

● 综述

肝纤维化研究概述 (下)

蔡卫民 陈 峰

(浙江医科大学传染病研究所, 浙江, 310003)

3 抗肝纤维化的治疗新进展与评价

3.1 对肝纤维化治疗的新认识

从本质上讲, 慢性肝病的治疗就是肝纤维化的治疗, 主要是祛除原发病的病因和抗肝纤维化治疗, 因此肝纤维化的治疗与抗肝纤维化治疗有不同的概念与范围。关于抗肝纤维化治疗经过多年的动物实验(血吸虫病肝纤维化)与临床观察, 有几方面已趋明朗^[14]: ①彻底治疗原发病不能完全代替抗肝纤维化治疗, 尤其在血吸虫病肝纤维化已获肯定结果, 在近期我们对已达消灭血吸虫病地区进行 B 超检查, 尚有 19.32% (219/1133) 的村民肝实质有回声增强、增粗及网状结构的改变。国外已有人提出杀虫治疗(吡喹酮)同时进行抗肝纤维化治疗。临床上亦见乙型肝炎后肝硬化、血清 HBV 标志已转阴, 但肝纤维化仍在进展; ②抗肝损(抗炎和抗肝坏死)药物与抗肝纤维化治疗不同。肝损伤是致肝纤维化的始动原因, 抗肝损伤的药物可影响胶原的合成, 当然对肝纤维化有利。某些中药可能具有抗肝损伤作用, 而列入抗肝纤维化药物。因此抗肝纤维化药物应在祛除致病因素后, 对仍在进展中的肝纤维化具有抑制肝脏胶原合成、分泌与沉积作用, 促进肝脏纤维化降解作用。抗肝损伤药物可列为与肝纤维化有关药物; ③动物实验结果与临床差距甚大; ④不同程度(轻、中、重)和不同时期(早、中、晚)肝纤维化治疗方法和疗效不同。

3.2 抗肝纤维化治疗药物的分类与应用

严格地讲哪些药物应属抗肝纤维化药物仍不十分清楚, Wu J 1994^[15]将目前的: 抗肝纤维化药物”分为抑制间质合成、分泌、沉积和促进间质降解四类。但 Wu J 将吡喹酮列入此中, 可能不十分确切, 已间接说明目前尚没有统一的看法。

3.3 基因治疗

近年基因治疗技术进展较大, 现扼要介绍如下。

3.3.1 基因治疗方法

肝病基因治疗可分为基因替代(置换)、基因修正、基因修饰和基因失活。肝纤维化中无基因异常, 主要是某些基因过度表达, 某些基因表达不足, 需进行基因修饰, 就是将外源基因导入病变发生的细胞或其他细胞, 转导基因表达产物替代致病基因的功能异常, 而致病基因序列本身未发生改变; 还可运用反式调节机理及反义技术失活特定基因表达(即基因失活)。对肝纤维化中激活并过度表达的胶原基因的抑制, 甚至封闭其基因表达具有广阔应用前景。广义地讲许多影响基因表达的药物亦属基因治疗范畴。

3.3.2 基因转导技术

基因治疗大体上涉及到确定目的基因、靶细胞、靶器官(靶组织)。首先要将目的基因转导至靶细胞里, 其方法有体外与体内基因转导技术。现已确定病毒可作转导(染)细胞的高效载体, 特别是逆转录病毒。从 LDL 受体缺乏患者自身采集肝细胞, 用含有 LDL 受体的基因的逆转录病毒转染后, 进行自体肝细胞移植, 治疗 LDL 受体缺乏所致的家族性高胆固醇血症已获成功。

3.3.3 设想中肝纤维化的基因治疗

靶基因可能是胶原与某些细胞因子基因, 靶细胞可能是贮脂细胞(早期)与成纤维细胞(晚期), 靶器官可能是肝脏。此种治疗可能是较抗病毒治疗容易些, 望有条件单位能进行协作攻关, 期望在短期内能在动物实验从体外到体内进行研究试验, 进入临床试验恐非短期内能达到目的。基因治疗是正在快速发展成为极有前途的治疗人类疾病的方法。

