

編號：CCMP95-TP-031

## 肝纖維化動物模式評估中西醫藥 併用抗肝纖維化療效及機制探討

邱雲棕

台中榮民總醫院

### 摘 要

以體內 (*in vivo*) 肝纖維化動物模式建立各種生物活性評估方法後，針對中草藥單方—丹參與複方—柴胡舒肝散合併西藥 rapamycin 進行評估抗肝纖維化之藥效探究其機轉研究。

以每週管餵兩次四氯化碳 (1ml/kg) 誘導大鼠肝纖維化 8 週期間，分別給予丹參 (SM 40mg/kg/day)、Rapamycin (1.5mg/kg/day)、Rapa+SM、柴胡舒肝散 (SHP 2.5g/kg/day) 及 SHP+Rapa 處理 (另預留正常對照組與四氯化碳組)，透過血清生化指標 (SGOT、SGPT、BUN)，肝纖維化評分，肝臟  $\alpha$ -SMA 與膠原蛋白含量測定，金屬蛋白酵素 (MMPs)，以及肝纖維化生成作用 (fibrogenesis) 相關基因 TGF- $\beta$ 1 基因表現等指標項目，比較餵食中西醫藥合併療程的藥物之抗炎症反應、抑制星狀細胞增生及膠原蛋白合成情形，以評估其抗肝纖維化療效。

除 Rapa+SM 組死亡率 50% 外，其他各組並無死亡情形。Rapa、Rapa+SM、SHP、Rapa+SHP 處理之組別 SGOT、SGPT 明顯較 CCl<sub>4</sub> 組降低 (P<0.01)。組織病變與肝纖維化程度評分方面，Rapa、Rapa+SM、SHP、Rapa+SHP 處理之組別亦均較四氯化碳組輕微 (P<0.05)。肝臟組織中總膠原蛋白之定量分析，給予中藥、西藥或中西藥合併處理組之肝臟中總膠原蛋白含量明顯低於四氯化碳組 (P<0.05)。活化態肝臟星狀細胞之定量分析結果，Rapa 與 Rapa+SM 組  $\alpha$ -SMA 表現亦均明顯低於 CCl<sub>4</sub> 組 (P<0.001)。Rapa、Rapa+SM 及 Rapa+SHP 處理組之 MMP-2、TGF- $\beta$ 1 均可見減少的趨勢 (P<0.01)。從以上結果證實，

給予 Rapamycin、SM+Rapa、SHP 及 SHP+Rapa 處理均可透過抑制 TGF- $\beta$ 1 表現，減少肝星狀細胞之增生及活化，並影響 MMP-2 表現，減少膠原蛋白之合成，以改善肝纖維化。

關鍵詞：肝纖維化、中西醫藥合併、肝臟星狀細胞、動物模式

Number: CMP95-TP-031

# **The Effects and Mechanism Studies of Herb Drugs Combining with Western Medicine to Inhibit Liver Fibrosis in Animal Models**

Yung-Tsung Chiu

Taichung Veterans General Hospital

## **ABSTRACT**

In this study, we use *in vivo* liver fibrosis in rat models to investigate the mechanisms of anti-fibrotic and hepato-protective effects of *Salvia miltiorrhiza* (SM), Shugan-Huayu powder (SHP) and combine with rapamycin (Rapa).

Liver fibrosis was induced by carbon tetrachloride (1.0ml/kg, by gavage) twice a week for 8 weeks. Carbon tetrachloride-induced rats were randomly assigned to seven groups: Control, CCl<sub>4</sub>, SM (40mg/kg/day), Rapa (1.5mg/kg/day), SM+Rapa, SHP (2.5g/kg/day), and SHP+Rapa. Assessment of therapeutic effects are include: (1) serum biochemical markers including SGOT, SGPT, and BUN, (2) histological scoring of liver fibrosis, (3) quantitation of hepatic collagens and  $\alpha$ -SMA, (4) Matrix metalloproteinases (MMPs) activity, and (5) molecular markers of fibrogenesis including TGF- $\beta$ 1 mRNA expressions.

After the treatments with drugs, the mortality of SM+Rapa group is 50%. The contents of SGOT and SGPT of Rapa·Rapa+SM·SHP and Rapa+SHP groups were significantly decreased ( $P<0.01$ , vs CCl<sub>4</sub> group). The degree of histopathological examination and scoring of liver fibrosis revealed improved after Rapa, Rapa+SM,

SHP and Rapa+SHP treatment ( $P<0.05$ ). Liver collagen determinations were also markedly reduced in the same groups ( $P<0.05$ ). In quantitation of activated hepatic stellate cells, we found that  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) were markedly reduced by Rapa and Rapa+SM treatment ( $P<0.001$ , vs  $\text{CCl}_4$  group). The MMP-2 activity and TGF- $\beta$ 1 level were both decreased in the same trend. These results show that treatments of rapamycin, SM+Rapa, SHP and SHP+Rapa have anti-fibrotic effects in  $\text{CCl}_4$ -induced liver fibrosis rat model. The anti-fibrotic mechanisms might through inhibiting stellate cell proliferation and activation.

Keywords: liver fibrosis, traditional Chinese herb, hepatic stellate cell, animal model

## 壹、前言

在台灣及世界各國，B 及 C 型等病毒性肝炎與酒精性肝炎均為肝臟疾病的主要禍首<sup>(1-3)</sup>，當肝臟疾病若未能及時治療，病程之持續發展結果就可能導致不可逆之肝硬化。在肝臟中肝細胞為主要細胞，比率超過 80%，但對各種肝損傷因子甚為敏感，如 hypoxia、reactive oxygen species (ROS)、toxic chemicals (including drugs)、alcohol、bile acids<sup>(4-6)</sup>，當肝細胞受損時活化細胞表面的接受體，將引發一連串細胞內粒線體的破潰及蛋白質崩解之連鎖反應，導致肝細胞的凋亡 (apoptosis) 或壞死<sup>(4-5)</sup>。而此現象更與肝臟中之其他細胞 (Kupffer cells、sinusoidal endothelial cells、hepatic stellate cell leukocytes、monocytes and neutrophils)，以及一些生化氧化因子 (lipid peroxidation、reactive oxygen species and GSH/GSSG redox buffer) 有密切關係<sup>(4-6)</sup>。其中引起肝纖維化最重要的細胞為星狀細胞 (Hepatic stellate cell, HSC)，此細胞在正常下呈休止狀態存在於竇狀隙中，但當肝細胞受損時及前述之生化氧化因子發動時，將活化 HSC 使其形態、行為及生化特性發生改變，進而大量增生並轉變成纖維性細胞 (Fibrogenic cell)，合成大量的細胞外母質 (Extracellular matrix) 如 Collagen I、III，並沉積於竇狀隙中阻礙了內皮細胞的滲透性，降低了竇狀隙中物質的通透運送，使肝功能受損，且由於膠原纖維持續的合成沉積，逐漸演變成肝纖維化進而轉變成肝硬化併發門脈高壓<sup>(7-9)</sup>。在肝纖維化的調控因子中，影響 HSC 增生最強的因子為 platelet-derived growth factor (PDGF)<sup>(10)</sup>，其來源可由 HSC 自己分泌或由增生之膽管細胞合成<sup>(11)</sup>，而 transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 為刺激 HSC 活化，產生膠原纖維之最重要因子<sup>(12)</sup>，在肝纖維化中可見 TGF- $\beta$ 1 量明顯上升以調節 HSC 的活性。另一參與纖維化之調控因子 connective tissue growth factor (CTGF) 則可促進 TGF- $\beta$ 1 作用、纖維母細胞增生及膠原纖維之沉積<sup>(13)</sup>。

近年來大部分治肝研究方面，主要針對直接阻斷纖維化形成的連鎖反應，以及抑制和逆轉 (reversing) 纖維化<sup>(14-15)</sup>，在研究抗纖維化治療策略尚可歸納以下數點：一、抗氧化的功效，二、抗炎症反應，三、細胞激素 (cytokine) 的阻斷，四、抑制膠原纖維的合成，五、促使肝臟星狀細胞加速凋亡<sup>(16-17)</sup>。雖然目前有一些藥物對於治療肝纖維化有抑制及部分逆轉作用<sup>(16, 18-21)</sup>，有動物實驗結果及肝硬化病人臨床用藥及外科治療效果的證實<sup>(22-23)</sup>，對於西藥治療肝纖維化之研究進展方面，包括干擾素 (Interferon- $\alpha$ )<sup>(24)</sup>、抗轉型生長因子 (anti-TGF- $\beta$ 1) 之抗體<sup>(25)</sup>、肝

細胞生長因子 (hepatocyte growth factor, HGF) <sup>(26)</sup> 等，但是到目前為止市面上卻無一種適合有效的西藥可治療肝纖維化。然而近年來掀起中草藥開發的研究風氣<sup>(27)</sup>；如 Han-Dan-Gan-Le <sup>(28)</sup>、小柴胡湯<sup>(29-30)</sup>、龍膽瀉肝湯 <sup>(31)</sup>、柴胡疏肝散<sup>(32)</sup>與丹蔘 (Salvia miltiorrhiza) <sup>(33-34)</sup> 等，在動物實驗結果及肝硬化病人臨床用藥上均有良好治療效果的證實。

其中柴胡疏肝散在我們的先前研究報告中，於四氯化碳肝纖維化動物試驗中發現具有明顯抗肝纖維化<sup>(32)</sup>及抗氧化和解毒作用<sup>(35)</sup>，在抗肝纖維化作用機制為抑制肝臟星狀細胞活化增生及細胞外母質膠原纖維之合成分泌。根據衛生署「臺灣常用藥用植物圖鑑」<sup>(36)</sup>及明朝〈景岳全書〉中記載柴胡疏肝散具有疏肝行氣、和血止痛之功效。柴胡疏肝散各單方之作用如下：柴胡能疏肝解鬱，對免疫系統有增強作用，其中柴胡皂苷 (saikosaponin) 為主效成分，具鎮靜、鎮痛、解熱及鎮咳之作用，具有保肝利膽之功效；柴胡與香附具明顯之鎮痛解熱作用；柴胡、香附、甘草、枳殼與陳皮均可抑制炎症反應；枳殼、陳皮、白芍及甘草具解痙作用；川芎可抑制 Thromboxane A<sub>2</sub> 之血栓形成作用，白芍也具有抗血栓及降血壓之功效；枳殼成分中之檸檬烯 (d-Limonene) 可促使膽管收縮以利膽汁分泌<sup>(37-38)</sup>。柴胡疏肝散為中醫常用之肝病治療方劑，根據臨床病例指出，柴胡疏肝散對病毒性肝炎<sup>(39-40)</sup>與酒精性脂肪肝<sup>(41)</sup>具有療效，可顯著降低肝硬化患者 ALT 及  $\gamma$ -GT 以促使肝功能恢復及抑制肝纖維化<sup>(42)</sup>。

Rapamycin (Sirolimus)為一種巨環類黴菌藥並具有免疫抑制、抗發炎及抑制細胞分裂<sup>(46-49)</sup>，在我們先前的研究及目前已發表報告，對腎、肝纖維化動物模式有良好之抗纖維化功用<sup>(50-52)</sup>，其作用機制為抑制“mammalian target of rapamycin” (mTOR) 的酵素調控作用，使 40S ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) 的活化減少<sup>(48-49,53)</sup>，相對地降低 cell cycle progress 導致肝臟星狀細胞靜止狀態，抑制膠原蛋白分泌，因此給予 rapamycin 間接阻斷 p70S6K 細胞進入靜作用，進而抑制星狀細胞的增生分泌而達到抗纖維化之作用。另外，rapamycin 亦有抑制 TGF- $\beta$ 1、CTGF 及 PDGF 等生長因子之活性，進而減少星狀細胞活化<sup>(52,54)</sup>，故我們欲藉由 rapamycin 在抗纖維化與抗發炎之功用，進一步運用在中西藥合併研究，以達抑制肝纖維化之療效。

本試驗目的為應用我們先前抗肝纖維化試驗之有效中草藥<sup>(32-35)</sup>，其作用效果和機轉與 rapamycin 相類似，兩者中西藥合併使用於肝纖維化動物模式試驗，以評估在抗肝纖維化療效上是否具有相加作用、相乘作用或配伍禁忌，並探討兩者中西藥交互作用發生機制。

