

R  
008.8  
7562

私立中山醫學院醫學研究所

碩士論文

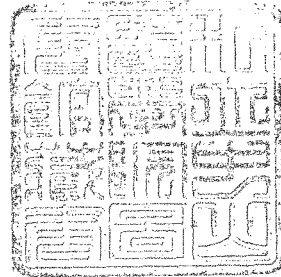
Master Thesis

Graduate Institute of Medicine

Chung Shan Medical and Dental College

中華肝吸蟲致病機轉之研究

Studies on Pathogenesis  
of *Clonorchis sinensis* in Rat



指導教授： 李秀雄博士 (Hsiu-Hsiung Lee )  
王朝鐘博士 (Chau-Jong Wang)

研究生： 陳日和 (Ryh-Her Chen)

中山醫學院圖書館



C039019

中華民國八十六年一月

# 授權書

(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學院 醫學研究所  
\_\_\_\_\_ 組 85 學年度第 1 學期所撰 碩士學位論文。

論文名稱：中華肝吸蟲致病機轉之研究

同意  不同意

本人具有著作財產權之論文提要，授予國家圖書館、本人畢業學校及行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得重製成電子資料檔後收錄於該單位之網路，並與台灣學術網路及科技網路連線，得不限地域時間與次數，以光碟或紙本重製發行。

同意  不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得不限地域時間與次數以微縮、光碟重製後發行，並得享該中心微縮小組製作之研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔資料等值新台幣伍佰元之服務。本論文因涉及專利等智慧財產權之申請，請將本論文全文延後至民國 \_\_ 年 \_\_ 月後再公開。

同意  不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限時間與地域，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。

指導教授姓名：李秀雄、王朝鐘

研究生簽名： 陳日和 學號： R8301111  
(親筆正楷)

日期：民國 86 年 1 月 31 日

- 備註： 1. 上述同意與不同意之欄立若未鈎選，本人同意視同授權。  
2. 授權第二項者，請再交論文一本予承辦人員。  
3. 本授權書已於民國85年4月10日送請著委會修正定稿。

## 簽署人須知

1. 依著作權法的規定，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先得到著作財產權人授權，請分別在三種利用方式的同意欄內鈎選並填妥各項資料。
2. 所謂非專屬授權是指被授權人所取得的權利並非獨占性的使用權，授權人尚可將相同的權利重複授權給他人使用；反之即為專屬授權，如果您已簽署專屬授權書予其他法人或自然人，請勿簽署本授權書。
3. 授權人的權利與義務：  
在美國授權博碩士論文予UMI公司(博碩士論文全文資料發行公司)製作發行，須交付美金45元的出版費，銷售年逾七件以上時得享收入10%的權利金約美金20元；在國內本計畫之經費全數由政府支應，收入亦應歸國庫，為答謝您的支持，科資中心特為您提供新台幣500元的等值資料服務(以研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔為限)，請逕洽本案聯絡人，地址電話詳如第5項。義務方面唯一要注意是，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可以授權其他自然人或法人上述的行為。
4. 全國博碩士論文全文資料微縮片整合計畫的宏觀效益：  
在個人方面，您的論文將可永久保存(微縮技術在理論上可保存八百年，實證已逾百年)，也因為您的授權，使得後進得以透過電腦網路與光碟多管道檢索，您的論文將因而被充分利用。在國家總體利益方面，紙本容易因影印而造成裝訂上的傷害，圖書館中孤本的公開陳列與外借也有破損之虞，唯有賴政府全面性的整合，借助科技設備才能一舉完成保存與利用的全方位效益，回憶您過去尋找資料之不便經驗，學弟與學妹確實須要您的論文與授權書。
5. 本案聯絡電話：(02)7377746 江守田、王淑貞  
地址：台北市和平東路二段106號17樓1702室

---

研究生姓名：陳日知 聯絡電話：3592525 車24512<sup>(04)</sup>  
地址：台中手筆美西街一段228號11F

---

本論文為中山醫學院授予理學碩士學位之必備條件之一，經中山醫學院醫學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

私立高雄醫學院寄生蟲學科教授

顏全敏 博士

顏全敏

私立中山醫學院生化研究所教授  
(論文指導教授)

王朝鐘 博士

王朝鐘

私立中山醫學院寄生蟲學科教授  
(論文指導教授)

李秀雄 博士

李秀雄

中華民國八十六年元月

學生 陳日和 論文題目為中華肝吸蟲致病機轉之研究，其論文已經中山醫學院醫學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授： 李秀雄 博士 簽名：李秀雄

王朝鐘 博士 簽名：王朝鐘

中華民國 86 年 1 月 31 日

## 誌謝

對一個離校十多年的學生而言，還能夠再回到學校做研究實在是一種享受也是一種挑戰，在學期間雖然遇到許多的挫折，但終究還是克服了，那段在晨曦中踏著側門田埂小路而歸的日子，也終將可以暫告一個段落了，這其中滋味點滴在心頭。

在此，感謝我的指導教授李秀雄教授、王朝鐘教授，二位如師如父的在研究及做人處事上的教導、支持及鼓勵，又本論文亦承顏全敏教授的審查及指正在此致謝。

另外要感謝以下二個單位的師長、同學和朋友們的幫忙：

### 台中榮總

醫學檢驗部：丁明哲主任、李名世主任、于組長、王俊民組長及門診檢驗室的工作同仁，沒有你們工作上的分擔及給予方便，我實在沒有時間再去衝刺，感謝你們的幫忙。

病理部：潘憲棠醫師、俞國清技師、吳麗琴醫檢師謝謝你們在病理技術上的支援及指導。

醫研部泌尿外科研究室：袁小雲、洪玉葉小姐謝謝妳們在分生及免疫組織染色的指導及協助。

腸胃科：盧金定小姐在電腦文書作業上的處理，感謝妳。

### 中山醫學院

生化研究所：惠珮、自君、明誠、光坪、寶香，謝謝你們在生化及分生上的幫忙。

病理科：許振東醫師、蔡崇弘醫師在病理及統計上的指導。

醫研所：蔡金秋同學的電腦及文書方面的協助。

醫技系：蔡淦仁副教授在分生方面的協助及指導。

寄生蟲科：徐老師、娟娟、新傑、仲康、麗如、俐均、秉如、嘉仁，謝謝你們在實驗上給予我很多的幫忙及陪我渡過這一段歲月。

最後，我要感謝父母的養育之恩、岳父母的鼓勵，更應該感謝我的愛妻 瑞娟，謝謝你幫我照顧宥竹、家庭及實驗室的動物，辛苦妳了！

願以此篇論文獻給父母、師長、妻女及關愛我的朋友們，感謝你們的幫助。謝謝！

陳日和 謹識於中山醫學醫學研究所  
1997年3月

# 目錄

	頁數
縮寫表 .....	IV
中文摘要 .....	VI
英文摘要 .....	VII
前言 .....	1
材料與方法 .....	13
結果 .....	26
結論 .....	28
參考文獻 .....	31
表 .....	41
圖 .....	47
附錄 .....	59



## 縮寫表

WBC	: White blood cell or Leukocyte
RBC	: Red blood Cell or Erthrocyte
Hb	: Hemoglobin
Hct	: Hematocrit
Neut	: Neutrophil
Lym	: Lymphocyte
Eos	: Eosinophil
Baso	: Basophil
Plt	: Platelet
EDTA	: Ethylenediamine tetraacetic acid
EGTA	: ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)N, N, N', N', tetraacetic acid
ALP	: Alkaline phosphatase
T. Bil	: Toloal Bilirubin
AST	: Aspartate aminotrasferase
ALT	: Alanine aminotrasferase
LDH	: Lactate Dehydrogenase
ELISA	: enzyme-linked immunosorbent assay
Alc	: alcohol
SDS-PAGE	: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
PKC	: Protein kinase C
TBS	: Tris buffered saline
PBS	: Phosphate buffered saline
DAB	: 3,3'-diaminobenzeidine tetrahydrochloride

FBS : Fetal bovine serum  
TBST : Tris-buffered solution Tween-20  
AP-1 : Activator protein-1  
C. s. : *Clonorchis sinensis*  
PMSF : phenylmethylsulfonyl fluoride

## 中文摘要

本研究為了探討中華肝吸蟲致病機轉，以囊幼(Metacercaria)感染於大白鼠後，採用血液學、生化學、病理學、分子生物學等方法，在感染後不同時間(30、40、50、60週)來探討其致病機轉。實驗結果:1. 在血液學方面的評估白血球數目(White Blood Cell)和絕對嗜伊紅性白血球數目(Eosinophils)在各不同時間實驗組和對照組相互比較有顯著的上升( $p < 0.05$ )。2. 生化學臨床檢驗評估:ALP、AST、ALT、LDH、Bilirubin等項目在40週前，實驗組和對照組相互比較，沒有顯著差異，但40週以後則有顯著差異。3. 肝臟萃取液及血清的SDS-PAGE沒有發現特別的蛋白pattern。4. Western blotting可見到細胞質及細胞膜之PKC在實驗組有顯著表現。5. Immunohistochemical staining顯示感染以後實驗組的膽管c-fos有顯著的表現，但c-jun、c-myc並無沒有顯著的表現。6. 在病理切片方面，可見到膽管有明顯的發炎反應(Lymphocytes及Eosinophils浸潤)、膽汁鬱積、肝膽管肥大、原纖維化增加及腺瘤樣增生現象出現。依研究結果我們推測中華肝吸蟲致病原因可能與PKC translocation及c-fos活化有關，惟詳細機轉有待進一步探討。

## Abstract

In this study, we have investigated the pathogenesis of the *C. sinensis* in Wistar rats. Several clinical diagnostic criteria have been applied to evaluate the clinical manifestation as well as the underlying mechanism for the disease development, including the hematological, biochemical, pathological and molecular biological examinations of the infected rats at the different time periods of infections. Significantly increased in both white cell counts, and especially the absolute eosinophil counts ( $p < 0.05$ ) were found among the infected rats than those of controls. Biochemistry studies of ALP, AST, ALT, LDH and Bilirubin display significant differences in those infected rats only after forty weeks of infections. No specific protein band patterns were observed by SDS-PAGE analysis of the liver extracts and serum proteins between sick and normal rats. However, obvious expressions of both cytoplasmic and membranous PKCs were detected by Western blotting analysis. Immunohistochemical stainings of gall ducts from infected rats have demonstrated an increased expression of c-fos, however significant expression of c-jun and c-myc has not been defined. Evident inflammatory, stasis gallbladder, gall duct enlargement as well as other pathologic changes were noticed by histological examinations of the infected gall ducts. Although this study has provided some evidences, especially the PKC-translocation and c-fos activation, to elucidate the causal relationship between the *C. sinensis* infection and the tumorigenesis, however, the underlying mechanism still needs to be further clarified.

# 第一章 前言

## 第一節

### 一、概論

中華肝吸蟲 *Clonorchis sinensis* 是一種寄生於人及多種哺乳類動物,貓、狗、豬等動物的肝、膽管組織的吸蟲,其所造成的寄生蟲病變稱為中華肝吸蟲症(clonorchiasis)。此蟲為臺灣最重要的人畜共通寄生蟲(Zoonotic parasite)之一(1,2)。

西元 1874 年,Macconnel 氏在印度加爾各答做屍體解剖時發現一名中國 20 歲年輕木匠的膽管內有一種未曾報告的寄生蟲存在(3),次年 Cobbol 也發現此蟲,並命名為中華肝吸蟲 *Clonorchis sinensis*(4)。

西元 1910 年,小林氏(5)證明此蟲第二中間宿主為淡水魚類的鯉魚科,1917 年武藤氏更證明一種淡水螺 *Bithynia striatulus var japonicus* 為本蟲之第一中間宿主(6),幼蟲之發育由 Nagarn 氏於 1925 年及 Faust. Khao. 二氏於 1927 年(7),先後研究本蟲之生活史,後來經國人徐錫藩等人於 1936 至 1940 年完成了感染實驗(6)。

中華肝吸蟲廣泛流行於大陸、日本、越南、韓國、香港、臺灣。尤其廣東、福建、臺灣等省居民常被感染(6)。臺灣地區人體感染的情形始見於 1915 年 Ohoi(8)的報告。1969 年 Cross(9)的報告更指出中華肝吸蟲在臺灣廣泛的流行。並且估計本省約有 1.5% 的人感染此種寄生蟲。此蟲臺灣常見於屏東縣的部份客家村落. 高雄縣的旗山、美濃, 苗栗縣獅潭鄉、大湖、及卓蘭, 南投縣之國姓鄉、埔里鎮、魚池鄉, 而後有學者報告指出上述台灣流行地區之感染率約為 9.28 至 59 % 不等(6,10-12)。

