

編號：CCMP93-CT-104

# 肝纖維化動物模式研究傳統中醫方劑於保肝 與抗肝纖維化之作用機制研究和療效評估

邱雲棕

台中榮民總醫院教學研究部

## 摘要

本研究擬以四氯化碳誘導大鼠肝纖維化動物模式，探討中醫傳統方劑—柴胡疏肝散變方抗肝纖維化之作用療效。實驗共分為正常對照組、四氯化碳組、低劑量中藥組（1.26 g/kg）及高劑量中藥組（6.30 g/kg），除正常對照組外其他組每週管餵兩次四氯化碳（50% 1ml/kg）連續八週，中藥組同時管餵柴胡疏肝散變方以及四氯化碳組管餵等量一次水每週五次。評估指標包括—肝功能試驗相關之血液生化值（AST、ALT）檢測，組織病理病變評分，肝臟總膠原蛋白含量之定量分析， $\alpha$ -smooth muscle actin 免疫組織化學染色法進行活化態肝臟星狀細胞數量分析，西方氏墨點偵測法（western blot）分析  $\alpha$ -smooth muscle actin 之蛋白表現量，並以蛋白酵素電泳法（zymography）分析基質金屬蛋白酶（matrix metalloproteinases; MMPs）之表現量，及 RT-PCR 檢測 TGF- $\beta$  1 and procollagen I mRNA 之表現。實驗結果發現餵食高劑量中藥組之 AST、ALT（ $132 \pm 38$  U/L;  $90 \pm 26$  U/L）顯著較四氯化碳組（ $240 \pm 130$  U/L;  $142 \pm 32$  U/L）降低（ $p < 0.05$ ），組織病變評分，肝纖維化程度中藥組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：高劑量中藥組（ $22.5 \pm 1.5 \mu$  g/mg）肝臟中總膠原蛋白含量明顯低於（ $p < 0.05$ ）四氯化碳組（ $24.1 \pm 1.0 \mu$  g/mg），活化態肝臟星狀細胞數量之表現：高劑量中藥組明顯少於四氯化碳組（ $p < 0.01$ ），在 western blot 分析結果：高劑量中藥組之  $\alpha$ -smooth muscle actin 之蛋白表現量明顯低於四氯化碳組（ $p < 0.001$ ），然而低劑量中藥組有幾項評估指標，雖無統計上明顯差異但亦有改善之趨勢，Zymography 分析結果，高劑量中藥組之 proMMP-2 與 activeMMP-2 表現量明顯低於四氯化碳組（ $p < 0.05$ ），

RT-PCR 分析結果高劑量中藥組之 TGF- $\beta$  1 and procollagen I mRNA 之表現明顯低於四氯化碳組 ( $p < 0.05$ )，而低劑量中藥組之 procollagen I mRNA 之表現明顯低於四氯化碳組 ( $p < 0.05$ )。因此從以上結果證實；柴胡疏肝散變方可抑制肝組織中膠原蛋白之合成，以達改善肝纖維化病變程度之療效，其作用機轉推測可能為抑制肝臟中活化態星狀細胞之增生及活化與 TGF- $\beta$  1 之表現，而導致 MMP-2 之表現量降低，膠原蛋白之合成減少以改善纖維化之病變程度。

關鍵詞：肝纖維化、中醫傳統方劑、肝臟星狀細胞、動物模式

Number : CCMP93-CT-104

# **Study mechanism and effect of hepato- protection and anti-fibrosis in traditional Chinese herbal medicinel in hepato- fibrotic animal model**

Yung-Tsung Chiu

Department of Education and Research, Taichung Veterans General Hospital

## **ABSTRACT**

The purpose of this study was to investigate the antifibrotic effects of modified Chai-Hu-Shu-Gan (CHSG) powder, comprised of Chinese herbs, on chemical-induced liver fibrosis in adult Sprague-Dawley rats. Liver fibrosis was induced by carbon tetrachloride (50%, 1.0 ml/kg, by gavage) twice a week for 8 weeks. Carbon tetrachloride-induced rats were randomly assigned to three groups: saline, low dose CHSG (1.26 g/kg) and high dose CHSG (6.30 g/kg), each given by gavage 5 times a week for 8 weeks starting from the onset of carbon tetrachloride administration. Therapeutic effects were assessed by serum enzyme activities (AST and ALT), histopathological score of liver fibrosis, determination of liver collagen content and immunostaining against smooth muscle cell  $\alpha$ -actin to count the number of stellate cells. The content of  $\alpha$ -smooth muscle actin was assayed by western blot, the expression of TGF- $\beta$  1 and procollagen I mRNA were assayed by RT-PCR and the expression of gelatinases (MMP-2, MMP-9) were assayed by zymography. Treatment with CHSG (6.30 g/kg) more significantly decreased ( $p < 0.05$ ) the content of AST and ALT ( $132 \pm 38$  U/L;  $90 \pm 26$  U/L) than carbon tetrachloride-induced rats receiving saline ( $240 \pm 130$  U/L;  $142 \pm 32$  U/L). Liver collagen accumulation was also markedly reduced ( $p < 0.05$ ) by CHSG (6.30 g/kg) treatment. Histopathological

