

編號：CCMP97-RD-009

複方中藥在肝硬化鼠的療效研究

黃怡超
國立陽明大學

摘 要

肝纖維化之特徵為肝臟星狀細胞(stellate cells)“活化”；如何逆轉或緩解肝纖維化是國際熱門研究課題，目前並無“抗肝纖維化”之西藥，是以中藥之研發有其意義與契機。特別是肝纖維化之分子形成機轉，包括：氧化壓力、肝星狀細胞增生與移行、發炎反應等等，以“複方”中藥將不同抑制肝纖維化機轉之丹參、川芎與大黃三種單方組成創新複方，在開發治療抗肝纖維化之中藥生技研發上，有其意義。本計畫即以離體細胞與活體肝硬化鼠模式延續並進一步深入探討“抗肝纖維化”與“保護肝臟”藥物之藥效藥理機轉，以作為臨床抗肝纖維化療效評估之根據、基礎。

本計畫以(1)離體細胞（包括肝臟星狀細胞），與(2)活體肝纖維化動物模式，評估“複方”中藥之效應。肝星狀細胞經SV40病毒轉染之細胞株(HSC-T6)，分別以TGF- β 1引致其活化、分泌膠原蛋白，再以中藥來評估其效應。活體動物效應研究以膽管結紮引致肝纖維化動物模式來評估其療效。以“複方”中藥餵食後做療效評估—包括病理切片肝纖維化嚴重度、肝中膠原蛋白與 α -SMA含量測定，血清生化指標(SGOT, SGPT, creatinine)等等。特別是由不同作用機轉之丹參、川芎與大黃三種單方組成創新複方，以由活體動物模式，來評估是否比單一藥物大黃療效佳。

由本研究結果顯示，中藥新複方（丹參+川芎+大黃）萃取物在離體肝臟星狀細胞株上有抗肝纖維化效應，而活體動物療效評估顯示中藥新複方有降低肝纖維化鼠肝腫大、肝膠原蛋白含量與提升並改善膽管結紮鼠全身體重之效應，複方比單方大黃在降低肝腫大效應上較優。而在肝膠原蛋白含量方面，亦有降低之趨勢。唯因樣本數關係，尚未達 $p < 0.05$ 之統計差異。

關鍵詞：肝纖維化、中藥複方、丹參、川芎、大黃、肝星狀細胞

Therapeutic Study of a Chinese Herbal Formula on Cirrhotic Rats

Yi-Tsau Huang

National Yang-Ming University

ABSTRACT

Liver fibrogenesis is a dynamic, complex, and progressive process and at some stages, it is reversible. No clinically efficacious anti-fibrotic drugs are yet available, and current research is directed to lessening or reversing fibrosis. The major culprit of liver fibrosis is activation of hepatic stellate cells (HSCs), characterized by transformation from a quiescent phenotype to a proliferative, contractile and secretory phenotype. In this study, we investigated the *in vitro* and *in vivo* anti-fibrotic effects of a novel Chinese herbal formula of 3 herbs (SLR: S, *Salvia miltiorrhiza*; L, *Ligusticum chuanxiong*; R, *Rheum palmatum*) in rats.

A cell line (HSC-T6) is challenged with transforming growth factor (TGF)- β 1 to induce HSC activation, and to evaluate the inhibitory effects of SLR on activated HSCs in terms of collagen and α -smooth muscle actin (α -SMA) production. A rat model of hepatic fibrosis was induced by bile duct ligation (BDL). SLR (50 mg/kg, bid, S:L:R= 2:2:1) or R (*Rheum palmatum*, 10 mg/kg, bid) alone was administered to BDL rats for 3 weeks. Assessment of therapeutic effects included: (A) hepatic and body weights, (B) quantitation of hepatic collagens and α -smooth muscle actin (α -SMA), (C) serum biochemical markers including SGOT and SGPT, and (D) histological scoring of liver fibrosis.

SLR (S+L+R=5.0+5.0+2.5 μ g/ml) reduced TGF- β 1-stimulated collagen and α -smooth muscle actin (α -SMA) protein expressions in HSC-T6. In the *in vivo* therapeutic study, SLR (50 mg/kg, bid, S:L:R= 2:2:1) treatment for 3 weeks significantly reduced hepatic collagen content and liver weight of BDL rats with hepatic fibrosis. Body weight of BDL rats was also improved by SLR treatment. Therapeutic benefits of SLR were significantly better than R (*Rheum palmatum*) alone. Moreover, the reduction of hepatic collagen content in BDL rats tended to be greater in SLR than R alone.

Keywords: hepatic fibrosis, Chinese herbal formula, *Salvia miltiorrhiza*, *Ligusticum chuanxiong*, *Rheum palmatum*, hepatic stellate cells

壹、前言

因慢性B或C型肝炎及酗酒性肝炎等所致慢性肝臟損傷、發炎有可能導致肝硬化，特徵為肝正常組織及細胞漸被結疤組織所取代，即肝纖維化。慢性B或C型肝炎併有肝硬化是導致肝癌之重要危險因子，故如何阻延或逆轉肝纖維化為處理慢性B或C型肝炎及預防肝癌的重要課題。肝纖維化是一個動態、進行性的過程，在某些階段為可逆的。而對肝纖維化目前尚無有效藥物治療，醫學界仍致力實驗研究，尋找阻延肝纖維化之藥物。

肝纖維化之特徵為肝臟星狀細胞(stellate cells)“活化”，即星狀細胞由靜態儲存維生素A細胞轉化為具有增生，收縮肝小竇(hepatic sinusoids)，以及分泌細胞外間質等特性而促進肝纖維化；如何逆轉成緩解肝纖維化是國際熱門研究課題，目前並無“抗肝纖維化”之西藥，是以中藥之研發有其意義與契機。特別是肝纖維化之分子形成機轉，包括：氧化壓力、肝星狀細胞增生與移行、發炎反應等等，以“複方”中藥將不同抑制肝纖維化機轉之丹參、川芎與大黃三種單方組成創新複方，在開發治療抗肝纖維化之中藥生技研發上，有其意義。本計畫即以離體細胞與活體肝硬化鼠模式延續並進一步深入探討“抗肝纖維化”與“保護肝臟”藥物之藥效藥理機轉，以作為臨床抗肝纖維化療效評估之根據、基礎。

本計畫以(1)離體細胞（包括肝臟星狀細胞），與(2)活體肝纖維化動物模式，針對創新複方中藥（丹參、川芎與大黃）萃取物，在離體及活體上之抗肝纖維化效應做研究，評估各種生物活性，並進而探究其藥效機轉。

貳、材料與方法

一、實驗材料

(一) 儀器設備 循環恆

溫水域槽

(Circulating water bath, WB212-B1, Bioway, Taipei)

超音波震盪器 (Sonorex supper RK 255H, Germany)

高速離心機

(High-Speed Centrifuge, Hermile Labotechnik, Germany) 微量離心

機 (Micro centrifuge, The Griffin group, INC. U.S.A.) 血球計數器

(Hemocytometer, Hausser Scientific Horsham, USA) 光學顯微鏡

(Light microscope, CK-30, Olympus, Japan) 相位差顯微鏡 (Phase-

contrast microscope, IX70, Olympus, Japan) 雷射共軛焦顯微鏡

(Laser confocal microscopy, TCS-SP2, Leica) 二氧化碳培養箱

(CO₂ incubator, SANYO, Japan) 免疫酵素分析儀 (ELISA reader,

Power Wave, BIO-TEK, USA) 即時定量聚合酶分析儀

(ABI prism 7900 HT Sequence Detection System, Applied Biosystems)

聚合酶分析儀

(Gene Amp PCR system 9700, Perkin Elmer Applied Biosystems, U.S.A.)

