

生藥在肝纖維化的分子生物學 作用機轉新研究

高雄醫學大學藥學系副教授 顏銘宏

摘要

肝纖維化(liver fibrosis)是指肝臟內的細胞外基質(extracellular matrix, ECM)過度沉積所形成的一種病態病癥。肝纖維化的發生、發展和轉歸取決於纖維增生(fibrogenesis, 指ECM的合成增加)與纖維分解(fibrolysis, 指ECM的降解過程)的“淨效應”。肝纖維化係肝臟內的ECM過度沉積所形成, 因此在研究抑制肝纖維化生藥的同時, 相對的必須瞭解ECM的形成與降解機制。抑制肝臟發炎、減低HSCs被激活, 是抑制肝纖維化形成及進展的重要機轉。目前認為調控ECM降解的因子有尿激酶型纖溶酶原激活物(urokinase plasminogen activator, uPA)及作用相反的兩大類酵素分子。星狀細胞受到許多生物訊息傳遞因子的調控, 解明這些複雜又互相關連的調控因子, 是生藥治療肝纖維化予以現代化的希望所在。許多研究探討生藥及方劑抑制肝纖維化分子生物學研究新進展。肝纖維化分子生物學機轉逐漸被解明, 生藥的研究進展及研究

成果正在轉化為抗肝纖維化療法新希望, 期望透過分子生物學的研究, 解明生藥在纖維形成及降解的機轉, 則生藥逆轉肝纖維化甚至肝硬化應該指日可待, 臨床上將肝纖維化患者『軟肝』, 將是生藥發揚光大的絕佳時刻。

關鍵字：

生藥、肝纖維化、分子生物機轉研究

一、肝纖維化與細胞外基質(extracellular matrix, ECM)

肝纖維化是指肝臟內的細胞外基質(ECM)過度沉積所形成的一種病態病癥。細胞外基質(ECM)由下列物質所組成：(1)纖維結構蛋白(fibrotic protein)：包含膠原蛋白(collagen), 彈性蛋白(Elastin)、基膜粘連蛋白(laminin; LN), 和纖維糖連蛋白(fibronectin; FB)。其中膠原蛋白為最重要的成分；(2)多糖(polysaccharide)：透明質酸(hyaluronic acid or hyaluronan; HA)；(3)蛋白多糖(proteoglycans)：包含硫酸軟骨素(chondroitin sulfite), 硫

酸角質素(keratan sulfate)，硫酸肝黏醣(heparan sulfate)。

基本上對正常組織的細胞而言，各種細胞及細胞外基質成分受到精密的分子生物傳遞訊息的調控，形成一個相對穩定的微生態系統(ecosystem)，也就是說肝纖維化的發生、發展和轉歸取決於纖維增生與纖維分解的“淨效應”。

二、肝臟星狀細胞與細胞外基質(ECM)的關連¹

肝纖維化係肝臟內的ECM過度沉積所形成，因此在研究抑制肝纖維化生藥的同時，相對的必須瞭解ECM的形成與降解機制。從細胞學的研究中，肝臟星狀細胞(hepatic stellate cell, HSCs)是產生ECM的主要細胞，星狀細胞又稱為伊東細胞(Ito cell)，位於肝臟的血竇(sinusoids)和肝細胞之間的細縫(disse)中，是一種儲存油脂的細胞，在正常情況下，星狀細胞處於靜止不活化期，但當肝臟發炎時，星狀細胞會受到一些生長因子或是發炎性細胞激素(cytokines)的影響而增生ECM(特別是膠原蛋白)。

肝損傷在急性狀態下(急性肝炎)，肝臟纖維增生是機體對於肝實質損傷的一種修復反應，一旦病因去除則過多的ECM會自然的被降解，肝組織內細胞與基質成分恢復正常，因而不產生肝臟纖維化。但慢性肝病所致的持續或反復的肝實質炎症、壞死，可引起纖維結締組織大量增生，而其降解活性相對或絕對不足，因此大量的ECM被沉積下來形成肝纖維化。