examination revealed that the CHSG (6.30 g/kg) treatment significantly reduced the degree of liver fibrosis. In addition, we found that the numbers of  $\alpha$ -smooth muscle actin positive stellate cells and the content of  $\alpha$ -smooth muscle actin were markedly reduced ( $p < 0.001$ ) by CHSG (6.30 g/kg) treatment, the expression of TGF- $\beta$  1 and procollagen I mRNA was markedly reduced ( $p < 0.05$ ) by CHSG (6.30 g/kg) treatment, the expression of MMP-2 was markedly reduced ( $p < 0.05$ ) by CHSG (6.30 g/kg) treatment. These results show that modified Chai-Hu-Shu-Gan powder has anti-fibrotic effects on a carbon tetrachloride-induced liver fibrosis rat model. Therefore, anti-fibrotic mechanisms might inhibit stellate cell proliferation and activation.

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

## 壹、前言

肝硬化及慢性肝臟疾病久居十大死因之第六、七位，為國內罹患率極高之重要疾病<sup>1</sup>。慢性肝病病程發展之最後結果為不可逆之肝硬化，肝臟纖維化為慢性肝病中一常見且重要之病徵<sup>2</sup>，導因於肝臟中細胞外基質過度沉澱所致之一種慢性不可回復的肝臟病變，因此在肝硬化的防治上，抑制肝纖維化發生為首要工作。

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，在研究抗纖維化治療策略尚可歸納以下數點（1）抗氧化的功效，（2）抗炎症反應，（3）細胞激素（cytokine）的阻斷，（4）抑制膠原纖維的合成，（5）促使肝臟星狀細胞加速凋亡<sup>3,4</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>3,5-8</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>9,10</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>11</sup>、抗轉型生長因子（anti-transforming factor  $\beta 1$ ；anti-TGF- $\beta 1$ ）之抗體<sup>12</sup>、肝細胞生長因子（hepatocyte growth factor; HGF）<sup>13</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；如 Han-Dan-Gan-Le<sup>14</sup>、小柴胡湯（Sho-saiko-to）<sup>15, 16</sup>與丹參（*Salvia miltiorrhiza*）<sup>17, 18</sup>等。可是尚無法證實真正有效之治療方法，雖然傳統中醫藥在對肝病之臨床治療上已有悠久之歷史，但對於中醫藥成分療效之探討缺乏科學化數據佐證，加上作用機轉不明使得藥物使用安全性受到顧慮，因此在應用上無法受到國際醫學界之認同<sup>19, 20</sup>。但長久以來中醫之臨床用藥經驗也確實具療效，所以近年來對於中醫藥療效評估及作用機轉研究，無論在國內外皆日趨獲得重視。

根據明朝<景岳全書>中記載柴胡疏肝散之成分為「柴胡、陳皮各二錢、川芎、香附、枳殼、芍藥各一錢半加炙甘草一錢」，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，其中柴胡皂甘（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 A2 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>21, 22</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>23, 24</sup>與酒精性脂肪肝<sup>25</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>26</sup>。本研究之目的在於以大鼠肝纖維化模式證實中醫傳統複方—柴胡疏肝散變方對於抗肝纖維化之療效，並進一步期望提供此技術平台作為中醫藥發展以及中西醫整合研究之參考。

## 貳、材料與方法

### 一、柴胡疏肝散變方的製備

#### (一) 組成：

本實驗之柴胡疏肝散變方組成包含：柴胡 4 公克、枳殼 2 公克、香附 4 公克、川芎 2 公克、陳皮 2 公克、白芍 3 公克、甘草 2 公克、藏紅花 1 公克、桃仁 4 公克、丹參 4 公克。本研究所使用的藥材係一次購得，並經中國醫藥大學中國藥學研究所邱年永老師鑑定無誤後，委由勝昌製藥公司萃取製備。

#### (二) 製備方法：

將各組成生藥材依比率稱取 3000 公克，以 50°C 蒸餾水浸泡抽取 4~5 次，每次約四小時，合併抽取液，再以冷凍乾燥法冷凍乾燥，即得到本方之萃取物供本研究用。

