

中華醫事科技大學生物醫學研究所



探討Smad路徑及上皮-間質轉換在山藥逆  
轉腎間質細胞纖維化之機制

***Dioscorea alata* L. reverses renal interstitial cellular  
fibrosis by regulating Smad- and epithelial-  
mesenchymal transition related signaling pathway**

研究生：張珊瑜

指導教授：楊堉麟 博士

中華民國 九十九 年 七 月

中華醫事科技大學  
碩士學位考試委員會審定書

本校 生物醫學研究所 碩士班 張珊瑜 君所提論文

探討 Smad 路徑及上皮-間質轉換在山藥逆轉

腎間質細胞纖維化之機制

合於碩士資格水準，業經本委員會評審認可。

考試委員：楊 堉 麟 博士

中華醫事科技大學/生物科技系 教授

楊堉麟

張 榮 賢 博士

國立中山大學/生醫所 教授

張榮賢

黃 阿 敏 博士

國立成功大學/生理所 副教授

黃阿敏

指導教授：楊 堉 麟 博士

中華醫事科技大學/生物科技系 教授

楊堉麟

系主任（所長）：

黃昭祥

中華民國 99 年 07 月 26 日



## 中華醫事科技大學 碩士論文全文電子檔案上網授權書

本授權書所授權之論文全文電子檔案，為本人於中華醫事科技大學，撰寫之碩士學位論文。(以下請擇一勾選)

- 同意立即開放
- 同意一年後開放，原因是：\_\_\_\_\_
- 同意二年後開放，原因是：\_\_\_\_\_ 尚未發表期刊
- 同意三年後開放，原因是：\_\_\_\_\_

以非專屬、無償授權中華醫事科技大學圖書館和國家圖書館。基於推動「資源共享、互惠合作」之理念，於回饋本校與社會作為學術研究目的之用，得不限地域、時間與次數，以紙本、光碟、學位論文全文系統、網路或其他各種方法收錄、重製、與發行，或再授權他人以各種方法重製與利用，以提供讀者基於個人非營利性質之線上檢索、閱覽、下載或列印。

研究生：\_\_\_\_\_ 張珊瑜

論文名稱：探討 Smad 路徑及上皮-間質轉換在山藥逆轉腎間質細胞纖維化之機制

指導教授：\_\_\_\_\_ 楊堉麟 博士

系所：生物醫學研究所

學號：A97030010

日期：民國 99 年 9 月 7 日

## 中文摘要

腎間質纖維化是糖尿病腎病變重要併發症，其病理特徵包括細胞外基質蛋白累積、纖維母細胞的增生和上皮細胞間質轉換，最後導致末期腎臟疾病。在過去的研究中顯示，乙型轉型生長因子（TGF- $\beta$ ）是一個與細胞增生或上皮細胞間質轉換及腎纖維化相關的致纖維化因子。近年來的文獻發現，山藥為重要糧食和藥用作物，也廣泛應用於臨床上治療糖尿病的中藥材。然而，山藥對腎臟纖維化所調控的機轉及其分子作用機制還不清楚。因此，本研究探討山藥水萃取物對  $\beta$ -羥丁酸所誘導 NRK-49F 細胞間質纖維化的調控及訊息傳遞過程。我們利用西方墨點法分析 TGF- $\beta$  下游受器（第一型及第二型受器）和 Smad 訊息蛋白質（如：Smad2/3、pSmad2/3、Smad4 和 Smad7），以及 EMT 表現標誌蛋白（ $\alpha$ -SMA、MMP-2 與 E-cadherin）；並以 ELISA 的方式測定 TGF- $\beta$  的生物活性及 fibronectin 表現量，再以免疫螢光染色觀察轉錄因子 Snail 及纖維蛋白 fibronectin 的表現。實驗結果發現，山藥萃取物顯著地降低  $\beta$ -羥丁酸所誘導 Smad 蛋白質（如 Smad2/3、pSmad2/3、與 Smad4）增加，同時也增加  $\beta$ -羥丁酸所減少的 Smad7 蛋白質。另一方面，山藥顯著地減少間質標記蛋白  $\alpha$ -SMA、MMP-2

以及增加上皮細胞標記蛋白 E-cadherin 的表現。上述結果顯示山藥萃取物可降低 TGF- $\beta$ / smad 訊息以及調節上皮-間質轉換，因此，山藥萃取物可做為一種新穎的抗纖維化之標靶藥物。

**關鍵字：**乙型轉型生長因子、纖維化、纖維蛋白、Smad、山藥、  
上皮間質轉換

## Abstract

Renal interstitial fibrosis (RIF) is one of the major complications of diabetic nephropathy and the pathology of RIF consists of accumulation of extracellular matrix protein, proliferation of fibroblasts, and epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) that leading to renal fibrosis and end-stage renal disease. Transforming growth factor beta1 (TGF- $\beta$ 1) has been implicated as an inducer of cell proliferation and EMT. It is also known as a potent fibrogenic growth factor in renal fibrosis. Recent studies suggest that yam, an agricultural and medicinal plant, is an important herb in Chinese medicine widely used for the treatment of clinical diabetes mellitus. However, the molecular mechanism of *Dioscorea alata* (DA) on antagonizing renal interstitial fibrosis has never been fully investigated. Thus, this study aims to investigate the modulatory effect of water extract of DA in NRK-49F cells (a rat fibroblasts cell line) under renal fibrosis model, which was induced by  $\beta$ -hydroxybutyrate ( $\beta$ -HB). Western blotting was used to examine protein expression in TGF- $\beta$ -related signal proteins (type I and type II TGF- $\beta$  receptor, Smads2/3, pSmad2/3, Smads4, Smads7) and EMT marker (E-cadherin,  $\alpha$ -SMA, MMP-2). In addition, Enzyme-linked immunosorbent assay was used to analyze levels of bioactive TGF- $\beta$  and fibronectin in the culture media. Expression of Fibronectin and transcription factor Snail, a transcription factor that modulates EMT, was also assessed by immunofluorescence staining. DA extract inhibited  $\beta$ -HB-induced expression of fibronectin in NRK-49F cells ( $P < 0.05$ )

concomitantly with dose-dependent inhibition of Smad2/3, pSmad2/3, Smad4. However, Smad7 was significantly increased by DA extract. Mesenchymal marker ( $\alpha$ -SMA and MMP-2) was significantly decreased and epithelial marker (E-cadherin) was increased by DA extract. These results suggest that DA extract might down-regulate TGF- $\beta$ /Smad and modulate EMT. In conclusion, we proposed that DA extract might act as a novel renal fibrosis antagonist for treating diabetic nephropathy.

**Key words:** TGF-beta, fibrosis, fibronectin, Smad, Yam, EMT

## 英文縮寫表

APS	Ammonium persulfate
AU	Absorbance unit
BSA	Bovine serum albumin
$\beta$ -HB	$\beta$ -hydrooxybutyrate
Co-Smads	Common-mediator Smads
DKA	Diabetic ketoacidosis
DN	Diabetic nephropathy
DM	Diabetes mellitus
DMEM	Dobellco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ECL	Enhanced chemiluminescence
ECM	Extracellular matrix
EMT	Epithelial-to-Mesenchymal Transition
ESRD	End-stage renal disease
FCS	Fetal calf serum
FN	Fibronectin
kDa	Kilo dalton
I-Smads	Inhibitory Smads
MAPK	Mitogen-activated Protein kinase
MMP	Matrix metalloproteinase
NRK-49F	Normal rat kidney fibroblast
OD	Optical density
PBS	Phosphate buffered saline



PVDF	Polyvinylidene difluoride
R-Smads	Receptor-activated Smads
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
TBS-T	Tris-buffer saline Tween-20
TEMED	N,N,N,N-tetramethylene diamine
TGF- $\beta$ 1	transforming growth factor-beta1
TGF- $\beta$ RI	Type I TGF-beta receptor
TGF- $\beta$ RII	Type II TGF-beta receptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
USRDS	US Renal Data System
UV	Ultra violet

## 致謝

時間真的過得很快，轉眼間 2 年的研究所生涯告一段落，終於把論文完成了!非常感謝指導教授楊堉麟博士，在實驗設計與論文撰寫上悉心指導，讓我從學習的過程中，更懂得如何規劃自己，藉此致上最深的謝意。同時也感謝中山大學生醫所張榮賢博士和成功大學生理所黃阿敏博士對本論文提供寶貴建議，讓論文撰寫上更為完整。另外，還有張文騰博士給予寶貴意見及技術指導，讓我受益良多。

也要特別感謝實驗室的大夥們：學長姐逸玄、亞穎、哲倫、大康及同屆的同學國正、小豬，還有可愛的學弟妹韋銘、偉烈、子淦、川崎、佩坊，在實驗及生活上更加多彩。同學們雅吏、瑁瑁、記寧、秋樺...等，在求學期間學業及實驗上的協助；以及最親愛的朋友汶珊、怡頻、怡菁感謝你們在實驗困難點時給予鼓勵與支持，使我能順順利利的完成學業。求學期間，受到大家的照顧及關心，也感謝一直陪在我身邊的瑞彬，這兩年來，不論歡喜或憂慮，都有你陪伴在身旁，使我每當面臨挫折與困難時，有你在身旁不間斷的鼓勵與打氣，使我更有目標往上爬。

最後，將此論文獻給我摯愛的家人，謝謝你們對我的關懷及照顧，使我可以無後顧之憂地專心完成學業。倘若我有未提及的，在此一併致謝，謝謝！

## 總目錄

頁數

口試委員會審定書

授權書 .....	ii
中文摘要 .....	iii
Abstract.....	v
英文縮寫表 .....	vii
致謝.....	ix
總目錄 .....	xi
圖表目錄 .....	xv
<b>第一章、緒論 .....</b>	<b>- 1 -</b>
一、糖尿病與糖尿病腎病變之概述 .....	- 1 -
二、糖尿病腎病變及其病理機轉 .....	- 2 -

三、酮體與糖尿病腎病變 .....	4 -
四、乙型轉型生長因子與腎臟纖維化之關係 .....	5 -
五、上皮間質轉換 (Epithelial Mesenchymal Transition) 與腎纖維 化之關係 .....	14 -
六、上皮間質轉換標記蛋白 .....	16 -
七、Smad 訊息傳遞路徑和上皮間質轉換 .....	19 -
八、山藥 (Dioscorea spp.) .....	21 -
九、研究目的 .....	23 -
<b>第二章、材料與方法 .....</b>	<b>25 -</b>
一、試劑與藥品 .....	25 -
二、細胞培養與保存 .....	27 -
三、細胞數目之測定 .....	29 -
四、細胞存活率之測定 .....	30 -
五、山藥水萃取 .....	30 -

六、酵素連結免疫吸附法 .....	31 -
七、細胞溶解物之製備 .....	32 -
八、蛋白質電泳及西方墨點法 .....	33 -
九、免疫螢光染色 .....	36 -
十、高效能液相層析 .....	36 -
十一、統計分析 .....	37 -
<b>第三章、結果 .....</b>	<b>38 -</b>
一、山藥萃取物之高效能液相層析 .....	38 -
二、 $\beta$ -羥丁酸及山藥萃取物對纖維蛋白之影響 .....	38 -
三、 $\beta$ -羥丁酸及山藥萃取物對乙型轉型生長因子之影響 .....	38 -
四、觀察山藥萃取物對細胞存活之影響 .....	39 -
五、山藥萃取物對乙型轉型生長因子受器蛋白質表現之影響 .....	40 -
六、山藥萃取物對 $\beta$ -羥丁酸所誘發腎纖維母細胞 Smad2/3 及 pSmad2/3 表現之影響 .....	40 -

七、山藥萃取物及 $\beta$ -羥丁酸所處理過的腎纖維母細胞其 Smad4 和 Smad7 之表現 .....	40 -
八、 $\beta$ -羥丁酸及山藥萃取物對腎纖維母細胞型態之影響 .....	41 -
九、山藥萃取物對上皮-間質轉化蛋白之影響 .....	42 -
十、山藥萃取物對轉錄因子 Snail 之影響 .....	43 -
<b>第四章、討論 .....</b>	<b>44 -</b>
<b>第五章、結論 .....</b>	<b>50 -</b>
<b>第六章、圖表 .....</b>	<b>51 -</b>
<b>第七章、參考文獻 .....</b>	<b>62 -</b>

## 圖表目錄

Figure 1. HPLC chromatograms of the extract of <i>Dioscorea alata</i> . HPLC conditions: .....	- 51 -
Figure 2. Effects of DA extract on $\beta$ -HB-induced fibronectin secretion in renal fibroblast cells. ....	- 52 -
Figure 3. Effects of DA extract on the level of secreted bioactive TGF- $\beta$ 1. ....	- 53 -
Figure 4. Effects of DA extract on cellular viability by trypan blue..... .....	- 54 -
Figure 5. Effects of DA extract on $\beta$ -HB-induced TGF- $\beta$ receptor expression in NRK cells. ....	- 55 -
Figure 6. Effects of DA extract on $\beta$ -HB-induced Smad2/3, pSmad2/3 expression in NRK cells. ....	- 56 -
Figure 7. Alteration of cellular levels of Smad4 and Smad7 in NRK cells treated with DA extract and exposed to $\beta$ -HB. ....	- 57 -
Figure 8. Effect of DA extract on phenotypic transformation of tubular epithelial to myofibroblasts in NRK-49F induced by $\beta$ -HB. ....	- 58 -
Figure 9. Immunoblot analyses of E-cadherin, $\alpha$ -SMA and MMP-2..... .....	- 59 -



Figure 10. Western blot analysis of transcription factor Snail expression in NRK-49F cells..... - 60 -

Figure 11. The effects of DA extract on NRK-49F cell fibronectin and Snail expression in NRK-49F cells. .... - 61 -

## 第一章、緒論

### 一、糖尿病與糖尿病腎病變之概述

糖尿病（Diabetes mellitus，DM）是一種與代謝失調相關聯的慢性疾病，和環境、化學毒素、微生物及遺傳有關，臨床表現亦有多種變化，即使接受治療也無法治癒，亦是二十一世紀罹患率增加最快的慢性疾病。糖尿病的長期併發症包括：糖尿病視網膜病變（diabetic retinopathy）、糖尿病神經病變（diabetic neuropathy）、糖尿病腎病變（diabetic nephropathy）以及糖尿病心肌病變（diabetic cardiomyopathy）。其中糖尿病腎病變容易發展成末期腎臟疾病（end-stage renal disease，ESRD），是病患致死的一大主因。

根據行政院衛生署的統計，糖尿病與糖尿病腎病變自民國 86 年至民國 97 年止，一直位居國人十大死亡排行，於 97 年分別為十大死因的第五位及第十位，其中於民國 97 年之統計，因糖尿病而死亡有 8,036 人，占死亡總人數的 3.4%，相較 96 年，病患增加 264 人，與 96 年底每十萬人口死亡人數 7,772 人相比較，有增加情形。且隨著國人飲食西化的影響，漸轉向多吃高热量的食物，身體運動量又減少，肥胖人口逐漸增加，糖尿病患者也愈來愈多，進而罹患糖尿病之年齡

有越來越年輕化趨勢。

依據美國腎臟資料系統（US Renal Data System，USRDS）2007年報告顯示，台灣區域在末期腎臟疾病發生率為每百萬人口 415 人，盛行率為每百萬人口 2,288 人；驚訝的是，發生率或盛行率皆高居全世界之冠。由此可知，糖尿病與國人的健康息息相關，若不予以適當處置，可能造成嚴重後遺症與不可逆的後果，甚至死亡。

## 二、糖尿病腎病變及其病理機轉

糖尿病腎病變是發展成末期腎病變(ESRD)的主因(Hostetter TH, 1991)，根據國際糖尿病聯合會(International Diabetes Federation，IDF)統計，全球現有 2 億 8 千多萬人罹患糖尿病，並且每年有 4 百萬人死於糖尿病性病變，預估在 2025 年後罹患糖尿病人數將達到 4 億 3 千多萬人；而根據國內國家衛生研究院研究發現，因為糖尿病所導致的糖尿病性腎病變，在台灣盛行率為 27.4%，也就是說平均每 4 名糖尿病患中，就有一人會發生腎病變。驚人數字代表糖尿病在醫療處置上是刻不容緩的要務。病患早期的特徵是尿液中白蛋白排出率增加，相關併發症有高血壓、高血脂、高尿酸、心血管疾病、神經損傷、視網膜病變、及 ESRD，也是俗稱的尿毒症，此時便需要進行透析（洗腎）

治療。

在台灣尿毒症的發生率也是全球第一，目前洗腎患者在台灣約 6 萬多人，每年約新增 6000 病患，病患終身多須依賴洗腎來維持生活。健保局統計，洗腎費用所使用的健保資源一年高達 330 多億，平均每位洗腎病人每年要支出 65 萬元。綜合以上結果，得知糖尿病性腎病變對國家社會成本、醫療資源造成很大的負擔，故其機制的探討及研究，是目前迫切瞭解的課題，期能有更好的預防及治療。

糖尿病性腎病變過程一般是先由微白蛋白尿症 (microalbuminuria) 開始，然後變為蛋白尿 (proteinuria) 或氮血症 (azotaemia)，最終導致 ESRD (Hostetter et al., 1994 ; Lapuz et al., 1997)。其病理特徵是：腎絲球 (glomerular) 與腎小管 (tubular) 細胞的肥大 (hypertrophy)，腎絲球與腎小管基底膜 (basement membranes) 的增厚，腎絲球對於白蛋白 (albumin) 通透性 (permeability) 增加，在腎絲球膜 (glomerular mesangium) 與腎小管間質 (tubulointerstitium) 中細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 過度堆積，進而導致腎臟纖維化 (Liu, 2006) 包括腎絲球硬化 (Glomerulosclerosis) 和腎小管間質纖維化 (Renal tubulointerstitial fibrosis) (Hewitson, 2009)，最後造成 ESRD (Wolf, 1995)。近幾年的研