因此抑制肝臟發炎、減低HSCs被激活，是抑制肝纖維化形成及進展的重要機轉。

三、細胞外基質(ECM)降解的基因調控機制²

肝組織中ECM的降解是抑制肝纖維化形成的一個重要因素。目前認為調控ECM降解的因子有尿激酶型纖溶酶原激活物(uPA)及作用相反的兩大類酵素分子：基質金屬蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)家族和基質金屬蛋白酶組織抑制劑(tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs)家族。uPA及MMPs都具促進ECM降解、細胞遷移、組織重建之作用，二者在ECM降解中有協同作用，而TIMPs則會和MMPs相互拮抗而抑制MMPs的降解功能。在正常情況下，這些系統能互相調節，共同維持ECM的沉積降解平衡而達成肝細胞微環境的穩定。

MMPs家族是一組含有Ca²⁺ - Zn²⁺離子的蛋白酶類，能特異性降解ECM，迄今為止已發現了至少3大類(間質膠原酶、明膠酶、基質分解素)18個成員。其中MMP-1(間質膠原酶)主要降解ECM的主要膠原成分collagen I & III，是最重要的ECM降解酶之一。TIMPs是一組與MMPs結合的特異性活性因子，目前已發現有4個家族成員，即TIMP-1~4，它們能與MMPs按1:1的比例形成非共價結合物，從而抑制MMPs的降解功能。四種因子中已證實在慢性肝病時，肝組織中TIMP-1表達增強，因此TIMP-1與肝纖維化的形成與發展有密切之相關。

四、肝纖維化的近代分子生物學細胞訊息傳遞因子調控研究

星狀細胞受到許多生物訊息傳遞因子的調控，解明這些複雜又互相關連的調控因子，是生藥治療肝纖維化予以現代化的希望所在。當肝臟發炎時，sinusoids內的發炎性細胞如自然殺手細胞(natural killer cell)、庫布弗細胞(Kupffer cell)³、竇狀內皮細胞(Sinusoidal endothelial cell)等等會在不同時機產生免疫介質和細胞因子，以自分泌或旁分泌的方式作用於靶細胞受體，刺激活化星狀細胞使其轉變成為肌纖維母細胞，進而合成大量ECM。

在這些細胞訊息傳遞因子中，促肝纖維化形成的細胞因子有：轉化生長因子 β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、結締組織生長因子(connective tissue growth factor, CTGF)、血小板源性生長因子(platelet-derived growth factor, PDGF)、核轉錄因子- κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)、腫瘤壞死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、瘦素(leptin)、介白素-1、-2、-6、-8(interleukins; IL-1、IL-2、IL-6、IL-8)等，其中之TGF- β 1是目前所知的最強大的促膠原生成因子；PDGF會促進HSCs之增殖；而NF- κ B是一種具有轉錄啟動功能的蛋白質，為肝細胞發炎的表徵，能擴大肝臟炎症，最終使HSCs活化，產生大量膠原纖維，形成肝纖維化。