## 貳、材料與方法

### 一、中草藥萃取製備

本實驗中草藥方劑沿用先前我們已證實具有抗纖維化療效之複方—柴胡疏肝散（柴胡 4、枳殼 2、香附 4、川芎 2、陳皮 2、白芍 3、甘草 2、藏紅花 1）<sup>(32, 35)</sup>與單方—丹參<sup>(33, 34)</sup>為測試方劑。因中草藥—柴胡疏肝散先完成萃取製備，於本年度（95 年度）首先進行中藥複方—柴胡疏肝散與 Rapamycin 中西藥合併使用於肝纖維化動物模式試驗。

(一) 柴胡疏肝散製備方法—依比例稱取柴胡疏肝散 3,000g，分別以 50°C 蒸餾水浸泡抽取 4~5 次，每次約 4 小時，合併抽取液後再以冷凍乾燥法冷凍乾燥，即得到中草藥方劑柴胡疏肝散之萃取物供本研究用。

劑量配置—劑量計算方法如下：60 公斤成人臨床使用量為：14 g/人/天，依照 200g 大鼠體表面積換算係數 0.018 計算，實驗使用量為臨床使用量之 2 倍，實驗使用量為： $14 \times 2 \times 0.018 \times 5 \times 1 = 2.52$  g/kg。

(二) 丹參製備方法—將購入乾燥之丹參根切片，將丹參片以 80% ethanol 萃取三次，收集這些萃取物通過 Diaion HP-20 chromatographic column 並收集 50-75% ethanolic fractionate，再將收集液純化冷凍乾燥保存備用。丹參萃取物以 reverse-phase HPLC 測定含有 80% 的 salvianolic acid B，以 saline 稀釋餵食動物進行動物試驗。

劑量配置—丹參先以 DMSO 溶解後，再加入生理鹽水溶液稀釋至實驗濃度（40mg/kg/day）<sup>(33-34)</sup>。

### 二、肝纖維化動物模式

經台中榮總實驗動物管理小組審核通過後，由樂斯科生物科技公司購買 6 週齡雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠餵養於動物中心，控制在 12 小時 light/dark 循環條件下，任其隨意進食進水，於 8 週齡時進行實驗。將實驗動物分為七組（各組 n=12）依序為正常對照組（Control）、四氯化碳組（CCl<sub>4</sub>）、丹參處理組（SM）<sup>(33-34)</sup>、Rapamycin 處理組（Rapa）<sup>(51-52)</sup>、Rapamycin+丹參處理組（Rapa+SM）、柴胡舒肝散處理組（SHP）<sup>(32)</sup>、以及 Rapamycin+柴胡舒肝散處理組

(Rapa+SHP)。除正常對照組給予 PBS 外，其他各組均以每週管餵兩次四氯化碳 (1ml/kg) 進行肝纖維化誘導，實驗進行共計 8 週<sup>(32)</sup>。在四氯化碳誘導同時，開始給予管餵藥物，正常對照組與四氯化碳組則給予一次水作為安慰劑。各組藥物管餵劑量如下，Control: DDW 10ml/kg BW, CCl<sub>4</sub>: DDW 10ml/kg BW, SM: 丹參 40mg/10ml/kg BW, Rapa: Rapamycin 1.5mg/10ml/kg, Rapa+SM: (丹參 40mg+Rapamycin 1.5mg)/10ml/kg BW, SHP: 柴胡舒肝散 2.52g/10ml/kg BW, Rapa+SHP: (柴胡舒肝散 2.52g+Rapamycin 1.5mg)/10ml/kg BW。實驗過程中每日觀察實驗動物之身體變化及臨床症狀，於四氯化碳誘導第 8 週誘導結束後，採血測定血清生化值，以評估肝腎功能。犧牲前一晚實驗動物先禁食 12 小時，犧牲當日以高濃度二氧化碳施行安樂死，打開腹腔後自後腔靜脈 (caudal vena cava) 以 10ml 針筒採血；將肝臟、脾臟及腎臟取出以生理食鹽水洗淨，去除多餘結締組織及橫膈肌，放在紗布塊上拭去水分後，秤重並紀錄。將肝臟左側葉切成適當大小後，分別置於 10% 中性福馬林及液態氮中，其餘肝葉保存於 -80°C。

### 三、血液生化值檢測

將血液靜置室溫 1 小時後，以冷凍離心機於 4°C 下，每分鐘 4,700 rpm 離心 20 分鐘，取上層血清測定血清生化值。以自動分析儀檢測 AST 及 ALT，採用自 RANDOX Laboratories (Antrum, UK) 之分析套組 (kit) 進行分析<sup>(32)</sup>。

### 四、組織病理學觀察與肝纖維化評分

肝臟經 H&E 染色後，觀察肝臟之纖維化及變性程度。在纖維化以 Sirius red 染色評分，標準可參考 Jonker 等 (1992) 的半定量方法：1 分為 portal area 之纖維母細胞 (紡錘狀, spindale) 增生，但還未長進來至肝小葉；2 分為 portal area 之纖維母細胞增生，也長進來至肝小葉，但彼此間未接在一起；3 分為 portal area 之纖維母細胞增生，也長進來至肝小葉，並且彼此間也接在一起；4 分為 portal area 之纖維母細胞增生，也長進來至肝小葉，並且彼此間也接在一起且纖維組織增生變寬及膽管增生<sup>(57)</sup>。細胞變性程度 (H&E 染色) 方面則可依據 Ruwart 等 (1989) 的方法，1 分為多空泡 (multifocal)，空泡在局部產生；2 分為局部空泡 (locally extensive)，但仍有一部份正常；3 分為整片空泡 (diffusion)；4 分為嚴重整片空泡 (severe diffusion)，其空洞很大且整片<sup>(58)</sup>。其他臟器依正常程序處理 H&E 染色後，評估是否有毒性病變產生。



## 五、肝臟膠原蛋白含量之定量分析

肝臟膠原蛋白含量之定量分析實驗方法參考 Lopez-De、Rojkind<sup>(59)</sup>與 Chiu<sup>(60)</sup>等人之方法，採樣固定以左側肝葉 (left lateral lobe) 進行測定。實驗步驟簡述如下：肝臟組織以石蠟包埋後製作 8 $\mu$ m 厚度之切片，切片經 xylene 脫蠟及不同濃度之酒精脫水處理後，以刀片刮約 50mm<sup>2</sup> 組織放入試管中，滴入 2 毫升 0.1% fast green 及 0.1% sirius red 混合染劑於飽和 picric acid 溶液中，以 shaker 震盪 30 分鐘，倒出染劑並以蒸餾水清洗至乾淨為止，接著加入 0.1N NaOH 與 Methanol (1:1) 1ml 洗出顏色，以分光比色計測量 540nm 及 605nm 之波長，將所得之值進行換算，換算公式如下：

$$\text{Collagen } (\mu\text{g}) = [ \text{OD}_{540} \text{ 值} - (\text{OD}_{605} \text{ 值} \times 0.291) ] \times 1000/38.4$$

$$\text{Noncollagenous protein (mg)} = \text{OD}_{605} \text{ 值} / 2.08$$

$$\text{Total collagen protein } (\mu\text{g}/\text{mg}) = \text{Collagen } (\mu\text{g}) / \text{Collagen (mg)} + \text{Noncollagenous protein (mg)}$$

## 六、 $\alpha$ -SMA 免疫組織化學染色

肝臟切片經  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) 之免疫組織化學染色，可將活化態之肝臟星狀細胞染成褐色，以此估算細胞之數目。肝臟組織以 10% 中性福馬林固定後，經過修整後置入石蠟包埋，切成 4 $\mu$ m 切片經 xylene 脫蠟及不同濃度之酒精脫水處理，以 0.1 M Acetic acid 煮沸處理 30 秒後靜置於室溫下 20 分鐘，之後加入 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 去除內源性過氧化酶，先以 mouse IgG 作用後再加入以  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) 之抗體 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. U.S.)。利用卵白素—生物素方法 (avidin-biotin complex) 標記抗體抗原免疫複合物，試劑為 Avidin Biotinylated enzyme complex (Vectastain R ABC reagent, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)，以 diaminobenzidine (DAB) 呈色，最後以蘇木紫 (hematoxylin) 染色完成後封片。於顯微鏡 (Nikon eclipse E800) 下觀察活化態星狀細胞之數目。

## 七、西方氏墨點偵測法 (Western Blot)

採用西方氏墨點偵測法 (western blot)，輔以電泳影像分析軟體 (Gel-pro Analyzer) 分析  $\alpha$ -SMA 蛋白之相對表現量。步驟簡述如下：取肝臟組織 (或 5x10<sup>6</sup> HSC-T6 cells) 於 NP-40 lysis buffer (150mM

NaCl, 50mM Tris-Cl, 1% Nonidet P-40) 冰上均質。均質液靜置冰上作用 30 分鐘後於 4°C 下 14000×g 離心 10 分鐘, 取上清液後再以相同方法離心一次去上清液, 離心完成後, 以小牛血清蛋白 (bovine serum albumin) 作標準曲線濃度校正, 利用 Beckman RU-640 Spectrophotometer 進行蛋白質定量。取 50μg 之蛋白質進行蛋白質電泳 (SDS-PAGE), 採用 12% separating gel, 於 100 伏特下進行電泳分析約 4 小時後, 將蛋白質轉移 (transfer) 至 PVDF 膜後, 將 PVDF 膜浸置於 blocking buffer (1% nonfat dry milk, 1%BSA) 中, 並於 4°C 下放置隔夜後, 進行免疫染色; PVDF 膜以 Tris-buffered saline-Tween 20 (TBS-T) 清洗, 與 α-SMA、IKKα、phospho-IκB 或 NFκB p65 一級抗體於室溫下反應 1 小時, 以 TBS-T 清洗, 再與對應專一性之二級抗體在室溫下反應 1 小時, 以 TBS-T 清洗後, 與 ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) 反應後, 以 X 光片顯影, 顯影完成後將 PVDF 膜以 100mM Glycine 將膜上抗體及顯色液洗去, 之後重複上述步驟, 改以 mouse anti-α-tubulin 一級抗體 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. U.S.) 作為對照比較 (internal control)。利用影像分析軟體 (Gel-pro Analyzer) 分析後所得之數值單位為表現之強度 (intensity), 在本研究中以相對比值 (relative ratio=α-SMA intensity/GAPDH intensity) 評估蛋白表現量。

## 八、Zymography 基質金屬蛋白酵素之分析

本研究中採用明膠蛋白酵素電泳法 (gelatin-zymography), 輔以電泳影像分析軟體 AlphaImager 2000 分析基質金屬蛋白酵素 (MMP-2、9) 的表現量。取 0.1 克冷凍肝臟組織於 1 毫升之中性磷酸鹽緩衝液 (PBS), 使用 homogeneizer 於冰上均質研磨成 10 倍乳劑, 均質完成之 10 倍乳劑以 12,000rpm 離心 10 分鐘, 取上清液後同樣以 12,000rpm 再離心 10 分鐘, 收集上清液此即為 5 倍之蛋白抽出液。以小牛血清蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 作標準曲線進行濃度校正, 取適量 5 倍之蛋白抽出液以 DDW 稀釋, 加入 loading buffer 染色, 以 595nm UV 光測 OD 值, 換算總蛋白質濃度。取 20μg 之蛋白質進行蛋白質電泳 (SDS-PAGE), 採用 0.1% gelatin-8% separating gel, 於 120 伏特下進行電泳分析約 2 小時後, 取下 gel 以 2.5% Triton X-100 清洗兩次, 每次 30 分鐘, 倒去 2.5% Triton X-100 加入反應液於 37°C 感應作用 16 小時, 倒去反應液後以蒸餾水清洗三次, 加入染色液於