究發現，造成糖尿病性腎病變的因素包括：高糖 ((Wolf et al., 1992); (Wolf and Ziyadeh, 1999))、高滲透壓(Chiang et al., 2010)、第二型血管張力素 (angiotensin II) 或特定生長因子誘導，如：甲型類胰島素生長因子 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) (Segev et al., 1997)、血小板衍生生長因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)、表皮生長因子 (epidermal growth factor, EGF)、乙型轉型生長因子 (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )，其中 TGF- $\beta$  在許多文獻皆指出 ESRD 有密切的關聯(Eddy, 1996; Shihab, 2007; Sugiura et al., 1999)。除了上述因素外，病患體內增加的酮體濃度，亦在腎病變中的訊息傳遞上扮演著重要的角色。

### 三、酮體與糖尿病腎病變

脂肪酸代謝後，會產生乙醯輔酶 A (Acetyl-CoA)，經由肝臟內特有酵素，將兩個 Acetyl-CoA 進行催化，製造出酮體 (ketone body)，形成乙醯基乙酸 (acetoacetate)、丙酮 (acetone) 及  $\beta$ -羥丁酸 ( $\beta$ -hydroxybutyrate,  $\beta$ -HB) 等三種不同比例、型式的酮體，其中以  $\beta$ -HB 和 acetoacetate 的合成較多。由於酮體的先驅物質為脂肪酸，因此會影響脂肪酸的代謝因素，例如：糖尿病、高脂肪飲食、飢餓等，皆會影響酮體新生作用 (ketogenesis)，使血液中酮體濃度增加，患有

糖尿病性酮酸症 (ketoacidosis) 之病患，此症狀更明顯。因此高酮血症 (ketonemia) 是糖尿病病患的主要病徵之一。由過去文獻顯示，10 mM  $\beta$ -HB 具有類似於生長因子 TGF- $\beta$  的效應，可以透過活化 Smad 訊息傳遞路徑，促使細胞外間質增生，進一步增強 TGF- $\beta$  濃度及活性，導致腎臟纖維化現象(Guh et al., 2003)。本實驗以上述實驗模式，以 10 mM 的  $\beta$ -HB 濃度處理腎臟纖維母細胞，做為模擬腎纖維化的條件。

#### 四、乙型轉型生長因子與腎臟纖維化之關係

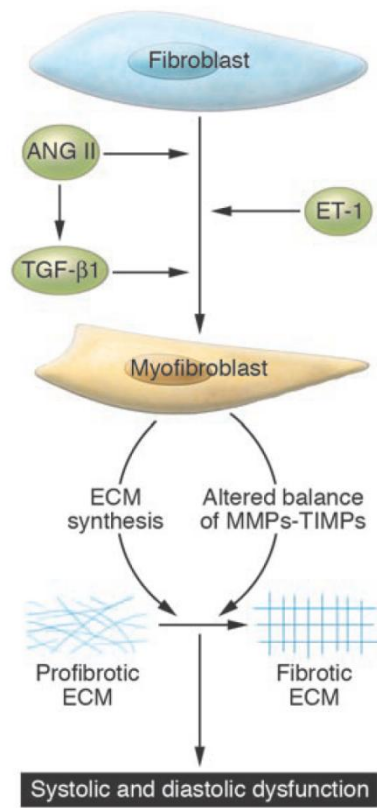
##### 乙型轉型生長因子之結構與功能

乙型轉型生長因子 (TGF- $\beta$ ) 的命名由來是因為它能使大鼠腎臟細胞在瓊脂上生長(de Larco and Todaro, 1978)，是一種對細胞生長、分化、細胞外間質增生、細胞自然凋亡 (apoptosis) 甚至胚胎發育等病理和生理過程均極重要的多功能細胞激素(Brodin et al., 1999; Grande, 1997)。在哺乳動物中具有三種異構型 (isoform): TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 3，序列上有 70-80%的相似性，其分子量均為 12.5 kDa，其中 TGF- $\beta$ 1 為血漿中主要存在的形式，且功能上研究最透徹。TGF- $\beta$  是透過細胞自泌 (autocrine)、旁泌 (paracrine) 或內分泌的方

式結合於細胞上的受器而產生生物效應。當腎小球細胞受到 TGF- $\beta$ 1 的刺激後，會以下列幾種可能的方式來加速腎臟纖維化：

1. 促進膠原蛋白 collagen (type I、III、IV)、fibronectin、proteoglycans 和其它 ECM components 的分泌(Silbiger et al., 1999; Wolf et al., 1991)。
2. 促使 plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 分泌增加，同時也會抑制 plasminogen activator 的分泌，降低細胞外間質的正常代謝率(Zhang et al., 2007)。
3. 誘導 tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) 的產生，進而抑制更多蛋白質分解酶的功能。

在腎臟疾病的惡化過程中，TGF- $\beta$ 1 一個很重要的介質，刺激活化成肌纖維母細胞（圖一），造成纖維化。



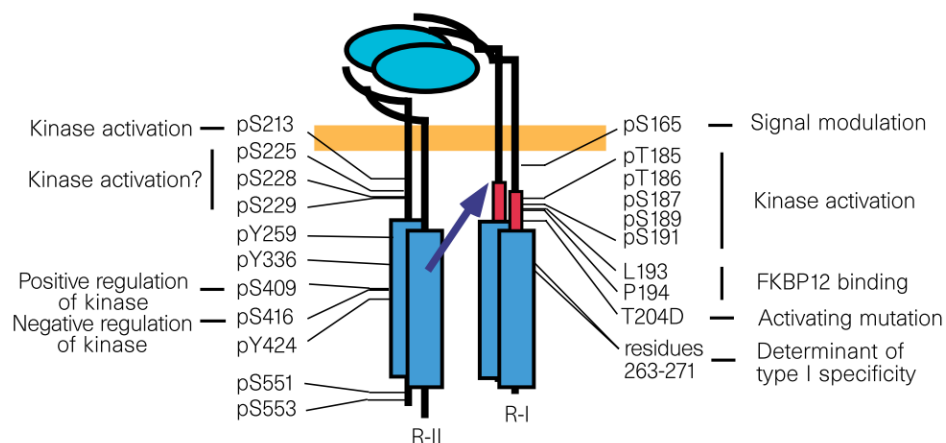
圖一 纖維母細胞轉換成肌纖維母細胞之機制

(Bradford et al., 2007)



## 乙型轉型生長因子之受器

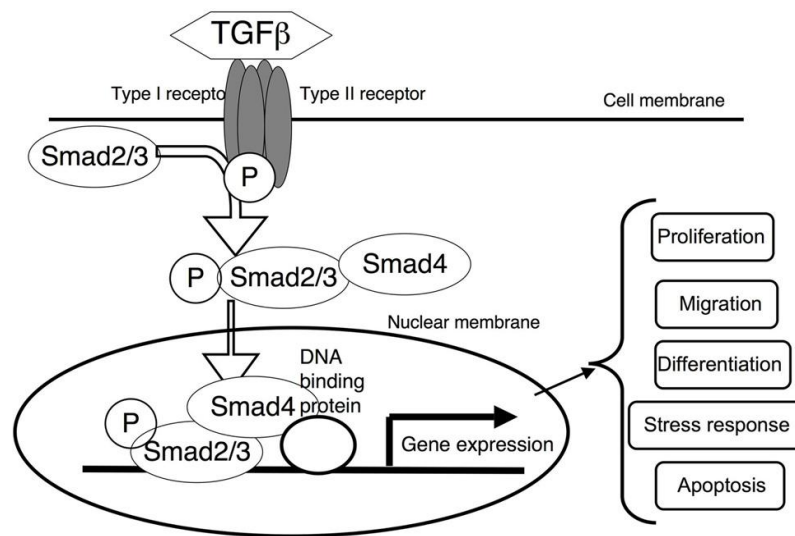
TGF- $\beta$  受器 (receptor) 有三種：T $\beta$ RI、T $\beta$ RII 和 T $\beta$ RIII 是由四個單體組合而成的四體複合蛋白質，結構上是由 2 個第一型與 2 個第二型受器組成 (圖二)，TGF- $\beta$  必需與 T $\beta$ RI 和 T $\beta$ RII 結合才能將訊息往下傳遞。第一及第二型受體皆具有絲胺酸/酰胺酸激酶活性 (serine / threonine kinase activity)，第三型受體受器又稱 betaglycan，位於細胞表面的 proteoglycan 多糖體，缺乏磷酸激酶區域，因此對於訊息傳遞上沒有作用，但仍會與結合基 (ligand) 結合，具有穩定受器複合體的功用 (Hocevar and Howe, 1998)。



圖二 TGF- $\beta$  第一型/第二型受器活化部位 (Heldin et al., 1997)

## 乙型轉型生長因子訊息傳遞

乙型轉型生長因子乃藉由結合在具有 serine-threonine kinase 活性的受器複合體來傳遞訊息(Derynck, 1994)。在不同種類的細胞中 TGF- $\beta$  會有不同的調控方式(Bottinger and Bitzer, 2002; Zhou et al., 1999), 如 Smad-dependent 路徑及 Smad-independent 路徑(包括 MAPK pathway 和 PP2A/p70S6 kinase pathway), 根據先前的文獻證明活化乙型轉型生長因子之 Smad 訊息傳導路徑會造成纖維化的產生, 但是目前為止, 乙型轉型生長因子之訊息傳遞仍存在著許多未知, 初步推測其訊息傳遞過程可能分為四個階段:(1) 乙型轉型生長因子與第二型受器的結合。(2) 第一型受器遊走並結合於乙型轉型生長因子第二型受器, 形成一個四複合體受器結構。(3) 第二型受器磷酸化第一型受器上的 GS domain (富含 Glycine-serine) 的區域。(4) 下游 Smad 傳訊蛋白結合於受器複合體上, 被第一型受器上的 serine-threonine kinase 磷酸化(Bottinger and Bitzer, 2002; Wrana, 1998), 啟動一連串的信息傳遞進入到細胞核內, 誘導下游許多基因的表現(圖三)。



圖三 TGFβ 與 Smad 訊息傳遞機制(Saika et al., 2009)

### 乙型轉型生長因子與下游 Smad 蛋白之關係

Smads 蛋白最早由研究果蠅和蠕蟲的科學家共同提出的，它與線蟲（*Caenorhabditis elegans*）中 SMA 蛋白及果蠅（*Drosophila*）中的 Mad（Mothers against decapentaplegic）蛋白具有相同之作用，為了名稱上的統一，學者們將這一類相關的蛋白統稱為 Smad 蛋白(Lagna et al., 1996)。Smad 蛋白的分子量分佈從 42 kDa 到 60 kDa，於 N 端與 C 端各有一高度同源性的區域：MH1（mad homologyl）與 MH2，中間以一段 proline-rich linker 區域相連(圖四)。研究發現，未活化的 Smad 蛋白，MH1 與 MH2 區域相互緊密結合，一旦受到 TGF-β 受器活化後，此蛋白便打開進一步相互結合為異體複合物（hetero-oligomeric

complex)，隨後進入細胞核內影響下游基因的表現（圖五）。目前在脊椎動物發現有 9 種不同的 Smad，根據結構和功能的不同可分為三大類(Vrljicak et al., 2004)：

1. Receptor-regulated Smads (R-SMAD)：在 C 端有高度保留性的 SSXS (ser·ser-x-ser) motif 結構，當受到 ligand 刺激時，其 serine 部位能被第一型受器磷酸化，並且與受體形成短暫複合體。

(A) Smad1、Smad5 和 Smad8：負責傳遞骨頭成型蛋白 (Bone morphogenetic protein, BMP) 之訊息，一般認為對 TGF- $\beta$  的訊息傳遞較無直接的關聯。

(B) smad2、Smad3：結構上兩者極為相似，其功能亦相同。當 TGF- $\beta$  與細胞表面受器結合，Smad2、Smad3 的 C 端 SSXS 區域便受到第一型受器磷酸化，進入細胞核內調控 TGF- $\beta$  下游基因的表現。

2. Common-mediator Smad (Co-SMAD) —Smad4：

Co-Smad 也具有 MH1、MH2 和連接區，但缺乏 SSXS 結構，因此不能受到 TGF- $\beta$  刺激而磷酸化，也不能結合 TGF- $\beta$  或 BMP 受體。

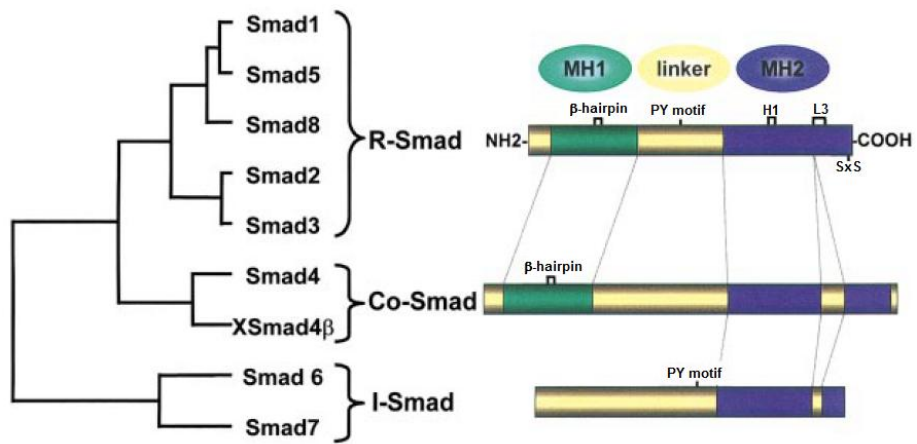
Smad4 作用是結合並穩定 R-SMAD 複合體，才進入細胞核內形成有活性的轉錄因子，調節因表現。另外，Smad4 也是一種腫瘤抑制基因，

在乳癌、肺癌、卵巢癌與胰臟癌中均發現其基因缺陷，則會抑制 TGF- $\beta$  之訊息傳遞啟動(Yang and Yang, 2010)。

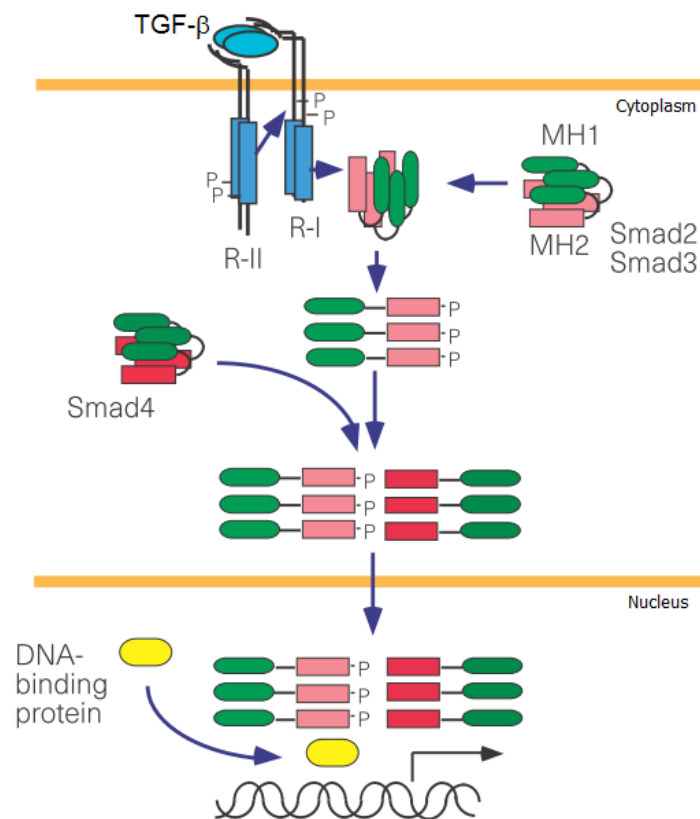
### 3. Inhibitory Smads (I-SMAD) —Smad6 及 Smad7：

Smad6 及 Smad7 與其他 Smad 蛋白結構上差別較大，在功能上扮演受器對 R-Smads 磷酸化的抑制劑，阻斷訊息傳遞的進行。在哺乳動物中，Smad7 皆會調控乙型轉型生長因子及骨頭成型蛋白的訊息傳遞，而 Smad6 則對第一型乙型轉型生長因子受器調控較小(Hanyu et al., 2001)。當正常細胞受到乙型轉型生長因子的刺激時，會促進細胞誘導 I-Smad 蛋白質的表現，這就是“負回饋自動控制”，以防止乙型轉型生長因子過度表現。最近的研究發現，Smad7 作用可抑制 Smad2、Smad3 的磷酸化，Smad7 也可抑制第一型受器對 Smad2 和 Smad3 的磷酸化，增加泛素對第一型受器的降解(Kavsak et al., 2000)。因此，對於 Smad 7 的表現調控可能成為阻斷腎絲球 TGF- $\beta$  效應的重要策略。

過去文獻指出，利用單側輸尿管結紮模擬腎間質纖維化動物模型中，smad3 基因剔除鼠與野生型老鼠相比較，發現纖維化程度較低(Sato et al., 2003)，顯示 TGF- $\beta$ /Smad 訊息傳遞路徑與腎臟纖維化的發生有密切關聯。