抑制肝纖維化形成的細胞因子主要有干擾素- γ (interferon- γ , IFN- γ)、肝細胞

生長因子(hepatocyte growth factor, HGF)和介白素-10(interleukin-10, IL-10)等。

五、生藥及方劑抑制肝纖維化分子生物學研究新進展

(一)、丹參(*Salvia miltiorrhiza*)⁴

有效成分有水溶性和脂溶性兩大類，脂溶性部分包括丹參酮、隱丹參酮等；水溶性部分主要為酚性酸類化合物，包括丹參素、原兒茶醛、丹參酚酸等。

(1)清除氧自由基抗脂質過氧化，保護肝細胞：丹參能降低血清TGF- α 、IL-6含量，具抗發炎、阻斷Kuffer cell和HSCs活化作用，又能促進肝細胞分裂增殖和DNA合成，促進肝臟再生作用，可能與丹參改善肝臟局部血液迴圈、加強再生內在因素的作用有關。(2)抑制TGF- β 1基因表達，對HSCs有直接的抑制作用。(3)提高肝纖維化大鼠肝組織MMP mRNA的表達，抑制TIMP-1mRNA表達而抑制膠原的產生。(4)誘導HSCs凋亡、抑制HSCs的增殖及膠原合成，降低尿羥脯氨酸(hydroxyproline, HYP)、HA、LN之水準，改善肝功能，減輕肝纖維化程度。(5)臨床應用顯示丹參具有降低門、脾靜脈內徑，減少門、脾靜脈血流量的作用，可改善肝臟微循環，有效降低肝硬化的門脈高壓、降低食道曲張靜脈壓。其活性成分之一為水溶性的丹參酚酸B(salvianolic acid B; SA-B)。

(二)、三七(*Panax notoginseng*)⁴

(1)清除氧自由基，抗脂質過氧化，保護肝細胞，促進肝細胞再生：

三七總皂苷能明顯提高肝臟SOD、GSH peroxidase活性，降低丙二醛、(Malondialdehyde, MDA)、HYP含量，有明顯的抗氧化、清除自由基活性，阻斷肝纖維化發生。(2)減輕肝臟細胞損傷和炎症反應，抑制膠原合成：三七抑制肝組織中發炎因子NF- κ Bp65 / I κ B α 的過度表達，降低血清TNF- α ，能消除炎症，減少細胞因子的釋放，抑制膠原合成。(3)抑制HSCs活化、促進HSCs凋亡。(4)阻斷TGF信號轉導途徑，抑制其異常表達：三七能明顯減少肝組織TGF- β 1 mRNA的表達，減少肝細胞的免疫損傷。(5)調控基因表達水準，促進膠原降解：三七通過下調肝組織中的TIMP-1的表達水準，從而相對降低TIMP-1 /MMP-1比值，促進ECM降解，發揮其抗肝纖維化作用。

【註】丹參、三七、冰片組成之丹七散(又名行氣活血散)能顯著改善肝臟微血管迴圈及門脈血管壓，是抗肝纖維化新方劑，劑型有濃縮製劑、散劑、錠劑、滴丸等等。

(三)、鱉甲

鱉甲能抑制結締組織增生，提升血漿白蛋白，降低患者Child - Pugh積分值，具優良的臨床療效。方劑鱉甲地龍河車散有效改善晚期肝硬化患者合成白蛋白的能力，有效改善腹水狀況，改善患者生活品質。組成：鱉甲、地龍、紫河車(3：1：1)散劑，每日2次，每次5克。

(四)、鬼針草(*Bidens pilosa*)總黃酮⁵

鬼針草總黃酮顯著降低肝組織 α -SMA、TGF- β 1、TIMP-1表達及顯著

降低HA、HYP含量。

(五)、排錢草(*Desmodium pulchellum*)總生物鹼

排錢草總生物鹼能提高血清IFN- γ 的含量，提高血清SOD活性，降低MDA含量，降低血清HA和肝組織中HYP含量。

(六)、黃耆(*Astragalus membranaceus* 或 *A. mongholicus*)

黃耆能抑制NF- κ B表達而抗發炎，抑制TGF- β 1表達而明顯降低collagen I & III和FN之分泌。複方黃耆軟肝顆粒並可以在蛋白水準增強MMP-2酶蛋白的表達，同時抑制TIMP-2酶蛋白的表達，促進ECM的降解，從而逆轉肝纖維化，組成生藥為黃耆、丹參、靈芝、赤芍、柴胡。

(七)、柴胡(*Bupleurum chinense*)

柴胡總皂苷抑制HSC活化、誘導HSC凋亡，下調膠原mRNA合成，減少膠原沉積的作用；柴胡總皂苷顯著升高血清ALB的含量，明顯降低血清HA、LN、PCIII含量，能夠升高肝纖維化大鼠血清中IL-10、NO⁻，降低血清中過高的TNF- α 。臨床上柴胡疏肝散能明顯減輕非酒精性脂肪肝患者肝臟脂肪沉積和肝纖維化程度，能有效治療非酒精性脂肪肝。