#### (三) 劑量配置：

本實驗中慢性給予柴胡疏肝散變方可以分為兩種劑量：

劑量計算方法如下<sup>27</sup>：臨床使用量為：14 g/人/天、實驗使用量為臨床使用量之 1 倍、實驗使用量為： $14 \times 0.018 \times 5 \times 1 = 1.26 \text{ g/kg}$ 。故低劑量為每公斤大白鼠給予 1.26 克中藥量，高劑量為 5 倍每公斤大白鼠給予 6.30 克中藥量。

### 二、實驗動物飼養

由財團法人國家實驗動物中心購之 6 週齡雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠，經台中榮總實驗動物管理小組審核通過後餵養於動物中心，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。

### 三、實驗分組

將實驗動物分為四組，正常對照組（未經四氯化碳處理）實驗動物隻數為 6 隻，其餘各組皆經四氯化碳處理分為：四氯化碳組（只投予四氯化碳之處理）及柴胡疏肝散變方低、高劑量之實驗組，實驗動物隻數皆為 12 隻。

### 四、四氯化碳誘導方式

每週管餵兩次 50% 四氯化碳（olive oil 稀釋）進行肝纖維化誘導，實驗進行共計 8 週。每 100 克大白鼠給予 0.2 毫升 50% 四氯化碳（1 ml/kg）。每週兩次給予四氯化碳，每週五次管餵給予試驗樣品，正常對照組與四氯化碳組則給予一次水作為安慰劑。

### 五、實驗設計

實驗過程中每日觀察實驗動物之身體變化及臨床症狀，於四氯化碳誘導後第 3 及第 6 週後採尾動脈血液，8 週誘導結束後以二氧化碳將動物犧牲。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 $-80^{\circ}\text{C}$ 。

### 六、血液生化值檢測

血液樣品室溫下放置一小時後，冷凍離心機於 $4^{\circ}\text{C}$ 下，每分鐘 4700 rpm 離心 20 分鐘以分離出血清。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。

### 七、肝臟組織病理學觀察

肝臟經福馬林固定石蠟包埋以 H&E 及 Sirius red 染色後，觀察肝臟之變性及纖維化程度。肝細胞變性程度觀察以經 H&E 染色之肝臟切片作評分，評分標準係參考 Ruwart 等之方法<sup>28</sup>：+為局部產生；++為散發局部產生（multifocal）；+++為局部區域性（locally extensive）；++++為瀰漫性（diffuse）。纖維化程度觀察以經 Sirius Red 特殊染色之肝臟切片作評分，評分標準係參考 Jonker 等的評分標準，將不同程度之肝臟纖維化病變分成 0~4 分<sup>29</sup>：+ 為門脈區之纖維母細

胞增生，但還未長進至肝小葉；++為門脈區之纖維母細胞增生，並長進至肝小葉，但彼此間未連接在一起；+++為門脈區之纖維母細胞增生，也長進至肝小葉，且彼此間連接在一起，++++為門脈區之纖維母細胞增生至肝小葉連接在一起，形成明顯偽小葉且膽管增生。

## 八、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>30</sup> 與 Chiu<sup>31</sup> 等人之方法，並於實驗組各組逢機採樣 7 隻，測定部位固定於中間葉進行測定。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 540 nm 及 605 nm 之波長，將所得之值進行換算，換算公式如下：

- Collagen (ug) = [ OD<sub>540</sub> 值 - (OD<sub>605</sub> 值  $\times$  0.291) ]  $\times$  1000/38.4
- Noncollagenous protein (mg) = OD<sub>605</sub> 值/2.08
- Total collagen protein (ug/mg)  
= Collagen (ug)/Collagen (mg) + Noncollagenous protein (mg)

## 九、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，先以 mouse IgG 作用後再加入  $\alpha$ -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) 下以數位式相機隨機選取拍攝 15 個 200 倍視野下組織切片做影像之截取，以 Image Pro-Plus 影像分析軟體計算活化態星狀細胞之數目並累計總數。



## 十、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  $\alpha$ -smooth muscle actin 蛋白之相對表現量。

步驟簡述如下：取 0.1 克冷凍肝臟組織於 1 毫升之 NP-40 lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM 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，離心完成後即可進行蛋白濃度之檢測。利用 Beckman RU-640 Spectrophotometer 進行蛋白質定量，並以小牛血清蛋白 (bovine serum albumin) 作標準曲線進行濃度校正。蛋白質定量後，取 50 $\mu$ g 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，與一級抗體 mouse anti- $\alpha$ -actin (Santa Cruz Biotechnology, Inc. U.S.) 於室溫下反應一小時，以 TBS-T 清洗，再與二級抗體 goat anti-mouse IgG conjugated with horseradish peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, Inc. U.S.) 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 100 mM Glycine 將膜上抗體及顯色液洗去，之後重複上述步驟，一級抗體改以 mouse anti- $\alpha$ -tubulin (Santa Cruz Biotechnology, Inc. U.S.) 作為對照比較 (internal control)。利用電泳影像分析軟體 (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 =  $\alpha$ -smooth muscle actin intensity /  $\alpha$ -tubulin intensity) 評估蛋白表現量。