3.4 已应用于临床的药物

3.4.1 关于 IFN- γ

关于 IFN- γ 对肝脏胶原合成的影响的研究至今已有 20 多年的历史,可分为:①体外实验研究 Jimenez 等 1984^[16]报道 IFN- γ 选择抑制二倍体成纤维细胞的胶原合成。次年 Duncan 等^[17]报道 IFN- γ 抑制成熟期成纤维细胞的增生,其后有用多种细胞进行体外研究。Mallat 等^[18]报道 IFN- γ 具有抑制人体正常肝脏的贮脂细胞的增殖与胶原的合成,减少该细胞 I、III 型前胶原 mRNA 的表达。另有报道人纤维化肌成纤维细胞体外培养中,IFN- γ 减少胶原的合成。1995 年美国肝病年会^[19~20]有报道认为 IFN- γ 具有促进肝脏星状细胞 I 型胶原的降解。Morita 等^[21]报道用鼠肝细胞作体外研究,显示 IFN- γ 对肝细胞亦有损伤作用。体外实验研究结果与不同细胞株、原代培养还是多次传代培养、在细胞的分离过程中所致细胞表现型的改变,以及分离细胞的纯度有关;各种细胞因子的剂量,多种细胞因子例如 TNF- α 的作用有剂量依赖关系;观察使用方法的可靠性,即使方法可靠,还有试剂问题,因此在分析时应全面考虑。②动物实验研究:Granstein 等^[22]用小鼠动物实验研究,显示 IFN- γ 能抑制胶原的合成。Czaja 等^[23]报道曼氏血吸虫感染的鼠肝纤维化动物模型,用 IFN- γ 每天肌注 5 万^U~10 万^U,共 4 周,结果发现肝总胶原含量大大下降,用 Northern blot 法分析可见 I、III 型前胶原 mRNA 水平分别为单纯感染(未用 IFN- γ 处理组)的 32%和 29%,认为体内研究显示 IFN- γ 具有抗肝纤维化作用。③临床研究:Saez-Royuela 等^[24]报道用重组 IFN- γ ,以人体表面积每平方米 200 万^U,每周 3 次皮下注射,连用 6 个月,肝组织活动系数(HAI)从治前的 7.7 ± 1.6 降至治后的 6.3 ± 1.4 ,而肝纤维化程度分级由 1.2 ± 1.0 降至 0.7 ± 1.0 ,仅有 6 例,统计学处理未见显著性差异,而同时有 6 例用 A 治疗,治疗前 HAI 为 9.8 ± 1.6 ,治疗后降至 5.7 ± 3.7 ,而肝纤维化程度分级治疗前、后均为 1.4 ± 1.1 ,此提示 TNF- α 对肝纤维化作用不大,但近有体外实验与临床认为 TNF- α 有一定抗肝纤维作用,可能通过抑制病毒而起作用。Hayasaka 等报道 IFN- γ 治疗慢性乙肝,测定血清 P-III-P、CIV-7s 水平,治后均有明显下降作者称此是首次显示 IFN- γ 对肝纤维化临床治疗有效。我们正在试用国

产重组 IFN- γ 治疗慢性肝炎肝纤维化,初步认为有较好疗效,副作用少,偶有头晕、发热、关节痛、皮疹、白细胞减少等。

3.4.2 秋水仙碱

1975 年 Rorind Kershenobich^[25]用肝硬变鼠肝切片研究秋水仙碱,发现其对胶原合成具有抑制作用。1988 年 Kershenobich 等发表秋水仙碱治疗肝硬变的临床研究报告,称具有延长肝硬变患者的存活率,主要作用是损害微管系统,干扰胶原分泌,还有促进巨噬细胞胶原酶的表达,并抑制多种细胞因子的分泌,认为秋水仙碱具有抗炎和抗肝纤维化的作用。从 1992~1995 年来国内外已有数篇报道,均认为秋水仙碱对肝炎后肝硬变无效。Pinto 等报道用双盲随机试验用秋水仙碱治疗酒精性肝纤维化。治疗组(20 例)服秋水仙碱 1mg/d, 5d/W, 对照组服外观相同的安慰剂,连续服药,两组在 19.5 ± 9 和 16.1 ± 1 月后随访,结果两组患者均有较好的耐受性,但多种生化指标均无明显好转。Mansower 等^[26]报道秋水仙碱具有抑制鼠血吸虫病肝成纤维细胞的胶原合成作用。Andrade 等^[27]两次实验用秋水仙碱治疗鼠曼氏血吸虫病,发现鼠肝细胞给予秋水仙碱即有微管变化,但仅见成纤维样细胞具有空泡扩张,未见胶原沉积减少,故认为秋水仙碱未能预防又未能消除血吸虫病肝纤维化。综国内外及我们对多年秋水仙碱进行的临床研究,大致可认为秋水仙碱(1mg/d)是安全、价廉但抗肝纤维化作用不够理想和需长期服用药物。近 Rndi 等^[28]报道慢性肝病患者,长期服用秋水仙碱(1mg/d),药物动力学研究显示在晚期肝病患者有蓄积作用。为寻找更为理想的药物,在进行抗肝纤维化药物研究时,秋水仙碱仍不失为一个随机、双盲对照药物。

