

肝纤维化的逆转策略及研究现状

聂青和

聂青和, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心
陕西省西安市 710038

聂青和, 男, 汉族, 1961 年生, 1995 年第三军医大学西南医院全军传染病专科中心博士毕业, 主治医师, 主要从事传染病学临床与实验研究。现任《中国实用内科杂志》、《世界华人消化杂志》、《胃肠病学和肝病杂志》、《肝脏》、《中国感染控制杂志》、《中国消化病学杂志》、《寄生虫病与感染性疾病》等 8 家学术专业杂志编委, 《实用肝病杂志》副主编, 《中华传染病杂志》、《中华消化杂志》特邀审稿人。

中国博士后科学基金资助项目(中博基), No. [1999] 10

陕西省科技攻关项目, No. 2003K10G63

通讯作者: 聂青和, 710038, 陕西省西安市新寺路 1 号, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心。nieqinghe@hotmail.com
电话: 029-83377752 传真: 029-83537377

收稿日期: 2005-03-12 接受日期: 2005-04-20

摘要

肝硬化是严重危害人类健康的常见病之一, 目前我国的发生率仍保持在较高水平。肝硬化的病理学基础是肝纤维化, 后者是各种损肝因素(如病毒性肝炎、酒精性肝病、某些代谢性疾病、药物及化学毒物损伤及肝寄生虫病等)引起的肝脏损害和炎症, 进而导致慢性肝病发展为肝硬化的必经病理过程。目前认为, 肝纤维化时肝组织中细胞外基质(ECM)的病理性改变是由于控制 ECM 形成及降解的稳态机制失调所致, 任何原因使得 ECM 形成过多或降解减少均可导致 ECM 过度沉积。近十多年来, 我们对肝纤维化的分子生物学及细胞学机制有了较为深入的认识, 其诊断与治疗也有了一定进展。但是, 迄今为止 HBV、HCV 和 HBV/HDV 感染人体后导致肝硬化的机制还未完全阐明, 尚存在许多问题, 说明病毒性肝纤维化形成机制的复杂性。肝星形细胞(HSC)已公认为肝内 ECM 堆积的关键因素。随着 HSC 生物特性的深入了解, 更多新的抗纤维化治疗方法被设计出来。当前的治疗主要针对病因, 其次是抑制 ECM 生成、促进纤维降解、抑制 HSC 活化等。随着分子生物学的发展, 肝纤维化的分子机制逐渐得以阐明, 从而使肝纤维化的基因治疗成为可能。肝纤维化的基因治疗主要起到阻止纤维化发展、刺激肝细胞分裂和肝组织结构重建三方面的作用。目前, 常用的方法一般是通过缺陷病毒(如腺病毒)转入特定的细胞因子和酶的基因, 通过靶细胞表达这些因子作用于受损的肝脏, 达到延缓和治愈肝纤维化之目的。中国传统的中医药对治疗肝纤维化大有希望, 但其长期效果有待观察。将来, 不仅病因可以祛除, 其他的目标也可以达到。但是目前还存在不少问题, 尚有许多工作需要进行。

关键词: 肝纤维化; 细胞外基质; 逆转

聂青和. 肝纤维化的逆转策略及研究现状. 世界华人消化杂志 2005;13(10): 1165-1174

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1165.asp>

0 引言

肝纤维化是肝脏内纤维结缔组织异常增生的病理过程, 多是持续性肝脏损伤或存在纤维化刺激因子的结果。轻者称肝纤维化或纤维肝, 重者伴有再生结节的假小叶形成时则为肝硬化。肝纤维化是慢性肝病最重要的病理特征, 也是慢性肝炎、肝硬化等进一步发展、恶化的重要环节, 此时如果病因消除并经适当治疗, 纤维化尚可被逐渐吸收, 是可复性病变。抗纤维治疗可阻止乃至逆转纤维化进程, 故一直受到高度重视^[1]。

肝纤维化研究的重要性: (1) 肝纤维化是各种肝病发展成肝硬化的必经病理过程; (2) 肝纤维化是阻止发展肝硬化过程中唯一可靠的治疗时机; (3) 世界范围内对慢性肝病治疗的两大策略既抗病毒治疗和阻止肝纤维化的发生^[2]。目前尚无特效抗病毒疗法治疗慢性病毒性肝炎^[3]。因此, 肝病的治疗重点转移到如何控制肝病的进展, 防止肝纤维化以致肝硬化的发生、发展方面, 随之而来的是对肝纤维化发生机制的研究。

1 肝纤维化的逆转研究

在我国, 现在和将来相当长的一个时期内, 肝硬化发生率将持续保持较高水平, 可以说肝硬化是严重危害人类健康的常见病之一, 其病理学基础是肝纤维化, 后者是各种损肝因素(如病毒性肝炎、酒精性肝病、某些代谢性疾病、药物及化学毒物损伤及肝寄生虫病等)引起的肝脏损害和炎症, 进而导致慢性肝病发展为肝硬化的必经病理过程, 其病理改变的特点为: (1) ECM 在肝脏湿重中所占的比例增加, 由正常时不到 0.6% 升高 3-6 倍; (2) ECM 各种成分不成比例地升高, 如各型胶原中以 I、IV 及 III 型胶原升高为主, 蛋白多糖以硫酸皮肤素(DS)及硫酸软骨素(CS)升高为主, 结构糖蛋白以纤维连接蛋白(FN)及层粘连蛋白(LM)等升高为主; (3) 一些基质分子的微细结构发生变化, 如胶原 α 链的羟化程度及糖胺聚糖(GAG)的硫酸化程度发生改变等; (4) ECM 在肝组织中出現局部性再分布, 表现为 ECM 主要沉积于汇管区及窦周间隙(Disse 隙), 并且出现窦周毛细血管化(capillarization)。目前认为, 肝纤维化时肝组织中 ECM 的病理性改变是由于控制 ECM 形成及降解的稳态机制失调所致, 任何原因使得

ECM形成过多或降解减少均可导致ECM过度沉积.近十多年来,虽然我们对肝纤维化的分子生物学及细胞学机制有了较为深入的认识,其诊断与治疗也有了一定进展.然而,迄今为止HBV、HCV和HBV/HDV感染人体后导致肝硬化的机制还未完全阐明,存在许多问题,说明病毒性肝纤维化形成机制的复杂性^[4].根据现有文献分析表明,病毒性肝纤维化发生机制可能主要与下列因素有关:(1)病毒抗原持续存在,肝损害持续或反复发生;(2)胶原刺激因子持续存在,刺激肝星状细胞(HSC又称Ito细胞、储脂细胞)激活,肝纤维化不断进展;(3)肝细胞生长抑制因子持续存在,肝细胞再生迟缓等.

1.1 肝纤维化的可逆性 肝纤维化的转逆机制一直是人们十分关心的问题.多年来,人们进行了大量实验及临床研究,以探讨肝纤维化的可逆性.在动物模型上,曾证明了肝纤维化是可逆的,如CCl₄模型、大鼠胆管结扎梗阻性模型、血吸虫性模型、硫乙酰胺模型;于临床患者,30 a来陆续有一些报道,证明人类的肝纤维化是可逆的,如血色病、Wilson病、原发性胆汁性肝硬化.近年来陆续报道丙型肝炎肝纤维化可因IFN- α_2b 治疗而减轻,慢性乙型肝炎肝纤维化因拉米夫定(lamivudine)抗病毒治疗而好转.至于当肝纤维化进展到肝硬化以后,是否仍可逆转,一般来说答案是否定的.1996年Bissell在其肝纤维化专章中讲到:目前普遍认为,人类的肝硬化是不可逆的.至1999年Friedman在肝纤维化一章中谈到:肝纤维化是可以逆转的,而肝硬化是不可逆的.他们的这些论述,代表了西方医学界公认的见解.目前认为,肝纤维化与其他器官的纤维化反应一样,具有可逆性.在某些肝损伤时,随着损伤因素的消除,肝组织结构可完全恢复正常,在CCl₄所致的实验性肝纤维化模型中即如此.而当肝纤维化进展为肝硬化时,一般认为不具有可逆性,对肝脏疾病的研究支持这一观点^[1, 4].需要提出的是,在肝纤维化向肝硬变发展过程中,时间因素起着重要作用.在短时间内形成的肝硬变中,如由CCl₄所致的大鼠肝硬变及小鼠的血吸虫病性肝硬变中,早期去除损伤刺激可使肝损害完全恢复正常.在各种人肝脏疾病中,随病因的不同,发展成肝纤维化及肝硬变的时间变化很大,短的仅需1 a或数年,长的可达20 a以上^[5].