冷光測定儀

(AutoLumat LB953, Berthold technologies, Bad Wildb Germany)

分光光度計 (DU-65 Spectrophotometer, Beckman, U.S.A.) 比色

分析儀

(Colorimetric analyzer, Dri-Chem 3000, Fuji Photo Film Co, Tokyo, Japan)

酸鹼測定計

(pH meter JENCO MODEL 6171, Jenco Electronics, Ltd., Taiwan)

均質機 (Ultra Turrax®, Ika Labotechnik, Germany)

SDS-PAGE 電泳套組 (Bio-Rad, USA)

影像分析處理設備 Kodak MI Analysis System (Eastman Kodak)

(二) 試劑與藥品

以下試劑購自 **Amersham (UK)**

Cell proliferation biotrak ELISA system

ECL™ Western Blotting Detection Reagents
以下試劑購自 **Biocolor (Ireland)**
Sircol collagen assay kit
以下試劑購自 **Millipore (USA)**
Immobilon-PVDF
以下試劑購自 **Molecular Probes (USA)**
Propidium iodide
以下試劑購自 **Bio-red (USA)**
Acrylamide
N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethylenediamine (TEMED)
以下試劑購自 **BRL Gibco (USA)**
Trypsin-EDTA
以下試劑購自 **Calbiochem (USA)**
Mouse α -actin, TGF β 1 (Human)
以下試劑購自 **Chemicon**
Nuclear extraction kit
以下試劑購自 **Invitrogen (USA)**
dNTP mix, oligo(dT)12-18, RNase inhibitor,
M-MLV reverse transcriptase
Waymouth's medium
以下試劑購自 **Jackson ImmunoResearch (USA)**
Rhodamine-conjugated donkey anti-mouse IgG antibody
以下試劑購自 **Merck (Germany)**
Ammonium persulfate (APS)
Boric acid
Dimethyl sulfoxide (DMSO)
Disodium hydrogen phosphate (Na₂HPO₄)
Ethylenedinitrilo tetraacetic acid disodium salt dihydrate (EDTA)
Sodium chloride (NaCl)
Tween® 20
以下抗體購自 **Santa Cruz (USA)**
Goat anti-phospho-Smad2/3 polyclonal antibody
Goat anti-Smad2/3 polyclonal antibody

二、複方中藥萃取物的製備

所篩選的各中藥萃取物由國立中國醫藥研究所林雲蓮老師實驗室提供。丹參、川芎、大黃三種中藥材購自中藥藥材行。將丹參、川芎、大黃藥材以80%酒精於60°C萃取過濾三次，經減壓濃縮後得到丹參粗抽物(Sm)、川芎粗抽物(LC)、大黃粗抽物(RP)，以供實驗用。指標成份各為salvianolic acid B(丹參)、tetramethylpyrazine(川芎)與emodin(大黃)。因考量大黃為大苦大寒之瀉下藥材，故在複方比例上先予以減量，在離體及活體試驗上均採2:2:1比例劑量進行實驗，期能不對活體實驗的動物造成不良影響。

(一) 中藥對肝星狀細胞離體活性抑制分析

1. HSC-T6 cell line培養

離體試驗所使用的星狀細胞(HSC-T6 cell line)來源自紐約西奈山醫學院(Mount Sinai School of Medicine) S.L. Friedman教授，以運用lipofectamine轉植SV40的T-antigen帶有Rous sarcoma virus promoter表現基因之大鼠肝星狀細胞。HSC-T6 cells維持在含有10%胎牛血清、2mM L-glutamate、100 μ M非必須胺基酸及抗生素(100units/ml of penicillin, 100g/ml streptomycin and 0.25 μ g/ml of fungizone)的Waymouth 752/1培養基，培養於37°C、5% CO₂/95% air培養箱。每四天以胰蛋白酶消化繼代，以每片1 \times 10⁷個細胞的密度培養在75平方公分細胞培養皿。

2. HSC-T6 cell活化之評估

藉由加入1ng/ml TGF- β 1刺激星狀細胞的活化，再以Western blot及real time-PCR定量分析，分析 α -smooth muscle actin(α -SMA)蛋白質表現量及基因的轉譯表現，將可作為檢測星狀細胞活化之參數。HSC-T6 cell培養在6cm培養皿中以10% FBS Waymouth 752/1培養基培養24小時後，更換為不含血清培養基。分別加入複方中藥併用處理1小時後，再加入1 ng/ml TGF- β 1刺激星狀細胞的活化(同時留一對照組)，併用處理24小時後收集蛋白質供Western Blot實驗用。用於real time-PCR定量分析則以藥物處理6小時。

在分析藥物對降低HSC-T6細胞膠原蛋白(Collagen)實驗，方法為將細胞培養在24-well培養盤中，以含10% FBS培養液培養24小時後，更換為不含FBS的培養液，同時給予刺激劑TGF- β 1(1ng/ml)以及不同濃度複方中藥萃取物繼續培養24小時後，以Sircol Soluble Collagen Assay Kit偵測膠原蛋白的表現。先吸去培養液，以1 \times PBS清洗兩次，加入甲醇於-20°C放置1小時用以固

定細胞，再以1×PBS清洗，加入Sirius Red在培養箱處理30分鐘後，吸去Sirius Red並加入純乙醇清洗殘留試劑，吸去乙醇後加入alkaline dye solution，利用ELISA reader讀取波長540nm的吸光值。

3. 細胞毒性分析—MTT Assay

將細胞培養在24-well培養盤中，以含10% FBS培養液培養24小時後，更換為不含FBS的培養液，並加入不同濃度複方中藥萃取物處理。經處理24小時後，加入0.1mg/ml MTT溶液培養2小時，將上清液吸去，加入200 μ l DMSO使細胞破裂釋出formazan結晶，以ELISA reader讀取波長540nm的吸光值。

4. MAP kinase及Smad2/3磷酸化測定—西方點墨法(Western blot)

將細胞培養在6cm培養皿中，每well種入 10^6 細胞，在含10% FBS培養液培養24小時，更換為不含FBS之培養液培養，先以中藥萃取物處理1小時後，再加入TGF- β 1 (1ng/ml)處理1個小時，用分散液收取細胞，定量蛋白質，取30 μ g蛋白質加入樣本緩衝液(sample buffer)於95 $^{\circ}$ C加熱10分鐘，置於冰上。

以10% SDS-polyacrylamide gel進行電泳分析，電壓100伏特約2小時後將蛋白質轉 (transfer)至PVDF膜，將PVDF膜浸置於blocking buffer (5% non-fat milk in TTBS)中，室溫下搖晃1小時。接著以TTBS清洗PVDF膜，將膜置於一級抗體中 (1:15000，以2% BSA in TTBS配置)，4 $^{\circ}$ C作用至隔夜，接著再加上二級抗體作用1小時，以ECL顯影，以冷光影像分析處理機偵測及分析。

5. HSC-T6細胞遷移試驗(Migration assay)

實驗前先將轉移盤上層以Matrigel (100 μ g/ml)塗覆處理1小時，再以培養液清洗。細胞先以含10% FBS培養液培養24小時，再以不含FBS之培養液培養24小時後打下細胞，每個轉移盤上層種入 1×10^5 細胞、150 μ l不含FBS之培養液以及不同濃度中藥萃取物，下層24-well於每個well加入500 μ l不含FBS之培養液以及刺激劑TGF- β 1 (1ng/ml)，置於培養箱培養6小時。