圖四 Smad 家族及其結構(Itoh et al., 2000)。



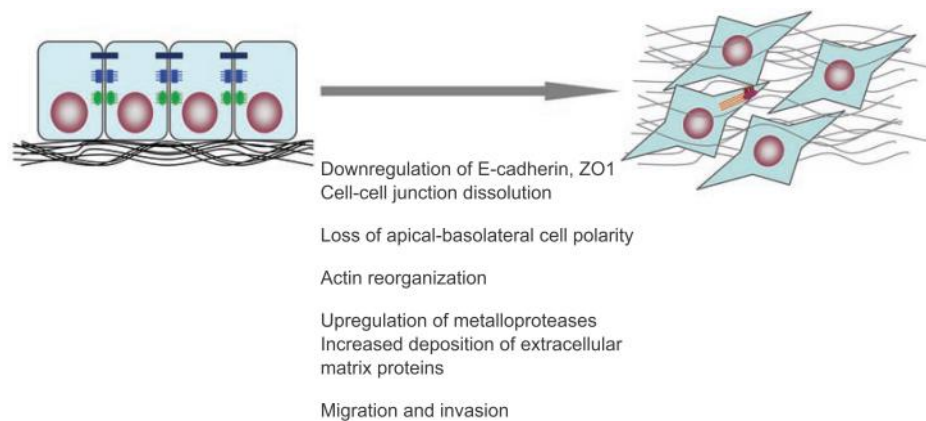
圖五 Smad 蛋白受 TGF- $\beta$  刺激其結構表現(Heldin et al., 1997)。

## 五、上皮細胞胞間質轉化 (Epithelial Mesenchymal Transition) 與腎纖維化之關係

上皮細胞間質轉化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 最早是由 Greenburg 和 Hay 這兩位學著所發現，透過體外共同培養上皮細胞與 collagen gels 的實驗，發現上皮細胞型態漸漸轉變成間質細胞 (Greenburg and Hay, 1982)，換句話說，即具有極性的上皮細胞轉變為具有移行能力的間質細胞過程 (圖六)。過去文獻報導，在人類生理及病理過程中 EMT 牽扯了三個重要組成，(1) 胚胎發育及型態；(2) 腫瘤的發展及轉移的形成 (Miyazono, 2009)；(3) 在腎臟、肝臟和肺中形成慢性漸進性組織纖維化 (Zavadil and Bottinger, 2005)。如肺臟修復過程中，上皮細胞會經由 EMT 的過程轉變形成具有遷移能力的間質細胞，主要是因為受到一些生長因子的刺激，像是 TGF- $\beta$ 、FGF、Integrin、Wnt 等等，其中最重要的是 TGF- $\beta$ ，它會導致細胞表現抑制上皮細胞黏附蛋白的分子或是具有破壞細胞基底膜 (Basement membrane) 能力的金屬蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) (Crosby and Waters, 2010)。

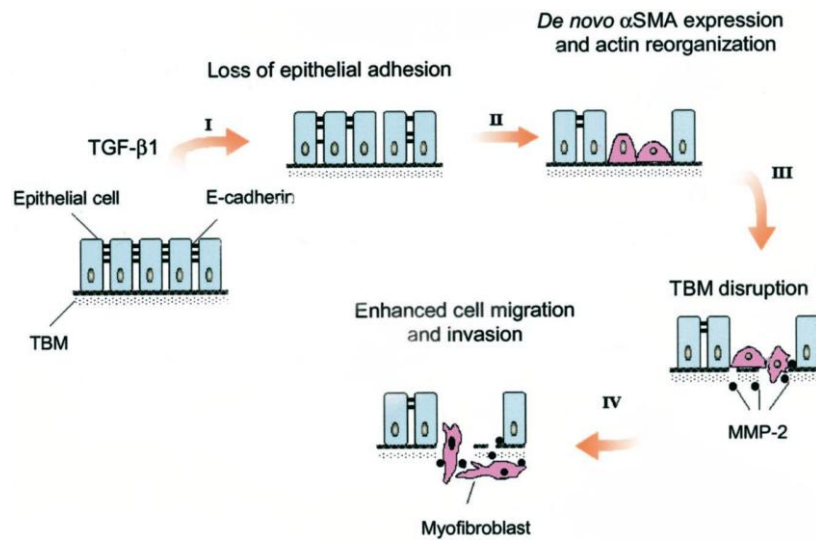
細胞轉分化的過程分為四個步驟：(1) 上皮細胞會失去上皮標記蛋白 (E-cadherin、 $\beta$ -catenin 等)，而導致失去原本細胞該有的極性

(epithelial polarity)，如 adherens junctions；(2) 間質標記蛋白 (Fibronectin、 $\alpha$ -SMA 等) 表現量增加，細胞骨架進行重組，此時細胞外觀型態會轉變成紡錘狀的細胞形態；(3) 分泌破壞細胞外基質的 MMPs；(4) 已經轉化的細胞進行細胞轉移 (圖七)。事實上，腎小管間質纖維化是因為 TGF- $\beta$  誘導腎臟 EMT 使腎臟細胞變成肌纖維母細胞 (myofibroblasts) 分泌過多的 ECM (Fibronectin、collagen)，進而加速纖維化的進行(Li et al., 2009)。



圖六 上皮細胞轉換成間質細胞之機制(Xu et al., 2009)。





圖七 腎臟細胞纖維化之 EMT(Yang and Liu, 2001)。

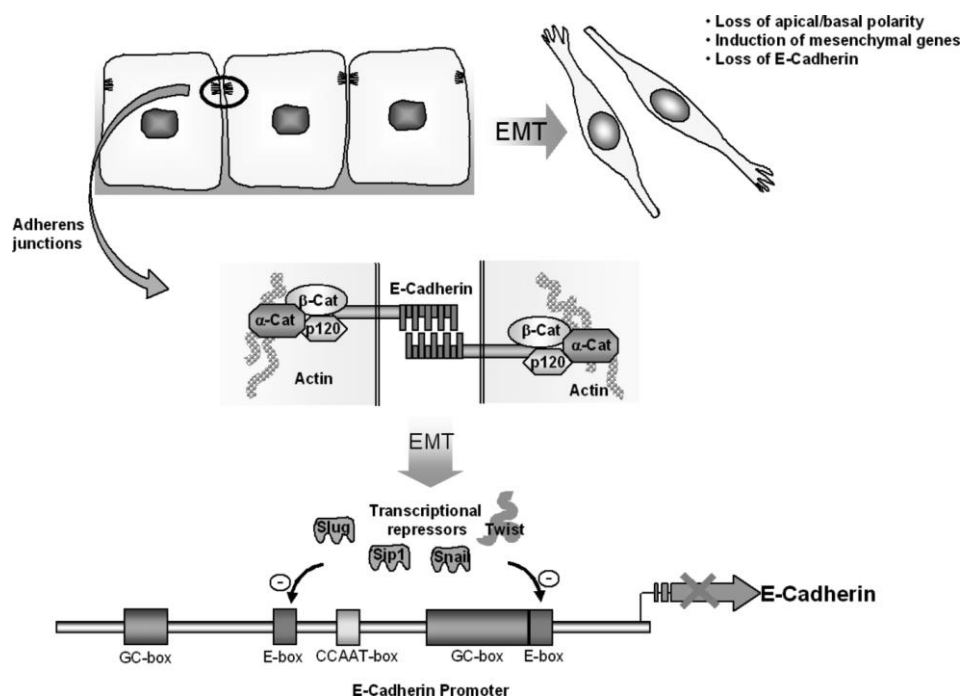
## 六、上皮-間質轉化標記蛋白

### 1. E-cadherin

E-cadherin對於保持細胞型態、細胞運動及黏附功能具有重要作用，分子量約120 kDa，是一種細胞膜上的醣蛋白，所有的上皮細胞皆可發現它的存在，與 $\beta$ -catenin及 $\gamma$ -catenin鍵結，並結合 $\alpha$ -catenin使E-cadherin連接上actin cytoskeleton以維持細胞與細胞間黏合的完整，被認為是上皮細胞重要的特徵(Jamora and Fuchs, 2002)。此外，E-cadherin表現量增加，也會抑制腫瘤細胞的轉移和侵入，減緩腫瘤的發展及擴散(Hirohashi, 1998)。

過去的研究發現，調控 E-cadherin 主要由某些轉錄因子所控制，

包括：(1) 鋅手指蛋白 (zinc finger containing proteins)：Snail (Snail 1) (Cano et al., 2000; Nieto, 2002)、Slug (Snail 2) (Hajra et al., 2002)和 SIP 1(Comijn et al., 2001)；(2) 鹼性螺旋-環-螺旋轉錄因子 (basic helix-loop-helix gene called twist, bHLH)。在最近的研究指出，Snail 會接合在 E-cadherin promoter 的 E-box 位置上，抑制 E-cadherin 基因轉錄，產生上皮-間質轉化，也就是 EMT 現象，導致腎臟纖維化的進行 (圖八) (Boutet et al., 2006)。



圖八 轉錄因子抑制 E-cadherin 基因表現(Kelleher et al., 2006)。

## 2. $\alpha$ -平滑肌動蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin, $\alpha$ -SMA)

$\alpha$ -SMA 在真核細胞中為高度保留的蛋白質，存在於平滑肌細胞以及纖維母細胞 (fibroblast) 中，上皮細胞通常不表現或是表現量很低，因此被認為是纖維母細胞最重要的特徵(Gabbiani, 1992)。目前研究認為纖維母細胞過度活化會使  $\alpha$ -SMA 表現量增加，ECM 合成，使細胞會轉變成具有 myofibroblast phenotype，呈現紡錘狀外觀，因此被認為是進入 EMT 的象徵。

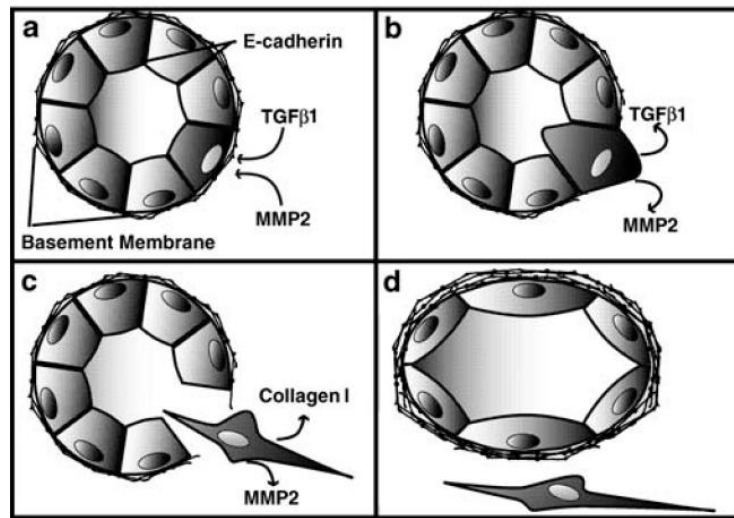
## 3. 纖維連接蛋白 (Fibronectin, FN)

纖維連接蛋白 (Fibronectin, FN) 主要是由纖維母細胞所分泌的細胞外基質 (extracellular matrix) 的醣蛋白質 (glycoprotein) (Serini et al., 1998)，具有多種重要生物活性功能，包括細胞黏附 ((Xia and Culp, 1995))，細胞運動、胚胎發育和傷口癒合等。許多研究也顯示，纖維連接蛋白在器官纖維化及 EMT 中扮演重要的角色，當表現量增加時，會參與許多疾病的發生，如：在心肌梗塞老鼠重塑模型中，發現金屬基質蛋白酶的調控會影響纖維連接蛋白的表現 ((Yang et al., 2009))；肺部纖維化中模式中，纖維連接蛋白會大量堆積(Kuhn and McDonald, 1991)；在腎臟纖維化模式中，EMT 會影響纖維連接蛋白

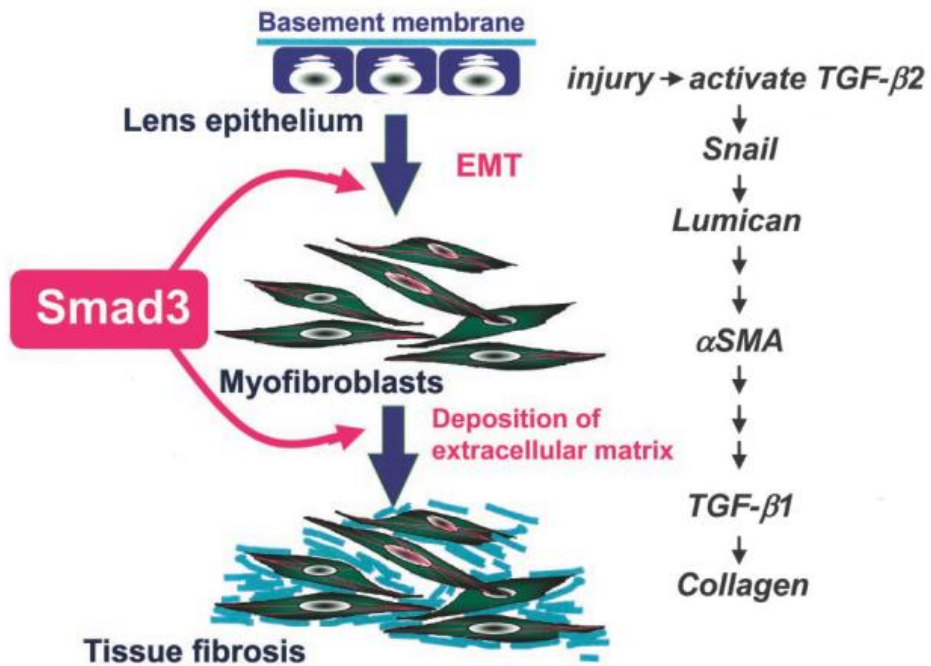
及  $\alpha$ -SMA 表現(Camara and Jarai, 2010)；在癌症轉移的研究，腫瘤的纖維連接蛋白表現量與癌細胞入侵轉移能力及 MMPs 的釋放量有關(Kenny et al., 2008)。

## 七、Smad 訊息傳遞路徑和上皮間質轉換

上皮間質轉換 (EMT) 過程中上皮細胞失去上皮細胞標記蛋白 (E-cadherin) 且表現出間質細胞標記蛋白 (Fibronectin、 $\alpha$ -SMA) 的現象，在胚胎發育、傷口癒合、器官纖維化和腫瘤細胞侵入及轉移等等，皆會發生 EMT 的現象(Hay and Zuk, 1995)，整個過程最主要的因素是 TGF- $\beta$ (Roberts et al., 2006)。促進 MMP-2 大量表現，使腎小管基底膜受損，並大量堆積細胞外間質 (圖九)，另外，由 Saika 等人研究發現，EMT 主要是透過 Smad 3 訊息傳遞路徑，刺激轉錄因子 Snail 表現，進而增加了 Snail 轉錄因子的蛋白質量，並伴隨著 EMT(圖十)。



圖九 腎小管基底膜 EMT 之過程(Zeisberg and Kalluri, 2004)。



圖十 細胞 EMT 透過 Smad3 訊息路徑，細胞分泌大量

間質標記蛋白使器官纖維化(Saika et al., 2004)。

## 八、山藥 (*Dioscorea* spp.)

### 1. 山藥之簡介

山藥(拉丁學名:*Dioscorea* spp.;英文俗名:yam;漢語拼音:shanyao)是薯蕷科(Dioscoreaceae)的草本多年生蔓生性植物(herbaceous perennial lianas)之根莖類植物,外觀呈圓柱狀,具分支,表面為淡黃至棕黃色;原產於我國、日本以及熱帶地區,主要產區則分布在熱帶以及亞熱帶地區。自古以來山藥即被國人利用為補虛之保健食品,依據最早的一部中藥典籍《神農本草經》中就將山藥列為上品,指出具有「主傷中、補虛羸、除寒熱邪氣、補中、益氣力。」,在《本草綱目》也指出具有「益腎氣、健脾胃、止泄痢、化痰涎、潤皮毛。」

### 2. 山藥的種類及產地

全世界的山藥有超過大約 600 個物種,其中可供食用的物種約有 50 多個,而在台灣已被發現到的有 14 個物種以及 5 個變異種(Liu and Huang, 1962)。目前台灣較為常見的山藥大多是源自於下列 6 個品種:

(1)大薯 (*Dioscorea alata* L.) (英文俗名為water yam或winged yam)

又有別名為田薯,是本土山藥中分布最廣的品種,並衍生出台灣地區的代表性品種有台農1號(*Dioscorea alata* L. cv Tainung No. 1)以及台

農2號 (*Dioscorea alata* L. cv Tainung No. 2)；

(2)長薯 (*Dioscorea batatas*) 又有別名為家山藥，原產於大陸，是較為耐寒的物種並且可供藥用；

(3)山薯 (*Dioscorea japonica*) 又有別名為日本山藥，原產於日本，目前普遍栽種於大陸、日本以及東南亞一帶；

(4)紫田薯 (*Dioscorea alata* L. var. *purpurea*) 又有別名為條薯，目前栽種於台灣中部；

(5)恆春山藥 (*Dioscorea doryophora*) 又有別名為戟葉田薯，原產於台灣的恆春半島一帶；

(6)基隆山藥 (*Dioscorea japonica* Thunb. var. *pseudojaponica*)，主要分布於北台灣的雙溪、貢寮、瑞芳、平溪、蘇澳與三芝。

