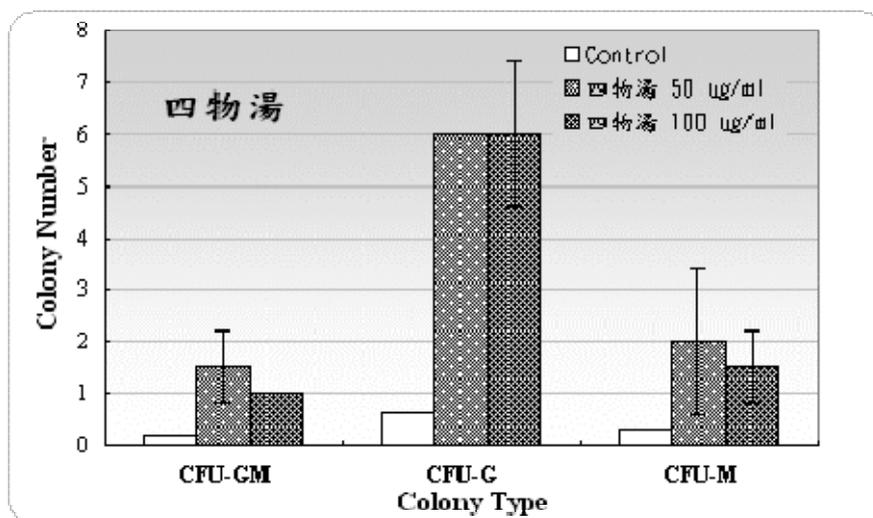
圖一 四物湯對於血球群落生成數量的影響

Primitive BFU-E：初期爆增性紅血球群落；Mature BFU-E：成熟爆增性紅血球群落，CFU-E：晚期紅血球群落；CFU-GM：顆粒單核系細胞群落；CFU-G：顆粒系細胞群落；CFU-M：單核系細胞群落。