吸去將轉移盤上層的培養液，用棉花棒沾取1×PBS小心括除上層未轉移之細胞，將上層轉移盤浸入乙醇10分鐘後，再浸入Harris Hematoxylin Solution 30分鐘用以染細胞核，之後以1×PBS小心沖洗轉移盤，將轉移盤上的膜取下，在顯微鏡400X下隨意挑選4個視野計算轉移至下層的細胞數。實驗結果(Cell migration)以下列表示：實驗組轉移至下層的細胞數除以對照組轉移至下層

的細胞數。實驗中同時以Dexamethasone作為正對照組^(23,24)。

(二) 中藥抑制肝纖維化之活體動物試驗

1. 肝纖維化動物模式

樂斯科生物科技公司購買6週齡雄性Sprague-Dawley (SD)大鼠飼養於動物中心，控制在12小時light/dark循環條件下，任其隨意進食進水。實驗用SD大白鼠分為假手術組(Sham)，每組6隻動物；膽管結紮組(BDL)、複方中藥(50mg/kg)+膽管結紮(BDL)、Silymarin (50mg/kg)+膽管結紮(BDL)、大黃EtOH層萃提取物(10 mg/kg)+膽管結紮手術(BDL)組，每組十隻動物，飼養於陽明大學實驗動物中心。肝纖維化動物模式以膽管結紮模式(bile duct ligation, BDL)處理三週誘發大鼠肝臟纖維化，複方中藥亦同步治療，以劑量50(mg/kg)每天餵食二次連續三週。犧牲前一晚實驗動物先禁食12小時，犧牲當日以ketamine (100mg/kg)麻醉並採血後，以KCl (3M)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、脾臟取出，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℃。

2. 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℃下，每分鐘4,700rpm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，採用自動之分析套組(kit, Dri-Chem 3000, Fuji Photo Film Co, Tokyo, Japan)進行分析。

3. 活體肝臟膠原蛋白含量之定量分析

取約0.1g肝組織於0.5M acetic acid中，利用均質機(ULTRA TURRAX[®], Ika Labortechnik, Staufen, Germany)予以均質。經acetic acid萃取出之不可溶的膠原蛋白在經過加熱80℃，60分鐘後會轉變成可溶的膠質。測定方法依照Sircol collagen assay (Biocolor, Belfast, Northern Ireland)所提供之實驗方法。

4. 肝臟組織病理學觀察

肝臟經HE染色後，觀察肝臟之纖維化程度。纖維化以Sirius red染色評分的半定量方法：1分為portal area之纖維母細胞（紡錘狀, spindle）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。

(三) 統計分析

上述實驗所得到之數據結果均以平均值±標準誤差值(mean ± s.e.m)表示。多組之間以單因子變異分析(one-way ANOVA)評估各組間差異。當統計結果 $p < 0.05$ 時，則認為兩組間的差異具有統計學上的意義。^(15-17, 21,22,25)

參、結果

一、中藥對肝星狀細胞離體活性抑制分析

(一) HSC-T6 cell活化之評估

以西方點墨法分析複方中藥對抑制經TGF- β 1 (1ng/ml)處理之大鼠肝臟星狀細胞株 α -Smooth Muscle Actin (α -SMA)蛋白表現結果，在經三次實驗重複後，發現複方中藥以2:2:1比例，在劑量Sm-LC-RP 5-5-2.5 μ g/ml時可降低經刺激TGF- β 1 (1ng/ml)處理之大鼠肝臟星狀細胞株HSC-T6所產生 α -SMA蛋白表現量，在 $p < 0.05$ 時，有統計上差異。(如圖1)。

在定量PCR分析複方中藥對大鼠HSC-T6細胞株分泌 α -smooth muscle actin (α -SMA)基因產物量效應上，實驗結果發現以複方中藥以2:2:1比例，在劑量Sm-LC-RP 5-5-2.5 μ g/ml時可降低經刺激TGF- β 1 (1ng/ml)處理之大鼠肝臟星狀細胞株HSC-T6所表現的 α -smooth muscle actin (α -SMA)基因產物量(如圖2)。

以Sircol Collagen Assay分析複方中藥對抑制TGF- β 1刺激處理大鼠肝臟星狀細胞株HSC-T6膠原蛋白表現結果，在經四次實驗重複後，發現複方中藥Sm-LC-RP在2.5-2.5-1.25 μ g/ml及5-5-2.5 μ g/ml二個劑量均可降低大鼠肝臟星狀細胞株HSC-T6膠原蛋白表現量(如圖3)，並且在 $p < 0.05$ 時，有統計上的差異。

(二) 細胞毒性分析—MTT Assay

在藥物處理對肝臟星狀細胞HSC-T6毒性試驗方面，複方中藥Sm-LC-RP在1-1-0.5 μ g/ml、2-2- μ g/ml、2.5-2.5-1.25 μ g/ml及5-5-2.5 μ g/ml四個劑量對肝臟星狀細胞株HSC-T6均不會造成毒性(如圖4)。

(三) MAP kinase及Smad2/3磷酸化測定

為了確認複方中藥對於抑制由TGF- β 1所引起Smad2/3蛋白質磷酸化的影響，本實驗室在經三次以西方點墨法實驗後，初步得到複方中藥Sm-LC-RP在劑量5-5-2.5 μ g/ml時可降低Smad 2/3蛋白質磷酸化的結果，但目前結果並無統計上差異，有待進一步實驗證實(如圖5及圖6)。

本實驗室目前在TGF- β 1及中藥單方對於MAPK的影響有初步成果(如圖7 A-F)。HSC-T6細胞先以不含血清的培養液培養一天，經大黃預處理1小時，加入1ng/ml TGF- β 1刺激後，收細胞進行Western blot分析。

1. JNK表現方面

以TGF- β 1分別刺激15分、30分、1小時和2小時，收細胞進行Western blot分析，結果顯示TGF- β 1在作用後2小時明顯刺激JNK活化至156% \pm 39% (圖7-A)。大黃預處理組中，在5以及10 μ g/ml濃度下分別可明顯抑制JNK活化至102% \pm 19%及88% \pm 25% (圖7-D)。

2. p38 MAPK表現方面

以TGF- β 1分別刺激15分、30分、1小時和2小時，結果顯示TGF- β 1在作用後30分鐘即可刺激p38 MAPK活化，作用至2小時可以明顯刺激p38 MAPK活化至149% \pm 32% (圖7-C)。大黃預處理組中，在5以及10 μ g/ml的濃度下皆無法抑制p38 MAPK活化(圖7-F)。

3. ERK 表現方面

以TGF- β 1分別刺激15分、30分、1小時和2小時，結果顯示TGF- β 1皆無法明顯刺激ERK活化(圖7-B)。大黃預處理組中，在5以及10 μ g/ml的濃度下對ERK亦無明顯作用(圖7-E)。總結MAPK的分析結果，TGF- μ 1可刺激JNK和p38 MAPK的活化，而大黃可明顯抑制JNK的活化並呈現濃度效應關係，對p38 MAPK卻無抑制作用。

(四) HSC-T6細胞遷移試驗(Migration assay)

在TGF- β 1的刺激下，大黃酒精萃取物於5、10和25 μ g/ml不同濃度下呈現濃度效應關係的抑制趨勢，並且在5 μ g/ml的濃度下即有統計學上的差異，可以明顯抑制HSC-T6細胞的遷移作用至147% \pm 51%。

與西藥dexamethasone相比，大黃酒精萃取物於5、10和25 μ g/ml對抑制細胞遷移效果更佳。至於大黃成分emodin對於抑制細胞遷移則無明顯效果。(如圖8)

