

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

具肝保護功效性的圓魚肝臟萃取物之研發

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2622-B-009-001-CC3

執行期間：93年05月01日至94年04月30日

執行單位：國立交通大學生物科技學系(所)

計畫主持人：林志生

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫為提升產業技術及人才培育研究計畫，不提供公開查詢

中 華 民 國 94 年 7 月 25 日

行政院國家科學委員會補助提升產業技術及人才培育 研究計畫成果報告

中文計劃題目：具肝保護功效性的圓魚肝臟萃取物之研發

英文計劃題目：Development of terrapin liver extracts for preventing liver dysfunctions

計畫編號：NSC 93-2622-B-009-001-CC3

執行期限：93 年 5 月 1 日 至 94 年 4 月 30 日

計劃主持人：林志生 國立交通大學 生物科技系

一、中文摘要

本研究目的為製備圓魚肝臟萃出物並探討其對於化學物所引起的肝細胞損傷之保護作用。將圓魚肝臟均質後，分別以 25、40、50、60、70、80 及 90 處理，均質物經離心，上清液乾燥後，再以 10% (w/v) 濃度回溶即成為圓魚肝萃出物。電泳結果顯示，不同熱處理之肝萃出物中蛋白質組成顯著不同。本研究中，以 acetaminophen (AP) 或 D-galactosamine (GAL) 處理肝細胞株 (Clone 9)，可致使該細胞產生顯著性細胞傷害，而這種細胞毒性可因合併給予細胞圓魚肝萃出物而降低，其中以經 25-60 處理製得的萃出物對肝細胞之保護效果較為顯著。另外，經 AP 處理的 Clone 9 細胞，其肝細胞生長因子受器 (HGFr) 基因表現量會顯著下降，但若合併給予該細胞 60 處理的肝萃出物，則會顯著提高 HGFr 的基因表現量。圓魚肝萃出物具有減低肝毒性藥物對肝細胞造成的細胞損傷，而此保護機制部分可能是藉由增加細胞之 HGFr 的表現量來產生肝細胞保護的功效。

關鍵詞：圓魚、肝臟、萃出物、肝細胞生長因子受器

Abstract

The aim of this study is to prepare extract from terrapin liver and to evaluate the efficacy of terrapin liver extract (TLE) for

preventing liver dysfunction induced by chemicals. Terrapin livers were homogenized and followed raw extracts were obtained from the extraction process of 25, 40, 50, 60, 70, 80 and 90 treatments. The raw extracts were centrifuged and the supernatants were dried as well as prepared to be TLE in a final concentration of 10% (w/v). These TLEs showed different protein profiles analyzed by SDS-PAGE. Acetaminophen (AP) and D-galactosamine (GAL) were used as hepatotoxic chemicals to induce hepatocyte damages in a liver cell line, Clone 9. The damages include decreasing cell viability and gene expression of hepatocyte growth factor receptor (HGFr). Administration of TLEs could rescue the Clone 9 cells from the damages induced by AP or GAL treatments. Such effects on liver protection were observed in the TLEs prepared by 25 to 60 treatments, in particularly. Additionally, a significant upregulated expression of HGFr gene was observed in the AP-damaged cells which were treated with the 60-prepared TLE. In summary, the TLEs could decrease the cell damages induced by the challenge of hepatotoxic chemicals, and the mechanism of liver-protection of TLE may be associated with the gene regulation of HGFr.

