

中國醫藥學院
醫學研究所
碩士學位論文

門脈高壓動物之細胞激素基因表現

Cytokine Gene Expression of Liver in
Animals With Portal Hypertension

指導教授：陳祖裕 副教授 鄭如茜 副教授

The seal of the National Central University Library is a circular emblem. It features the university's name in English, "NATIONAL CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY", around the perimeter. In the center, there are Chinese characters "中央圖書館" (National Central University Library).

研究生：賴學洲

中華民國九十二年七月

中國醫藥學院醫學研究所

碩士候選人學位考試

論文題目

中文 門脈高壓動物之細胞激素基因表現

英文 Cytokine Gene Expression of Liver in Animals

With Portal Hypertension

本論文係 賴學洲 於中國醫藥學院醫學研究所完成之
碩士論文，經考試委員審查及口試合格，特此證明。

考試委員

所長： _____

中華民國 九十二年 七 月 二十六日

摘要

研究目的 探討不同原因導致之肝硬化合併門脈高壓,肝臟組織產生之細胞激素會有何種異同。

研究背景 肝硬化是一種廣泛性的纖維化及再生性結節的病理變化,在臨床上的表徵包括肝功能衰竭和門脈高壓,而衍生的併發症則包括肝腦病變、腹水及自發性細菌性腹膜炎、肝腎症候群、肝肺症候群及靜脈曲張出血等。肝臟纖維化是肝硬化的前驅性病理變化,它涉及好幾種類型的細胞、生長因子及細胞激素等。細胞激素中如甲型腫瘤壞死因子(TNF- α)、乙型變形生長因子(TGF- β)、丙型干擾素(INF- γ)及間白質-10(IL-10)等皆可能扮演了重要的角色。

研究方法 雄性 Sparague-Dawley 大白鼠以隨機分組分別接受門靜脈結紮(PVL組, n = 12)、總膽管結紮(BDL組, n = 14)及「假裝手術」(sham組, n = 16)。PVL組在術後二週及其餘在術後六週取出肝臟組織並貯存於 -70°C 。抽取肝臟組織之RNA後以即時聚合連鎖反應分析肝臟組織的TNF- α 、TGF- β 、IFN- γ 及IL-10等細胞素激 mRNA 的含量,並以 actin mRNA 為肝臟組織 RNA 含量的對照。

研究結果 三組大白鼠(PVL組、BDL組及sham組)肝臟組織之 actin mRNA 以即時聚合連鎖反應檢測所需之週期數依次為 24.32 ± 1.17 、 24.78 ± 0.96 及 25.29 ± 0.81 ; TNF- α mRNA 所需之週期數依次為 30.31 ± 1.34 、 29.40 ± 1.95 及 31.61 ± 1.38 ; TGF- β mRNA 所需之週期數依次為 24.00 ± 1.49 、 23.48 ± 1.36 及 23.95 ± 0.94 ; IFN- γ mRNA 所需之週期數依次為 35.93 ± 0.95 、 37.16 ± 0.78 及 37.51 ± 0.86 ; 以上各種 mRNA 的含量在三組之間並無統計學上的差異,惟 IL-10 mRNA 所需之週期數依次為 23.61 ± 1.28 、 30.01 ± 1.35 及 24.47 ± 1.72 , 其中

BDL 組 IL-10 表現量有意義地低於其他兩組 ($p < 0.05$)。

結 論 本研究的結果顯示，BDL 大白鼠與 PVL 大白鼠肝臟組織 TNF- α 的基因表現在 PVL 及 BDL 大白鼠雖有上升，但未達統計學上的顯著差異；而 TGF- β 及 IFN- γ 的基因表現亦未如預期的增加。至於 IL-10 的基因表現在 BDL 大白鼠則是顯著地下降，其中涉及之機制及在臨床上之意義仍有待進一步之探討。

Abstract

Aims To evaluate the discrepancy of cytokine gene expression between animal models with different mechanism of portal hypertension.

Background Liver cirrhosis is a disease entity characterized by diffuse fibrosis and nodule formation. The clinical manifestations of cirrhosis can be divided into two categories: hepatic failure and portal hypertension. The complications of liver cirrhosis include hepatic encephalopathy, ascites and spontaneous bacterial peritonitis, hepatorenal syndrome, hepatopulmonary syndrome and variceal bleeding. Hepatic fibrosis is a complex process that involves in several cell types, growth factors and cytokines. It has been reported that tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), transforming growth factor-beta (TGF- β), interferon-gamma (IFN- γ) and interleukin (IL)-10 may play important roles in the development and progression of liver cirrhosis.

Methods Male Sparague-Dawley rats were randomly divided into three groups to receive portal vein ligation (PVL group , n = 12), bile duct ligation (BDL group, n = 14) or sham operation (sham group, n = 16). Liver tissue of the rats were obtained 2 weeks after PVL or 6 weeks after BDL or sham operation and stored at -70°C . After the RNA was extracted, mRNA of TNF- α , TGF- β , IFN- γ and IL-10 were detected by real time-polymerase chain reaction (PCR). Actin mRNA in liver tissue was used as control.

Results The numbers of PCR cycles needed to detect the actin mRNA in the three groups (PVL group, BDL group and sham group) were 24.32 ± 1.17 , 24.78 ± 0.96 , and 25.29 ± 0.81 , respectively ($p > 0.05$); those needed to detect the TNF- α mRNA were 30.31 ± 1.34 , 29.40 ± 1.95 , and 31.61 ± 1.38 , respectively ($p > 0.05$); those needed to detect the TGF- β

mRNA were 24.00 ± 1.49 , 23.48 ± 1.36 , and 23.95 ± 0.94 , respectively ($p > 0.05$); and those needed to detect the IFN- γ mRNA were 35.93 ± 0.95 , 37.16 ± 0.78 , and 37.51 ± 0.86 respectively ($p > 0.05$). The number of PCR cycles needed to detect the IL-10 mRNA in the BDL group (30.01 ± 1.35) was significantly greater than those of the PVL group (23.61 ± 1.28) and of the sham group (24.47 ± 1.72) ($p < 0.05$).

Conclusions The TNF- α gene expression in BDL rats and PVL rats tended to be increased, however, it was not significantly different from the control group. Both the TGF- β and IFN- γ gene expressions were not increased as our expectation. In contrast, the gene expression of IL-10 in BDL group was markedly decreased as compared with the PVL group and the sham group. Further investigation is necessary for evaluation of the mechanism of this particular finding.

序言及誌謝辭

兩年了，臨床醫療與研究所兩頭忙的生涯，終將劃上休止符，碩士課程的結束意味著另一醫學研究道路的開始。研究所每一位師長，因為您的熱心親切教導 - 傳道、授業、解惑，使我這兩年得以過得溫馨且充實，感謝您們。未來，我將繼續鑽研、從事研究，並延續師長們的教育精神，將師長的教育理念與學問繼續傳承下去，秉持取之社會、用之社會的精神，貢獻所學服務社會人群。

感謝邱主任昌芳【內科部主任】及陳主任祖裕、伍主任偉華【前消化系主任】、彭主任成元，在您的鼓勵與支持下，才有今日進修的機會。

承蒙指導老師陳主任祖裕，在您豐富的學術涵養下，自始自終殷切及不厭其煩的指導、關懷，受益恩情永銘於心，您是我永誌難忘的師長；更感謝鄭如茜老師的指導及建宇、維洲撥冗在實驗室教導，本論文得以順利完成，在此謹致上十二萬分的謝意。

回首來時路，這兩年，感謝醫院、師長們的大力支持及各位醫師夥伴的協助，減輕了我臨床工作上的壓力，衷心的感謝這些工作同伴伴隨我度過求學的日子，由於大家的照顧與支持，才能讓我順利的完成此論文！感激大家

