行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

應用人體組織幹原細胞初代培養技術平台於篩選神經及血管再生治療用中藥
研究成果報告(精簡版)

計 畫 類 別 ：個別型
計 畫 編 號 ：NSC 94-2323-B-038-003-
執 行 期 間 ：94 年 12 月 01 日至 95 年 11 月 30 日
執 行 單 位 ：臺北醫學大學細胞及分子生物研究所

計 畫 主 持 人：施子弼

計畫參與人員：碩士級-專任助理：呂佩珊
學士級-專任助理：藍珮綺

處 理 方 式 ：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1 年後可公開查詢

中 華 民 國 96 年 03 月 20 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告

應用人體組織幹原細胞初代培養技術平台於篩選神經及血管再生治療用中藥

計畫類別：☑ 個別型計畫　　□ 整合型計畫
計畫編號：NSC94－2323－B－038－003
執行期間：　94 年 12 月　01 日至　95 年 11 月　30 日

計畫主持人：施子弼
計畫參與人員：徐鳳麟

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：□精簡報告　☑完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：
□赴國外出差或研習心得報告一份
□赴大陸地區出差或研習心得報告一份
□出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
□國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢
□涉及專利或其他智慧財產權，□一年□二年後可公開查詢

執行單位：台北醫學大學 細胞分子生物研究所

中　華　民　國　　9　6　年　0　2　月　2　8　日

中文摘要

近年來幹細胞的研究已顯示成人體幹細胞具組織修復再生功能。本實驗室已建立數種人體組織幹細胞分離、鑑定、及培養之平台-從骨髓、脂肪、頭皮、臍帶血、臍帶、包皮、羊膜、胎盤等組織來源分離純化造血及間質幹細胞，從胎兒肝臟、臍帶血、成人周邊血分離純化造血幹細胞，同時已完成各組織幹細胞之生長分化分析及分子特性等鑑定。特別是本實驗室已建立由體外擴增之間質幹細胞，分化成為血管內皮細胞及神經細胞之技術平台。並已針對單方藥材如黃耆、西洋參、三七、柴胡、紅景天及複方中藥如人蔘養榮湯、十全大補湯及生脈散等活血化瘀藥材之萃取物進行評估研究，並已鑑定分析特定中藥具保護造血功能及促進間質幹細胞生長及分化等藥效。

本計劃擬利用人體組織幹細胞分離鑑定及培養之平台，篩選評估出可治療心血管疾病及神精退化性疾病之中藥，本計劃目標如下：(1)針對可能促進活化血管內皮及神經前驅細胞再生或分化藥效目標，篩選評估中藥有效成分並鑑定其特性；(2)系統性分析中藥作用於人體組織幹原/前驅細胞之分子藥理機制；(3)探討中藥對心血管疾病及神精退化性疾病改善之分子藥理機制。本計畫執行一年期間引用造血幹細胞及間葉幹細胞生長分化之培養系統，共計篩選 22 種中藥單複方，純化成分或其衍生物作用於血管內皮及神經前驅細胞分化及生長的影響。實驗證明三七皂苷具有促進造血幹細胞分化成為血管內皮前驅細胞及促進成熟內皮細胞參與血管生成之功效，三七成份衍生物 QFA-15 可促進成體間葉幹細胞的神經分化潛能同時可維持其細胞複製特性。利用細胞激素蛋白陣列及定量 PCR 陣列研究發現，三七皂苷及三七衍生物 QFA15 分別對血管生成及神經生長分化相關激素具有調控其表現量之功能。三七皂苷也會調控多種細胞表面接受器、細胞間交互作用蛋白的表現。本計畫之執行，對中藥在個體幹細胞生理調節上有更深入地了解，亦可提供中藥醫療作用於人體組織幹細胞之分子生理系統效用評估範例，建立一現代化中藥藥理鑑定的新方向，有助中藥之國際化發展。

關鍵詞：人體組織幹/母細胞；造血及間質幹細胞；心血管疾病;神經退化性疾病;神經分化;血管內皮細胞分化

Abstract

Background 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 body tissue injury repairs. We have previously established several somatic human tissue stem/progenitor cell primary culture systems and characterized their function at cell and molecular levels. *In vitro* cell lineage specific differentiation analyses on hematopoietic stem/ progenitor cells (isolated peripheral blood, umbilical cord blood, and fetal liver) and mesenchymal stem/progenitor cells derived from various tissues (bone marrow, peripheral blood, fat, scalp, foreskin, and amniotic membrane tissue) have also been established. Particularly, we have been shown able to transdifferentiation of some hematopoietic and mesenchymal stem/progenitors into endothelial and/or neurogenic phenotypes in cell culture. A series of some selected chinese drugs such as Astragalus membranaceus Bge., Panax quinqueflium L., Panax notoginseng F.H.Chen, Bupleurum chinense DC., Coix lachryma-jobi L. and Rhodiola kirilowii., were analyzed and evaluated their influences on hematopoietic erythroid maturation, mesenchymal tissue cell differentiations and proliferation for characterizing their tissue protection and repairing functions. Results obtained from the studies at our laboratory have shown some components of chinese herbs are capable of influence stem cell renew and differentiation properties.

Objectives The objectives of this proposal study were set as following: (1) To functional evaluate candidate components of chinese herbs for activating, renewing and/or improving differential ability of neural and endothelial progenitor/stem cell. (2) To systemically collect the molecular analytical data of selective drug for establishing pharmacological informatics of Chinese drugs on human tissue stem cell. (3) To investigate the molecular pharmacological effect of the traditional chinese medicine on improving cardiovascular and neurodegenerative disease.

Results and Discussion By our HSCs and MSCs proliferation and differentiation culture system, to date we have screen 22 kinds of Chinese herbs included single herb and/or compound prescriptions, purified herb components and chemical derivates. Evaluation of their pharmaceutical effects on endothelial progenitors and neural progenitors proliferation/differentiation potential has been made. In this study, we found notoginsenoside can promote the HSCs transformed into endothelial progenitors and enhance capillary-formation capacity of endothelial cells. Notoginsenoside derivates QFA-15 was also found able to promote MSCs differentiation into neural progenitors while maintain their growing potential as a neurotropic factor. The pharmaceutical effect of notoginsenoside on the molecular based proliferation and differential properties have been further examined by cytokine antibody array and quantitative PCR super-array. Expressions of several cytokines involved in angiogenesis and neurongenesis was found to be modulated by notoginsenoside and derivates QFA-15. In addition, notoginsenoside involved in the regulations of cell surface receptor, cell-cell interaction molecular and tissue remodeling factor were investigated. These informations were exemplified and organized to serve as a pharmacogenomic evaluation reference. In completions of the proposal study, we have shown that stem/progenitor cell based drug evaluation may enhance our better understanding into the Chinese drug prescription function at the molecular pharmacological level.

Conclusion This study demonstrates the feasibility of using tissue progenitor based primary cell culture drug testing system as an additional useful method for systemic evaluation Chinese drug at cell and molecular levels, which will be also aid to the Chinese drug development.

Key Word: Human tissue stem/progenitor cell; Hematopoietic/Mesenchymal stem cell; Cardiovascular disease; Neurodegenerative disease; Neural differentiation; Endothelial differentiation.

目錄

中文摘要……I

英文摘要……II

計畫內容

壹、前言……1

貳、研究目的……4

參、研究方法……5

肆、結果與討論……7

伍、結論與建議……11

陸、參考文獻……13

柒、附圖及附表……14

壹、 前言

幹原細胞具有多機能特性，是個體組織器官發育之起源，特別是當個體經歷老化或損傷等壓力環境下，幹細胞對於受損組織的更新復原顯的格外重要，因此透過藥物對幹原/前驅細胞影響的生物系統性研究，除了可增加我們對中藥作用機理了解，並且擴大中藥在醫療上與分子生物醫學諮詢之溝通。有效利用幹原細胞生物學拓展及解析中藥修繕個體受傷器官組織而加速創傷組織的修復藥理，將是本計劃執行的達成之最大效益。本計劃相關研究背景如下:

一、幹原細胞(stem cell)的特性：

（1）自我更新(Self-Renewal)能力：幹細胞進行不對稱分裂(asymmetry division)，分裂成一個跟自己完全一樣的幹細胞即自我複製及另一個準備分化為成熟細胞的前驅細胞(progenitor cell)，組織一方面維持了長期自行更新(long-term self-renewal)的能力，一方面又增加了新的細胞可以發展為成熟的細胞以代替喪失的部分。這種自我更新能力可以維持終生。

(2) 分裂靜止Mitotic Quiescence)：幹原細胞相對於成熟的血球細胞是非常少的，只有少數在進行細胞分裂(＜0.5%)，而大多數的Stem Cell 是處於潛靜狀態(Quiescence Stage，G_0 Phase)。

（3）具有多潛能分化(multipotency)的能力：幹原細胞具有分化成不同種類前驅細胞的能力，如造血幹原細胞具有分化成髓性(myeloid)或淋巴性(lymphoid)系列血球細胞的能力。

（4）具有可塑性(plasticity)：在不同的微環境(microenvironment)刺激下，幹原細胞可跨越發育胚層藩籬(barrier)，往不同於原始存在胚層的細胞進行分化(trans-differentiation)如造血幹細胞可分化為神經細胞等。無論幹細胞的來源為何，當細胞進行分化後將伴隨著逐漸消失的可塑性及多潛能性。因此如何藉由現有中藥透過基因體表達分析來增進個體功能幹原細胞的質與量，多方面增加傷口再生復原效率。

二、造血幹細胞(hematopoietic stem cell)之特性：

原始造血幹細胞具有分化成各系血球細胞的能力包括髓性及淋巴性血球。造血幹細胞能分化成數種血球系，具有多(潛)能特性(multiple-potency)；後期細胞只分化成單一血球系，稱之為單(潛)能性前驅細胞(uni-potency)，在此稱為前驅細胞。因此，血球的來源為兼具分化(differentiation)和再生(regeneration)能力的原始細胞。但近幾年發現在此類幹細胞中有內皮前驅細胞存在；而在神經前驅細胞表面也發現造血幹原細胞之標記抗原 CD34，顯示造血幹細胞同時具備不同組織細胞之分化能力。目前許多活體研究已顯示造血幹原細胞可以形成除了血球細胞之外的體組織如肝、血管、肌肉、神經等屬於不同胚層組織的細胞，顯示造血幹原細胞在分化上具有某種程度的可塑性。

三、人類間質葉幹細胞(mesenchymal stem cell)之特性：

早期自骨髓分離出除血球系幹原細胞外，另一類具有分化為各種特定組織細胞的能力的紡錘狀貼附性(adherent)細胞，稱為間質葉幹細胞，其可分泌不同細胞因子滋養與調節造血幹原細胞之增殖與分化。二者在發育及成體之健康生理上密不可分。在細胞激素或誘導劑作用下又可分化成特定組之細胞，例如脂肪細胞、骨質細胞、軟骨細胞及內皮細胞等；接著其他研究指出成體組織存在許多相似之

間質葉幹原細胞，也具有多重分化潛能的特性，但其個別潛在差異機制仍不明瞭。雖然如此，目前已知不同組織分離之間質葉幹細胞仍有許多共通細胞表面標記如CD90w，SH2，SH3 等。可由人體各器官組織萃取研究。因此對各器官之再生修復研究必須與其組織幹原母細胞共同探討。

四、<u>中藥對於幹原/前驅細胞之基礎研究</u>

(1)中草藥影響造血前驅/幹細胞(Hematopoietic Stem/Progeniotor Cell)集落形成檢測(Colony Formation Assay, CFA)之源由