室溫下染色 30 分鐘，倒去染色液後以褪色液退染兩次，每次 30 分鐘，退染後進行明膠溶解酶 MMP-2、9 之影像量化分析。

## 九、即時定量反轉錄-聚合酶連鎖反應 (Real time RT-PCR) 檢測基因表現量

將肝臟組織(或  $5 \times 10^6$  HSC-T6 cells)利用 RNeasy Mini kit (Qiagen GmbH) 抽取組織中所有細胞的核糖核酸 (total cellular RNA)，並利用分光光度計以波長 260nm 及 280nm 來測量 Total RNA 的質與量。利用 DNA 分解酶 (DNase) 來分解組織中的 DNA，以確保 RNA 的品質。取 0.5 $\mu$ g total RNA 以 M-MLV 反轉錄酶來進行反轉錄反應 (reverse transcription)，反應條件為 37 $^{\circ}$ C、60 分鐘，65 $^{\circ}$ C、10 分鐘，4 $^{\circ}$ C 保存。並以經反轉錄反應後之產物 (complementary DNA, cDNA) 及針對具有專一性的引子(primer):使用 ABI prism 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) 檢測系統，配合 SyBR Green 雙股 DNA 螢光染色試劑，以具專一性的引子 (primer) (表一) 進行定量 PCR 測定 TGF- $\beta$ 1，並以 house keeping gene (GAPDH) 作為 internal control 作為相對定量校正，合成的 PCR 產物並加以定序確認。

表一 PCR 引子及探針序列

Gene	Forward Primer	Reverse Primer	Probe : Taqman Probe 6-FAM-5_end; TAMRA-3_end
TGF-1 beta	AAACGGAAGC	GCATCGAAGGGAC TGGCGAG	CCTTAGTT CCATCCGTGGC
GAPDH	GCTACACTGAGGA CCAGGTTGTC	GCCAGCCCCGGCAT	CGACTTCAACAGC AACTCCCACTCTT CC

## 十、統計分析

上述實驗所得到之數據，採用 Sigma Stat 電腦統計套裝軟體中之變異數分析 (analysis of variance, 簡稱 ANOVA)，再配合 Bonferroni t-test 進行統計分析，以客觀分析實驗數據間是否有顯著性差異 ( $P < 0.05$ )。

## 參、結果

### 一、臨床生理數值

#### (一) 各藥物處理後體重變化情形

給予 Rapamycin 或 Rapamycin + 丹參合併處理後，於第 2 週起即可見其體重明顯比四氯化碳組降低 ( $P < 0.05, 0.01$ )，且 Rapamycin + 丹參合併處理時體重降低之情形比單獨 Rapamycin 處理組更明顯 ( $P < 0.01$ ) (圖一 A)。給予柴胡舒肝散處理後，於第 3 週起和四氯化碳組相比可明顯增加大鼠體重 ( $P < 0.01$ )，且柴胡舒肝散合併 Rapamycin 處理時於 3 週起即可明顯改善 Rapamycin 處理時體重降低的問題 ( $P < 0.01$ ) (圖一 A)。在四氯化碳誘導 4 週後，即可見四氯化碳組體重明顯比正常對照組輕 ( $P < 0.05$ ) (圖一 A)。在八週的纖維化誘導與藥物處理結束後，Rapamycin 及 Rapamycin + 丹參合併處理組與四氯化碳組相比可見體重極顯著降低 ( $P < 0.001$ )，而丹參處理組和 Rapamycin + 柴胡舒肝散處理組與四氯化碳組相比並無顯著差異，但柴胡舒肝散處理組則可見體重極顯著上升 ( $P < 0.001$ )，且回復至和正常對照組無顯著差異之情形 (圖一 B)。另外，在經過 8 週的實驗過程後，Rapamycin + 丹參合併處理組累計有 6 隻大鼠因藥物作用關係過度虛弱貧血死亡，死亡率 50% (6/12)，而其他各組並無死亡情形發生。

#### (二) 血清生化值檢測

於四氯化碳誘導八週結束後犧牲，並進行血清生化值 SGOT、SGPT 及 BUN 檢測，結果顯示  $\text{CCl}_4$  組和 Control 組相比可見 SGOT、SGPT 極顯著升高 ( $P < 0.001$ )，Rapa、Rapa+SM、SHP 以及 Rapa+SHP 處理組分別和  $\text{CCl}_4$  組相互比較均可見顯著降低 SGOT ( $552.3 \pm 471.7$ 、 $424.8 \pm 289.2$ 、 $312.4 \pm 100.2$ 、 $420.8 \pm 266.5$  vs  $1538.0 \pm 657.1$  U/L,  $P < 0.001$ ) 與 SGPT ( $283.6 \pm 221.1$ 、 $143.0 \pm 61.1$ 、 $173.4 \pm 55.1$ 、 $236.2 \pm 167.0$  vs  $701.1 \pm 490.1$  U/L,  $P < 0.001, 0.001$ )，而 SM 組與  $\text{CCl}_4$  組間並無顯著差異。Rapa+SM 組和 SM 組相互比較，經 Rapa+SM 合併處理可顯著降低之 SGOT 和 SGPT 數值 ( $P < 0.05, 0.001$ ) (圖二)。BUN 於各實驗組間並無統計上之差異 (圖二)。

### (三) 血液中 Rapamycin 濃度檢測

於四氯化碳誘導八週結束後犧牲，採集全血並進行血液中 rapamycin 濃度檢測，結果僅在 Rapa、Rapa+SM 及 Rapa+SHP 組可檢測出 rapamycin，且三組間其血液 rapamycin 濃度並無顯著差異（圖三）。

## 二、肉眼病變

實驗動物經四氯化碳誘導八週後犧牲，比較各組之肉眼病變，Control 組肝臟色澤紅潤，表面平滑且觸感柔軟，而四氯化碳組及中藥組肝臟明顯偏黃、腫大且觸感堅實，但四氯化碳組肝臟表面較粗糙可見結節狀之突起，SM 組肝臟表面粗糙亦可見結節狀之突起，與 CCl<sub>4</sub> 組無顯著差異，Rapa 組與 Rapa+SM 組之肝臟表面外觀則較 CCl<sub>4</sub> 組平順，SHP 組與 Rapa+SHP 組其肝臟表面粗糙，但較 CCl<sub>4</sub> 組平順，肝臟邊緣鈍圓且有輕微腫脹之情形（圖四）。

經體重標準化後，各組臟器/體重比之結果，CCl<sub>4</sub> 組之肝臟、脾臟及腎臟重量/體重之百分比可見顯著高於 Control 組之情形（ $P < 0.001$ ）。在給予各藥物處理組中以 SHP 組之腎臟重量百分比與 CCl<sub>4</sub> 組相比可見顯著降低外（ $0.92 \pm 0.06$  vs  $1.05 \pm 0.06\%$ ， $P < 0.05$ ），其他各組之肝、腎臟重量百分比並無顯著差異。在脾腫大部分，除 SM 組外，其他各組均可見減輕之趨勢，其中以 Rapa、Rapa+SM 及 Rapa+SHP 組分別與 CCl<sub>4</sub> 組相比可見明顯差異（ $0.24 \pm 0.03$ 、 $0.27 \pm 0.03$ 、 $0.24 \pm 0.03$  vs  $1.05 \pm 0.06\%$ ）（ $P < 0.01, 0.001$ ）（圖五）。

## 三、組織病理學檢查及評分

肝臟切片以 H&E 染色後進行組織病理學檢查，結果顯示 Control 組無任何病變，CCl<sub>4</sub> 組可見局部至廣泛之肝細胞空泡樣變性，嚴重纖維化及偽小葉形成，藥物處理組可見局部至廣泛之肝細胞空泡樣變性與不等程度之纖維化，SM 組仍可見嚴重之纖維化及偽小葉形成，而 Rapa、Rapa+SM、SHP 及 Rapa+SHP 組之纖維化情形可見明顯改善，其中以 Rapa 和 Rapa+SM 組改善最顯著（圖六）。肝細胞變性程度除 Rapa+SM 組仍可見中度局部廣泛之肝細胞變性外，Rapa、SHP 及 Rapa+SHP 組可見空泡樣變性情形較 CCl<sub>4</sub> 組輕微（圖六）。

經 Sirius Red 染色後，Control 組僅於肝門脈區有少量紅色膠原蛋白沉澱，CCl<sub>4</sub> 組與 SM 組可見大量紅色膠原蛋白沉澱，甚有膠原蛋白沉澱延伸至中央靜脈形成偽小葉之病變（圖七 B），而 Rapa、

Rapa+SM、SHP 及 Rapa+SHP 組之肝纖維化程度可見明顯改善，無明顯之偽小葉形成（圖七 D-G）。

#### 四、肝臟膠原蛋白含量之定量分析

於四氯化碳誘導八週後，可見  $\text{CCl}_4$  組大鼠肝臟膠原蛋白之含量和 Control 組相比較可見極顯著增加（圖八， $P<0.001$ ）。給予藥物處理後，結果顯示 Rapa ( $16.3\pm 1.9\mu\text{g}/\text{mg}$ )、Rapa+SM ( $15.9\pm 1.8\mu\text{g}/\text{mg}$ )、SHP ( $16.5\pm 2.8\mu\text{g}/\text{mg}$ )及 Rapa+SHP 組 ( $16.2\pm 4.0\mu\text{g}/\text{mg}$ ) 之肝臟膠原蛋白含量分別較  $\text{CCl}_4$  組 ( $19.5\pm 4.9\mu\text{g}/\text{mg}$ ) 可見明顯降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.001$ )，且除 Rapa+SM 合併處理組比 SM 組可見纖維化極顯著改善外 ( $P<0.001$ )，在其他各藥物處理組間並無統計上之差異（圖八）。

#### 五、活化態肝臟星狀細胞表現分析

經  $\alpha$ -SMA 免疫組織化學染色標定活化態肝臟星狀細胞，於 Control 組除了肝動脈壁平滑肌細胞呈陽性外，幾乎沒有活化態肝星狀細胞（圖九 A）， $\text{CCl}_4$  組與 SM 組於門脈區至整個肝小葉之肝索間竇狀隙可見大量活化態星狀細胞存在（圖九 B-C）。而 Rapa、Rapa+SM、SHP 及 Rapa+SHP 組之活化態肝星狀細胞和  $\text{CCl}_4$  組相比較可見明顯減少（圖九 D-G）。

肝臟組織經蛋白萃取後，以西方氏墨點偵測法測量肝臟  $\alpha$ -SMA 蛋白表現之結果， $\text{CCl}_4$  組和 control 組比較  $\alpha$ -SMA 蛋白表現量明顯增加 ( $P<0.001$ )，Rapa、Rapa+SM、SHP 及 Rapa+SHP 組之  $\alpha$ -SMA 蛋白表現量可見下降趨勢，經量化後以 Rapa 和 Rapa+SM 組與  $\text{CCl}_4$  組相比可見極顯著差異 ( $P<0.001$ )，Rapa+SM 合併處理組比 SM 組明顯降低 ( $P<0.001$ )，顯示活化態星狀細胞之量有減少現象（圖十）。

#### 六、基質金屬蛋白酶 MMP-2, 9 之活性分析結果

以 Zymography 檢測肝臟 MMP-2, 9 酵素活性，經量化後可見 MMP-9、proMMP-2 及 MMP-2 在藥物處理後有下降之趨勢，其中 MMP-9 與 proMMP-2 活性以 Rapa 處理組可見顯著差異 ( $P<0.05$ )，而 MMP-2 活性與  $\text{CCl}_4$  組相比，Rapa、Rapa+SM 及 Rapa+SHP 組均可見顯著降低 ( $P<0.01$ )，Rapa+SM 與 Rapa+SHP 組等合併 Rapamycin 處理時，比單獨給予中藥 (SM 或 SHP) 更顯著降低 MMP-2 活性著 ( $P<0.01$ )（圖十一）。

#### 七、Real time RT-PCR 檢測 TGF- $\beta$ 1 基因表現量之結果

肝臟組織經萃取 mRNA 後，以 real time RT-PCR 檢測 TGF- $\beta$ 1 基因表現之相對定量的結果中，發現 CCl<sub>4</sub> 組和 control 組比較 TGF- $\beta$ 1 基因表現量呈現增加的現象，SM 處理組之 TGF- $\beta$ 1 基因表現更高於 CCl<sub>4</sub> 組，Rapa、Rapa+SM、SHP 及 Rapa+SHP 組經藥物處理後之 TGF- $\beta$ 1 基因表現量可見下降趨勢（表二）。

## 肆、討論

在肝炎的中藥與西醫藥治療中，常見的為口服保肝片，或中藥方劑，另一種施打干擾素亦是在病毒性肝炎中所常見的。目前常使用的保肝片多為天然植物或動物肝臟的萃取物，如丹參等亦常被使用。中藥方劑如 Han-Dan-Gan-Le<sup>(28)</sup>、小柴胡湯<sup>(29-30)</sup>、龍膽瀉肝湯<sup>(31)</sup>、柴胡疏肝散<sup>(32)</sup>與丹蔘 (Salvia miltiorrhiza)<sup>(33-34)</sup>等，亦在動物實驗結果及肝硬化病人臨床用藥上均有良好治療效果的證實。