## 十一、TGF- $\beta$ 1 and procollagen I mRNA 表現檢驗

本研究中採用半定量的反轉錄—聚合連鎖反應 (RT-PCR)，輔以電泳影像分析軟體 (Gel-pro Analyzer) 來分析 mRNA 的表現量。

將肝臟組織自大鼠取下後，直接放入液態氮中保存，以備進行實驗。首先，利用 Tri reagent 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 260 nm 及 280 nm 來測量 Total RNA 的質與量；利用 DNA 分解 (Dnase) 來分解組織中的 DNA，以確保 RNA 的品質。取 0.5 g Total RNA 以 M-MLV 反轉錄來進行反轉錄反應 (reverse transcription)，反應條件為 37°C、60 分鐘，65°C、10 分鐘，4°C 保存。並以經反轉錄反應後之產物 (complementary DNA, cDNA) 及轉型生長因子第一型 (TGF- $\beta$  1) 及原膠原蛋白第一型 (procollagen

type I) 具有專一性的引子 (primer): (TGF-1 forward primer: 5'-TAT AGC AAC AAT TCC TGG CG-3', reverse primer: 5'-TGC TGT CAC AGG AGC AGTG-3'; MMP-2 forward primer: 5' GCT GAT ACT GAC ACT GGT ACT G 3' , reverse primer: 5' CAA TCT TTT CTG GGA GCT C 3'; procollagen I forward primer: 5'-TAC TAC CGG GCC GAT GAT GC-3', reverse primer: 5'-TCC TTG GGG TTC GGG CTG ATG TA-3') 進行 PCR 反應, 反應條件為 94°C、5 分鐘, 94°C、30 秒, 58°C、30 秒, 72°C、30 秒, 72°C、7 分鐘, 4°C 保存。所有基因的表現量皆與 G3PDH 此一 Housekeeping 基因進行調整 (normalization), 所有經由 PCR 反應的基因產物皆經由定序分析進行確認。進行 PCR 反應後, 隨即以 2% 的 Agarose Gel 進行電泳分析, 並以電泳影像分析軟體 (Gel-pro Analyzer) 進行影像分析。

## 十二、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 12,000 rpm 離心 10 分鐘, 取上清液後同樣以 12,000 rpm 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 20 $\mu$ g 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, 倒去褪色液加入 50ml 縮膠液, 縮膠 60 分鐘, 最後將膠平放在兩玻璃紙之間, 待乾後即可裁切保存, 進行影像之量化分析。

## 十三、統計分析

上述實驗所得到之實驗數據, 採用 Sigma plot 電腦統計套裝軟體中之變異數分析 (analysis of variance, 簡稱 ANOVA) 配合 t-test 進行統計分析; 組織病理病變判讀評分分析採用 SPSS 電腦統計套裝軟體中之無母數分析 (nonparametric test) 之 Mannan-Whitney test 進行, 以客觀分析各組實驗數據間是否達到顯著性差異 ( $p < 0.05$ )。

## 參、結果

### 一、血液生化值檢測

於四氯化碳誘導三、六及八週後進行血液生化值 AST 與 ALT 檢測，結果顯示：四氯化碳誘導至三週中藥組與四氯化碳組之 AST 及 ALT 比較無顯著差異 ( $p > 0.05$ )，但與正常組比較均有差異 ( $p < 0.001$ )。於四氯化碳誘導至六週，高劑量中藥組之 AST 及 ALT ( $299 \pm 151$  U/L;  $157 \pm 32$  U/L) 較四氯化碳組 ( $476 \pm 195$  U/L;  $242 \pm 90$  U/L) 相比有顯著降低之情形 ( $p < 0.05$ )。於四氯化碳誘導八週後，高劑量中藥組之 AST 與 ALT ( $132 \pm 38$  U/L;  $90 \pm 26$  U/L) 較四氯化碳組 ( $240 \pm 130$  U/L;  $142 \pm 32$  U/L) 亦有顯著降低 ( $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$ )；低劑量中藥組 AST 與 ALT ( $165 \pm 38$  U/L;  $110 \pm 25$  U/L) 與四氯化碳組比較，AST 有顯著降低之情形 ( $p < 0.05$ )，但 ALT 數值雖有下降趨勢但無統計上差異 (表一、二)。