1990 年Ohnishi Y等人利用動物模擬造血受損的模式，發現十全大補湯有促進早期幹細胞群落CFU-S生成的作用，初步鑑定中草藥在活體之效能；接著Fujii Y. 等人餵食經放射線照射減低免疫小鼠人蔘養榮湯，發現可以增加血液中幹細胞群落CFU-E、CFU-GM的數量達 2-2.5 倍(Ref:1)；Hsu HY. 等人也發現以四物湯餵食免疫缺失小鼠有保護其免疫功能的效果(Ref:2)。直到 1997 年，Hisha, H 等人進一步發現十全大補湯具有加速經放射性及癌症化學治療藥物mitomycin C處理後造血受損老鼠之造血能力恢復，而其中當十全大補湯的甲醇萃取物達 10μg/ml 時可增加骨髓白血球系群落大小，並可使群落之數量相對性增加 2.11 倍(Ref:3)。其他由人體中分離出造血幹原/前驅細胞的體外細胞培養的研究如: 人參皂 (GS) 對較晚期的造血幹細胞具有促進增殖作用，能提高紅血球系、骨髓白血球系其前、後期群落形成細胞產率，同時具有分泌活性生長因子和類生長因子能力，能在體外協同生長因子，刺激幹原母細胞$CD34^+$細胞增殖。除了動物體內及人體初代細胞體外群落活性的研究外，利用人類血球癌細胞株如TF-1 和K562 等在不同的誘導劑如: δ-aminolevulinic acid、Hemin、Butyric acid、 Ara-C、5-azacytidine 等不同的化合物及細胞因子個別處理之下，影響紅血球系的分化方向，並引發細胞血紅蛋白hemoglobin 之生成。除了觀察到的細胞活性檢測結果，Detmer K. *et al* 更深入探討中藥對於細胞訊息傳導的影響及表達基因體變化，發現一抑制 Hedgehog Signaling 的 藥物Cyclopamine於 10 μM的濃度之下在體外細胞培養時對於骨髓白血球系群落的生成無影響，但是對於紅血球系後期群落生成數量有明顯抑制現象，並且Cyclopamine會延遲紅血球系之細胞hemoglobin 的生成。

由以上研究指出，中藥成份的確有其專一細胞內作用機轉，為了探討中藥對於人體造血各群系細胞活性影響及基因表達變化，我們將借助幹原細胞多重分化潛能與其幹原細胞優勢，利用群落形成方法與群落型態分析，對於我們欲檢測之藥物以人體組織細胞而非癌細胞株培養，進行初步篩選工作。

(2) 造血系統/血管生成：許多臨床上治療癌症的化療藥物造成病患噁心、體重下降、掉髮等副作用，無法專一性毒殺癌細胞與避免病患個體傷害。因此若能透過幹細胞提高病患免疫 B、T 細胞之毒殺能力，降低化療的使用，激發個體造血幹細胞之分化發育成免疫性幹原細胞，增加體內免疫細胞數量及藉由活化免疫細胞而提昇毒殺癌細胞能力，可提供血癌及腫瘤治療上一個較人性的選擇。過去研究報導曾指出人蔘、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，但我們並不清楚其作用的分子機制，在長遠治療不同或新種類疾病及中西藥物使用上造成了限制，因此若能加強研究中藥效能對造血幹細胞及血管形成相關前驅細胞的藥物作用機轉，將可更有效率提昇中藥於抗癌(抑制血管生成)及心血管疾病(促進血管再生)治療之應用。

(3) 神經系統發育/調節：目前已知調節神經細胞的藥物主要針對促進細胞生長、增加存活能力與促進神經軸之生長等方向，但時常面臨藥物的分解快速，且須注射高劑量才能達到有效治療等種種問題。雖然目前已有細胞激素如神經細胞生長激素(NGF)的使用，可達到促神經細胞生長的效果，用以治療運動神經原傷害或

神經細胞退化的疾病如阿茲海默症等，但因這類蛋白藥物的分解快速、無法突破血壁腦屏障(blood-brain barrier)、而且成本昂貴，並不是一個最好的治療藥物選擇。目前已知具調理神經作用中藥藥物許多著重於安神、提神、耐神等功用，而對於細胞功能上的機理探討較少，因此首先以功能性基因體層次探討藥物對幹細胞的變化影響及藥理機制，根據這些資訊可開發現有之中草藥成份中包括非蛋白成份或小分子，達到能模擬細胞激素之相似或更好的治療效果是我們長遠的理想。

歸納目前中藥與幹細胞研究之進展已知：

i. 調理氣血之中藥可影響造血前驅/幹細胞(Progenitor/Stem Cell)活性。

ii. 組成相似的中藥複方對於造血前驅/幹細胞的影響具多樣性。

iii. 人體分離出之初代細胞體外培養 Primary Colony Formation Assay 或人類細胞株體外培養分析的方法，可以被應用於鑑定對於造血前驅/幹細胞有影響的藥物。

利用體外檢測（*In Vitro*）的實驗結果和老鼠體內（*In Vivo*）活性回復的實驗結果的相關性可提供藥物對於人體造血幹原/前驅細胞的影響(分化、增生)基礎研究及臨床應用上的價值。

貳、研究目的

本計劃的主旨是利用人類組織之幹原/前驅細胞生長、分化等相關技術平台，篩選出對神經及血管前驅/幹細胞具調節能力之中藥及其衍生物，並進一步針對幹細胞功能性基因體探討其藥物作用機轉，研究受藥物調控基因與細胞功能調節之相關性，進而拓展中藥於心血管疾病及神經退化疾病之應用。

本計畫將針對心血管疾病及神經退化疾病，篩選開發中藥於修護血管前驅/幹細胞及神經前驅/幹細胞之應用。計畫將針對血管前驅/幹細胞及神經前驅/幹細胞生長分化過程中，受中藥或其衍生物影響所分泌之細胞激素，生長因子及驅化性激素的改變作分析。此外也將針對前驅細胞性基因及細胞分化相關基因進行功能性基因體分析。本實驗室所建立之檢測系統，具備從各組織幹細胞之分離鑑定、基因及蛋白體學分析經驗、及動物活體分析系統，穩定培養的軟、硬體設備在此計畫期間完成可信賴的整合資訊。

本計劃執行目標如下：

（一）篩選分離及純化特定中藥或衍生物，並鑑定其有效成分特性。

(二) 以人類造血幹細胞及間葉幹細胞生長分化之培養系統，篩選中藥或其衍生物對於幹細胞生長分化能力之影響：目標將針對間葉幹細胞趨於神經前驅細胞分化，成人血球單核細胞趨於血管內皮前驅細胞分化等方向進行篩選。

(三) 探討中藥或其衍生物於神經前驅細胞分化、血管內皮前驅細胞生長分化之調節機制：將利用基因微陣列分析分析藥物調控基因與細胞功能調節之相關性，並利用細胞激素蛋白晶片研究細胞蛋白激素分泌之變化，整合此功能性基因體藥理資訊，本目標將可整合藥物治療過程中幹原細胞之內，及幹原細胞與周邊其他受損細胞之互動調節訊息，有助於拓展中藥於心血管疾病及神經退化疾病之應用。

本計畫將整合功能性藥理基因學及細胞學模式的系統性研究，篩選並評估中藥或其衍生物對神經前驅細胞分化、血管內皮前驅細胞生長分化的影響。計劃之順利完成將能提供學、醫界更多中藥透過調節幹細胞活性，對於提昇個體調理、保固健身的機制原理，拓展中藥於再生醫學及細胞醫療技術之應用，並開發出可應用於心血管疾病及神經退化疾病之科學性中藥。

參、研究方法

（1）中藥及衍生物來源：

待評估之天然藥物或其衍生物來源如下： (1)由台北醫學大學生藥所徐鳳麟教授提供中藥萃取物； (2)由市售購得後選取中藥材，以 50%EtOH浸泡隔日收集後再加入新的 50%EtOH浸泡共 3 次。或以熱水用同樣流程萃取純水溶性成分，經離心去除不溶之固態物質之後於 45℃水浴中經減壓濃縮約 1~2hr，收集的浸液濃縮體積 30~40ml將各濾液體積，調成至 50 ml 取濃縮液 1ml至 50ml tube內經冷凍使其凝結後至真空冷凍乾燥機，乾燥 2 天後秤重加入 1ml ddH_2O過 0.22 μm filter 調整濃度至 0.1μg/μl，0.5μg/μl，2.5μg/μl，10μg/μl 存放於 4℃保存。施以不同劑量檢測中藥物對於體外培養細胞生長的影響。分析其有效數據作為評估藥效依據。

（2）中藥萃取物之分離與有效成份之鑑定：

本研究計劃執行中所篩選出之中藥將針對其主成分單方單獨萃取後以細胞實驗測試其主成分藥效是否具再現性，單方之有效成份組成將進一步利用高解析液相層析法，分離有效藥物中不同極性之化合物，並與台北醫學大學生藥所徐鳳麟教授共同合作，協助鑑定分離有效成份工作，再進一步由檢測細胞活性測試來確認藥效。

（3）藥物對於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前驅/幹細胞的影響由細胞數目 作為判斷藥物之作用是促進或是抑制生長。

（4）體外幹原/前驅細胞之體外培養系統建立：

人類週邊血單核細胞的分離及內皮前驅細胞培養：利用 Ficoll-paque (Amersham Biosciences) 重力密度不同分離成人週邊血液中的單核細胞 (PBMNCs)，使用已覆蓋 gelatin 的培養皿及特定培養液培養具有貼附性的週邊血單核細胞 (adherent PBMNCs) ，於 37℃、5% CO_2條件下，連續培養七天。並於培養第一天、第四天換一次新鮮培養基，並在培養第一天、第四天、第七天觀察其細胞型態並擷取數位影像，以 1% Trypsin-EDTA在 37℃作用 20 分鐘後，收取貼附於培養皿底部的細胞，進行流式細胞儀或RT-PCR分析其細胞特性。

骨髓間質葉幹原/前驅細胞：我們已購得人類骨髓間質葉幹原前驅細胞，並於特定培養基中長期穩定培養。已知特定細胞表面吸附相關之抗原、受體之表達如CD29、CD34、CD45、Flt1、KDR、Flt-3、CD105、CD44、CD49e、CD49f、CDw90、SH2、SH4及HLA-class I等將由免疫螢光染色法鑑定，並利用分化誘導劑測試其分化為脂肪細胞、骨質細胞及軟骨細胞等多潛能特性。

脂肪間質葉幹原/前驅細胞：我們收集外科整形去除的脂肪組織，經過膠原蛋白胺與核甘酸胺作用後，收集吸附於培養皿之細胞，培養至定量細胞數後，以單一細胞分離技術挑選單一細胞，培養增殖成一穩定細胞株。除了利用免疫螢光染色分析細胞表面特定表達之抗原標記組成外，並利用分化誘導劑測試其多潛能特性。

(5)中藥對於幹細胞之體外分化影響

成人周邊血於內皮前驅細胞之分化:細胞用已建立之週邊血單核細胞的分離及內皮

前驅細胞培養方法。將欲檢測之中藥成份依不同劑量加入早期與後期增殖分化培養基中，觀察比較內皮前驅細胞的數量與分化程度差異。我們主要探討中藥對於成人前驅細胞再生與分化能力調控。偵測特定細胞在早期與晚期之型態、抗原蛋白及細胞內因子表達差異意義探討。相關免疫抗體偵測、螢光染色、西方墨點法蛋白鑑定及寡核甘酸晶片製備等技術將於分析中應用。

間質葉幹細胞之神經前驅細胞分化：我們將利用已建立單一選殖株之間質葉幹細胞方法，培養穩定之幹細胞來源，在神經細胞分化培養基中，依不同種類加入不同劑量之欲檢測中藥化合物，觀察幹細胞中神經前驅細胞早期、晚期所表達標記蛋白之產生與變化。

〈6〉免疫抗體蛋白晶片檢測:收集經中藥刺激處理前後的幹細胞培養基，利用蛋白晶片分析如細胞激素、細胞趨化激素、細胞生長及凋亡調控因子等蛋白的種類及定量變化。整合分析後再進一步以ELISA定量分析及濃度測定。