(八)、薑黃(*Curcuma longa*)

薑黃素curcumin抑制HSCs增殖、促進HSCs凋亡，抑制肝內CTGF表達，抑制HSC-T6之MMP-2、TIMP-1mRNA的表達。MMP-2會降解正常肝臟基質內的collagen IV (CIV)，導致細胞-基質間的聯繫被破壞，進一步促進HSCs的活化。

(九)、黃芩(*Scutellaria baicalensis*)

黃芩苷(Baicalin)抑制HSCs活化、增殖，進而抑制細胞膠原蛋白及糖蛋白等細胞外基質合成。

(十)、黃根(*Prismatomeris tetrandra*)

黃根抑制TGF- β 1表達，降低collagen I & III水平，明顯減輕大鼠肝臟內膠原纖維增生沉積，減少纖維化組織面積。

(十一)、蘼艾(*Artemisia argyi*)

蘼艾明顯提高SOD活性，降低MDA的含量，降低血清HA、LN、PCIII和CIV水準而抑制肝纖維化。

(十二)、藤茶(*Ampelopsis grossedentata*)⁶

藤茶總黃酮明顯提高SOD活性，降低MDA的含量，顯著降低大鼠血清中HA、LN、PCIII、CIV的水準，能有效降低大鼠體內脂質過氧化水準，防止體內抗氧化酶受自由基誘導的氧化損傷，抑制大鼠肝纖維化的形成。

(十三)、石榴(*Punica granatum*)

石榴果皮可降低對膽汁淤積誘導的肝纖維化大鼠血清中ALT、AST、LDH、TNF- α 、IL-1B濃度，對氧化損害有潛在的治療價值。

(十四)、桑黃(*Phellinus igniarius*或*P. linteus*)⁷

桑黃誘生IFN- γ ，提高機體免疫功能可能是抗肝纖維化作用機制之一。

(十五)、冬蟲夏草(*Cordyceps sinensis*)

蟲草多醣及蟲草菌絲提取物抑制TGF- β 1的異常表達，減少HSCs的活化，

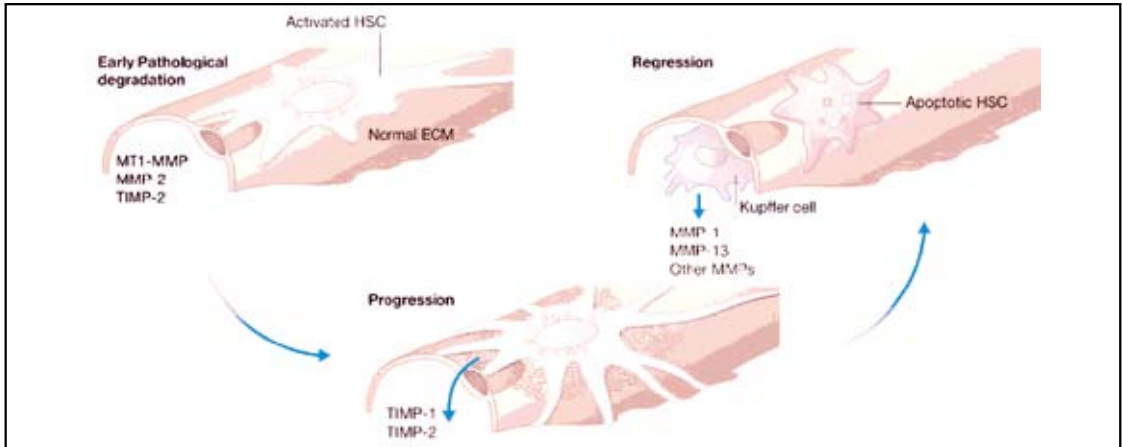
降低血清HA含量和肝組織MDA、HYP含量，減輕肝組織中膠原纖維沉積，抗過氧化損傷。