1.2 肝纤维化的逆转机制 研究发现,在急性肝损伤中,随着肝组织结构完整性的恢复,激活的HSC的数量降低,鉴于激活的HSC在肝纤维化的形成中发挥着重要作用,其数量降低将有助于肝组织结构恢复到正常状态.目前认为肝损伤修复中激活的HSC数量降低有两种可能,一是激活的HSC由激活表型逆转为静息表型,

二是通过某种机制如细胞凋亡将激活的HSC清除掉^[6].

1.2.1 HSC凋亡 对细胞凋亡的广泛深入研究近年来也扩展到了HSC,目前已在实验性肝损伤的恢复期观察到HSC的凋亡.这一现象与肾纤维化时肾小球细胞的凋亡相似.此外,还发现凋亡的HSC其基质金属蛋白酶组织抑制物(TIMPs)表达降低,从而使得胶原酶活性增强,由此可解释自限性肝损伤后肝组织恢复正常的基质吸收.体外培养过程中,自发激活的HSC也出现凋亡,同时出现FasL、Bcl-2和P53表达增加,以及对FasL的敏感性增加.

1.2.2 激活表型的逆转 体外培养研究显示,可在一定程度上对激活的HSC表型进行调节,但目前仍不肯定激活的HSC能否完全逆转为静息状态.研究发现,培养于小鼠骨肉瘤基底膜基质(EHS基质)上的刚分离的正常大鼠HSC,其表型保持静息状态,提示细胞外基质环境在维持HSC处于正常静息状态中起着十分重要的作用,正常的细胞外基质环境可能具有逆转激活的HSC表型的作用.当前,对于激活的HSC表型能否完全逆转尚缺乏直接的实验证据,尤其是体内实验的证据.

目前对不可逆性肝纤维化(或肝硬化)产生的分子基础仍在争议.研究发现,在肝病早期,胶原酶位于纤维间隔(fibrous band)中,而在肝硬变时,胶原酶活性降低,但尚不清楚胶原酶质和量的改变与肝纤维化不可逆性之间的因果关系.此外,还推测,在肝纤维化乃至肝硬变形成过程中,胶原纤维发生交联(cross-linking),胶原对蛋白酶的抵抗性增加,从而使得肝纤维化具有不可逆性^[7].

2 肝纤维化的逆转途径^[4, 8]

2.1 控制原发病 如慢性病毒性肝炎时给予抗病毒治疗,酒精性肝纤维化应戒酒,血吸虫性肝纤维化给予吡喹酮杀灭血吸虫等.治疗原发病,减轻肝脏实质的炎症坏死,无疑是重要的.因为减轻炎症坏死,减少了血小板衍生生长因子(PDGF)、转化生长因子 β (TGF- β)等细胞因子的释放,即减少了HSC活化,从而减少了ECM的产生和分泌,利于肝纤维化的抑制和恢复.当然仅仅控制原发病时不够的,因HSC活化之后,即使没有炎症及细胞因子的作用,通过自分泌及旁分泌途径,HSC仍能持续表达ECM,使纤维化得以延续,故仍需抗纤维化的治疗.

2.2 抑制ECM生成 ECM的生成,系由相关基因转录,形成Mrna,继而能翻译为相应的蛋白,分泌至细胞外沉积,交联而成纤维组织.抑制ECM生成可减少ECM在肝组织中出现局部性再分布.

2.3 促进纤维降解 正常时纤维生成同时伴以纤维降解.肝纤维化时基质金属蛋白酶(MMPs)在早期生成总量虽

也略增, 但不及纤维生成明显, 而后期 MMPs 日趋减少, 以至降解活性不足, 此为肝纤维化形成的机制之一. 应用中医中药后见到血清及肝组织中潜在 MMPs 及活性 MMPs 均明显增加. HSC 表达的 MMP-13 mRNA 也明显增多, HSC 培养的上清液中 MMPs 酶活性也明显增强, 这些说明中医中药增加了 MMPs 的基因表达及活性, 也即增强了降解活性, 这是中医中药逆转肝纤维化的又一重要机制. TIMPs 与 MMPs 结合, 可抑制 MMPs 的活性, 肝纤维化时 TIMPs 生成增加系纤维增生的机制之一^[9]. 中药应用后, 不论于肝组织或培养的活化肝星状细胞均见 TIMP mRNA 表达明显减少, 这无疑是有利于纤维化逆转的又一机制^[10].

2.4 抑制 HSC 活化 已公认 HSC 是纤维化生成的主要细胞来源, 抑制其活化是治疗的一个重要环节^[11]. 恢复 ECM 合成与降解的失衡是关键. 在正常肝脏的纤维组织存在着 ECM 生成与降解的动态平衡, 肝纤维化是 ECM 生成与降解过程失衡的结果, 纤维组织的形成不能被视为一个静止的过程, 而应看作是一个动态过程, 因而从理论上讲其是可逆的. 任何抗纤维化的治疗之所以有效在于他干预生成与降解的任何一方或最好是同时干预两方^[12].

3 肝纤维化的常用药物

现代医学对肝纤维化发病机制的研究已趋明朗, 主要是在各种损肝因素作用下, HSC 激活、增殖, 合成并分泌大量的 ECM, 降解减少, 沉积增多, 则肝纤维化形成. 而 ECM 的主要成分是胶原, 因此肝纤维化可以被认为是胶原合成与降解的失衡所致, 这是一个涉及到多种不同水平调节的非常复杂的过程. 因此, 针对不同水平的调节因素以及纤维组织生成和降解的机理, 抗肝纤维化药物可以从不同环节抑制其形成或促进其降解^[1-2, 12].

抗肝纤维化西药尚无确切分类, Cales *et al*^[13] 将初步分为以下 5 类: (1) 保护肝细胞, 阻止其凋亡 (熊去氧胆酸、水飞蓟素、西列丙胺、维生素 E 等); (2) 抑制 HSC 活化类 (IFN- γ 、维甲酸类、雌激素); (3) 拮抗细胞因子及其受体类; (4) 抑制 ECM 合成与分泌; (5) 促进 ECM 降解 (IFN- γ 、不饱和卵磷脂) 等为抗肝纤维化因子.

3.1 秋水仙碱 为最早应用于临床的药物, 他可干扰细胞的胶原分泌, 还能刺激胶原酶活性, 促进胶原分解. 最近研究认为秋水仙碱能作用于巨噬细胞, 抑制单核细胞因子及生长因子的释放, 减少白介素 1 的分泌等. Kershenovich *et al*^[14] 采用随机双盲对照试验, 用秋水仙碱治疗肝硬化 100 例 (45 例酒精性, 41 例病毒性肝炎, 14 例其他原因所致), 10 a 累积生存率为 56%,

而安慰剂组仅为 20%, 差异极其显著 ($P = 0.006$). 对治疗组 30 例和安慰剂组 14 例进行连续肝活检, 治疗组 9 例有组织学好转, 而安慰剂组无 1 例好转 ($P < 0.002$). 因此, 不少学者认为该药是治疗早期肝纤维化最有希望的药物之一. 但是该药有较严重的毒副作用, 而影响其在临床上的应用.