傳統中醫主張「辨證論治」，依患者的症狀及體質加以分類以選擇適當的中藥處方。中醫常將肝炎分為四種證型，第一型是濕熱型—患者常有噁心、食慾不振、胃腸障礙、黃疸、舌苔黃膩等現象，此證常出現於急性 C 型肝炎或慢性 C 型肝炎急性惡化期，可用藥以改善胃腸症狀及促進膽汁排泄的中藥方劑為主。第二型是肝鬱脾虛型—患者常於上腹有悶脹感且易合併軟便或下痢等症狀，此為慢性 C 型肝炎遷延期最常見證型，可用藥以具調整腸胃及解除焦慮之作用的方劑為主，如小柴胡湯加減方等。第三型是血瘀型—患者於腹部常出現顯著的皮下靜脈，而舌下靜脈則有瘀點，常見於 C 型肝炎遷延日久，進入肝硬化之階段，用藥以可改善血液循環的中藥為主，如桃仁、當歸、丹參等藥。第四型是肝、腎陰虛型—患者有消瘦、腰酸背痛、手足心煩熱、心悸、便乾等症狀，常見於慢性 C 型肝炎遷延日久而出現代謝異常及自律神經失調的患者，可以調整異化代謝及自律神經失調的中藥方為主，如一貫煎或六味地黃丸加減等方劑。因此，傳統中藥所講的證型常反映患者在疾病發展過程中某一階段的典型症狀，而中藥治療 C 型肝炎主要以改善症狀為主，但針對即時改善肝臟發炎的效果，則不如西藥來的快速。

在本研究中所使用的植物單方萃取物—丹蔘<sup>(33-34)</sup>與西藥 Rapamycin<sup>(46-49)</sup>，於先前的研究中已證實具有強的抗發炎及抑制細胞分裂效果，柴胡疏肝散在我們的先前研究報告中，於四氯化碳肝纖維化動物試驗中發現具有明顯抗肝纖維化<sup>(32)</sup>及抗氧化和解毒作用<sup>(35)</sup>，在抗肝纖維化作用機制為抑制肝臟星狀細胞活化增生及細胞外母質膠原纖維之合成分泌，在臨床上可顯著降低肝硬化患者之 SGOT、SGPT 及  $\gamma$ -GT，以促使肝功能恢復<sup>(42)</sup>，此於本研究的結果中更再度得到證實可顯著降低肝臟之 SGOT、SGPT ( $P < 0.001$ ，圖二)，及抑制肝纖維化形成 ( $P < 0.05, 0.001$ ，圖七-八)。

肝硬化是很多慢性肝病最後的結局，無論是 B 型或 C 型病毒肝炎



或是酒精性肝病若未妥善治療往往會進展至肝硬化的階段，雖然其機轉尚未完全清楚，但目前最被接受的觀念是肝臟內部膠原蛋白的製造與膠原蛋白的破壞失去平衡導致膠原纖維的累積，持續的纖維化為肝硬化的主要原因。西藥 Rapamycin 在我們先前的研究及目前已發表報告，對腎、肝纖維化動物模式有良好之抗纖維化功用<sup>(50-52)</sup>，其作用機制為抑制 mTOR 的酵素調控作用，使 p70S6K 的活化減少<sup>(48-49, 53)</sup>，相對地降低 cell cycle progress，其強烈的抑制細胞分裂、抗增生的作用，雖導致肝星狀細胞呈休止狀態，但長時間的給予將造成副作用，在本研究中亦發現在合併丹參與 Rapamycin 處理時，增重的抑制作用比單獨使用丹參或 Rapamycin 更明顯 ( $P < 0.001$ ，圖一)，顯示合併性質相似的中西醫藥治療時，會使得其副作用與毒性更加的明顯，由丹參與 Rapamycin 併用所造成的 50% 高死亡率更可知。

而配合複方的柴胡疏肝散進行治療時，因柴胡疏肝散具有疏肝行氣、和血止痛之功效，其各單方之作用—柴胡能疏肝解鬱，對免疫系統有增強作用，且具有保肝利膽之功效；柴胡與香附具明顯之鎮痛解熱作用；柴胡、香附、甘草、枳殼與陳皮均可抑制炎症反應；枳殼、陳皮、白芍及甘草具解痙作用；川芎可抑制 Thromboxane A<sub>2</sub> 之血栓形成作用，白芍也具有抗血栓及降血壓之功效；枳殼成分中之檸檬烯 (d-Limonene) 可促使膽管收縮以利膽汁分泌；在先期的動物研究中更證實柴胡疏肝散具增加肝臟抗氧化和解毒作用<sup>(35)</sup>，因此改善了使用 Rapamycin 時所造成之增重抑制的情形 (圖一)，且達到抑制膠原蛋白分泌之作用 (圖七-八)。而 Rapamycin 與丹參或柴胡疏肝散併用時，在 Rapa、Rapa+SM 及 Rapa+SHP 組三組間其血液中的 Rapamycin 濃度並無顯著差異 (圖三)，顯示 Rapamycin 與丹參或柴胡疏肝散併用並不會影響到西藥 Rapamycin 之吸收。

肝星狀細胞 (HSC)，當它受到炎症細胞產生的細胞激素 (cytokine) 如 TGF- $\beta$ 1 或自由基刺激時，可被活化而製造大量的膠原蛋白，並釋放至肝組織內。活化的肝星狀細胞是肝臟內最主要製造膠原蛋白的細胞，並與膠原蛋白酶 (collagenase, MMP-2, 9) 可將已形成的膠原蛋白纖維分解有關。在細胞激素或酒精代謝物 (如乙醛) 刺激 HSC 產生膠原蛋白的初期，膠原蛋白酶活化性也會輕度增加，以抑制肝纖維化的形成。從本研究的結果中顯示，四氯化碳誘導會促使星狀細胞大量的活化 ( $P < 0.001$ ，圖九、十)，給予 Rapa 與 Rapa+SM 可明顯減少星狀細胞活化的量 ( $P < 0.001$ ，圖十)，進一步抑制纖維化。

於肝纖維化恢復之機制中，在實驗動物模式中已證實，活化態肝臟星狀細胞發生凋亡（apoptosis），以致於活化態肝臟星狀細胞之數量減少，此為導致肝纖維化恢復之主因，而於體外與活體試驗皆證實，TIMP-1具有提昇活化態肝臟星狀細胞存活率之能力，TIMPs 生成增加可抑制MMPs 降解細胞外基質之功能，而於肝纖維化發生可逆恢復時，膠原蛋白酵素（MMP-13）之活性增加至原本之數倍，也可能是由於TIMPs之表現減弱所致。由此可知，活化態星狀細胞數量減少，除使細胞本身產生膠原蛋白之能力降低外，也使得TIMPs不足以抑制膠原蛋白酶之降解作用，故肝臟星狀細胞數量的改變與 $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)之蛋白表現可作為評估改善肝纖維化的重要指標。

MMP-2 與 MMP-9 皆為明膠酵素（gelatinase），可降解第四、五型膠原蛋白（type V and type IV collagen）等細胞外基質。炎症細胞如淋巴球（lymphocyte）、嗜中性球（neutrophil）與巨噬細胞（macrophage）皆為MMP-9之來源細胞，肝臟之kupffer cell也具有分泌MMP-9之功能；肝臟MMP-2之主要來源為活化態肝臟星狀細胞，轉型生長因子（TGF- $\beta$ 1）為纖維化過程中最重要之細胞介素，可刺激MMP-2之表現（up-regulation），對於肝臟星狀細胞之活化作用與氧化性傷害有關。在本研究中，我們亦發現給予藥物處理後，在Rapa、Rapa+SM及Rapa+SHP組之MMP-2活性與CCl<sub>4</sub>組相比可見顯著降低（ $P < 0.01$ ，圖十一），顯示給予Rapamycin或合併SM與SHP組等處理時，可透過影響MMP-2活性抑制纖維化之形成，且合併中藥（SM或SHP）處理時比單獨使用中藥更可顯著降低MMP-2活性著（ $P < 0.01$ ，圖十一）。目前對於MMP-2與MMP-9之活化與肝纖維化形成之關係尚不明，但MMP-2可能與肝纖維化形成有密切相關，因為MMP-2可降解肝臟正常基質（type IV collagen），而使基質膠原蛋白易於沉澱並有助於星狀細胞之增生活化，另外MMP-2也具有刺激星狀細胞移動（migration）之作用<sup>(46)</sup>，且在肝纖維化恢復期（fibrolysis）並不會有表現，目前於人醫方面，分析血清中之MMP-2活性作為肝病之臨床診斷已逐步發展中。

另外，在轉型生長因子（TGF- $\beta$ 1）基因表現的部分，亦發現TGF- $\beta$ 1表現量（表二）和活化的肝星狀細胞量（圖十）以及MMP-2的活性有相對應的關係（圖十一），推測rapamycin可以抑制TGF- $\beta$ 1之活性，進而減少刺激星狀細胞的活化<sup>(47, 49)</sup>以及影響其MMP-2的活性，進而抑制星狀細胞的膠原蛋白的增生分泌而達到抗纖維化之作用。

## 伍、結論與建議

本研究所建立肝纖維化動物模式及評估中西醫藥療效和作用機轉探討之技術平臺，未來將可陸續研究驗證傳統中草藥與中西醫合併療效和作用機轉，有助解開中醫古方治肝之謎並與西方醫學接軌。以複方中藥—柴胡疏肝散作為調養的方式，搭配西藥—Rapamycin 運用在臨床治療肝纖維化研究方面，未來將是一個頗大的契機。

## 誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會，計畫編號 CCMP95-TP-031 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 陸、參考文獻

1. 行政院衛生署統計室：台灣地區死因統計結果摘要（民國九十年）。2002。
2. 高尚德、張賢哲：急慢性肝炎。行政院衛生署中醫藥委員會。89年12月。
3. Branda M, Wands JR.: Signal transduction cascades and hepatitis B and C related hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2006; 43: 891-902.
4. Brechot C.: Molecular bases of hepatitis B- and hepatitis C-related chronic liver diseases. In: Arias IM, Boyer JL, Chisari FV, Fausto N, Schachter D, and Shafritz DA., eds. *The Liver: Biology and Pathobiology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:801-830.
5. Kao JH, Chen DS.: Global control of hepatitis B virus infection. *Lancet Inf. Dis.* 2002; 2: 395-403.
6. Lieber CS.: Alcoholic liver disease: new insights in pathogenesis lead to new treatments. *J. Hepatol* 2000; 32(1 Suppl): 113-128.
7. Olaso E, Friedman SL.: Molecular regulation of hepatic fibrogenesis. *J. Hepatol.* 1998; 29: 836-847.
8. Alcolado R, Arthur MJP, Iredale JP.: Pathogenesis of liver fibrosis. *Clin. Sci.* 1997; 92: 103-112.
9. Poli G.: Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol. Aspects Med.* 2000; 21: 49-98.
10. Pinzani M, Knauss TC, Pierce GF, Hsieh P, Kenney W, Dubyak GR, Abboud HE.: Mitogenic signals for platelet-derived growth factor isoforms in liver fatstoring cells. *Am J Physiol.* 1991; 260: C485-C491.
11. Grappone C, Pinzani M, Parola M, Pellegrini G, Caligiuri A, DeFranco R, Marra F, Herbst H, Alpini G, Milani S.: Expression of platelet-derived growth factor in newly formed cholangiocytes during experimental biliary fibrosis in rats. *J Hepatol.* 1999; 31: 100-109.
12. Friedman SL.: Liver fibrosis-from bench to bedside. *J. Hepatol.* 2003; 38: S38-S53.
13. Frazier K, Williams S, Kothapalli D, Klapper H, Grotendorst GR.: Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production and granulation tissue formation by