Keywords: Terrapin, liver, extract, hepatocyte growth factor receptor

二、緣由與目的

根據行政院衛生署西元2004年公佈的統計資料顯示，慢性肝病位居國人十大死亡原因之第六位，對國人之健康影響甚巨。因此，肝臟的保健工作實不可輕忽，天然保肝物質的開發也成為當今生物科技業者的研發重點之一[1-3]。

在本研究室的先期研究中，我們發現圓魚肝臟中存在保護肝臟免於受損害的因子，據此我們認為適當的萃取與分離製程可獲得具保肝功能的圓魚肝臟萃取物。更甚者，我們長期的研究目標是探討得知，除已知之營養組成、維生素及微量元素外，在圓魚肝臟中存在的肝臟保護因子。事實上，除了肝臟保護因子外，日本東京大學Feng等人的研究也顯示圓魚組織中具有天然抗腫瘤物質，而供給圓魚粉的小鼠也被證實較不易產生疲倦[4,5]。圓魚在東方民族一直都為食補中重要的淡水養殖動物，其曾因大陸「馬家軍」的食用，有強化人類體能與耐力的功能，更為名噪一時。圓魚在低溫下可冬眠數月之久，顯見在其肝臟中存在許多有助肝細胞維持代謝功能的要素，而這些物質相信在質與量上有別於豬、牛、羊等大型哺乳動物，因此我們認為圓魚肝臟萃取物是個非常值得開發的產品。

三、研究成果與討論

圓魚肝臟經不同溫度處理所得萃出物之 SDS-PAGE 蛋白質電泳圖譜如圖 1A 所示，依此可作為圓魚肝臟萃出物 (TLE) 製備的流程品質管監控參考依據。圖 1B 中的分析結果顯示，圓魚肝臟均質液隨處理溫度 (25、40、50、60、70、80 及 90) 的提昇，所製得的 TLE 中高分子量 (≥ 66 kDa) 和中分子量 (>30 kDa, > 66 kDa) 的蛋白質比列分別由 21.4% 與 45.2% 逐漸減少至 8.8% 及與 23.4%; 而低分子量 (≤ 30 kDa) 蛋白質比列則由 33.5% 增加到 67.8%。

在 TLE 的肝臟保護功能性研究中，肝

細胞株 (Clone 9) 以 acetaminophen (AP) 或 D-galactosamine (GAL) 處理，再以 MTT 方法評估肝細胞毒性，其間並同時合併給予 TLE 以評估肝萃出物對 AP 或 GAL 所引起的細胞損傷是否具保護作用。Clone 9 細胞經 AP 或 GAL 處理後，均呈現顯著的細胞傷害。在合併加入經 25、40、50 及 60 處理 (低溫處理組) 的 TLE 者，可顯著減低 AP 或 GAL 所引起的細胞毒性，但 70、80 及 90 處理 (高溫處理組) 的圓 TLE 這種肝細胞保護功能較不顯著 (圖 2)。

在 TLE 處理對肝細胞基因表現調節的實驗中，我們利用 RT-PCR 方法來測定肝細胞生長因子受器 (HGFr) 基因的表現量。結果顯示，以 AP 誘發之肝細胞損傷，其 HGFr 基因表現量會顯著下降，而若合併供給細胞經 60 處理的 TLE，則會刺激 Clone 9 肝細胞顯著增加 HGFr 基因的表現量 (圖 3)。已知 HGFr 的表現和調控與肝臟再生和修復的機制有關 [15, 6]。因此，TLE 對於肝細胞的保護機制，有可能是藉由增加 HGFr 的表現量，以促使肝細胞對肝細胞生長因子 (HGF) 的感受性增加而達到肝細胞保護的效能。

肝臟對東方民族而言，是一種補充營養源的食材，早在 1950 年代就有不少的研究者針對動物肝臟萃取人體所必需的維他命 (A、D、K、B₁₂) 與微量物質等技術進行研發。由於當時專利多針對針劑的開發為目標，所以常使用有機溶劑及鹽類以除去肝臟均質液中的蛋白質。雖然如此，世界專利組織 GB696,178 號、GB1,205,906 號、GB878,747 號[8]仍指出，這樣無蛋白質的萃出物仍具有許多的療效。一直到 1990 年代，開始有人針對肝臟中的蛋白質進行研究。其中 Wagle 等人利用丙酮萃取肝臟中的蛋白質成分，並以管柱層析分離特定組成份後，發現肝臟中某些蛋白質成分對於 B 型肝炎的患者具有療效最為引人注目[9,10]。Thomas 的研究發現，肝臟蛋白質的萃出物含有 HGF 與胸腺蛋白兩種蛋白質，而 HGF 與胸腺蛋白在肝臟再生