3.2 干扰素 γ 干扰素在体外能减少胶原合成, 在鼠血吸虫肝纤维化模型中, 能阻止结缔组织的沉积. 国外临床报道认为他能降低胶原 mRNA 的稳定性, 抑制胶原合成. Hayasak *et al* 用 γ -干扰素治疗慢性乙型肝炎, 测定治疗前后血清 P III P 含量, 结果显示有明显降低. α -干扰素有抗病毒作用, 且能使慢性丙型肝炎肝组织中 I 型胶原 mRNA 及 TGF- α mRNA 降低, 减轻肝纤维化. 干扰素- α 治疗慢性丙型肝炎 3 a 随访结果表明, 治疗临床显效 (血清 HCV RNA 转阴、肝功复常) 者, 肝纤维化改善达 70%, 有效及无效者无变化, 对照组有 40% 病例进一步恶化. 临床随访研究表明, 在产生持续病毒学应答的丙型肝炎患者其肝组织纤维化可以减轻^[15].

3.3 拉米夫定 1995 年 Dienstag *et al*^[16] 发现拉米夫定 (lamivudine) 对 HBV DNA 的抑制作用以来, 世界各地先后进行了拉米夫定治疗乙型肝炎的 II 期和 III 期临床试验. 拉米夫定作为第一个获美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准的口服抗乙型肝炎病毒药物, 其问世推动了慢性乙型肝炎治疗的进程, 标志着慢性乙型肝炎治疗进入核苷类似物治疗时代. 拉米夫定能有效抑制 HBV DNA 的复制, 并在部分患者获 HBeAg 血清转换, 治疗 1 a 后肝组织纤维化有不同程度的减轻或延缓其进程, 若治疗更长时间甚至可以使已形成的肝硬化也可逆转, 但 YMDD 变异及所致的耐药性限制了他的长期应用^[17].

3.4 肾上腺皮质激素 通过免疫抑制及抗炎作用而减少胶原合成. 细胞培养及动物实验表明他能抑制 I 型胶原 mRNA 的表达, 使肝细胞及成纤维细胞内 I 型胶原 mRNA 降低, 从而抑制胶原合成. 皮质类固醇可以降低前胶原 mRNA 含量, 其机制可能与胶原基因转录减少和前胶原 mRNA 降解增多有关. 在体内, 皮质类固醇还可抑制炎细胞的趋化反应, 减少炎细胞的聚集, 从而减少胶原合成. 但皮质类固醇同时也抑制胶原酶的产生. 因此, 他对胶原代谢的净效应可能不同情况下有所不同, 而且长期应用会产生严重的不良反应, 严重影响其应用价值^[18].

3.5 脯氨酸类似物 他可取代脯氨酸而结合到前胶原中, 形成非螺旋结构的胶原, 这种胶原易为蛋白酶水解, 以致细胞外间质的形成减少. 如铃兰氨酸能缓解 CC14 诱发的大鼠肝硬变的纤维化程度, 阻止胶原中脯氨酸结合成羟脯氨酸, 减少肝组织胶原的沉积.

3.6 马洛替酯 马洛替酯为二硫戊环衍生物,是肝脏蛋白产生的诱导剂,主要增加蛋白质DNA和RNA的比值,诱导细胞色素b5和6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G6PD)的活性,增强烟酰胺腺嘌呤二核苷酸细胞色素C的活性,用于酒精性肝纤维化及病毒性肝炎肝纤维化.动物实验证实该药具有减轻肝脏炎症及纤维化,阻止肝脏胶原合成和堆积.该药还可阻止乙醛的产生,该物质具有促进胶原合成的作用.其防止肝纤维化的机制,可能是通过抑制肝脏的炎症反应,减少炎症细胞分泌的激活胶原合成的因子,从而抑制胶原的合成,但此药对人类肝纤维化的治疗作用似乎并不明显,但对改善血浆白蛋白有一定作用.

3.7 前列腺素 Ruwart *et al*^[19]报道,前列腺素E2可抑制胶原的沉积及肝脏羟脯氨酸含量的增加.还可通过肝脏的保护作用防止肝纤维化的发展.机制是通过增加cAMP水平减少胶原产生.

3.8 D-青霉胺 此药可抑制胶原的交联,可与Ca²⁺螯合,与赖氨酸产生的醛类反应,还可促进降解交联不完全的胶原纤维,从而抑制胶原的交联.他主要影响软组织胶原的共价交联.但此药有较大的毒性.

3.9 β -氨基丙晴 利用药物干扰胶原的共价交联,从而抑制胶原纤维的生成也是治疗纤维化的一条途径.赖氨酸氧化酶是产生与胶原共价交联的关键酶. β -氨基丙晴是抑制此酶最强的药物.此药对赖氨酸氧化酶的抑制是不可逆的,在动物和临床实验中均可抑制胶原的交联,但毒性较大,影响了他的使用价值.

3.10 核糖核酸 为生物体内重要的生化物,临床试验表明可使III型前胶原蛋白、透质明酸(HA)明显下降,与对照组比较差异有显著性意义,电镜显示治疗组肝组织炎症活动度及纤维化程度均明显减轻.

3.11 促肝细胞生长素(PHGF)基础研究已发现,PHGF不仅具有促进肝细胞再生,而且有抗肝纤维化的作用.24例慢性活动性肝炎于应用PHGF治疗前后检测HA的变化,治疗前HA异常23例(95.8%),治疗后12例降至正常(52.2%).提示PHGF具有促进肝细胞组织修复和抗肝纤维化的作用^[20].另一项研究表明^[21],在肝纤维化的形成过程中,TGF- β 是一种起关键作用的细胞因子,PHGF能抑制TGF- β 1 mRNA的过度表达和肝细胞的凋亡而间接地发挥抗纤维化的作用,从而他可抑制各种原因诱导的实验性肝纤维化的发生和二硝基亚硝胺诱导的大鼠肝纤维化的发展.

3.12 维生素E 维生素E是肝细胞生长的重要保护因子之一,他对多种急性肝损伤具有保护作用,对慢性肝纤维化有延缓作用,他能直接阻止HSC的增殖和胶原的产生,从而抑制铁诱导的肝纤维化,即维生素E可以抑制铁过载引起的肝纤维化.在CCl₄致肝硬化

模型中,饲料中补充维生素E后能明显减少肝氧化损害,能显著抑制TGF- β 1 mRNA及 α 2型前胶原mRNA在肝脏的表达,提示维生素E减少炎症反应和防止肝脏胶原沉积的作用可能与其抗氧化和抗坏死的特性紧密相关^[22].

3.13 己酮可可碱(PTX) PTX是甲基黄嘌呤的衍生物,它具有抑制HSC和肌成纤维样细胞(MFB)生长,减少胶原蛋白堆积的抗肝纤维化作用.其作用机制可能与其抑制细胞因子网络有关.在肝纤维化动物模型中,PTX及其活性代谢产物可减少纤维化动物胶原mRNA的数量,抑制胶原的形成,进而阻止纤维化的发生.

3.14 维甲酸(RA) 维甲酸可减少CCl₄诱导的肝纤维化大鼠、III型胶原等细胞外基质在肝脏的积聚,抑制HSC向肌纤维母细胞的转变.最近一项实验研究表明,维甲酸可抑制HSC 3H-TdR掺入及降低原代培养HSC的DNA、RNA含量,有望成为有效的抗纤维化药物.

3.15 多不饱和卵磷脂 多不饱和卵磷脂能减轻狒狒的酒精性肝硬化和人血白蛋白所诱导的大鼠肝纤维化,体外细胞培养发现他对I型前胶原mRNA的表达无影响,但能使HSC的胶原活性升高1倍.其多中心临床试验的初步结果显示,本药在部分病例可延缓酒精性肝纤维化的进展.

3.16 血管紧张素II受体阻断剂 激活的人HSC有大量血管紧张素II(AT II)受体(AT II R)表达,AT II作用于AT II R可迅速引起细胞内钙浓度增加并导致细胞收缩和细胞增殖,AT II R阻断剂氯沙坦可以阻断该作用.选择性AT II R阻断剂科沙坦能减轻猪血清诱导的肝纤维化.

4 肝纤维化的基因治疗

近年来随着分子生物学的发展,肝纤维化的分子机制逐渐得以阐明,从而使肝纤维化的基因治疗成为可能.肝纤维化的基因治疗主要起到阻止纤维化发展、刺激肝细胞分裂和肝组织结构重建三方面的作用.目前,常用的方法一般是通过缺陷病毒(如腺病毒)转入特定的细胞因子和酶(如HGF、TGF- β 1受体、MMPs及TIMPs等)的基因,通过靶细胞表达这些因子作用于受损的肝脏,达到延缓和治愈肝纤维化的目的^[23].