### 二、肉眼病變

實驗各組於六週後陸續發生死亡，動物死亡情形分別為：四氯化碳組 4 隻、低劑量中藥組 3 隻、高劑量中藥組 1 隻，死亡原因為過度虛弱不堪 CCl<sub>4</sub> 的毒力以及管餵後嘔吐導致吸入性肺炎，而正常對照組無死亡之情形。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，正常對照組肝臟色澤紅潤，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、腫大且觸感間實，但四氯化碳組肝臟表面較粗糙可見結節狀之突起，但中藥組相較之下無此病變 (圖一)。各組臟器/體重比之結果；以四氯化碳處理之各組肝臟、脾臟及腎臟重量/體重之比值皆有顯著高於正常對照組之情形 ( $p < 0.001$ ;  $p < 0.05$ ;  $p < 0.05$ )，而四氯化碳組與中藥組間臟器/體重比之比較，隨著給予中藥劑量之加高有降低之趨勢，其中高劑量中藥組之肝臟/體重比值 ( $3.97 \pm 0.55$  %) 及腎臟重量/體重比值 ( $0.85 \pm 0.03$  %) 與四氯化碳組比較 ( $4.79 \pm 0.77$  %;  $0.99 \pm 0.18$  %)，可見顯著降低之情形 ( $p < 0.01$ ;  $p < 0.05$ ) (表三)。

### 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，結果顯示正常對照組無任何病變，四氯化碳對照組與中藥組可見局部至廣泛之肝細胞空泡樣變性 (圖二)，於肝門脈區可見纖維母細胞增生與大量膠原蛋白沉澱，甚有膠原蛋白沉澱延伸至中央靜脈形成偽小葉之病變 (圖三)。肝細胞變性程度觀察以經 H&E 染色之肝臟切片進行判讀，評分結果顯示高、低劑量中藥組均較四氯化碳組有顯

著減輕變性之情形 ( $p < 0.001$ ;  $p < 0.01$ )，其中又以高劑量中藥組較為明顯。肝纖維化程度觀察以經 Sirius red 特殊染色之肝臟切片進行判讀，評分結果顯示高、低劑量中藥組均較四氯化碳組輕微 ( $p < 0.01$ ;  $p < 0.05$ )，且以高劑量中藥組差異較大 (表四)。

#### 四、肝臟膠原蛋白含量之定量分析

於四氯化碳誘導八週後，比較大鼠肝臟膠原蛋白之含量，結果顯示高劑量中藥組 ( $22.5 \pm 1.5 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) 肝臟膠原蛋白含量較四氯化碳組 ( $24.1 \pm 1.0 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) 顯著降低 ( $p < 0.05$ )；低劑量中藥組 ( $22.8 \pm 2.0 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) 與四氯化碳組比較有降低之趨勢但無統計上之差異 (表五)。

#### 五、活化態肝臟星狀細胞量化分析

經免疫組織化學染色標定活化態肝臟星狀細胞，於正常對照組僅見相當少量，四氯化碳組與中藥組於門脈區至整個肝小葉之肝索間竇狀隙明顯可見不同量活化態星狀細胞存在 (圖四)。以影像分析系統 (Image analysis) 進行活化態星狀細胞量化分析，高劑量中藥組活化態肝臟星狀細胞之數目較四氯化碳組顯著減少 ( $p < 0.01$ )，而低劑量中藥組與四氯化碳組比較有減少之趨勢但無統計上之差異 (表六)。

#### 六、 $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) 蛋白表現分析

以西方氏墨點偵測法 (western blot) 測量肝臟  $\alpha$ -SMA 蛋白表現之結果，低劑量中藥組、高劑量中藥組與四氯化碳組比較，降低之幅度分別為 8.0 %、58.3%，然而高劑量中藥組  $\alpha$ -SMA 蛋白表現量較四氯化碳組差異極顯著 ( $p < 0.001$ ) (圖五)。

#### 七、TGF- $\beta$ 1 and procollagen I mRNA 表現分析

以反轉錄-聚合連鎖反應 (RT-PCR)，輔以電泳影像分析軟體 (Gel-pro Analyzer) 來分析 TGF- $\beta$  1 and procollagen I mRNA 的表現量。經影像分析後，肝臟 TGF- $\beta$  1 表現量之分析結果，高劑量中藥組 TGF- $\beta$  1 之表現量較四氯化碳組明顯減弱 ( $p < 0.05$ )，而低劑量中藥組較四氯化碳組有減弱之趨勢但無統計上之差異。肝臟 procollagen I 之表現分析結果，低劑量與高劑量中藥組較四氯化碳對照組明顯減弱 ( $p < 0.05$ ) (圖六)。