(7) 基因微陣列分析分析藥物調控基因與細胞功能調節之相關性:確定細胞之生理反應與特定藥物之作用可能透過的機制之關聯性後，我們將進一步分離其有效成分，依不同劑量培養觀察藥物對於細胞生長之劑量差異影響，在了解核藥物成分為有效後，我們收集不同分化階段之前驅細胞、分化細胞與幹細胞控制組之訊息核甘酸，經放大反應增加分析材料，經螢光標記後與已知之調控細胞生長免疫再生分化之基因組晶片進行雜交結合反應。比較得知差異性基因種類與觀察的細胞型態綜合藥效作用分子途徑。此外如參與細胞生長、細胞週期、細胞分化、細胞凋亡等作用的基因，將以RT-PCR進一步檢測分析。

肆、結果與討論

篩選分離及純化特定中藥或衍生物，並鑑定分析其有效成分特性。

本計劃以人體正常幹原/前驅細胞為技術平台，篩選並鑑定對血管神經修復再生具有功效的單/複方中藥。先初步對四物湯、生脈散、補中益氣湯與龜鹿二仙膠等四種複方，以及紅蔘、五味子、五味子素(schizandrin)、麥門冬、當歸、丹蔘、杜仲、何首烏、三七水萃液、三七皂苷、三七衍生物 QFA-15、人蔘水萃液、人蔘皂苷 Rb1、Rg1、Re、Rh-2、升麻成份 Cimifugin 及 Isoferulic acid 等十八種單方進行功效篩選。結果發現對血管內皮細胞有促進生長或分化的中藥包括有四物湯、補中益氣湯、五味子、人蔘皂苷 Rb1 及三七，反之有抑制作用者有生脈散、紅蔘、麥門冬、升麻成份 Cimifugin 及 Isoferulic acid；對神經幹細胞有促進生長或分化的中藥包括有龜鹿二仙膠、四物湯、生脈散、人蔘皂苷 Rh-2、三七水萃液、三七皂苷及三七衍生物 QFA-15。因此我們針對作用功效較明顯的三七、人蔘及升麻中所純化之特定成分，進一步探討其分子藥理研究以深入剖析其作用機制。（詳述於後）

利用人類造血幹細胞生長分化之培養系統，篩選出對成人血球單核細胞趨於血管內皮前驅細胞分化有促進效用之中藥或其衍生物

於本實驗室中已建立由成體周邊血單核球細胞中，培養分化出類血管內皮前驅細胞，此類細胞會貼附於覆有動物膠(gelatin)的培養皿上並形成細胞群落，同時可表現 Sox-2, Rex-1 及 Oct-4 等前驅細胞之特有基因。也會表現 CD31, eNOS, VE-cadherin, vWF, Flt-1 及 KDR 等內皮細胞之特有基因，此外也可在 Matrigel 半固態膠質培養基中形成類似微血管的三維空間結構。因此本培養分化系統可作為血管內皮前驅細胞藥物的篩選平台。如圖一所示，分別將四種不同的中藥純化成份，包括三七皂苷、人蔘皂苷 Rh-2 及升麻成份中的 Cimifugin 及 Isoferulic acid 加入此血管內皮前驅細胞培養分化系統中，於第四天及第七天時記錄觀察細胞群落形成數量。結果發現低劑量(1 μg/ml)人蔘皂苷 Rh-2 及高劑量(5 μg/ml)三七皂苷均有促進成體血管內皮前驅細胞群落數量增加之功效。然而 Cimifugin 及 Isoferulic acid 反而會造成血管內皮前驅細胞群落數量減少。以 RT-PCR 分析發現三七皂苷處理後可促進血管內皮前驅細胞的 KDR 及 VE-cadherin 的基因表達量增加，前驅細胞性基因 IGF 及 Sox-2 的表現量則會下降(圖二)。由此結果推測三七皂苷及人蔘皂苷 Rh-2 均具有促進成體幹細胞分化成為血管內皮前驅細胞之功效，然而 Cimifugin 及 Isoferulic acid 卻會抑制此分化現象。

於本實驗室的另外一個系統中，由脂肪間葉幹細胞所分化而成的內皮細胞，可表現內皮細胞之特有基因，於 Matrigel 半固態膠質培養基中亦可形成類似微血管的三維空間結構。同時因此本培養系統可作為血管內皮成熟細胞藥物的篩選平台。如圖三所示，人蔘皂苷 Rh-2(1 μg/ml)、三七皂苷(5 μg/ml)、Isoferulic acid(5 μg/ml)及 Cimifugin(5 μg/ml)都具有促進成熟血管內皮細胞形成微管狀結構之功效。

總結本項研究目標結果，三七皂苷及人蔘皂苷 Rh-2 都同時可促進造血幹細胞分化成為血管內皮前驅細胞及促進成熟內皮細胞參與血管生成之功效；而升麻成分中的 Cimifugin 及 Isoferulic acid 則只有促進成熟內皮細胞參與血管生成之功效。

利用間葉幹細胞生長分化之培養系統，篩選出對間葉幹細胞趨於神經前驅細胞分化有促

進效用之中藥或其衍生物

探討中藥成份對間葉幹細胞的影響，將四物湯、生脈散及三七等單、複方中藥進行高溫水萃後，加入與臍帶間葉幹細胞共同培養以研究這些水萃液對細胞生長複製的影響。如圖四所示，低劑量的生脈散(100 μg/ml)、四物湯(100 μg/ml)以及高劑量的三七(250 μg/ml)都有促進臍帶間葉幹細胞生長之功效。將臍帶間葉幹細胞培養於神經分化培養基 NC210 中時，可誘導臍帶間葉幹細胞分化成為神經前驅細胞，但是也同時會造成細胞大量死亡。如圖五所示，生脈散、四物湯以及三七水萃液都可減少細胞死亡使得細胞可持續複製；另一方面以 RT-PCR 檢測神經性基因的表達變化(圖六)， 結果發現加入生脈散、四物湯及三七後仍可維持神經前驅細胞表達 NFM 神經性基因之特徵，但是只有三七可進一步加強 NCAM 的基因表達量。由這些結果可推論生脈散、四物湯及三七都可促進臍帶間葉幹細胞的生長，維持神經前驅細胞生長複製能力及分化特性；此外三七尚可進一步促進 NCAM 神經性基因之表達量。

進一步探討中藥純化成份對神經前驅細胞分化的影響，分別將三七皂苷、人蔘皂苷Rh-2及升麻成份中的Cimifugin與Isoferulic acid加入NC210 分化培養基中以誘導臍帶間葉幹細胞分化。結果如圖七所示，三七皂苷於中、高劑量時均可明顯加強神經前驅細胞性基因SOX-2、神經細胞性基因NFM及神經膠質細胞性基因GFAP的表現，其他如NSE、nestin及MAP-2 等基因都無明顯增減差異。而人蔘皂苷Rh-2則是於低劑量(1 μg/ml)時對NCAM及NFM的基因表達有促進作用，而於中劑量(0.2 μg/ml)及高劑量(5 μg/ml)時對神經前驅細胞性基因Sox-2 的基因表達有加強作用。升麻成份中的Cimifugin則於低、中、高劑量時分別有加強NFM, GFAP及Sox-2 基因的表達量；而Isoferulic acid只有在中劑量時才有強Sox-2 基因表達量的功效。但是值得注意的是除了Isoferulic acid之外，其他三種中藥純化物成份於高劑量時都會抑制NCAM的基因表達量。

總結本項研究目標結果可得知，三七水萃液可維持神經前驅細胞生長複製能力及分化特性，也可進一步加強NCAM基因之表達量；進一步用高度純化的三七皂苷測試其功效時，發現三七皂苷可明顯加強神經發育前期的細胞特徵(如Sox-2)，但是在中劑量時卻會誘導細胞趨於神經膠狀細胞分化(如GFAP基因表達量增加)。另外同屬於皂苷類的人蔘純化物Rh-2，也有加強神經發育前期的細胞特徵，但是卻不會誘導細胞趨於神經膠狀細胞分化。升麻成份中的Cimifugin於不同劑量時所影響的神經性基因都不相同，Isoferulic acid雖然會增加前驅細胞特徵(如SOX-2)，但是也降低了神經細胞特徵(如NFM及nestin基因表達量被抑制)，因此升麻純化物對神經細胞分化的影響仍待更多的研究才能有較明確的結論。此外，這四種中藥純化物成份都可能會改變細胞間的交互作用(例如影響NCAM基因的表達量)，但是也同時都對成熟性神經細胞基因 (例如MAP-2) 的基因表達量沒有促進的效果。由上述結果推論三七皂苷主要功能是作用於早期的神經分化過程，而晚期的神經分化過程則較不易受到三七皂苷的影響。

解析中藥或其衍生物於神經前驅細胞分化或增殖之影響

由上述研究結果已得知三七水萃液及三七皂苷對成體間葉幹細胞的神經分化潛能均有特定的促進功效。因此我們進一步探討三七衍生物 QFA-15 對成體間葉幹細胞的神經分化潛能之影響。未分化的頭皮間葉幹細胞於含有 10% FBS 的 maintain medium 中進行繼代培養時，除了會高量表現 nestin 及 GFAP 之外，其他如 NSE,NFM 及 NCAM 等神經細胞性基因則只能測得微量表達(圖八 C)；但是當改用 2%FBS 的低血清培養基進行繼代培養

時，發現會降低原本高量表現 nestin 及 GFAP 但卻會促進 NCAM 基因大量表達，由此結果可推論成體間葉幹細胞於較差環境中可能會改變細胞間交互作用及降低神經分化潛能。於2%FBS的低血清培養基中加入QFA-15進行繼代培養時，則發現會促進nestin, NSE, NFM, NCAM 及 GFAP 基因的表現，觀察細胞形態時也可發現當加入 QFA-15 會使得細胞由原本的紡錘狀改變成為多角狀細胞(圖八 B)，此外加入 QFA-15 並不會明顯降低細胞的於 2%FBS 低血清培養基中的複製能力(圖八 A)。根據此結果可推論 QFA-15 可促進成體間葉幹細胞的神經分化潛能同時可維持其細胞複製特性。

探討血管內皮前驅細胞受到三七皂苷刺激後，與調節細胞分化相關的細胞激素、細胞表面分子或其他調控相關蛋白之變化

由前述研究成果已得知三七皂苷同時可促進造血幹細胞分化成為血管內皮前驅細胞及促進成熟內皮細胞參與血管生成之功效，因此進一步探討三七皂苷作用血管內皮前驅細胞後，所可能影響的自泌/旁泌性調控機制(autocrine/paracrine mechanism)。收集成體周邊血單核球細胞於分化成為血管內皮前驅細胞第四天到第七天時的細胞培養液，再以細胞激素抗體微陣列(cytokine antibody array)檢測血管內皮前驅細胞分泌至培養液中的細胞激素種類。結果如圖九所示，血管內皮前驅細胞受到三七皂苷刺激後，如VEGF, VEGF-D及Angiopoietin-2 等細胞激素分泌量並沒有明顯改變，但是其他直接與血管生成有關的細胞激素例如Angiogenin, HGF, IGF-1, PDGF及PARC都有明顯促進分泌的現象; 其他與發炎性趨化調節/血管生成相關的免疫細胞激素，包括ENA-78(CXCL5), Eotaxin(CCL11), Eotaxin-3(CCL26), MCP-1(CCL-2), MCP-4(CCL-13), NAP-2(CXCL7), IL-1α及IL-6 也有明顯加強分泌的現象。