治疗肝纤维化理想的策略应包含阻止纤维化的发展、刺激肝细胞的分裂和肝组织结构重建这三个部分^[24].基于以上对肝纤维化分子机制的认识,目前的肝纤维化基因治疗一般从以下几方面入手:(1)以细胞因子(TGF、PDGF、TNF、丝裂原等)、HSC为靶位点,抑制HSC的激活,减少ECM的生成;(2)以MMPs及TIMPs为靶位点,促进异常堆积的细胞外基质的降解,重建肝小叶;(3)抑制炎症反应,保护肝细胞,减少肝细胞的损害.基因治疗常用载体有缺陷型腺病毒、逆转录

病毒脂质体, 以及转染的细胞等.

4.1 以 TGF β 为靶向的基因治疗 在人和哺乳动物中, 现已发现三种转化生长因子 β , 即 TGF β 1, 2, 3, 其中以 TGF β 1 与肝纤维化关系最为密切. 目前已确定 TGF β 1 有 I 型、II 型、III 型三种受体, 其中 I 型、II 型受体是信号转导所必需的. TGF β 1 在肝纤维化的形成中扮演重要角色, 他可以促进 HSC 分泌 I、III、IV 型胶原、板层素 (LA)、纤维连接蛋白 (FN) 等 ECM, 并加速 HSC 由静止向激活的转化. 同时还可以抑制 MMPs 的分泌, 上调 TIMPs 的表达, 从而抑制 ECM 的降解. 单纯的 TGF β 1 过表达即可引起大鼠的肝纤维化形成. TGF β 中和抗体亦曾用来抑制皮肤损伤后的纤维化形成. 因而不难设想, 阻断 TGF β 的作用可能会成为治疗肝纤维化的有效手段^[25].

4.2 HGF 在肝纤维化形成的过程中, 肝细胞的相对体积和绝对数量都显著减少, 因此, 刺激、促进肝细胞的再生也是防治肝纤维化的重要策略和措施. 能够促进肝细胞再生的因子包括多种生长因子, 如 HGF、表皮生长因子 (EGF)、TGF- α 、角质细胞生长因子 (KGF) 和肝再生增强因子 (ALR) 等. HGF 是一种具有最强的促进肝细胞再生作用的生长因子之一. 缺失变异体型的 HGF 具有比完整分子更强的有丝分裂原作用. 以羟脯氨酸含量测定得知肝组织中的胶原含量也显著下降. 缺失突变型 HGF 甚至对于 DMN 诱导已经形成的肝纤维化也具有显著的抗肝纤维化作用. 缺失突变型 HGF 的抗肝纤维化作用机制, 不是通过促进细胞色素 P450 依赖性 DMN 的代谢, 而是通过降低或抑制 TGF β 基因转录物水平和 HSC 的激活, 以及促进肝细胞的再生来实现的.

Ueki *et al*^[26] 以 HVJ-liposome 为载体将人 HGF 基因导入 DMN 诱导的肝纤维化大鼠骨骼肌中, 使这种基因在大鼠体内过表达. 经指标检测证实, 注射 4 wk 后, 大鼠体内血浆 HGF 水平显著升高, 约为正常水平的 3-4 倍. 肝组织中 HGF 受体 Cmet 的表达亦升高. 而 TGF β 1、 α SMA 的表达显著减少, 且二者具有相关性. 肝细胞凋亡较对照组减少 47%. 组织学观察显示, ECM 的沉积较对照组减少 70% 以上, 门静脉周围及肝小叶中心地带肝纤维化形成几乎完全终止, 肝小叶和血管结构得到很好的重建, 门脉高压亦得到改善. 治疗组大鼠平均生存时限延长, 未见肝外不良效应. 证实 HGF 确是一种有效的抗纤维化形成因子. 虽然其作用机制尚未完全阐明, 但极有可能成为一种有效的临床治疗措施.

4.3 MMPs 及其抑制剂 TIMPs MMPs 是一类依赖金属离子锌, 并以 ECM 成分为水解底物的蛋白水解酶, 是降解 ECM 的主要酶类. 在肝纤维化形成早期, MMPs 活性变化不大或有轻度增加, 随着肝纤维化的发展, 其活性逐渐增强, 至晚期则下降. MMPs 的活性主要受

到 TGF β 1 和 TIMPs 的影响. 在肝损伤的急性期, HSC 短暂表达 MMP-3、MMP-13 和 u PA, 基质降解; 在肝损伤的晚期, HSC 活化, 表达模式发生了变化, 产生一系列能降解正常肝基质的 MMPs, 如较常见的前 MMP-2 和膜型 MMP-1, 同时也可以抑制纤维化肝中积聚的纤维状胶原的降解. 另外, 肝组织中 TIMPs 的显著表达抑制了 MMP-1/MMP-13 对纤维丝状胶原的降解. 这些路径在肝纤维化的进程中起着很重要的作用^[27].

同样, 在肝纤维化恢复过程中也有胶原酶的参与, 研究显示在肝纤维化恢复的早期, 肝细胞和 HSC 就有 MMP-13 的表达, 这些酶的激活与胶原酶的特异性抑制物产生平衡. 因此 MMPs 及其抑制物 TIMPs 成了肝纤维化基因治疗的重要的作用点. 主要的治疗策略有: 抑制 TIMPs 的作用, 提高肝组织中 MMP-3 和 MMP-13 的活性, 降解纤维丝状胶原, 恢复肝组织的正常结构; 抑制 MMP-2/MT1-MMP 的生成, 防止肝正常纤维结构的降解和重构.

MMPs 具有降解 ECM 的作用, 但其并非独立发挥作用, 而是受到 TGF β 1 和 TIMPs 的影响. 而且在肝纤维化形成的早、中期 MMPs 的表达并未减少, 甚至有所增加. 因而单纯提高 MMPs 的表达可能不是治疗肝纤维化的有效途径, 如能在提高 MMPs 的活性或同时抑制 TGF β 1 和 TIMPs 的表达或许能收到较满意的效果. 我们曾经用人血清球蛋白免疫大鼠制备肝纤维化模型, 然后经尾静脉注射 20-聚硫代磷酸反义寡核苷酸 (S-asON, 共 4 种) 阻断 TIMP-1 的表达, 通过 RT-PCR、免疫组化、电泳进行检测. 结果显示 S-asON 可以阻断 TIMP-1 的表达, 并且可以逆转肝的纤维化^[28-29]. 与此同时, 为了系统地分析抑制 TIMP-1 的 S-asON 在肝纤维化大鼠体内的生物学分布及药代动力学变化, 为将来临床应用提供科学依据, 我们应用 γ -32 p-ATP 标记 S-asON 的 5' 端, 给实验大鼠尾静脉一次性注射, 观察其在大鼠在体内的生物学分布及药动学状态. 结果说明抑制 TIMP-1 的 S-asON 在实验大鼠体内以肝、肾为主的广泛组织生物学分布 (表明肝脏作为反义治疗的器官有着重要的现实意义) 和较长的清除半衰期 (其药物能在体内维持 72 h 以上), 使其成药及临床用药变为可能, 从而为研制新一代抗肝纤维化基因治疗药物奠定了实验基础^[30]. 这种方法有望在基因水平抑制肝纤维化.