衷心感謝家人的支持。謝謝！

目 錄

中文摘要.....	3
英文摘要.....	5
序言及誌謝辭.....	7
目錄.....	8
符號與縮寫.....	9
正文.....	10
第一章 前言.....	10
第一節 研究緣起.....	10
第二節 研究目的.....	19
第二章 文獻探討.....	20
第一節 定義.....	20
第二節 門脈高壓動物模式.....	21
第三節 本研究相關之細胞激素.....	21
第三章 研究架構與研究設計.....	25
第一節 研究設計.....	25
第二節 研究架構.....	25
第三節 研究假說.....	25
第四章 研究材料及統計方法.....	26
第一節 門脈高壓動物模式.....	26
第二節 肝臟組織 RNA 的萃取.....	27
第三節 即時聚合 連鎖反應.....	29
第四節 數據與統計.....	30
第五章 研究結果.....	32
第一節 大白鼠之術後狀況.....	32
第二節 聚合 連鎖反應檢測結果.....	32
第六章 討論.....	39
第一節 結果討論.....	39
第二節 其他相關性討論.....	41
第三節 研究限制.....	43
第七章 結論與建議.....	45
第一節 結論.....	45
第二節 建議.....	45
參考文獻.....	46
個人履歷.....	62

符號與縮寫

ANOVA : analysis of variance
BDL : bile duct ligation
cNOS : constitutive NOS
COX : cyclo-oxygenase
CSF : colony stimulating factors
CSIF : cytokine synthesis inhibitory factor
ecNOS : endothelial cNOS
ET : endothelins
HSC : hepatic stellate cells
IFN- γ : interferon- γ
IL : interleukin
iNOS : inducible NOS
MAF : macrophage-activating factor
nNOS : neuronal NOS
NO : nitric oxide
NOS : nitric oxide synthase
OSM : oncostatin M
PBMCs : peripheral blood mononuclear cells
PCR : polymerase chain reaction
PDGF : platelet derived growth factor
PGI₂ : prostaglandin I₂
PVL : portal vein ligation
RT : reverse transcription
TGF : transforming growth factor
TNF : tumor necrosis factor
VEGF : vascular endothelial growth factor
VIP : intestinal vasoactive peptide

第一章 前言

第一節 研究緣起

一、台灣地區肝硬化之流行病學

台灣是 B 型肝炎的盛行區，成年人口中約百分之十五到二十為慢性 B 型肝炎帶原者，估計約有三百萬人口〔1,2〕。此外，C 型肝炎在台灣地區亦相當常見，在都會區盛行率約一般人口的百分之一到二〔3-5〕。南部偏遠及沿海地區盛行率超過百分之十，而且有 C 型肝炎村的存在〔6,7〕。統計中國醫藥學院附設醫院從八十九年一月至九十一年六月，肝癌確診病例 123 例，其中 B 型肝炎佔 56.1%，C 型肝炎佔 28.5%，B 型肝炎合併 C 型肝炎者為 3.3%〔8〕。依據衛生署 91 年統計慢性肝炎及肝硬化佔我國十大死因第六位，死亡人數共 4795 人。肝硬化併發門脈高壓及其併發症的研究始終是國內肝病醫學主要的研究課題。

二、肝硬化之臨床表徵

肝硬化可依據其致病原因、型態及病程的不同而作分類；致病原因大致可分(1)藥物及毒物、(2)感染:包含 B 型肝炎及 C 型肝炎、(3)自體免疫、(4)代謝疾病、(5)膽道阻塞、(6)心血管疾病、(7)其它少見的原因。其型態的分類可分為小節結性肝硬化、大節結性肝硬化及混合型肝硬化〔9-12〕。小節結性肝硬化其定義為肝臟內呈現的結節全部或大部份小於三毫米，大部份發生於慢性酒精性肝炎者，其他包含鐵色素沉著病，及膽道阻塞。大節結性肝硬化，結節的直徑大部份大於三毫米，常發現於慢性病毒性肝炎及自體免疫性肝炎。混合型肝硬化，為小節結與大節結比例大致一樣〔13〕。

臨床上肝硬化可分代償性肝硬化及非代償性肝硬化。肝硬化的症狀是漸進性的進行，早期及後期的症狀沒有一定的界線。肝硬化患者在臨床上常見的症狀包括倦怠、體弱、厭食、腹脹、噁心、搔癢、缺乏耐性和性功能衰退等。在身體檢查可發現黃疸、蜘蛛斑（spider angioma）、掌紅斑（palmar erythema）、白指甲、舌紅而平滑、男乳女性化（gynecomastia）、皮膚抓痕、出血點及紫斑等。此外，還可發現肝臟腫大或萎縮、脾臟腫大、腹部表淺靜脈怒張、腹腔積水、水腫、吐血、血便、茶色尿、灰白糞便，以及神經精神症狀等〔14〕。

除上述臨床表徵外，肝硬化伴隨之併發症包括：肝腦病變（hepatic encephalopathy）、腹水、自發性細菌性腹膜炎（spontaneous bacterial peritonitis）、肝腎症候群（hepatorenal syndrome）、肝肺症候群（hepatopulmonary syndrome）及胃—食道靜脈曲張出血等，常是造成肝硬化患者死亡的原因。

三、肝硬化之致病機制

肝硬化在病理學上主要包括兩個瀰漫性的變化：（1）纖維化（2）再生結節形成。這種病理學上的變化若持續惡化，將會導致兩個結果：（1）肝功能衰竭、（2）門脈高壓（portal hypertension）。

其中肝功能衰竭的機制是較容易理解：在肝臟受到長期的損傷，肝細胞再生的速度比不上損耗的速度，加上瀰漫性纖維化阻礙再生的過程，引致具有功能的肝細胞日益減少。當肝細胞數量減少至不足以維持正常新陳代謝時，便出現肝功能衰竭的情況。如白蛋白製造不足引起低白蛋白血症（hypoalbuminemia）而導致腹水產生和水腫；膽紅素（bilirubin）來不及代謝而堆積體內引致黃疸；來自腸道的神經性毒素無法排除而造成肝腦病變。但在近年的研究發現，肝硬化的

各項併發症並不是單純由肝功能衰竭所引起，而是全都涉及門脈高壓〔15〕。

門脈高壓之形成，在傳統之觀念上認為主要是由於肝臟發生瀰漫性的纖維化及再生結節造成組織架構受到扭曲，因而阻塞門脈系統的血流，繼而導致門脈壓力上升。由於壓力的傳遞，引起下列各種效應：(1) 脾臟長期充血而逐漸腫大並功能亢進，白血球和血小板降低；(2) 產生側枝循環 (collateral circulations)，包括可引起致命性出血的胃—食道靜脈曲張；(3) 門脈及腸繫靜脈血流之流體靜壓 (hydrostatic pressure) 增加而使腹水的產生；(4) 發生門脈—全身分流 (portal-systemic shunting) 而導致肝腦病變。

雖然上述有關門脈高壓之病理生理學變化在肝硬化的發病原理 (pathogenesis) 仍然扮演重要的角色，但近十餘年的研究顯示，其由涉及的機制除了肇因於結構上的改變之外，還涉及一個功能性之血管活性機制造成肝臟血流阻力的上升。有人認為肝竇狀隙 (hepatic sinusoids) 的直徑係由 β -2 接受器 (receptor) 所控制〔16,17〕；門靜脈和上腸繫靜脈 (superior mesenteric vein) 則對可以造成血管收縮的 5₂-serotonergic agonists 特別敏感〔18〕。而實驗證明，肝內血管的阻力可藉由不同的血管擴張劑 (vasodilators)，如 nitroprusside、papaverine 及 isoproterenol 等，予以降低〔19〕。因此，肝竇狀隙及小靜脈周圍之肌纖維母細胞 (myofibroblasts) 的收縮張力 (contractile tone) 與門脈高壓應有關聯，而正麻黃鹼 (norepinephrine)、substance P、凝血酶 (thrombin)、第 II 型血管收縮素 (angiotensin II) 及內皮素 (endothelins, ET) 等物質皆可影響此等細胞的收縮張力〔20,21〕。