與免疫反應中的扮演的重要功能已多被證實[11]。

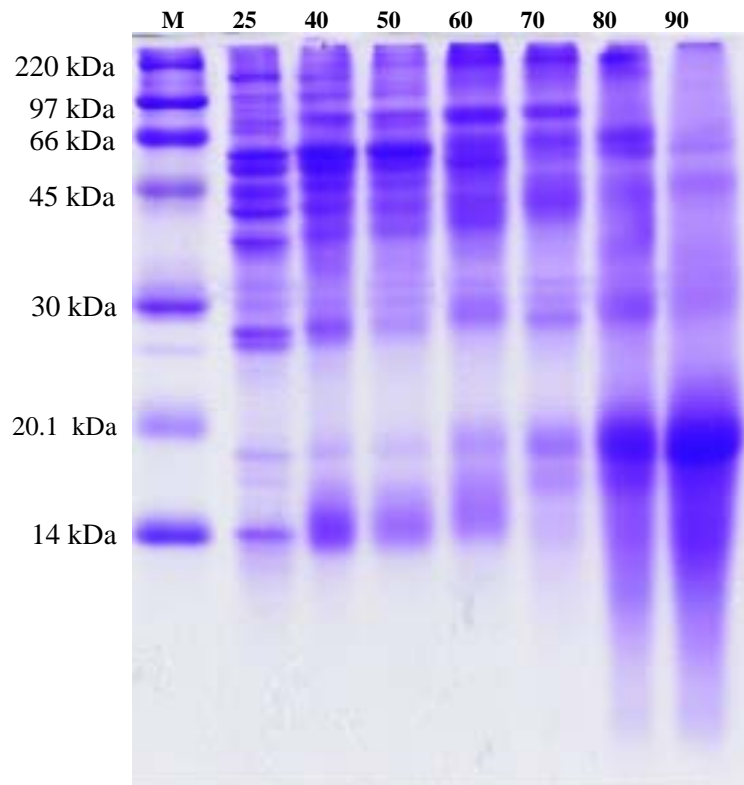
肝臟中除了已知之營養組成、維生素及微量元素外，在肝臟也存在一些肝臟保護因子。在 1950~1970 年代，一些營養學家曾專注於動物肝臟萃取物用於營養補給與貧血治療用途的研究，此乃基於肝萃取物中富含 Vitamine B₁₂ 及鐵離子等物質 [12]。當時，有些臨床醫師從事於肝萃取物對於肝病醫療功效的探討[13,14]，這些肝萃取物被開發成注射針劑[15]或口服製劑[16]。有些研究者更指出，肝萃取物中存在抑制腫瘤細胞生長的因子 [17,18]。近年來，一些生技公司持續開發具有醫療效果的肝萃出物。美國第 6,350,472 號[19]，第 6,156,349 號[20]及世界專利組織 WO117,535 號[21]專利揭示合併藥物與動物肝臟萃取物的服用，可有效的控制人類免疫不全病毒（human immunodeficiency virus）在人體中的繁衍，這種合併肝臟萃取物的服用的治療方式，也被利用於 B 型肝炎病毒（hepatitis B virus）與鼻咽癌病毒（Epstein-Barr virus）的控制[22]。再則，由特殊動物肝萃取物的製備與用途，因至今多無專利受限，因此相關產品仍受到生技業者的重視而持續研發中，其中一例為由鯊魚肝臟萃取物，可有效提昇人體的免疫力[23]。