進一步利用定量PCR陣列探討三七皂苷對血管內皮前驅細胞的血管生成調控基因表達之影響。如圖十所示，在受到三七皂苷刺激後Leptin, Plasminogen, Thrombospondin 1, Thrombospondin 2 等基因會大量表現(圖十A, 上圖), 包括細胞激素(如Angiopoietin -1&-2, Angiopoietin-like 3, CXCL-4, -5, -6&-9, FGF-1, VEGF-C&-D, IL-1β, neurite growth-promoting factor 2、(TGF-α)、細胞接受器（EDG1, Ephrin-A3, FGFR3, KDR, TGF-β R1), 轉錄因子(如HAND2), VE-cadherin, Jagged 1, Plexin domain containing 1, TIMP-3 等基因也會提高表現量(圖十A, 下圖)。 但是如CXCL10, Endoglin, HGF, HIF1α, IFN-γ, IL6, Integrin αV, MMP9, Neuropilin 2, Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 等基因在受到三七皂苷刺激後反而會下降(圖十B)。

於本研究中發現血管內皮前驅細胞在受到三七皂苷刺激後，在細胞激素蛋白陣列及定量 PCR 陣列實驗中均可觀察到 ENA-78 (CXCL-5)的基因及蛋白表現量會提高。ENA-78 已知會參與發炎驅化反應及血管新生作用(Koch AE et al)，因此未來研究值得對三七皂苷調控 ENA-78 的藥理機制、三七皂苷於活體中是否對 ENA-78 會引發相同的調控反應，以及 ENA-78 高量表現後所引發的生理反應做更進一步的探討。

探討神經前驅細胞受到中藥或其三七衍生物QFA-15 刺激後，與調節細胞分化相關的細胞激素、細胞表面分子或其他調控相關蛋白之變化

由前述研究成果已得知 QFA-15 可促進成體頭皮間葉幹細胞的神經分化潛能同時可維持其細胞複製特性。近一步探討三七衍生物 QFA15 作用於成體頭皮間葉幹細胞後，所可能影響的自泌/旁泌性調控機制(autocrine/paracrine mechanism)。分別收集頭皮間葉幹細胞

生長於 10% FBS 培養基、2%培養基及在 2%培養基中加入 QFA15 刺激後三天的細胞培養液，再以細胞激素抗體微陣列分析細胞激素表現量之表現。結果如圖十一(A)所示，在以(2%培養基+QFA15)培養條件下，會進一步加強刺激頭皮間葉幹細胞大量分泌如 Acrp30 (adiponectin), Nerve growth factor(NGF), Betacellulin (BTC), I-309 (CCL-1), Insulin-like growth factor binding proteins 4 (IGFBP-4), Interleukin 6 (IL-6), Leptin 及 Neurotrophin-3 (NT-3)等細胞激素；當降低培養基的血清濃度時，如 Angiogenin, Angiopoietin-2, Brain-derived neurotrophic factor(BDNF), Bone morphogenetic proteins –4,-6(BMP-4, -6), Ciliary neuronotrophic factor(CNTF), Epidermal growth factor(EGF), hepatocyte growth factor(HGF), Interferon-inducible T cell Alpha Chemoattractant (I-TAC, CXCL-11), Lymphotactin, Pulmonary and Activation-Regulated Chemokine (PARC, CCL-18), Platelet-derived Growth Factor BB (PDGF-BB), Regulated upon activation normal T-cell expressed and presumably secreted (RANTES, CCL-5), Stem Call Factor (SCF)及 Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2)等細胞激素的表現量會下降，但是如果用 QFA15 刺激時則可提高上述細胞激素的表現量(圖十一 B)；反之，唯有在生長於高血清培養基中才會大量表現，在低血清培養基及 QFA15 刺激後表現量會下降的細胞激素包括有 Epidermal growth factor-receptor (EGF-R), Epithelial neutrophil-activating protein 78 (ENA-78, CXCL-5), Fas/TNFRSF6, Fibroblast growth factor-4 ,-9 (FGF-4, -9), Granulocyte-colony Stimulating Factor (G-CSF), Glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor (GITR), GITR ligand, Growth Related Oncogene (GRO), Insulin-like growth factor binding protein –3,-6 (IGFBP-3, -6), Insulin like growth factor I soluble receptor (IGF-I SR), Thrombopoietin (TPO)及 Urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) (詳見圖十一 C)。

進一步利用定量PCR陣列探討QFA15 對神經細胞功能調控基因表達之影響。如圖十二所示，在受到QFA15 刺激後ACCN1, KCNA3, KCNA5, KCNN2, KCNS1, SCN1B, SCN2B, SCN4A, SLC18A1, SLC1A2 等基因會大量表現(圖十二 A)。但是如 CACNA1C, CACNB2, CLCN1, CLCN3, CLCN4, KCNG1, KCNMB1, SCN1A, SCN2A2, SCN5A 等基因在受到 QFA1 刺激後反而會下降(圖十二 B)。

結論與建議

人參皂苷依照其苷元的化學結構可分為三類：(1)人參二醇系皂苷，即以20(S)-protopanaxadiol為苷元的人參皂苷: 例如本計劃中的人參皂苷-Rb1，及紅蔘中所含有的-Rg3、Rh2、Rs1 及Rs2。目前已知Rb1 的主要生理功能及藥效為促進神經纖維形成及維持其功能. 防治性功能減退鎮靜，鎮痛，治療失眠，退熱，促進免疫功能，促進膽固醇分解，擴張血管，抗動脈硬化，抗糖尿病促進記憶。(2)人參三醇系皂苷，即以20(S)-protopanaxatriol為苷元的人參皂苷: 例如本計劃中的人參皂苷-Re、-Rg1。目前已知Re的主要生理功能及藥效為抑制大腦皮層過度興奮，促進DNA, RNA合成。Rg的主要生理功能及藥效為興奮中樞神經，預防性功能衰退，促進記憶，增強免疫力，擴張血管，降血壓，抗血栓　(3) 以齊墩果酸(oleanolic acid)為苷元的人參皂苷-Ro。目前的科學研究已發現人參皂苷Rg1、Re物質可強化心臟之收縮舒張力,改善心衰竭之狀態,並且可使血管平滑肌舒張,刺激血流循環作用。亦可會刺激內皮細胞釋放一氧化氮，使其擴張血管。此外已知人蔘皂苷Rh-2 (ginsenoside Rh-2)有抑制腫瘤細胞生長(Yun and Shibata 2003)，促進肝腫瘤細胞株趨向良性分化(Zeng and Tu 2004)。此外Rh-2 亦可拮抗NMDA受體引起的神經細胞死亡，因此有可能成為治療神經退化的藥物(Lee, Kim et al. 2006)。於本研究計畫中則發現，Rh-2 可促進造血幹細胞轉化成為血管內皮前驅細胞及促進成熟內皮細胞參與血管生成之功效；Rh-2 亦有加強神經發育前期細胞的功效。由上述成果可得知， 以本血管神經藥物篩選平台所發現的人參皂苷藥效，與人參皂苷作用於動物活體的藥效可相互驗證；同時本篩選平台尚可更進一步地探討其作用於特定細胞的分子藥理機制。

三七(*Radix Notoginseng*)所含的主要有效成分為三七皂苷(notoginsenoside)，目前已知三七皂苷具有抑制血小板黏附聚集的作用，因此於動物實驗中具有防止血栓及促進微循環之功效(Wang, Xu et al. 2004)；三七於APO基因缺損小鼠活體中亦可調控其血脂量(Wen, Xu et al. 2005)。於本研究計畫中則發現，三七皂苷具有促進造血幹細胞轉化成為血管內皮前驅細胞及促進成熟內皮細胞參與血管生成之功效；三七皂苷可加強血管內皮前驅細胞分泌如Angiogenin, HGF, IGF-1, PDGF及PlGF等血管生成相關激素，此外三七皂苷也會調控血管內皮前驅細胞所分泌的發炎/免疫相關激素(包括ENA-78, Eotaxin, Eotaxin-3, NAP-2, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, MCP-1, MCP-3, MCP-4)。三七皂苷可明顯加強神經發育前期的細胞特徵(如Sox-2)，但是在中劑量時卻會誘導細胞趨於神經膠狀細胞分化(如GFAP基因表達量增加)。

三七成份衍生物QFA-15亦可促進成體間葉幹細胞的神經分化潛能同時可維持其細胞複製特性。成體間葉幹細胞在收到QFA-15刺激後會提高神經生長分化相關調控激素蛋白的表現量(例如: NGF, NT-3, BDNF, CNTF及EGF)，但是也會降低如EGR-R, FGF-4, FGF-9等激素蛋白的表現量。

升麻(Cimicifuga)性微寒，味甘辛微苦。其功能為散風解毒，升陽，透斑疹。升麻成分中的異阿魏酸（isoferulic acid）具有降體溫、解熱、鎮痛及抗浮腫作用。升麻素(cimifugin)具有中樞神經抑制作用。於本計劃中則發現這兩種成分具有抑制血管內皮前驅細胞分化及促進成熟內皮細胞參與血管生成之功效。升麻素(cimifugin)具有抑制間葉幹細胞分化成神經細胞之作用。異阿魏酸對神經細胞分化的影響則未明。

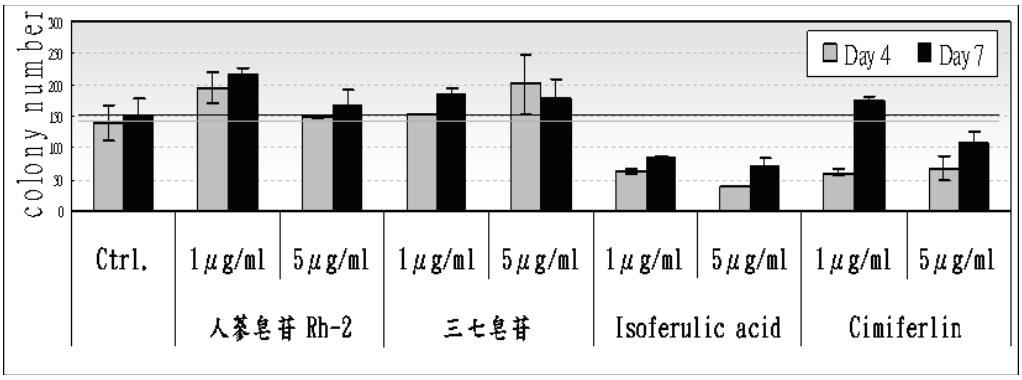
本計劃以人體正常組織幹原/前驅細胞為技術平台，篩選並鑑定對血管神經修復再生具有功效的單/複方中藥。共計對四種複方及十八種單方中藥完成其神經血管性細胞修復

再生的功效篩選。並針對其中功效較為顯著的三七、人蔘及升麻等成分進一步探討其分子藥理機制。由本細胞藥物篩選平台所鑑定的中藥功效，可以和動物活體的生理藥效得到相互驗證，又可進一步獲得藥物對特定細胞的基因或蛋白表達的控制影響等資訊。此外，相較於動物活體的藥物篩選平台，本計劃中所執行的細胞級血管神經藥物篩選平台，實驗重複執行及再現性較高，也具有發展成為高通量(high-throughput)篩選平台的潛能。因此值得進一步投入成為中藥有效成分的篩選平台。

參考文獻

1. 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.
2. 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.
3. Hisha H. Yamada H. Sakurai MH. Kiyohara H. Li Y. Yu C. Takemoto N. Kawamura H. Yamaura K. Shinohara S. Komatsu Y. Aburada M. Ikehara S (1997) Isolation and identification of hematopoietic stem cell-stimulating substances from Kampo (Japanese herbal) medicine, Juzen-taiho-to. *Blood*. 90(3): 1022-30.
4. Koch AE, Volin MV, Woods JM, Kunkel SL, Connors MA, Harlow LA, Woodruff DC, Burdick MD, Strieter RM. (2001) Regulation of angiogenesis by the C-X-C chemokines interleukin-8 and epithelial neutrophil activating peptide 78 in the rheumatoid joint. *Arthritis Rheum.* 44(1):31-40
5. Lee, E., S. Kim, et al. (2006). "20(S)-ginsenoside Rh2, a newly identified active ingredient of ginseng, inhibits NMDA receptors in cultured rat hippocampal neurons." *Eur J Pharmacol* 536(1-2): 69-77.
6. Wang, J., J. Xu, et al. (2004). "[Effect of Radix notoginseng saponins on platelet activating molecule expression and aggregation in patients with blood hyperviscosity syndrome]." Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi 24(4): 312-6.
7. Wen, C., H. Xu, et al. (2005). "[Effect of drugs for promoting blood circulation on blood lipids and inflammatory reaction of atherosclerotic plaques in ApoE gene deficiency mice]." Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi 25(4): 345-9.
8. Yun, T. K. and S. Shibata (2003). "Experimental and epidemiological evidence on non-organ specific cancer preventive effect of Korean ginseng and identification of active compounds Chemistry and cancer preventing activities of ginseng saponins and some related triterpenoid compounds." Mutat Res 523-524: 63-74.
9. Zeng, X. L. and Z. G. Tu (2004). "[Induction of differentiation by ginsenoside Rh2 in hepatocarcinoma cell SMMC-7721]." Ai Zheng 23(8): 879-84.