3.4.3 汉防己甲素

已有体外实验、动物实验与临床研究显示汉防己甲素有较好的抗肝纤维化作用,汉防己甲素是一种钙通道阻滞药物,权启镇等^[29]用于临床,50mg, 3 次/天,6 个月为一疗程,使用 2~6 个疗程;治后血清 P-III-P、HA 均有明显下降,治疗达 36 个月者 93 例,肝活检肝纤维化消失 14 例(15.1%),明显减轻 54 例(58.1%),轻度减轻 19 例(20.4%),总有效率达 93.6%。此值得进一步研究。

3.4.4 酰羟化酶抑制剂

脯氨酰羟化酶在胶原合成中起关键作用。它的产物 4-羟脯氨酸残基可使胶原的超螺旋结构保持稳定,而不被溶解。许多脂肪族和芳香族化合物与一氧化戊二酸盐竞争抑制羟化酶的活性。其中最有效的是吡啶-2,4-双羧酸二乙胺(S₀₈₈₅)和吡啶-2,4-羧酸二酰胺(HOE₀₇₇),它们能有效降低肝内羟脯氨酸含量,近有报道后者能抑制 FSC 活性,使 I、III 型胶原大大下降^[30]。健康人及第 1 期临床使用没有明显副作用,进入第 2 期临床研究,发现可致白内障而被中止研究。现有其衍生物正在研究中。

3.4.5 马洛替酯

80 年代就已经有许多细胞培养和动物实验研究马洛替酯的抗肝纤维化效果。发现它能保护肝细胞、降低肝纤维化程度,改善肝功能并能促进正常肝细胞的蛋白质合成。因此曾一度广泛用于临床治疗肝纤维化,然而进一步研究发现,它的抗肝纤维化效果不明显,且有许多严重的并发症。于 1988 年被禁止使用^[31]。

3.5 中医中药治疗肝纤维化的研究

近几年来,中医药对乙、丙型肝炎肝纤维化的认识及治疗已屡有报道,对肝纤维化病机的认识大致有气滞血淤、肝郁痰阻、气虚湿停及肝肾亏虚等。治疗研究较深入的是北京中日友好医院王宝恩等的复方丹参 861 方,徐列明等的桃仁提取物,刘成等报道的扶正祛淤方,均获一定疗效。从现有资料来看,由于各地立法治疗尚无统一规律,缺乏统一设计及对比研究,不少研究仅局限于动物实验,在广度和深度上都有待深化,但从国内大量工作来看,中药治疗肝纤维化还需多方协作,进行多中心,重复临床研究。

4 肝纤维化研究中值得重视的问题

(1) 对体外实验与动物实验结果的解释应谨慎。体外细胞培养研究结果至少有①细胞在体外的环境完全不同体内,前已述 ECM 对细胞有很大影响,目下尚无与体内相同的培养基可供研究应用;②随培养时间的延长,细胞发生表型的变化,特别是 HSC;③细胞分离纯度难达 100%,早期分离肝细胞的研究表明有合成胶原作用,现知其中混有 HSC。动物实验与人体肝纤维化形成的差距甚大。近有报道 HBV 有表达能提高转染者 I、III 型胶原的表达,结论是 HBV 感染能促进 I、III 型胶原的转录,诱导肝纤维化的发生。但