四、參考文獻

1. Bedda S, Laurent A, Conti F, et al. 2003. Mangafodipir prevents liver injury induced by acetaminophen in the mouse. *J Hepatol* 39:765-72.
2. Chen CF and Lin CS. 2003. Hepatoprotective effects of clam extract supplementation on subacute hepatitis induced by carbon tetrachloride in rats. *Taiwanese J Agri Chem Food Tech* 41:159-66.
3. Lin CS. 2003. Effects of freshwater clam extract on liver functions in alcoholic liver injury. *Nut Sci J* 28:26-33.
4. Brent JA and Rumack BH. 1993. Role of free radicals in toxic hepatic injury II. Are free radicals the cause of toxin-induced liver injury? *Clin Toxicol.* 31:173-96.
5. Feng H, Matsuki N and Saito H. 1996a. Improvement of fatigue and acceleration of recovery from stress-induced deficient sexual behavior in mice following oral administration of soft-shelled turtle powder. *Biol Pharm Bull.* 19:1447-50.
6. Feng H, Yamazaki M, Matsuki N, et al. and Saito H. 1996b. Anti-tumor effects of orally administered soft-shelled turtle powder in mice. *Biol Pharm Bull.* 19:367-8.
7. Matsushita R, Ishinoda Y, Etoh T, et al. 1995. Immunohisto-chemical studies on the expression of HGF and HGF receptor in carbon tetrachloride-treated monkeys. *Post/ International hepatology communication* 3:S37-S169.
8. Thuillier V. 1961. Method of preparing pure extract of liver. GB878,747.
9. Wagle SS and Steinbach T. 1994. Method of treating an Epstein-barr viral infection. US5,334,395.
10. Wagle SS, Steinbach T, Lawyer CH, et al. 1994. Method of treating the symptoms of Alzheimer's disease. US5,284,664.
11. Thomas B. 2001. Live Protein Therapy in the Management of Liver Disease. *Townsend Letter for Doctors and Patients Online Magazine.* http://www.tldp.com/issue/11_00/protein.htm
12. Lippi G. 1964. Clinical research on the hemopoietic action of nucleosides associated with liver extract, vitamin b complex and vitamin b 12. *Minerva Med.* 55:1958-63.
13. Bazzicalupo G and Coscelli C. 1968. On the action of a total liver extract in subacute and chronic hepatopathies. *Minerva Med.* 59:3977-82.

14. Preziosi P, Nistico G and Marano V. 1975. Double-blind study of a total liver extract in patients with hepatic dysfunction. *Int J Clin Pharmacol Biopharm.* 11:210-5.
15. Gorini M. 1966. Clinical research on the action of the intravenous administration of total deproteinized liver extract in acute and chronic liver diseases. *Clin Ter.* 37:143-56.
16. Suros J and Ciscar F. 1962. Treatment of chronic liver diseases with a total liver extract by oral and parenteral routes. *Med Clin. (Barc)* 39:418-22.
17. Fare G. 1964. Partial protection by an ox liver extract against rat liver carcinogenesis by 4-dimethylaminoazobenzene. *Nature.* 204:1004-05.
18. Li CP, Prescott B, Martino EC, et al. 1968. Antineoplastic activity of clam liver extract. *Nature.* 219:1163-64.
19. Hermann Jr WJ and Pylant PR. 2002. Method of treating HIV infection with transdermal gel containing mammalian liver extract. US6,350,472.
20. Lawyer CH and Frank P. 2001. Enriched fraction from a porcine liver extract for treating human diseases. WO117,535.
21. Hermann Jr WJ and Pylant PR. 2000. Method of treating HIV infection with suppository containing mammalian liver extract. US6,156,349.
22. Lawyer CH and Gawish AAS. 1994. Method of treating hepatitis B infection. US5,316,775.
23. Raithaus LR. 1998. Shark liver extract for stimulating the immune system. US5,840,342.

A.



B.

