

應用尼羅種吳郭魚探討菇蕈多醣體 對肝臟修復之研究

蕭仟攻¹、吳育昇¹、張景盛¹、黃世鈴²、冉繁華³、黎錦超⁴、陳秀男^{1,*}

¹ 國立臺灣大學漁業推廣委員會

² 臺灣行政院農業委員會鹿港淡水繁養殖中心

³ 國立臺灣海洋大學水產養殖系

⁴ 金門水產試驗所

一、前言

肝臟是動物體內少數具有再生能力之器官，當肝臟進行部分切除後或損傷時，肝細胞會啟動一系列代償性的肝臟修補機制（Compensatory Fashion），留存的肝臟細胞將由靜止狀態（G0 Phase）重新進入細胞週期，直到肝臟細胞增生回復至原有肝重與功能時才回復為靜止期（Michalopoulos and DeFrances, 1997; Taub, 2004）。以斑馬魚為例，整個增生過程約需要 5-7 天（Kan *et al.*, 2009）。過去研究已發現多種生長、轉錄因子及細胞激素與營養物質參與並影響肝臟複雜的修補再生機制（Bohm *et al.*, 2010），但是由初始訊號觸發一連串的肝臟再生反應，其確切的分子機制以及肝臟如何精準增生恢復至原來肝臟重量仍是未知數。

文獻指出，菇蕈多醣體（ β -glucan）除了具有抗腫瘤、抗菌、增加免疫刺激等作用，還有降血糖、降膽固醇、抗炎症、降低氧化傷害、促進傷口癒合、增加肝功能等功能。對於肝臟受損之動物，靈芝亦能降低其肝發炎指數，並促進肝細胞的再生。我們認為菇蕈多醣體對於肝臟修復應有其關聯性存在，因此本研究主要針對菇蕈多醣體（ β -glucan）對尼羅種吳郭魚（*Oreochromis niloticus*）肝臟回復的相關性進行觀察。

二、結果與討論

(一) 體外細胞增生分析結果

Glucan 5 g/L 組與 Glucan 10 g/L 組在第一、二、三、四天的表現量與控制組比較皆為極顯著差異 ($p < 0.01$)，顯示吳郭魚肝臟細胞經多醣體處理後其細胞增生活性明顯增加 (圖 1)。BrdU cell proliferation assay 分析結果：Glucan 5 g/L 組與 Glucan 10 g/L 組在各個時間點的表現量與控制組比較皆為極顯著差異 ($p < 0.01$)，顯示吳郭魚肝臟細胞經多醣體處理後其新生細胞數量明顯增加。免疫組織化學染色法 (Immunohistochemistry, IHC) 結果顯示：將吳郭魚進行部分肝臟切除手術後，肝臟組織切片中亮點表示為新生細胞標記，顯示肝切術後吳郭魚肝臟進行代償性增生作用，而多醣體組之吳郭魚肝臟組織其新生細胞數量較部分肝切組明顯增加 (圖 2)。

(二) 利用免疫組織化學染色法 (Immunohistochemistry) 偵測肝臟組織之新生細胞數量

觀察菇蕈多醣體對吳郭魚部分肝臟切除後細胞新生之影響，Anti-PCNA 實驗結果如 (圖 3) 所示；Anti-Ki-67 實驗結果如 (圖 4) 所示。實驗結果顯示，經過部分肝臟切除手術之組別，如“浸泡多醣體並部分肝臟切除組 (β -glucan/PH)”與“部分肝臟切除手術組 (PH)”，其肝臟組織的新生細胞數量 (Proliferation Index) 於採樣點第一天、第三天皆顯著高於未經部分肝臟切除手術之組別。四個採樣時間點中，又以採樣點第三天的新生細胞數量最多。Proliferation Index = (PCNA-positive cells or Ki-67-positive cells / DAPI-positive cells)。