二、中藥抑制肝纖維化之活體動物試驗

(一) 肝纖維化動物模式

動物實驗分成假手術組(Sham)、膽管結紮手術組(BDL)、複方中藥(50mg/kg)+膽管結紮手術(BDL)、Silymarin (50mg/kg)+膽管結紮手術(BDL)、大黃(RP)EtOH層萃取物(10mg/kg)+膽管結紮手術(BDL)組。假手術組處理6隻動物，給藥組每組10隻動物，均飼養於陽明大學實驗動物中心。動物在體重達300克後進行假手術及膽

管結紮手術。手術隔日開始以口服餵食藥物三週，每天二次。持續三週後犧牲動物，稱取每隻體重、肝重，紀錄其數值，並取其肝葉組織分別保存於10%福馬林溶液及液態氮中。並離心採集血清以自動分析儀檢測AST及ALT。由體重、平均肝重數據結果來看，膽管結紮組(BDL)、複方中藥2:2:1混合物(50mg/kg)+膽管結紮(BDL)、Silymarin (50mg/kg)+膽管結紮(BDL)組及大黃(RP) EtOH層萃提取物(10mg/kg)+膽管結紮手術(BDL)組體重均比假手術組(Sham)輕，顯示進行膽管結紮手術會造成大鼠體重降低。而在肝重、肝重/體重比較上(如Table 1)，假手術組在肝重上均比膽管結紮組(BDL)、複方中藥2:2:1混合物(50mg/kg)+膽管結紮(BDL)、Silymarin (50mg/kg)+膽管結紮(BDL)及大黃EtOH層萃提取物(10mg/kg)+膽管結紮手術(BDL)組來得輕。

但若以平均肝重/體重比例來看，膽管結紮手術(BDL)組會提高大鼠肝重/體重比例($p < 0.05$)。而複方中藥2:2:1混合物(50mg/kg)+膽管結紮(BDL)、Silymarin (50mg/kg)+膽管結紮(BDL)組二個給藥處理組的大鼠平均肝重/體重比例，則有降低的情形，並有統計上的差異(如Table 1及圖9)，而複方中藥2:2:1混合物(50mg/kg)降低膽管結紮大鼠的平均肝重/體重比效果較大黃EtOH層萃提取物(10 mg/kg)佳。

(二) 肝臟觀察

在實驗犧牲大鼠肝臟外觀觀察上(如圖10-圖14)，施行假手術組大鼠外觀與施行膽管結紮手術組(BDL)相較，假手術組(sham)肝臟體積較小，顏色較為紅潤。而四個施行膽管結紮手術組大鼠肝臟體積較大，顏色均偏黃色，顯示有肝腫大與黃疸現象。

(三) 血液生化值檢測

在血清生化值ALT及AST的比較上，接受膽管結紮手術(BDL)組別的AST及ALT值均較只進行假手術組(Sham)來得高，並且有統計上的差異：將藥物處理組與膽管結紮手術(BDL)組相較，餵食複方中藥2:2:1混合物(50mg/kg+膽管結紮手術(BDL))組無法降低ALT及AST血清生化值；而Silymarin (50mg/kg)+膽管結紮手術(BDL)組與膽管結紮手術(BDL)組相較，AST及ALT平均值均有降低，但無統計上之差異。至於大黃EtOH層萃提取物(RP 10mg/kg)+膽管結紮手術(BDL)組可降低AST平均血清生化值，但亦無統計上之差異。(如Table 2)。

(四) 肝臟膠原蛋白含量之定量分析

在活體肝臟膠原蛋白含量之定量分析結果上，以Sircol collagen assay測肝組織可溶性膠原蛋白含量，結果發現，施行膽管結紮手術組(BDL)大鼠其肝組織膠原蛋白含量比假手術組(sham)高，在 $p < 0.05$ 時，有統計上的顯著差異。而三個給藥組的大鼠肝臟膠原蛋白含量，與膽管結紮手術組(BDL)大鼠組相較之下有降低的趨勢，而且在 $p < 0.05$ 時，有統計上的顯著差異。顯示複方中藥2:2:1混合物、Silymarin、大黃EtOH層萃取物三種藥物均有降低施行膽管結紮手術大鼠肝臟膠原蛋白含量的效果(如Table 3)。

(五) 肝臟組織病理學觀察

在肝臟組織病理學觀察方面，本實驗室在犧牲所有實驗大鼠後，以10%福馬林固定組織，委由台灣動物科技研究所製作組織切片，由台中榮總比較病理實驗室人員對所有樣本進行肝臟病理評分。結果(如Table 4)發現，膽管結紮手術組(BDL)大鼠比假手術組(sham)大鼠在肝纖維化及肝壞死程度上均有明顯嚴重，在 $p < 0.05$ 下有統計上差異。而複方中藥2:2:1混合物50 mg/kg對於膽管結紮手術大鼠，有降低其肝臟纖維化及肝臟壞死的功效，但與單方大黃相較則無統計上差異。

肆、討論

本研究以離體肝星狀細胞細胞株(HSC-T6)與膽管結紮肝纖維化動物模式來評估中藥新複方(丹參、川芎、大黃)之抗肝纖維化效應。由本研究結果顯示,中藥新複方(丹參+川芎+大黃)萃取物在離體肝臟星狀細胞株上有抗肝纖維化效應,而活體動物療效評估顯示中藥新複方有降低肝纖維化鼠肝腫大、肝膠原蛋白含量與提升並改善膽管結紮鼠全身體重之效應,複方比單方大黃在降低肝腫大效應上較優。而在肝膠原蛋白含量方面,亦有降低之趨勢。唯因樣本數關係,尚未達 $p < 0.05$ 之統計差異。未來研究可以在不同肝纖維化動物模式(例如四氯化碳或其他肝毒素Dimethylnitrosamine或Thioacetamide誘發肝纖維化)來進一步印證中藥新複方療效,以做為臨床療效評估之依據。

伍、結論與建議

由本研究結果顯示,中藥新複方(丹參+川芎+大黃)萃取物在離體肝臟星狀細胞株上有抗肝纖維化效應,而活體動物療效評估顯示中藥新複方有降低肝纖維化鼠肝腫大、肝膠原蛋白含量與提升並改善膽管結紮鼠全身體重之效應,複方比單方大黃在降低肝腫大效應上較優。未來研究可以在不同肝纖維化動物模式(例如四氯化碳或其他肝毒素Dimethylnitrosamine或Thioacetamide誘發肝纖維化)來進一步印證中藥新複方療效,以做為臨床療效評估之依據。

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CCMP97-RD-009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. Kao JH, Chen DS. Global control of hepatitis B virus infection. *Lancet Inf. Dis.* 2002; 2: 395-403.
2. 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.
3. Friedman SL. Liver fibrosis-from bench to bedside. *J. Hepatol.* 2003; 38: S38-S53.
4. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J. Clin. Invest.* 2005; 115: 209-218.
5. Lotersztajn S, Julien B, Teixeira-Clerc F, Grenard P, Mallat A. Hepatic fibrosis: molecular mechanisms and drug targets. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2005; 45: 605-628.
6. 王寶恩，張定鳳主編，現代肝臟病學（第一版），科學出版社，中國，p1002-1012，1999。
7. 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.
8. 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.
9. Imanishi Y, Maeda N, Otagawa K, Seki S, Matsui H, Kawada N, Arakawa T. Herb medicine Inchin-ko-to (TJ-135) regulates PDGF-BB-dependent signaling pathways of hepatic stellate cells in primary culture and attenuates development of liver fibrosis induced by thioacetamide administration in rats. *J. Hepatol.* 2004; 41: 242-250.
10. Shimizu I. Sho-saiko-to: Japanese herbal medicine for protection against hepatic fibrosis and carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2000; 15 (Suppl): D84-D90.
11. Sheehan MP, Rustin MHA, Buckley C, Harris DJ, Ostlere L, Dawson A, Atherton DJ, Brostoff J. Efficacy of traditional Chinese herbal therapy in adult atopic dermatitis. *Lancet* 1992; 340: 13-17.
12. Bensoussan A, Talley NJ, Hing M, Menzies R, Guo A, Ngu M. Treatment of irritable bowel syndrome with Chinese herbal medicine: a randomized controlled