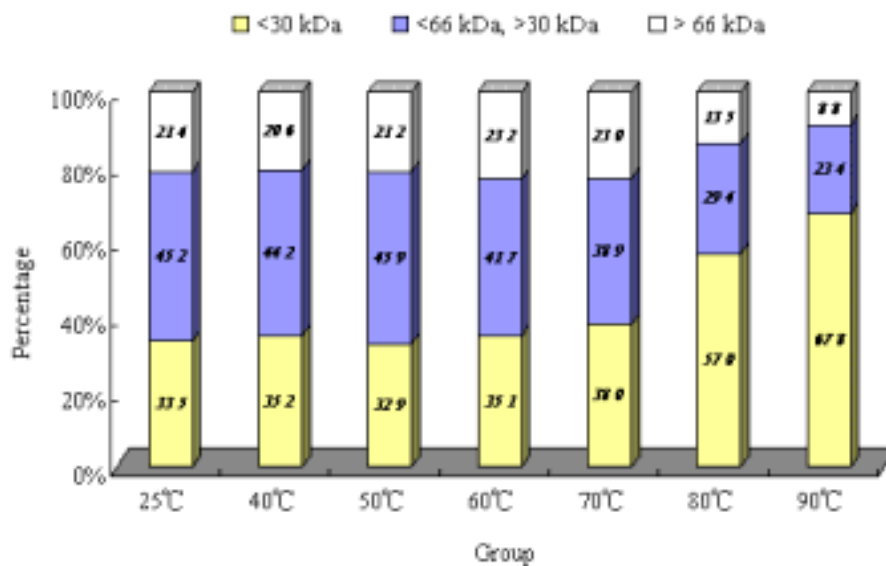


圖 1 不同溫度處理所製得的圓魚肝萃出物進行 SDS-PAGE 以分析其蛋白質圖譜 A, 不同溫度處理之圓魚肝萃出物以 30 μ g 的總蛋白量利用 15% 聚丙醯凝膠 (polyacrylamide gel) 進行蛋白質解析, 並以 coomassie blue 進行蛋白質染色。M 為蛋白質分子量標準品。B, 不同溫度處理製得圓魚肝萃出物的圖譜分析, 其被區分成低分子量蛋白質範圍 (≤ 30 kDa)、中分子量範圍 (> 30 kDa, < 66 kDa) 及高分子量範圍 (≥ 66 kDa) 分析之。