4.4 间质炎症的抑制 间质炎症是肝纤维化病理改变的一个重要特征, 同时也是肝纤维化的重要中间环节, 因此, 通过抑制间质炎症反应也是肝纤维化基因治疗的重要策略. 白介素 10 (IL-10) 是肝纤维化间质炎症的重要炎症递质因子, 因而是阻断肝纤维化过程基因治疗的重要靶位点. 应用重组 IL-10 对于体外培养的库普弗细胞产生超氧化物离子和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)

的能力具有显著的抑制作用. IL-10在肝纤维化中的抑制作用首先在胶原基因启动子活性的下调结果中得到了证实. 将IL-10的表达载体与 $\alpha 1(I)$ 型胶原的启动子指导的报道基因的表达载体共转染细胞, 发现IL-10的表达对于 $\alpha 2(I)$ 启动子活性的抑制率可达40%, 提示在体内IL-10对肝脏ECM的代谢调节中具有十分重要的意义. 另外的研究证实, 肝脏HSC表达IL-10水平的下降, 可能是肝纤维化形成的重要原因. 肝脏内的库普弗细胞在体内同样是产生IL-10的重要细胞类型. Rai *et al*^[31]的研究结果表明, IL-10的表达在调节TNF- α 的产生中具有显著的上调作用, 而TNF- α 又是70%肝脏切除时主要的肝脏再生始动因子. IL-10抗肝纤维化的作用机制, 还包括抑制TGF β 的产生等环节.

4.5 利用uPA的方案 尿激酶型纤溶酶原激活剂(urokinase-type plasminogen activator, uPA)是基质水解瀑布的起始因子, 同时也诱导HGF的表达, 是HGF成熟的重要条件. 在肝纤维化模型中, 静脉注射一种能编码非分泌性人uPA的复制缺陷型腺病毒, 可在肝细胞中产生很多有功能的uPA蛋白, uPA可通过肝细胞破裂漏出或细胞基因大量表达时的少量释放两种途径进入体液, 激活纤溶酶原生成纤溶酶, 后者可激活胶原酶MMP-14和MMP-15, 使细胞外胶原基质消化, 促进肝纤维化的好转, 同时uPA也可使HGF的表达增加, 引起肝细胞的增殖和肝结构的重建, 肝功能得到极大的好转, 因此这些结果提示了一种潜在的新型的治疗方法^[32].

4.6 肝干细胞 如健康机体中大多数器官一样, 肝实质细胞的增加和减少维持着一个很好的平衡. 肝细胞数目的减少, 比如部分肝切除、病毒感染、炎症等等, 都可引起肝细胞的反应性再生, 现今研究认为共有四种细胞对肝细胞的减少起反应: 成熟的肝实质细胞、卵形细胞、造血干细胞和骨髓干细胞. 其中, 肝实质细胞可在正常肝组织更新、轻微的肝损伤时发挥其增殖功能, 具有量多、单功能及对肝损伤反应迅速的特点; 卵形细胞在肝损伤几天后出现在门脉区的一种细胞, 是由干细胞分化而来, 他的增殖功能则是在慢性及广泛肝损害或肝实质细胞增殖抑制时受到激活, 其作用具有两重性, 一方面可维持长时间的增殖, 另一方面由于该细胞数目较少, 增殖作用还是很有限的; 造血干细胞和骨髓干细胞都可分化成外源性肝干细胞, 主要在酒精性肝损伤或肝癌变过程中起作用, 尤其以肝细胞再生方面作用显著. 由于不同的再生细胞在增殖和分化方面的潜能多样性为移植提供了多种细胞来源: 肝细胞常用于急性肝损伤的治疗, 肝的起源细胞常用于以肝细胞为目标的基因治疗, 骨髓源

性细胞用于慢性肝病的长期治疗. 肝细胞移植成功的一个限制因素就是肝细胞分化和增殖的微环境^[33].

4.7 端粒酶 端粒是真核细胞染色体末端特殊的帽状结构, 由头尾相连的DNA序列TTAGGG与具有催化活性的蛋白质组成. 端粒本身维持一定的长度对于细胞的染色体末端的稳定性、正常的有丝分裂过程、正常的染色体转位、防止染色体末端的相互连接、避免核酸酶和连接酶的催化作用改变染色体的结构等都是必须的. 当端粒的长度低于2-4 kb这一临界值, 染色体的稳定性和完整性就难以维持. 端粒长度的维持主要依赖端粒酶的活性. 端粒酶由RNA和2种蛋白亚单位组成, 是一种RNA依赖性DNA聚合酶组成的复合体. 大量的证据表明, 端粒酶在细胞周期、衰老、细胞增殖、细胞的转化以及肿瘤形成过程的调节中具有重要的调节作用.

在纤维化的肝脏中, 有足够的证据表明, 端粒酶的活性变得不稳定或显著降低, 特别在肝硬化组织中更加明显. 而在肝细胞癌(HCC)组织中则显著升高. 因此, 推测端粒酶的激活可能是大结节性肝硬化形成的早期步骤, 而且在HCC的形成过程中与其他因素之间具有协同作用. 以表达端粒酶蛋白亚单位的重组表达载体转染人的成纤维细胞系, 可以使端粒酶阴性的细胞系能够继续维持细胞的正常状态.

4.8 促进HSC的凋亡 在过去的20 a间, 关于肝纤维化的细胞生物学和分子生物学机制的研究取得了显著的进展. 其中关注的焦点就是HSC的激活与转化^[34]. HSC的激活具备一系列的特征, 包括ECM合成水平增加, 获得收缩功能, 晚期肝脏疾病中造成肝脏组织结构的显著改变等. 肝脏组织中的ECM总量也是处于不断的动态变化之中, 所以肝纤维化的发展历程取决于ECM代谢状况, 即肝脏组织中ECM的合成和降解速度的净值. 因此, 抗肝纤维化的基因治疗也得根据肝纤维化形成的分子生物学机制从多个方面进行. 最为有效的抗肝纤维化基因治疗还是针对HSC的基因治疗途径.

在纤维连接蛋白分子结构中, 第14个III型结构位点有一段功能性序列(YTIYVIAL)对于整合素介导的细胞与细胞外基质之间的黏附具有抑制作用. 纤维连接蛋白分子中这一抗黏附位点对于细胞的增殖、分化和细胞凋亡过程也具有十分重要的调节作用. 研究表明^[35], 来源于纤维连接蛋白分子结构的抗黏附多肽对于HSC向成纤维细胞表型的转换具有显著的抑制作用. 在含有胎牛血清的培养基中, 新鲜分离的HSC向成纤维细胞表型转化, 表现为增殖水平增高, 维生素A脂滴的出现和累积, 以及 α SMA表达水平的提高等. 以含有这种抗黏附多肽的培养基进行培养, 可以有效抑制HSC向成纤维细胞的转化过程. 这一发现对于设计抑制HSC的转化为目的的基因治疗方案提出了可能的途径.

5 肝纤维化的中医药治疗

中医认为,肝纤维化属胁痛、积聚、症瘕等范畴,病因病机多属嗜酒好醴之人,或情志抑郁者,或饮食不洁或常怀愤郁之气,正气内虚,外感湿热疫毒之邪,邪毒阻滞肝经,深伏血分,肝失调达之性,木乘土位,肝脾不和,气血结而不畅,终致气滞血瘀,脏腑机能失调,血脉失养,久而酿成症积之根.根据肝脾的生理病理特性及临证所见,其病机可以明确为肝郁(气滞)血瘀脾虚,此为肝纤时机体基本病理状态.根据患者体质与病情,尚有阴虚、湿热等兼夹证之不同.肝纤乃肝硬变之早期阶段,而从肝郁血瘀脾虚三者病机看,应以肝郁(气滞)血瘀为主,部分可有脾虚存在,故在肝纤阶段病情以实证居多,若病变继续发展则脾虚象逐渐显露.

5.1 中药提取物^[36-37]

5.1.1 汉防己甲素(tetrandrine, Tet) Tet 名汉防己碱、粉防己碱,是从防己科植物粉防己等根中提取的一种属异喹啉化合物的生物碱.防己碱是一种 Ca^{2+} 通道阻滞剂,能够阻滞质膜电压或受体依赖性 Ca^{2+} 通道,抑制细胞外 Ca^{2+} 内流和细胞内 Ca^{2+} 动员,保护肝细胞、心肌细胞、神经细胞等免受毒物及缺血再灌注损伤,但能促进白血病细胞内 Ca^{2+} 动员,诱导细胞死亡;能够下调 T 细胞蛋白激酶 C 信号传导途径,抑制 T 细胞增殖,白介素 2 分泌及 T 细胞激活抗原的表达,且能破坏局势细胞的完整性,抑制其呼吸爆发和致炎因子释放,诱导肿瘤细胞凋亡,下调 P 糖蛋白活性,逆转多药耐药,抑制血小板源生长因子诱导肝星状细胞及肺成纤维细胞增殖及 I 型和 III 型胶原表达.因此粉防己碱具有抗肝纤维化、肺纤维化,降低门脉高压及肺动脉高压,抑炎、抗肿瘤作用.在治疗肝纤维化、门静脉和肺动脉高压,免疫机能调节及肿瘤防治等方面具有很好的应用前景.