內皮素同時具有 autocrine 及 paracrine 的特性，其接受器有兩種：(1) ETA：主要在平滑肌細胞上，受刺激後產生血管收縮的效應。

(2) ETB：可存在於幾種不同類型的細胞，各具不同的效應。如在血管內皮細胞上的 ETB 受到刺激，便會釋出一氧化氮 (nitric oxide, NO) 而引起血管擴張；相反地，若血管平滑肌細胞或肌纖維母細胞之 ETB 被刺激，則會如 ETA 受到刺激一般，直接引起血管收縮〔22〕。門脈高壓患者因內皮素同時作用於兩種接受器而引致血管收縮〔23〕。而肝硬化病患不但 ETA 及 ETB 都會增加，內皮素的分泌也由於受到變形生長因子 (transforming growth factor, TGF) 及腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 等細胞激素 (cytokines) 的刺激而增加而致病人血漿的內皮素濃度上升〔24-26〕。然而，內皮素在門脈高壓的發病原理中是否扮演某些角色，仍有待商榷〔27〕。

近年來 NO 在門脈高壓的發病原理佔有非常重要的地位。NO 是藉由 NO 合成酶 (synthase, 簡稱 NOS) 催化 arginine 成為 citrulline 而產生。NOS 可分為兩型：(1) 基本型 NOS (constitutive NOS, cNOS)：這是一種依賴 calcium-calmodulin 的合成酶，負責合成生理所需之基本量的 NO，以調節血管的張力。這類型的 NOS 主要位於神經原細胞 (稱為 NOS I neuronal NOS 或 nNOS) 及血管內皮細胞 (稱為 NOS III、endothelial NOS 或 ecNOS)。(2) 誘發型 NOS (inducible NOS, iNOS)：這是一種不依賴 calcium-calmodulin 的合成酶〔28〕，它是在巨噬細胞等受到內毒素 (endotoxins) 干擾素- γ (interferon-gamma, IFN- γ)、TNF- α 及其他細胞激素的作用而產生。而 cNOS 也會受到缺氧、細胞激素及可增加胞質內鈣離子的因子所調節。NO 的半衰期甚短 (只有 20 至 30 秒)，它能自由地擴散通過胞膜來活化 guanylate cyclase 生產 cGMP，繼而引起平滑肌的舒張。

由於 NO 可令血管平滑肌鬆弛而具有減緩肝內血管阻力的功能，故對肝臟 (特別是硬化的肝臟) 是具有保護作用的。而硬化的肝

臟其 NO 在局部的生產受阻，而導致肝內血管收縮的代償機制發生障礙。而 NO 的減少乃源自血管內皮細胞的 ecNOS 活性降低〔29–31〕。由於肝內血管收縮的因子(如 ET)及血管舒張的因子(如 NO)之間的平衡狀態發生改變，因而導致肝內血管阻力增加。

雖然肝硬化患者肝內血管阻力增加，但自內臟血管流入肝臟的血液流量卻反增不減〔32–34〕。因此，有學者認為內臟血流增加才是門脈高壓的主要致病機制，此一學說被稱為「門脈高壓之往前流動原理」(forward flow theory of portal hypertension)。在正常的肝臟，內臟血管必須增加四至八倍才可能讓門脈壓力上升〔35〕，但若在肝內血管阻力稍升時，門靜脈血流的增加便可引致門脈壓力也跟著上升。而長期的門靜脈血流增加可能會損及竇狀隙內皮細胞，造成阻力更大。

而內臟血流增加的原因是由於內臟、脾臟、腸繫及小動脈等處血管之阻力降低的結果，這種情況也在高血流動力循環症候群(hyperdynamic circulatory syndrome)扮演一定的角色。此一症候群的特色為心輸出率增加而全身血管阻力降低〔36〕，其發病原理則是涉及神經性、生物激素性及局部性的機制〔37〕。肝硬化患者腹水形成的機制被稱為「周邊動脈擴張原理」(peripheral arterial vasodilatation theory)〔38〕，是述說在發生門脈高壓時，患者的周邊動脈會擴張而導致中央血容積不足，除血管收縮系統被活化之外，腎臟會啟動留鈉留水的機制，最後便造成過多的水分留在體內。又因體內水分過多，在患者平躺時可造成心臟之 preload 增加，再配合 afterload 的下降，心臟輸出率因而增加。

涉及肝硬化周邊動脈擴張的可能物質包括：升血糖素(glucagon)、前列腺素(prostaglandins，如 prostacyclin)、組織胺

(histamine)、腸道血管活性胜 (intestinal vasoactive peptide, VIP)、substance P、cholecystokinin、雌性激素 (estrogens)、氨、內毒素、adenosine、膽酸、NO、 α -calcitonon gene-related peptide、adrenomedullin 及血管內皮生長因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 等 (39–48) (表 1)。其中以升血糖素、VEGF、前列腺素及 NO 等研究得比較詳細。

肝硬化患者血中的升血糖素濃度會上升，患者的全身性血管擴張有 25 至 40% 的部分是因升血糖素濃度上升所致，其主要作用為減緩血管對內生性血管收縮物質 (endogenous vasoconstrictors) 的反應 (49)。臨床上使用生長激素釋放抑制因子 (somatostatin) 或其類似物 octreotide 來治療門脈高壓造成之胃—食道靜脈曲張出血，部分作用機制就是透過抑減升血糖素而達成 (50)。

Prostacyclin (prostaglandin I₂, PGI₂) 是一種由血管內皮細胞分泌的內生性血管收縮物質，在肝硬化時產量也有增加 (51)，而動物實驗也顯示腸繫血管組織的第一型環氧化 (cyclo-oxygenase, COX) 表現增加 (52)。如以 indomethacin 抑制 PGI₂ 的產生可改善高血流動力循環、減少內臟血流及降低門脈壓力 (52–54)。

近年 NO 在肝硬化患者內臟血管擴張的角色已受到研究者的重視。門脈高壓的肝硬化患者內臟血管之 cNOS 及 iNOS 均上升而導致 NO 的產生增加 (43)。因此，NO 在肝硬化患者的全身循環中上升，但在肝內循環中卻是下降。研究顯示，肝硬化合併腹水的老鼠長期給予 NO 抑制劑會將其高血流動力循環狀況完全更正過來 (55)，但卻不會改變門脈壓力 (56)。這是由於抑 NO 合成不但減少內臟動脈的血流，同時更增加肝內門靜脈的阻力，兩者相互抵消所致。因此，NOS 抑制劑似乎不宜用作治療門脈高壓之併發症。而另一方面，雖

然 NO 在肝硬化內臟血管擴張扮演重要的角色，但由於血流動力的變化乃涉及多種血管活性因子，當使用藥物抑制其中之一時，其他會發生代償作用而抵消其作用〔 57 〕。

這些物質之中，如升血糖素、adenosine 或甚至 NO，其作用機制亦有涉及降低血管對兒茶酚胺（catecholamines）及第 II 型血管收縮素引發之血管收縮作用〔 42,47,58,59 〕。

肝硬化患者本身會呈現自主神經的缺陷而循環系統對壓力的改變反應不全。因此，周邊血管擴張涉及的機制除了因有許多令血管擴張的物質存在之外，血管對血管收縮劑的低反應度（hyporeactivity）也可能是原因之一。而低反應度很可能與接受器親和性的改變、接受器的往下調節（down-regulation）或不同的後接受器（post-receptor）路徑缺損有關。

四、細胞激素的生物學角色〔 60–62 〕

人類的細胞激素目前已知超過 200 種，是一群具有 autocrine 或 paracrine 作用而效力極 的小型蛋白（約 8 至 80kDa），參與免疫系統各項功能（包括發炎、對抗病毒感染、特定 T 淋巴球及 B 淋巴球細胞系的增生及分化的調節）中的細胞外訊號傳遞網絡。由於各種細胞激素是在免疫學、病毒學及血液學等不同的研究領域中被發現，因而有不同的名稱，如介白質（interleukins, IL）、干擾素、TNF、生長因子（growth factors）、菌落刺激因子（colony stimulating factors, CSF）及化學素（chemokines）等。由於同一種細胞激素可作用於不同的細胞並發揮不同的功能（如 TNF- α 可促進白血球的黏著及移動、調節巨噬細胞的活化及免疫反應、調節造血及淋巴球的發展），而好幾種細胞激素會具有相同的功能（如 IL-1 與 TNF- α 有許多共同的功能），再