## 二、形態、生活史：

中華肝吸蟲成蟲，背腹扁平，半透明，柔軟，呈樹葉狀，前端略窄，後端鈍圓，體長約 10~25 mm (附圖一)，前端口吸盤略大於腹吸盤，內部構造隱約可見，為雌雄同體，成蟲寄生於人及哺乳動物的膽管，膽囊及肝內膽管，蟲卵受膽汁染色成金黃色，似燈泡形狀，有小蓋，蓋兩旁可見尖峰樣小突起，後端鈍圓，有小結節樣突狀，稱為小疣，卵大小為 27~35×12~20 μm，卵內含毛蚴，從蟲卵發育為成蟲須經過二個中間宿主，第一中間宿主為淡水螺，在我國已被證實有六屬八種(13)，在台灣主要為滿州派螺(*Paraforssarulus*)為主，約有 1-4% 帶有尾動幼蟲，其他尚有自由川螺(*Semisulcospira libertina*)，顆粒洗螺(*Thiara granifera*)(6)，第二中間宿主為淡水魚類，在我國已被證實有 12 科 39 屬 68 種(13)，在台灣較常見且感染率較高的淡水魚有克氏鱖魚(*Hemiculter kneri*)(附圖二)及羅漢魚(*Pseudorasbora parva*)，草魚(*Ctenopharyngodon idellus*)，鯽魚(*Carrasius auratus*)，雜種吳郭魚(*Tilapia hybrid*)及鯉魚(14)，前二者感染率幾乎 100%(15)，人體被感染的原因及途徑主要是食用未經煮熟的淡水魚類，魚肉內中華肝吸蟲之囊狀幼蟲(metacercaria)經由消化道進入宿主，而後寄生於宿主的膽道及肝內膽管中，約在食用一個月後宿主即可排出蟲卵，成蟲壽命可長達 15~20 年，其蟲卵經宿主排出後，被第一中間宿主淡水螺吃下後，可在其腸道孵化成纖毛蚴蟲 miracidium 在螺體內發育成胞狀幼蟲 sporocyst，雷氏幼蟲 redia 到尾動幼蟲 cercaria 才自螺體排出於水中，尾動幼蟲遇有機會侵入第二中間-淡水魚體，即可在魚體內發育成囊狀幼蟲，寄生在魚體的肌肉內及魚鱗下，等待被下一個宿主攝食(人，狗，貓，豬等等)形成其生活史之循環(附圖三)。

### 三、流行(地理分佈):

中華肝吸蟲廣泛流行於遠東的日本、韓國、越南、香港、中國、台灣，大陸約有 23 省有不同程度的流行，唯人體感染大都集中於廣東、廣西、及台灣，台灣以高雄美濃(10)、南投日月潭(1,11)、苗栗等地區最為嚴重(1,12). 居民可高達 50 %以上(10,11,12)是台灣主要的流行地區，日本據報導(16)也曾有高達 67%的高感染地區，而韓國在 Ahnseny 河四周的居民則有 5.8~54.8 %不等的感染率(17)。近 30 年來台灣的公共衛生雖然有明顯的改善，許多寄生蟲的感染已不復見，可是在某些流行地區仍然有高的中華肝吸蟲感染率，例如顏、陳等人(18)在屏東縣內埔鄉竹圍村、竹田鄉頭崙村、麟洛鄉新田村調查中華肝吸蟲感染率仍然達 10.2 %到 21.8 %不等，鄭、李等人(19)南投縣國姓鄉、苗栗縣獅潭鄉也有相近的感染率 9.28 至 21.29 %。

#### 四、病理及症狀

感染中華肝吸蟲引起的病理變化主要是因蟲體在肝內膽管移動所造成的機械性傷害及毒素所形成。蟲體將膽管阻塞所造成的阻塞性黃疸,再加上宿主本身的修補與發炎反應及蟲體成份代謝物的釋放,成蟲或蟲卵所分泌的毒素及蟲屍腐敗後有毒物質的釋放等共同造成組織病變。

病變程度視寄生蟲數之量及寄生時間長短及宿主之抵抗力而異,少數寄生,局部變化頗少或不引起症狀,反覆感染會使病變加劇。感染中華肝吸蟲所引起的病變,早期及輕微感染者大體上症狀不明顯或很輕微,中度感染患者有胃腸不適、水腫、肝脾腫大等症狀,併生膽結石膽管炎肉芽腫、腺瘤、阻塞性黃膽等症狀,嚴重感染可能發生在被寄生之膽管、肝管內粘膜上皮細胞已脫落和增生、管壁擴張、肥厚而發生膽管炎及膽管周圍炎,肝小葉圓型細胞浸潤及結締組織增生,又因蟲體栓塞使膽汁瘀積,膽汁輸出管擴張、膽毛細管破壞,肝實質細胞壞死、黃疸、肝細胞變性萎縮,有的患者晚期併發膽囊炎、膽管炎、肝硬化、膽管癌、原發性肝癌(20-24)。



## 五、診斷

1. 蟲卵檢查：中華肝吸蟲診斷主要由糞便中檢查出蟲卵做為確診依據。

從糞便中檢查出蟲卵是確認中華肝吸蟲感染的可靠方法。但本蟲蟲卵小容易漏檢，因此其檢出率與所用的方法和次數有密切關係，目前在蟲卵檢查方面有下列幾種：(1)糞便直接塗抹法(2)集卵法，一般使用的方法有：乙醚蟻醛法、水洗沉澱法、氫氧化鈉消化法，其中以乙醚蟻醛法檢出率最高。這些蟲卵數目的計算大多以每公克糞便所含蟲卵數目(EPG ; egg per gram feces)作為判斷標準，雖然 EPG 數目無法完全反應出中華肝吸蟲感染的真實情形，但多少能反應出宿主受到中華肝吸蟲感染的強度。

2. 免疫診斷：

免疫法可用來作為臨床輔助診斷和疫區流行病學調查，其方法包括：補體結合實驗、皮內試驗、間接血凝試驗、間接螢光抗體試驗和酶聯免疫吸附試驗(ELISA)，其中以 ELISA 最好，具有敏感性和特異性強的優點。近年來，陸續有許多學者將 ELISA 法應用在中華肝吸蟲症的診斷上。顏、陳等人 (25, 26)曾經利用 ELISA 法檢視患者，發現 ELISA 的敏感性可以由 98.3 %到 95.5 %不等，同時其專一性則可以達到 84 %到 99 %之間，其他學者所做報告也有相似結果(25, 27-30)。因此 ELISA 法在中華肝吸蟲症的診斷是值得一般檢驗室採用的中華肝吸蟲檢查方法。

## 六、治療

有許多藥物曾經被用來治療中華肝吸蟲如 Praziquantel (31-35, 36)、Albendazole(35, 36)、Hetachloroparaxyol (31)、Hetol(6, 35, 37)、Milbemycin oxime(38)、VD-99-11(39)。其中 Praziquantel(31-36)為最常用及有效的治療藥其劑量以 25 mg/kg tid 連續兩天，效果最好，治癒率高達 90 %以上(31)。

## 七、控制及預防

寄生蟲的預防及控制應注重防止寄生蟲的繁殖及斷絕寄生蟲傳入人或家畜身體內之途徑，因而控制中華肝吸蟲的感染有下列六種方法：

1. 推行衛生教育：宣傳本病的傳播途徑，讓一般民眾瞭解吃生魚片的危險及餐具使用後須徹底洗淨或用熱水燙過，以防止囊幼污染。
2. 不吃生的或半熟的魚肉：中華肝吸蟲的囊幼很怕高溫，在 $60\sim 70^{\circ}\text{C}$ 中只活6秒鐘(6)，因此淡水魚必須煮熟(40)，亦可將魚肉冷凍至 $-10^{\circ}\text{C}$  5天或以10%食鹽水浸泡而將囊幼殺死。
3. 糞便消毒：禁止用糞便餵魚，且將糞便做消毒或改善貯存及處理的方法。
4. 普遍檢查及治療：在流行地區普遍檢查糞便及治療患者；人體及保蟲宿主均應同時治療，以減少此種寄生蟲的感染源。此步驟在消滅感染源上具有重要意義。
5. 不用生魚餵狗、貓、或豬等動物。
6. 其他：用 $0.15\text{ kgy}$ 的 $\text{Co60}$  Gamma irradiation照射(41)，魚肉中的囊幼可被放射線殺死，是一種良好的食物消毒及保存方法。

## 第二節 中華肝吸蟲症與癌的相關性報告：

過去不認為中華肝吸蟲對人體有嚴重的危害性，直到1930年代國內外學者才加以重視，並發現嚴重病變，例如：

1937年梁氏1955年秦氏(13)都陸續發現中華肝吸蟲可併發原發性肝癌及與膽管癌有關。

1956 Hou PC. (42)報告：在香港解剖200例原發性肝癌發現30例由中華肝吸蟲所引起，因中華肝吸蟲感染引起二級小膽管上皮細胞增生，然後癌病變主要為腺癌；其認為香港的原發性肝癌至少有15%系由中華肝吸蟲感染所引起。從此才廣泛的引起人們對中華肝吸蟲的重視。

1963 丘福禧等人(43)報告有中華肝吸蟲感染的病例併有原發性肝癌者為0.35%，而無感染中華肝吸蟲的各種病例伴有肝癌者僅有0.05%。

1972 Belamaric J. 等人(44)從1961~1966年五年間213個autopsy診斷為HCC(hepatocellular carcinoma)的Case 19例的肝內膽管區的adenocarcinoma觀察到有1/3左右的人有中華肝吸蟲的蟲卵化石。

1977 Kim(13)在韓國觀察284例肝癌患者由中華肝吸蟲感染引起的佔24.6%。

1981 郭美貞等人(45)觀察中華肝吸蟲感染家兔後的膽道微細構造後提出中華肝吸蟲引起原發性膽管性肝癌是值得注意的。

1981 Flanell(46)認為后畢和支畢吸蟲病(*C. sinensis*)是引起人體膽管癌的病原學主要因素。

1982 朱師晦報導(47)中華肝吸蟲與膽管疾病有關者最主要為膽管上皮癌(37.5%)、肝細胞癌(16.6%)、各型肝硬化

(16.3%)、膽結石及膽囊膽管炎(9.38%)。

1985 肖錫呂報導(13)原發性肝癌與非原發性肝癌患者糞便中 *C. sinensis* 的蟲卵檢查陽性率前者為 35.0%(21/60)，後者為 15.2%， $P < 0.05$  二者有顯著差異。

1989 Kim Y. I. 報導(48) 中華肝吸蟲感染後引起膽管癌的病理變化。

1991 Fernando V. 等人報導(49) 中華肝吸蟲感染後引起膽管癌 Cholangiocarcinoma 的病例報告。

1994 Huang SC. (50) 等人：中華肝吸蟲感染後引起膽囊癌的病例報告。

從以上的報告，可以說明中華肝吸蟲感染與原發性肝膽癌的確有密不可分的關係。

### 第三節 PKC 與 c-fos 、 c-jun 、 c-myc

Protein Kinase C(PKC)是一種鈣與磷脂依賴的蛋白激酶素，於 1977 年首先由 Nishizuka 發現(51)，以後即受到廣泛的重視及更進一步的研究，後來更發現 PKC 由肌醇磷脂 (inositol phospholipid) 分解而來，在穿透細胞膜的訊息傳遞系統上扮演相當重要的角色(52)；當外來物與膜上相關接受器作用後導致特異性的 phospholipase C (PLC) 去水解 phosphatidylinositol -4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) 產生 inositol phosphate (IP<sub>3</sub>) 及 diacylglycerol (DAG)，IP<sub>3</sub> 溶解於細胞質促使儲存的鈣離子釋放而增加細胞中鈣濃度，親脂性的 DAG 則留在膜上，此時細胞質內的 PKC 會移動到細胞膜上與 DAG、鈣、磷脂質形成複合體(53-55)，當 PKC 轉位到膜上時會造成細胞內的許多蛋白質磷酸化如 histone(56)，EGF receptor(57)，insulin receptor(58)，transferrin receptor(59)，轉譯作用 2 號起始因子 (eIF2)(60)，ribosomal protein S6(61) 等等，引起一連串細胞內訊息傳遞。

原致癌基因(proto-oncogene)是指存在于正常細胞的一段基因，平時有正常的生理功能，但當外界有某種刺激時(例如：病毒、霉菌、寄生蟲)可激發其大量表現，基因過度活化的結果使細胞變形或增生、癌化。