三、結語

本研究以體外實驗與體內實驗兩部分進行探討，針對菇蕈多醣體誘導吳郭魚肝臟細胞增生之影響。體外實驗結果顯示，吳郭魚肝臟細胞經過菇蕈多醣體處理後，顯著提升細胞活性與細胞增生率。於體內實驗中，首先建立魚隻部分肝臟切除手術模式，刺激吳郭魚肝臟之增生反應，再進一步探討浸泡菇蕈多醣體是否能促進魚隻肝臟之增生，以及對於肝臟組織增生相關基因表現量之影響。免疫組織染色法結果顯示，浸泡多醣體組之肝臟新生細胞數量顯著提升，而肝臟再生相關之細胞激素，推測菇蕈多醣體藉由調控相關之細胞激素、生長因子等，有效促進吳郭魚肝臟細胞之增生。

附錄 (圖)

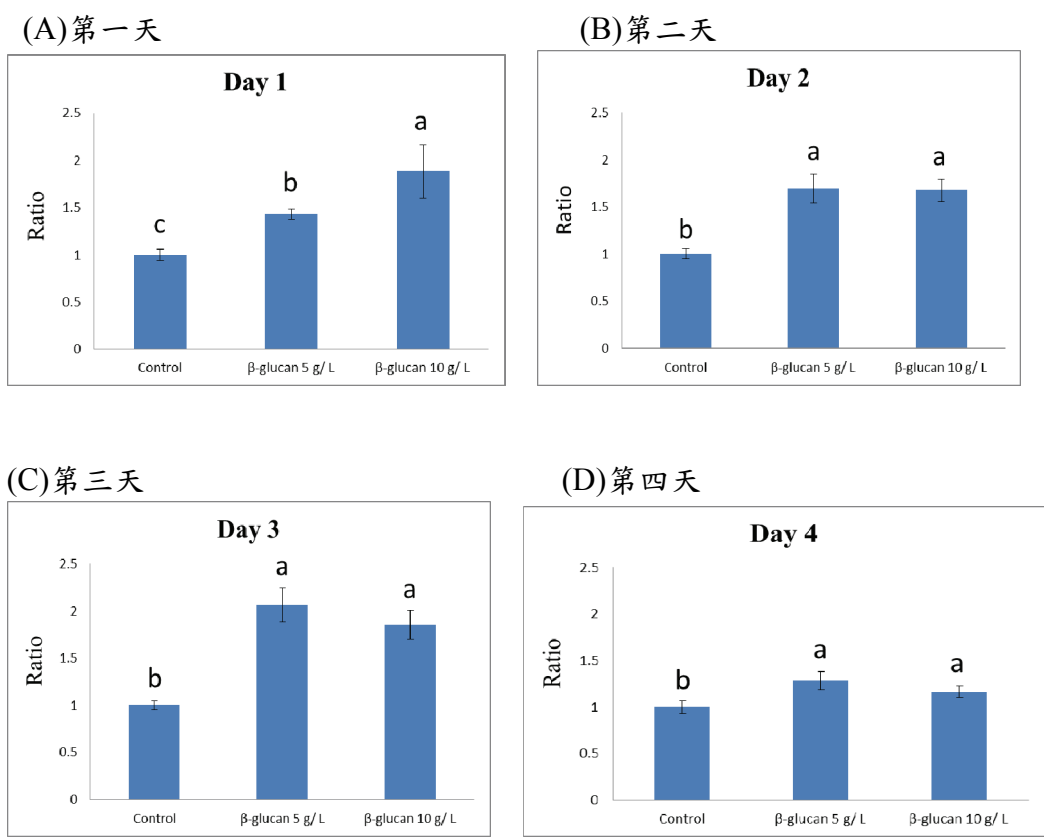
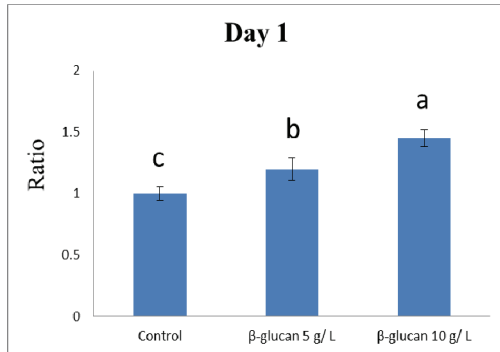
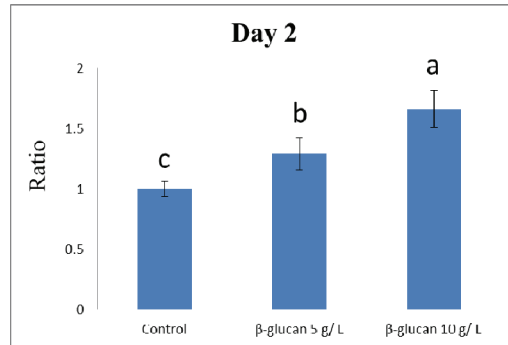