### 3. 山藥的營養成分及保健功能

山藥的利用部位為塊莖 (tuber)【亦被稱為擔根體 (rhizophore)】，依據傳統中藥典籍“神農本草經”的記載，山藥具有主傷中，補虛羸，除寒熱邪氣，補中益氣力，長肌肉，強陰，久服耳目聰明，輕身，不飢，延年之功效，因此，山藥自古以來被廣泛地用作為保健食材以及

生藥材料。此外，目前山藥已被證實還具有調節脂質代謝、調節血糖、抗氧化(antioxidation)、抗老化(anti-senescence)、抗癌(anticancer)、調節生殖系統、強化免疫系統，以及改善消化功能等效用(Choi et al., 2004; Wang et al., 2006; Wang et al., 2004)。由於山藥具有高生產率(productivity)的優勢以及多種有益的保健效用，近年來有關山藥萃取物在疾病治療與醫藥品上的應用已經成為本領域中的研究人員所關注的重點。

## 九、研究目的

依據美國腎臟資料系統(USRDS) 2007 年的統計，台灣末期腎臟疾病(ESRD)不管發生率或是盛行率，均高居全世界之冠。造成 ESRD 的病因中，糖尿病誘導之腎纖維化為一極大關鍵。目前糖尿病性腎病變之研究著重在腎絲球治療，但是研究發現腎臟間質纖維母細胞(例如：NRK-49F 細胞)才是導致腎臟纖維化重要成員。

現今治療糖尿病腎病變之方法包括給予降血壓藥、抗氧化劑和血管張力素阻斷劑，但是，若糖尿病患已有蛋白尿的情況時，似乎都難逃最後的血液透析治療。目前，國人常偏好以中藥作為食補養腎的天然食材，使用上較安全無副作用。而山藥是國人常用的中草藥，在台



灣栽種面積廣泛，有研究指出，含有多種特殊成分如：薯蕷皂甘素 (diosgenin)、黏液質 (mucin) 和甘露聚糖 (mannan) 等有益成分，具有調節脂質的功能(Cayen and Dvornik, 1979)、降低血糖、總膽固醇，改善腎臟功能和抗氧化(Hou et al., 2002; Lee et al., 2002)，但是，在腎臟功能的作用機制仍不是很清楚。因此我們將探討山藥在治療腎臟纖維化上的角色。

由於 TGF- $\beta$ 1 在糖尿病腎病變中扮演極具重要角色，它能經由活化下游的 Smad 路徑，來誘導腎臟細胞進行皮-間質轉化作用 (EMT) 的能力，並促進分泌細胞外基質堆積，造成纖維化，另一方面，TGF- $\beta$ 1 也會活化 Smad，促進轉錄因子 Snail 表現，進而抑制上皮細胞標記蛋白 E-cadherin，使細胞型態發生改變。因此本研究更進一步探討山藥萃取物對 TGF- $\beta$  下游訊息分子、各種 Smad 的表現量，以及 EMT 的過程是否受到轉錄因子 Snail 調控，造成下游基因之表現的變化，希望闡明山藥萃取物對於影響腎臟細胞纖維化效應的分子作用機制為何。

## 第二章、材料與方法

### 一、試劑與藥品

1. 細胞培養盤由丹麥 TPP 公司購得；
2. 甲醇由台灣 ECHO 購得；
3. Ammonium persulfate ( APS ) , tetramethylethylenediamine ( TEMED )  
由美國 Bio-Rad 公司購得；
4. Bovine serum albumin 購自 Boehringer Mannheim Biochemica ；
5. chamber slid 購自 Nunc ；
6. Dulbecco's modified Eagle's medium ( DMEM ) , fetal calf serum  
( FCS ) , penicillin/ streptomycin , sodium pyruvate , 及 glutamine  
購自美國 GIBCOBRL 公司 ；
7. Fibronectin EIA Kit 購自 TAKARA BIO INC. ；
8. Glycin 、 Bromophenol blue 、 Sodium bicarbonate 、 Tween-20 購自  
MERCK ；
9. Immunofluorescence 之抗體：anti-E-cadherin 、 anti-Fibronectin 、  
anti-Snail 及 goat polyclonal to rabbit IgG-H&L ( FITC ) 由 Abcam  
公司購得；
10. Mounting Medium 由 Santa Cruz Biotechnology 公司購得；

11. Penicillin ( 10000 U/ml ) / Streptomycin ( 10000 mg/ml ) 、 Fetal calf serum ( FCS ) 、 Trypsin-EDTA 購自美國 Gibco BRL ；
12. TGF- $\beta$ 1 EIA Kit 購自 R & D 公司 ；
13. Trypan blue 、  $\beta$ -羥丁酸 、 DMSO 、 anti- $\beta$ -actin 、 Ammonium persulfate ( APS ) 購 Signal -Aldrich Co. ；
14. Western blotting E.C.L. 呈色劑 、 PVDF membrane 由美國 Millipore 公司購得 ；
15. Western blotting 之抗體 : Anti-Smad2/3 、 anti-pSmad2/3 、 anti-Smad4 、 anti-Smad7 、 anti-T $\beta$  RI 、 anti-T $\beta$  RII 、 anti-E-cadherin 、 anti- $\alpha$ -SMA 、 anti-Snail 、 anti-MMP 2 、 anti-mouse IgG-HRP 及 anti-rabbit IgG-HRP 皆由 Santa Cruz Biotechnology 公司購得 ; anti-Snail 由 Cell signaling 公司購得

## 二、細胞培養與保存

### 1. 細胞培養

正常大鼠腎臟纖維母細胞株 (Normal Rat Kidney cells, NRK-49F) 是購自 American Type Culture Collection (ATCC)。培養時，將正常大鼠腎臟纖維母細胞株 (Normal Rat Kidney cells, NRK-49F) 置於 DMEM (Gibco/BRL, NY, USA) 培養液【含 5% 的小牛血清 (bovine calf serum, BCS)、100 unit/ml penicillin G 及 100 µg/ml streptomycin】，使用 25 cm<sup>2</sup> 的培養盤培養，並置於 37°C 恆溫中且含 5% 的 CO<sub>2</sub> 的培養箱中，待培養至八、九分滿時，可以進行細胞的次培養。平均每隔三天換一次培養液，細胞的存活率以錐藍染色法 (trypan blue exclusion) 方法偵測，大於 90% 者才進行隨後實驗。將生長良好的細胞依實驗需要培養於 25 cm<sup>2</sup> 的培養盤培養，在含有 5% 的小牛血清 DMEM 培養基中培養 24 小時，換新鮮的 DMEM 培養基含 5% 的小牛血清及 10 mM β-羥丁酸培養 48 小時，之後更換新鮮的 DMEM 培養基含 5% 的小牛血清及 10 mM β-羥丁酸，同時在培養基中加入一系列不同濃度之山藥萃取物 (25、50、100 及 200 µl/mL) 再繼續培養 24 小時。隨後進行下列實驗。觀察山藥水萃取物或 β-羥丁酸處理後對 NRK-49F 之生長與其纖維相關蛋白質表現之影響。

## 2. 繼代培養

將培養盤中舊的細胞培養液吸出，加入適量的 phosphate buffered saline (PBS) (0.02%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.02%  $\text{KCl}$ 、0.8%  $\text{NaCl}$  及 0.216%  $\text{NaHPO}_4$ ) 緩衝液沖洗二次，再加入 3.3 倍 trypsin-EDTA，trypsin-EDTA 為一種內切酶，能使細胞脫離培養盤，當 trypsin 覆蓋所有細胞後，置於  $37^\circ\text{C}$  作用 5 分鐘，使細胞脫離培養盤，可利用顯微鏡觀察細胞是否脫離培養盤，若未完全脫離，可用手輕輕拍打培養盤邊緣，以幫助細胞脫落。加入適量之 DMEM 培養基均勻沖散細胞，利用血球計數器 (Hemocytometer) 來計算細胞數目，取需培養之細胞數放入適量之培養基於培養盤，並置於  $37^\circ\text{C}$  及 5%  $\text{CO}_2$  之恆溫培養箱中培養。

## 3. 冷凍細胞

先依繼代培養細胞之操作方法，收集培養之細胞，取些許細胞懸浮液，計數細胞濃度，再將細胞液 1,200 rpm 離心 5 分鐘，此時配製冷凍保存液(新鮮的細胞培養液中含有 10% 的 DMSO)，離心後，去除上清液，在加入適量冷凍保存液混合均勻，使細胞濃度為  $5 \times 10^5$  個細胞/毫升，以每管冷凍管 1 毫升將細胞移到冷凍管中，以緩慢降溫方式，先放在  $4^\circ\text{C}$ / 20 分鐘，之後  $-20^\circ\text{C}$  冷凍 1 小時，再移至零下  $80^\circ\text{C}$

冷凍隔夜，最後將冷凍管移至液態氮桶內，以確保細胞完整。

#### 4. 解凍細胞

首先從液態氮桶取出冷凍管，迅速移置 37 °C 水浴槽快速解凍，輕搖冷凍管並且在 60 秒內快速解凍，回溫後將含有細胞之冷凍液(1 ml)放置於細胞培養盤，並且加入 9 ml DMEM 培養液，置於 37°C 及 5% CO<sub>2</sub> 之恆溫培養箱中培養。隔日更換新鮮的培養液，待細胞約 9 成滿將進行繼代培養。

### 三、細胞數目之測定

先依繼代培養細胞之操作方法，收集培養之細胞，取 10 μl 細胞懸浮液到微量離心管，並加入等體積的 trypan blue (Gibco/ BRL) 均勻混合，最後取約 10 μl 混合液至計數盤於倒立顯微鏡下觀察並計數。將血球計數器放置顯微鏡下，以 10 倍物鏡觀察計數細胞，使用 counter 計算活細胞數目，顯微鏡底下可看到九大方格，取角落四大方格計數，計算會發亮的活細胞，死細胞會被 trypan blue 染上細胞質。計算方式：細胞數目 = 4 大格細胞總數 ÷ 4 × 稀釋倍數 × 10<sup>4</sup> × 細胞浮懸液體積

#### 四、細胞存活率之測定 (Cell viability assay)

將培養盤的細胞培養液移除，以 PBS 清洗兩次，再加入適量的 trypsin-EDTA，使細胞剝落後，加入適量培養液中和 trypsin 作用，接著取至 15 ml 離心管，離心 (1200 rpm) 五分鐘移去上清液然後加入培養液將細胞均勻沖散。取 10  $\mu$ l 細胞懸浮液到微量離心管，並加入等體積的 trypan blue (Gibco/BRL) 均勻混合，最後取約 10  $\mu$ l 混合液至計數盤於倒立顯微鏡下觀察並計數。Trypan blue 會滲入死細胞中而被染呈藍色，而活細胞因細胞膜完整，則無法滲入細胞內不會呈藍色。計算方式： $\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{total viable cells (unstained)}}{\text{total cells (stained + unstained)}} \times 100\%$ ，細胞存活率大於 90% 者方可進行隨後之實驗。

#### 五、山藥水萃取

秤取 100 公克購自於港香蘭藥廠股份有限公司 (台灣) 的乾燥山藥 (*Dioscorea alata* L.) 粉末，並予以加入 1000 mL 的二次水 (ddH<sub>2</sub>O)，繼而將所形成的混合物於 100°C 下加熱煮沸歷時 15 至 20 分鐘。之後，於 40°C 以旋轉式減壓濃縮機 (LABOROTA 400/G3/WB, Heidolph) 進行濃縮歷時 1 小時，繼而以 325 篩目 (mesh) (約  $4.4 \times 10^{-5}$  m) 的分

析篩 (KUANG YANG) 予以過濾而得到一濾液。接著，取 100 mL 的濾液並以冷凍乾燥機 (KINGMECH FD-4.5-12P) 予以冷凍乾燥 12 小時，而得到山藥凍乾粉末 (lyophilized powder)。

## 六、酵素連結免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

### 1. Fibronectin 纖維分析試驗

人類細胞外纖維母蛋白 Fibronectin EIA kit (TAKARA, Japan) 是以固相三明治法來測體外 (細胞培養後的培養液) 人類細胞外纖維母蛋白。首先加入 sample 和 standard 並清洗後再加入標有 peroxidase (POD) 的抗人類細胞外纖維母蛋白的二級抗體，再加入受質反應 15 分鐘呈色後，再以 stop solution 終止反應。步驟：Sample incubation：在 5 分鐘內加入 100  $\mu$ l 的 sample 和 standard，混合均勻，在 37°C 下培養一小時。移除 sample 和 standard solution，再用 washing buffer (含有 0.1% Tween-20 的 PBS) 清洗 3 次後，拍乾。Antibody-POD conjugate incubation：各加入標有 POD 的抗體 100  $\mu$ l 後，混合均勻，在 37°C 下培養一小時。移除 sample 和 standard solution，再用 washing buffer (含有 0.1% Tween-20 的 PBS) 清洗 4 次後，拍乾。Substrate



incubation：各加入 100  $\mu$ l substrate solution，並在室溫下培養 15 分鐘後。再各加入 100  $\mu$ l Stop solution (1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)，並在室溫下培養 15 分鐘後，終止反應。利用 ELISA reader (Bio-Rad/Model550) 以波長 450 nm 測其 OD 值 (加入 Stop solution 後一小時內測完)。

## 2. TGF- $\beta$ 分析試驗

人類 TGF- $\beta$  EIA kit (Quantikine™; R&D Systems, USA) 是以固相三明治法來測體外 (細胞培養後的培養液) 人類細胞外 TGF- $\beta$  表現量。實驗步驟與 Fibronectin 相似，因此簡略。

## 七、細胞溶解物 (cell lysates) 之製備

細胞經過加藥反應適當時間後，移去培養液，以 PBS 沖洗兩次，再將培養培養盤中的殘留液吸乾淨。接著加入適當的 trypsin-EDTA，37°C 作用 5 分鐘後使細胞脫落，並立即加入培養液 (DMEM /5% FCS、100 unit/ml penicillin G 及 100  $\mu$ g/ml streptomycin)，取至新的微量離心管 4°C 離心 1,200 rpm，五分鐘後，倒掉上清液，加入 300  $\mu$ l 細胞溶解緩衝液 (cell lysis buffer：10 mM Tris、1 mM EDTA、1% Triton X-100 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、20 mg/ml aprotinin、20 mg/ml leupeptin、1 mM dithiothreitol、50  $\mu$ g/ml PMSF) 混合均勻，然後在冰浴下以超音波震

碎細胞，每次震盪5秒停1秒十次，再於4°C離心(13000 rpm, 10分鐘)，吸取280 µl上層液(勿觸及沉澱物)為細胞內蛋白質萃取液，置新的微量離心管。蛋白質的濃度測定則採用“Bio-Rad DC Protein Assay”。此法是以胎牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)當標準品，利用紫外光可見光光譜分析儀(Hitachi U-2000, Japan)於波長595 nm測定其吸光值，並依此吸光值做出標準曲線，然後測其檢體之蛋白質濃度。將細胞溶解液加入4倍的SDS-sample Buffer(125 mM Tris、4% SDS、25% glycerol、4 mM EDTA、pH = 6.8)混合製成檢體，於95°C反應5分鐘並儲存於-40°C冰箱保存。

## 八、蛋白質電泳及西方墨點法

### 1. 硫酸十二酯鈉-聚本醯胺凝膠電泳(SDS-PAGE)

製膠及電泳：本實驗所使用的電泳設備購自於 Bio-Rad Laboratories。首先把玻璃膠架(glass plate sandwiches)裝置好，其次配置 10% separating gel (Distilled water、1.5 M Tris-HCl (pH8.8)、10 % SDS、40 % Acrylamide/ Bis、10 % ammonium persulfate、TEMED)，注入玻璃膠架的凹槽，上面輕輕覆蓋一層異丙醇，使 separating gel 壓平，約 30 分鐘 stacking gel 凝結後，倒掉異丙醇，用

Distilled water 稍微沖洗一下，再注入 4% stacking gel (Distilled water、0.5M Tris-HCl (pH6.8)、10 % SDS、40 % Acrylamide/Bis、10 % ammonium persulfate、TEMED)，緩緩插入齒梳 (comb)，避免 stacking gel 產生氣泡。當 stacking gel 凝固後，將 SDS-PAGE 與電泳設備架置，加入適當 1x Running Buffer (0.1 % SDS、25 mM Tris-glycine buffer)，把齒梳拿起，用 3cc 滴管將凹槽所殘留膠沖掉，檢體先離心 12,000g，10 分鐘於 4 °C。再取檢體注入到凹槽內，進行電泳時，跑 stacking gel 電壓為 80 伏特，之後跑 separating gel 為 100 伏特電壓，使檢體跑至 SDS-PAGE 末端。

## 2. 蛋白轉漬

當電泳結束前準備聚二氟乙烯膜 (polyvinylidene difluoride membrane, PVDF membrane) 轉印膜，將裁剪好的 PVDF 膜浸潤在 100% 的甲醇 (Methanol) 中進行活化，之後以二次水浸泡備用。電泳完畢時，將 stacking gel 部分去除浸潤於 Transfer buffer 中，在轉漬槽中注滿 Transfer buffer，打開夾片負極在下依序放入：海棉、一張 3M 濾紙、gel、PVDF 膜、再疊上一張 3M 濾紙、海綿，夾上夾片，放入轉漬槽中以固定電壓 (75V) 轉漬兩個小時。

