

行政院原子能委員會
委託研究計畫研究報告

2010 醣質藥物於肝衰竭之臨床前應用研究

Preclinical Application Research of Glyco-Drug on Hepatic Failure

計畫編號：992001INER083

受委託機關(構)：台灣大學生物科技研究所&臺大醫院

計畫主持人：李宣書

核研所聯絡人員：王美惠

聯絡電話：0223123456 ext 65193

E-mail address：hslee@ntu.edu.tw

報告日期：2010.11.30

2010醣質藥物於肝衰竭之臨床前應用研究

李宣書

台灣大學生物科技研究所及臺大醫院

摘要

Asialoglycoprotein receptors (ASGP-R) 已知是一種只會出現在肝臟細胞膜上的受體，本計畫擬以核研所開發可與ASGP-R 相結合的藥劑，應用於肝炎肝纖維化、肝癌與肝衰竭等動物模式上，藉由單光子斷層影像與生物體分布定量分析，98年度實驗結果顯示核研醣質藥物專一表現於肝臟。但是肝病變個體相較於正常個體活性表現量較低。本年度針對此現象進一步檢視ASGP-R在組織層面的變化，利用anti-ASGPR抗體觀察確認ASGP-R在臨床肝癌標本上的分佈情形。同時也會利用FITC標誌的醣質藥物，觀察醣質藥物經過ASGP-R進入肝細胞後的運轉及代謝路徑。

根據我們的實驗結果，目前以anti-ASGPR抗體標記臨床肝癌組織上ASGP-R的分佈情形，從western blot與免疫染色的結果，發現ASGP-R在肝癌細胞的分佈情形比正常肝細胞顯著的減少。另外，使用雙光子顯微鏡觀察被FITC標記的醣質藥物從血管進入肝細胞的運轉及代謝路徑，發現ASGP-R對於不同的醣胜肽有專一性。

關鍵字：去唾液酸醣蛋白受體、醣胜肽、肝臟、肝細胞。

核能研究所

2010 Application Research of Glyco-Drug on Hepatic Failure

2010 final report

By

Shuan-Hsu Lee

National Taiwan University Hospital

Abstract

Asialoglycoprotein receptors (ASGP-R) , strictly located on the hepatocyte membrane, can recognize galactose or N-acetylgalactosamine terminal of desialylated glycoprotein or glycopeptide. Sawamura et al. reported that a decrease in the number of ASGP-R led to an accumulation of asialoglycoprotein in the sera of galactosamine-treated rats, and the number of these receptors decreases in patients with chronic liver diseases.

In this study, the comparison between the tumor and non-tumor part of the clinical HCC specimen, it shown that the ASGP-R of tumor part less than the non-tumor part. On the other part, the glycopeptide specificity of ASGP-R on liver hepatocyte was shown that only recognized FITC-GalBSA rather than FITC-BSA or FITC-ManBSA by the two-photon microscopy.

Keyword: asialoglycoprotein receptor (ASGP-R), glycopeptide, liver hepatocyte.

Institute of Nuclear Energy Research

目 錄

1. 前言.....	5
2. 研究方法	6
2.1 肝病變動物模式之建立	6
2.1.1 肝癌模式.....	6
2.1.2 肝纖維化模式.....	6
2.2 組織病理切片檢驗與臨床生化檢驗分析	6
2.3 螢光分子標幟 ASGPR biomarker	6
2.4 標幟螢光分子之 ASGP-R biomarker 於螢光顯微鏡下觀察其在肝 細胞內分布的動力學.....	7
2.5 纖維化肝組織病理切片檢驗與臨床生化檢驗分析	7
3.結果與討論	8
4. 結論與建議	8
5. 參考文獻	9
6. 誌謝.....	11

1. 前言

98 年，我們以核研所之 ASGP-R biomarker，應用於肝纖維化與急性肝炎的動物模式上，評估其作為肝衰竭預後檢驗指標的可行性。這些計畫研究成果皆顯示核研醣質藥物專一表現在肝臟部位，但是活性約為正常肝的一半，因疾病的模式不同甚至更低。

故在 99 年度，為能更進一步瞭解 ASGP-R 在肝病變中的組織數量變化，本計畫將會利用 anti-ASGPR 抗體進行肝病變病理組織切片染色實驗，觀察 ASGP-R 仍存在肝發炎組織上，確認肝病變對 ASGP-R 的影響。另一方面，本計畫同時也會利用 FITC 標誌的醣質藥物，透過高倍螢光及雙光子顯微鏡進行觀察醣質藥物經過 ASGP-R 進入正常肝細胞後的運轉及代謝路徑。