圖 1. 吳郭魚肝臟細胞經過不同濃度多醣體處理後，於不同天數偵測肝臟細胞活性 (MTT Assay)

(A) 第一天



(B) 第二天



(C) 第三天

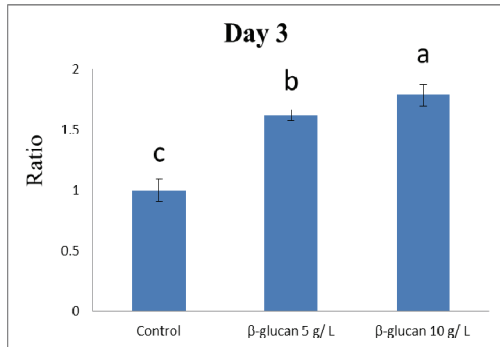


圖 2. 吳郭魚肝臟細胞經過不同濃度多醣體處理後，於不同天數偵測肝臟細胞增生活性 (BrdU Cell Proliferation Assay)

各處理組肝臟細胞增生率與時間趨勢圖

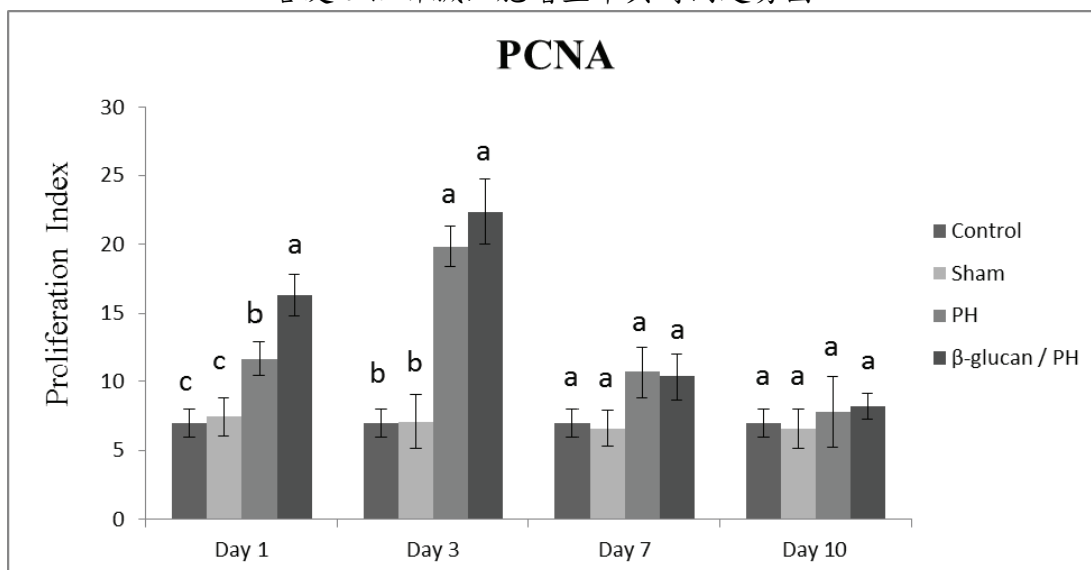


圖 3.利用免疫組織化學染色法 (Immunohistochemistry) 偵測肝臟組織之 PCNA-positive cells 數量

各處理組肝臟細胞增生率與時間趨勢圖

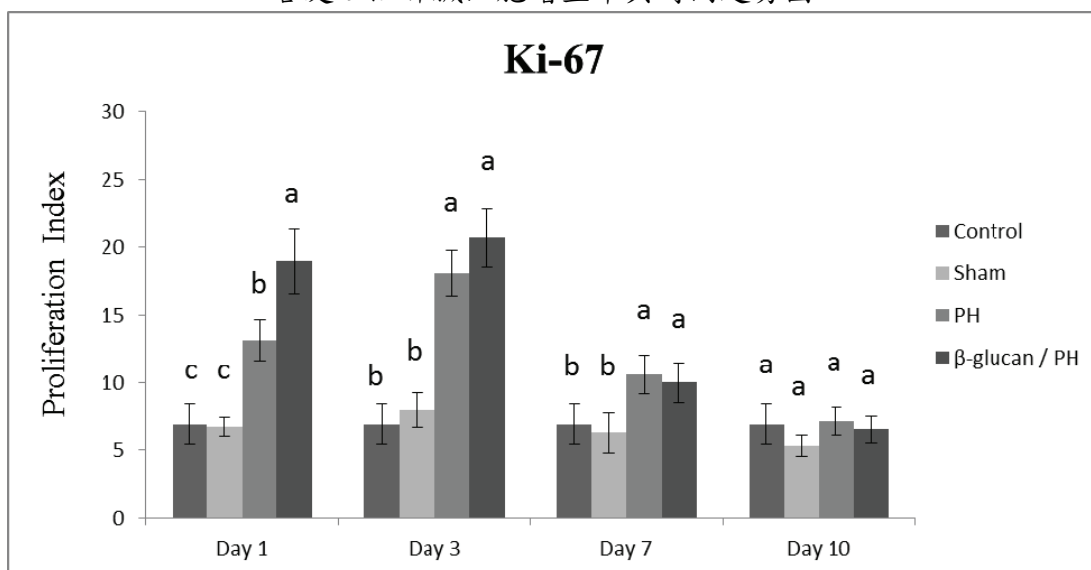


圖 4.利用免疫組織化學染色法 (Immunohistochemistry) 偵測肝臟組織之 Ki-67-positive cells 數量

參考文獻

- Bohm, F., U.A. Kohler, T. Speicher, and S. Werner. 2010. Regulation of liver regeneration by growth factors and cytokines. *European Molecular Biology Organization Molecular Medicine*. 2:294-305.
- Bravo, J., and J.K. Heath. 2000. Receptor recognition by gp130 cytokines. *The European Molecular Biology Organization Journal*. 19:2399-2411.
- Bravo, R., R. Frank, P.A. Blundell, and H. Macdonald-Bravo. 1987. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature*. 326:515-517.
- Celis, J.E., and A. Celis. 1985. Cell cycle-dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: subdivision of S phase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 82:3262-3266.
- Kan, N.G., D. Junghans, and J.C. Izpisua Belmonte. 2009. Compensatory growth mechanisms regulated by BMP and FGF signaling mediate liver regeneration in zebrafish after partial hepatectomy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 23:3516-3525
- Michalopoulos, G.K., and M.C. DeFrances. 1997. Liver regeneration. *Science*. 276:60-66.
- Mizuno, T., P. Yeohlui, T. Kinoshita, C. Zhuang, H. Ito, and Y. Mayuzumi. 1996. Antitumor activity and chemical modification of polysaccharides from niohshimeji mushroom, *Tricholma giganteum*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 60:30-33.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 65:55-63.
- Taub, R. 2004. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 5:836-847.