加上它們很少單獨地產生及單獨地作用，故對於細胞激素的研究及釐清各種細胞激素的生物學角色並不容易。

而在人類或動物體內，細胞激素網絡的調控是經由下列途徑：

- (1) 個別細胞激素的產生是短暫而受到嚴密的調控；
- (2) 細胞激素之間有相互協同或拮抗作用；
- (3) 細胞激素可促進或抑制其他細胞激素的產生；
- (4) 細胞激素調節自身或其他細胞激素接受器的基因表現；
- (5) 接受器的拮抗劑可與特定的接受器結合而不傳遞訊號；
- (6) 細胞激素接受器的細胞外結構 (extracellular domains) 會脫落並與可溶的細胞激素分子結合。

就發炎性細胞激素網絡而言，它是由促效劑 (agonists) 及拮抗劑 (antagonists) 兩類型的細胞激素所調控。如 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 具有促進發炎的功能，而 IL-4、IL-10、IL-11 及 TGF- β 則是在細胞激素網絡擔任往下調節的重要角色。

五、細胞激素在肝硬化 (門脈高壓) 致病機制之可能角色

細胞激素在肝硬化致病機制的角色可分為兩個層面：

(一) 在肝臟受損及纖維化過程扮演的角色：

肝臟纖維化是肝硬化的前驅性病理變化，是一多重功能性步驟。它涉及好幾種類型的細胞、細胞激素及生長因子，在涉及的細胞中以肝臟星狀細胞 (hepatic stellate cells, HSC) 扮演最重要的角色，此種細胞無論是在正常或病態的肝臟都是細胞外基質成分 (matrix components) 的主要生產者。但其他細胞 (如 Kupffer 細胞) 提供必要的訊號來維繫體內平衡 (homeostasis) 及發起或持續癒合過程所需之連串狀況。

在正常肝臟中，Kupffer 細胞可產生某些因子來防止增生及膠原

(collagen) 的合成〔63-65〕。但在肝臟受到損傷時，Kupffer 細胞會產生細胞激素及生長因子以誘發 HSCs 及肝細胞增生，而對發炎細胞及 HSCs 具有趨化性，並更具吞噬效能，但移除內毒素的能力卻受損。因此，肝臟受損時患者血中細胞激素如 TNF- α 、IL-6、IL-1 及抑制瘤素 M (oncostatin M, OSM) 等皆會上升〔66〕。此外，被活化之 Kupffer 細胞亦會產生具纖維生成性之細胞激素 TGF- β 1〔64,65〕，繼而活化 HSCs〔67〕及增加 α 1(I) 膠原之 mRNA〔68-70〕。

在正常的肝臟，HSC 位於 Disse 空隙及內皮細胞下緣。它們呈星狀般伸出突起相互及與肝細胞連接，亦有可能與內皮細胞相連。在肝臟受損時，HSC 被活化，細胞增生而變大，其內之樹脂狀小滴 (retinoid droplets) 消失而粗內質網增加，並表現平滑肌特有的 α -肌動蛋白 (α -actin)〔71〕，此時。HSC 的活化除與 Kupffer 細胞分泌 TGF- β 1 有關之外，涉及之細胞激素還包括血小板生長因子 (platelet derived growth factor, PDGF)、纖維組織母細胞生長因子 (fibroblast growth factor)、IL-1 表皮生長因子 (epidermal growth factor) 及 TNF- α 等〔72〕。這些細胞激素除了來自 Kupffer 細胞之外，也可由 HSC 產生而呈現 autocrine 之特色〔65〕。被活化的 HSC〔此時已轉變成肌纖維母細胞 (myofibroblast)〕具有平滑肌細胞可以收縮的特色，並可產生 ET-1 而令平滑肌收縮。因此，HSC 除了是造成纖維化的主要細胞外，在血流調整上也擔任角色。

(二) 在門脈高壓扮演的角色：

肝臟能清除血流中細胞激素以限制其對全身造成影響，但在肝功能衰竭或發生門脈全身分流而致細胞激素的廓清受阻，使肝硬化患者的免疫反應產生變化。而另一方面，來自腸道的內毒素也無法正常

地清除，繼而激發單核球及巨噬細胞產生細胞激素〔73〕。這些細胞激素除了可引起患者出現發燒和噁心及抑制肝細胞再生之外，如前所述，更活化肝外循環系統中之 NOS 而產生 NO，導致周邊血管擴張，繼而進入門脈高壓的惡性循環。

因此，細胞激素在肝硬化及門脈高壓的致病機制中扮演非常重要的角色。

第二節 研究目的

一、研究假設

不同原因導致之肝硬化，雖然最後都可程現出肝功能衰竭、門脈高壓以及各種併發症，到了末期甚至在病理學上的變化也趨於一致。但由於原發傷害的機制不同，便會出現不同的續發性傷害（secondary injuries）及代償（compensation），其中局部產生的細胞激素可能扮演不同的角色。

二、研究目的

探討不同原因導致之門脈高壓，肝臟內部產生之細胞激素會有何種異同。進而對細胞激素在肝硬化及門脈高壓的致病機制有更多的了解。

第二章 文獻探討

第一節 定義

一、肝硬化

肝硬化是一個由病理學定義的臨床狀況，可由不同原因引起，主要的病理學變化是由肝實質不可逆之慢性傷害導致廣泛的纖維化及再生結節形成。在臨床上的表徵包括肝功能衰竭和門脈高壓，併發症包括肝腦病變、腹水及自發性細菌性腹膜炎、肝腎症候群、肝肺症候群及靜脈曲張出血等〔74〕。

二、門脈高壓

肝門靜脈的壓力上升至超過正常範圍（6–10 mmHg）或肝門靜脈與肝靜脈壓力間的梯度（gradient）超過 5 mmHg。但通常在此梯度達 10–12 mmHg 以上時才會出現相關的臨床狀況，最嚴重的莫過於胃—食道靜脈曲張出血〔15〕。

三、細胞激素

細胞激素是一群具有 autocrine 或 paracrine 作用而效力極 的小型蛋白，參與免疫系統各項功能中的細胞外訊號傳遞網絡。它們有不同的名稱，如介白質、干擾素、腫瘤壞死因子、生長因子、菌落刺激因子及化學素等。同一種細胞激素可作用於不同的細胞並發揮不同的功能（如 TNF- α 可促進白血球的黏著及移動、調節巨噬細胞的活化及免疫反應、調節造血及淋巴球的發展），而好幾種細胞激素又會具有相同的功能（如 IL-1 與 TNF- α 有許多共同的功能）；此外，它們很少單獨地產生及單獨地作用，故細胞激素的作乃藉由多種細胞激素相互連結形成之訊號傳遞網絡來發生〔60〕。

第二節 門脈高壓動物模式

肝硬化及門脈高壓之血流動力學變化可充分地在動物模式中呈現出來〔34,40,75,76〕。常用的動物模式可分為肝外門脈高壓（extrahepatic portal hypertension）及肝內門脈高壓（intrahepatic portal hypertension）合併肝臟受損。前者以門靜脈結紮（portal vein ligation, PVL）而後者以膽管結紮（bile duct ligation, BDL）為代表。

一、門靜脈結紮模式

動物在接受部分門脈結紮後會出現門脈阻力上升、門脈壓力上升及門靜脈血流減少〔77-79〕、全身血管阻力及平均動脈壓力卻會下降〔34,78-81〕，而心臟輸出、內臟血流也增加〔34,78-82〕。此外，由於門脈血流受阻，在門靜脈結紮後的大白鼠會呈現上腸繫動脈血管收縮的現象〔81〕，而血中 TNF- α 濃度上升〔78〕，但血漿內毒素濃度與接受偽手術者相近〔80〕。至於肺內並無顯著的血管擴張或換氣異常〔83〕。