在临床工作中,见诸多 HBV 感染者,并无明显的肝纤维化发生。动物实验观察时间均较短,多用损肝药物诱导肝纤维化,许多研究的结论是在肝脏急性炎症阶段所进行的观察结果,区分抗肝损伤、抗炎作用与抗肝纤维化作用的药物有困难。因此需找好的模型,用胆固醇和乙底酚诱发肝纤维化研究的动物模型值得重视。

(2) 应用 PCR 法测 ECM、细胞因子、MMP、TIMP 等及其受体的 mRNA 研究正在掀起,无疑从分子水平推动肝纤维化的研究,因前述的某些物质的 mRNA 在正常人可能存在,半定量法的结果可能不可信。现诸多的定量 PCR 方法,也不很理想,根据自己实验条件,建立可行的、可信的、稳定性、重复性好的定量 PCR 法很重要,但仍不能忽视表达蛋白产物与形态学的研究,从微观(分子水平)到宏观(形态学)均很重要,相互佐证,可能产生不必要的错误结果。很重要的是我们每一个肝纤维化科研工作者,均应虚心向他人学习,互补长短,加强交流与协助,期望有权威性的人物来组织与分工协助,此可大大推进我国的科研工作。

综上所述,仅有动物实验研究证实有较好疗效的药物,而临床研究报道较少,随机、配对和双盲比较研究更少,至今尚难获客观的结果;另一方面未能选择客观、可信的肝纤维化指标供疗效考核,门脉循环血流量、脾脏大小等指标,受多种因素影响,不太理想,近期国内外均在努力寻找较理想的抗肝纤维化药物,但更为重要的是共同协作,进行临床研究,对已有的药物包括中药进行客观的评价,每个省乃至全国需组成肝纤维化临床研究协作组,统一临床方案,需可信的客观的疗效考核指标,又要考虑到国情(患者经济条件能耐受)。一个单位生产出的试剂或研制出的方法,需要经他单位或他省重复研究,以达客观与可信。基因治疗也非遥远的将来。深信不久的将来必有长期服用无毒副作用,仅作用肝脏、抑制肝细胞外间质合成、分泌、促进降解、抑制沉积的药物。

参考文献

- 1 Friedman SL. Molecular fibrogenesis in hepatic injury. Falls Symposium, 1995; 87 (1): 45
- 2 蔡卫民. 从基因水平认识肝纤维化研究新进展. 临床肝胆病杂志, 1995; 11 (增刊): 6
- 3 Hogemann B, Gillessen A, Bocker W, et al. Myofibroblast—