### 3. 西方墨點法

將轉印後的PVDF膜取出並於室溫下以10% 脫脂牛乳 (skimmed milk) 配於TBST (Tris-Buffered Saline、Tween-20) 中，進行覆蓋處理 (blocking) 於室溫反應1小時，繼而以TBST予以洗滌1次10分鐘。配置適當量內含1：2,000的初級抗體的5%安佳脫脂牛奶之TBST緩衝液，將PVDF轉印膜分別放入各種不同的初級抗體：transformation growth factor- $\beta$  receptor II (T $\beta$ RII)、T $\beta$ RI、pSmad2/3、Smad2/3、Smad4、Smad7、E-cadherin、MMP-2、皆來自Santa Cruz，USA兔子多株抗體， $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) 自Santa Cruz，USA老鼠多株抗體、以及 $\beta$ -actin (1:4,000) 抗體來自Sigma，USA，室溫下反應一個小時，用TBST沖洗3次，每次5分鐘。再各別加入二級抗體1:5000 anti-rabbit：T $\beta$ RII、T $\beta$ RI、pSmad2/3、Smad2/3、Smad4、Smad7、E-cadherin 和 1:8,000  $\beta$ -actin (CALBIOCHEM, 401315)，以及 anti-mouse： $\alpha$ -SMA (Santa Cruz, USA) 反應後，用TBST沖洗3次，每次5分鐘，以ECL kit (Millipore, USA) 呈色，隨後以自動洗片機洗片。

## 九、免疫螢光染色 (Immunofluorescence)

NRK-49F 細胞以  $4 \times 10^3$  cell/well 種於chamber slid之 8 孔盤中，於37°C 培養箱培養24小時後，換新鮮的DMEM培養基含5%的小牛血清及10 mM  $\beta$ -羥丁酸培養48小時，之後換新鮮的DMEM培養基含5%的小牛血清及10 mM  $\beta$ -羥丁酸，並加入200  $\mu$ l/mL山藥萃取物培養24小時。進行細胞免疫螢光染色。將舊的培養液去除，PBS清洗2次，以4 % paraformaldehyde 固定30分鐘，PBS清洗4次，加入0.1% Triton X-100/in PBS作用5分鐘，使細胞膜產生孔隙得以讓染劑進入，PBS清洗4次，細胞在室溫下使用1% BSA (bovine serum albumin) / PBS作用60分鐘，以mouse anti-Snail、anti-Fibronectin (1:100) antibody 4°C 作用隔夜，PBS清洗5次，接著以FITC-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (1:1000) 室溫下作用60分鐘，PBS清洗5次。加入Mounting Medium進行封片。使用螢光顯微鏡照相記錄。

## 十、高效能液相層析 (high performance liquid chromatography, HPLC)

上機前所有溶劑皆需 HPLC 等級，並經過 0.22  $\mu$ m 過濾膜過濾去除氣體，HPLC 操作條件如下：山藥濃度為 10 mg/mL 取 20  $\mu$ l 至儀器

中，流動相為 88% 水/12% 甲醇；設定流速為 0.9 mL/min，時間設定為 20 分鐘，分析管柱為 C18 (Phenomenex)，長度：250 mm × 4.6 mm；UV 偵測器的波長為 260 nm (MD-2010 plus, Jasco)，分析出圖譜。

## 十一、統計分析

本篇研究實驗皆重複二至三次，實驗結果數據以平均值±平均值之標準偏差 (mean ± SD) 所表示。統計分析方法以 Multi Gauge V3.0 軟體於電腦中分析。P 值小於 0.05 在統計上有顯著差異。

### 第三章、結果

#### 一、山藥萃取物之高效能液相層析

由 Figure 1 我們得知，山藥經水萃取產物的 HPLC 洗提圖形 (HPLC elution profile)。

#### 二、 $\beta$ -羥丁酸及山藥萃取物對纖維蛋白之影響

糖尿病腎臟病變普遍發生酮尿及末期腎臟纖維化，造成腎絲球與腎小管細胞的肥大，進而使得腎絲球與腎小管基底膜增厚、腎絲球對白蛋白通透性增加，最終發展成腎絲球與腎小管細胞之細胞外間質增生。所以我們實驗藉由細胞內外分泌纖維蛋白含量的分析來作為細胞纖維化細胞外基質堆積的依據。如 Figure 2 所示， $\beta$ -羥丁酸刺激 NRK-49F 細胞內外分泌纖維蛋白含量的現象，然而，有趣的事我們給予外加不同劑量山藥萃取物 (25、50、100 及 200  $\mu\text{g/ml}$ )，可以劑量性的逆轉  $\beta$ -羥丁酸所誘導的細胞分泌纖維蛋白含量的增加。

#### 三、 $\beta$ -羥丁酸及山藥萃取物對乙型轉型生長因子之影響

許多文獻指出細胞纖維化最主要的因素是來自於乙型轉型生長因子 (TGF- $\beta$ ) 過度表現所導致的結果，所以我們實驗藉由細胞內外

分泌乙型轉型生長因子含量的分析來作為細胞纖維化的產生。如 Figure 3 所示， $\beta$ -羥丁酸刺激 NRK-49F 細胞內外分泌乙型轉型生長因子含量的增加，然而，我們給予外加不同劑量山藥萃取物（25、50、100 及 200  $\mu\text{g/ml}$ ），可以劑量性的逆轉  $\beta$ -羥丁酸所誘導的細胞分泌乙型轉型生長因子含量的增加。

#### 四、觀察山藥萃取物對細胞存活之影響

為了探討山藥萃取物對於  $\beta$ -羥丁酸所誘發的腎臟間質纖維化是否影響細胞存活，首先將 NRK-49F ( $4 \times 10^4$ ) 細胞培養在 25 平方公分的培養盤中，於含 5% FCS 之 DMEM 培養基中生長 24 小時後，換成新鮮的 5% FCS 之 DMEM 培養基內含 10mM  $\beta$ -羥丁酸培養 48 小時之後，再換成新鮮的 5% FCS 之 DMEM 培養基內含 10 mM  $\beta$ -羥丁酸及不同濃度（25、50、100 及 200  $\mu\text{g/ml}$ ）山藥萃取物觀察細胞存活，如 Figure 3 所示，以 trypan blue exclusion assay 來觀察不同濃度山藥萃取物之存活作用，結果顯示  $\beta$ -羥丁酸及不同濃度山藥萃取物處理的實驗組，細胞活性皆高達 90% 以上，與正常對照組以及空白對照組相較之下，沒有顯著的差異存在。



## 五、山藥萃取物對乙型轉型生長因子受器蛋白質表現之影響

進一步探討腎臟細胞纖維化模型，在受到山藥萃取物作用後所產生的細胞內乙型轉型生長因子受器蛋白的影響。如 Figure 5 所示，加入山藥萃取物可顯著的降低（down-regulation）第二型轉型生長因子蛋白質表現量，但是在第一型乙型轉型生長因子受器則不顯著。

## 六、山藥萃取物對 $\beta$ -羥丁酸所誘發腎纖維母細胞 Smad2/3 及 pSmad2/3 表現之影響

由 Figure 6 得知山藥萃取物可以減少第二型轉型生長因子蛋白質表現後，進一步我們將探討其下游 Smad 訊息傳遞路徑是否也受影響。由 Figure 5 所示， $\beta$ -羥丁酸（10 mM）的刺激下，可顯著的增加 Smad2/3 及 Smad2/3 磷酸化（pSmad2/3）蛋白質表現，反之，加入不同劑量山藥萃取物（25、50、100 及 200  $\mu\text{g/ml}$ ），可以劑量性的逆轉  $\beta$ -羥丁酸所誘導的 Smad2/3 及 pSmad2/3 蛋白質的增加。

## 七、山藥萃取物及 $\beta$ -羥丁酸所處理過的腎纖維母細胞其 Smad4 和 Smad7 之表現

從過去文獻我們知道活化的 Smad2/3 磷酸化會與 Smad4（co-Smads）結合成為 pSmad2/3-Smad4 複合體（pSmad2/3-Smad4

complex) 並進著細胞核內，進而啟動纖維蛋白基因的轉錄，然而在 Smad 訊息傳遞作用下 Smad7 蛋白質扮演著抑制的角色，其抑制 Smad4 無法結合成為 pSmad2/3-Smad4 複合體 (pSmad2/3-Smad4 complex) 並進著細胞核內，啟動下游傳遞路徑。於是我們將探討 Smad4 與 Smad7 蛋白質表現。如 Figure 7 所示，加入山藥萃取物可顯著的降低 Smad4 蛋白質表現量，另一方面，Smad7 是一個抑制 Smad2/3 磷酸化的抑制因子，山藥萃取物則可以顯著的增加 Smad7 蛋白質表現，進而抑制纖維連接蛋白基因的轉錄，藉此達到降低細胞外纖維連接蛋白的表現量之效用。

#### 八、 $\beta$ -羥丁酸及山藥萃取物對腎纖維母細胞型態之影響

正常大鼠腎纖維母細胞株 NRK-49F 的型態是上皮狀 (epithelial-like)。過去文獻指出  $\beta$ -羥丁酸會對細胞生長及膠原蛋白產生影響，進而導致細胞外基質堆積。然而細胞外基質過度堆積會造成上皮-間質轉化作用 (Epithelial Mesenchymal Transition, EMT)，變成肌纖維母細胞 (myofibroblasts)，且上皮間質化伴隨型態的發生。我們藉由細胞型態的改變來做為細胞上皮間質轉分化作用。如 Figure 8 所示，NRK-49F 細胞經由  $\beta$ -羥丁酸所處理過的細胞型態呈現間質狀 (mesenchymal-like)，細胞明顯變成細長及紡錘狀。然而加入山藥萃

取物顯著的逆轉  $\beta$ -羥丁酸誘導細胞型態的改變。

## 九、山藥萃取物對上皮-間質轉化蛋白之影響

由 Figure 2 我們得知  $\beta$ -羥丁酸刺激下，會造成纖維蛋白的產生，進而導致細胞纖維化，然而造成纖維化的原因是由於細胞外基質的過度堆積，導致上皮細胞轉分化為肌纖維母細胞（EMT），並促使細胞型態改變，轉化的過程也需要藉由金屬蛋白酶（MMP-2）破壞細胞基底膜（Basement membrane）使細胞具遊走能力，因此我們想進一步探討造成 EMT 主要蛋白質分子 E-cadherin、 $\alpha$ -SMA 以及細胞轉化時金屬蛋白酶的表現。由 Figure 9 我們得知， $\beta$ -羥丁酸刺激下顯著的造成上皮標記分子 E-cadherin 減少，反之，間質標記分子  $\alpha$ -SMA 及金屬蛋白酶 MMP-2 顯著的上升，有趣的事，加入山藥萃取物則逆轉  $\beta$ -羥丁酸所誘導 E-cadherin、 $\alpha$ -SMA 和 MMP-2 蛋白質改變。但是，促使細胞 EMT 的現象其蛋白質在細胞上的分佈如何呢？我們透過免疫螢光染色觀察 E-cadherin 和 Fibronectin 在細胞上的表現，由 Figure 11 發現  $\beta$ -羥丁酸刺激下顯著的造成上皮標記分子 E-cadherin 減少，反之，間質標記分子 Fibronectin 則大量堆積在細胞表面，接下來給予山藥 200  $\mu\text{g/ml}$  劑量下則顯著的逆轉  $\beta$ -羥丁酸所造成的現象。此現象與我們的結果相符合。

## 十、山藥萃取物對轉錄因子 Snail 之影響

從過去文獻我們知道造成 EMT 主要蛋白質分子 (E-cadherin、Fibronectin) 的表現增加及減少，主要是透過轉錄因子 Snail 的影響，來調控下游基因 (E-cadherin、Fibronectin) 的促進或是抑制，於是我們接下來探討轉錄因子 Snail 的表現是否會影響 E-cadherin、Fibronectin，由 Figure 10 所示， $\beta$ -羥丁酸 (10 mM) 的刺激下，可顯著的增加轉錄因子 Snail 蛋白質表現，反之，加入不同劑量山藥萃取物 (25、50、100 及 200  $\mu\text{g/ml}$ )，可以劑量性的逆轉  $\beta$ -羥丁酸所誘導的轉錄因子 Snail 蛋白質的增加。然而轉錄因子 Snail 作用是進入細胞核內調控基因表現，於是我們利用免疫螢光染色觀察轉錄因子 Snail 在細胞上的分佈情況，由 Figure 11 所示， $\beta$ -羥丁酸 (10 mM) 的刺激下，可顯著的增加轉錄因子 Snail 在細胞核表現，然而，再加入 200  $\mu\text{g/ml}$  山藥萃取物，可顯著的抑制轉錄因子 Snail 進入細胞核。由以上結果證實，山藥萃取物可以有效的抑制  $\beta$ -羥丁酸刺激 Snail 蛋白質表現及分佈。

## 第四章、討論

高酮血症、糖尿病、長期高血壓以及藥物的濫用都是造成慢性腎臟病最主要的原因。而腎臟纖維化是所有慢性腎臟病以及正常腎臟老化過程中必經過程，其特徵主要是正常的腎臟結構被不正常的細胞外基質蛋白所取代（如：fibronectin、collagen等），腎小管細胞萎縮、腎小管空腔擴大以及腎絲球硬化(Eddy, 1996)。儘管近幾年來對腎纖維化的病理變化較為明瞭，但目前仍沒有方法可以有效延緩腎臟疾病持續惡化的情形。過去研究發現，肝細胞生長因子、血管緊張素轉換酶抑製劑和紅血球生成素均能拮抗腎間質纖維化和改善腎臟功能(Park et al., 2007; Yang and Liu, 2003)。

山藥的營養豐富，含有大量的澱粉及蛋白質，是世界上主要的糧食作物之一，而我們選用的是大薯品種（*D.alata* L.），其台灣分佈最廣。因此，做為本實驗之研究材料，而且，在許多研究均顯示山藥具有許多醫療效果，如：降低血糖、保護肝腎臟、抗氧化、抗癌(Chang et al., 2004; Hikino et al., 1986; Lee et al., 2002; Wang et al., 2006)。在2002年Hsu等人研究中證實山藥萃取物具有血管緊張素轉化酶抑製劑之能力，簡稱ACEI（Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor），可以用於高血壓的治療，功效相似於目前糖尿病的治療藥物

captopril(Hsu et al., 2002)。然而，山藥萃取物是如何調控腎臟纖維化之機轉目前並不清楚，因此，我們將進一步討可能的作用機制。

在本篇研究中我們利用 $\beta$ -HB建立腎間質纖維化細胞膜型，主要由Guh等人文獻中證實， $\beta$ -HB（體內酮體的主要形式）在腎臟細胞株（HK-2）中可以抑制細胞增生和增加膠原蛋白合成，以及增加p21<sup>WAF1</sup>/p27<sup>kip1</sup>的蛋白質表現(Guh et al., 2003)。正常人血液中酮體的濃度大約在0.1 mM左右，而患有嚴重酮酸症的糖尿病患中，其血清中酮體的含量可以達到3-12.3 mM的濃度(Fulop et al., 1999; Wallace et al., 2001)，此外，根據我們先前的研究也證實， $\beta$ -HB刺激下可成功的誘導fibrosis的增加及TGF- $\beta$ 表現(Yang et al., 2008)。因此，我們實驗結果與先前的研究相符合，10 mM的 $\beta$ -HB在NRK-49細胞中，可顯著的增加fibronectin（figure 2）以及促進TGF- $\beta$ （figure 3）生物活性表現。

近年來許多科學研究證實，山藥除一般營養成份之外，尚含黏液質(mucin)、膽鹼(choline)、尿囊素(allantion)、薯蕷皂甘素(diosgenin)、固醇類皂素(steroid saponins)、山藥多醣、醣蛋白、多種抗養化酵素、澱粉酵素等特殊成份均具有生理活性。過去文獻指出，山藥塊莖含有豐富的固醇類皂素，經水解去掉糖基的配醣體(aglycone)稱為薯蕷皂甘素或薯蕷皂甘配基(diosgenin)，是山藥之主要活性成份，為steroid

saponins之一種，diosgenin之結構與膽固醇相似。經口服後，於肝臟代謝，經膽汁排除；這種固醇類的結構，在人體內可以轉化為其它重要的固醇類藥物相似，故為合成重要醫療用類固醇之基本原料。因此，我們也利用HPLC分析山藥萃取物得到，HPLC洗提圖形 (Figure 1)，未來將進一步確認分析山藥具有哪些有效成份具有抗纖維化之活性。

在腎臟纖維化的研究中，TGF- $\beta$ 1功能上的研究最透徹，也是組織纖維化作用最強的致纖維化因子，其主要特徵是細胞外基質的堆積。因此，TGF- $\beta$ 1在腎纖維化的發展過程中扮演重要角色，(Border and Noble, 1994; Efstratiadis et al., 2009)。假若能有效的抑制TGF- $\beta$ 訊息傳遞，必能阻斷腎臟疾病的發生。另外，在腎臟疾病研究中，指出TGF- $\beta$ /Smad訊息傳遞對腎纖維化是重要的訊息傳遞路徑(Wang et al., 2005)。

本實驗結果發現，第二型乙型轉型生長因子受器蛋白質可以透過抑制 $\beta$ -羥丁酸增加，亦發現山藥可以透過抑制 $\beta$ -羥丁酸所誘導第二型乙型轉型生長因子受器蛋白質增加 (Figure 5A)。然而，在第一型乙型轉型生長因子受器蛋白質的變化，亦發現山藥治療下並無顯著性差異 (Figure 5B)。這與我們的參考文獻並不符合(Chiang et al., 2010)。