六、生藥及方劑抑制肝纖維化的展望

肝纖維化是一種慢性進展性的疾病，起因於各種致病因素造成肝細胞損傷壞死，啟動發炎性細胞如Kupffer cell等分泌多種細胞因子(如上所述)共同作用於靜止期的HSCs，使其啟動、轉化為肌成纖維細胞(MFB)，通過自分泌和旁分泌使HSCs增殖，並合成分泌大量細胞外基質(ECM)，若發炎狀況一直持續，則ECM的合成-降解的“淨效應”將失衡，終因ECM過度增生沈積而造成肝纖維化。

肝纖維化能否被抑制甚至被逆轉？從研究的理論觀之，肝纖維化發病過程中，發炎反應促使HSCs活化是關鍵環節，因此抗氧化、抑制發炎或減輕發炎程度、縮短發炎次數和時間，使肝細胞有機會再生復原，應該可以阻斷肝纖維化的進展，但是已生成的纖維是否可以被逆轉？從分子生物學的研究探討，答案仍然是肯定的。美國醫學博士Scott L. Friedman指出，從MMPs及TIMPs的調控著手，應該是纖維被逆轉的契機所在(如圖一)。

基於肝纖維化分子生物學機轉逐漸被解明，生藥的研究進展及研究成果正在轉化為抗肝纖維化療法新希望，期望透過分子生物學的研究，解明生藥在纖維形成及降解的機轉，則生藥逆轉肝纖維化甚至肝硬化應該指日可待，臨床上將肝纖維化患者『軟肝』，將是生藥發揚光大的絕佳時刻。



Emerging mechanisms of early pathological matrix degradation, fibrosis progression, and fibrosis resolution in chronic liver disease. Activation of stellate cells (top left panel) is a key event in hepatic fibrosis, and is associated with pathological matrix degradation because of increased production of membrane type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), leading to replacement by interstitial collagen or scar matrix. As fibrosis progresses (middle panel), sustained expression of TIMPs prevents matrix degradation and apoptosis of activated stellate cells. Regression of fibrosis (upper right panel) is associated with increased apoptosis of activated stellate cells. Apoptosis requires decreased expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), yielding a net increase in protease activity. These events may occur coincident with production of matrix metalloproteinases, which could include MMP-1 (in humans) or MMP-13 (in rodents), although cellular sources of these enzymes (possibly including Kupffer cells) and clear evidence of their induction *in vivo* are still lacking. Validation of these events and further elucidation of mechanisms underlying the regression of fibrosis represent key challenges for future studies.

圖一 肝纖維化逆轉之理論途徑⁸

參考資料：

1. Atzori L, Poli G, and Perra A: Hepatic stellate cell: a star cell in the liver. *The Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41(8-9):1639-42.
2. Baffy G: Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: the emerging view. *J Hepatol* 2009; 51: 212-23.
3. Consolo M, Amoroso, A, Spandidos, D A et al: Matrix metalloproteinases and their inhibitors as markers of inflammation and fibrosis in chronic liver disease (Review). *Int J Mol Med* 2009; 24(2): 143-52.
4. Li W, Huang XH, Shen ZQ, et al: Preliminary experimental study of Sanqidanshen on preventing rats immune liver fibrosis. *China Med Herald* 2009; 6:14-6.
5. Lu YQ, Chen FH, Shen JJ, et al: Effect of total flavones *Bidens pilosa* L on the expression of α -SMA, TGF- β 1 and the metabolism of collagen in liver tissues of mice infected with *Schistosoma japonicum*. *Acta Univ Medicinal Anhui* 2009; 44:80-4.
6. Kuang MY, Deng PC, and Song XU: The effects of tengcha flavonoids on expression of collagen I, III of hepatic fibrosis in rats. *Prog Modern Biomed* 2009; 9:2055-57.
7. Qi X, Zhang J, and Chen Y: Advance of researches on *Phellinus* Spp. A Rare and precious fungus. *Food Res Develop* 2009; 30:172-4.
8. Friedman SL and Bansal MB: Reversal of Hepatic Fibrosis—Fact or Fantasy? *Hepatol* 2006; 43:S82-8.