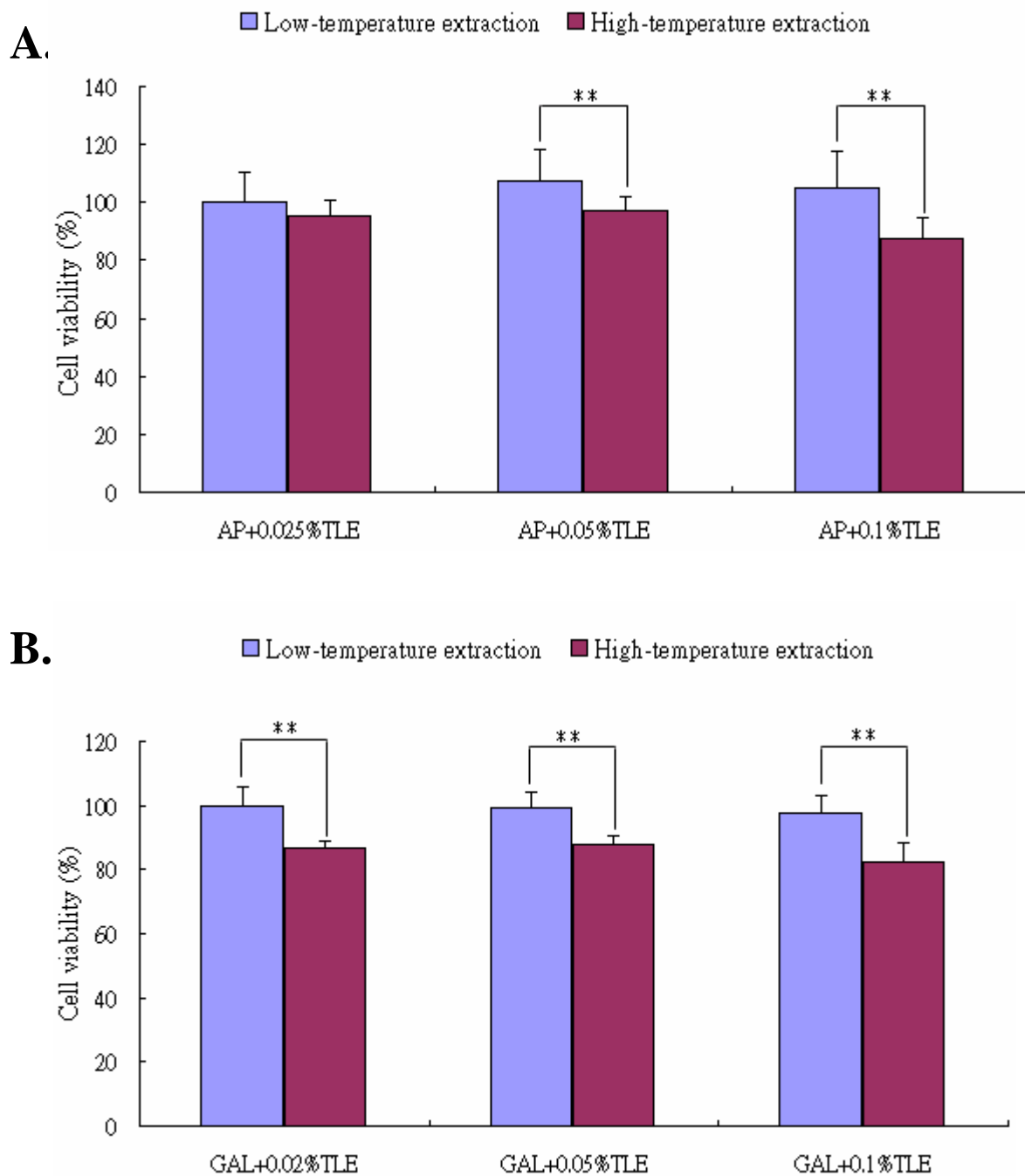
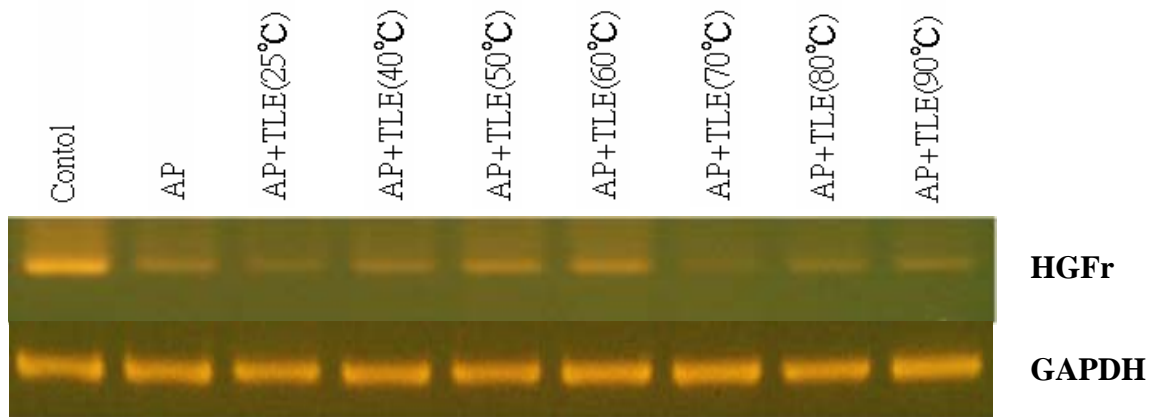