當 PKC 引發了細胞開始進入分裂週期有密切關係的 proto-oncogene C-jun、C-fos 的表現，所產生的 jun-fos complex (AP-1) 便能促進多種基因的 transcription (62) 而使細胞增殖(proliferation)和細胞分化(differentiation)(63)因此 PKC 被認為有促進細胞增殖、分化、基因表現和腫瘤催化作用。

fos、jun、myc 為 tyrosin kinase dependent 的核內 oncogene，



其上游 oncogene 經細胞質的多重活化步驟後，使 transcription factor phosphorylation 而促進 fos、jun、myc 等核內 oncogene 的表達，進而 gene transcription 而使癌蛋白質合成，其可引起細胞變形、增生及細胞癌化。

#### 第四節 研究目的：

根據很多臨床病例報告顯示中華肝吸蟲大量及長時間的感染會引起肝臟與膽管方面的癌症，但臨床醫師及學者們多從病理學來觀察；我們想從大白鼠感染中華肝吸蟲的模式，藉血液學、生化學、病理學、分子生物學等多方面的觀察及比較來研究感染中華肝吸蟲後不同時間大白鼠的肝臟病理變化及探討中華肝吸蟲的致病機轉。



## 第二章 材料與方法

### 囊幼收集：

從日月潭買回的新鮮克氏鱒魚，以清水洗淨後，用菜刀剝成小塊，以均質機攪碎，以 1 : 30 之比例加入人工胃蛋白消化液，放入磁性攪拌子在 37°C 恆溫箱以攪拌機攪拌，2 小時後取出用紗布過濾，過濾液以 1 : 1 生理食鹽水稀釋，靜置 30 分鐘，以後每隔 30 分鐘倒掉一半上清液，再加滿生理食鹽水，重複此步驟直到上清液清澈為止(約 3 小時)，再用滴管吸取沉澱物，在解剖顯微鏡下收集囊幼。

### 人工胃蛋白消化液之配製：

7 gm Pepsine

8 ml HCl

加二次水稀釋至 1000 ml

### 實驗動物分組：

購自國科會動物飼養中心之四週齡 Wistar strain 雌性大白鼠，依感染週數、30、40、50、60 週，分實驗組與對照組各 3 隻。

### 動物感染：

實驗組於感染前 12 小時禁食，每隻老鼠以口餵管餵食 300 隻中華肝吸蟲囊幼。

### 感染成效評估：

感染後第六週，收集老鼠糞便以福馬林-乙醚濃縮法 (formalin-ether concentration) 計算每公克糞便中蟲卵數目。

## 血液常規評估：

使用 sysmex® NE-8000 型全自動化儀器測定血液中 WBC、RBC、Hb、Hct、Plt、Neut、Lym 及 Eos 等多項血液常規評估。

### 測定原理：

這是一部全自動血液分析儀，血球及血小板的計算是根據懸浮在稀釋液中之顆粒間各有其不同的電氣特性而予以偵測；在 WBC 偵測器中，其分析是應用普通的直流阻抗偵測法及高頻電抗偵測法，並搭配使用定量浮球式計量管。而 Eos 及 Baso 則各有其獨立之偵測器，亦採用直流阻抗偵測法及浮球式計量計。RBC、Hct 及 Plt 採用流體動力集中式直流阻抗偵測法分析。

### 測定步驟：

- 1、將裝有 whole blood 之真空採血管，編號。
- 2、按照編號先後次序安插入 rack(檢體架)上。
- 3、按 Sampler No 鍵。
- 4、將 Sampler rack 擺放在 rack pool 之右邊就定位。
- 5、按 Start 鍵，則儀器便開始自動 Mix、Aspirate、Dilute、Analyze、Report。

## 血液生化值評估：

Synchron CX-7 是一種可誰隨意選擇檢驗項目的全自動化儀器，應用其檢驗：T. Bil 、ALP 、AST 、ALT 及 LDH 等項目。

### 測定原理：

T. Bil :

Total bilirubin 加 diazo dye 試劑反應，會產生紅色的 azobilirubin 產物，在波長 530 nm 比色，即可知道 total-bilirubin 的濃度。

ALP :

利用 P-nitrophenyl phosphate 加 H<sub>2</sub>O 及適當條件下 ( NaOH , pH 10.3 和兩價鎂離子存在)ALP 可促使其產生 P-nitrophenol 和 phosphate , 在波長 405 nm 測 P-nitrophenol 的濃度變化，即可測出 ALP 的活性。

ALT :

利用 L-Alanine 和  $\alpha$ -Ketoglutarate 在 ALT 存在時可產生 Pyruvate 和 Glutamate. 再利用 Pyruvate 在 H<sup>+</sup> 的條件下會使 NADH 轉變為 NAD<sup>+</sup> 及產生 Lactate, 在波長 340 nm 測定 NADH 減少的量，即可知 ALT 的活性。

AST :

利用 Aspartate 加  $\alpha$ -Ketoglutarate 在 AST 存在時可產生 Oxaloacetate 和 Glutamate, Oxaloacetate 在 H<sup>+</sup> 的環境下會使 NADH 轉變為 NAD<sup>+</sup> 及產生 Malate, 在波長 340 nm 測

定 NADH 減少的量，即可知 AST 的活性。

LDH：

利用 Pyruvate 在  $H^+$  存在下，可使 NADH 轉變為  $NAD^+$  及產生 L-Lactate，在波長 340 nm 測定 NADH 減少的量，即可知 LDH 的活性。

**操作步驟：**

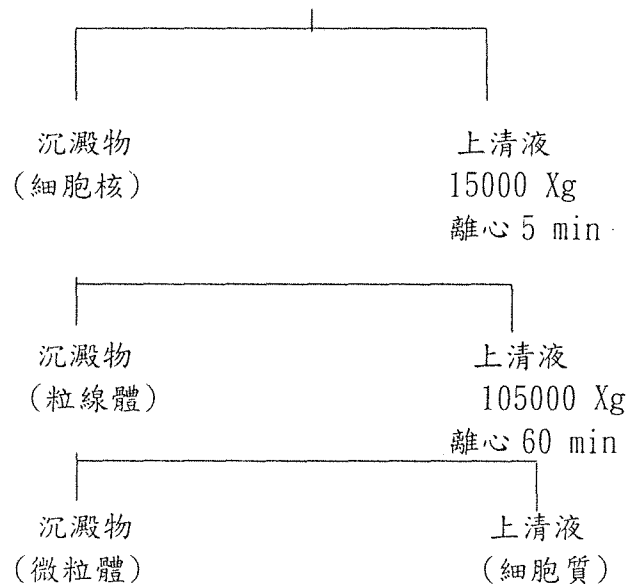
1. 將 CRT 上之 Power on 以後，再開 Printer 及去離子水的 Pump。
2. 當上述步驟的開關順利打開時，儀器會自動展開 Boot up 步驟，把管道內的氣泡及殘留液(水)完全排除。
3. Loading Reagent。
4. 儀器以校正液做校正，校正值皆在可接受範圍即可再做三種 Control(high、low、normal)，Control 值皆在可接受範圍即可進行檢體分析。
5. 將欲分析的檢體放入 Sector 的 cup 中，Sector 放入儀器就定位後，即可從主螢幕的 F1 中輸入檢體所放的 Sector 號碼及 cup 號碼和所要檢測的項目。
6. 輸入完後按 Start 鍵即可進行檢體分析。

## 肝臟組織萃取：

分別取實驗組與陰性對照組之大白鼠斷頭、放血犧牲之，迅速取出新鮮肝臟組織約 2 gm，儘量切碎，組織與均質液以 1 : 5 的比例在均質機下研磨(以上步驟多在冰浴中實行)

1. Tissue : Homogenized solution = 1 : 5 混合
2. Liver tissue 研磨後，使用冷凍離心機離心。
3. 600 Xg, 離心 10 min(2 times)。沉澱物：細胞核
4. 取上清液，15000 Xg，離心 5 min (2 times)。沉澱物：粒線體
5. 取上清液，105000 Xg，離心 60 min。  
上清液：細胞質 沉澱物：微粒體

大白鼠斷頭、放血犧牲之，迅速取出肝臟，致於冰水浴中，以均質液 1 : 5 比例，加入均質機研磨，  
600 Xg 離心 10 min。



### 均質液之配製：

Tris-HCl	0.282 gm	pH 7.4 (20 mM)
EDTA	67.24 mg	(2 mM)
10%Glycerol	10 ml	
$\beta$ -mercaptoethanol	349 $\mu$ l	
用二次水稀釋至	100 ml	

### 蛋白質定量分析：

取適當稀釋(1 : 5)後之肝臟組織萃取液 50  $\mu$ l 加入 Bio-Rad® protein assay dye 2.5 ml，室溫反應 10 min 後在 Hitagi 3210 型比色計 595 nm 吸光度下測蛋白。以 bovine serum albumin 為標準液，分別測定細胞核、粒線體、微粒體及細胞質之蛋白質濃度。

## 電泳分析 SDS-PAGE(64)

- 1、 使用 Bio-Rad 公司 protein® II xi cell 之電泳槽做蛋白質電泳分析。
- 2、 蛋白質電泳的方法：

將電泳玻璃片洗淨擦乾，利用約 0.75 mm space 為間隔，裝好電泳片，泡製 12 %SDS-PAGE 之 separating gel，加入 12 ul TEMED 混合均勻後迅速倒入電泳片中，直到液面到達箭頭指標處為止，加入去離子水覆蓋液面，等待膠體凝固後，將上層去離子水倒掉，再製備 5 %SDS-PAGE stacking gel，加入 6 ul TEMED 後混合均勻迅速倒入電泳片中，並立即將電泳齒梳插入 stacking gel 中，並避免氣泡產生，待膠體凝固後，拔掉齒梳再用去離子水清洗數次 well，準備 loading sample。
- 3、 取 20  $\mu$ l 的 10  $\mu$ g%蛋白質樣本加 80  $\mu$ l(1 : 4)的 sample buffer，以 100  $^{\circ}$ C 煮沸 5 min 後，取 20  $\mu$ l loading 至每個 well。
- 4、 將上下電泳槽加入 running buffer 後蓋上蓋子，開始以 15 mA 的電流通電 45 min，使色帶跑至 stacking gel 與 separating gel 交接處，調整電流為 30mA, 當色帶跑至底線時才停止電泳(通電時間約 4 hrs)。
- 5、 電泳完畢後將膠體取出以 Coomassie blue R-250 染色 30 min 及用 methanol-acetic acid 混合液脫色三次每次 30 min。

### Separating gel(12 % SDS-PAGE)之配製：

d <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	9.9 ml
30 % acrylamide mix	12 ml
1.5 M Tris (pH8.8)	7.5 ml
10 % SDS	0.3 ml
10 % Ammonium persulfate	0.3 ml
TEMED	12 ul

### 5% stacking gel 之配製：

d <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	4.1 ml
30 % acrylamide mix	1 ml
1.0 M Tris (pH6.8)	0.75 ml
10 % SDS	60 µl
10 % Ammonium persulfate	60 µl
TEMED	6 µl

### Sample buffer 之配製：

d <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	3.8 ml
1.0 M Tris (pH 6.8)	1.0 ml
glycerol	0.8 ml
10 %SDS	1.6 ml
β-mercaptoethanol	0.4 ml
0.05 % bromophenol blue	0.4 ml

### 5 X Electrode (running )buffer 之配製：

Tris base 25 mM	15.0 gm
glycine 192 mM	72 gm
SDS 0.1 %	5 gm
d <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O dil to	1000 ml



**Stain solution (0.1 % Coomassie blue)之配製：**

Coomassie blue G-250	1 gm
Methanol	400 ml
Acetic acid	100 ml
d <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	500 ml

**Destain solution 之配製：**

Methanol	400 ml
Acetic acid	100 ml
d <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	500 ml

## 肝膽組織病理切片：

從老鼠取出之肝臟及膽管立刻固定於 10 %福馬林，以石蠟包埋，切片 5 um，使用 Hematoxylin-Eosin 進行染色、封片、觀察。

## Immunocytochemistry stain (for c-jun c-fos and c-myc )

1. 製作 5 um 厚度之組織石蠟玻片。
2. 石蠟玻片溶蠟:50-55 °C，40-50 min。
3. 脫蠟:Xylene 10 min，二次。
4. Hydrate:100 % Alcohol(Alc) 5 min, 100 % Alc. 5 min, 95 % alc. 5 min, 85 % Alc. 5 min, 75 % Alc. 5 min。
5. Running tap water 30 sec。
6. 耐高溫玻璃缸內裝入約 1/2 至 3/2 滿的 citrate buffer (含 0.1 %NP 40)。
7. 放入微波爐，以低中火力加熱 5 min，使其微滾有些許冒泡。
8. 將脫蠟後組織片放入上個步驟 buffer 內，以低中火力加熱 4~5 min。
9. 重覆步驟 8，操作 3~4 times。
10. 將整缸取出，放置室溫 30 min。
11. 將玻片取出，放入 PBS buffer 浸泡 5 min。
12. 加 primary Ab(anti c-fos、anti c-jun and anti c-myc)，over night in 4 °C。
13. PBS washing 5 min。
14. Link Ab ( Second-Ab -biotine )，37 °C 20 min。