## 八、基質金屬蛋白酶表現分析

以明膠蛋白酶電泳法 (gelatin-zymography) 分析肝臟中基質金屬蛋白酶之表現，結果於膠片可見 MMP-9 (92kDa)、proMMP-2 (72kDa) 與 active MMP-2 (64kDa) 之條帶出現，MMP-9 之條帶較 proMMP-2 與 active MMP-2 微弱。經影像分析後，MMP-9 之表現於各組均無顯著差異 ( $p>0.05$ ，數據未列出)；肝臟 proMMP-2 表現量之分析結果，高劑量中藥組 proMMP-2 之表現量較四氯化碳組明顯減弱 ( $p<0.05$ )，而低劑量中藥組較四氯化碳組有減弱之趨勢但無統計上之差異，各組 proMMP-2 之表現量皆較正常對照組顯著增加 ( $p<0.01$ )，依四氯化碳組、低劑量中藥組、高劑量中藥組之順序與正常對照組比較，增加之幅度依序為 2.9 倍、2.7 倍、2.3 倍。肝臟 active MMP-2 之表現分析結果，高劑量中藥組 active MMP-2 之表現量較四氯化碳對照組明顯減弱 ( $p<0.01$ )，中藥低劑量組較四氯化碳組有減弱之趨勢但無統計上之差異，而各組 MMP-2 之表現量均較正常對照組顯著增加 ( $p<0.001$ )，依四氯化碳組、低劑量中藥組、高劑量中藥組之順序與正常對照組比較，增加之幅度依序為 37.5 倍、30.4 倍、22.0 倍 (圖七)。

## 肆、討論

依中醫理論肝纖維化肝硬化應歸於「脅痛」、「癥瘕」、「水臌」等範疇。其病因多為：濕熱餘邪未盡、酒食不節、虫毒感染、勞倦內傷、七情不和等<sup>32</sup>。本病的病機關鍵是：肝血瘀滯、肝絡瘀阻。所以本病的基本治法為：活血化瘀消癥軟堅<sup>32,33</sup>。中醫認為肝主疏泄，性喜條達，惡抑鬱，主藏血，司筋骨關節，開竅於目，乃體陰而用陽。肝疏泄正常則氣機疏暢，血行通力，五臟六腑，四肢百骸因而得其溫煦、濡養而發揮正常功能；但外感內傷均能引起肝失疏泄，肝不藏血而肝經失養，肝絡瘀阻，隧道不通而見脅痛、癥瘕、臌脹等。常見的病因病機：濕熱餘邪未盡或酒食不節，釀生濕熱，致濕熱蘊結肝膽，氣機不暢，血行瘀滯而脅痛。七情不和，肝氣鬱結，致血瘀脈絡，日久成積，變生癥瘕、積聚。勞倦內傷，虫毒感染，損傷肝脾，肝脾血瘀，隧道不通，水氣內聚，致氣滯血瘀水停之水臌。久病損及脾腎，脾腎陽虛，溫煦推動無力，血行不暢，致陽虛氣弱血瘀之水臌。病久損及下焦肝腎，肝腎陰虛，血行不暢，津液不能隨之而輸布，反停聚中焦，泛濫中焦，致陰虛血瘀水結之水臌。總之，肝硬化可歸納為本實表虛證。本實者乃氣滯、血瘀、濕阻、熱蘊；表虛者乃是由實致虛，其中包括心脾氣虛、脾腎陽虛、肝腎陰虛等。瘀血的程度與肝硬化纖維化程度相平行。《血證論》說：「瘀血不行，則新血斷無生理」，就是說瘀血所導致的氣血陰陽虧虛之征。肝纖維化的主要病理基礎是：肝血瘀阻，而心脾氣虛，脾腎陽虛，肝腎陰虛是肝硬化形成過程中，不同發展階段所表現出來的由實變虛的臨床證型<sup>33,34</sup>。

柴胡疏肝散加活血化瘀藥是用於本型之常用方劑。其主要是以《景岳全書》之柴胡疏肝散加活血化瘀之丹參、紅花來組成。本方能疏肝解瘀<sup>35</sup>、活血化瘀、行氣止痛、軟堅等作用<sup>33,36</sup>。活血化瘀之藏紅花及丹參<sup>36,37</sup>，臨床上對於慢性肝炎肝纖維化肝硬化的治療具有療效。本實驗在於動物誘發肝纖維化分別給予高低不同劑量之柴胡疏肝散變方進行肝纖維化之療效評估，實驗結果顯示，餵食高劑量柴胡疏肝散變方可顯著降低四氯化碳誘導大鼠血清 AST 與 ALT 數值（表一、二），尤其於四氯化碳誘導六週後最明顯，此與中醫臨床病例指出柴胡疏肝散可降低酒精性脂肪肝患者之 AST、ALT 及  $\gamma$ -GT 數值<sup>25</sup>，及肝硬化患者之 ALT 及  $\gamma$ -GT 數值<sup>26</sup>相吻合，顯示其對慢性肝臟損傷的確具保護作用，未來可適用於肝病中期之治療。