5.1.2 扁桃甙(amygdalin)来自桃仁提取物,又称苦杏仁甙.桃仁提取物通过提高肝组织胶原酶活性和抑制 HSC 的活化,并使活化的 HSC 转为静止状态,能有效地抑制胶原等肝 ECM 的合成而促进其降解:肝脏内 I、III 和 IV 型胶原, FN、LN 的降解,显著减少肝纤维化的肝内纤维间隔.扁桃甙可以防止肝纤维化时功能性基底膜的破坏,干扰连续基底膜的形成,抑制肝窦毛细血管化;并可使毛细血管化的肝窦修复.体外试验证实,扁桃甙可抑制活化的 HSC 增殖,减少其合成和分泌胶原,其作用不与剂量成正比.对血吸虫肝硬变患者,他能使肝脏缩小,尿羟脯氨酸(Hyp)排泄量及肝血流量增加.

5.1.3 苦参碱\苦参素 苦参碱\苦参素是中药苦豆子提取的有效成分,具有抗炎作用及抑制某些细胞因

子的产生.我们实验研究表明,苦参素能显著减轻肝细胞变性、坏死及纤维组织的形成,同时能降低不同实验阶段血清 ALT、HA 以及肝组织中 Hyp 含量.证明其有防治实验性大鼠肝纤维化的作用^[38].

5.1.4 丹酚酸 B(magnesium lithospermate B, LSA-B) LSA-B 是从丹参中分离出的一种水溶性成分,可显著降低血清 ALT、AST 活性,减轻肝细胞坏死,抑制纤维增生,降低肝组织羟脯氨酸含量. LSA-B 还可通过抑制脯氨酸羟化酶和赖化酶的活性,从而抑制成纤维细胞的胶原分泌,但不影响 DNA 或非胶原蛋白的合成. LSA-B 能在体外抑制 HSC 增殖,减少其胶原合成和分泌.

5.1.5 虫草多糖脂质体 冬虫夏草含有虫草菌丝、虫草多糖、虫草酸、冬虫夏草素脂肪、粗蛋白质和纤维等.冬虫夏草具有激活肝脏库普弗细胞的作用,提高小鼠腹腔巨噬细胞吞噬能力、促进细胞免疫功能,具有延缓或阻断肝纤维化的形成作用.虫草菌丝和虫草多糖均能抑制 HSC 的增殖和转化,从而减少胶原合成及在肝窦的沉积.研究发现虫草多糖脂质体通过增加肝组织胶原酶 mRNA 表达而可能促进 III 型胶原降解.经治疗肝脏胶原酶含量增高,他还能明显增强 T 细胞免疫功能,改善肝功能促进吞噬及增强免疫应答.此两方面是其抗肝纤维化的两条途径.

5.1.6 川芎嗪 以川芎嗪治疗慢性肝病患者,治疗后血脂质过氧化物、ALT、白蛋白、门静脉直径、肝右斜径均明显改善.提示川芎嗪注射液对慢性肝病有明显的治疗作用^[39].

5.1.7 水飞蓟素 水飞蓟素是从植物大蓟中分离出的主要成分,临床上已应用多年.随机对照实验表明,水飞蓟素可以抑制 HSC 增殖、分化,降低胶原、I 型前胶原水平,下调转化生长因子 $\beta 1$ 的水平,抑制 TIMPs mRNA 的活性^[40].

5.1.8 白藜芦醇苷 是从虎杖中提取出的 5 种结晶中的第 4 种.白藜芦醇苷作用于肝细胞后,能降低邻苯三酚引起的一氧化氮(NO)和丙二醛升高,抑制 NO 氧化酶活性,升高超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶活性,减少谷胱甘肽消耗,降低邻苯三酚导致的细胞悬液中 ALT 浓度增高,抑制 HSC 增殖及胶原产生.

5.1.9 大黄素 大黄素是大黄、虎杖、何首乌、望江南、砂仁及百合等多种中药的有效成分之一.采用 CCl_4 大鼠模型,并以 3 种不同剂量的大黄素进行干预,结果大黄素组较模型组 HA、层粘连蛋白显著降低,肝组织胶原蛋白明显减少,肝组织纤维化程度明显改善,肝细胞损伤减轻.提示大黄素对大鼠肝纤维化具有治疗作用.

5.2 单味中药

5.2.1 黄芪 有研究表明,黄芪能明显降低主动脉和肝内的胶原含量.实验结果显示,黄芪可明显减少总

胶原及 I 和 IV 型胶原在大鼠肝脏的病理性沉积,使胶原蛋白含量明显下降;电镜观察显示经黄芪治疗后肝细胞变性坏死明显减轻,巨噬细胞吞噬功能活跃,纤维隔有溶解、吸收趋势,说明黄芪对实验性纤维化有治疗作用,且随疗程延长而作用有所增强。

5.2.2 虫草菌丝 用虫草菌丝防治实验性免疫损伤性肝纤维化,研究表明该中药不但能减轻肝脏炎症细胞浸润及肝细胞变性坏死,能抑制 I、III 型胶原沉积,而且能使已形成的胶原降解、吸收,此作用可能与虫草菌丝增加胶原酶活性有关。另外,他能提高机体免疫功能,加强病毒清除能力,较适于病毒性肝炎的反复炎症所致肝纤维化的治疗。

5.2.3 丹参 丹参注射液可以降低肝内胶原蛋白含量,增加尿羟脯氨酸的排泄,丹参组肝内无纤维增生或仅有轻度增生,肝细胞结构基本恢复正常。说明丹参可促进已形成的胶原纤维降解,即促进肝纤维重吸收作用。进一步研究发现,丹参能明显抑制肝纤维化大鼠 I、III 和 IV 型胶原的病理性增加,减少肝内胶原、FN、及 LN 含量;抑制 HSC 转化为成纤维细胞及成纤维细胞的核分裂和增殖。另外,由于丹参还具有促进坏死细胞修复和肝再生,护肝降酶,改善微循环,抗肝脂质过氧化损伤等作用,间接抑制了 HSC 激活因素,发挥抗纤维化作用。

5.3 中药复方制剂^[36, 40]

5.3.1 汉丹制剂类方 国内应用汉丹必妥(汉防己、丹参、赤芍、败酱草、马蹄金、马鞭草等)治疗慢性肝纤维化患者 20 例,3 mo 后患者血清中 HA、LN、PC 明显下降,说明近期内有良好抗肝纤维化作用,还可抑制胶原蛋白合成,促进胶原分解。

5.3.2 清热利湿方药 该方药可防止肝细胞变性,保持细胞膜的完整性和细胞器的结构正常,并有促进细胞增生作用,且抑制胶原等物质的合成与分泌,加速其降解和吸收,从而起到防治肝纤维化的作用。

5.3.3 血府逐瘀汤 动物实验表明血府逐瘀汤组有显著抗胶原沉积作用,且明显优于秋水仙碱。血府逐瘀汤能同时抑制 I 型胶原生成和沉积,明显优于秋水仙碱组。

5.3.4 小柴胡汤 日本学者研究得出结论,小柴胡汤提前使用 3 mo,可使猪血清和二甲基亚硝胺诱生的羟脯氨酸升高受到显著抑制,且能阻止病理性凝血酶原时间延长,其抗肝纤维化作用强于大柴胡汤。

5.3.5 扶正化瘀方 采用整体给药、分离血清的血清添加法对扶正化瘀方进行体外实验,结果发现扶正化瘀方药物血清有促正常肝细胞增殖的作用,而能明显降低肝细胞外胶原水平,显著抑制肝细胞胶原生成率;且该方药物血清能明显抑制原代培养的纤维肝细胞的增殖及其胶原生成率,促进纤维肝细胞白