圖一(A) 紅血球群落生成數量變化



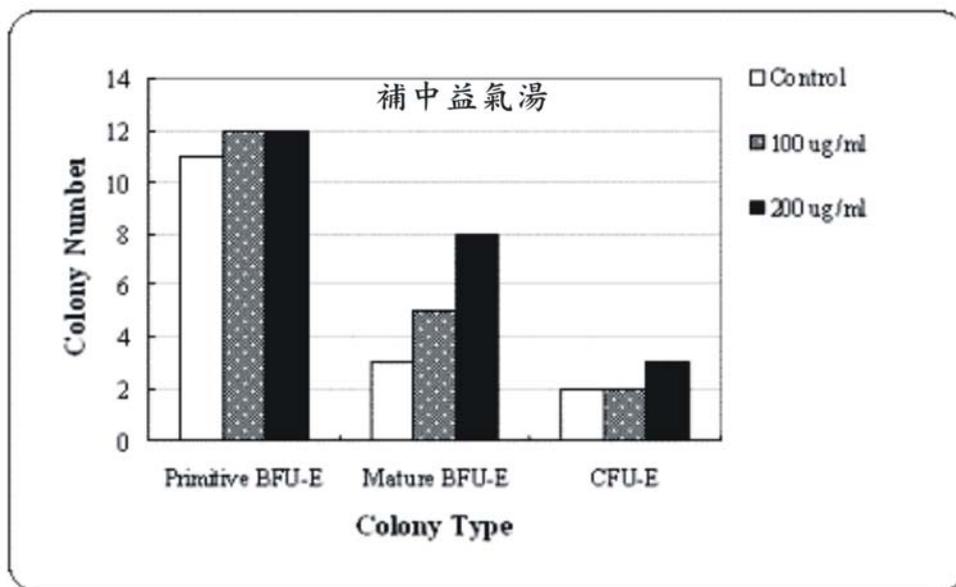
圖一(B) 白血球群落生成數量變化



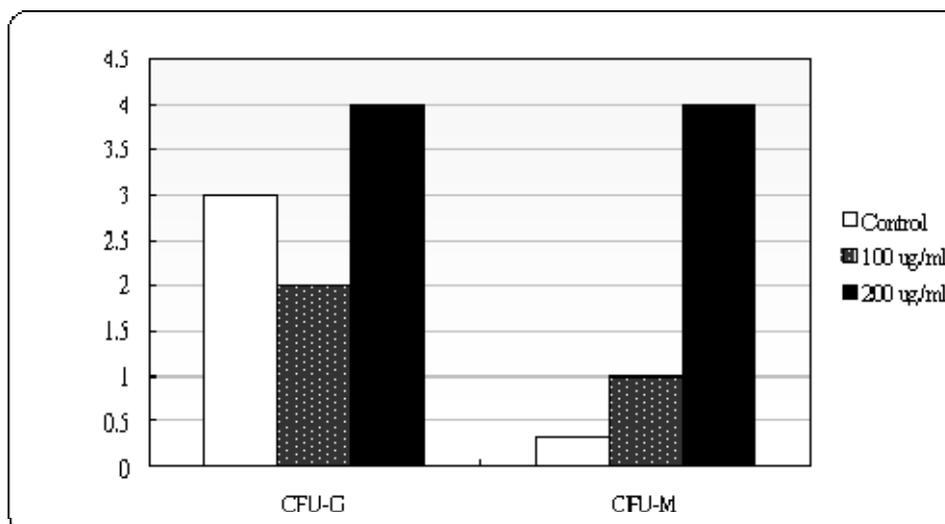
圖二 補中益氣湯對於血球群落生成數量的影響

Primitive BFU-E：初期爆增性紅血球群落；Mature BFU-E：成熟爆增性紅血球群落，CFU-E：晚期紅血球群落；CFU-GM：顆粒單核系細胞群落；CFU-G：顆粒系細胞群落；CFU-M：單核系細胞群落