- connective tissue growth factor. *J Investig Dermatol.* 1996; 107: 404-411.
14. 衛生署中醫藥委員會：肝病研究成果報告彙編第二冊（80~88 年度）。89 年 05 月。
  15. 衛生署中醫藥委員會：肝病研究成果報告彙編第一冊（71~75 年度）。89 年 05 月。
  16. Bissell DM.: Chronic liver injury, TGF-beta, and cancer. *Exp. Mol. Med.* 2001; 33: 179-190.
  17. Rojkind M, Greenwel P. Pathophysiology of liver fibrosis. In: Arias IM, Boyer JL, Chisari FV, Fausto N, Schachter D, and Shafritz DA., eds.: *The Liver: Biology and Pathobiology.* 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 721-738, 2001.
  18. Friedman SL.: Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 2247-2250.
  19. Iredale JP.: Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury. *Semin. Liver Dis.* 2001; 21: 427-436.
  20. Schuppan D, Porov Y.: Hepatic fibrosis: from bench to bedside. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2002; 17: S300-S305.
  21. Gebhardt R.: Oxidative stress, plant-derived antioxidants and liver fibrosis. *Planta Med.* 2002; 68: 289-296.
  22. Shiratori Y, Imazeki F, Moriyama M, Yano M, Arakawa Y, Yokosuka O, Kuroki T, Nishiguchi S, Sata M, Yamada G, Fujiyama S, Yoshida H, Omata M.: Histologic improvement of fibrosis in patients with hepatitis C who have sustained response to interferon therapy. *Ann. Intern. Med.* 2000; 132: 517-524.
  23. Hammel P, Couvelard A, O'Toole D, Ratouis A, Sauvanet A, Flejou JF, Degott C, Belghiti J, Bernades P, Valla D, Ruszniewski P, Levy P.: Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the common bile duct. *N. Engl. J. Med.* 2001; 344: 418-423.
  24. Dieperink E, Ho SB, Tetrick L, Thuras P, Dua K, Willenbring ML: Suicidal ideation during interferon-alpha2b and ribavirin treatment of patients with chronic hepatitis C. *Gen. Hosp. Psychiatry.* 2004; 26: 237-240.
  25. Nakamura T, Sakata R, Ueno T, Sata M, Ueno H.: Inhibition of transforming

- growth factor  $\beta$  prevents progression of liver fibrosis and enhance hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats. *Hepatology* 2000; 32: 247-255.
26. Matsuda Y, Matsumoto K, Yamada A, Ichida T, Asakura H, Komoiya Y, Nishiyama E, Nakamura T.: Preventive and Therapeutic effects in rat of Hepatocyte growth factor infusion on liver fibrosis/cirrhosis. *Hepatology* 1997; 26: 81-89.
27. 行政院衛生署中醫藥委員會：臺灣中醫藥未來的發展與策略。90 年 11 月。
28. Li C, Luo J, Li L, Cheng M, Huang N, Liu J, Waalkes MP.: The collagenolytic effects of the traditional Chinese medicine preparation, Han-Dan-Gan-Le, contribute to reversal of chemical-induced liver fibrosis in rats. *Life Sci.* 2003; 72: 1563-71.
29. Sakaida I, Matsumura Y, Akiyama S, Hayashi K, Ishige A, Okita K.: Herbal medicine Sho-saiko-to (TJ-9) prevents liver fibrosis and enzyme-altered lesions in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid-deficient diet. *J. Hepatol.* 1998; 28: 298-306.
30. Shimizu I, Ma Y-R, Mizobuchi Y, Liu F, Miura T, Nakai Y, Yasuda M, Shiba M, Horie T, Amagaya S, Kawada N, Hori H, Ito S.: Effects of Sho-saiko-to, a Japanese herbal medicine, on hepatic fibrosis in rats. *Hepatology* 1999; 29: 149-160.
31. 吳龍源、徐曉萍、陳怡欣、林乃女、陳旺全、鄭振鴻、彭文煌、邱雲棕：龍膽瀉肝湯變方對 Dimethylnitrosamine 誘發大鼠肝損傷的療效探討。中醫藥雜誌 2003；14(4)：205-215。
32. 吳龍源、徐曉萍、程景章、林乃女、蕭雅如、陳旺全、鄭振鴻、徐慶霖、王俊秀、邱雲棕：中醫傳統方劑—柴胡疏肝散變方於四氯化碳誘導大鼠肝纖維化動物模式探討抑制肝纖維化之療效。中醫藥雜誌 2004；15(4)：257-271。
33. Huang YT, Lee TY, Lin HC, Chou TY, Yang YY, Hong CY.: Hemodynamic effects of *Salvia miltiorrhiza* on cirrhotic rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2001; 79: 566-572.
34. Hsu YT, Lin YL, Chiu YT, Shiao MS, Lee CY, Huang, YT.: Anti-fibrotic effects of *Salvia miltiorrhiza* on dimethylnitrosamine-intoxicated rats. *J. Biomed. Sci.*

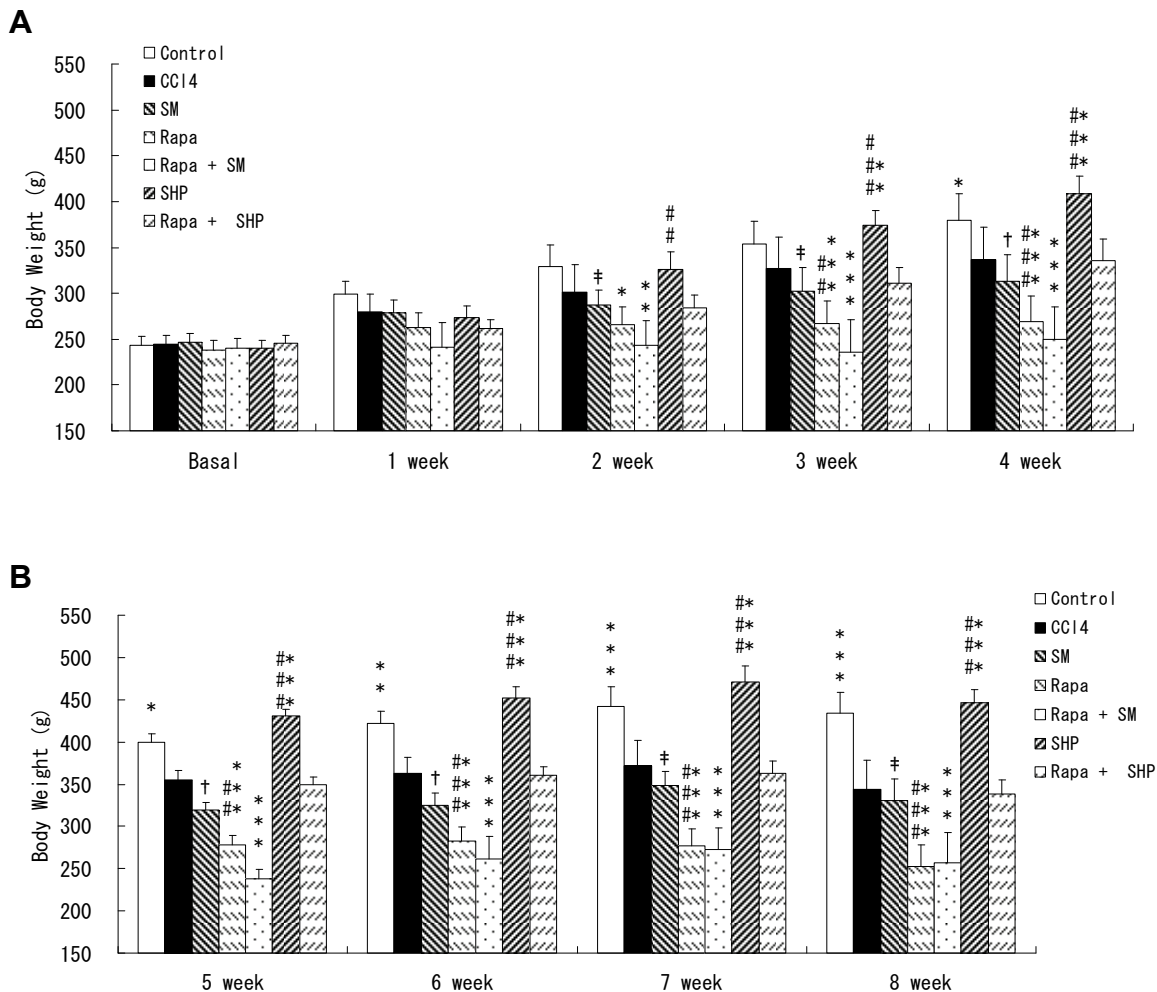
- 2005; 12: 185-195.
35. 李聖慧、吳龍源、徐曉萍、曾惠芬、程景章、施純全、邱雲棕：大鼠肝損傷動物模式於中醫傳統方劑柴胡疏肝散變方之抗氧化及細胞色素評估。 *臺灣獸醫誌* 2006；32(3)：186-194。
  36. 謝文全、林宜信、謝伯舟、張麗晴：臺灣常用藥用植物圖鑑〈一〉。行政院衛生署中醫藥委員會。91年09月。
  37. 陳奇：中藥名方藥理與應用。南天書局，台北市，pp. 112-113，1993。
  38. 林宗旦、林宗平、林景彬：中藥藥理學。華香園出版社，台北市，1996。
  39. 楊曉冰：柴胡疏肝散加味治療慢性乙型肝炎 58 例療效觀察。 *交通醫學* 1997；11：9。
  40. 俞君平、朱蔚崗、宋鴻范：柴胡疏肝散加減治療病毒性肝炎合併膽道感染 65 例。 *實用中西醫結合雜誌* 1997；10：865-866。
  41. 潘志堅、鐘澤鑫：柴胡疏肝散治療酒精性之脂肪肝 60 例。 *實用中醫藥雜誌* 2001；17：22-23。
  42. 朱肖鴻、符淑艷、葉蕾：柴胡疏肝散抗肝纖維化治療的療效觀察。 *中醫藥學報* 2003；31：28-29。
  43. Tang W, Eisenbrand G.: *Salvia miltiorrhiza* Bge. In: Chinese Drugs of Plant Origin. *Berlin, Springer-Verlag* 1992; 891-902.
  44. Liu G-T, Zhang T-M, Wang B-E, Wang Y-W.: Protective action of seven natural phenolic compounds against peroxidative damage to biomembranes. *Biochem Pharmacol* 1992; 43: 147-152.
  45. Wu Y-J, Hong C-Y, Lin S-J, Wu P, Shiao M-S.: Increase of vitamin E content in LDL and reduction of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits by a water-soluble antioxidant-rich fraction of *Salvia miltiorrhiza*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 481-486.
  46. Martel RR, Klicius J, Galet S.: Inhibition of the immune response by sirolimus, a new antifungal antibiotic. *Can J Physiol Pharmacol* 1977; 55: 48-51.
  47. Kahan BD.: Sirolimus: a comprehensive review. *Pharmacother* 2001; 2: 1903-1917.
  48. Schmelzle T, Hall MN.: TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 2000; 103: 253-262.

49. Guertin DA, Sabatini DM.: An expanding role for mTOR in cancer. *Trends Mol Med* 2005; 11: 353–361.
50. Wu MJ, Wen MC, Chiu YT et al.: Rapamycin attenuates unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis. *Kidney Int* 2006; 69: 2029–2036.
51. Zhu J, Wu J, Frizell E et al.: Sirolimus inhibits hepatic satellite cell proliferation in vitro and limits fibrogenesis in an in vivo model of liver fibrosis. *Gastroenterology* 1999; 117:1198–1204.
52. Biecker E, De Gottardi A, Neef M, Unternahrer M, Schneider V, Ledermann M, Sagesser H, Shaw S, Reichen J.: Long-Term Treatment of Bile Duct-Ligated Rats with Rapamycin (Sirolimus) Significantly Attenuates Liver Fibrosis: Analysis of the Underlying Mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005; 313(3): 952-61.
53. Price JD, Grove JR, Avruch J, Bierer BE.: Sirolimus induced inhibition of the 70-kilodalton S6 protein kinase. *Science* 1992; 257: 973–977.
54. Liu Y.: Rapamycin and chronic kidney disease: beyond the inhibition of inflammation. *Kidney Int.* 2006; 69(11): 1925-1927.
55. Chong L-W, Hsu Y-C, Chiu Y-T, Yang K-C, Huang Y-T.: Antifibrotic effects of thalidomide on hepatic stellate cells and dimethylnitrosamine-intoxicated rats. *J. Biomed. Sci.* 2006; 13: 403-418.
56. Hsu Y-C, Chiu Y-T, Cheng C-C, Wu C-F, Lin Y-L, Huang Y.-T.: Antifibrotic effects of tetrandrine on hepatic stellate cells and rats with liver fibrosis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2006, in press.
57. Jonker AM, Dijkhuis FWJ, Boes A, Hardonk MJ, Grond J.: Immunohistochemical study of extracellular matrix in acute galactosamine hepatitis in rats. *Hepatology.* 1992; 15: 423-432.
58. Ruwart MJ, Wilkinson KF, Rush BD.: The integrated value of serum procollagen III peptide over time predicts hepatic hydroxyproline content and stainable collagen in a model of dietary cirrhosis in the rat. *Hepatology* 1989; 10: 801-806.
59. Lopez-De Leon A, Rojkind M.: A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections. *J. Histochem. Cytochem.* 1985; 33: 737-43.