15. PBS washing 5 min ◦
16. streptavidin-horseradish peroxidase 37 °C 20 min ◦
17. PBS washing 5 min ◦
18. DAB 10 min ◦
19. Rinsing with running tap water 30 sec ◦
20. Counter stained , Hematoxylin 1 min ◦
21. Rinsing with running tap water 20 min ◦
22. 95 % Alc. 1 min , 100 % Alc 1 min , 100 % Alc 1 min ◦
23. Xylene 90 sec. , Xylene 90 sec. ◦
24. mounting ◦

**Western blot ( 64, 65 )**  
**(for PKC c-fos c-jun c-myc )**

1. 取新鮮肝臟 0.5 gm 加 buffer A solution(Tris 20 mM, pH 7.5  
2mM EDTA , 0.5 mM EGTA , 0.3 M sucrose , 2 mM PMSF ) 2.5  
ml 。
2. 均質機 1000 rpm 均質 20 下。
3. 取均質後之均質液離心：50 K rpm、4<sup>0</sup>C、1 hr 5 min。
4. 上清液(sup.)存于-70 <sup>0</sup>C(cytosol)。
5. pellet 加 buffer B solution(即含 0.3 % TritonX-100 之  
buffer A ) 1 ml。磨散、弄均勻。
6. 放入冰中 1 hr，每隔 5 min 取出 mix 一次。
7. 加 buffer A solution 1.8 ml。
8. 再離心，50 K rpm、4 <sup>0</sup>C、1 hr 5 min。
9. 取上清液(sup.)存于-70 <sup>0</sup>C(membrane)
10. 剩下的 pellet 丟棄。
11. 分別取 membrane 及 cytosol，測蛋白濃度，跑 SDS-PAGE。
12. 電泳完畢後，將膠體浸入冰冷的 Electrotransfer  
buffer[25 mM Tris-HCl(pH 8.3)，0.192 M glycine，  
20 %(v/v) methanol ]約 5-10 min。
13. 將膠體平鋪在兩張浸濕的 Whatman 3M 濾紙上，然後再將預  
先浸濕 0.45 $\mu$ m 孔徑的硝化纖維紙(nitrocellulose paper  
)蓋在膠體上面，依次再覆蓋兩張浸濕的 3M 濾紙，並以玻璃  
棒小心趕走其電極板間的氣泡，然後裝入 Transfer holder  
內，再置於 Electrotransfer tank(Hoefer) 以 4<sup>0</sup>C，100mA  
(0.38 mA/cm<sup>2</sup>) 進行電轉移。
14. 電轉移過夜後，將硝化纖維紙取出浸入含 3%(w/v)FBS 之 TBST  
緩衝液[10 mM Tris-HCL (pH 8.0)，150 mM NaCl，0.05%

Tween-20]，在室溫搖動 1 hr。

15. 以 TBST 緩衝液清洗兩次，每次 10 min。
16. 加 50 ug 抗 PKC 抗體(Anti-PKC IgG，購自 GIBCO BRL)於 20 ml 含 1 %(w/v)FBS 的 TBST，然後與硝化纖維紙在室溫下作用 4 hrs 之後以 TBST 緩衝液清洗兩次，每次 10 min。
17. 與 primary antibody 作用後的硝化纖維紙，再進一步與加有 20 ug Secondary antibody (alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG，購自 Promega)，含 1 %(w/v) FBS 之 TBST 緩衝液 20 ml，於在室溫下作用 1 hr，TBST 緩衝液清洗兩次，每次 10 min。
18. 最後將硝化纖維紙浸入 20 ml 的受質溶液(Substrate Buffer) [即 20 ml 受質緩衝液(100 mM Tris-HCl，pH 9.5，100 mM NaCl，5 mM MgCl<sub>2</sub>)加上 7 mg 的 NBT(Nitrobluetetrazolium) 及 5 mg 的 5-Bromo-4-chlor-3-indolylphosphate(BCIP)] 進行呈色反應，約 5-10 min 後可用去離子水終止呈色反應並清洗之。

## 第三章 結果

### 肝臟外表：

老鼠感染中華肝吸蟲後，其肝臟外表光滑與一般的肝臟外表並無太大的差別，肝外膽管腫大，自外面隱約可見到中華肝吸蟲存在其中(圖一)，其餘肝膽組織外表並無明顯病灶產生。

### 血液常規評估：

感染中華肝吸蟲後實驗組與對照組 WBC 數值的比較，實驗組 WBC 數值一直呈現較高的值，其中以 50、60 週的數值比較高，但仍未達到顯著差異( $P>0.05$ )(Table 1)。感染中華肝吸蟲後實驗組與對照組 Eos 數值的比較，實驗組顯著高於對照組( $P<0.05$ )(Table 2)。其它血液常規值 Hb、Hct、Plt、Seg Lym。實驗組與對照組比較，統計上未出現顯著差異。

### 肝臟功能的生化值評估：

ALP、AST、ALT、LDH 四項生化值實驗組與對照組沒有顯著差異( $P>0.05$ )，但 ALP、AST、ALT 三項在感染 50、60wks 後實驗組顯著高於對照組(Table 3-6)。

### 肝臟及血清的 SDS-PAGE：

在 SDS-PAGE 方面，實驗組與對照組比較血清、細胞核、細胞質、微粒體、粒腺體，五項的 SDS-PAGE 實驗組並沒有發現特別的蛋白 pattern 出現(圖二、圖三、圖四)。僅有呈現零星的非特异性蛋白。

### 肝臟的病理染色觀察：

感染中華肝吸蟲 30 週後在膽管發現有發炎細胞浸潤、膽道上皮細胞增殖多層、纖維細胞增生(圖五 A)。感染中華肝吸蟲 40 週後在膽管發現有發炎細胞浸潤、淋巴細胞增多、嗜伊紅性球增加、膽道上皮細胞間隙擴大(圖五 B)。感染中華肝吸蟲 50 週後在膽管發現有發炎細胞浸潤、淋巴細胞增多、膽道上皮細胞間隙擴大、原纖維增加及膽管上皮細胞腺瘤樣增生(圖五 C)。感染中華肝吸蟲 60 週後在膽管發現有發炎細胞浸潤、原纖維增加、膽管上皮細胞腺瘤樣增生(圖五 D)。

### **免疫組織化學染色法結果：**

中華肝吸蟲感染後肝臟及膽管使用免疫組織化學染色法 (Immunohistochemistry stain) 染色，發現 30、40 週原致癌基因 c-fos 在膽管有輕微表達，50、60 週有中度表達(圖六)，c-jun、c-myc 並沒有明顯表達(圖七、圖八)。

### **西方墨點分析法測定：**

PKC 的蛋白量，由西方墨點分析法測定，顯示從 30wks 起在 cytosolic 與 membrane 實驗組的蛋白量皆有明顯表現(圖九)。

c-fos 的蛋白量，由西方墨點分析法測定，顯示從 30wks 起實驗組的蛋白量比對照組，有較明顯的表現(圖十)。

c-jun 的蛋白量表現，由西方墨點分析法測定，圖形顯示實驗組與對照組比較，並未出現較明顯的變化(圖十一)。

c-myc 的蛋白量表現，由西方墨點分析法測定，圖形顯示實驗組與對照組比較，有少量的表達但兩者比較並未出現明顯的變化(圖十二)。

## 第四章 討 論

由前人的研究得知(66-69)；中華肝吸蟲感染，可因其長期生活於肝內膽管中，致使被寄生之部位產生長期性的物理刺激(經常吸附於膽道內壁上皮細胞及經常移位，使細胞產生脫落與再生)及化學性刺激(蟲體的代謝廢物，成蟲或蟲卵所分泌的毒素或蟲屍腐敗所釋放的有毒物質，促使膽道內皮細胞過度增生)，蟲體多者甚至可堆積成堆，造成膽道阻塞，在阻塞上端會有膽管擴張，膽汁滯積，使病情惡化成為多發性肝膿腫。由於膽管細胞增生及發炎，細胞浸潤的結果，使得膽管纖維組織增生，如再合併細菌感染，加上肝吸蟲本身致癌物質的釋放，即可逐步演變成膽管上皮癌，周邊細膽管癌或原發性肝癌。此致病過程的病理變化，即為本篇實驗項目所欲加以探討的主題。

感染 *C. sinensis* 後，從 30 週起可看到白血球及絕對嗜伊紅性白血球和對照組相比較呈現持續性顯著的差異。血清生化值 AST、ALT、ALP 呈現稍微增加，但是 50-60 週有顯著差異，推測是長期刺激所導致，*C. sinensis* 確實可對動物體造成發炎反應。

臨床上所見到 *C. sinensis* 感染引起的膽管阻塞大部份是因蟲體停留處造成阻塞，而引起病變，如再加上細菌感染(大腸桿菌)易形成二次感染，進而導致阻塞性黃疸及急慢性膽管炎(70-71)，嚴重者併發膽結石(72)腫瘤(73)，膽管癌(74-78)本實驗嚴重的病變主要發生在肝內膽管及次級膽管，包括發炎細胞浸潤、嗜伊紅性白血球增加、膽管增生、膽管肥大、輕微纖維化、原纖維增加、膽管上皮細胞腺瘤樣增生及 proto-oncogene c-fos 在膽管的表現；因此判斷有週邊膽管癌的傾

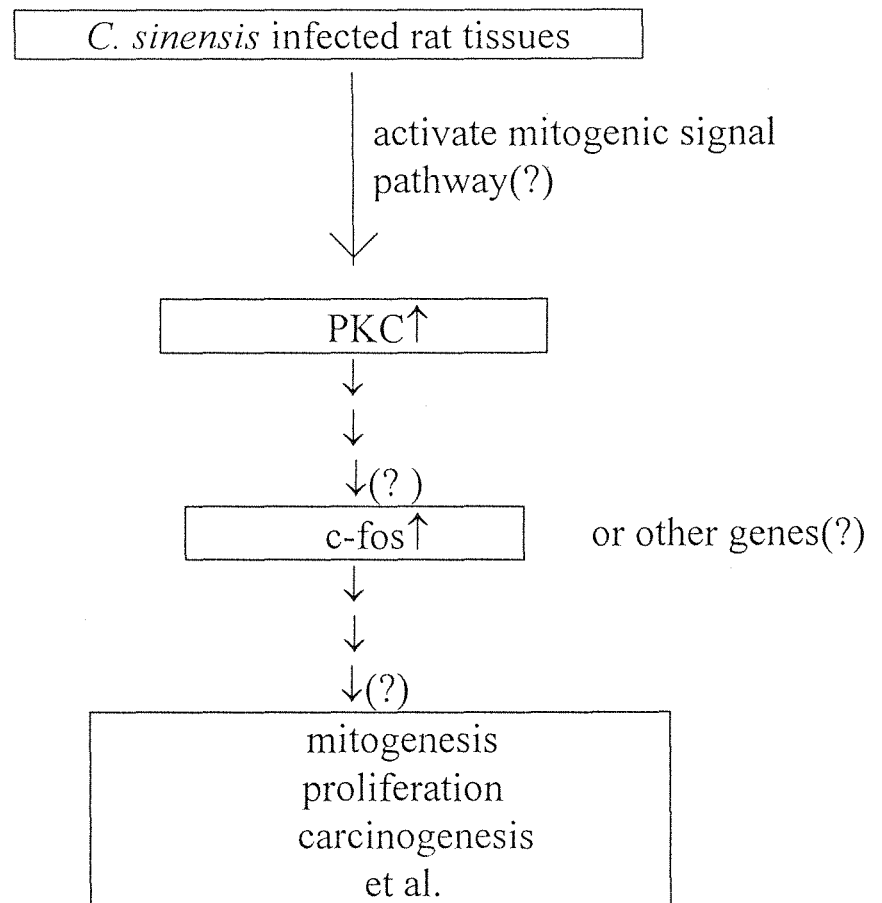


向。

當外來物(例如:病毒、霉菌、寄生蟲)與膜上相關接受器作用後導致特異性的 phospholipase C (PLC) 去水解 phosphatidylinositol -4, 5-biphosphate (PIP<sub>2</sub>)產生 inositol phosphate (IP<sub>3</sub>)及 diacylglycerol (DAG), IP<sub>3</sub> 溶解於細胞質促使儲存的鈣離子釋放出來而增加細胞中鈣濃度,親脂性的 DAG 則留在膜上,此時細胞質內的 protein kinase C(PKC)會移動到細胞膜上與 DAG、鈣、磷脂質形成複合體(53),當 PKC 轉位到膜上時會造成細胞內特殊蛋白質磷酸化而引起細胞內訊息傳遞; PKC 受到刺激後可激發 c-fos 5'端特定序列區域的表現(如 TRE; TPA response element)進而促使 c-fos 增加(79)且 pkc 也可使 c-jun 蛋白 c-端磷酸化而使 c-jun 的量增加,進而促使以 fos/ jun 的複合體存在,再促動多種基因的轉譯作用(transcription)而帶動細胞進入活躍狀態使細胞增殖(proliferation)和細胞分化(differentiation)(63)及促癌瘤作用(62-63)。因此 PKC 在細胞內的活性過高時會導致細胞生長失調,並且提高形成轉形細胞(Transformed cell)的可能性(80-81); 但一旦肝癌形成後 PKC 的活性會被負調解而下降(82); 本實驗由於受中華肝吸蟲感染時間與感染嚴重度的影響,雖未能見到 c-myc 有量的差異性表達、與 c-jun 的不同表現及形成真正的癌瘤細胞(只見到 PKC 量的增加與 fos 的表現),但在多步驟的致癌機轉中由 PKC 量的增加與 fos 的表現而提高致癌機轉的可能性,是值得進一步探討的。