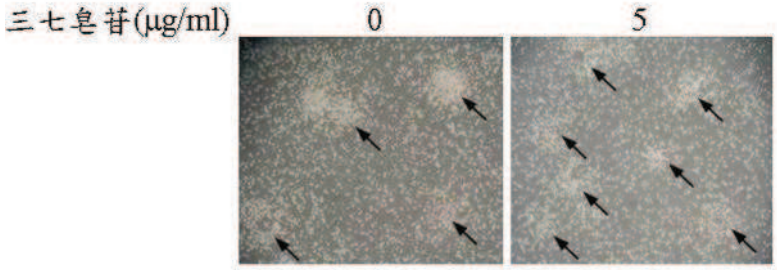
附圖及附表



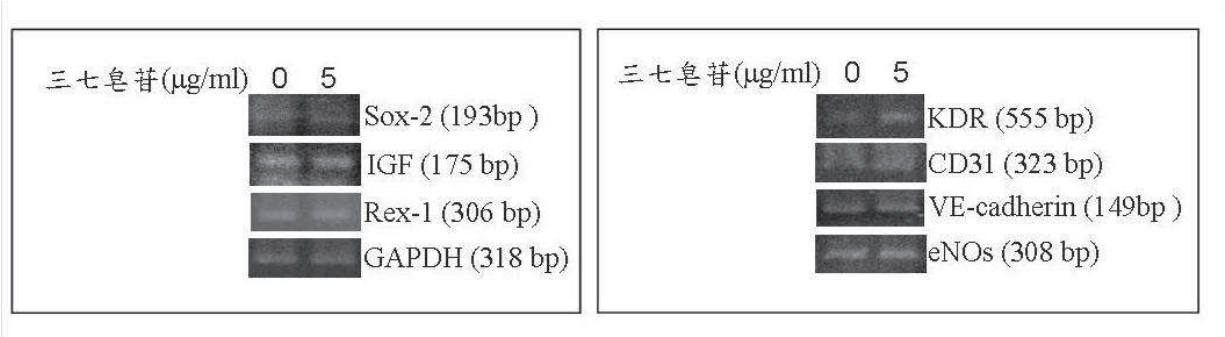
圖一、中藥成分對內皮前驅細胞的影響功效－細胞群落數量試驗

純化成人周邊血單核球後，利用內皮細胞培養基使其分化成為血管內皮前驅細胞，在培養的第一天同時分別加入各種定量的植物性中藥，逐日觀察並分別於第四天及第七天時計算血管內皮前驅細胞的群落形成數量。

(A)

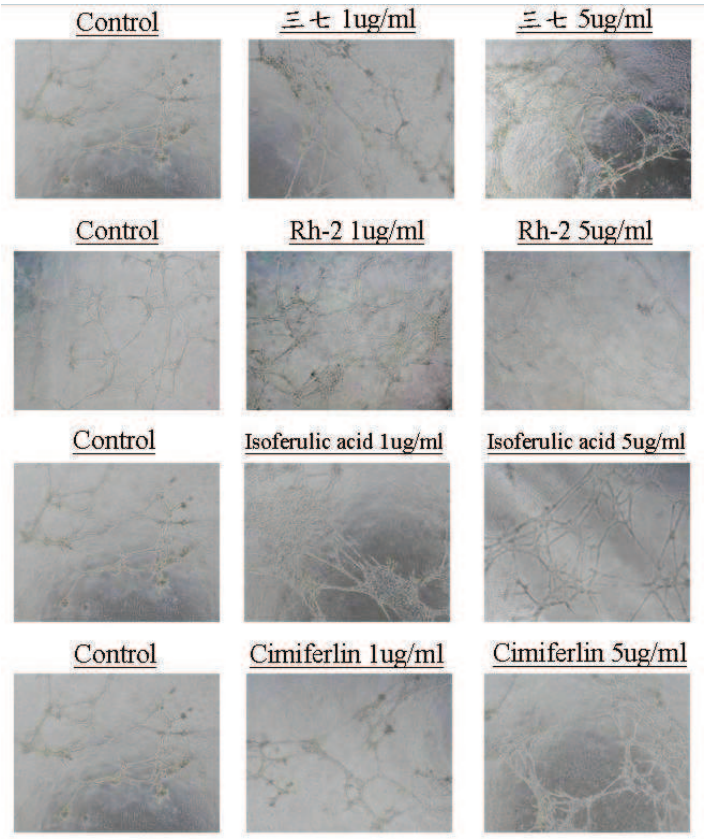


(B)



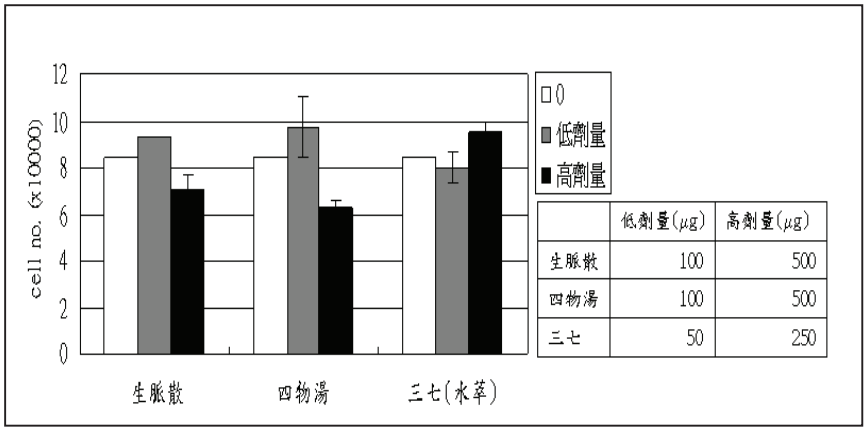
圖二、三七皂苷對內皮前驅細胞生長分化的影響功效

純化成人周邊血單核球後，利用內皮細胞培養基使其分化成為血管內皮前驅細胞，在培養的第一天加入三七皂苷，第七天時照相記錄細胞群落分布疏密狀態(圖 A，箭頭所指即為內皮前驅細胞群落)，同時收取細胞純化 RNA 後，以 RT-PCR 分析比較幹原/前驅細胞的早期性基因(B 圖左)及血管內皮細胞性基因(B 圖右)。



圖三、中藥成分對成熟內皮細胞的影響功效－微管形成試驗

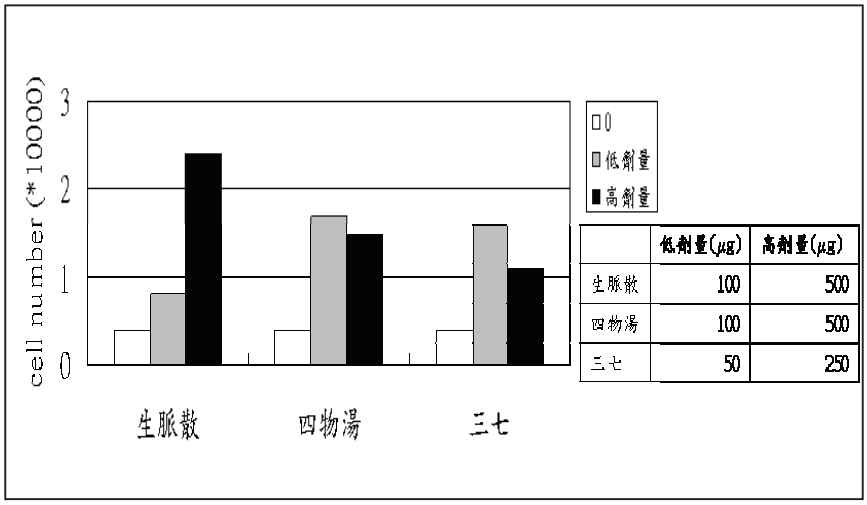
使用由脂肪間葉幹細胞分化而成的血管內皮細胞與 Matrigel 培養，分別加入高低濃度的中藥成分，內皮細胞在此半固態培養基中會形成三維空間的微管結構。以倒立顯微鏡逐日觀察紀錄微管形成狀態及穩定度。



	低劑量(μg)	高劑量(μg)
生脈散	100	500
四物湯	100	500
三七	50	250

圖四、中藥對臍帶間葉幹細胞生長增殖的影響

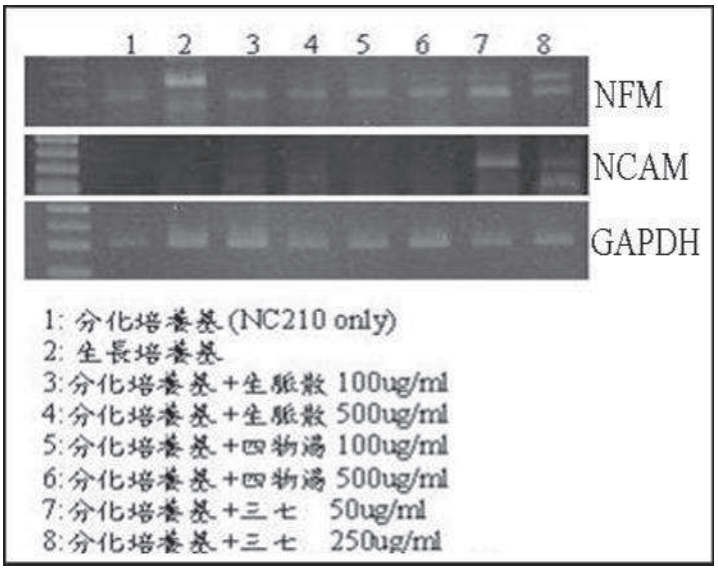
分離臍帶間葉幹細胞，經多代培養並鑑定確認其臍帶間葉幹細胞特徵後。分別加入高低劑量之中藥水萃液培養後，收集細胞並計算細胞數量以比較中藥促進臍帶間葉幹細胞生長之功效。