圖二(A) 紅血球群落生成數量變化



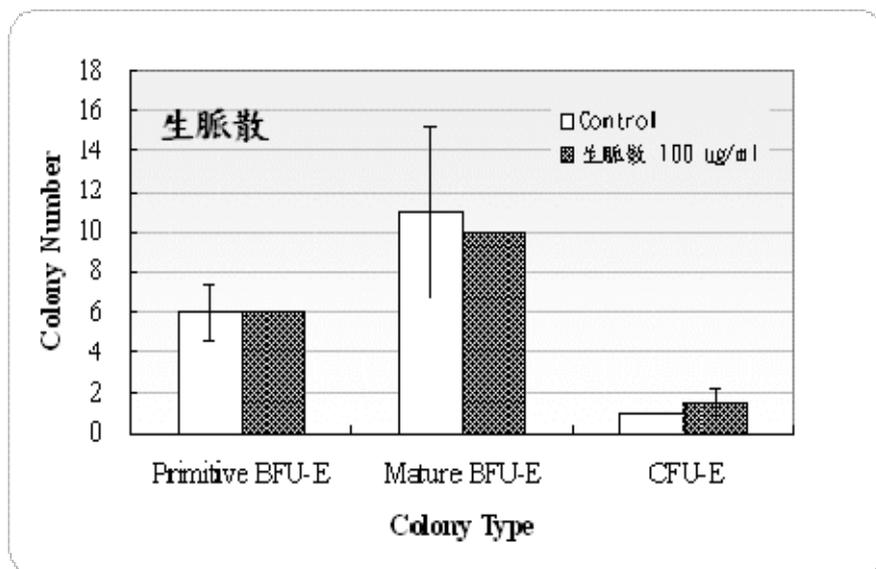
圖二(B) 白血球群落生成數量變化



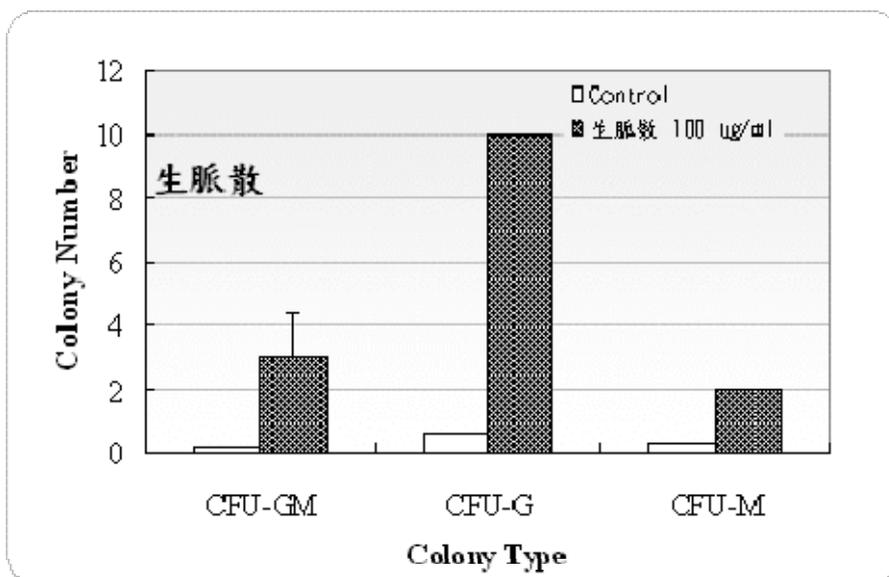
圖三 生脈散對於血球群落生成數量的影響

Primitive BFU-E：初期爆增性紅血球群落；Mature BFU-E：成熟爆增性紅血球群落，CFU-E：晚期紅血球群落；CFU-GM：顆粒單核系細胞群落；CFU-G：顆粒系細胞群落；CFU-M：單核系細胞群落