實驗結果我們推測中華肝吸蟲可能經由誘導 PKC 的活化,再活化細胞的 protooncogene 的 c-fos 表現; 其詳細機轉有待進一步探討。

綜合本篇研究，我們提出一個因中華肝吸蟲感染而導致癌症的假設：



## 參考文獻

- 1、Wang JS, Tung PC, Chen HW. Studies on the control of zoonotic clonorchiasis. (1) An epidemiological survey in several areas of Taiwan. Natl Sci Counc Monthlyl ROC, 8: 113-22, 1980.
- 2、Hsieh HC. Outline of parasitic Zoonoses in Taiwan. Formosan Sci, 13: 99-108, 1959.
- 3、David I. Grove. A History of Human Helminthology, 6: 141-157, 1989.
- 4、Kim DC, Kuntz RE. Epidemiology and Heliminth Diseases. *Clonorchis sinensis*(Cobbold, 1875) looss, 1907 looss on Taiwain (Formosa). Chinese M J, 11: 29- 47, 1964.
- 5、小林晴治郎：細菌學雜誌(日本), 202:1-66, 1912.
- 6、Fan PC. Medical Parasitology, Taipei, Taiwain, ROC, Men-Chin Book Printing Co., Third Edition, 242-257, 1977.
- 7、Faust EC, Khaw, OK. Studies on *Clonorchis sinensis*. (Cobbold). Amer J Hyg Monographic Series, 8: 1-207, 1927.
- 8、Ohoi T. Survey of the intestinal parasites among local people in middle Taiwan. J Formosan Med Assoc , 154: 816-825, 1915.
- 9、Cross JH. Clonorchiasis in Taiwain. A review. In: proceedings of the 4th Southeast Asian Seminar on Parasitology and Tropical Medicine, Schistosomiasis and other Snail-Transmitted Helminthiasis. Manila,

24-27 February 1969, Thai Watana Panich Press,  
Bangkok, 231-242, 1969.

10. Chow LP. Epidemiological studies of clonorchiasis at Meinung township in southern Taiwan. Formosan Sci, 14: 135-165. 1960.
11. Clarke MD, Khaw OK, Cross JH. Clonorchiasis in Sun Moon Lake area. Chinese J Microbiol, 4: 50-60, 1971.
12. Ong SJ, Lu SC. Protozoan and Helminthic infections among the government workers and students of Miao-Li District in Miao-Li county : A highly endemic area of clonorchiasis in Taiwan. Chinese J Microbiol, 12: 13-20, 1979.
13. 趙慰先:人體寄生蟲學(第二版), 1994。
14. 陳瑩霖、顏全敏:中華肝吸蟲在臺灣的流行情形, 科學月刊, 24-27, 1981。
15. Chen ER, et al. Epidemiological Surveys of clonorchiasis in Taiwan. 10th International Congress on Trop Med and Malaria, 312, 1980.
16. Komiya Y, Suzuki N. The distribution of Clonorchis infection in Japan with remarks on its epidemiology, in Progress of Medical Parasitology in Japan, vol. 1, Meguro Parasitological Museum, Tokyo, 603, 1964.
17. Chong YJ, Young Ah. Epidemiological studies of *Clonorchis sinensis* in the vicinity of River Ahnseong, Kyungpook Province, (Korea) Jap J Parasito, 40; 6:542-552, 1991.
18. Yen CM, Chen ER, Fang AY, Chung TC. Human Clonorchiasis in New Endemic Areas of Taiwan, An Epidemiological

- Survey. Kaohsiung J Med Sci ,4:538-546, 1988.
- 19、鄭美英、李松玉等人：中華肝吸蟲在臺灣。疫情報導 17-19, 1990.
  - 20、Kim YI. Liver carcinoma and liver fluke infection. *Arzmittelforschung*, 34(9B):1121-1126, 1984.
  - 21、Flavell DJ. Liver-Fluke infection as An actiological Factor in Bile-duct carcinoma of Man. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* , 75:81-82, 1981.
  - 22、Nakashima T, Sakamoto K, Okudo K. A minute Hepato-cellular carcinoma found in a liver with *Clonochis sinensis* infection. *Cancer*, 39:1306-1311, 1977.
  - 23、Baker MS, Baker BH, Woo R. Biliary Clonorchiasis. *Arch Surg*, 114:748, 1979.
  - 24、Belamaric J. Intrahapatic bile duct carcinoma and *C. sinensis* Infection in Hong Kong. *Cancer* ,31:468-473, 1973.
  - 25、陳瑩霖、顏全敏等人：人體中華肝吸蟲病微量酵素標誌免疫診斷法。中華微免雜誌, 17: 210-8, 1984.
  - 26、陳瑩霖、顏全敏等人：台灣人體中華肝吸蟲病新流行地區的調查研究(一)流行病學的調查。Kaohsiung J Med Sci , 4: 538-546, 1988.
  - 27、Kim TS, Joo KH, Rim HJ. Evaluation of indirect hemagglutination test with adult worm antigen for the serodiagnosis of clonorchiasis. *Korea Univ Med J* , 24: 197- 205, 1987.
  - 28、Hahm JH, Lee JS, Rim HJ. Comparative study on the indirect immunofluorescent antibody test, complement fixation test ELISA in diagnosis of human clonorchiasis

- . Korea Univ med J, 21:177-84, 1984 .
- 29 · Han JH, Eom KS, Rim HJ. Comparative studies of the immunodiagnosis of clonorchiasis by means of micro-ELISA using sera and blood collected of filter paper. Korea Univ med J, 23:13-25, 1986.
- 30 · 林雅玲、顏全敏等人：中華肝吸蟲病之免疫學篩檢。臺灣醫誌，90:49-54, 1990.
- 31 · 葉錦龍、鄭美英等人：南投縣國姓鄉中華肝吸蟲病流行病學調查及藥物治療研究。疫情報導, 9;5:89-98, 1993.
- 32 · Chen CY, Hsieh WC. Clinical investigation of praziquantel in the treatment of *clonorchiasis sinensis*. J Formosan Med Assoc , 81:1434-1442, 1982.
- 33 · Chen ER, Hsieh HC, Yen CM, Shih CC. Efficacy of praziquantel in the treatment of clonorchiasis. J Formosan Med Assoc , 80:111-2, 1981.
- 34 · Lee HH, Shyu LY: In vitro effect of various ant-helminthics on the motility of adult *Clonorchis sinensis*. Chinese Journal of Parasitology, 8:1-7, 1995.
- 35 · Lee HH, Shyu LY. Response and character of the motility of adult *Clonorchis sinensis* in vitro . Chinese J of Parasitol (abstract), 7:31, 1994.
- 36 · Yokogawa M, Koyama H. Chemotherapy of *Clonorchis sinensis* (1) Chemotherapy with 1,4-bis-trichloromethylbenzol(hetol) for the experimentally infected animal with *Clonorchis sinensis*. Japan J parasitol 14;3:233-242, 1965.
- 37 · Lee HH, Shyu LY. Studies of chemotherapy of parasitic helminths(45) mode and mechanism of action of

- milbemycin oxime on *Angiostrongylus cantonensis* and *Dirofilaria immitis*. Chinese J Parasitol, 4:117,1991.
- 38、Lee HH, Shyu LY. In vitro effects of VD-99-11 on the motility of various parasitic helminths. Chinese J. Parasitol, 9:27-33,1996.
- 39、Fan PC, Huang P, Yen CW. Determination of minimum effective doses of praziquantel and albendazole on chemotherapy against *Clonorchis sinensis* in rodents. The 10th Annual Meeting of the Chinese Society of Parasitology, 27 ,1994.
- 40、蕭孟芳、陳正成、陳瑩霖：醫學寄生蟲學。力大出版社，1988.
- 41、Song CC, Duan YF, Shou GC, Zhu H. Studies on the use of Cobalt-60 Gamma irradiation to control infectivity of *Clonorchis sinensis* metacercariae . Southeast Asean J Trop Med Public Health, 23:71-76,1992.
- 42、Hou PC. The relationship between primary carcinoma of the liver and infestation with *Clonorchis sinensis*. J Path Bact, 122:239-246, 1956.
- 43、邱福禧等：中華分支睪吸蟲傳染作為膽道、肝和胰腺等一些疾患致病因素的探討。中華醫學雜誌(大陸), 49: 573-580, 1963.
- 44、Belamaric J. Intrahepatic bile duct carcinoma and *C. sinensis* infection in Hong Kong. Cancer 31:468-473,
- 45、郭美真陳瑩霖：中華肝吸蟲感染家兔之膽道微細構造寵觀察。台灣醫誌， 80:765-773,1981.
- 46、Flanell DJ. Liver-fluke infection as an aetiological factor in bile-duct carcinoma of man. Trans R Soc Trop Med Hyg, 75:814-824,1981.

- 47、朱師晦：中華分支畢吸蟲病與其它肝膽疾病的關係。中華內科雜誌(大陸), 10:22-28, 1982.
- 48、Kim IL, Yu ES, Kim ST. Intraductal Variant peripheral cholangiocarcinoma of the liver with *Clonorchis sinensis* infection. Cancer , 63:1562-1566, 1989.
- 49、Fernando V, ONA and Joseph NT. Clonorchis-associated cholangiocarcinoma: A report of two cases with unusual manifestations. Gastroenterology, 101:831-839, 1991.
- 50、Huang SC, Chen L, Eng Hl, Chen WJ. Gallbladder adenocarcinoma with gallstone and calcified ova of *Clonorchis sinensis* - A case report. Chang Gung Med J 17:94-99, 1994.
- 51、Inoue M, Kishimoto A, and Takai Y. Studies on a cyclic nucleotide-indepebden protein Kinase and its proenzyme in mammalian tissues. (π)proenzyme and its activation by calcium-dependen protase from rat brain. J Biol Chem, 252:7610-7616, 1977.
- 52、Yasutomi N. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. Nature, 308:693-698, 1984.
- 53、Berridge MJ. Inositol triphosphate and diacyl-glycerol : Two interacting second messengers. Annu rev Biochem, 56:153-93, 1987.
- 54、Rozengurt E. Signal Transduction pathway in mitogenesis. Brit Med Bull, 45:515-528, 1989.
- 55、Hisaaki T, Stephane M, Masami S, and Koiti T. Myristoylated alanine-rich C Kinase substrate (MARCKS) a major protein Kinase C substrate is an in vivo substrate



- of proline-directed protein kinase. J Biol Chem, 269: 18299-302, 1994.
- 56 · Takai Y. Kishimoto A. Inoue M. and Nishizuka Y. Studies on a cyclic nucleotide-independent protein Kinase and its proenzyme in mammalian tissues. J Biol Chem , 252: 7603-7609 , 1977.
- 57 · Hunter T. Ling N. and Cooper JA. Protein Kinase C Phosphorylation of EGF receptor at a Threonin residue close to the cytoplasmic face of the plasma membrane. Nature, 311:480-483, 1984.
- 58 · Jacobs S, Sahyoun NE, Saltiel AR, and Cuatrecasas P. Phorbol ester stimulate the phosphorylation of receptors for insuline and somatomedin C. Proc Natl Sci, USA. 80: 6211-6213, 1983.
- 59 · May WS, Jacobs S, and Cuatrecasas P. Association of Phorbol ester -induced hyperphosphorylation and reversible regulation of transferrin membrane receptors in HL 60 cells. Proc Natl Sci, USA. 81: 2016-2020, 1984.
- 60 · Schatzman RC, Grifo JA, Merrick WC, And Kuo JF. Phospholipid-sensitive  $Ca^{2+}$ -Dependent protein kinase hosphorylates the beta subunite of eukaryotic initiation factor 2 (eIF-2). FEBS Lett, 159:167-170, 1983.
- 61 · Le peuch, CJ, Ballester R, and Rosen OM. Purified rat brain calcium and Phospholipid-Dependent protein kinase phosphorylates ribosomalprotein S6. Proc Natl. Acad. Sci, USA .80: 6858-62, 1983.