- trial. *JAMA* 1998; 280: 1585-1589.
13. Bent S, Xu L, Lui LY, Nevitt M, Schneider E, Tian G, Guo S, Cummings S. A randomized controlled trial of a Chinese herbal remedy to increase energy, memory, sexual function, and quality of life in elderly adults in Beijing, China. *Am. J. Med.* 2003; 115:441-447.
 14. DiPaola RS, Zhang H, Lambert GH, Meeker R, Licitra E, Rafi MM, et al. Clinical and biologic activity of an estrogenic herbal combination (PC-SPES) in prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* 1998; 339: 785-791.
 15. Lin Y-L, Hsu Y-C, Chiu Y-T, Huang, Y.-T. Anti-fibrotic effects of a herbal combination regimen on hepatic fibrotic rats. *Phytother. Res.* 2007, in press.
 16. Hsu Y-T, Lin Y-L, Chiu Y-T, Shiao M-S, Lee C-Y, Huang, Y-T. Anti-fibrotic effects of *Salvia miltiorrhiza* on dimethylnitrosamine-intoxicated rats. *J. Biomed. Sci.* 2005; 12: 185-195.
 17. Lin Y-L, Lee T-F, Huang Y-J, Huang, Y-T. Inhibitory effects of *Ligusticum chuanxiong* on the proliferation of rat hepatic stellate cell. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2006; 21: 1257-1265.
 18. 中華藥典編修委員會中藥集小組，中華中藥典，中華民國行政院衛生署，臺北，2004。
 19. 江蘇新醫學院，中藥大辭典.上海科學技術出版社，中國，上海，1999。
 20. Vogel S, Piantedosi R, Frnak J, et al. An immortalized rat liver stellate cell (HSC-T6): a new cell model for the study of retinoid metabolism in vitro. *J. Lipid Res.* 2000; 41: 882-893.
 21. 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.* 2007; 22: 99-111.
 22. 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.
 23. Yang C, Zeisberg M, Mosterman B, Sudhakar A, Yerramalla U, Holthaus K, Xu L, Eng F, Afdhal N, Kalluri R. Liver fibrosis: insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors. *Gastroenterology* 2003; 124: 147-159.
 24. Ikeda K, Wakahara T, Wang YQ, Kadoya H, Kawada N, Kaneda K. In vitro migratory potential of rat quiescent hepatic stellate cells and its augmentation by cell activation. *Hepatology* 1999; 29: 1760-1767.
 25. Hsu Y-C, Chiu Y-T, Lee C-Y, Wu C-F, Huang Y-T. Antifibrotic effects of tetran-

- drine on bile duct ligated rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2006; 84: 967-976.
26. Lopez-De Leon A, Rojkind MA simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections. *J. Histochem. Cytochem.* 1985; 33: 737-743.
 27. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 102: 156-159.

柒、圖表

Table 1. Profiles of body, liver and kidney weights in rats.

	三週後體重(g)	平均肝重(g)
Sham (n=6)	390±6.3	13±0.6
BDL (n=8)	358.8±8.3*	26.5±1.1*
SLR (2:2:150mg/kg)+BDL (N=10)	334.9±5.6*#	21.7±1.3*#
SN (50mg/kg)+BDL (n=9)	364.4±14*#	20.7±1.5*#
RP (10mg/kg)+BDL (n=8)	368.8±10.8*◇	26.1±2.1*◇

Data are expressed as mean ±SEM.

* p<0.05 BDL組vs. sham組

p<0.05 BDL組+給藥組vs. BDL組

◇ p<0.05 SLR(2:2:1 50 mg/kg)+BDL組vs RP(10 mg/kg)+BDL組

Table 2. Results of plasma biochemistry in different groups.

	ALT(U/L)	AST(U/L)
Sham (n=6)	19.3±3.7	77±7.6
BDL (n=8)	117±9.2*	728.6±69.7*
SLR (2:2:1 50mg/kg)+BDL (n=10)	135.7±19.6	794± 45.8
SN (50mg/kg)+BDL (n=9)	103.6±18.3	558.9±80
RP (10mg/kg)+BDL (n=8)	116.8±13.5	612±81

Data are expressed as mean ±SEM.

* p<0.05 BDL group vs sham group.

Table 3. Hepatic Collagen Content (mg/g of dried liver) of Different Treatment groups of Bile-duct Ligation Rats.

	Hepatic Collagen Content (mg/g of dried liver)
Sham (n=6)	14.8±8.0
BDL (n=8)	53.2±6.8*
BDL + SLR 2:2:1 50mg/kg (n=10)	20.9±6.9 *#
BDL + Silymarin 50mg/kg (n=9)	27.4±6.9 *#
BDL + RP 10mg/kg (n=8)	30±7.0 *#

Data are expressed as mean ±SEM.

* p<0.05 BDL 組vs. sham組

p<0.05 BDL+給藥組 vs. BDL組

Table 4. 肝臟纖維化與壞死程度評分結果

	肝纖維化程度評分	肝壞死程度評分
Sham (n=6)	0±0	0±0
BDL (n=8)	1.9±0.8*	0.8±0.9*
BDL + SLR 2:2:1 50mg/kg (n=10)	1±0.5*#	0.7±0.7*#
BDL + Silymarin 50mg/kg (n=9)	1.9±1.6*	0.1±0.4*
BDL + RP 10mg/kg(n=8)	0.8±0.7*#	0.6±0.5*#

Data are expressed as mean ±SEM.

* p<0.05 BDL組 vs. sham組

p<0.05 BDL+給藥組 vs. BDL組

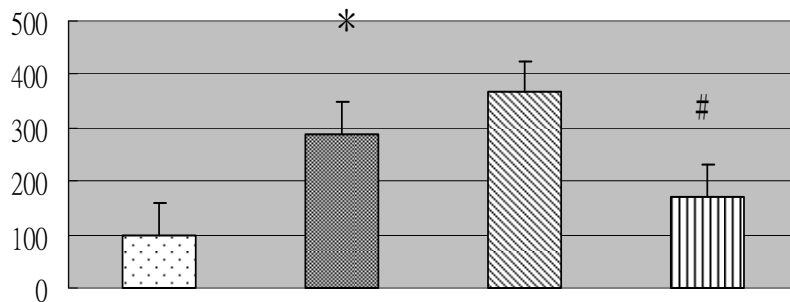
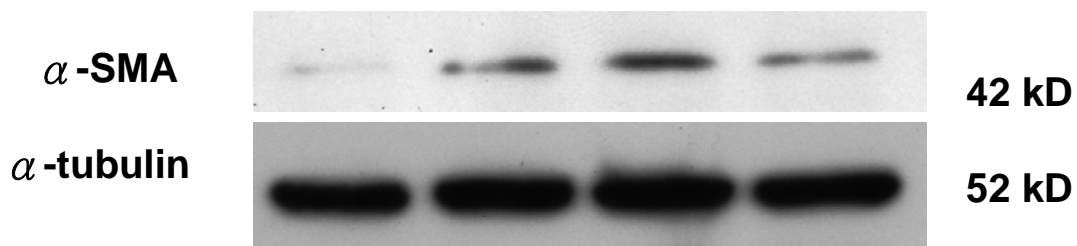