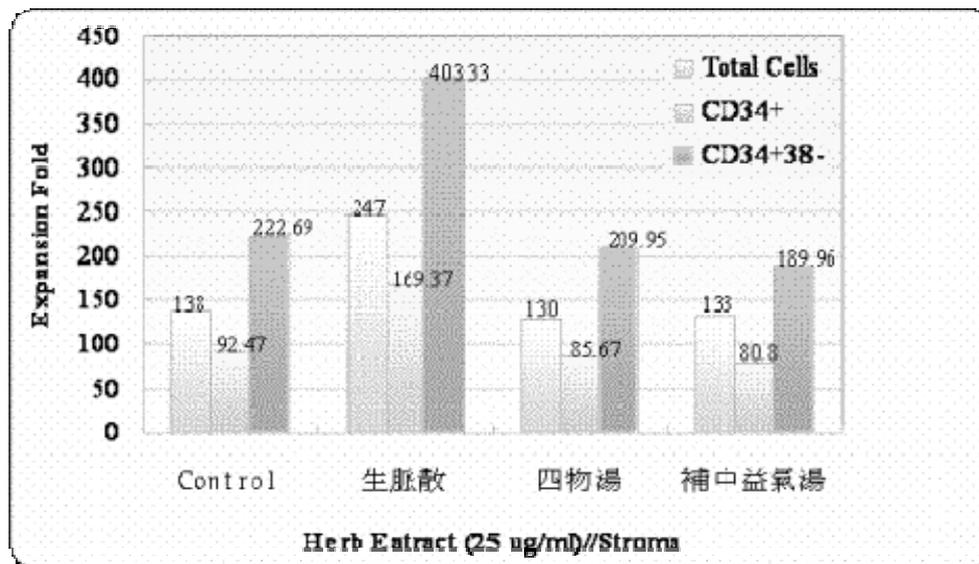
圖三(A) 紅血球群落生成數量變化



圖三(B) 白血球群落生成數量變化

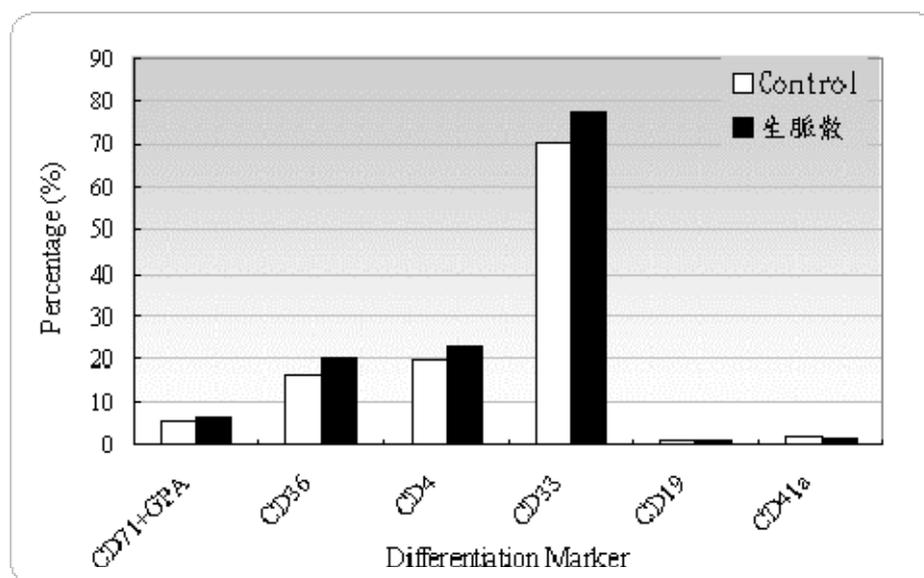


圖四 補益類中藥對於臍帶血早期造血幹原/前驅細胞增殖影響

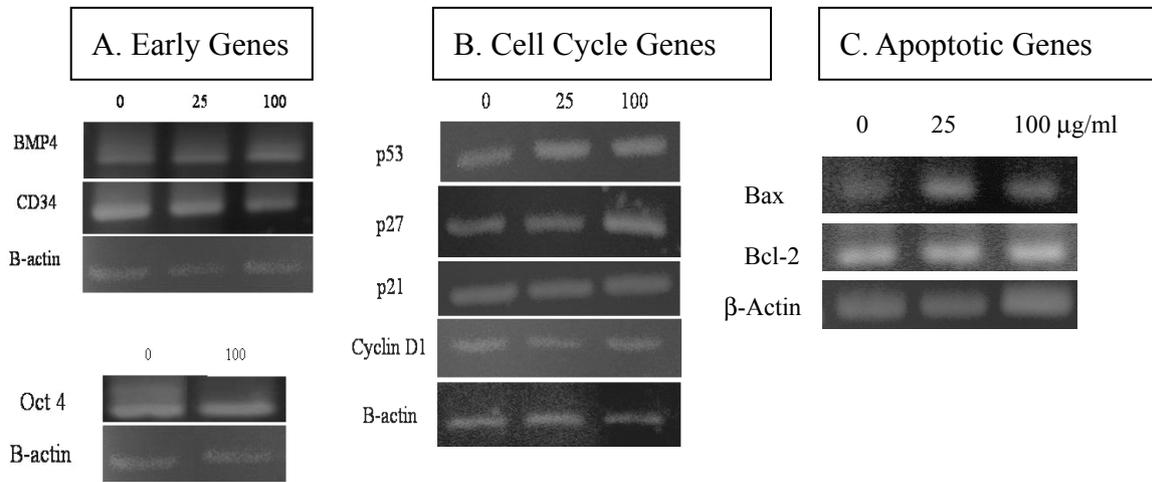


圖五 生脈散對於造血幹細胞分化為各血球系前驅細胞的影響

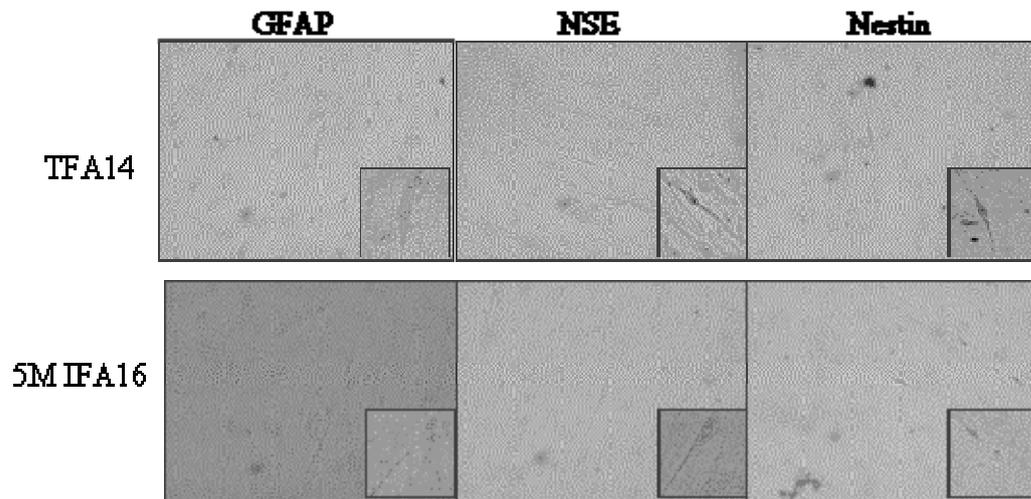
(CD71, GPA, CD36：紅血球系，CD33：早期髓性細胞，CD19：B 淋巴細胞，CD4：T 淋巴細胞，CD41a：血小板細胞)