- 62 · Curran T, Franza BR. Fos and Jun the AP-1 concentration. *Cell*, 55:395-397, 1988.
- 63 · Nishizuka Y. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* , 233: 305-312, 1989 .
- 64 · Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
- 65 · Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein Kinase C and its implication for cellular regulation *Nature* , 334: 661-665, 1988.
- 66 · Kuo MC, Chen ER. Ultrastructure of rabbit biliary tract infected with *Clonorchis sinensis*. *J Formosan Med Assoc* , 80:765-773, 1981.
- 67 · Okanoue T, Takino T, Okuno T, Sugino S, Ogasawara T, Takahashi T. Electromicroscopic study on the cells related to hepatic fibrosis in chronic liver disease. *Liver*, 17: 820-831, 1976.
- 68 · Sun T, Tung ML. Ultrastructural changes in the biliary tracts of guinea pigs infected with *Clonorchis sinensis*. *J Pathol*, 109: 291 -294, 1973.
- 69 · Wang SJ, Su KE. Pathological studies on liver of guinea pigs infected with *Clonorchis sinensis*. Abstract of the 7th Annual Meeting of the Chinese Society of Parasitology, (abstract) 11. 1991.
- 70 · Koo J, Ho J, Wong J, Ong GB. Mucoepidermoid carcinoma of the bile duct. *Annals of Surgery*, 196: 140-148, 1982.
- 71 · Lim JH, Ko YT. Clonorchiasis of the pancreas. *Clinical Radiology*, 41:195-198, 1990.

- 72 · Jimenz T, DiBenedetto A. Common duct stone with associated *Clonorchis sinensis* infection. New York State Journal of Medicine, 89: 480-481, 1989.
- 73 · Kim YI, Yu ES, Kim ST. Intraductal variant of peripheral cholangiocarcinoma of the liver with *Clonorchis sinensis* infection. Cancer, 63: 1562-1566, 1989.
- 74 · Choi BI, Park JH, Kim YI, Yu ES, Kim SH, Kim CY, Han ME. Peripheral cholangiocarcinoma and clonorchiasis: CT finding Radiology, 136: 149-153, 1988.
- 75 · Juttijudata P, Prichanond S, Churnratanakul S, Chiemchaisri C. Hilar intrahepatic cholangiocarcinoma and its etiology J Clin Gast, 6: 503-504, 1984.
- 76 · Papillo JL, Leslie KO, Dean RA. Cytologic diagnosis of liver fluke infestation in a patient subsequently documented cholangio-carcinoma. Acta cytologica, 33: 865-869, 1989.
- 77 · Schwartz DA. Cholangiocarcinoma associated with liver fluke infection : a preventable source of morbidity in Asian immigrants. American Journal of Gastroenterology, 81: 76-79, 1986.
- 78 · Sher L, Iwatsuki S, Lebeau G, Zajko AB. Hilar cholangiocarcinoma associated with Clonorchiasis. Diagnostic Disease Science, 34: 1121-1123, 1989.
- 79 · Robert JD, Bruce MS. Protooncogene c-fos as a transcription factor. Adv Can Res, 55: 37-55, 1990.
- 80 · Gerard M, Mark D. Overproduction of protein Kinase C causes disordered growth in rat fibroblasts. Cell, 52: 343-54, 1988.
- 81 · Derek A, Persons, William O. Altered growth regulation and enhanced tumorigenicity of NIH 3T3 fibroblasts

transfected with protein kinase C-1 cDNA. Cell, 52: 447-58, 1988.

- 82 · Chang KJ, Lin JK, Lee PH, Hsieh YS, Cheng CK, Liu JY. The altered activity of membrane-bound protein kinase C in human liver cancer. Cancer Letters ,105: 211-215, 1996.

Table 1 Comparison of WBCs between normal and *C.sinensis* infected Rats

wks	Control (10 <sup>3</sup> /ul)	Infected (10 <sup>3</sup> /ul)
30	7696 ±1797 <sup>a</sup>	8880 ±1387
40	6089 ±1180	6137 ± 909
50	8963 ±1588	9740 ±1217
60	7600 ±919	8072 ±1338

a: mean ±sd ;n=3

\*: p<0.05;compared with control

Table 2 Comparison of Eosinophils between controls and *C.sinensis* infected Rats

wks	Control (10 <sup>3</sup> /ul)	Infected (10 <sup>3</sup> /ul)
30	293 ± 90 <sup>a</sup>	494 ± 175*
40	156 ± 39	360 ± 153*
50	167 ± 73	453 ± 146*
60	213 ± 62	550 ± 229*

a: Mean ± sd ,n=3

\*: p<0.05; compared with control

Table 3 Alkaline phosphatase activity comparison between controls and *C. sinensis* infected rats

wks	Control (U/L)	Infected (U/L)
30	349 ± 12 <sup>a</sup>	309 ± 13
40	197 ± 85	236 ± 79
50	311 ± 40	563 ± 138*
60	307 ± 118	637 ± 130*

a: Mean ± sd, n=3

\*: p<0.05 ; compared with control

Table 4 Aspartate aminotrasferase activity comparison between controls and *C. sinensis* infected rats

wks	Control (U/L)	Infected (U/L)
30	101 ± 6 <sup>a</sup>	43 ± 55
40	98 ± 4	100 ± 11
50	60 ± 5	79 ± 6
60	89 ± 10	125 ± 33 *

a: Mean ± sd, n=3 ;

\*: p<0.05; compared with control



Table 5 Alanine aminotrasferase activity comparison between controls and *C. sinensis* infected rats

wks	Control (U/L)	Infected (U/L)
30	45 ± 7 <sup>a</sup>	44 ± 2
40	46 ± 4	64 ± 3
50	36 ± 5	50 ± 6*
60	42 ± 9	142 ± 48*

a: Mean ± sd ,n=3 ;

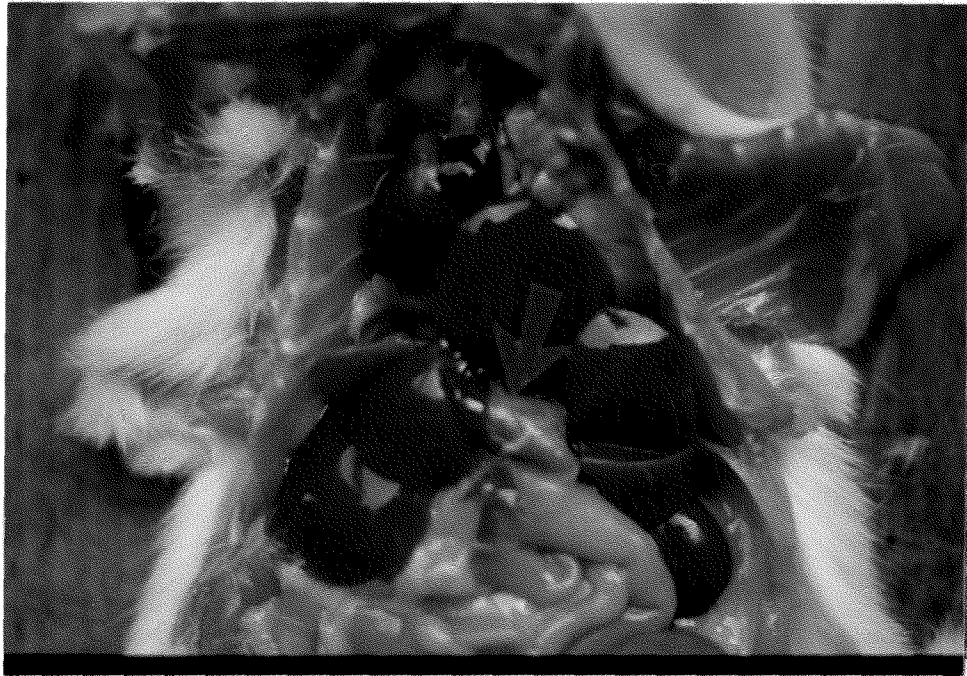
\*: p<0.05 ; compared with control

Table 6 Lactate Dehydrogenase activity comparison between controls and *C. sinensis* infected rats

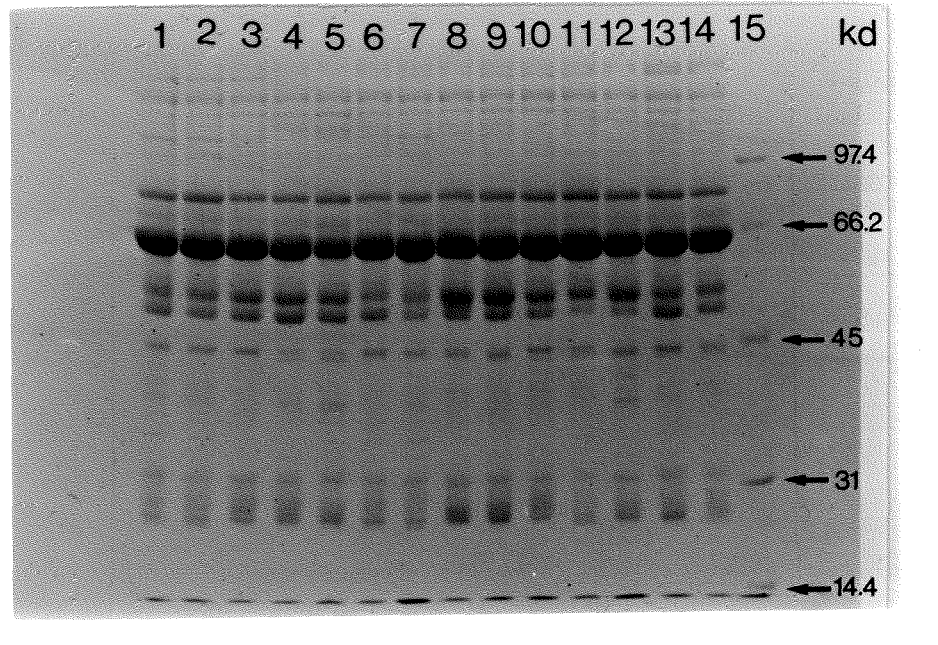
	Control	Infected
wks	(U/L)	(U/L)
30	2223 ±96 <sup>a</sup>	2412 ±783
40	2209 ±94	1851±226
50	1807 ±118	2254 ±294*
60	1656 ±372	1798 ±542