二、膽管結紮模式

動物在接受膽管結紮後會出現門脈壓力上升，平均動脈壓較低，全身及腎臟血管阻力減少，腎臟血流增加，並出現門脈全身血液分流（portosystemic shunting）〔84-88〕，而心臟輸出亦會增加〔86,88〕；但內臟血流不會如接受部分門脈結紮動物般明顯增加，其中門脈血流減少而肝動脈血流增加〔82〕。膽管結紮模式另一個不同的變化是發生近似肝肺症候群的換氣異常及呈現肺內血管擴張〔83〕。此外，在對體內血量變化的反應也較遲鈍〔85,87〕。

第三節 本研究相關之細胞激素

一、甲型腫瘤壞死因子

TNF- α 曾被稱為惡病質素 (cachectin)、巨噬細胞細胞毒素 (macrophage cytotoxin)、壞死素 (necrosin)、細胞毒素 (cytotoxin)、出血因子 (hemorrhagic factor)、巨噬細胞細胞毒性因子 (macrophage cytotoxic factor) 及分化誘發因子等。

TNF- α 的來源包括被活化的單核球和巨噬細胞、B 淋巴球、T 淋巴球及纖維母細胞等。它除了是發炎反應及免疫功能上一種強效的 paracrine 及內分泌介體已外，亦參與調節許多類型的細胞的生長和分化，它選擇性地對於許多發生變形的細胞具有細胞毒性，其中許多作用是與其他的細胞激素共同作用而連結成細胞激素網絡 (89-91)。

TNF 有兩類型的接受器，第一型接受器 (CD120a) 之 Mr 為 55,000，第二型接受器 (CD120b) 之 Mr 為 75,000。TNF 接受器分佈甚廣，除了紅血球及在休止狀態中的 T 淋巴球外，其他所有細胞幾乎都有 TNF 接受器。第一型 p55 接受器可在大多數的細胞上發現，第二型 p75 接受器則只限於造血細胞上。這兩種接受器皆與 TNF- α 及 TNF- β (又稱為淋巴毒素, lymphotoxin) 結合，同時亦屬於 TNFR 超家族 (superfamily) 的成員，在細胞外的結構具有四個 Cys-rich repeats。人類的可溶性 p55 和 p75 接受器可存在於癌症病人的血清和尿液中，由於是來自接受器的細胞外結構，具有與 TNF 接合的能力，因而可抑制 TNF 的作用 (92)。

二、乙型變形生長因子

人類之 TGF- β 1 也稱為分化抑制因子 (differentiation inhibiting factor)、軟骨誘導因子 (cartilage inducing factor)，而人類 TGF- β 2 則亦被稱為神經膠母細胞瘤衍生 T 細胞壓抑性因子 (glioblastoma-derived T cell suppressor factor)。

TGF β 是一種涉及功能極廣的細胞激素，它與組織再造、傷口癒合、發育及造血等〔93〕，而其中最主要的作用是抑制細胞生長。TGF β 包含三種相關的二聚體（dimeric）蛋白—TGF- β 1、2及3，三者同屬一個超家族。TGF- β 的來源甚廣，其中血小板含有TGF- β 1及 β 2；而大多數有核細胞及許多腫瘤細胞均會表現TGF- β 1、 β 2及 β 3或三者之間的組合〔94〕。

TGF- β 接受器可分為三型〔95〕。第一型：高親和力，Mr 55,000〔94,96〕；第二型：Mr 80,000〔97〕；第三型：低親和力，Mr 250,000 – 350,000〔98,99〕。這些接受器分佈在許多不同的細胞，它們與三種TGF- β 結合的情況分別為第一型： β 1 = β 2 > β 3；第二型： β 1 > β 2 > β 3；第三型： β 1 = β 2 = β 3。

三、丙型干擾素

亦名為免疫干擾素、第二型干擾素、T細胞干擾素、巨噬細胞活化因子（macrophage-activating factor, MAF）等。

IFN- γ 的來源是CD8⁺及CD4⁺T淋巴球和NK細胞，它所涉及的功能甚多，包括作用於T淋巴球、B淋巴球、巨噬細胞、NK細胞及其他如內皮細胞和纖維母細胞等之活化、生長和分化〔100〕。它並促進抗原呈現細胞（antigen-presenting cells）的MHC表現。此外，除了可加IFN- α/β 的抗病毒及抗腫瘤效應之外，它本身還具有微弱抗病毒及抗增生活性〔101–103〕。

除紅血球外，人體所有細胞都有IFN- γ 的接受器〔104〕，它是第二型細胞激素接受器的一員，同類者還包括IFN- α/β 接受器、IL-10接受器及組織因子等〔105–107〕。此接受器是一個由對IFN- γ 具有高度親和力的結合鏈（CDw119）及訊號傳遞所需的次級副蛋白所構成

的複合體〔103,108〕。與 IFN- γ 結合的次單位被稱為 IFN- γ R α 鏈，它是一穿透胞膜的醣蛋白，在細胞內的結構含有高量的 serine 和 threonine。

四、間白質-10

又稱為細胞激素合成抑制因子 (cytokine synthesis inhibitory factor, CSIF)。

IL-10 是由 CD4⁺ T 淋巴球的 Th0 及 Th2 細胞所分泌的一種對酸不能耐受的細胞激素。它會抑制 Th1 T 細胞、被活化的單核球及 NK 細胞等所激發的細胞激素合成〔109–111〕。它亦會刺激或加強 B 細胞、胸腺細胞 (thymocytes) 及肥胖細胞 (mast cells) 的增生〔109,110,112〕，並與 TGF- β 合作刺激 B 細胞產生 IgA。

IL-10 接受器是屬於與 IFN- γ 接受器同類的第二型細胞激素接受器〔105–107〕，分佈在 B 淋巴球、胸腺細胞、肥胖細胞及巨噬細胞等。傳送的訊號是 Jak1 和 Tyk2 的活化、STAT1a 和 STAT3 的加磷氧基作用 (phosphorylation)。

第三章 研究架構與研究設計

第一節 研究設計

以確立之門脈高壓動物模式來探討不同原因導致之肝硬化合併門脈高壓，肝臟內部產生之細胞激素會有何種異同。進而對細胞激素在肝硬化及門脈高壓的致病機制有更多的了解。

第二節 研究架構

- 一、手術方法使雄性 Sparague-Dawley 大白鼠產生不同型式之門脈高壓。
- 二、取出其肝臟組織並貯存於 -70°C 。
- 三、抽取肝臟組織之 RNA。
- 四、以即時 (real-time) 聚合 連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 分釋肝臟組織多種細胞激素 (包括 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{TGF-}\beta$ 、 $\text{IFN-}\gamma$ 及 IL-10 等) mRNA 的含量。

第三節 研究假說

不同原因導致之肝硬化，雖然最後都可程現出肝功能衰竭、門脈高壓以及各種併發症，到了末期甚至在病理學上的變化也趨於一致。但由於原發傷害的機制不同，便會出現不同的續發性傷害 (secondary injuries) 及代償 (compensation)，其中局部產生的細胞激素可能扮演不同的角色。

第四章 研究材料及統計方法

第一節 門脈高壓動物模式

本研究採用之動物模式有兩種：(一)以門靜脈結紮造成肝外門脈高壓動物模式及(二)以膽管結紮造成肝內門脈高壓動物模式。所有動物實驗過程皆按照美國生理學學會之實驗動物照顧及使用指引原則來進行。

一、門靜脈結紮造成肝外門脈高壓動物模式(第一組)