配合核研所肝造影劑開發過程，我們除提供肝病變動物模式外，我們也將提供肝病變鼠血清供核研所進行血清醣質藥物濃度監測與醣質結構鑑定，此等藥動之變化與醣質藥物定性亦為 IND 資料所必需。本計畫若能成功，臨床上急性（猛暴性）肝昏迷、代償性肝炎急性發作、慢性肝衰竭將能用此方法做為預後判斷。臺灣肝移植案例不多，每年約 100 個人（全世界約 2 萬人），但需要做這些判斷的人很多，分母需求很大。本計畫預期先完成醣質藥物於肝衰竭之臨床前應用研究，包括安全性與有效性數據獲得，做為將來人體試驗申請之依據，其最終目標在訂定出肝移植所相對之肝功能閾值。

2. 研究方法

2.1 肝病變動物模式之建立

2.1.1 肝癌模式

以同樣大鼠，於飲水中加入 100 ppm 的 nitro-diethylsamine，餵食 12 到 16 星期後犧牲，收集肝組織（包括腫瘤部分）進行病理切片分析。

2.1.2 肝纖維化模式

誘發小鼠肝纖維化的方法參考本小組之前的作法，使用 4-5 週大的 Balb/c 小鼠，在飲用水中，加入 0.03% 的硫代乙酰胺（TAA, thioacetamide）。飲用兩週後，待小鼠體重穩定，提高硫代乙酰胺（TAA）濃度至 0.04%。每 2-3 天更換一次飲用水，餵食到第 10 週，每週秤小鼠體重並紀錄之。

2.2 組織病理切片檢驗與臨床生化檢驗分析

收集的肝組織浸泡於 10% 的福馬林溶液固定之，兩天後以石蠟包埋，並製備約 5-7 μm 厚度的切片，進行 hematoxylin & eosin 染色，於顯微鏡下觀察與照像。肝纖維組織（肝纖維化及肝硬化的診斷）以 Sirius red 染色，並以 photoshop 軟體算出纖維組織所佔之比率來代表纖維化/硬化的嚴重程度。臨床血液生化分析由自動化機器測量上述肝臟相關之生化指標。

2.3 螢光分子標幟 ASGPR biomarker

螢光分子標幟 ASGPR biomarker 之製備：(1) 活化量子點微結晶（quantum dot）- 將量子點加入 SMCC 溶液，於室溫反應 1 小時。(2) 還原蛋白質 - 將 DTT 溶液加入蛋白質溶液，於室溫反應 30 分鐘。(3) 去鹽純化 - 將已活化量子點及已還原蛋白質分

別加到兩根去鹽管柱，以交換緩衝液流洗純化並收集。(4) 結合反應 - 將已去鹽之量子點及蛋白質混合，於室溫反應 1 小時後，加入 2-mercaptoethanol 溶液，於室溫反應 30 分鐘。之後利用高速離心將反應溶液濃縮至 40 μ L。(5) 純化最終產物 - 將濃縮反應溶液加入凝膠管柱，以 PBS 緩衝液流洗純化並收集，最後加入 sodium azide，保存於 4°C，以備後續實驗使用。

2.4 標幟螢光分子之 ASGP-R biomarker 於螢光顯微鏡下觀察其在肝細胞內分布的動力學

將採用 6 週大之正常老鼠或肝病變鼠（急性肝炎和肝纖維化），經適當麻醉後將上腹部剖開裝置肝臟視窗，然後施打標幟螢光分子之 ASGP-R biomarker，並於高倍率雙光子顯微鏡下連續觀察此螢光物由肝細胞表面進入細胞內的動力學。並區分正常及受傷細胞間動力學上的差異。

2.5 纖維化肝組織病理切片檢驗與臨床生化檢驗分析

收集的肝組織浸泡於10%的福馬林溶液固定之，兩天後以石蠟包埋，並製備約5-7 μ m厚度的切片，進行hematoxylin & eosin 染色，於顯微鏡下觀察與照像。肝纖維組織（肝纖維化及肝硬化的診斷）以Sirius red染色，並以photoshop軟體算出纖維組織所佔之比率來代表纖維化/硬化的嚴重程度。臨床血液生化分析由自動化機器測量上述肝臟相關之生化指標。