a: Mean ± sd,n=3

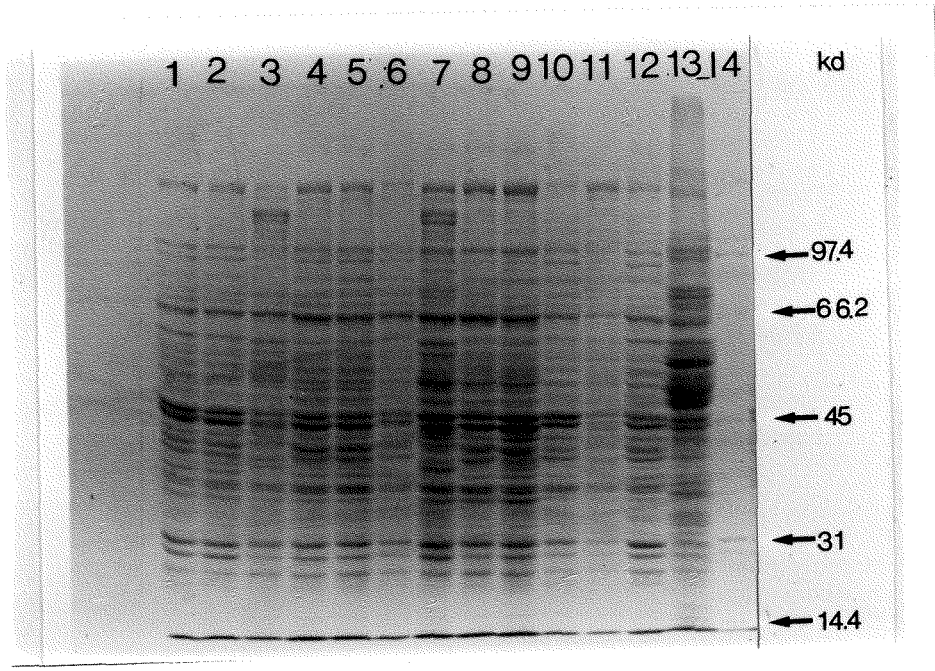
\*: p<0.05 ; compared with control



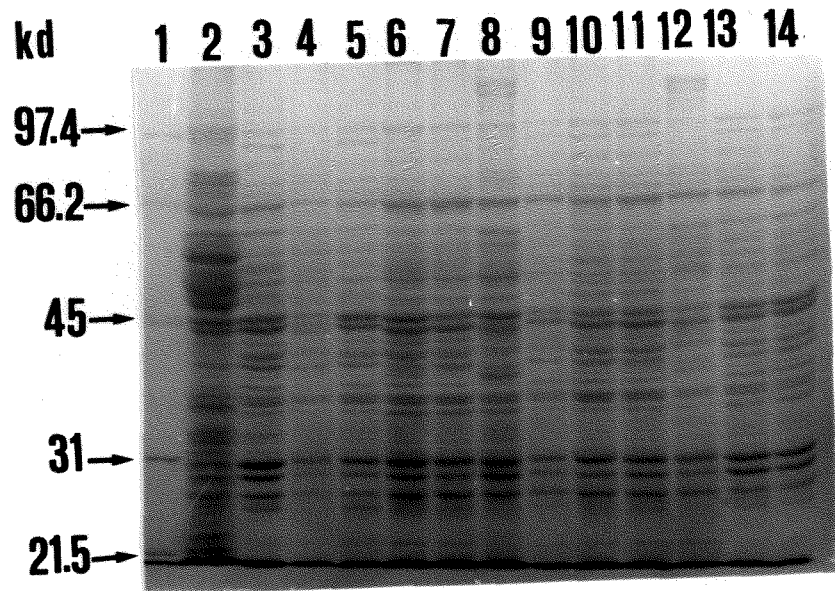
圖一 感染中華肝吸蟲 60 週後大白鼠解剖時發現膽管腫大（箭頭所指）。



圖二 老鼠感染中華肝吸蟲後血清電泳圖形  
 lane 1-3, 60 wks; lane 4-6, 50 wks; lane 7-9, 40  
 wks; lane 10-12, 30 wks; lane 13-14, Control;  
 lane 15, markers。

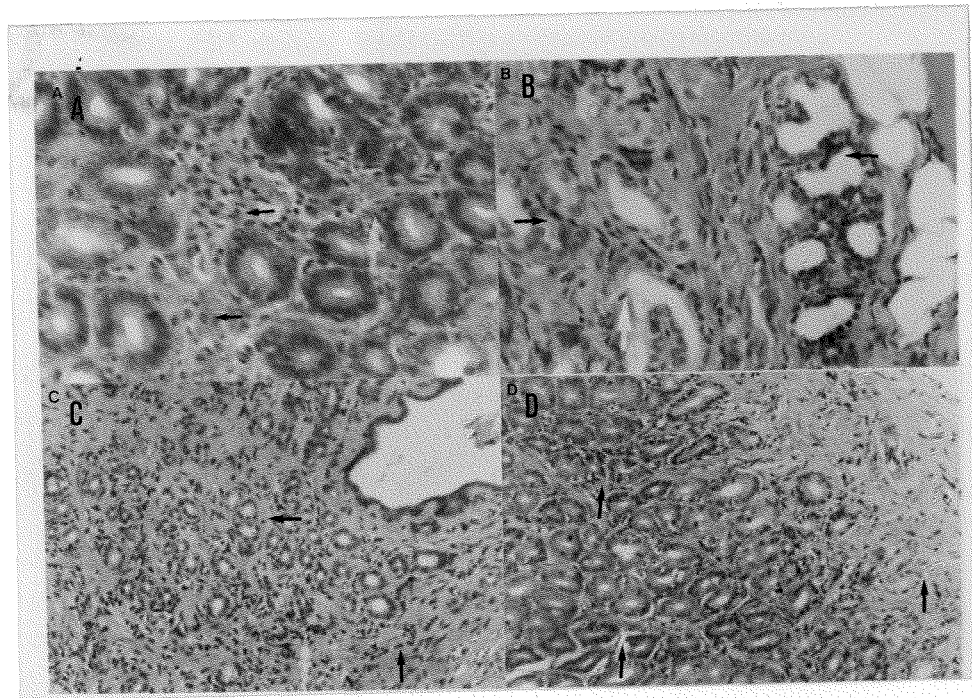


圖三 老鼠感染中華肝吸蟲後肝細胞核蛋白質電泳圖形  
 lane 1-3, 60wks; lane 4-6, 50wks; lane 7-9, 40wks;  
 lane 10-12, 30wks; lane 13, control; lane 14  
 markers。

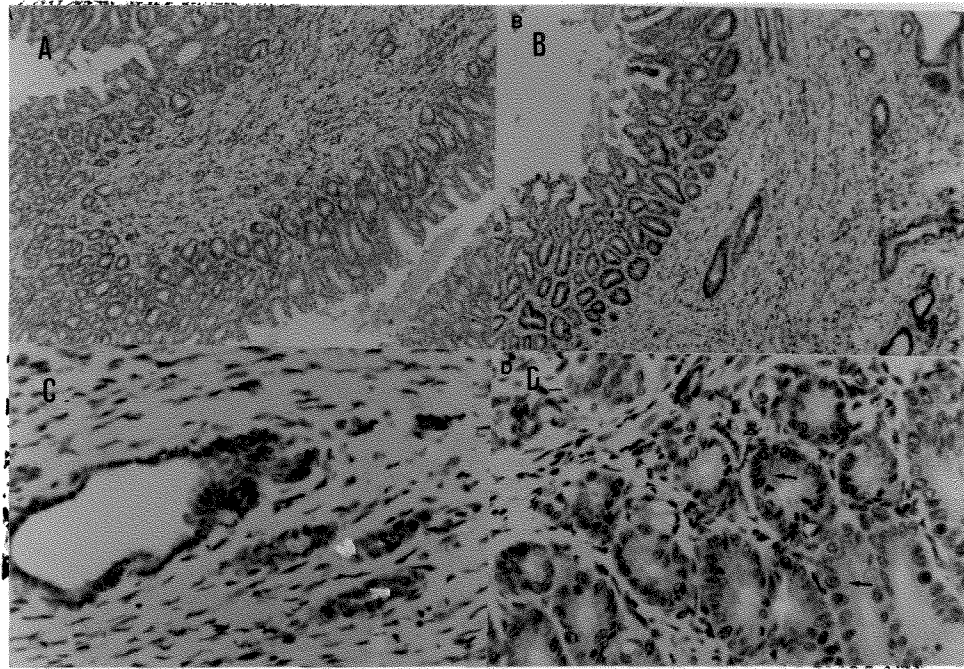


圖四 老鼠感染中華肝吸蟲後肝細胞質蛋白質電泳圖形

lane 1, markers ; lane 2, control; lane 3-5, 30wks;  
lane 6-8, 40wks; lane 9-11, 50 wks ; lane 12-14, 60wks 。

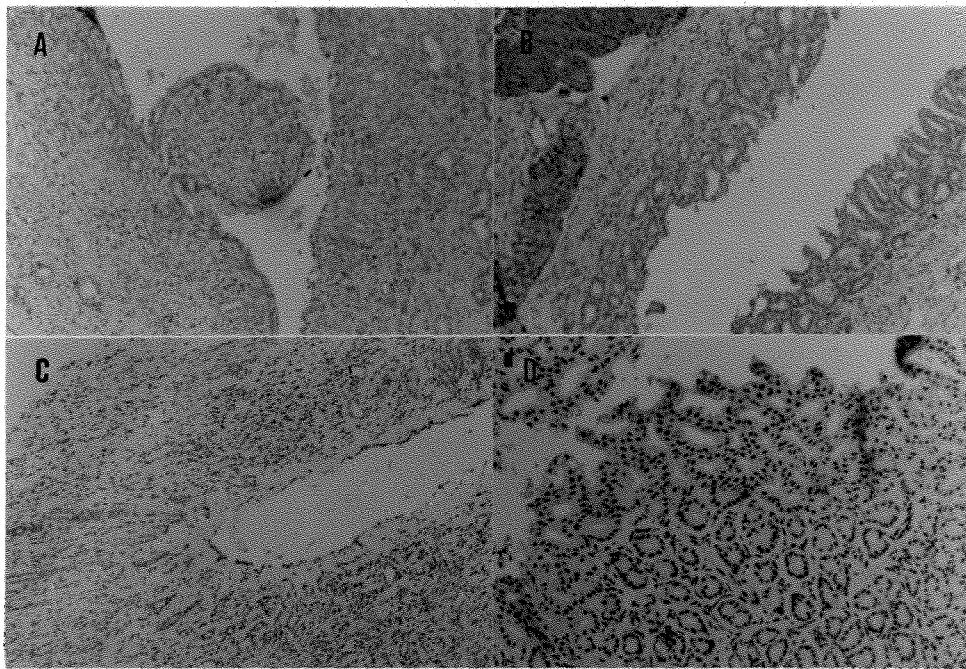


圖五 感染中華肝吸蟲後肝、膽組織的病理變化。A. 箭頭指處顯示感染 30 週後在膽管發現有發炎細胞浸潤、膽道上皮細胞增殖多層、纖維細胞增生。B. 箭頭指處顯示感染 40 週後在膽管發現有發炎細胞浸潤、淋巴細胞增多、嗜伊紅性球增加、膽道上皮細胞間隙擴大。C. 箭頭指處顯示感染 50 週後在膽管發現有發炎細胞浸潤、淋巴細胞增多、膽道上皮細胞間隙擴大、原纖維增加及膽管上皮細胞腺瘤樣增生。D. 箭頭指處顯示感染 60 週後在膽管發現有發炎細胞浸潤、原纖維增加、膽管上皮細胞腺瘤樣增生。H-E stain。X 400。

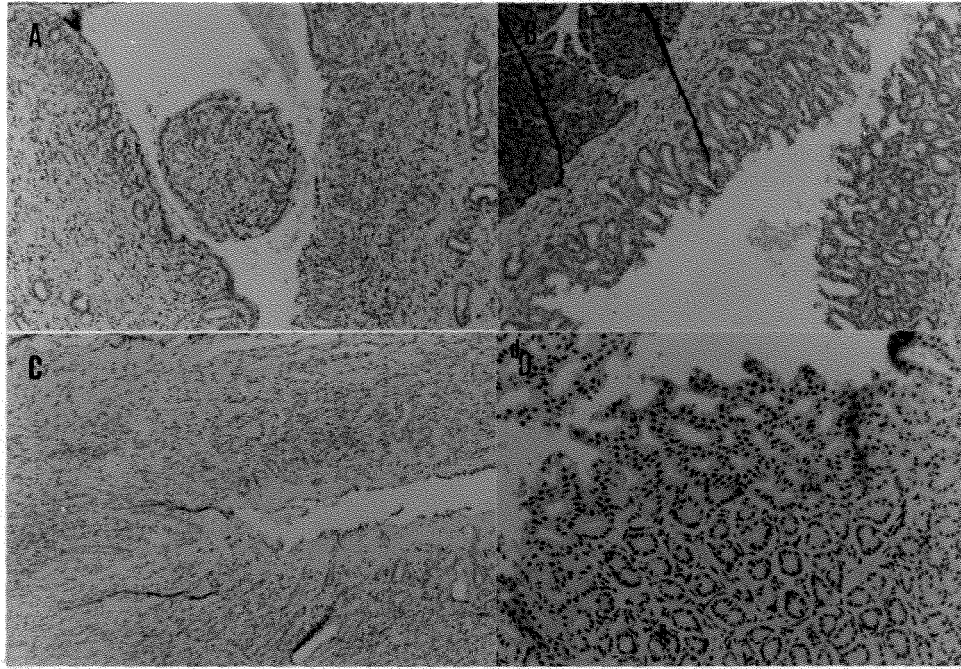


圖六 c-fos(immunocytochemistry stain)在大白鼠感染中華肝吸蟲後肝臟及膽管的表達。圖 A. 感染後 30 週;圖 B. 感染後 40 週; 圖 C. 感染後 50 週;圖 D. 感染後 60 週。400X。