蛋白分泌量。应用该复方治疗慢肝患者,发现治疗后血清 MAO 活性、P III P、HA 及 LN 含量均显著下降,肝组织学变化改善。

5.3.6 复方丹参(861 冲剂) 系根据益气活血、养血柔肝原则配制而成的复方,主要由丹参、黄芪、鸡血藤等 10 味中药组成。用于治疗慢性肝炎和早期肝硬化 60 例,结果表明连服 2 a 以上可明显改善症状,且 ALT 保持正常不再波动者占 70%,白蛋白保持到正常水平,已升高的球蛋白有下降趋势。治疗 6 mo、2 a 其 P III P 均值较治疗前下降至接近或达到正常范围, LN 降至正常范围内。对 CCl₄、白蛋白所致两种大鼠纤维化模型均有治疗作用,可使肝组织中网状纤维、结缔组织增生及沉积均受抑制。其机制是通过抑制 HSC 的活化,减少 TGF- β 1 mRNA 的表达及相应蛋白的产生,从而抑制肝脏总胶原和 I、II、V 型胶原的生物合成,并促进胶原的降解^[41]。

6 问题及展望

过去 10 多年来有关 HSC 的细胞生物学研究取得了巨大的进展。可以预见,对肝纤维化发生的分子机制的认识将持续深入^[42]。不久的将来,以此为基础的各种抗纤维化治疗将逐步进入临床试用阶段。但在目前,仍未对许多关键问题作出回答,尤其是在进行抗肝纤维化治疗时这些问题应给予考虑。这些问题包括以下几个方面:(1)各种原因所制的肝纤维化之间是否存在差异。目前我们认为,在各种原因所制的肝纤维化中,HSC 所发生的反应是一样的,这种观点可能过于简单化,如在病毒性及酒精性肝损伤中,HSC 的反应可能表现出微小的,然而可能是非常重要的差别,这种差别还可能同治疗有着密切关系^[43];(2)如何区分可逆性与不可逆性肝纤维化。虽然已知肝纤维化是可以逆转的,但不清楚肝纤维化何时会变得不可逆转,包括确定其组织学标志及其基质组成或含量的特异性改变等。对尚处于可逆转期的肝纤维化进行抗纤维化治疗,才有可能取得最佳的治疗效果;(3)宿主因素在调节 HSC 激活及肝纤维化中的作用。最近的研究提示^[44],宿主的免疫表型是决定宿主的纤维化反应性质的一个重要因素。但目前尚不清楚不同株小鼠间纤维化反应的差异仅仅由免疫效应细胞的差异引起或是由不同株小鼠间 HSC 的内在差异(inherent difference)所致^[45];(4)类维生素 A(retinoids)在 HSC 激活中的作用。这是一个非常重要但尚未作出明确回答的问题,对这一问题的深入研究将为寻找新的抗纤维化药物提供线索;(5)如何将 HSC 作为抗肝纤维化治疗中的药物作用靶。由于 HSC 在肝纤维形成过程中起着至关重要的作用,许多学者试图通过干扰 HSC

的功能来达到预防或治疗肝纤维化之目的. 但由于HSC上不存在任何完全特异的基因或受体分子等, 任何对HSC某项功能的干预都须考虑对肝内或肝外其他细胞的副作用. 今后研究肝纤维化逆转的方向: (1) 中医中药治疗肝纤维化、肝硬化的长期疗效有待考察^[46]; (2) 肝纤维化乃至肝硬化发展到何种程度即不再能逆转^[47-48]? (3) 如何合并使用抗病毒治疗以增加治疗肝纤维化的疗效^[49]; (4) 急需建立稳定的无创性评价指标反应肝纤维化的消长^[50-51].

7 参考文献

- Murphy F, Arthur M, Iredale J. Developing strategies for liver fibrosis treatment. *Expert Opin Investig Drugs* 2002;11:1575-1585
- 刘泽富, 聂青和. 病毒性肝炎的诊断和治疗. 第一版, 北京: 人民军医出版社, 2001:201-221
- Lai CL. Therapeutic advances in chronic hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol* 2004;19(Suppl):S5-9
- 聂青和. 肝硬化. 见:李梦东, 王宇明. 实用传染病学. 第三版, 北京: 人民卫生出版社, 2004:1439-1452
- Czaja AJ, Carpenter HA. Progressive fibrosis during corticosteroid therapy of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2004;39:1631-1638
- Bedossa P, Paradis V. Approaches for treatment of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Clin Liver Dis* 2003;7:195-210
- Arthur MJ. Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following treatment for hepatitis C. *Gastroenterology* 2002;122:1525-1528
- Lieber CS. Prevention and treatment of liver fibrosis based on pathogenesis. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:944-949
- 聂青和, 周永兴, 谢玉梅. 肝硬化患者血清、肝组织中金属蛋白酶组织抑制因子的表达及意义. 中华医学杂志 2001;81:805-807
- 谢玉梅, 聂青和, 周永兴, 黄长形, 康文臻, 张岩, 郝春秋, 王九平, 朱晓慧. 中药双甲五灵冲剂对免疫性肝纤维化大鼠肝组织中 TIMPs 蛋白及基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:199-203
- Beljaars L, Meijer DK, Poelstra K. Targeting hepatic stellate cells for cell-specific treatment of liver fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:e214-222
- Pinzani M, Rombouts K. Liver fibrosis:from the bench to clinical targets. *Dig Liver Dis* 2004;36:562-563
- Cales P. Apoptosis and liver fibrosis:antifibrotic strategies. *Biomed Pharmacother* 1998;52:259-263
- Kershenobich D, Uribe M, Suarez GI, Mata JM, Perez-Tamayo R, Rojkind M. Treatment of cirrhosis with colchicine. A double-blind randomized trial. *Gastroenterology* 1979;77:532-536
- Metwally MA, Zein CO, Zein NN. Regression of hepatic fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C treated with interferon-based therapy. *Gastroenterology* 2003;124:1561
- Dienstag JL, Perrillo RP, Schiff ER, Bartholomew M, Vicary C, Rubin M. A preliminary trial of lamivudine for chronic hepatitis B infection. *N Engl J Med* 1995;333:1657-1661
- 聂青和. 拉米夫定应用中的问题及处理. 中国实用内科杂志 2004;24:457-459
- 张绪清, 聂青和. 糖皮质激素在治疗重型肝炎中的应用及评价. 实用肝脏病杂志 2004;7:70-72
- Ruwart MJ, Wilkinson KF, Rush BD, Vidmar TJ, Peters KM, Henley KS, Appelman HD, Kim KY, Schuppan D, Hahn EG. 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
- Shimizu I, Ichihara A, Nakamura T. Hepatocyte growth factor in ascites from patients with cirrhosis. *J Biochem* 1991;109:14-18
- Ikeda H, Nagoshi S, Ohno A, Yanase M, Maekawa H, Fujiwara K. Activated rat stellate cells express c-met and respond to hepatocyte growth factor to enhance transforming growth factor beta1 expression and DNA synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;250:769-775
- Ferro D, Basili S, Pratico D, Iuliano L, FitzGerald GA, Violi F. Vitamin E reduces monocyte tissue factor expression in cirrhotic patients. *Blood* 1999;93:2945-2950
- Utsunomiya T, Okamoto M, Hashimoto M, Yoshinaga K, Shiraishi T, Tanaka F, Mimori K, Inoue H, Watanabe G, Barnard GF, Mori M. A gene-expression signature can quantify the degree of hepatic fibrosis in the rat. *J Hepatol* 2004;41:399-406
- 聂青和. 基因疫苗的研究进展. 见:李梦东, 王宇明. 实用传染病学. 第三版, 北京: 人民卫生出版社, 2004:282-291
- 聂青和, 高巍. 转化生长因子- β 1 在肝纤维化研究及应用中的意义. 肝脏 2004;9:202-204
- Ueki T, Kaneda Y, Tsutsui H, Nakanishi K, Sawa Y, Morishita R, Matsumoto K, Nakamura T, Takahashi H, Okamoto E, Fujimoto J. Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. *Nat Med* 1999;5:226-230
- Nie QH, Cheng YQ, Xie YM, Zhou YX, Bai XG, Cao YZ. Methodologic research on TIMP-1, TIMP-2 detection as a new diagnostic index for hepatic fibrosis and its significance. *World J Gastroenterol* 2002;8:282-287
- Nie QH, Cheng YQ, Xie YM, Zhou YX, Bai XG, Cao YZ. Inhibiting effect of antisense oligonucleotides phosphorothioate on gene expression of TIMP-1 in rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001;7:363-369
- 聂青和, 周永兴, 谢玉梅, 程勇前. 硫代反义寡核苷酸对实验性肝纤维化大鼠 TIMP-1 基因及蛋白表达的抑制作用. 中华传染病杂志 2001;19:208-211
- 罗红, 聂青和, 谢玉梅, 周永兴, 程勇前. 抑制 TIMP-1 的硫代反义寡核苷酸在肝纤维化大鼠体内生物学分布及药代动力学研究. 肝脏 2002;7:237-239
- Rai R, Wilson LE, Astemborski J, Anania F, Torbenson M, Spoler C, Vlahov D, Strathdee SA, Boitnott J, Nelson KE, Thomas DL. Severity and correlates of liver disease in hepatitis C virus-infected injection drug users. *Hepatology* 2002;35:1247-1255
- Iredale JP. A cut above the rest? MMP-8 and liver fibrosis gene therapy. *Gastroenterology* 2004;126:1199-1201
- 聂青和. 肝干细胞. 见:姚光弼. 临床肝脏病学. 第一版, 上海: 上海科学技术出版社, 2004:939-952
- Shibata N, Watanabe T, Okitsu T, Sakaguchi M, Takesue M, Kunieda T, Omoto K, Yamamoto S, Tanaka N, Kobayashi N. Establishment of an immortalized human hepatic stellate cell line to develop antifibrotic therapies. *Cell Transplant* 2003;12:499-507
- Battaller R, Brenner DA. Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis. *Semin Liver Dis* 2001;21:437-451
- Yang H, Chen Y, Xu R, Shen W, Chen G. Clinical observation on the long-term therapeutic effects of traditional Chinese medicine for treatment of liver fibrosis. *J Tradit Chin Med* 2000;20:247-250
- Geng XX, Yang Q, Xie RJ, Luo XH, Han B, Ma L, Li CX, Cheng ML. In vivo effects of Chinese herbal recipe, Danshaohuaxian, on apoptosis and proliferation of hepatic stellate cells in hepatic fibrotic rats. *World J Gastroenterol* 2005;11:561-566
- 康文臻, 谢玉梅, 聂青和, 张岩, 郝春秋, 王久平, 陈伟红. 苦参素对实验性大鼠肝纤维化防治作用的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:195-198
- 聂青和. 临床肝硬化. 见:王宇明. 名院名医—感染病特色治疗技术. 第一版, 北京: 科学技术文献出版社, 2004:560-575
- 孙玉凤, 姚希贤, 蒋树林. 肝纤维化的中医中药治疗. 世界华人消化杂志 2000;8:686-687
- 王宝恩. 复方 861 对肝炎肝纤维化疗效的病理组织学分析. 中华肝脏病杂志 1997;5:77-78
- Chang XM, Chang Y, Jia A. Effects of interferon-alpha on expression of hepatic stellate cell and transforming growth factor-beta1 and alpha-smooth muscle actin in rats with hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2005;11:2634-2636