雄性 Sprague-Dawley 大白鼠在接受手術時之體重為 400–450 公克。大白鼠置於 24°C 的環境中，亮暗週期各 12 小時，在實驗前均可自由進食及飲水。門靜脈結紮之方法如下：以 ketamine HCl 輔以乙醚將大白鼠麻醉，在無菌狀況下於腹壁縱向切開。將大網膜和部分腸道輕輕撥出腹腔之外，並以和暖之 lactated Ringer 溶液濕潤的紗布保持潮濕。在分離出肝動脈及總膽管之後，將門靜脈曝露出來。以一磨鈍之 20 號針頭平行地貼近肝門靜脈，再以 3-0 絲線於靠近靜脈分枝上處將門靜脈及針頭一起結紮，然後將針頭取出，使門靜脈稍作擴張起來。最後將腹部臟器置回腹腔，以縫線及金屬夾將腹壁各層縫合起來，再以抗生素藥膏塗抹傷口，靜待動物慢慢恢復意識後再置回籠中〔114〕。在手術後 2 週所有大白鼠皆產生門脈高壓及側枝循環，此時再度剖腹切下一葉肝臟，並立即置入液態氮中，貯存在 -70°C 直至抽取其中之 RNA。

二、以膽管結紮造成肝內門脈高壓動物模式(第二組)

雄性 Sprague-Dawley 大白鼠在接受手術時之體重為 300–350 公克。大白鼠置於 24°C 的環境中，亮暗週期各 12 小時，在實驗前均可自由進食及飲水。膽管結紮之方法如下：以 ketamine HCl 輔以乙醚

將大白鼠麻醉，在腹壁縱向切開，以上述方法將大網膜和部分腸道輕輕撥出腹腔之外，然後分離出總膽管，以 4-0 絲線沿總膽管上下兩處予以結紮。上方結紮位置為靠近肝內膽管分枝處，下方結紮位置為靠近胰管與總膽管交接處；然後從中切下約 10 mm 長的總膽管(115)，再以上述方式縫合及上處理傷口，靜待動物慢慢恢復意識後再置回籠中。為防止動物發生凝血機能缺失，在術後每週皆予肌肉注射 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之維生素 K1。在手術後 6 週再度剖腹切下一葉肝臟，並立即置入液態氮中，貯存在 -70°C 直至抽取其中之 RNA。

三、對照組 (第三組)

雄性 Sprague-Dawley 大白鼠在接受「假裝手術」(sham operation) 時之體重為 300–350 公克。大白鼠置於 24°C 的環境中，亮暗週期各 12 小時，在實驗前均可自由進食及飲水。手術方式除了不進行總膽管結紮及切斷外，其餘處理過程如以膽管結紮造成肝內門脈高壓動物模式。術後不予維生素 K1，在手術後 6 週再度剖腹切下一葉肝臟，並立即置入液態氮中，貯存在 -70°C 直至抽取其中之 RNA。

第二節 肝臟組織 RNA 的萃取

一、RNA 的萃取

本實驗抽取 RNA 之主要試劑為 PRotch Technology 公司生產的 Rezo1™ C & T (PRotch Technology) 試劑。其原理修正自 Acid Guanidium Thiocyanate-phenol-chloroform 快速萃取 RNA 的方法。將裝有肝臟組織的 eppendorf 封上 parafilm，置於裝有工業用乙醇和乾冰的容器內反應 20-30 分鐘後，取出組織於研鉢磨碎，再加入 2 ml Rezo1™ C & T (PRotch Technology) 試劑。將組織 lysate 轉置於圓底離心管中，室溫下靜置 5 分鐘，加 0.4 ml chloroform (Merck)，劇烈搖晃

約 15 秒，再於室溫下靜置 2 分鐘。然後再在 4°C 中 12000 x g 轉速離心 15 分鐘，取出上清液至新的圓底離心管中，加等容積的 isopropanol (Merck) 混合均勻，室溫下靜置 10 分鐘後 4°C 中 12000 x g 轉速離心 10 分鐘，將離心後上清液倒掉，加 1 ml 之 75% 乙醇，輕微地以 vortex 混合然後，在 4°C 以 12000 x g 轉速離心 5 分鐘。倒掉上清液後，將 RNA 乾燥後，溶於 100 μ l 滅菌二次水，分裝成 30 μ l、30 μ l、20 μ l、10 μ l、10 μ l，存於 -70°C 冰箱中直至進行反轉錄聚合 連鎖反應 (reverse transcription-PCR, RT-PCR)。

二、吸光值 (OD 值) 之測量

為測定萃取標本中 RNA 之含量，將溶於滅菌二次水的 RNA 混合後，在 65°C 乾浴 5 分鐘，然後置於冰上，再次 mix 後取出 1 μ l 並加 99 μ l 之滅菌二次水於新的 eppendorf 中。另取 100 μ l 滅菌二次水當 blank，利用 Beckmen spectrophotometer DU 650 測量。以波長 260 nm 測量 RNA 的吸光值及波長 280 nm 測量蛋白質的吸光值，若 RNA 的吸光值與蛋白質的吸光值之比值在 1.8 至 2.0 之間，則符合實驗所需。

三、Agarose 電泳

為測定萃取物中 RNA 之純度，將 RNA 萃取液電泳跑膠。首先將跑膠的模板、齒模、tank 以 AbSolve™ (伯森生物科技) 擦拭過；取 1 g 的 Agarose，加入 100 ml 的 1X TAE buffer (10X TAE: 400 mM Tris-acetate, 20 mM EDTA)，加熱溶解，在膠凝固前加入適量 ethidium bromide 後倒入模板中並放入齒模，待其冷卻凝固後即可使用。將 1% 的膠放入電泳槽中，加入 1X TAE buffer，以 100 伏特電壓進行電泳 30 分鐘之後觀察是否有 DNA 之雜質及 RNA 的存在以符合實驗所需。

第三節 即時聚合 連鎖反應 (Real-Time PCR)

由於在研究期間實驗室的設施經過調整，本研究前半部之即時聚合 連鎖反應係採用 Taqman 方法 (TNF- α 、TNF- β 及 IL-10 的檢測)來進行，後半部之即時聚合 連鎖反應係採用 Sybr Green I dye 方法。

一、Taqman 方法

取組織 RNA 4 μ g，加入 25 μ l 之 Master mix reagent (Applied Biosystems，TaqMan One-step RT-PCR Master Mix Reagents)、2.5 μ l 之 20X Target Primer/Probe，1.25 μ l 之 40X MultiScribe and RNase Inhibitor Mix (Applied Biosystems)，最後加滅菌二次水補體積到 50 μ l，之後交由 ABI Prism 5700 機器執行已經設定好的程式 (48°C 30 分鐘；95°C 10 分鐘；95°C 15 秒；60°C 1 分鐘；40 cycles)，進行 PCR 反應。

二、Sybr Green I dye 方法

取組織 RNA 2 μ g，加入 25 μ l 之 2X Master mix reagent (Applied Biosystems，SYBR Green PCR Master Mix)、1 μ l 之 RNase Inhibitor (2000 U, 20 unit/ml)、2.5 μ l 之 random hexamers (50 mM, 5 nmoles)，再加入 5 μ l 之 1 mM 的 Forward 及 Reverse primers 及 0.25 μ l 之 40X Multiple transcriptase (Applied Biosystems，TaqMan Reverse Transcription Reagent)，最後加二次水補體積到 50 μ l，之後交由 ABI Prism 5700 機器執行已經設定好的程式，進行 PCR 反應。

三、使用之引子 (primers) 如表一所列。

第四節 數據與統計

本研究之數據（標的 mRNA 以即時聚合 連鎖反應檢測所需之週期數）係以平均值 \pm 標準差（mean \pm standard deviation, SD）來表示。組別間的差異係以變異數分析（analysis of variance, ANOVA）計算，若 P 值 < 0.05 即視為有意義之差別。

表一、本研究即時聚合 連鎖反應所採用之引子

項 目		引子序列
Actin	Sense	GGT CAG GTC ATC ACT ATC GGC A
	Anti-sense	ACC CAG GAA GGA AGG CTG GA
IFN- γ	Sense	CGC GTC TTG GTT TTG CAG CT
	Anti-sense	GGC TTT CAA TGA GTG TGC CTT G
TNF-a	Sense	TAC TGA ATC TCG GGG TGA TTG GTC C
	Anti-sense	CAG CCT TGT CCC TTG AAG AGA ACC
TGF- β	Sense	CTT CAG CTC CAC AGA GAA GAA CTG C
	Anti-sense	CAC GAT CAT GTT GGA CAA CTG CTC C
IL-10	Sense	GAC TTT AAG GGT TAC TTG GGT TGC
	Anti-sense	CAC TGC CTT GCT CTT ATT TTC ACA