柴胡疏肝散變方可顯著降低四氯化碳誘導大鼠之肝臟/體重與腎臟/體重比值，且於肉眼病變之觀察結果，柴胡疏肝散變方可改善四氯化碳誘導大鼠之肝臟腫脹程度，臨床上肝硬化患者之肝重變化於患病早期增加後期下降<sup>38</sup>，早期

肝臟重量增加可能與急性炎症所造成之細胞腫脹有關，後期肝臟重量下降之原因可能與肝實質結構破壞與結締組織取代正常肝細胞所致，因此柴胡疏肝散變方可減緩炎症反應所造成之肝臟腫脹，並由組織病變評分得知柴胡疏肝散變方可減輕肝細胞變性與肝纖維化程度，實驗組中以高劑量柴胡疏肝散變方組織病變減輕程度較為明顯，本研究結果與臨床治療病例中，柴胡疏肝散對於治療慢性乙型肝炎<sup>23</sup>及合併膽道感染之病毒性肝炎<sup>24</sup>，具有減輕患者症狀之功效相符，且由動物模式中病理病變得以證實。

於抗肝纖維化之療效上，中醫複方中藥如：小柴胡湯 (Sho-saiko-to)<sup>15, 16</sup>、Han-Dan-Gan-Le<sup>14</sup> 及丹參 (Salvia miltiorrhiza)<sup>17, 18</sup> 等，已證實對於實驗性肝纖維化大鼠之膠原蛋白具降解作用，Han-Dan-Gan-Le 之作用機制可能為提升膠原蛋白之解離以降低第一及第三型膠原蛋白原 (procollagen type I and III) 之合成<sup>14</sup>；小柴胡湯已於動物試驗中證實可降低第一型膠原蛋白之含量及  $\alpha$ -smooth muscle actin 之表現量，且由活體外 (in vitro) 試驗中發現可抑制肝臟星狀細胞活性及第一型膠原蛋白之表現<sup>16</sup>。活化態之肝臟星狀細胞在肝纖維化過程扮演重要角色<sup>38</sup>，可產生大量膠原蛋白而導致肝纖維化之發生。於肝纖維化恢復之機制中，在實驗動物模式中已証實，活化態肝臟星狀細胞發生凋亡 (apoptosis) 以致活化態肝臟星狀細胞之數量減少為導致肝纖維化恢復之之主因<sup>39</sup>，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，膠原蛋白酶 (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<sup>40</sup>。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<sup>41</sup>。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<sup>42</sup>，肝臟之 kupffer cell 也具有分泌 MMP-9 之功能<sup>43</sup>；肝臟 MMP-2 之主要來源為活化態肝臟星狀細胞<sup>44</sup>，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)<sup>45</sup>，對於肝臟星狀細胞之活化作用與氧化性傷害有關。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<sup>45</sup>，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<sup>47</sup>。

本實驗中給予高劑量柴胡疏肝散變方後，肝臟 proMMP-2 與 activeMMP-2 之活性較未給予中藥之大鼠有減弱趨勢，推論 MMP-2 表現量降低，應與 TGF- $\beta$ 1 表現降低與活化態肝臟星狀細胞數量減少導致分泌量下降有關，使得對肝臟正常基質 (type IV collagen) 之降解作用較差，導致肝臟星狀細胞之活化受阻，而 MMP-9 於本實驗中表現並不顯著，表示並沒有嗜中性球、單核球等炎症細胞之反應，且觀察肝臟組織切片同樣也不見大量炎症細胞之浸潤，推測 MMP-9 表現之結果應與本實驗以四氯化碳誘導肝纖維化大鼠所造成之炎症反應並不劇烈有關。

由本研究建立穩定之四氯化碳誘導模擬人類肝纖維化大鼠模式，對於柴胡疏肝散變方療效結果之評估，可提供中醫師臨床治療肝病患者有利的用藥參考依據，甚或作為中西藥合併治療策略研究之良好疾病動物模式，期盼能對於慢性肝病研發出更佳的治疗對策有所助益。

## 伍、結論與建議

本研究成功建立肝纖維化動物模式以及評估中醫藥複方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複方療效和作用機轉，有助解開中醫古方治肝之謎並與西方醫學接軌。但複方的研究再西方醫學尚未能被完全了解及接受，故論文投稿較為成分藥困難，因此建議：政府假如重視中醫藥傳統複方的發展，應給予鼓勵和經費持續補助。