圖 2、圓魚肝萃出物對應 acetaminophen (AP) 與 D-galactosamine (GAL) 所引起的肝細胞損傷之保護效應。 圓魚肝萃出物 (TLE) 分為低溫萃取組 (經 25、40、50 及 60 萃取處理之 TLEs) 與高溫萃取組 (70、80 及 90) Clone 9 細胞 (1×10^4 cells/well) 培養 (10% FBS) 於 96-well 培養皿中 12 小時, 更換無 FBS 培養基 24 小時後, 再次更換含 10% FBS 之培養基, 且於其中加入 40 mM 的 AP (A) 或 GAL (B) 並分別加入 0.025%、0.05% 及 0.1% 的 TLE, 這些細胞再經 24 小時培養後進行 MTT 分析。每個處理組至少重複 3 次, 圖中所列為每處理組之平均值 \pm 標準偏差 (mean \pm SD)。以 AP 或 GAL 加 0.025% 的低溫萃取 TLE 組之數值為細胞存活率 100% 計算之。**表示低溫萃取組與高溫萃取組間數值呈現的差異顯著性, 其 P 值 < 0.01 。

A.



B.

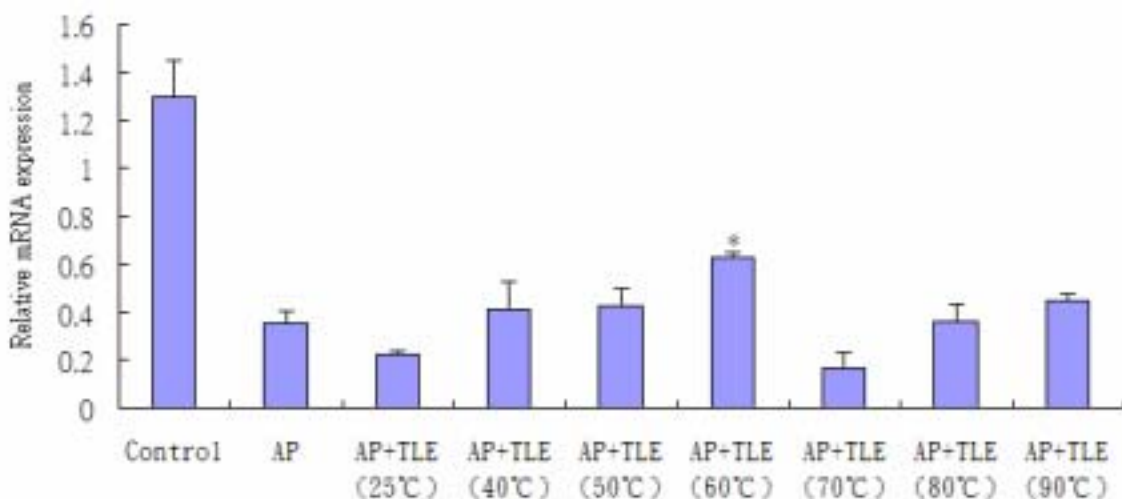


圖 3、以 RT-PCR 測定圓魚肝萃出物對經 acetaminophen (AP) 處理肝細胞之肝細胞生長因子受器 (HGFr) 基因表現的影響。 實驗為肝細胞 Clone 9 經 40 mM AP 處理，並分別以不同熱處理的 TLEs 合併處理，實驗處理後萃取細胞的 RNA 進行 RT-PCR 分析。GAPDH 與 HGFr 基因表現同時被測定，並以 GAPDH 基因表現量為基準，計算各處理組 HGFr 基因的相對表現量。A, RT-PCR 之 agarose gel 電泳圖；B, 各處理組的 HGFr 基因相對表現分析結果。每個處理組至少重複 3 次，B 圖中所列為每處理組之平均值 \pm 標準偏差 (mean \pm SD)。*代表該組之數值與 AP 處理組比較呈現的差異顯著性，其 P 值 < 0.05 。