第五章 研究結果

第一節 大白鼠之術後狀況

本研究採用之雄性 Sprague-Dawley 大白鼠有 12 隻接受門靜脈結紮 (PVL 組) 14 隻接受總膽管結紮 (BDL 組), 及 16 隻接受假裝手術 (Sham 組)。在取出肝臟組織時全皆存活; PVL 大白鼠在取出肝臟組織時均呈現明顯之側枝循環; BDL 大白鼠在取出肝臟組織時除呈現側枝循環外, 肝臟已有硬化的變化。

第二節 聚合 連鎖反應檢測結果

三組大白鼠(PVL組 BDL組及 sham組)肝臟組織之 actin mRNA 以即時聚合 連鎖反應檢測所需之週期數依次為 24.32 ± 1.17 、 24.78 ± 0.96 及 25.29 ± 0.81 ; TNF- α mRNA 所需之週期數依次為 30.31 ± 1.34 、 29.40 ± 1.95 及 31.61 ± 1.38 ; TGF- β mRNA 所需之週期數依次為 24.00 ± 1.49 、 23.48 ± 1.36 及 23.95 ± 0.94 ; IFN- γ mRNA 所需之週期數依次為 35.93 ± 0.95 、 37.16 ± 0.78 及 37.51 ± 0.86 ; IL-10 mRNA 所需之週期數依次為 23.61 ± 1.28 30.01 ± 1.35 及 24.47 ± 1.72 (表二)

如表三所示, Sham 組的 TNF-a 表現量為 1, PVL 組之 TNF-a 表現量為 1.26 倍; BDL 組的 TNF-a 表現量為 3.25 倍; 三組之間的差異並未達統計意義。

如表四所示, Sham 組的 TGF- β 表現量為 1, PVL 組之 TGF- β 表現量為 0.5 倍; BDL 組的 TGF- β 表現量為 0.97 倍; 三組之間的差異並未達統計意義。

如表五所示, Sham 組的 IFN- γ 表現量為 1, PVL 組之 IFN- γ 表現量為 1.53 倍; BDL 組的 IFN- γ 表現量為 0.89 倍; 三組之間的差異並

未達統計意義。

如表六所示，Sham 組的 IL-10 表現量為 1，PVL 組之 IL-10 表現量為 0.93 倍；BDL 組的 IL-10 表現量為 0.02 倍；第二組的 IL-10 表現量有意義地低於其他兩組 ($P < 0.05$)。

表二、不同模式門脈高壓動物肝臟組織細胞激素 mRNA 以即時聚合 連鎖反應檢測所需之週期數

組別	Actin	TNF- α	TGF- β	IFN- γ	IL-10
PVL (n=12)	24.32 \pm 1.17	30.31 \pm 1.34	24.00 \pm 1.49	35.93 \pm 0.95	23.61 \pm 1.28
BDL (n=14)	24.78 \pm 0.96	29.40 \pm 1.95	23.48 \pm 1.36	37.16 \pm 0.78	30.01 \pm 1.35
Sham (n=16)	25.29 \pm 0.81	31.61 \pm 1.38	23.95 \pm 0.94	37.51 \pm 0.86	24.47 \pm 1.72

TNF- α = 甲型腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor); TGF- β = 乙型變形生長因子 (transforming growth factor- β); IFN- γ = 丙型干擾素 (gamma interferon); IL-10 = 間白質-10 (interleukin-10); Sham = 接受假裝手術之大白鼠 ; PVL = 接受門靜脈結紮之大白鼠 ; BDL = 接受總膽管結紮之大白鼠

表三、不同模式門脈高壓動物肝臟組織以即時聚合 連鎖反應檢測 TNF- α mRNA 所需之週期數

組別	Actin 之 Ct	TNF- α 之 Ct	Actin 與 TNF- α Ct 之差 (Δ Ct)	各組 Δ Ct 與 Sham 組 Δ Ct 之差	與 Sham 組 Ct 之比例
PVL (n=12)	24.32 \pm 1.17	30.31 \pm 1.34	5.99 \pm 2.05	-0.33 \pm 2.05	1.26
BDL (n=14)	24.78 \pm 0.96	29.40 \pm 1.95	4.62 \pm 2.51	-1.70 \pm 2.51	3.25
Sham (n=16)	25.29 \pm 0.81	31.61 \pm 1.38	6.32 \pm 1.85	0.00 \pm 1.85	1.00

TNF- α = 甲型腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor); Ct = 平均週期閾值 (cycle of threshold); Sham = 接受假裝手術之大白鼠 ; PVL = 接受門靜脈結紮之大白鼠 ; BDL = 接受總膽管結紮之大白鼠

表四、不同模式門脈高壓動物肝臟組織以即時聚合 連鎖反應檢測 TGF- β mRNA 所需之週期數

組別	Actin 之 Ct	TGF- β 之 Ct	Actin 與 TGF- β Ct 之差 (Δ Ct)	各組 Δ Ct 與 Sham 組 Δ Ct 之差	與 Sham 組 Ct 之比例
PVL (n=12)	24.32 \pm 1.17	24.00 \pm 1.49	-0.32 \pm 2.19	1.02 \pm 2.19	0.50
BDL (n=14)	24.78 \pm 0.96	23.48 \pm 1.36	-1.30 \pm 1.92	0.04 \pm 0.92	0.97
Sham (n=16)	25.29 \pm 0.81	23.95 \pm 0.94	-1.34 \pm 1.43	0.00 \pm 1.43	1.00

TGF- β = 乙型變形生長因子 (transforming growth factor- β); Ct = 平均週期閾值 (cycle of threshold);

Sham = 接受假裝手術之大白鼠 ; PVL = 接受門靜脈結紮之大白鼠 ; BDL = 接受總膽管結紮之大白鼠

表五、不同模式門脈高壓動物肝臟組織以即時聚合 連鎖反應檢測 IFN- γ mRNA 所需之週期數

組別	Actin 之 Ct	IFN- γ 之 Ct	Actin 與 IFN- γ Ct 之差 (Δ Ct)	各組 Δ Ct 與 Sham 組 Δ Ct 之差	與 Sham 組 Ct 之比例
PVL (n=12)	24.32 \pm 1.17	35.93 \pm 0.95	11.61 \pm 1.74	-0.61 \pm 1.74	1.53
BDL (n=14)	24.78 \pm 0.96	37.16 \pm 0.78	12.38 \pm 1.43	0.16 \pm 1.43	0.89
Sham (n=16)	25.29 \pm 0.81	37.51 \pm 0.86	12.22 \pm 1.36	0.00 \pm 1.36	1.00

IFN- γ = 丙型干擾素 (gamma interferon); Ct = 平均週期閾值 (cycle of threshold); Sham = 接受假裝手術之大白鼠 ; PVL = 接受門靜脈結紮之大白鼠 ; BDL = 接受總膽管結紮之大白鼠

表六、不同模式門脈高壓動物肝臟組織以即時聚合 連鎖反應檢測 IL-10 mRNA 所需之週期數

組別	Actin 之 Ct	IL-10 之 Ct	Actin 與 IL-10 Ct 之差 (ΔCt)	各組ΔCt 與 Sham 組ΔCt 之差	與 Sham 組 Ct 之比例
PVL (n=12)	24.32 ± 1.17	23.61 ± 1.28	-0.71 ± 2.00	0.11 ± 2.00	0.93
BDL (n=14)	24.78 ± 0.96	30.01 ± 1.35	5.23 ± 1.91	6.05 ± 1.91	0.02
Sham (n=16)	25.29 ± 0.81	24.47 ± 1.72	-0.82 ± 2.20	0.00 ± 2.20	1.00