	低劑量(μg)	高劑量(μg)
生脈散	100	500
四物湯	100	500
三七	50	250

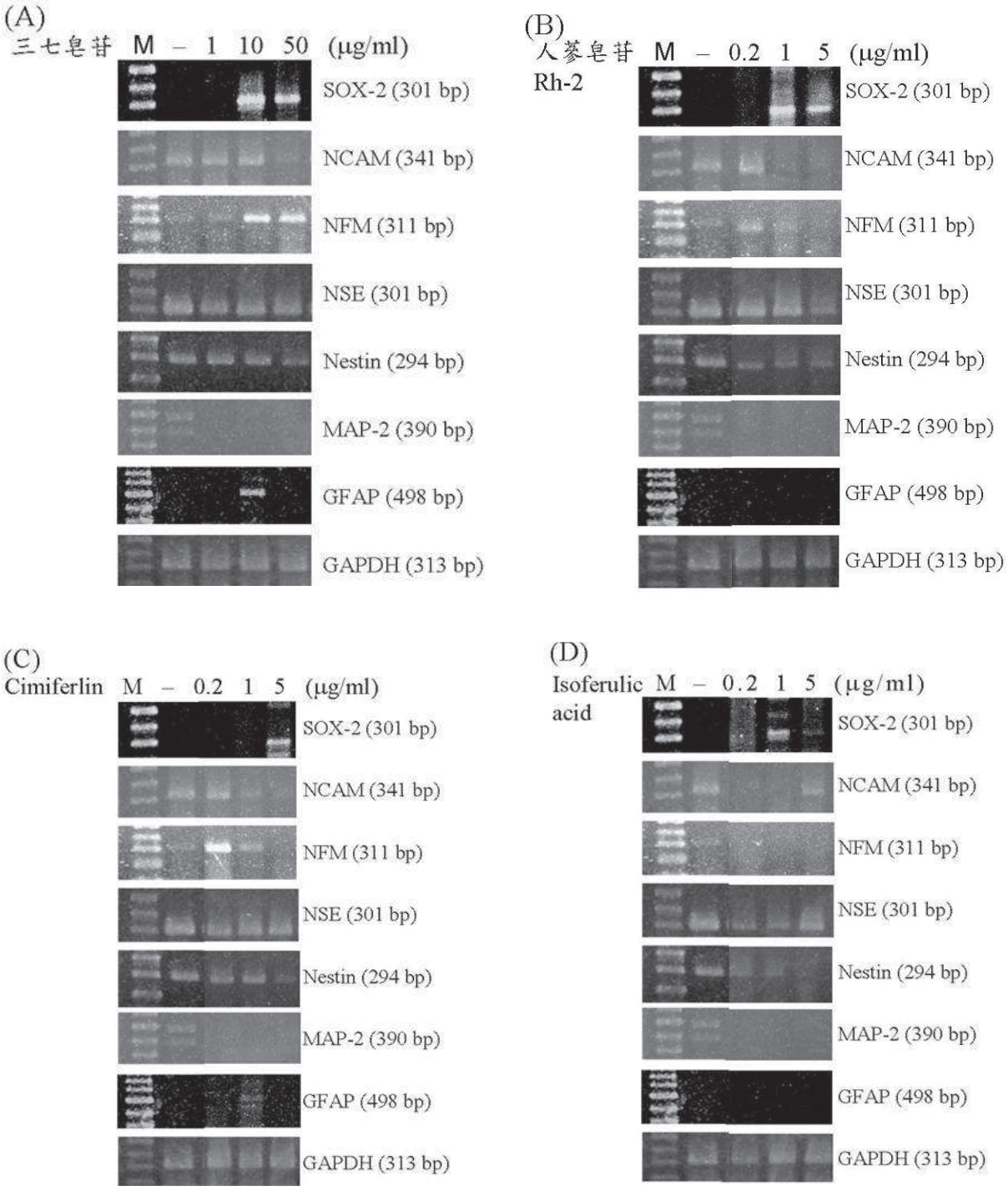
圖五、中藥對臍帶間葉幹細胞衍生之神經前驅細胞生長增殖的影響

使用神經分化培養基誘導臍帶間葉幹細胞分化成為神經前驅細胞後。分別加入高低劑量之中藥水萃液培養後，收集細胞並計算細胞數量以比較中藥促進神經前驅細胞生長之功效。



圖六、中藥對臍帶間葉幹細胞衍生之神經前驅細胞生長增殖的影響

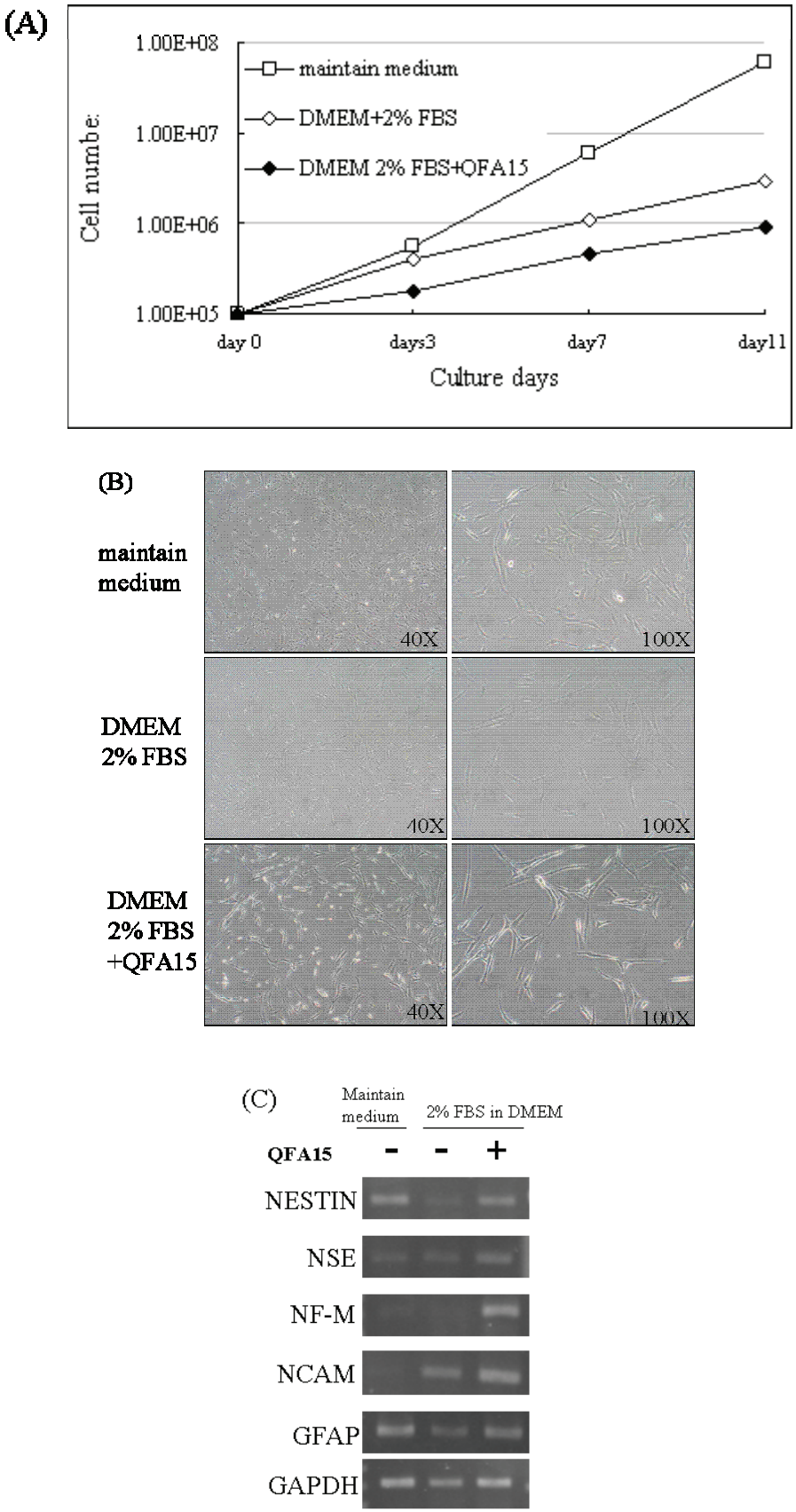
使用神經分化培養基誘導臍帶間葉幹細胞分化成為神經前驅細胞後。分別加入高低劑量之中藥水萃液培養後，收集細胞並計算細胞數量以比較中藥促進神經前驅細胞生長之功效



圖七、中藥成份對臍帶間葉幹細胞之神經分化潛能的影響

—神經性基因的表達差異

將臍帶間葉幹細胞培養於NC210 神經分化培養基中，同時分別加入不同劑量的三七皂苷(圖A）、人蔘皂苷Rh-2(圖B)、Cimifugin(圖C) 及 Isoferulic acid(圖D)培養三天後，收集所有的細胞，各取 $1*10^4$的細胞進行single cell RT-PCR分析其神經性基因的表達差異。所測試的gene包含神經前驅細胞性基因SOX-2、神經前驅及神經譜系細胞性基因NCAM、神經細胞性基因NFM, NSE及Nestin、成熟神經元細胞性基因MAP2 和神經膠質細胞性基因GFAP，GAPDH為internal control。

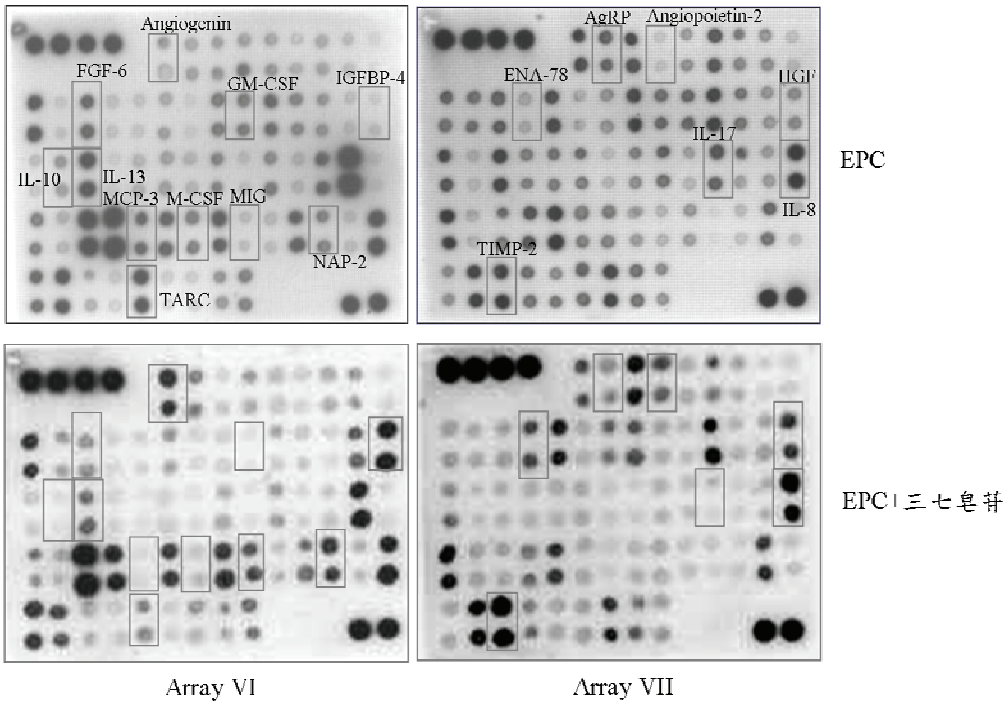


圖八、三七衍生物 QFA15 對頭皮間葉幹細胞之神經分化潛能的影響

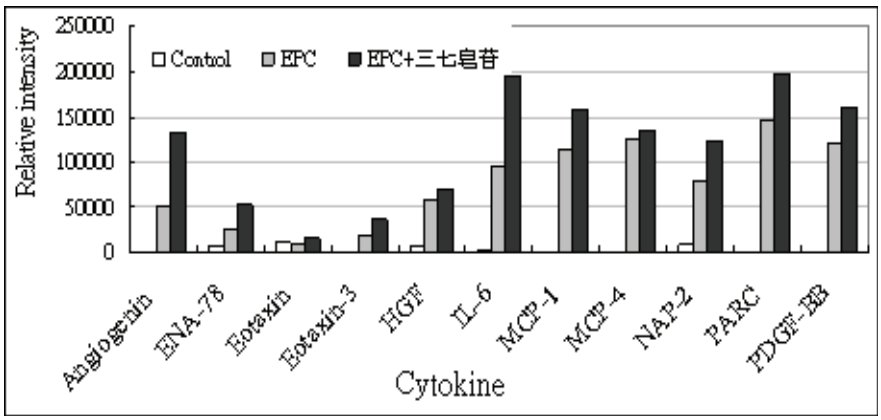
未分化的頭皮間葉幹細胞於 maintain medium 中進行繼代培養，欲測試三七衍生物 QFA15 的功效時則改於 2% FBS 的低血清培養基中培養。圖 A 為頭皮間葉幹細胞於三種培養基中的細胞生長曲線；圖 B 為頭皮間葉幹細胞於三種培養基中的細胞生長型態；圖 C 為分