- 43 Albanis E, Friedman SL. Hepatic fibrosis. Pathogenesis and principles of therapy. *Clin Liver Dis* 2001;5:315-334
- 44 Kikuchi K, Lian ZX, Yang GX, Ansari AA, Ikehara S, Kaplan M, Miyakawa H, Coppel RL, Gershwin ME. Bacterial CpG induces hyper-IgM production in CD27 (+) memory B cells in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 2005;128:304-312
- 45 Orr JG, Leel V, Cameron GA, Marek CJ, Haughton EL, Elrick LJ, Trim JE, Hawksworth GM, Halestrap AP, Wright MC. Mechanism of action of the antifibrogenic compound gliotoxin in rat liver cells. *Hepatology* 2004;40:232-242
- 46 朱永红, 聂青和. 肝纤维化发生机制的研究进展. 实用肝脏病杂志 1998;3:189-191
- 47 谢玉梅, 聂青和, 周永兴. 免疫诱导型与毒素诱导型大鼠肝纤维化模型差异比较. 中华实验外科杂志 2002;19:S215-217
- 48 Nie QH, Duan GR, Luo XD, Xie YM, Luo H, Zhou YX, Pan BR. Expression of TIMP-1 and TIMP-2 in rats with hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2004;10:86-90
- 49 Farci P, Roskams T, Chessa L, Peddis G, Mazzoleni AP, Scioscia R, Serra G, Lai ME, Loy M, Caruso L, Desmet V, Purcell RH, Balestrieri A. Long-term benefit of interferon alpha therapy of chronic hepatitis D: regression of advanced hepatic fibrosis. *Gastroenterology* 2004;126:1740-1749
- 50 罗新栋, 聂青和. 金属蛋白酶组织抑制因子在肝纤维化研究中的价值. 肝脏 2003;8:40-42
- 51 Xu L, Hui AY, Albanis E, Arthur MJ, O'byrne SM, Blaner WS, Mukherjee P, Friedman SL, Eng FJ. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut* 2005;54:142-151

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

中国生物医学基金论文摘要网站免费开通

本刊讯 中国生物医学基金论文摘要是由世界胃肠病学杂志社研制的大型生物医学基金论文摘要数据库. 该库收录自 1995-2004 年, 国内生物医学期刊 1191 种发表的各类基金资助论文摘要 155115 条, 其中国家基金资助的论文为 70167 条(45.23%), 其他基金资助的论文为 84948 条(54.76%).

1 本系统的功能

电子杂志: 关键词搜索, 高级搜索(期刊全名、ISSN、年度、单位、题名、摘要、作者、资助), 期刊搜索(A-Z 排序). 论文排序: 期刊论文数, 点击论文数.

2 网址

中国生物医学基金论文摘要(<http://www.wjgnet.com/cmfa/index.jsp>)

3 论文摘要格式

贺修胜, 陈主初, 田芳, 肖志强, 贺智敏, 关勇军, 李峰, 何春梅, 袁建辉. 鼻咽癌中染色体

3p21 区域一个表达下调的 EST 的鉴定. 癌症 2003 年;22(1): 1-5

鼻咽癌中染色体 3p21 区域一个表达下调的 EST 的鉴定

贺修胜, 陈主初, 田芳, 肖志强, 贺智敏, 关勇军, 李峰, 何春梅, 袁建辉.

湖南 长沙中南大学肿瘤研究所 410078

国家自然科学基金项目 (39970287, 30000188)

背景与目的: 研究显示鼻咽癌细胞 3p14-25 存在高频率杂合性丢失位点. 本研究拟寻找与筛选染色体 3p21 区域与鼻咽癌相关的表达序列标签(expressed sequence tag, EST), 为定位候选克隆鼻咽癌相关新基因奠定基础. 方法: 充分利用网上的生物信息资源, 采用定位查找 ESTs, 对 ESTs 进行同源性比较分析、筛选; 运用逆转录 PCR(reverse transcription-PCR, RT-PCR)方法, 检测 ESTs 在鼻咽癌和正常鼻咽组织中的表达; 并用 Northern blot 杂交方法, 检测 EST 在人其他正常组织及肿瘤细胞系的表达状况. 结果: 在 3p21 区域筛选到一个在鼻咽癌中表达下调的 EST(N31985), 在 60.00%(3/5)的鼻咽癌细胞株及 47.06% (16/34)的鼻咽癌活检组织检测到有 EST (N31985)表达下调, 与正常鼻咽上皮组织相比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$). 结论: 染色体 3p21 区域 EST(N31985)在鼻咽癌中表达下调, 提示其可能参与鼻咽癌癌变过程. (世界胃肠病学杂志 2004-06-15)