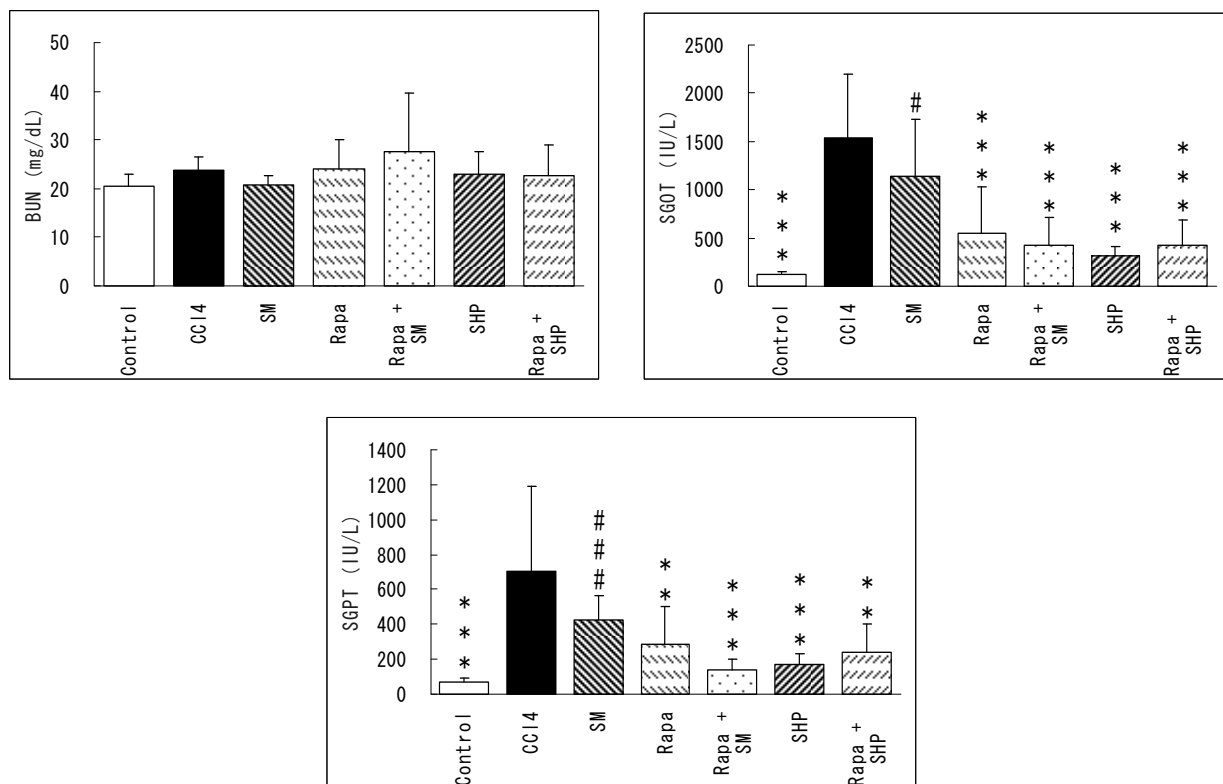


60. Chiu YT, Liu SK, Liu M, Chen SP, Lin YH, Mao SJ, Chu R.: Characterization and quantitation of extracellular collagen matrix in myocardium of pigs with spontaneously occurring hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiovasc. Pathol.* 1999; 8: 169-175. 1
61. Chomczynski P, Sacchi N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 102: 156-159.
62. Wasser S, Ho JMS, Ang HK, Tan CEL.: Salvia miltiorrhiza reduced experimentally-induced hepatic fibrosis in rats. *J. Hepatol* 1998; 29: 760-771.
63. Taimr P, Higuchi H, Kocova E, Rippe RA, Friedman S, Gores GJ.: Activated stellate cells express the TRAIL receptor-2/death receptor-5 and undergo TRAIL-mediated apoptosis. *Hepatology* 2003; 37: 87-95.

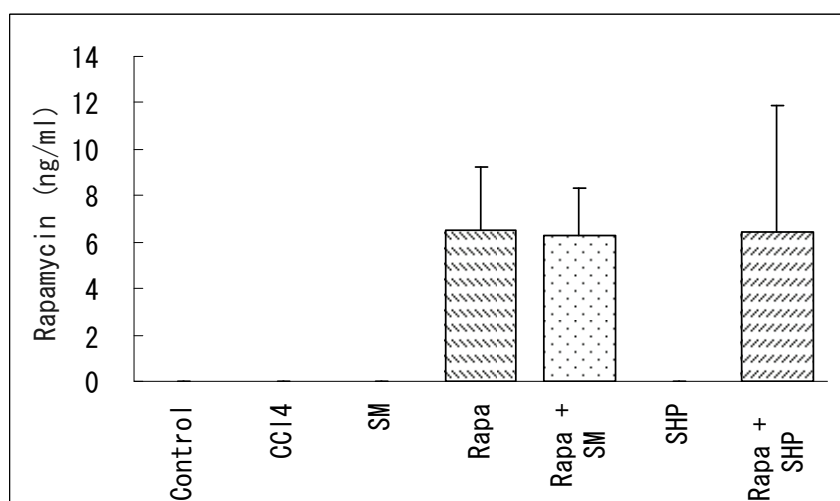
## 柒、圖表



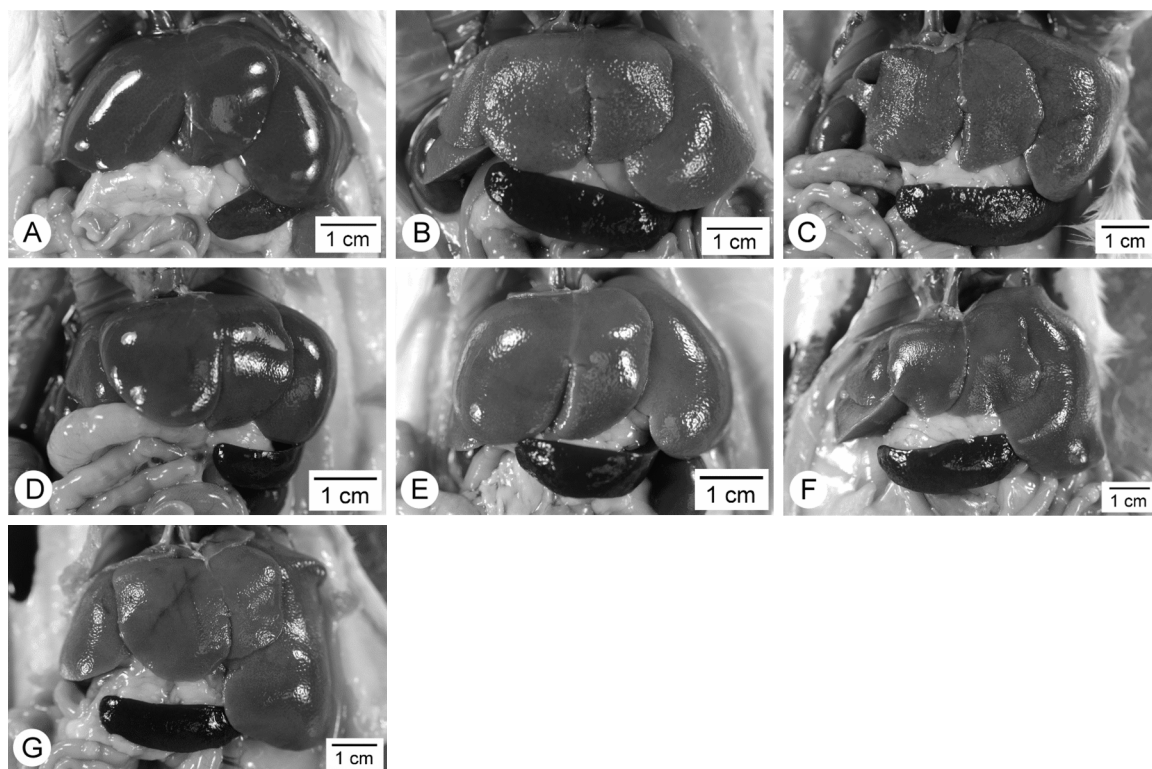
圖一 各藥物處理後體重變化情形。  
 經藥物處理 4 週後(A)及處理 5-8 週後(B)之體重變化情形，可見給予 Rapamycin 或 Rapamycin + 丹參合併處理後，於第 2 週起體重和四氯化碳組相比明顯降低 ( $P < 0.05$ )。給予柴胡舒肝散處理於第 3 週起可明顯增加大鼠體重 ( $P < 0.01$ )，而合併 Rapamycin + 柴胡舒肝散處理其體重變化和四氯化碳組相比無顯著差異。\*：  $P < 0.05$ ，\*\*：  $P < 0.01$ ，\*\*\*：  $P < 0.001$ ，以 Bonferroni t-test 統計分析方式和四氯化碳組相比，†：  $P < 0.05$ ，‡：  $P < 0.01$  與 Rapa + SM 組相互比較，###：  $P < 0.01$ ，####：  $P < 0.001$  則與 Rapa + SHP 組相互比較。Control：正常對照組、CCl<sub>4</sub>：四氯化碳組、SM：丹參處理組、Rapa：Rapamycin 處理組、Rapa + SM：Rapamycin + 丹參處理組、SHP：柴胡舒肝散處理組、Rapa + SHP：Rapamycin + 柴胡舒肝散處理組。



圖二 藥物處理 8 週後對四氯化碳誘導大鼠之血清生化學檢測結果。CCl<sub>4</sub> 組和 Control 組相比可見 SGOT、SGPT 極顯著升高 (P<0.001)，Rapa、Rapa+SM、SHP 以及 Rapa+SHP 處理組分別和 CCl<sub>4</sub> 組相互比較均可見顯著降低 SGOT (P<0.001) 與 SGPT (P<0.001, 0.001)，而 SM 組與 CCl<sub>4</sub> 組間並無顯著差異。BUN 於各實驗組間並無統計上之差異。