圖1 複方中藥抑制TGF-β1刺激HSC-T6細胞表現α-SMA蛋白之效應

DMSO (0.1%)	+	+	+	+
TGF-β1 (1ng/ml)	-	+	+	+
Sm crude extract (μg/ml)	-	-	2.5	5
LC EtOH extract (μg/ml)	-	-	2.5	5
RP EtOH extract (μg/ml)	-	-	1.25	2.5

* p<0.05 TGF-β1組 vs. DMSO組

p<0.05 TGF-β1組+中藥組 vs. TGF-β1組

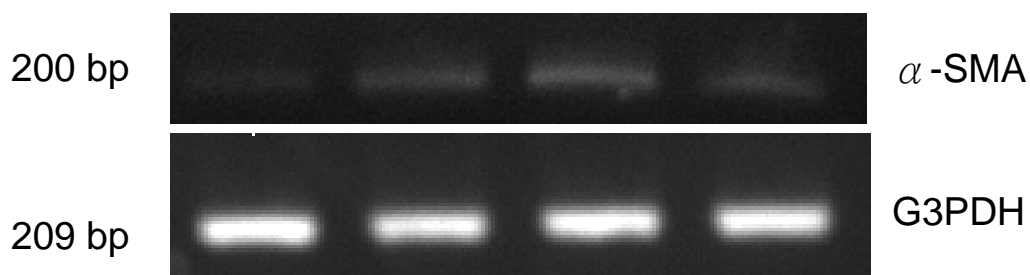


圖2 複方中藥對抑制TGF-β1刺激HSC-T6細胞分泌α-smooth muscle α-smooth muscle actin (α-SMA)基因產物量效應

DMSO (0.1%) 6H	+	+	+	+
TGF-β1 (1ng/ml) 6H	-	+	+	+
Sm crude extract (μg/ml) 6H	-	-	2.5	5
LC EtOH extract (μg/ml) 6H	-	-	2.5	5
RP EtOH extract (μg/ml) 6H	-	-	1.25	2.5

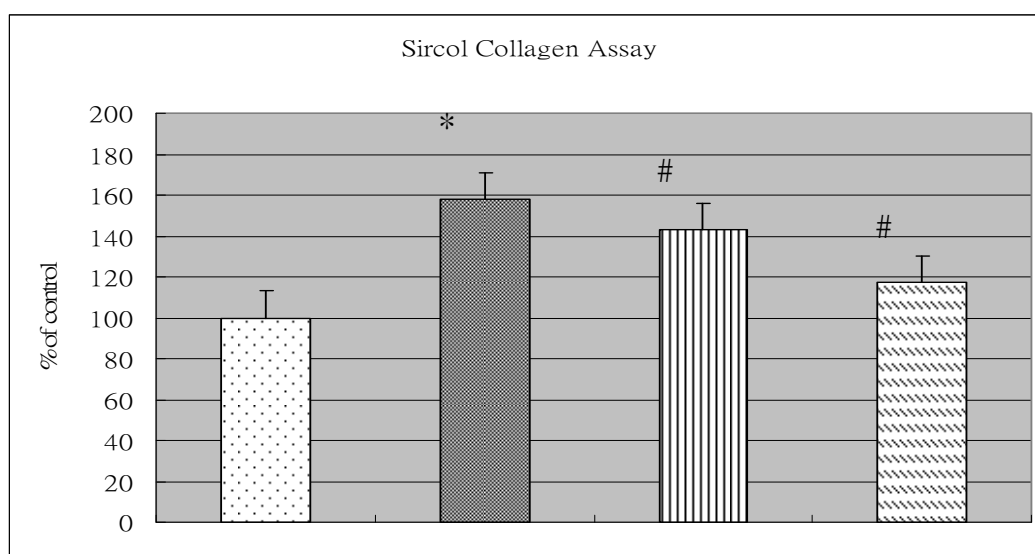


圖3 複方中藥抑制TGF-β1刺激HSC-T6細胞分泌膠原蛋白之效應

DMSO (0.1%)	+	+	+	+
TGF-β1 (1 ng/ml)	-	+	+	+
Sm crude extract (μg/ml)	-	-	2.5	5
LC EtOH extract (μg/ml)	-	-	2.5	5
RP EtOH extract (μg/ml)	-	-	1.25	2.5

* p < 0.05 TGF-β1組 vs. DMSO組

p < 0.05 TGF-β1組 + 中藥組 vs. TGF-β1組

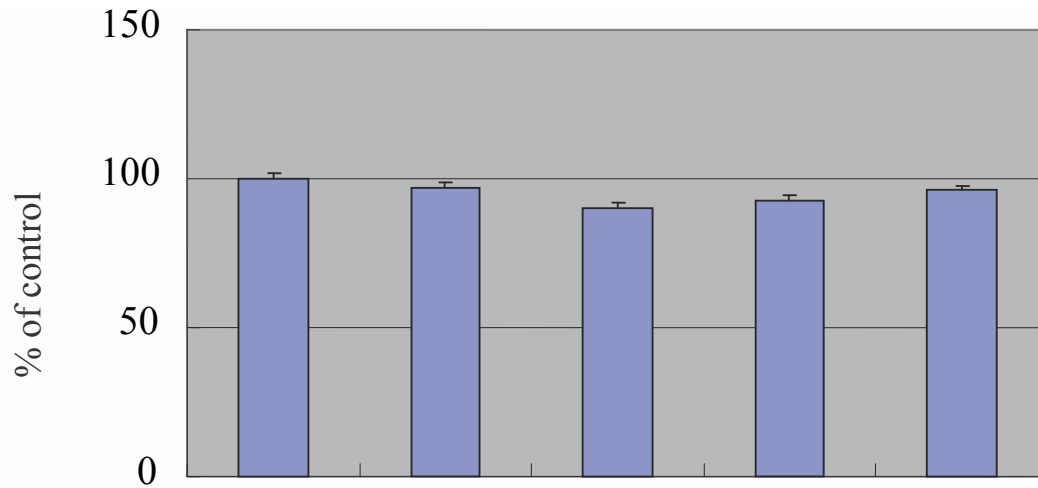


圖4 以MTT assay測試複方中藥對HSC-T6細胞毒性結果

DMSO (0.1%)	+	+	+	+	+
Sm crude extract (µg/ml)	-	1	2	2.5	5
LC EtOH extract (µg/ml)	-	1	2	2.5	5
RP EtOH extract (µg/ml)	-	0.5	1	1.25	2.5

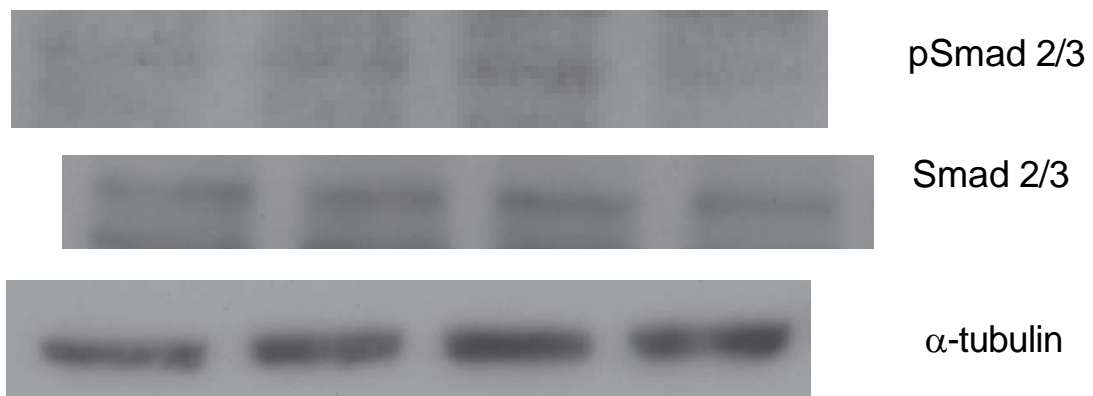


圖5 以西方點墨法分析複方中藥對TGF- β 1引起Smad2/3蛋白質磷酸化影響結果

DMSO (0.1%)	+	+	+	+
TGF- β 1 (1 ng/ml)	-	+	+	+
Sm crude extract (µg/ml)	-	-	2.5	5
LC EtOH extract (µg/ml)	-	-	2.5	5
RP EtOH extract (µg/ml)	-	-	1.25	2.5