3. 結果與討論

98年，已經證實醣質藥物 In-111 DTPA-Hexa Lactoside打入正常鼠後的确只會target到肝臟，但是相對於正常的個體，肝病變的個體表現活性較低，本年度針對此現象更進一步觀察在組織層面的變化。Asialoglycoprotein receptors (ASGP-R) 是醣質藥物在肝臟細胞膜上的受體。我們利用異硫氰酸熒光素(FITC)標記的醣質物質，透過雙光子顯微鏡進行觀察醣質物質經過ASGP-R進入正常肝細胞後的運轉及代謝路徑。並比較不同的醣質物質，結果顯示醣質物質在7秒鐘內即從血管進入肝細胞，並快速代謝、堆積在膽管，同樣比較FITC-GalBSA與FITC-ManBSA時，在顯微鏡下可以見到肝細胞只會將FITC-GalBSA帶入細胞內，並不會主動運輸FITC-ManBSA。

使用辨識ASGP-R 抗體標記在臨床肝癌病理切片上腫瘤區域與非腫瘤區域的肝細胞表面分布情形，從染色的結果可以見到在腫瘤區域的細胞表現ASGP-R明顯低於在非腫瘤區域的肝細胞。另外使用western blot驗證相同的組織，也得到相同的結果。

4. 結論與建議

本研究顯示此ASGP-R會受到肝病變的影響而改變數量，有用作評估肝病變時正常肝組織比例的可能性，另外，對於醣類藥物的主動運輸有專一性，具有攜帶肝細胞病變藥物的潛力，未來對於某些肝病變病人臨床治療將會有所幫助。

5. 参考文献

1. YC Lee, RR Townsend, MR Hardy, J Lonngren, J Arnarp, M Haraldsson and H Lonn Binding of Synthetic Oligosaccharides to the Hepatic Gal/GalNAc Lectin JBC 258, pp199-202, 1983.
2. SK Ha-Kawa and Y Tanaka A Quantitative Model of Technetium-99m-DTPA-Galactosyl-HAS for the Assessment of Hepatic Blood Flow and Hepatic Binding Receptor J Nucl Med 1991;32:2233-2240.
3. C Plank, K Zatloukal, M Cotton, K Mechtler and E Wagner Gene Transfer into Hepatocytes Using Asialoglycoprotein Receptor Mediated Endocytosis of DNA Complexed with an Artificial Tetra-Antennary Galactose Ligand Bioconjugate Chem 3:533-539, 1992.
4. JR Merwin, GS Noell, WL Thomas, HC Chiou, ME DeRome, TD McKee, GL Spitalny and MA Findeis Targeted Delivery of DNA Using YEE
5. (GalNAcAH)₃, a Synthetic Glycopeptide Ligand for the Asialoglycoprotein Receptor Bioconjugate Chem 5:612-620, 1994.
6. JJ Hangeland, JT Levis, YC Lee and POP Ts' o Cell-Type Specific and Ligand Specific Enhancement of Cellular Uptake of Oligodeoxynucleoside Methylphosphonates Covalently Linked with a Neoglycopeptide, YEE(ah-GalNAc)₃ Bioconjugate Chem 6:695-701, 1995.
7. JJ Hangeland, JE Flesher, SF Deamond, YC Lee, POP Ts' o and JJ Frost Tissue Distribution and Metabolism of the P-32 Labeled Oligodeoxynucleoside Methylphosphonate-Neoglycopeptide Conjugate, [YEE(ah-GalNAc)₃]-SMCC-AET-pUmpT7 in the mouse Antisense and Nucleic Acid Drug Development 7:141-149, 1997.

8. H Toyama, K Suzuki, A Naito, M Kuroda, K Kikukawa, Y Komori, A Hasumi, K Matsumura, T Fujiwara, K Ito, K Ejiri, K Senda, A Takeuchi and S Koga Evaluation of asialoglycoprotein receptor imaging agent as a marker of hepatic ischemia-reperfusion injury and recovery. *Annals of Nuclear medicine* 13(3):155-160, 1999.
9. AH Kwon, T Inoue, and SK Ha-Kawa Characterization of the Asialoglycoprotein Receptor Under Hypoxic Conditions in Primary Cultured Rat Hepatocytes *J Nucl Med* 46:321-325, 2005.
10. T. Sawamura, H. Nakada, H. Hazama, Y. Shiozaki, Y. Sameshima, Y. Tashiro Hyperasialoglycoproteinemia in patients with chronic liver diseases and/or liver cell carcinoma: asialoglycoprotein receptor in cirrhosis and liver cell carcinoma. *Gastroenterology*. 1984; 87:1217-1221.

6. 誌謝

本報告得以順利完成、感謝核研所沈立漢副所長之鼓勵與支持；感謝John Hopkins University李遠川教授提供glycopeptide；感謝醣質計畫動物模式建立小組的幫助與支持，才能順利完成本研究，在此致上最深的謝意。