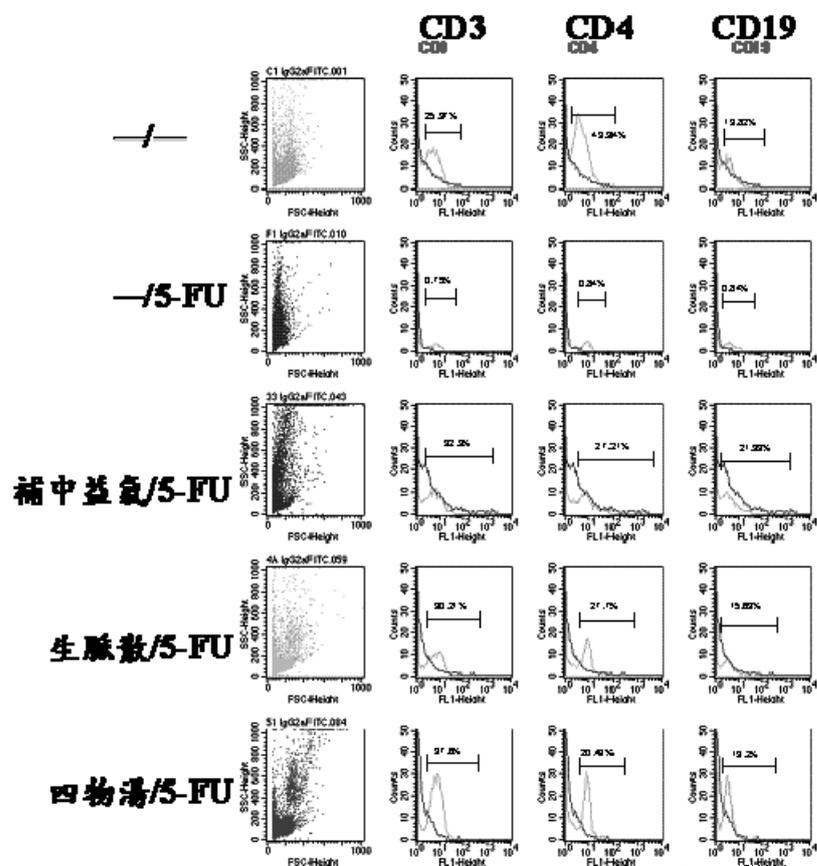
圖六 生脈散對幹細胞早期特定影響基因、細胞生長週期及細胞凋亡等基因表達量之影響



圖七 中藥三七衍生物對頭皮間質幹細胞之神經分化影響



圖八 補益類中藥對 5-FU 誘發白血球減少之小鼠的保護療效



表一、補益類中藥對造血幹細胞受化療藥物 5-FU 傷害之保護性

(A)

Treatment		FACS Percentage(%)		
Chinese Herbs	5-FU	CD3	CD4	CD19
—	—	25.37	49.94	13.82
—	+	0.75	0.84	0.84
補中益氣湯 (78.3 mg)	+	32.90	27.21	21.39
生脈散 (71.4 mg)	+	30.21	27.10	15.69
四物湯* (0.86 mg)	+	37.60	20.49	19.20

(B)

Treatment		FACS Percentage (%)		
Chinese Herbs	5-FU	CD3	CD4	CD19
—	+	14.36	28.00	29.02
補中益氣湯 (78.3 mg)	+	12.13	22.53	25.79
四物湯 (0.86 mg)	+	75.82	48.46	13.19