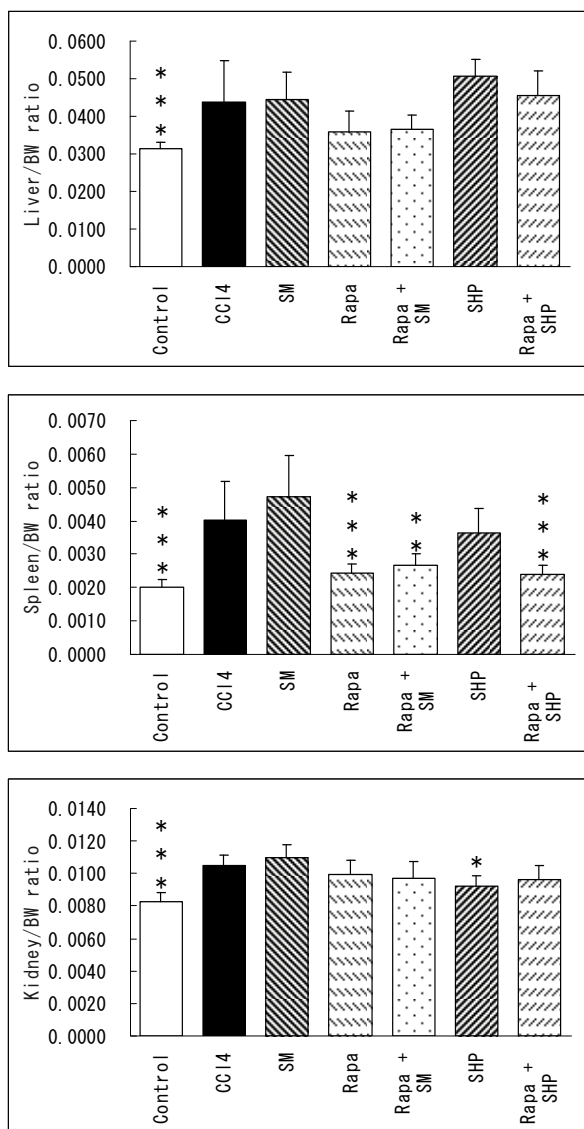


圖三 四氯化碳誘導並給藥 8 週結束後，血液中 Rapamycin 濃度

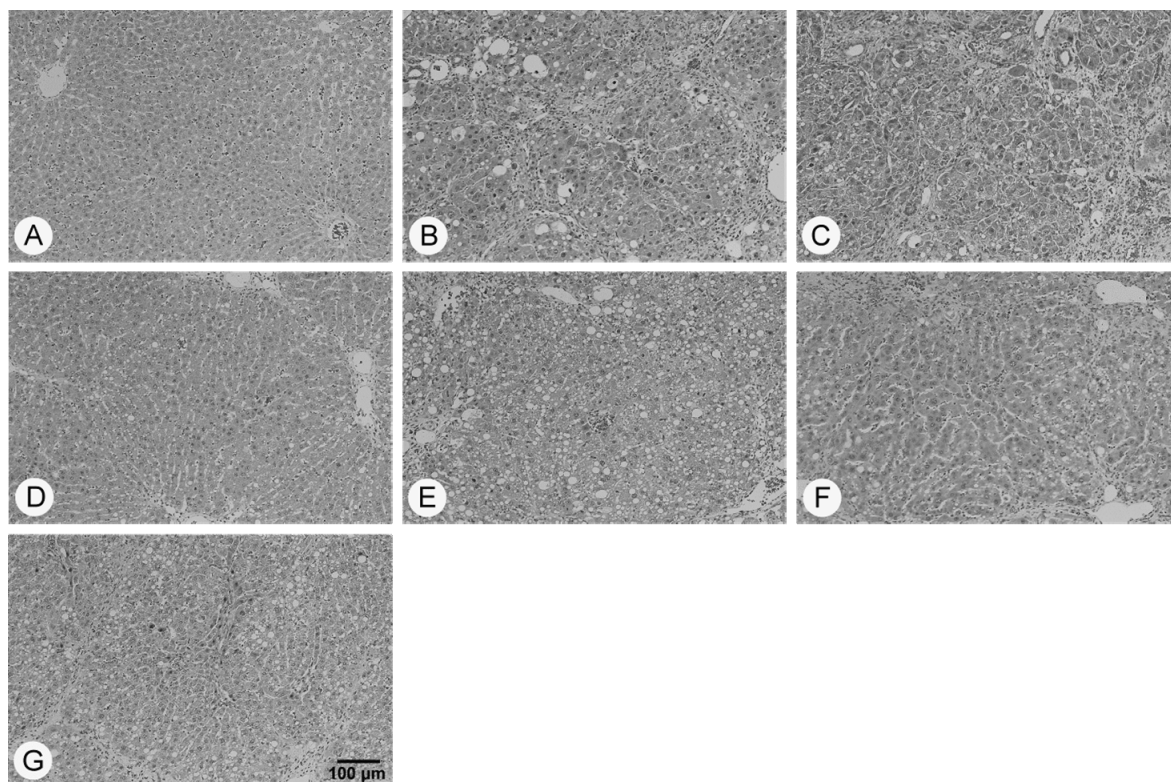


圖四 四氯化碳誘導 8 週後，各藥物處理組之肝臟肉眼病變

(A) Control 組肝臟顏色紅潤，表面平滑且觸感柔軟；(B)  $\text{CCl}_4$  組肝臟表面粗糙可見結節狀之突起；(C) SM 組肝臟表面粗糙亦可見結節狀之突起，與  $\text{CCl}_4$  組無顯著差異；Rapan 組(D)與 Rapa+SM 組(E)肝臟表面外觀均較  $\text{CCl}_4$  組平順；SHP 組(F)與 Rapa+SHP 組(G)肝臟表面粗糙，但較  $\text{CCl}_4$  組平順，肝臟邊緣鈍圓且有輕微腫脹之情形。Control: 正常對照組、 $\text{CCl}_4$ : 四氯化碳組、SM: 丹參處理組、Rapa: Rapamycin 處理組、Rapa+SM: Rapamycin + 丹參處理組、SHP: 柴胡舒肝散處理組、Rapa+SHP: Rapamycin+柴胡舒肝散處理組。

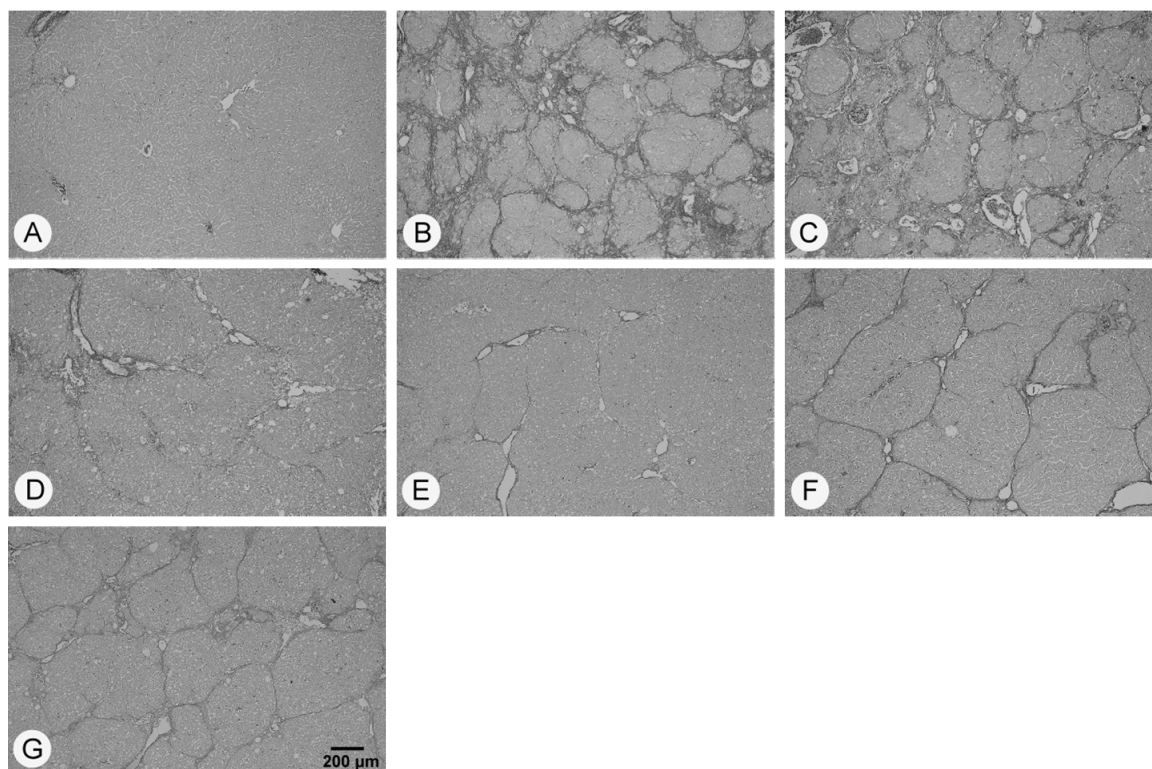


圖五 四氯化碳誘導 8 週後，各藥物處理組之肝、脾與腎臟重量/體重比較  
 實驗數據以平均值±標準偏差之形式表示，各組數據與 CCl<sub>4</sub> 組比較，統計差異 (Bonferroni t-test) 以 P 值表示：\* P<0.05，\*\* P<0.01，\*\*\* P<0.001。



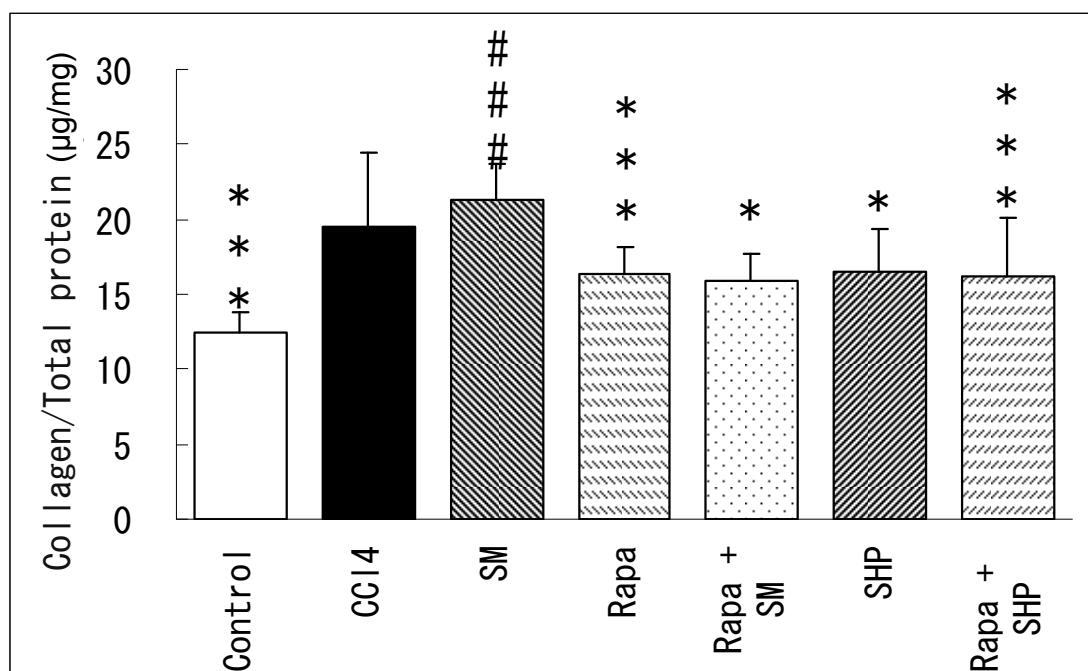
圖六 四氯化碳誘導八週後各藥物處理組之肝臟組織病變比較 (H&E stain, 100x)

(A) Control 組，(B)  $\text{CCl}_4$  組可見局部至廣泛之肝細胞空泡樣變性，大量膠原蛋白沉澱連結，形成偽小葉之情形，(C) SM 組仍可見嚴重之纖維化及偽小葉形成，而 Rapa (D)、Rapa+SM (E)、SHP (F) 及 Rapa+SHP 組 (G) 之纖維化情形與肝細胞變性程度可見明顯改善。



圖七 四氯化碳誘導八週後各藥物處理組肝纖維化病變比較 (Sirius Red stain, 40x)

(A) Control 組僅於肝門脈區有少量紅色膠原蛋白沉澱,  $\text{CCl}_4$  組(B)與 SM 組(C) 可見大量紅色膠原蛋白沉澱, 甚有膠原蛋白沉澱延伸至中央靜脈形成偽小葉之病變, 而 Rapa (D)、Rapa+SM (E)、SHP (F)及 Rapa+SHP 組(G)之肝纖維化程度雖仍有纖維母細胞增生之情形, 但未見明顯偽小葉形成, 可見改善之情形。