雖然第一型受器沒有變化，可能是因為活化部位改變所影響，需要未來將再進一步觀察受器上活化部位是否受到影響。

我們進一步探討山藥對於TGF- $\beta$ 下游Smads訊息傳導路徑變化。實驗結果發現山藥會抑制 $\beta$ -羥丁酸所誘導Smad2/3、磷酸化Smad2/3 (Figure 6)及Smad4之增加(Figure 7A);另一方面，山藥會刺激Smad7表現增加 (Figure 7B)。我們從文獻得知，Smad7是一種抑制型的蛋白質，當Smad2過度表現時啟動負回饋抑制來抑制smad2的活化，使得下游的信息路徑受到阻斷(Fukasawa et al., 2004; Li et al., 2002)。因此，我們發現山藥可能是增加Smad7表現，阻斷Smad2/3造成纖維訊息受調控。因此我們推測，在 $\beta$ -羥丁酸誘導乙型轉型生長因子自泌作用後，乙型轉型生長因子與第二型乙型轉型生長因子受器結合，促使第二型乙型轉型生長因子受器磷酸化，接著與第一型乙型轉型生長因子受器形成複合物，而活化下游Smads訊息傳導路徑，使得細胞核內的胞外基質基因啟動，增加腎纖維化的發生。

最近的研究發現，腎臟纖維化形成的原因會由EMT過程所導致，而TGF- $\beta$ 具有誘導腎臟細胞進行EMT的能力，並且會刺激細胞分泌EMT markers，EMT主要特徵是上皮細胞轉變成間質細胞型態，其調控機制是由於細胞與細胞間連接蛋白E-cadherin受到調控，使得表現



量降低，改變細胞型態，導致細胞骨架重組，此外間質標記蛋白 $\alpha$ -SMA會大量表現，並分泌基質金屬蛋白酶，像是MMP-2和MMP-9，因而破壞腎小管基底膜，促使細胞轉移(Dominguez et al., 2003; Yang and Liu, 2001; Yoshino et al., 2007)。有研究指出轉錄因子Snail的大量表現與TGF- $\beta$ 的調控及EMT的轉變有關(Burns et al., 2007; Xu et al., 2009; Yang and Liu, 2001; Zeisberg and Kalluri, 2004)。然而，TGF- $\beta$ 造成細胞EMT的現象產生，則是透過Smad訊息傳導路徑活化，進而使一些相關外基質蛋白的基因被啟動，包括fibronectin、膠原蛋白等(Yeh et al., 2010)。因此我們將探討山藥是否會影響EMT過程。

我們的實驗結果也證實 (Figure 8)， $\beta$ -羥丁酸改變了NRK-49F細胞原來的形態呈紡錘狀，加入山藥萃取物則逆轉其現象。另一方面，我們的結果顯示 (Figure 9)，NRK-49F細胞單獨處理 $\beta$ -羥丁酸72小時後，上皮細胞表現標記蛋白 (E-cadherin) 表現減少；間質細胞表現標記蛋白 ( $\alpha$ -SMA) 及金屬蛋白酶 (MMP-2) 明顯增加；以及轉錄因子Snail大量表現 (Figure 10)，結果表是NRK-49F細胞在 $\beta$ -羥丁酸刺激下可能透過Snail的調控進行EMT的過程；反之，加入山藥萃取物則逆轉期現象。然而，山藥是否會影響轉錄因子Snail來調控EMT的過程，未來還需要利用RNAi的技術，將Snail的表現抑制，觀察下游的訊息

分子是否會受到調控，才能得知。

綜合以上結果得知，透過抑制EMT而減少肌纖維母細胞的分布，可能是山藥萃取物抗纖維化作用的機轉之一，推測應該也是與阻斷TGF- $\beta$ 1訊息的傳遞有關。而山藥被深入研究出具有抗腎纖維化的效果及深究其機轉後。冀望可運用於保健食品之開發，並且在糖尿病腎病變的疾病發展能達“預防重於治療”之目的。

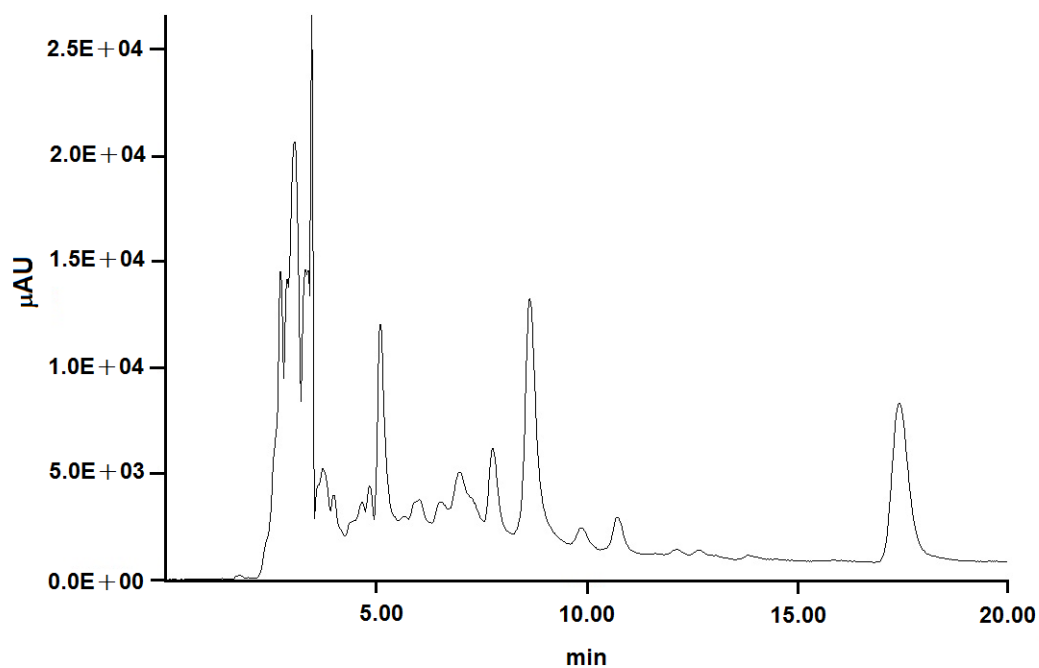
## 第五章、結論

本實驗使用  $\beta$ -羥丁酸誘發人類腎臟纖維化模式。此模式的建立評估中藥複方之於腎臟纖維化之療效。從我們的研究結果發現山藥萃取物具有多項藥理特性。總結如下：

- 一、給與山藥萃取物對  $\beta$ -羥丁酸引發腎纖維化的保護作用，其機轉可能與直接抑制 profibrotic cytokine (TGF- $\beta$ 1) 的產生有關。
- 二、給與山藥萃取物對  $\beta$ -羥丁酸引發腎纖維化的抑制作用，其機轉與抑制 TGF- $\beta$ 1/ Smads 的訊息傳遞，導致相關分子的表現減少有關。
- 三、給與山藥萃取物對  $\beta$ -羥丁酸引發腎纖維化的抑制作用，可能也會藉由阻斷 TGF- $\beta$ 1/ Smads 路徑減少細胞 EMT 之現象。
- 四、阻斷 TGF- $\beta$ 1/ Smads 路徑減少細胞 EMT 之現象，也可能是促進抑制型 Smad7 大量表現，來降低纖維母細胞的纖維化。

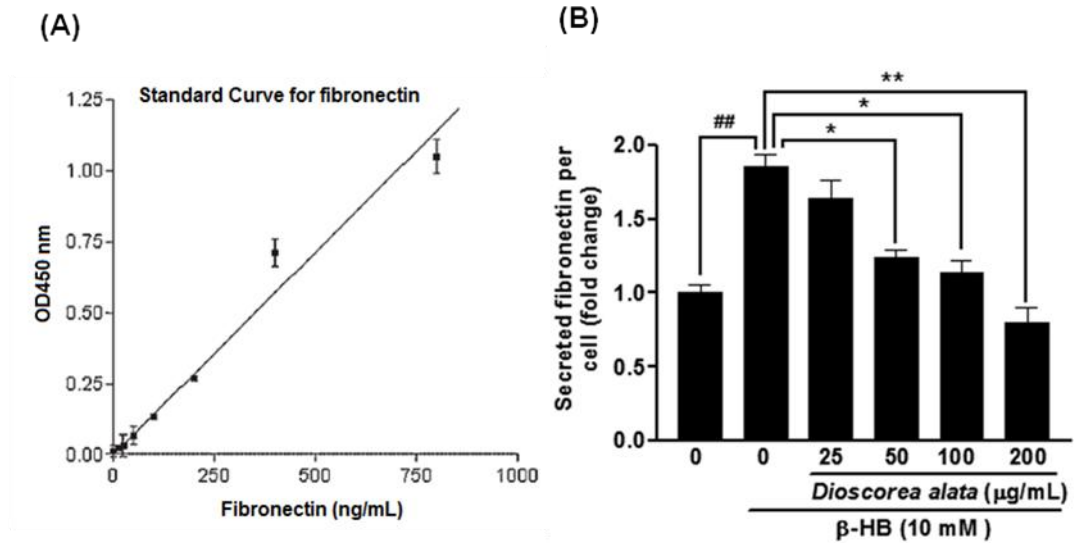
此結果說明傳統抗發炎中藥山藥在生物體內的藥效展現，有助於日後對山藥其有效成分之作用加以分析研究。

## 第六章、圖表

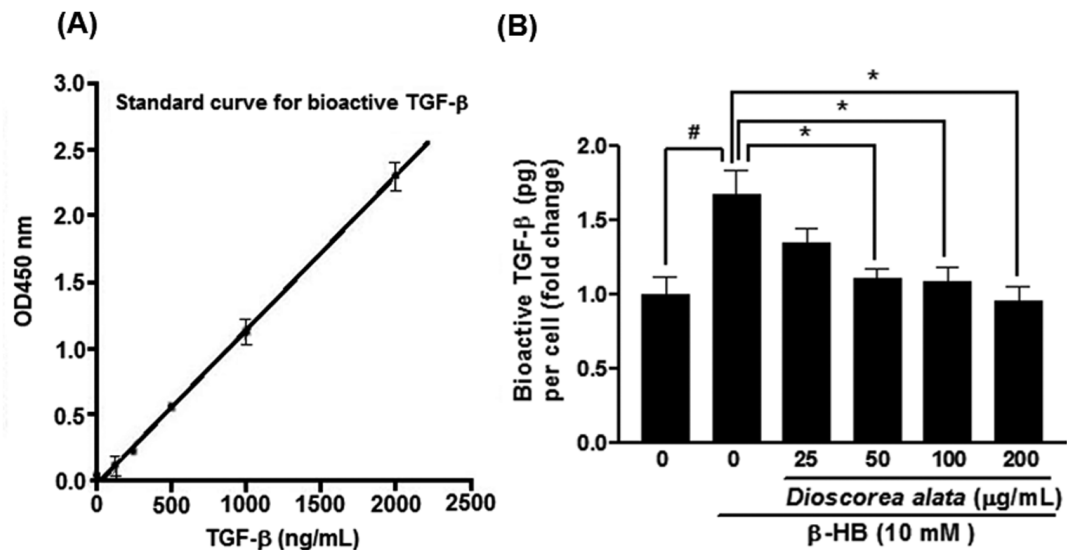


**Figure 1.** HPLC chromatograms of the extract of *Dioscorea alata*.

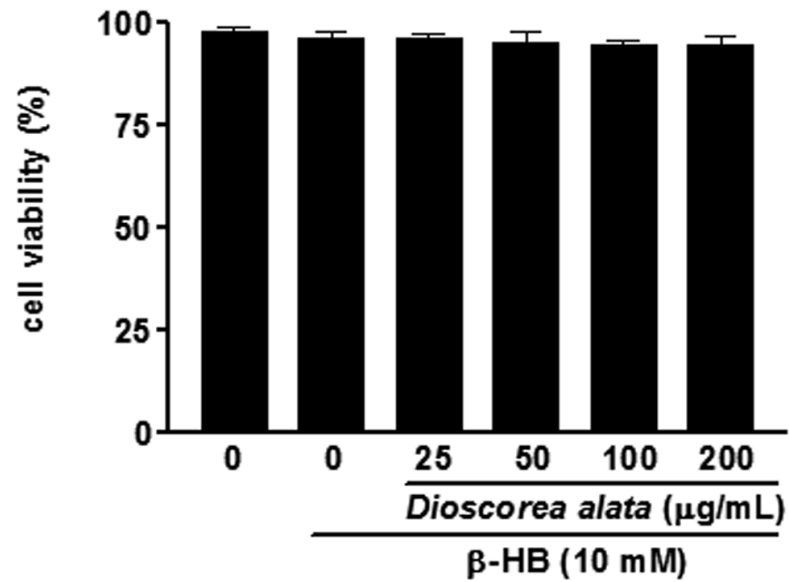
HPLC conditions: column, Phenomenex C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase consisted of water-methanol (50:50); UV detection wavelength: 260 nm; flow rate, 0.9ml/min.



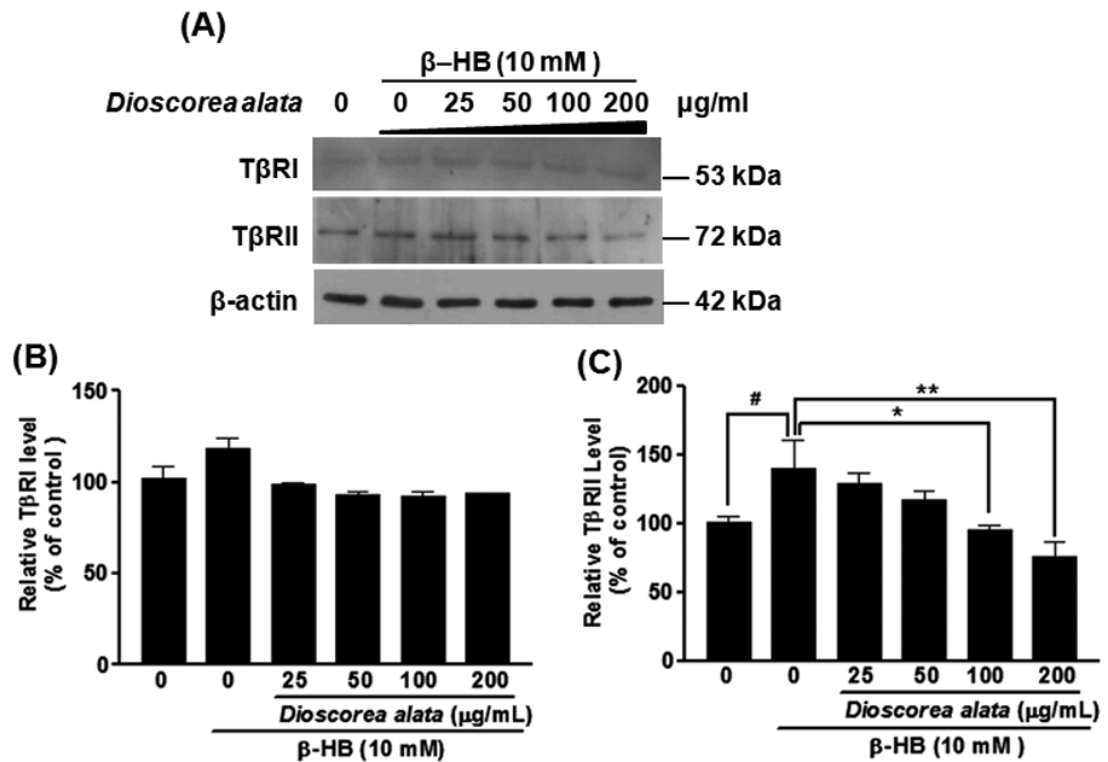
**Figure 2.** Effects of DA extract on  $\beta$ -HB-induced fibronectin secretion in renal fibroblast cells. A: Standard curves were generated using known concentrations of fibronectin (12.5, 25, 50, 100, 200, 400, and 800 ng/ml). ELISA was performed as the manufacturer’s instructions. The absorbance (450 nm) of each sample was then analyzed by an ELISA reader. B: Cells were treated with  $\beta$ -HB (10 mM) in 5% FCS for 48 h, followed by treatment with water extract of DA for another 24 h. Supernatant was collected and subjected to fibronectin ELISA analysis. Fibronectin level was determined by interpolation with the standard curve. The fibronectin level of each condition was normalized to the cell number of each well. It is evident that  $\beta$ -HB induced a significant increase in fibronectin levels. In addition, the DA extracts dose-dependently attenuated  $\beta$ -HB-induced increase in fibronectin level.  $^{###}P < 0.05$ ,  $^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ .



**Figure 3.** Effects of DA extract on the level of secreted bioactive TGF-β1. **(A):** To establish the standard curve for TGF-β1 ELISA assay, exogenous TGF-β1 (from 0 to 2,000 pg/ml) was used as a standard. The absorbance (450 nm) of each sample was correlated with the concentration of TGF-β1. Linear regression was performed as above. **(B):** Cells were treated with β-HB (10 mM) in 5% FCS for 48 h, followed by treatment with water extract of DA for another 24 h. The supernatant was then collected and subjected to TGF-β1 ELISA analysis. The secreted level for each experimental condition was normalized according to cell number. Measurements were repeated twice and similar results obtained. It is evident that DA extract dose-dependently induced a significant decrease in TGF-β1 secretion in NRK cells. <sup>#</sup>*P* < 0.05, <sup>\*</sup>*P* < 0.05.