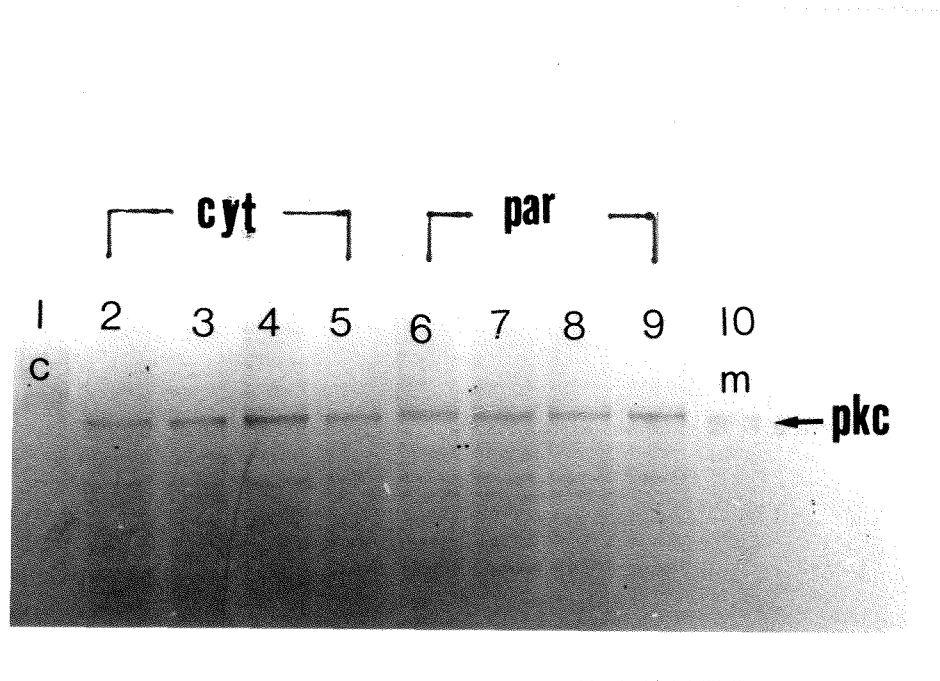




圖七 c-jun(immunocytochemistry stain)在大白鼠感染中華肝吸蟲後肝臟及膽管的表達。圖A. 感染後30週；圖B. 感染後40週；圖C. 感染後50週；圖D. 感染後60週。400X



圖八 c-myc(immunocytochemistry stain)在大白鼠感染中華肝吸蟲後肝臟及膽管的表達。圖 A. 感染後 30 週；圖 B. 感染後 40 週；圖 C. 感染後 50 週；圖 D. 感染後 60 週。400X。



圖九 感染中華肝吸蟲後對肝膽細胞PKC(western blot)蛋白質的影響。lane 1, control ; lane 2, 6, 30 wks ; lane 3, 7, 40 wks ; Lane 4, 8, 50 wks; Lane 5, 9, 60 wks; lane 10, mark。

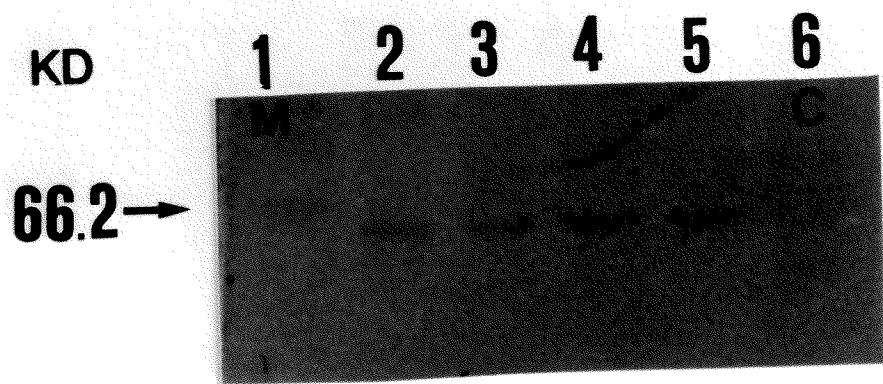


圖 十 感染中華肝吸蟲後對肝膽細胞 c-fos(western blot )  
 蛋白質的影響。 lane 1, mark ; lane 2 , 30 wks ;  
 lane 3 , 40 wks ; lane 4 , 50 wks ; Lane 5, 60 wks;  
 Lane 6 , control 。

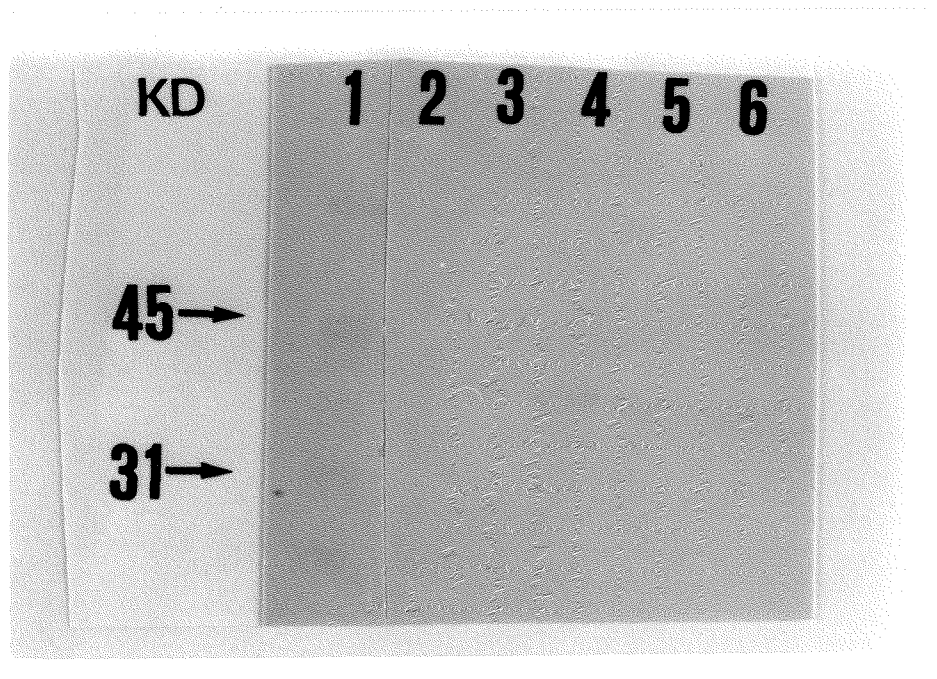


圖 十一 感染中華肝吸蟲後對肝膽細胞 c-jun(western blot )  
蛋白質的影響。 lane 1 , mark ; lane 2 , control ;  
lane 3 , 30 wks ; lane 4 , 40 wks ; Lane 5 , 50 wks ;  
Lane 6 , 60 wks 。

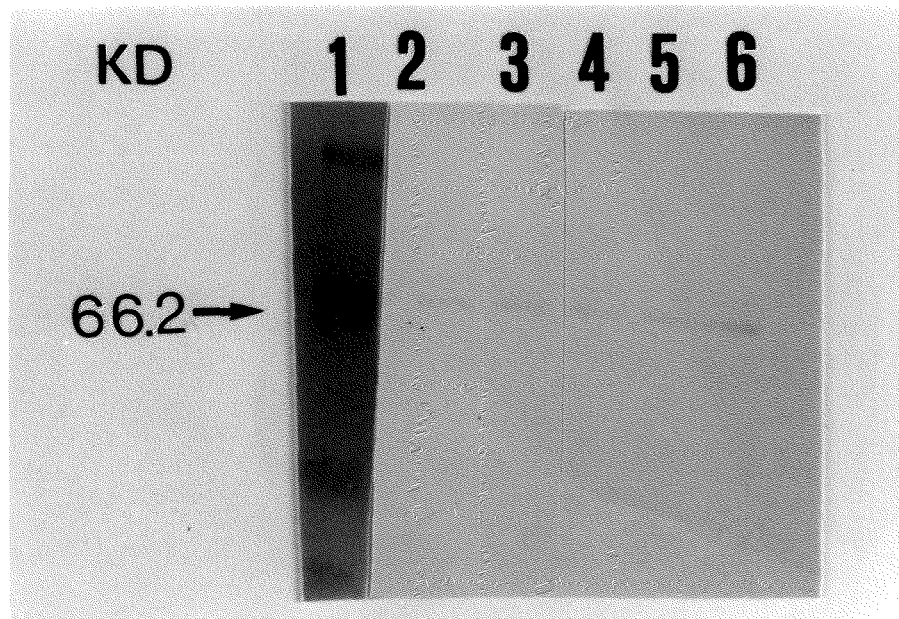


圖 十二 感染中華肝吸蟲後對肝膽細胞 c-myc(western blot) 蛋白質的影響。 lane 1 , mark ; lane 2 , control , lane 3, 30 wks ; lane 4, 40 wks ; Lane 5 , 50 wks; Lane 6 , 60 wks 。



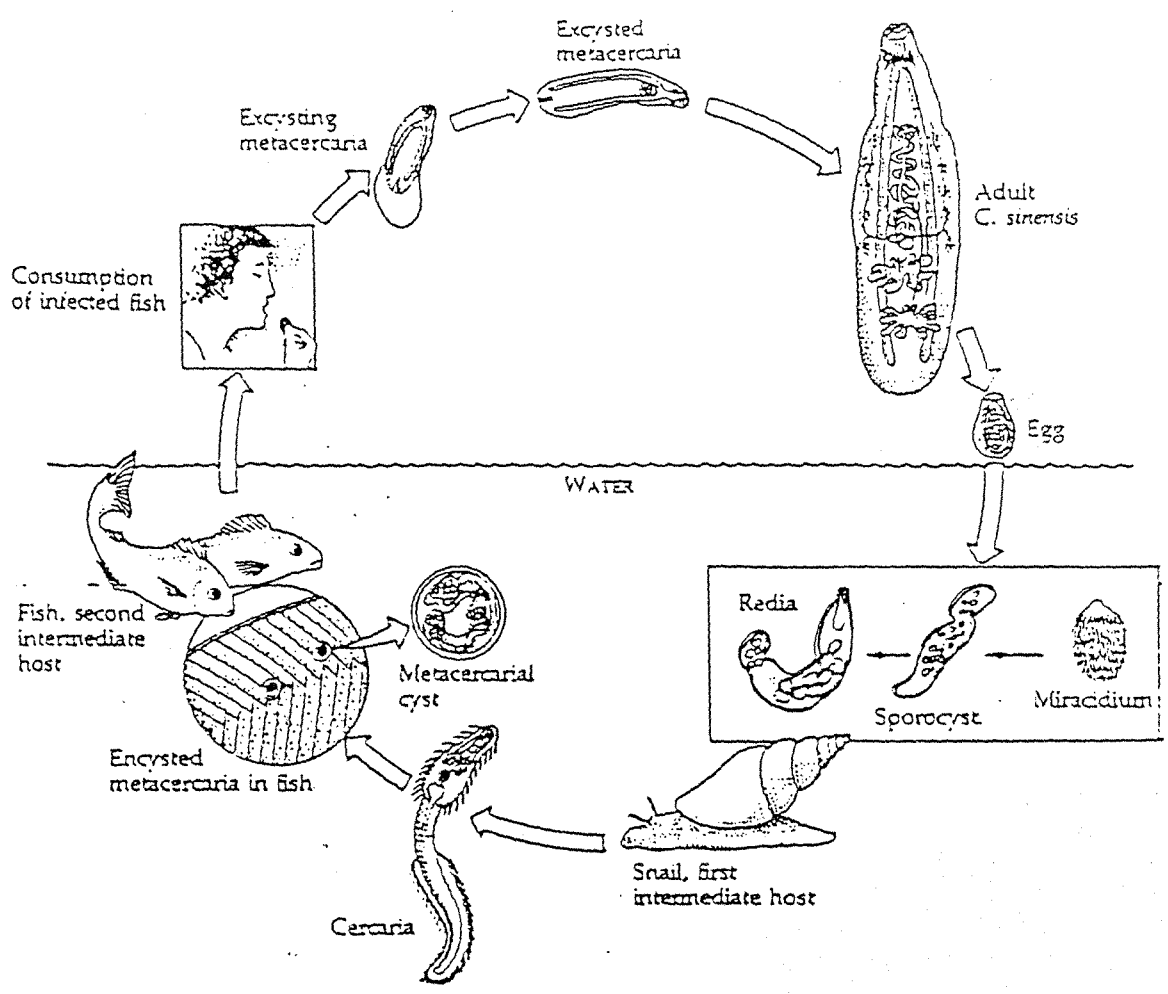
附圖一 中華肝吸蟲成蟲

(摘自：Wallace: Tropical Medicine and Parasitology 3rd  
1989)



附圖二 中華肝吸蟲的第二中間宿主克氏鱈魚





附圖三 中華肝吸蟲生活史  
 (摘自: Burton JB. Human Parasitology, 1990)