## 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 CCMP93-CT-104 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. Brenner DA, Waterboer T, Chio SK, Lindquist JN, Stefanovic B, Burchard E, Yamauchi M, Gillan A, Rippe RA. New aspects of hepatic fibrosis. *J Hepatol* 2000; 32:32-38.
3. Bissell DM. Chronic liver injury, TGF-beta, and cancer. *Exp Mol Med* 2001; 33:179-190.
4. 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. 2001, 721-738.
5. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275:2247-2250.
6. Iredale JP. Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury. *Semin Liver Dis* 2001; 21:427-436.
7. Schuppan D, Porov Y. Hepatic fibrosis: from bench to bedside. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17:S300-S305.
8. Gebhardt R. Oxidative stress, plant-derived antioxidants and liver fibrosis. *Planta Med* 2000; 68:289-296.
9. 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.
10. 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.
11. Dieperink E, Ho SB, Tetrack 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.

12. 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.
13. 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.
14. 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; 72:1563-1571.
15. 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.
16. 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.
17. Huang Y-T, Lee T-Y, Lin H-C, Chou T-Y, Yang Y-Y, Hong C-Y. Hemodynamic effects of *Salvia miltiorrhiza* on cirrhotic rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2001; 79:566-572.
18. Wasser S, Ho JMS, Ang HK, Tan CEL. *Salvia miltiorrhiza* reduced experimentally-induced hepatic fibrosis in rats. *J Hepatol* 1998; 29:760-771.
19. Schuppan D. Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver: collagens and glycoproteins. *Seminar liver dis* 1990; 10:1-10.
20. Stickel F, Brinkhaus B, Krahmer N, Seitz HK, Hahn EG, Schuppan D. Antifibrotic properties of botanicals in chronic liver disease. *Hepatogastroenterology* 2002; 49:1102-1108.
21. 陳奇，中藥名方藥理與應用，南天書局，台北市，pp. 112-113，1993。
22. 林宗旦、林宗平、林景彬，中藥藥理學，華香園出版社，台北市，1996。
23. 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* 11：

- 9, 1997。
24. 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 10：865-866，1997。
25. 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 17：22-23，2001。
26. 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 31：28-29，2003。
27. 陳奇，中藥藥理研究方法學，人民衛生出版社，北京市，pp.1103，1993。
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 張伯臾，中醫內科學，上海科學技術出版社，上海市，pp. 178-186，1984。
33. 陳可冀，實用血瘀證學，人民衛生出版社，北京市，pp. 357-367，1999。
34. 黃永生，中醫內科教學與臨床，人民衛生出版社，北京市，pp. 215-229，1999。
35. 許濟群、王綿之，方劑學，知音出版社，台北市，pp. 122-123，1997。
36. 李冀、康廣盛，中醫名方臨床新用，人民衛生出版社，北京市，pp. 574-576，2001。
37. 中藥大辭典，商務印書館，北京市，pp. 2723-2724，1979。
38. Chowdhury SA, Taylor R. Insulin sensitivity in experimental cirrhosis. *Mol Cell Biochem* 1989; 89:69-72.

39. Mann DA, Smart DE. Transcription regulation of hepatic stellate cell activation. *Gut* 2002; 50:891-896.
40. Iredale JP, Benyou RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, Arthur MJP. Mechanism of spontaneous resolution of rat fibrosis. *J Clin Invest* 1998; 102:538-549.
41. Corcoran ML, Hewitt RE, Kleiner Jr DE, Stetler-Stevenson WG. MMP-2: expression, activation and inhibition. *Enzyme Protein* 1996; 49:7-19.
42. Kherif S, Lafuma C, Dehaupas M, Lachkar S, Fournier JG, Verdier-Sahuque M, Fardeau M, Alameddine HS. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles. *Dev Biol* 1999; 205:158-170.
43. Knittel T, Dinter C, Kobold D, Neubauer K, Mehde M, Eichhorst S, Ramadori G. Expression and regulation of cell adhesion molecules by hepatic stellate cells (HSC) of rat liver: involvement of HSC in recruitment of inflammatory cells during hepatic tissue repair. *Am J Pathol* 1999; 154:153-167.
44. Arthur MJP. Degradation of matrix proteins in liver fibrosis. *Path Res Pratt* 1994; 190:825-833.
45. Okazaki I, Watanabe T, Hozawa S, Arai M, Maruyama K. Molecular mechanism of the reversibility of hepatic fibrosis : with special reference to the role of matrix metalloproteinase. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:D26-32.
46. 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.
47. Murawaki Y, Yamada S, Ikuta Y, Kawasaki H. Clinical usefulness of serum matrix metalloproteinase-2 concentration in patients with chronic viral liver disease. *J Hepatol* 1999; 30:1090-1098.

[\(6-12 圖表\)--CCMP93-CT-104.doc](#)