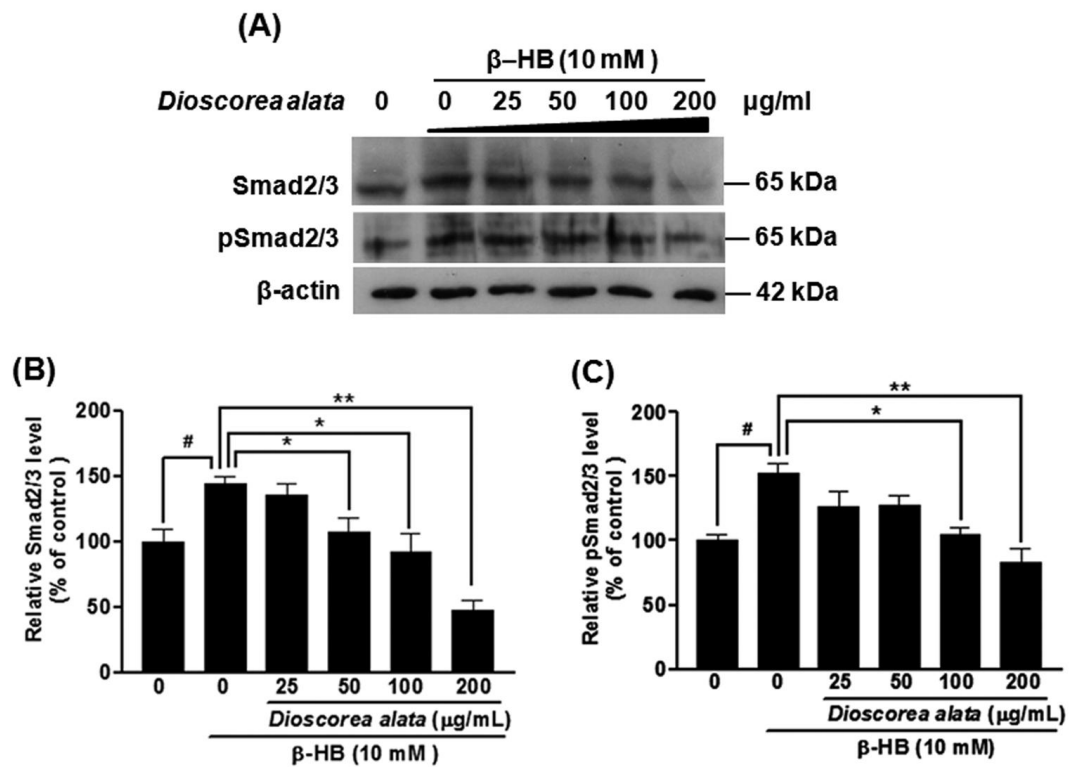


**Figure 4.** Effects of DA extract on cellular viability by trypan blue. Cells were treated with  $\beta$ -HB (10 mM) in 5% FCS for 48 h, followed by treatment with water extract of DA (0, 25, 50, 100, and 200  $\mu\text{g/ml}$ ) for another 24 h. The remaining cell layer was subjected to trypan blue exclusion assay. It is evident that DA extract does not affect the viability of culture cells.

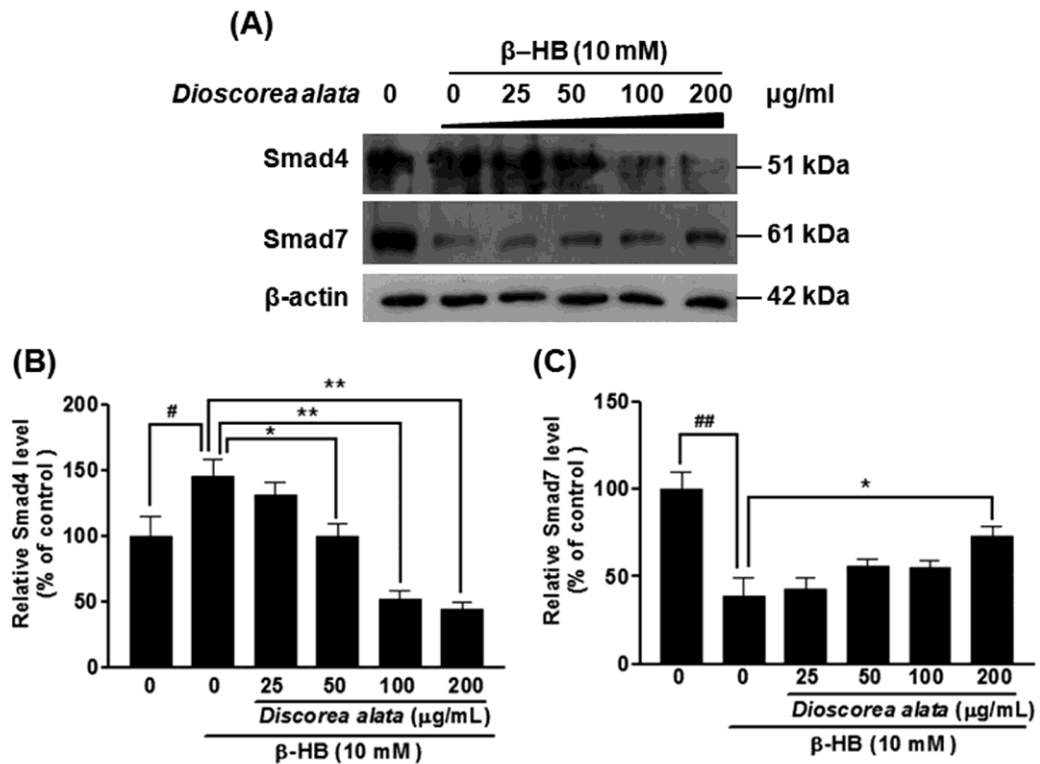


**Figure 5.** Effects of DA extract on  $\beta$ -HB-induced TGF- $\beta$  receptor expression in NRK cells. (A): NRK Cells were treated with  $\beta$ -HB (10 mM) in 5% FCS for 48 h, followed by treatment with water extract of DA for another 24 h. For Western blot analysis (A), cell extracts were subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with a primary antibody against T $\beta$ RI and T $\beta$ RII.  $\beta$ -actin was used as a internal control. The expression of T $\beta$ RI (B) and T $\beta$ RII (C) proteins was normalized to that of  $\beta$ -actin. Results were expressed as mean  $\pm$  SD of three observations. It is evident that DA extract significantly reduced  $\beta$ -HB-induced increase in the expression level of T $\beta$ RII.  $\#P < 0.05$ ,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ .

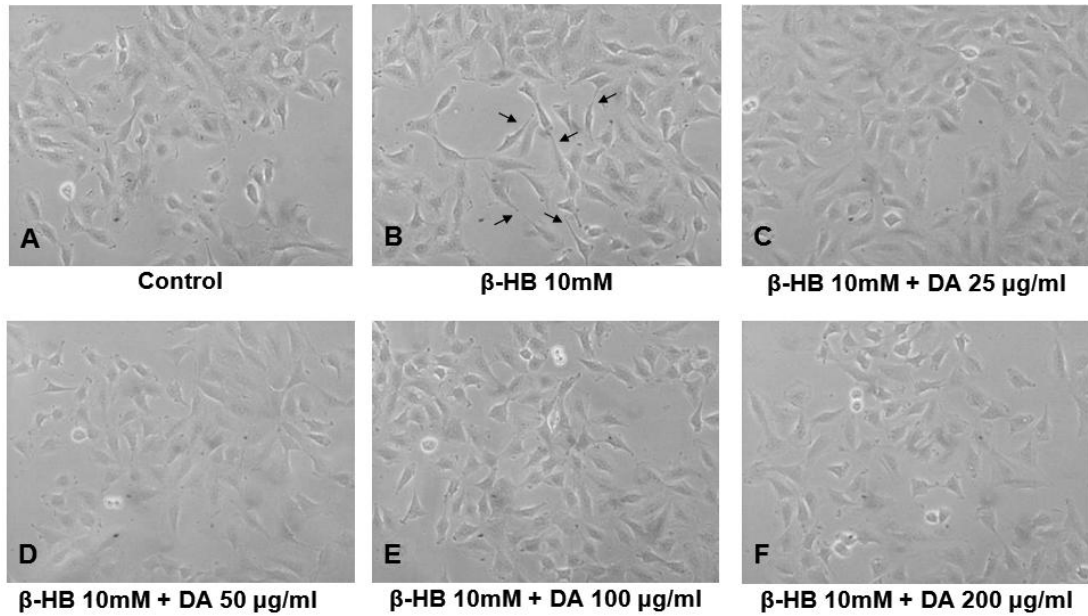




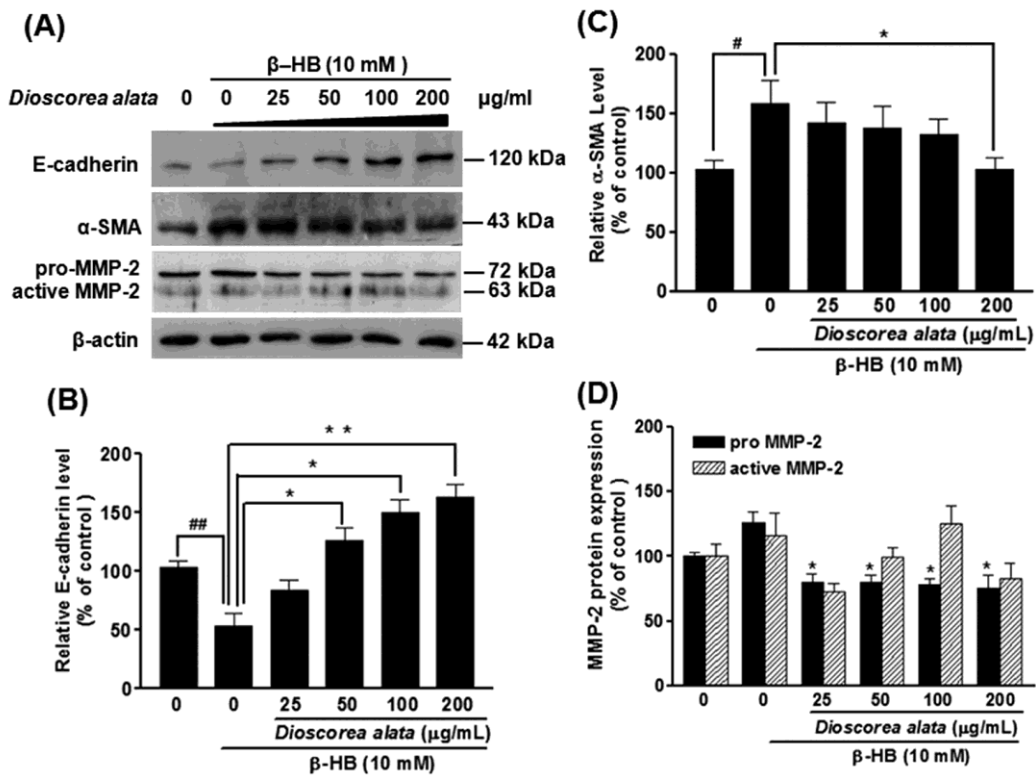
**Figure 6.** Effects of DA extract on  $\beta$ -HB-induced Smad2/3, pSmad2/3 expression in NRK cells. NRK Cells were treated with  $\beta$ -HB (10mM) in 5% FCS for 48 h, followed by treatment with water extract of DA for another 24 h. Western blot analysis (A), cell extracts were subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with a primary antibody against Smad2/3 and pSmad2/3. (B), (C): The expression of  $\beta$ -actin was used as an internal control. Data were scanned and normalized to that of  $\beta$ -actin. It is evident that that DA extract significantly reduced  $\beta$ -HB-induced increase in the expression level of Smad2/3 and pSmad2/3.  $\#P < 0.05$ ,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ .



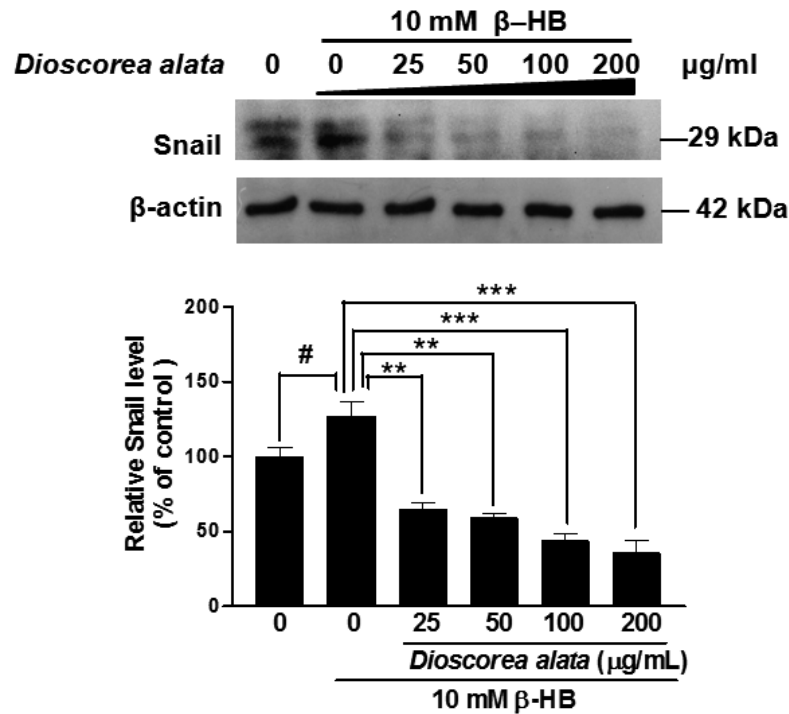
**Figure 7.** Alteration of cellular levels of Smad4 and Smad7 in NRK cells treated with DA extract and exposed to β-HB. NRK Cells were treated with β-HB (10mM) in 5% FCS for 48 h, followed by treatment with water extract of DA for another 24 h. For Western blot analysis (A), cell extracts were subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with a primary antibody against Smad4 and Smad7. β-Actin protein was used as an internal control. (B), (C): Data were scanned and normalized to that of β-actin. It is evident that β-HB induced an increase in Smad4 and a decrease in Smad7; importantly, DA extract significantly reversed β-HB-induced increase in Smad4 and the decrease in Smad7.  $^{##}P < 0.01$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{*}P < 0.05$ .



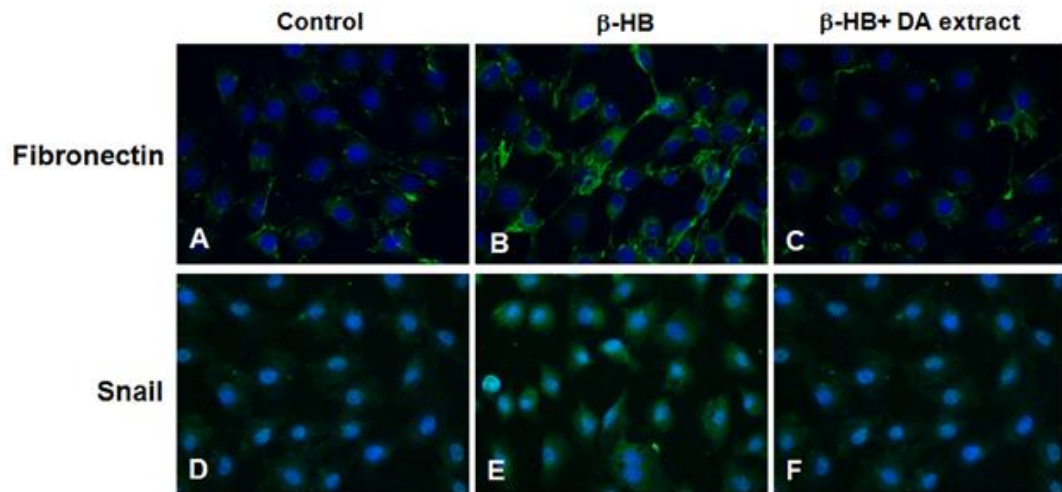
**Figure 8.** Effect of DA extract on phenotypic transformation of tubular epithelial to myofibroblasts in NRK-49F induced by  $\beta$ -HB.  $\beta$ -HB induced the typical cobblestone shape of cells to become elongated and spindle-like in appearance (as arrows indicated). DA extract on  $\beta$ -HB-induced morphological changes, whereas DA extract treatment blocked the morphologic transformation.



**Figure 9.** Immunoblot analyses of E-cadherin,  $\alpha$ -SMA and MMP-2. NRK-49F Cells were treated with  $\beta$ -HB (10 mM) in 5% FCS for 48 h, followed by treatment with water extract of DA for another 24 h. For Western blot analysis (A), cell extracts were subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with a primary antibody against E-cadherin,  $\alpha$ -SMA and MMP-2.  $\beta$ -actin as a internal control. (B), (C) and (D): Densitometry analysis from A is shown. It is evident that  $\beta$ -HB induced an increase in  $\alpha$ -SMA, MMP-2 and a decrease in E-cadherin; importantly, DA significantly reversed  $\beta$ -HB -induced increase in  $\alpha$ -SMA, MMP-2 and the decrease in E-cadherin. The experiment was duplicated with similar results observed. # $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ .



**Figure 10.** Western blot analysis of transcription factor Snail expression in NRK-49F cells. NRK-49F Cells were treated with β-HB (10 mM) in 5% FCS for 48 h, followed by treatment with water extract of safflower for another 24 h. After NRK-49F Cells culture protocols, SDS-PAGE was performed with cell extracts or culture media and Western blot analysis with a primary antibody against Snail (**up**). β-Actin protein was used as an internal control. Graphic presentation of the relative expression of Snail (**down**). DA extract decreased Snail expression induced by β-HB in a dose-dependent manner. <sup>#</sup>*P* < 0.05, \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01.



**Figure 11.** The effects of DA extract on NRK-49F cell fibronectin and Snail expression in NRK-49F cells. DA extract treatment decreased the  $\beta$ -HB–induced fibronectin (A through C, green) and Snail (D through F, green) expression in NRK-49F (A and D ) control. (B and E)  $\beta$ -HB (10 mM). (C and F)  $\beta$ -HB plus DA extract (200  $\mu$ g/mL). DAPI was used to visualize the nucleus (blue).

## 第七章、参考文献

Border, W.A., and Noble, N.A. (1994). Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 331, 1286-1292.

Bottinger, E.P., and Bitzer, M. (2002). TGF-beta signaling in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 13, 2600-2610.

Boutet, A., De Frutos, C.A., Maxwell, P.H., Mayol, M.J., Romero, J., and Nieto, M.A. (2006). Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney. *EMBO J* 25, 5603-5613.

Brodin, G., ten Dijke, P., Funa, K., Heldin, C.H., and Landstrom, M. (1999). Increased smad expression and activation are associated with apoptosis in normal and malignant prostate after castration. *Cancer Res* 59, 2731-2738.

Burns, W.C., Kantharidis, P., and Thomas, M.C. (2007). The role of tubular epithelial-mesenchymal transition in progressive kidney disease. *Cells Tissues Organs* 185, 222-231.

Camara, J., and Jarai, G. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in primary human bronchial epithelial cells is Smad-dependent and enhanced by fibronectin and TNF-alpha. *Fibrogenesis Tissue Repair* 3, 2.

Cano, A., Perez-Moreno, M.A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M.J., del Barrio, M.G., Portillo, F., and Nieto, M.A. (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing

E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2, 76-83.

Cayen, M.N., and Dvornik, D. (1979). Effect of diosgenin on lipid metabolism in rats. *J Lipid Res* 20, 162-174.

Chang, S.J., Lee, Y.C., Liu, S.Y., and Chang, T.W. (2004). Chinese yam (*Dioscorea alata* cv. Tainung No. 2) feeding exhibited antioxidative effects in hyperhomocysteinemia rats. *J Agric Food Chem* 52, 1720-1725.

Chiang, T.A., Yang, Y.L., Yang, Y.Y., Hu, M.H., Wu, P.F., Liu, S.F., Huang, R.M., Liao, T.N., Hung, C.Y., Hung, T.J., *et al.* (2010). Hyperosmolarity enhanced susceptibility to renal tubular fibrosis by modulating catabolism of type I transforming growth factor-beta receptors. *J Cell Biochem* 109, 663-671.

Choi, E.M., Koo, S.J., and Hwang, J.K. (2004). Immune cell stimulating activity of mucopolysaccharide isolated from yam (*Dioscorea batatas*). *J Ethnopharmacol* 91, 1-6.

Comijn, J., Berx, G., Vermassen, P., Verschueren, K., van Grunsven, L., Bruyneel, E., Mareel, M., Huylebroeck, D., and van Roy, F. (2001). The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell* 7, 1267-1278.

Crosby, L.M., and Waters, C.M. (2010). Epithelial repair mechanisms in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 298, L715-731.

de Larco, J.E., and Todaro, G.J. (1978). Growth factors from murine



sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 4001-4005.

Derynck, R. (1994). Tgf-Beta-Receptor-Mediated Signaling. *Trends Biochem Sci* 19, 548-553.

Dominguez, D., Montserrat-Sentis, B., Virgos-Soler, A., Guaita, S., Grueso, J., Porta, M., Puig, I., Baulida, J., Franci, C., and Garcia de Herreros, A. (2003). Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor. *Mol Cell Biol* 23, 5078-5089.

Eddy, A.A. (1996). Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 7, 2495-2508.

Efstratiadis, G., Divani, M., Katsioulis, E., and Vergoulas, G. (2009). Renal fibrosis. *Hippokratia* 13, 224-229.

Fukasawa, H., Yamamoto, T., Togawa, A., Ohashi, N., Fujigaki, Y., Oda, T., Uchida, C., Kitagawa, K., Hattori, T., Suzuki, S., *et al.* (2004). Down-regulation of Smad7 expression by ubiquitin-dependent degradation contributes to renal fibrosis in obstructive nephropathy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8687-8692.

Fulop, M., Murthy, V., Michilli, A., Nalamati, J., Qian, Q., and Saitowitz, A. (1999). Serum beta-hydroxybutyrate measurement in patients with uncontrolled diabetes mellitus. *Arch Intern Med* 159, 381-384.

Gabbiani, G. (1992). The biology of the myofibroblast. *Kidney Int* 41, 530-532.

Grande, J.P. (1997). Role of transforming growth factor-beta in tissue injury and repair. *Proc Soc Exp Biol Med* 214, 27-40.

Greenburg, G., and Hay, E.D. (1982). Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol* 95, 333-339.

Guh, J.Y., Chuang, T.D., Chen, H.C., Hung, W.C., Lai, Y.H., Shin, S.J., and Chuang, L.Y. (2003). Beta-hydroxybutyrate-induced growth inhibition and collagen production in HK-2 cells are dependent on TGF-beta and Smad3. *Kidney Int* 64, 2041-2051.

Hajra, K.M., Chen, D.Y., and Fearon, E.R. (2002). The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res* 62, 1613-1618.

Hanyu, A., Ishidou, Y., Ebisawa, T., Shimanuki, T., Imamura, T., and Miyazono, K. (2001). The N domain of Smad7 is essential for specific inhibition of transforming growth factor-beta signaling. *J Cell Biol* 155, 1017-1027.

Hay, E.D., and Zuk, A. (1995). Transformations between epithelium and mesenchyme: normal, pathological, and experimentally induced. *Am J Kidney Dis* 26, 678-690.

Heldin, C.H., Miyazono, K., and ten Dijke, P. (1997). TGF-beta signalling

from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465-471.

Hewitson, T.D. (2009). Renal tubulointerstitial fibrosis: common but never simple. *Am J Physiol Renal Physiol* 296, F1239-1244.

Hikino, H., Konno, C., Takahashi, M., Murakami, M., Kato, Y., Karikura, M., and Hayashi, T. (1986). Isolation and Hypoglycemic Activity of Dioscorans A, B, C, D, E, and F; Glycans of *Dioscorea japonica* Rhizophors1. *Planta Med* 52, 168-171.

Hirohashi, S. (1998). Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol* 153, 333-339.

Hocevar, B.A., and Howe, P.H. (1998). Mechanisms of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Miner Electrol Metab* 24, 131-135.

Hou, W.C., Hsu, F.L., and Lee, M.H. (2002). Yam (*Dioscorea batatas*) tuber mucilage exhibited antioxidant activities in vitro. *Planta Med* 68, 1072-1076.

Hsu, F.L., Lin, Y.H., Lee, M.H., Lin, C.L., and Hou, W.C. (2002). Both dioscorin, the tuber storage protein of yam (*Dioscorea alata* cv. Tainong No. 1), and its peptic hydrolysates exhibited angiotensin converting enzyme inhibitory activities. *J Agric Food Chem* 50, 6109-6113.

Itoh, S., Itoh, F., Goumans, M.J., and Ten Dijke, P. (2000). Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins.

Eur J Biochem 267, 6954-6967.

Jamora, C., and Fuchs, E. (2002). Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nat Cell Biol* 4, E101-108.

Kavsak, P., Rasmussen, R.K., Causing, C.G., Bonni, S., Zhu, H.T., Thomsen, G.H., and Wrana, J.L. (2000). Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Molecular Cell* 6, 1365-1375.

Kelleher, F.C., Fennelly, D., and Rafferty, M. (2006). Common critical pathways in embryogenesis and cancer. *Acta Oncol* 45, 375-388.

Kenny, H.A., Kaur, S., Coussens, L.M., and Lengyel, E. (2008). The initial steps of ovarian cancer cell metastasis are mediated by MMP-2 cleavage of vitronectin and fibronectin. *J Clin Invest* 118, 1367-1379.

Kuhn, C., and McDonald, J.A. (1991). The roles of the myofibroblast in idiopathic pulmonary fibrosis. Ultrastructural and immunohistochemical features of sites of active extracellular matrix synthesis. *Am J Pathol* 138, 1257-1265.

Lagna, G., Hata, A., Hemmati-Brivanlou, A., and Massague, J. (1996). Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways. *Nature* 383, 832-836.

Lee, S., Tsai, C., Chen, J., LIM, J., Lin, C., Hu, M., and Lu, S. (2002). Effects of Chinese yam on hepato-nephrotoxicity of acetaminophen in

rats. Zh ngguo yaoli xuebao 23, 503-508.

Li, J.H., Zhu, H.J., Huang, X.R., Lai, K.N., Johnson, R.J., and Lan, H.Y. (2002). Smad7 inhibits fibrotic effect of TGF-Beta on renal tubular epithelial cells by blocking Smad2 activation. J Am Soc Nephrol 13, 1464-1472.

Li, Y.J., Tan, X.Y., Dai, C.S., Stolz, D.B., Wang, D., and Liu, Y.H. (2009). Inhibition of Integrin-Linked Kinase Attenuates Renal Interstitial Fibrosis. Journal of the American Society of Nephrology 20, 1907-1918.

Liu, T.S. and Huang, T.C. (1962). On the Taiwan species of Dioscorea. Bot. Bull. Acad. Sin. 3, 133-149.

Liu, Y. (2006). Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. Kidney Int 69, 213-217.

Miyazono, K. (2009). Transforming growth factor-beta signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 85, 314-323.

Nieto, M.A. (2002). The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. Nat Rev Mol Cell Biol 3, 155-166.

Park, S.H., Choi, M.J., Song, I.K., Choi, S.Y., Nam, J.O., Kim, C.D., Lee, B.H., Park, R.W., Park, K.M., Kim, Y.J., *et al.* (2007). Erythropoietin decreases renal fibrosis in mice with ureteral obstruction: role of inhibiting TGF-beta-induced epithelial-to-mesenchymal transition. J Am

Soc Nephrol *18*, 1497-1507.

Roberts, A.B., Tian, F., Byfield, S.D., Stuelten, C., Ooshima, A., Saika, S., and Flanders, K.C. (2006). Smad3 is key to TGF-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition, fibrosis, tumor suppression and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev* *17*, 19-27.

Saika, S., Kono-Saika, S., Ohnishi, Y., Sato, M., Muragaki, Y., Ooshima, A., Flanders, K.C., Yoo, J., Anzano, M., Liu, C.Y., *et al.* (2004). Smad3 signaling is required for epithelial-mesenchymal transition of lens epithelium after injury. *American Journal of Pathology* *164*, 651-663.

Saika, S., Yamanaka, O., Okada, Y., Tanaka, S., Miyamoto, T., Sumioka, T., Kitano, A., Shirai, K., and Ikeda, K. (2009). TGF beta in fibroproliferative diseases in the eye. *Front Biosci (Schol Ed)* *1*, 376-390.

Sato, M., Muragaki, Y., Saika, S., Roberts, A.B., and Ooshima, A. (2003). Targeted disruption of TGF-beta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *J Clin Invest* *112*, 1486-1494.

Segev, Y., Landau, D., Marbach, M., Shehadeh, N., Flyvbjerg, A., and Phillip, M. (1997). Renal hypertrophy in hyperglycemic non-obese diabetic mice is associated with persistent renal accumulation of insulin-like growth factor I. *J Am Soc Nephrol* *8*, 436-444.

Serini, G., Bochaton-Piallat, M.L., Ropraz, P., Geinoz, A., Borsi, L., Zardi, L., and Gabbiani, G. (1998). The fibronectin domain ED-A is crucial for

myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1. *J Cell Biol* 142, 873-881.

Shihab, F.S. (2007). Do we have a pill for renal fibrosis? *Clin J Am Soc Nephrol* 2, 876-878.

Silbiger, S., Lei, J., and Neugarten, J. (1999). Estradiol suppresses type I collagen synthesis in mesangial cells via activation of activator protein-1. *Kidney Int* 55, 1268-1276.

Sugiura, T., Yamauchi, A., Kitamura, H., Matsuoka, Y., Horio, M., Imai, E., and Hori, M. (1999). High water intake ameliorates tubulointerstitial injury in rats with subtotal nephrectomy: possible role of TGF-beta. *Kidney Int* 55, 1800-1810.

Vrljicak, P., Myburgh, D., Ryan, A., Van Rooijen, M., Mummery, C., and Gupta, I. (2004). Smad expression during kidney development. *American Journal of Physiology- Renal Physiology* 286, 625.

Wallace, T.M., Meston, N.M., Gardner, S.G., and Matthews, D.R. (2001). The hospital and home use of a 30-second hand-held blood ketone meter: guidelines for clinical practice. *Diabet Med* 18, 640-645.

Wang, G., Chen, H., Huang, M., Wang, N., Zhang, J., Zhang, Y., Bai, G., Fong, W.F., Yang, M., and Yao, X. (2006). Methyl protodioscin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 liver cancer cells. *Cancer Lett* 241, 102-109.

Wang, T.S., Liang, S.J., Lii, C.K., and Liu, S.Y. (2004). Protective effect of water yam (*Dioscorea alata* L.) extract on the copper-driven fenton reaction and X-ray induced DNA damage in vitro. *Phytother Res* 18, 325-328.

Wang, W., Koka, V., and Lan, H.Y. (2005). Transforming growth factor-beta and Smad signalling in kidney diseases. *Nephrology (Carlton)* 10, 48-56.

Wolf, G. (1995). Cellular mechanisms of tubule hypertrophy and hyperplasia in renal injury. *Miner Electrolyte Metab* 21, 303-316.

Wolf, G., Killen, P.D., and Neilson, E.G. (1991). Intracellular signaling of transcription and secretion of type IV collagen after angiotensin II-induced cellular hypertrophy in cultured proximal tubular cells. *Cell Regul* 2, 219-227.

Wolf, G., Sharma, K., Chen, Y., Ericksen, M., and Ziyadeh, F.N. (1992). High glucose-induced proliferation in mesangial cells is reversed by autocrine TGF-beta. *Kidney Int* 42, 647-656.

Wolf, G., and Ziyadeh, F.N. (1999). Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int* 56, 393-405.

Wrana, J.L. (1998). TGF-beta receptors and signalling mechanisms. *Miner Electrolyte Metab* 24, 120-130.

Xia, P., and Culp, L.A. (1995). Adhesion activity in fibronectin's



alternatively spliced domain EDa (EIIIA): complementarity to plasma fibronectin functions. *Exp Cell Res* 217, 517-527.

Xu, J., Lamouille, S., and Derynck, R. (2009). TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res* 19, 156-172.

Yang, D., Ma, S., Li, D., Tang, B., and Yang, Y. (2009). Angiotensin II receptor blockade improves matrix metalloproteinases/tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 balance and restores fibronectin expression in rat infarcted myocardium. *Biochem Biophys Res Commun* 388, 606-611.

Yang, G., and Yang, X. (2010). Smad4-mediated TGF-beta signaling in tumorigenesis. *Int J Biol Sci* 6, 1-8.

Yang, J., and Liu, Y. (2001). Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am J Pathol* 159, 1465-1475.

Yang, J., and Liu, Y. (2003). Delayed administration of hepatocyte growth factor reduces renal fibrosis in obstructive nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 284, F349-357.

Yang, Y.L., Chang, S.Y., Teng, H.C., Liu, Y.S., Lee, T.C., Chuang, L.Y., Guh, J.Y., Chang, F.R., Liao, T.N., Huang, J.S., *et al.* (2008). Safflower extract: a novel renal fibrosis antagonist that functions by suppressing autocrine TGF-beta. *J Cell Biochem* 104, 908-919.

Yeh, Y.C., Wei, W.C., Wang, Y.K., Lin, S.C., Sung, J.M., and Tang, M.J.

(2010). Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Induces Smad3-Dependent  $\beta$ 1 Integrin Gene Expression in Epithelial-to-Mesenchymal Transition during Chronic Tubulointerstitial Fibrosis. *Am J Pathol*.

Yoshino, J., Monkawa, T., Tsuji, M., Inukai, M., Itoh, H., and Hayashi, M. (2007). Snail1 is involved in the renal epithelial-mesenchymal transition. *Biochem Biophys Res Commun* 362, 63-68.

Zavadil, J., and Bottinger, E.P. (2005). TGF- $\beta$  and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 24, 5764-5774.

Zeisberg, M., and Kalluri, R. (2004). The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J Mol Med* 82, 175-181.

Zhang, G., Kernan, K.A., Collins, S.J., Cai, X., Lopez-Guisa, J.M., Degen, J.L., Shvil, Y., and Eddy, A.A. (2007). Plasmin(ogen) promotes renal interstitial fibrosis by promoting epithelial-to-mesenchymal transition: role of plasmin-activated signals. *J Am Soc Nephrol* 18, 846-859.

Zhou, G.S., Lee, S.C., Yao, Z.B., and Tan, T.H. (1999). Hematopoietic progenitor kinase 1 is a component of transforming growth factor beta-induced c-Jun N-terminal kinase signaling cascade. *Journal of Biological Chemistry* 274, 13133-13138.