別收取於三種培養基中生長的頭皮間葉幹細胞後，抽取 Total RNA 進行 RT-PCR 以分析神經性細胞基因的表達差異。

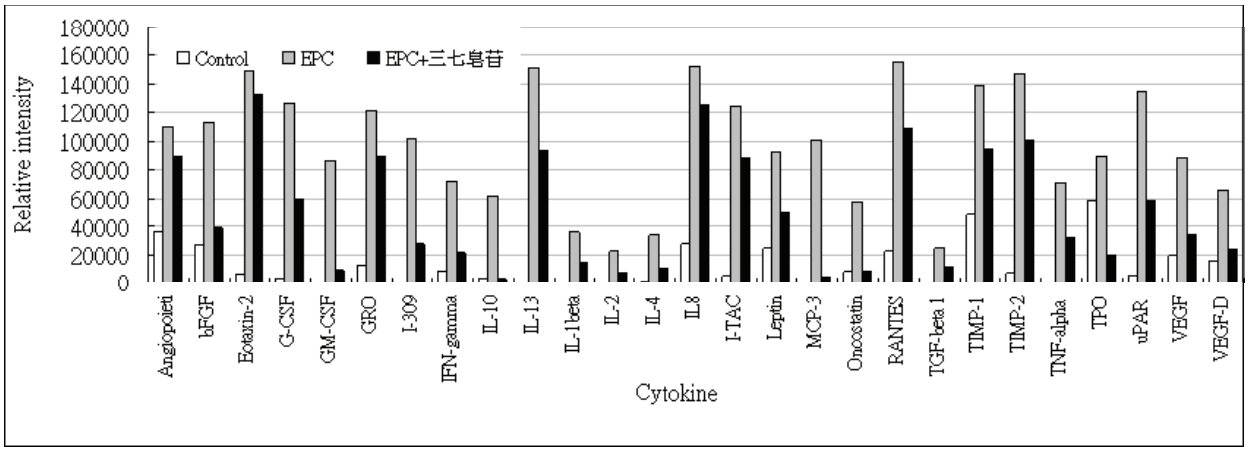
圖九(A)



圖九(B)



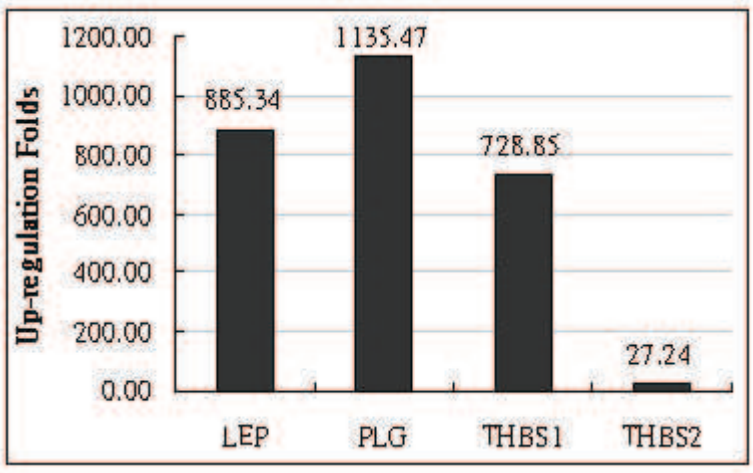
圖九(C)

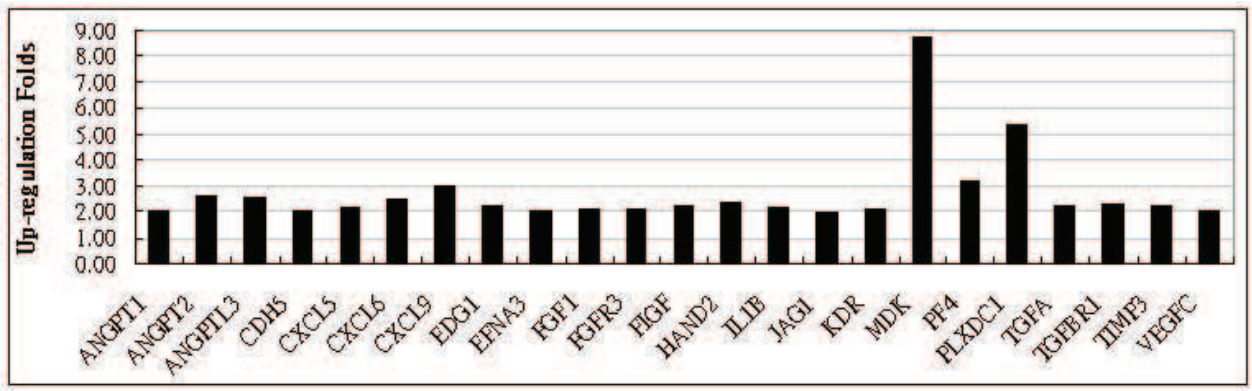


圖九、成體血管內皮前驅細胞受到三七皂苷刺激後，對血管生成相關細胞激素表現的影響

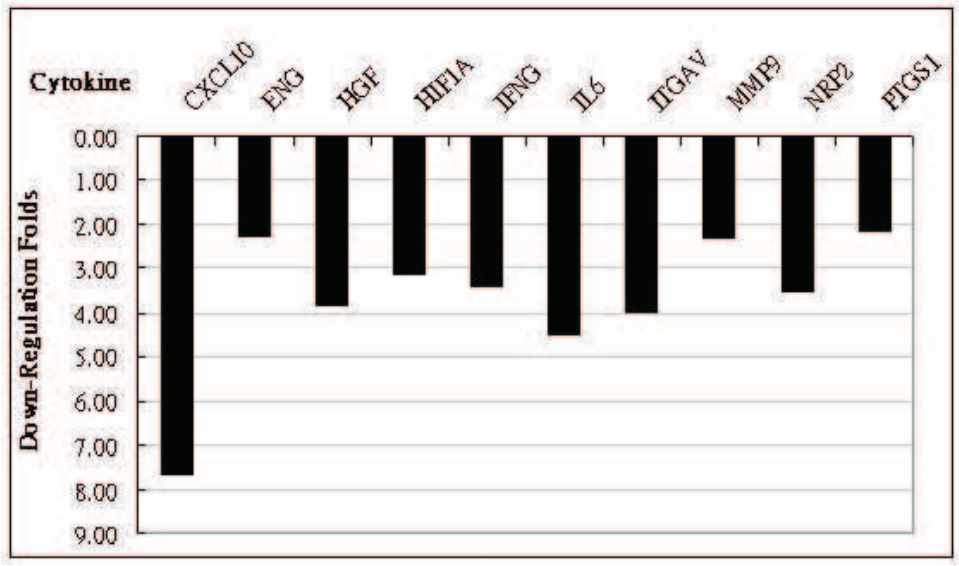
由成體周邊血單核球細胞中，培養分化出類血管內皮前驅細胞，收集第四天到第七天的細胞培養液，再以細胞激素抗體微陣列(cytokine antibody array)檢測類血管內皮前驅細胞分泌至培養液中的細胞激素種類圖(A)；圖(B)為血管內皮前驅細胞受到三七皂苷刺激後，會加強分泌的血管生成相關激素；圖(C)為血管內皮前驅細胞受到三七皂苷刺激後，分泌量變化不大或是反而降低的血管生成相關激素。控制組(control)是未曾養過細胞的培養基，因此在控制組中所測得的訊息強度應屬於來自於血清中的交互反應雜訊。

圖十(A)

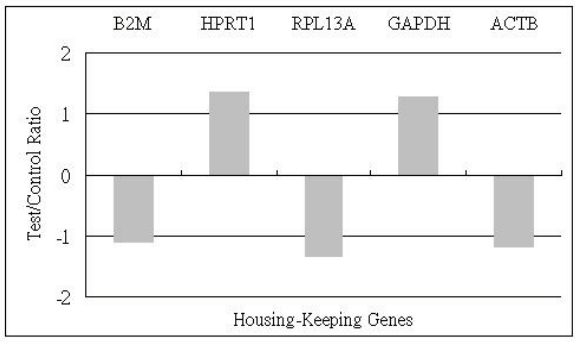


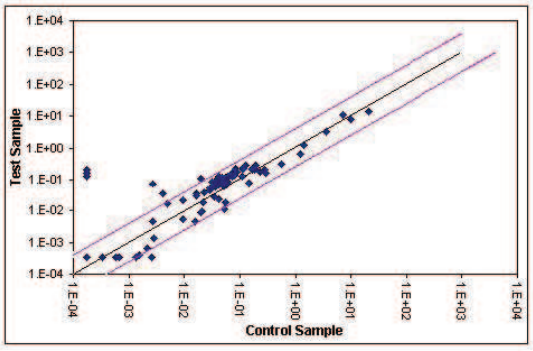


圖十(B)



圖十(C)





圖十、成體血管內皮前驅細胞受到三七皂苷刺激後，對血管生成調控機制有關的基因表現影響

由成體周邊血單核球細胞中，分離培養出類血管內皮前驅細胞後，收取經三七皂苷刺激培養(test組)，及未經處理(control組)的細胞並抽取RNA後，使用RT^2 Profiler PCR array system(SuperArray Bioscience)分析其血管生成調控機制相關的基因表達差異。圖(A)為三七皂苷處理後會增高表現量的基因；圖(B)為三七皂苷處理後會降低表現量的基因；圖(C)左為test組及control組的housekeeping基因表現比例，右圖為PCR array的Scatter plot.

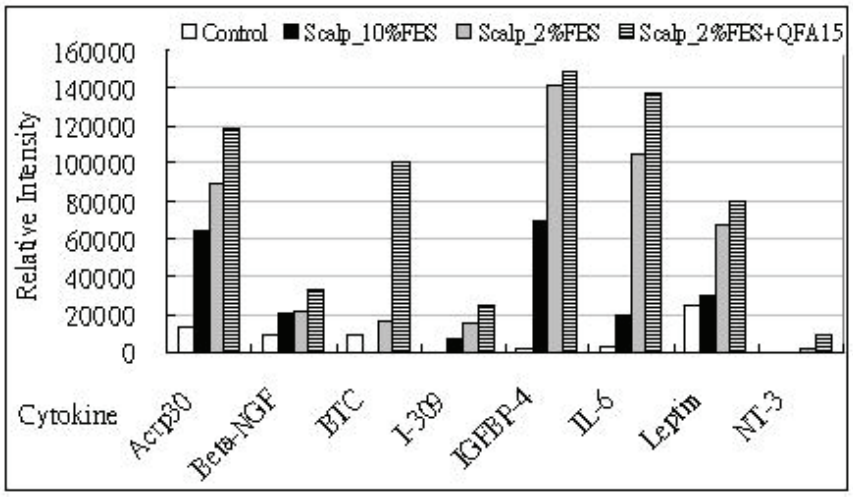
圖(A)中的基因名稱縮寫: LEP: Leptin(obesity homolog, mouse); PLG: Plasminogen; THBS1: Thrombospondin 1; THBS2: Thrombospondin 2; ANGPT: Angiopoietin; ANGPTL3:Angiopoietin-like 3; CDH5: Cadherin 5, type 2, VE-cadherin (vascular epithelium); CXCL: Chemokine (C-X-C motif) ligand; EDG1 :Endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 1; FNA3: Ephrin-A3; FGF: Fibroblast growth factor; FGFR: Fibroblast growth factor receptor 3 (achondroplasia, thanatophoric dwarfism); FIGF: C-fos induced growth factor (vascular endothelial growth factor D); HAND2: Heart and neural crest derivatives expressed 2; IL1B: Interleukin 1, beta; JAG1: Jagged 1 (Alagille syndrome); KDR: Kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase); MDK: Midkine (neurite

growth-promoting factor 2); PF4: Platelet factor 4 (chemokine (C-X-C motif) ligand 4); PLXDC1: Plexin domain containing 1; TGFA: Transforming growth factor, alpha; TGFBR1: Transforming growth factor, beta receptor I (activin A receptor type II-like kinase, 53kDa); TIMP3: TIMP metallopeptidase inhibitor 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudoinflammatory); VEGFC: Vascular endothelial growth factor C