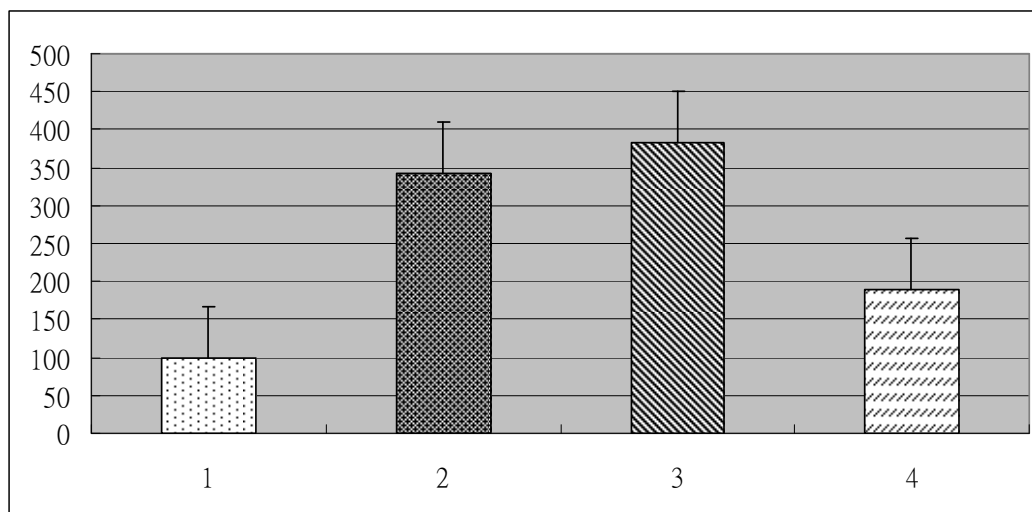


圖6 以西方點墨法分析複方中藥對TGF-β1引起Smad2/3蛋白質磷酸化影響結果

DMSO (0.1%)	+	+	+	+
TGF-β1 (1 ng/ml)	-	+	+	+
Sm crude extract (μg/ml)	-	-	2.5	5
LC EtOH extract (μg/ml)	-	-	2.5	5
RP EtOH extract (μg/ml)	-	-	.25	2.5

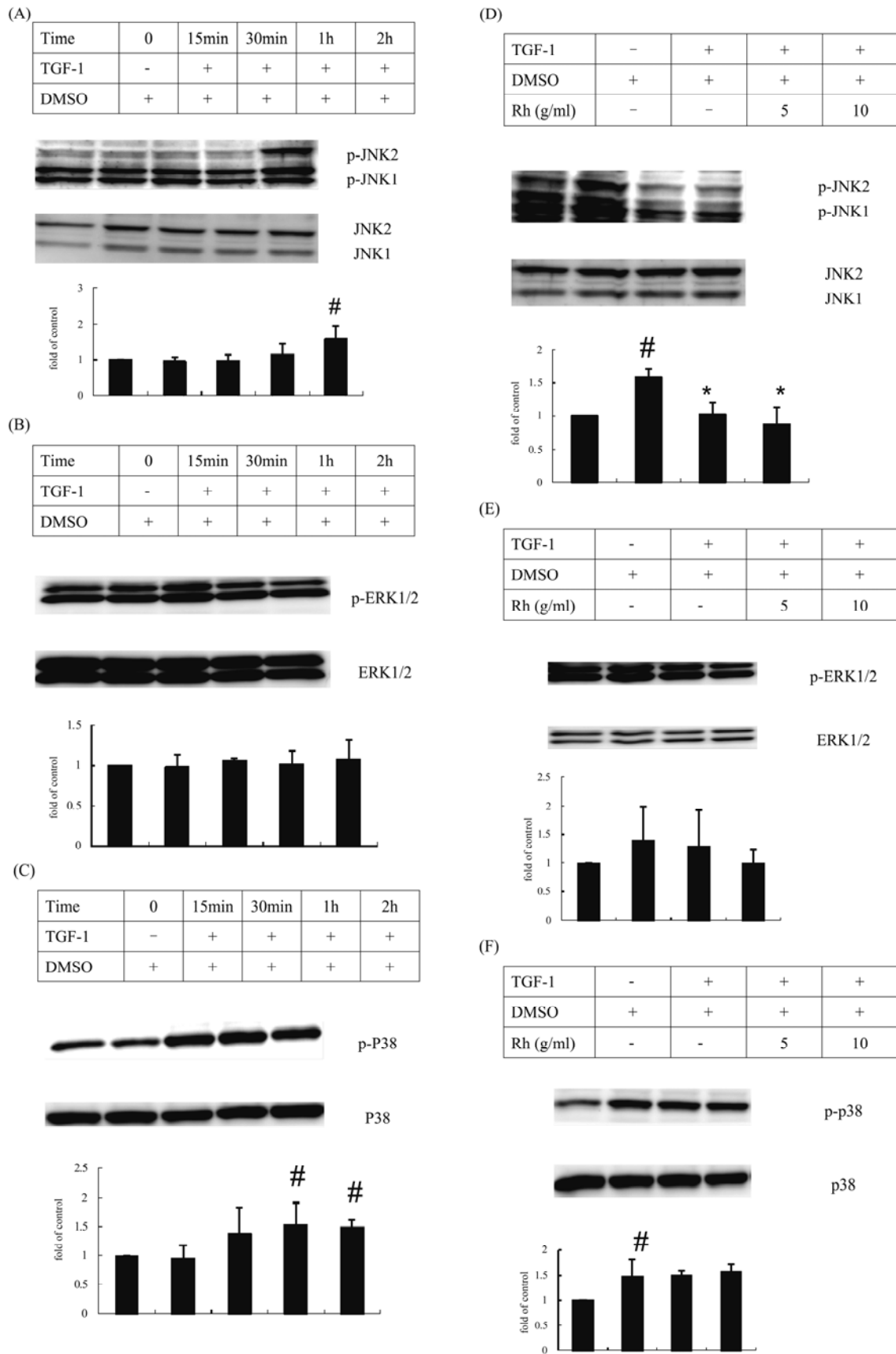
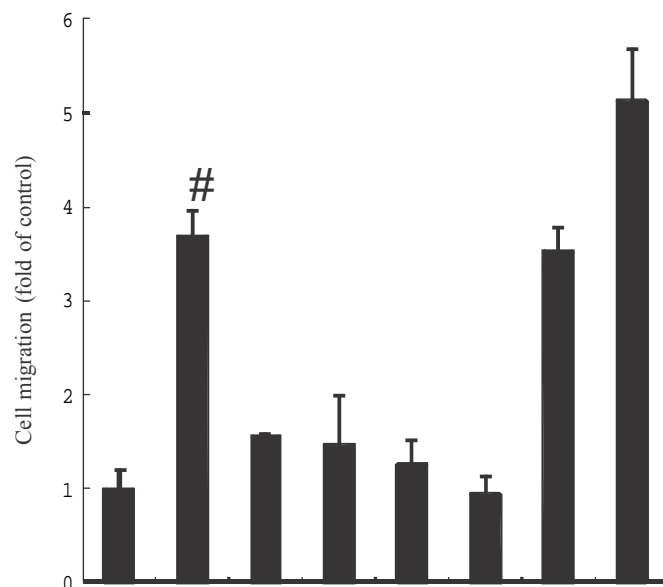
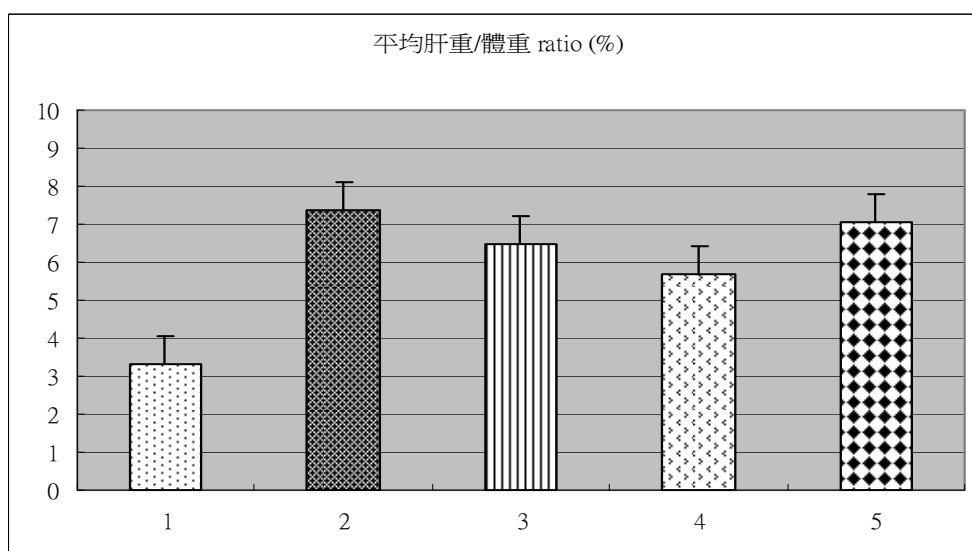