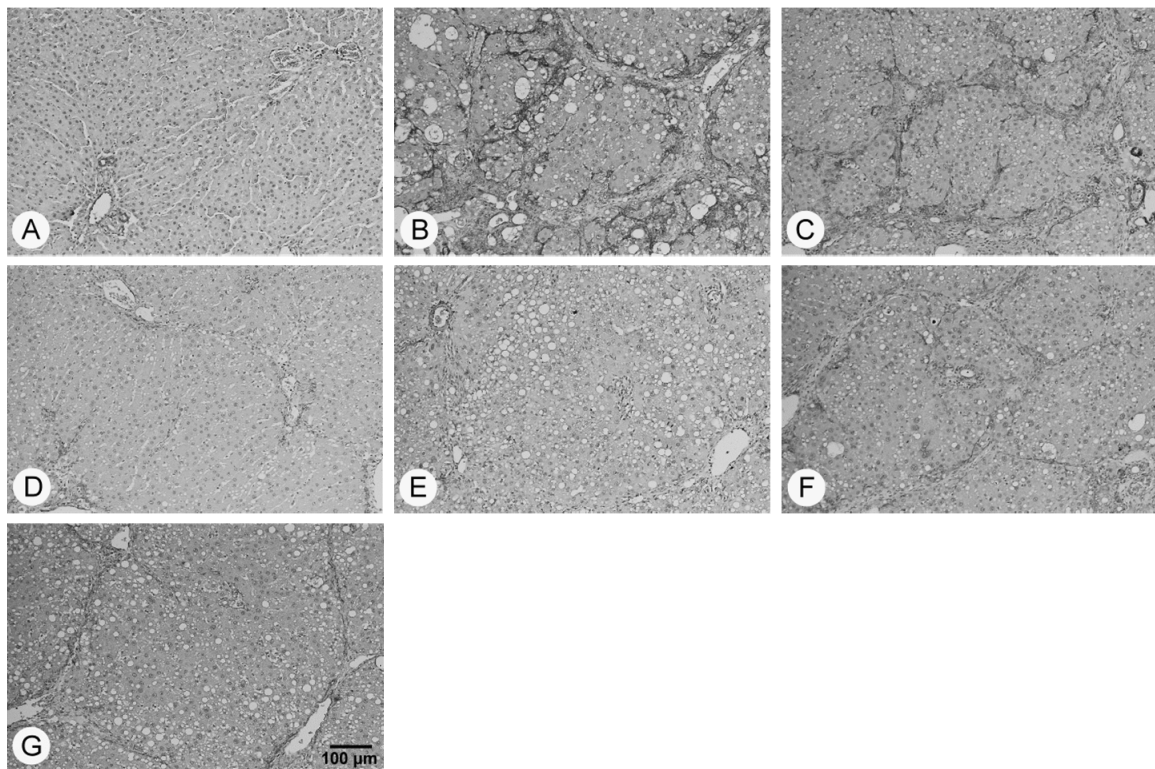


圖八 四氯化碳誘導八週後各藥物處理組之肝臟膠原蛋白含量定量分析

Rapa、Rapa+SM、SHP 及 Rapa+SHP 組之肝臟膠原蛋白含量明顯比 CCl<sub>4</sub> 組顯著降低 (P<0.05, P<0.001)，且除 Rapa+SM 合併處理組比 SM 組可見纖維化極顯著改善外 (P<0.001)，在其他各藥物處理組間並無統計上之差異。

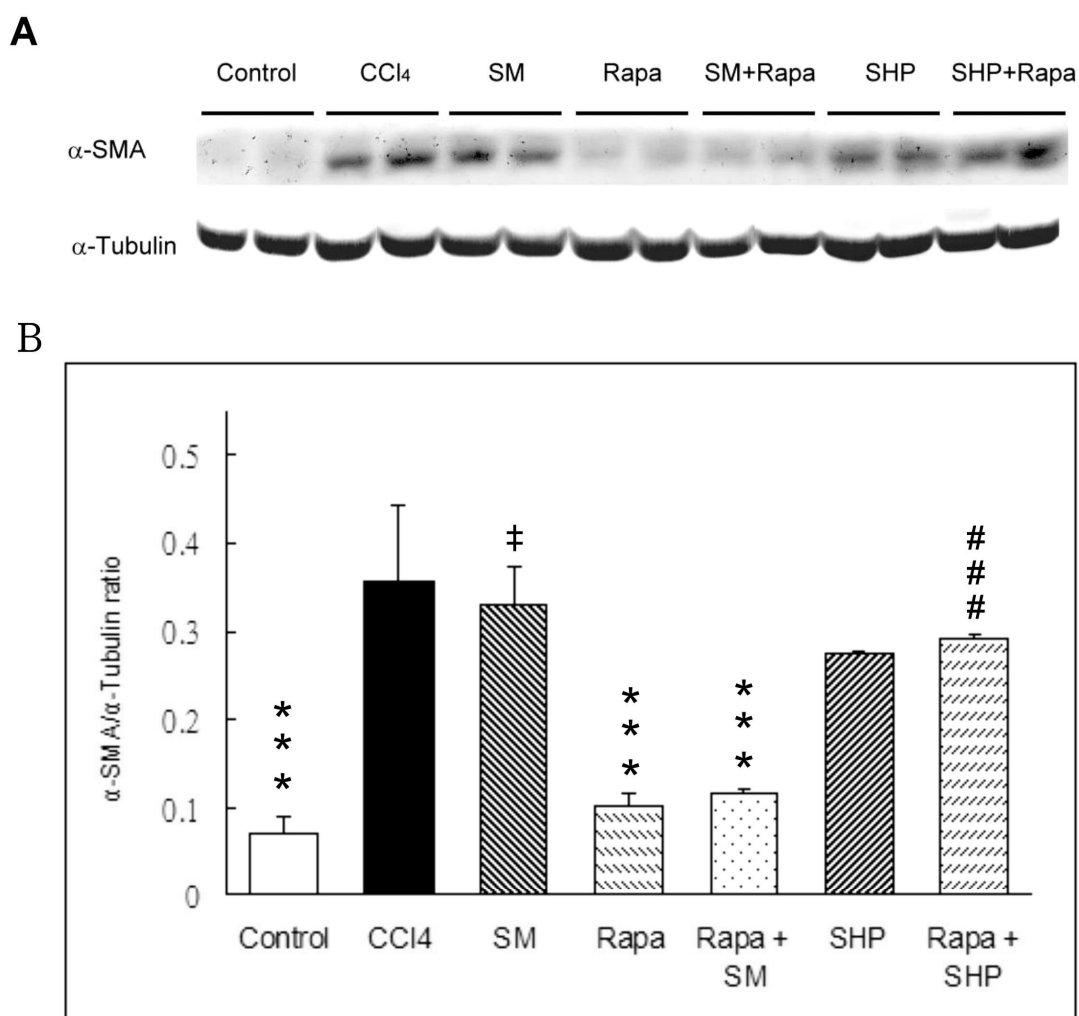
\*: P<0.05, \*\*\*: P<0.001 與 CCl<sub>4</sub> 組相比，###: P<0.001 和 Rapa+SM 組相比



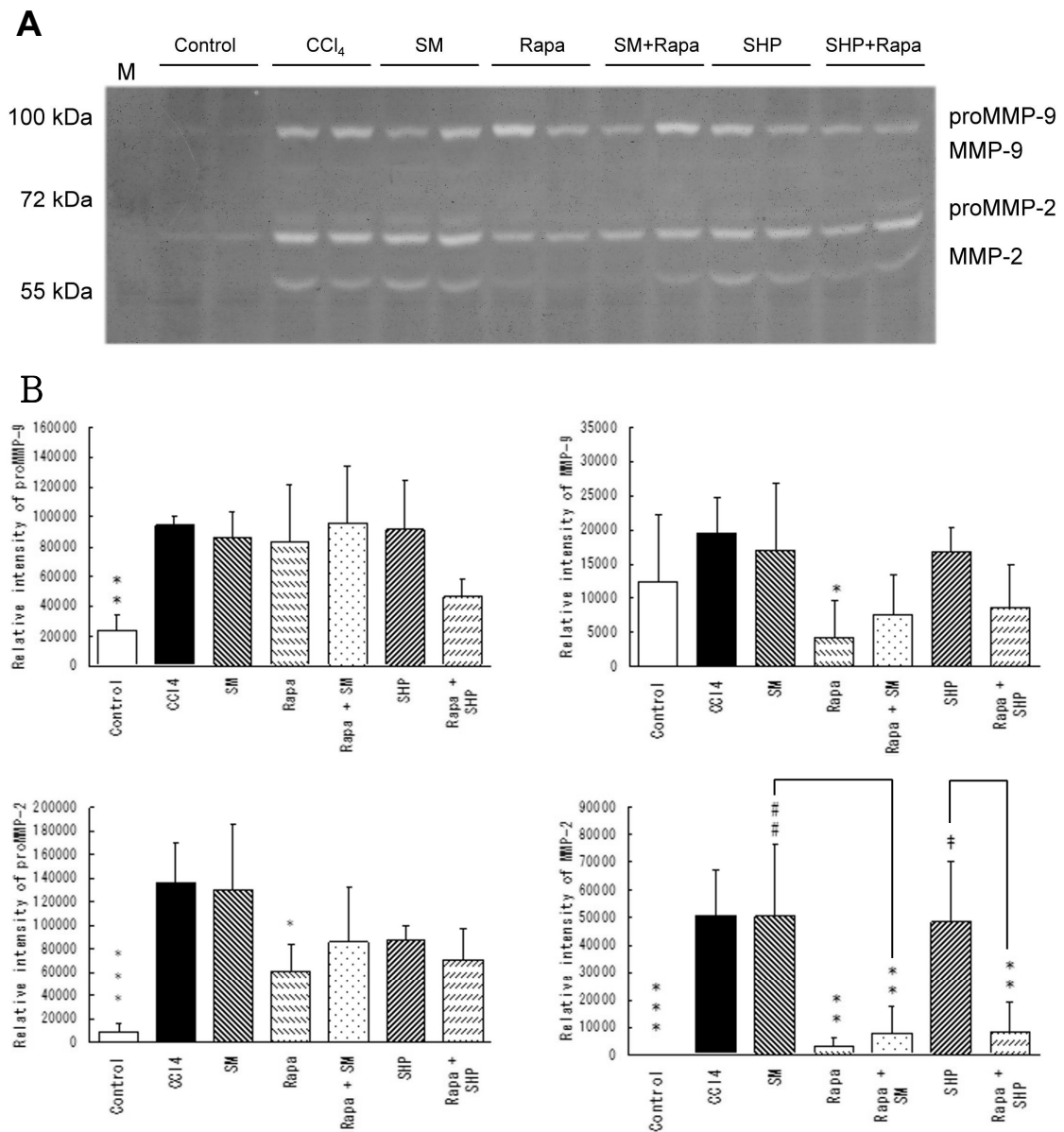


圖九 四氯化碳誘導八週後各藥物處理組肝活化態肝星狀細胞比較 ( $\alpha$ -SMA stain, 40x)

於 Control 組(A)除了肝動脈壁平滑肌細胞呈陽性外,幾乎沒有活化態肝星狀細胞,  $\text{CCl}_4$  組(B)與 SM 組(C)於門脈區至整個肝小葉之肝索間竇狀隙可見大量活化態星狀細胞存在。而 Rapa (D)、Rapa+SM (E)、SHP (F) 及 Rapa+SHP 組(G)之活化態肝星狀細胞和  $\text{CCl}_4$  組相比較可見明顯減少。



圖十 肝臟 $\alpha$ - smooth muscle actin 蛋白表現之 Western blot 圖及量化結果  
 (A) Western blot 圖，肝臟 $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)蛋白表現結果，(B)  $\alpha$ -SMA 蛋白表現經量化後，藥物處理組可見 $\alpha$ -SMA 表現較四氯化碳組極顯著減少。\*\*\*:  $P < 0.001$ ，和  $\text{CCl}_4$  組比較；‡:  $P < 0.001$  與 Rapa+SM 組相互比較；###:  $P < 0.001$ ， Rapa+SHP 組與 Rapa 組相互比較。



圖十一 肝臟基質金屬蛋白酶 MMP-2, 9 之活性分析結果

(A) Zymography 圖，(B) MMP-2, 9 酵素活性經量化後，可見 MMP-9、proMMP-2 及 MMP-2 有下降趨勢，以 Rapa、Rapa+SM 及 Rapa+SHP 組之 MMP-2 活性與 CCl<sub>4</sub> 組相比可見顯著降低，Rapa+SM 與 Rapa+SHP 組等合併 Rapamycin 處理時，比單獨給予中藥 (SM 或 SHP) 更顯著降低 MMP-2 活性著 (P<0.01)。\*: P<0.05, \*\*: P<0.01, \*\*\*: P<0.001，和 CCl<sub>4</sub> 組比較；‡: P<0.01 與 Rapa+SHP 組相互比較；##: P<0.01，與 Rapa+SM 組相互比較。

表二 Real time RT-PCR 檢測肝臟 TGF-β1 基因表現量之結果

Group	N	Median	25%	75%
Control	10	0.803	0.510	1.000
CCl <sub>4</sub>	10	2.285	1.057	2.358
SM	10	68.921	29.932	172.958
Rapa	10	0.492	0.238	2.931
Rapa+SM	6	0.616	0.419	1.000
SHP	10	1.165	0.578	19.623
Rapa+SHP	10	0.799	0.549	62.297