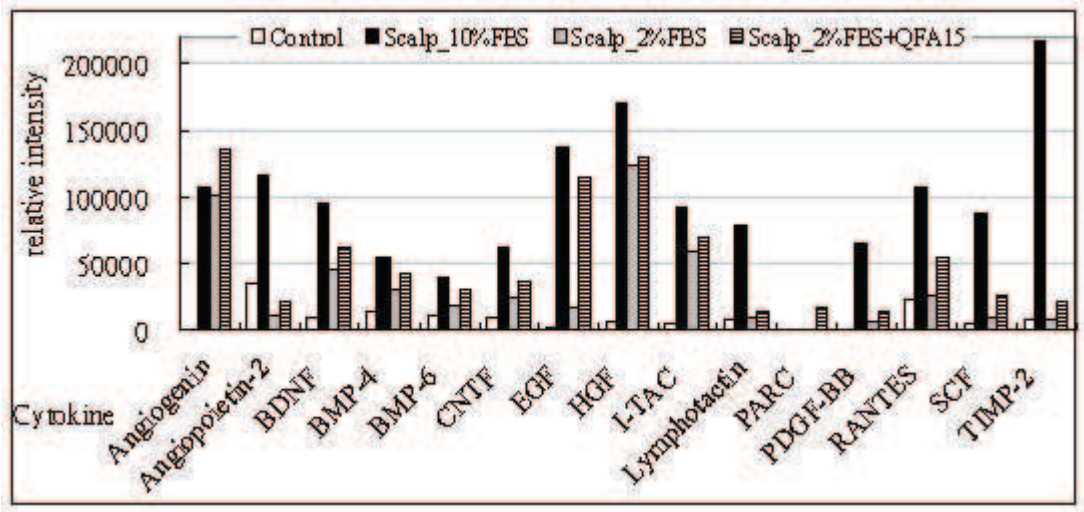
圖(B)中的基因名稱縮寫: CXCL10: Chemokine (C-X-C motif) ligand 10; ENG: Endoglin (Osler-Rendu-Weber syndrome 1); HGF: Hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor); HIF1A: Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor); IFNG: Interferon, gamma; IL6: Interleukin 6 (interferon, beta 2); ITGAV: Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51); MMP9: Matrix metallopeptidase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase); NRP2: Neuropilin 2; PTGS1: Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)

圖(C)中的基因名稱縮寫: B2M: Beta-2-microglobulin; HPRT1: Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Lesch-Nyhan syndrome); RPL13A: Ribosomal protein L13a; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; ACTB: Actin, beta

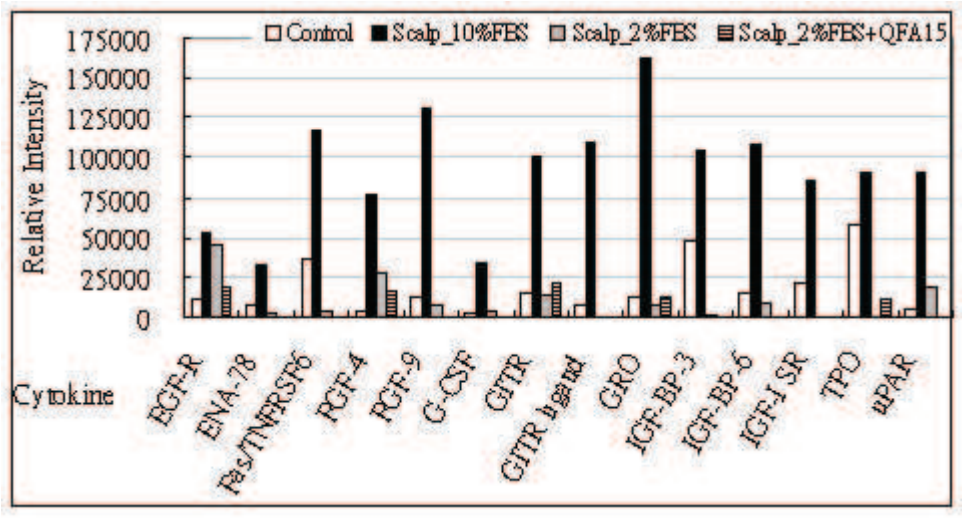
圖十一(A)



圖十一(B)



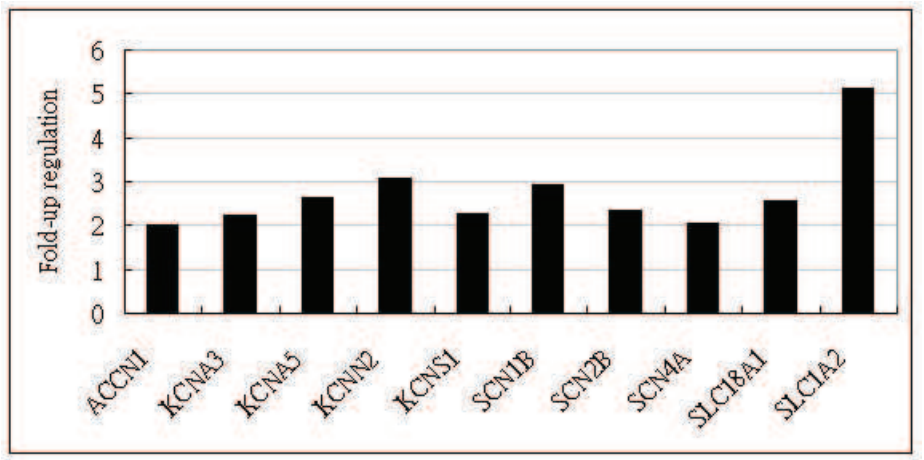
圖十一(C)



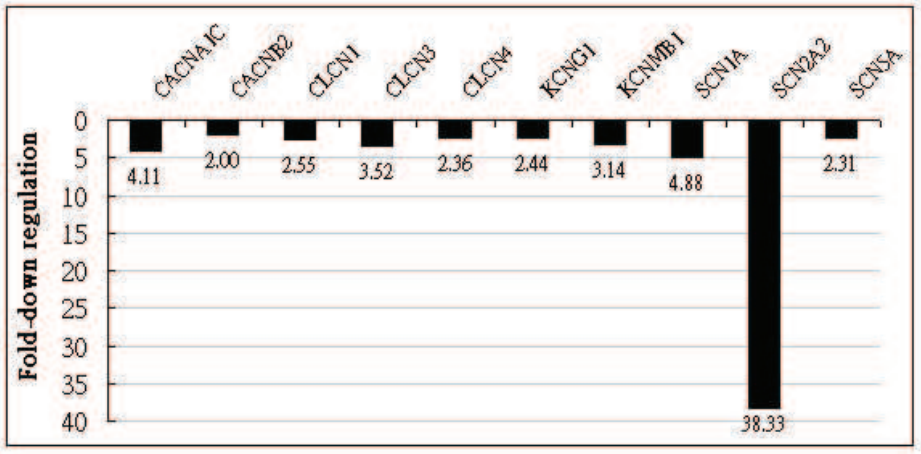
圖十一、成體頭皮間葉幹細胞受到三七衍生物 QFA15 刺激後，對細胞激素表現的影響

由成體頭皮組織中分離培養出間葉幹細胞後，以含有 10% FBS 的 maintain medium 進行繼代培養，欲測試三七衍生物 QFA15 的功效時則改成在 2% FBS 的低血清培養基中培養。收集細胞培養後三天的培養液，使用 protein array 分析其細胞激素表現之改變。控制組(control)是未曾養過細胞的培養基。圖(A)為加入 QFA15 後，會高其他組別的細胞激素；圖(B)為由 10% FBS 改成 2% FBS 培養基培養時，間葉幹細胞會降低表現，但是在加入 QFA15 後又會昇高的細胞激素；圖(C)為 10% FBS 的 maintain medium 進行培養時會高量表現，但是改成 2% FBS 培養基及加入 QFA15 後，會被抑制表現的細胞激素。

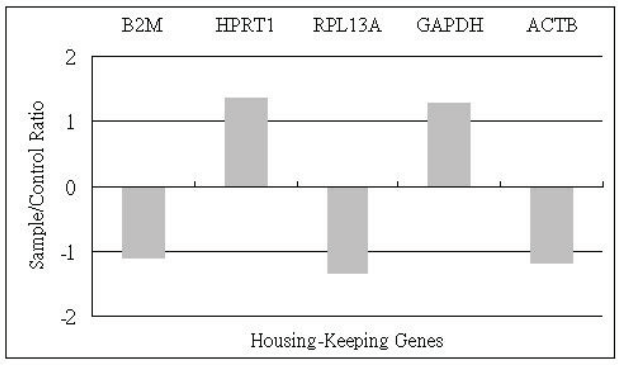
圖十二(A)

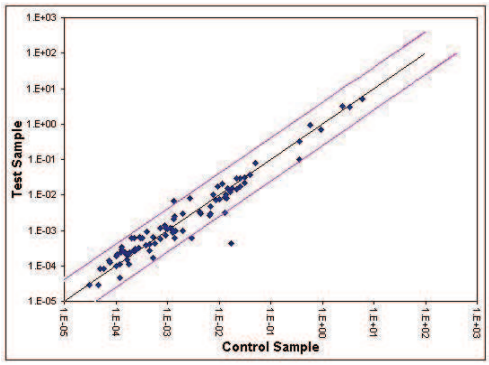


圖十二(B)



圖十二(C)





圖十二、成體頭皮間葉幹細胞受到三七衍生物 QFA15 刺激後，對神經細胞功能調控機制有關的基因表現影響

由成體頭皮組織中分離培養出間葉幹細胞後，欲測試三七衍生物QFA15 在 2% FBS低血清培養基中對神經功能調控機制的影響。取經過三七衍生物QFA15 刺激培養(test組)，及未經處理(control組)的細胞並抽取RNA後，使用 RT^2 Profiler PCR array system (SuperArray Bioscience)分析其神經細胞功能調控機制相關的基因表達差異性。圖(A)為三七衍生物QFA15 處理後會增高表現量的基因；圖(B)為三七衍生物QFA15 處理後會降低表現量的基因；圖(C)左為test組及control組的housekeeping基因表現比例，右圖為PCR array的Scatter plot.

圖(A)及(B)中的基因名稱縮寫: ACCN: Amiloride-sensitive cation channel; KCNA3: Potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily; KCNN: Potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N; KCNS: Potassium voltage-gated channel, delayed-rectifier, subfamily S; SCN: Sodium channel, voltage-gated; SLC18:Solute carrier family 18 (vesicular monoamine); SLC1: Solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter); CACNA1C:Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit; CACNB2: Calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit; CLCN1:Chloride channel 1; KCNG: Potassium voltage-gated channel, subfamily G; KCNMB1: Potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 1.

圖(C)中的基因名稱縮寫: B2M: Beta-2-microglobulin; HPRT1: Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Lesch-Nyhan syndrome); RPL13A: Ribosomal protein L13a; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; ACTB: Actin, beta