圖 7 (A)-(F) 大黃萃取物抑制HSC-T6細胞受TGF- β 1刺激下MAPK磷酸化效應。



TGF-β1 (1 ng/ml)	-	+	+	+	+	+	+	+
DMSO	+	+	+	+	+	+	+	+
Dexamethasone (1 μM)	-	-	+	-	-	-	-	-
Rh (μg/ml)	-	-	-	5	10	25	-	-
Emodin (μM)	-	-	-	-	-	-	10	20

圖8 大黃萃取物5-25 μg/ml抑制HSC-T6細胞受TGF-β1刺激移行的濃度劑量效應，以西藥dexamethasone為正對照組。大黃成份emodin未有抑制效應。



Sham	BDL	BDL + SLR (2:2:1 50mg/kg)	BDL + Silymarin 50mg/kg	BDL + RP 10mg/kg
------	-----	------------------------------	----------------------------	---------------------

圖9 不同藥物處理對大鼠平均肝重/體重比例的影響

Data are expressed as mean ± SEM.

* p < 0.05 BDL組 vs. sham組

p < 0.05 BDL組 + 給藥組 vs. BDL組

◆ p < 0.05 SLR(2:2:1 50 mg/kg) + BDL組 vs RP(10 mg/kg) + BDL組

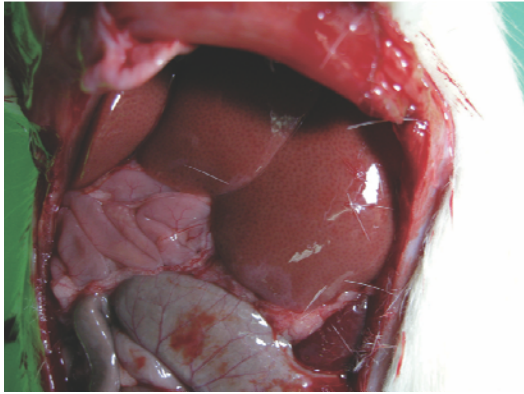


圖10 Sham組肝臟外觀

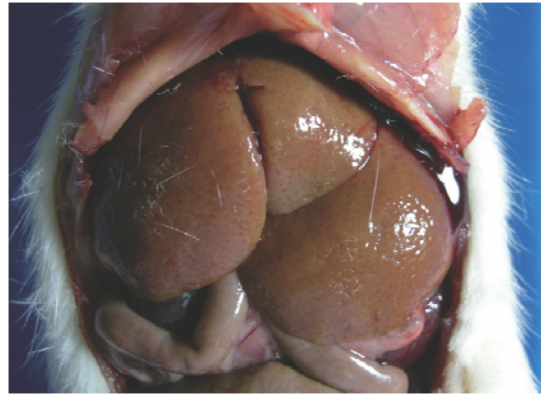


圖11 SLR 2:2:1 50 mg/kg+BDL組肝臟外觀

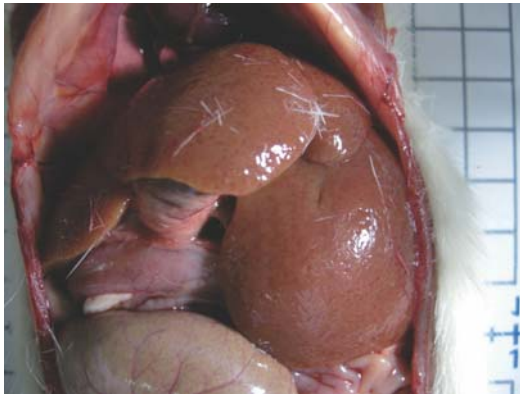


圖12 BDL組肝臟外觀

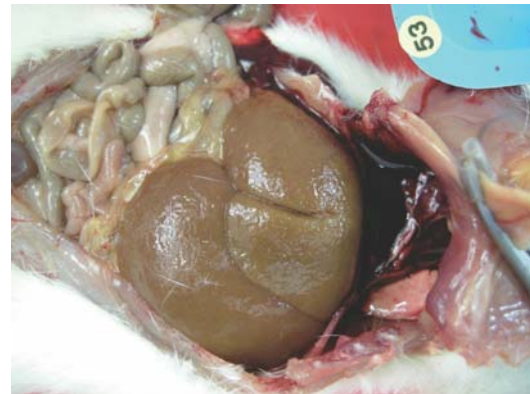


圖13 Silymarin 50 mg/kg +BDL組肝臟外觀

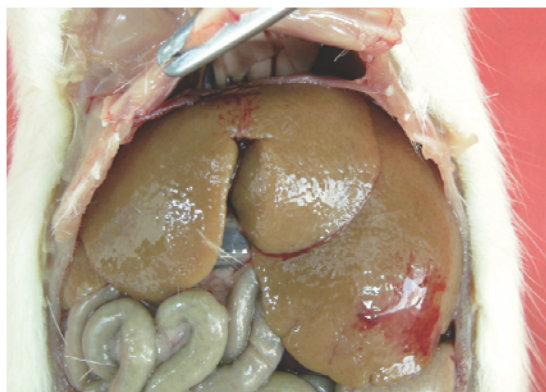


圖14 大黃EtOH層萃取10 mg/kg +BDL組肝臟外觀