- like cells produce mRNA for type I and III procollagens in chronic active hepatitis. *Scand J Gastroenterol*, 1993; 28 (7): 591
- 4 Weiner FR, Esposti SD, Zern MA, et al. A role for cytokines as regulators of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterol Jpn*, 1993; 28 (Suppl 4): 97
- 5 Blazejewski S, Preaux AM, Mallet A, et al. Human myofibroblastlike cells obtained by outgrowth are representative of the fibrogenic cell in the liver *Hepatology*, 1995; 22 (3): 788
- 6 Gresener AM, Lahme B. Treatment of rat hepatocytes with transforming growth factor β_1 measures their mitogenic activity for cultured fat storing cells. *International Hepatology Communications*, 1995; 4: 94
- 7 Wu J. Detection of hepatic fibrogenesis: A review of available techniques. *Scand J Gastroenterol*, 1995; 30 (9): 817
- 8 李伟道整理. 全国 III 型前胶原协作组. 血清 III 型胶原诊断肝纤维化的临床评价—1199 例测定结果分析. *肝脏病杂志*, 1995; 3 (2): 77
- 9 Murawaki Y, Kusakabe Y, Hirayama C. Serum lysyl oxidase activity in chronic liver disease in comparison with serum levels of prolyl hydroxylase and laminin. *Hepatology*, 1991; 14 (6): 1167
- 10 Collazos J, Diaz F, Genolla J. Serum concentrations of laminin in cirrhosis of the liver *Gut*, 1993; 34 (7): 974
- 11 Diaz F, Collazos J, Genolla J. Serum laminin levels offer only a little additional information in liver disease. *J Clin Gastroenterol*, 1994; 18 (2): 114
- 12 Roulot D, Durand H, Coste T, et al. Quantitative analysis of transforming growth factor β_1 messenger RNA in the liver of patients with chronic hepatitis C: absence of correlation between high levels and severity of disease. *Hepatology*, 1995; 21 (2): 298
- 13 蔡卫民, 孙永良, 张立煌, 等. 肝纤维化血清学诊断指标谱的初步探讨. *中西医结合肝病杂志*, 1995; 5 (1): 3
- 14 蔡卫民. 抗肝纤维化治疗新进展与评价. *临床肝胆病杂志*, 1993; 4: 173
- 15 Wu J. Inhibition of hepatic fibrogenesis: a review of pharmacologic candidates. *Scand J Gastroenterol*, 1994; 29 (5): 385
- 16 Jimenez SA, Freundlich B, Rosenbloom J. Selective inhibition of human diploid fibroblast collagen synthesis by INF. *J Clin Invest*, 1984; 74 (3): 1112
- 17 Duncan MR, Bernan B γ -Interferon is the lymphokine and β -interferon the monokine responsible for inhibition of fibroblast collagen production and late but not early fibroblast proliferation. *J Exp Med*, 1985; 162: 516
- 18 Mallet A, Preaux AM, Blazejewski S, et al. Interferon alfa and gamma inhibit proliferation and collagen synthesis of human iro cells in culture. *Hepatology*, 1995; 21 (4): 1003
- 19 Elias I, Alpini G, Gubba S, et al. Antiproliferation effects of IFN- γ in CCl₄-induced cirrhosis. *Hepatology*, 1995; 22 (4): 277A
- 20 Shi Z, Stewart TA, Rockey DC, et al. Liver injury and fibrosis in IFN- γ gene knock-out mice. *Hepatology*, 1995; 22 (4): 276A
- 21 Morita M, Watanabe Y, Akaike T. Protective effect of hepatocyte growth factor on Interferon- γ induced cytotoxicity in mouse hepatocytes. *Hepatology*, 1995; 21 (6): 1585
- 22 Granstein RD, Murphy GF, Margolis RJ, et al. Gamma-interferon inhibits collagen synthesis in vivo in the mouse. *J Clin Invest*, 1987; 79 (4): 1254
- 23 Czajka MJ, Weiner FR, Takahashi S, et al. γ -Interferon treatment inhibits collagen deposition in murine schistosomiasis. *Hepatology*, 1989; 10 (5): 795
- 24 Saez-Royuela F, Porres JC, Moreno A, et al. High doses of recombinant α -Interferon and γ -Interferon for chronic hepatitis C: a Randomized controlled trial. *Hepatology*, 1991; 13 (2): 327
- 25 Rojkind M, Kershenobich D. Effect of colchicine on collagen, albumin and transferrin. Synthesis by cirrhotic rat liver slices. *Biochim biophys Acta*, 1975; 378 (3): 415
- 26 Mansower MM, Dunn MA, Salah LA. Effect of colchicine on collagen synthesis by liver fibroblasts in murine schistosomiasis. *Clin Chim Acta*, 1988; 177: 11
- 27 Andrade ZA, Medeiros MV, Azevedo TM, et al. Action of colchicine on hepatic schistosomal granuloma. *Mem Inst Oswaldo Gruz*, 1990; 85 (1): 79
- 28 Rndi J, Raedsch R, Gerteis C, et al. Plasma kinetics and biliary excretion of colchicine in patients with chronic liver disease after oral administration of a single dose and after long-term treatment. *Scand J Gastroenterol*, 1994; 29 (4): 346
- 29 权启镇, 孙自勤, 李定国, 等. 钙拮抗剂抗肝纤维化的实验与临床研究. *新消化病学杂志*, 1994; 2 (4): 214
- 30 Wang YJ, Wang SS, Bickel, et al. Mechanism of action of HOE007 — novel antitubercotic with sexspecific effects in liver. *Hepatology*, 1995; 22 (4): 279A
- 31 Hogemann B, Domschke W. Hepatic Fibrosis — current concepts of pathogenesis and therapy. *Gastroenterol JPN*, 1993; 28 (4): 570

(收稿日期: 1997-07-08)