IL-10 = 間白質-10 (interleukin-10); Ct = 平均週期閾值 (cycle of threshold); Sham = 接受假裝手術之大白鼠; PVL = 接受門靜脈結紮之大白鼠; BDL = 接受總膽管結紮之大白鼠

第六章 討 論

第一節 結果討論

本研究所採用兩種不同的門脈高壓動物模式除了引起門脈高壓的機制不同之外，BDL 大白鼠比 PVL 大白鼠多了因膽管阻塞導致肝臟受損及纖維化的過程，在細胞激素的變化應更為繁複雜。然而，由於動物體內過百種的細胞激素乃互相作用而形成繁複的網絡，不同細胞也在交互影響的情況下釋放不同的細胞激素。單從血中細胞激素的濃度無法了解局部器官系統在其中的角色，更遑論探討細胞激素在某種病症所涉及的機制。故本研究以動物肝臟組織為材料，去檢視這兩種不同的門脈高壓動物模式的細胞激素基因表現，進而有助於明瞭其在門脈高壓可能涉及之致病機制。

無論是肝硬化實驗動物〔78〕或病人〔116,117〕血清 TNF- α 均會上升，且上升之程度與肝硬化的嚴重度相關〔118〕。血清 TNF- α 上升的原因一般認為是與患者血中內毒素增加有關〔73〕，但 TNF- α 上升對肝硬化之高血流動力循環所扮演的角色仍有爭議，支持與反對者各有論調〔119,120〕。由於肝硬化患者血中 TNF- α 的來源主要是來自周邊血液單核球（peripheral blood mononuclear cells, PBMCs），並造成全身性的血流動力學變化。在肝臟之內的單核球（包括 Kupffer 細胞）是否也受到血中內毒素增加的影響，繼而增加在肝內的 TNF- α ，至今仍未有定論。本研究以 real time PCR 檢測以 PVL 及 BDL 大白鼠肝臟組織 TNF- α 之 mRNA，顯示兩者之表現相近；雖然此二組之 TNF- α 表現傾向高於接受假裝手術之大白鼠（分別為 1.26 倍及 3.24 倍），但並未達到顯著差異。表示肝硬化病患 TNF- α 濃度上升及引發的影響（包括刺激 iNOS 產生 NO）主要是發生在全身循環中；

而在肝臟之內 TNF- α 濃度上升並不明顯，故無助於增加肝臟中 NO 的生產。

TGF- β 是一種涉及功能極廣的細胞激素，在肝臟中它具有活化 HSCs [67] 及增加 α 1(I) 膠原之 mRNA [68–70]，參與肝臟纖維化的重要機制。在肝硬化的患者中，其血漿 TGF- β 濃度較常人為高 [118,121,122]；研究亦發現這些病患及接受膽管結紮的動物的肝臟組織內之 TGF- β 亦稍有增加 [123,124]。本研究顯示 BDL 大白鼠肝臟組織 TGF- β mRNA 含量與 Sham 大白鼠者相近 (0.97 vs. 1)，而 PVL 大白鼠則反而偏低 (是 Sham 大白鼠的 0.5 倍)，惟其間之差異並未達統計學意義。Napoli 等人 [124] 係在大白鼠接受膽管結紮後 2 天至 3 週取出肝臟檢查 TGF- β mRNA 而發現明顯上升；我們則是在大白鼠接受膽管結紮後六週才取出肝臟 (此的肝硬化及門脈高壓皆已形成)，此時並無 TGF- β mRNA 上升的蹟象。涉及之原因仍有待探討，目前的推論假設是大白鼠的肝臟在術後三至六週啟動了代償的機制，致使 TGF- β 的基因表現沒有繼續增加。因此，未來將要在多個時段加作連串的檢測，並繼續探索其中之機制。

跟上述兩種細胞激素一樣，IFN- γ 具有多項生理功能，包括可促進巨噬細胞產生 NO 以導致內臟血管擴張 [125]，而肝硬化患者血清 IFN- γ 亦高於常人 [126]。本研究結果顯示，接受門靜脈結紮的大白鼠 IFN- γ 之基因表現最高，而接受膽管結紮的大白鼠則與接受假裝手術之大白鼠具有相同之 IFN- γ 基因表現，惟三組間之差異尚未達統計意義。

在本研究中最重要發現是 BDL 大白鼠 IL-10 的基因表現遠低於其他兩組 (PVL 大白鼠的 IL-10 mRNA 是 Sham 大白鼠的 0.93 倍；BDL 大白鼠的 IL-10 mRNA 則只有 Sham 大白鼠的 0.02 倍， $p < 0.05$)

研究顯示，IL-10 具有保護肝臟受損的功能〔127,128〕，而內生性或外來的皮質類固醇可促進 IL-10 釋出而可減輕肝臟在急性毒物傷害所引發的損傷〔129–132〕。在肝臟受損而 HSCs 被活化的初期 IL-10 的產生便會增加，若此一反應失效即會令組織之纖維化惡化〔133,134〕。

Lee 等人〔135〕在大白鼠接受 BDL 之後 1 至 10 週檢查其血中 IL-10 濃度，顯示血中 IL-10 在前兩週明顯地上升，但在第四週以後則降至比對照組第 1、2 週時的濃度更低。可惜此群研究者並沒有做好對照（每一時段只以一隻大白鼠為對照），也沒有對此現象作任何詮釋！至於在肝硬化患者或動物模式肝臟 IL-10 基因表現的情況卻罕有報告。本研究之 BDL 大白鼠是在術後第六週取出肝臟，其肝臟 IL-10 之基因表現與 Lee 等人的報告似乎相符。然而，血中 IL-10 的來源並非以肝臟為主；因此，肝臟 IL-10 之基因表現下降並不是血中 IL-10 下降的主要原因。至於為何 BDL 大白鼠在術後第六週時肝臟 IL-10 之基因表現下降至 Sham 大白鼠的 0.02 倍，目前仍未有明確的機制。但從 Lee 等人的報告〔135〕中獲悉，大白鼠在接受 BDL 手術後 IL-10 先是猛然上升，這可能是為要抗衡 TNF- α 等細胞激素在肝臟受損早期所導致的續發性傷害；但其後這種防護機制因某些原因瓦解，IL-10 基因表現不足不單是在肝臟，而是發生在全身而致血中 IL-10 顯著下降。可能由於這個原因，使 BDL 大白鼠肝臟受損的情況失去制衡而很快便步入肝硬化的階段。

第二節 其他相關性討論

一、實驗技巧及方法之心得

以一個臨床醫師，經十餘年後再踏入分子生物及分子生物實驗

領域，使自己的視野更加開闊，比較不會排斥接受期刊中有關分生及分生實驗的文章。雖然至目前為止對於分生實驗的部份依然自信不足，但至少耳熟能詳的 PCR 能親身進一步的了解。

傳統上 RT-PCR 的原理乃是利用 RNA 反轉錄成 DNA，再由 DNA 為模板進行聚合？鏈鎖反應。在完成 PCR 後必須再將標本「跑膠」後，再作半定量或定量的分析。而本實驗使用的即時反轉錄聚合？鏈鎖反應則有以下的好處：

1. 可較準確地測定核酸的量。
2. 聚合？鏈鎖反應的放大過程可以追蹤偵測而不是只測定反應後的終產物。
3. 偵測的標的物可以是去氧核糖核酸，也可以是核糖核酸。
4. 節省時間（少於二小時）。
5. 有大的動態偵測範圍。
6. 封閉的試管。
7. 不用電泳。
8. 不用後聚合？鏈鎖反應的處理過程。

而本研究採用了兩種偵測聚合？鏈鎖反應的方法：（1）SYBR Green I Dye 的方法：乃是利用 SYBR Green I Dye 結合雙股 DNA 的小溝（minor groove）而產生螢光反應。（2）TaqMan Probes 的方法：乃是利用一段帶有報告者（reporter）及冷？者（quencher）的特殊探針（probe）與雙股 DNA 結合，當再放大一雙股 DNA 時可產生螢光反應。兩種方法的優缺點如下：

1. SYBR Green I Dye 的方法：
 - a. 較便宜可省下探針的發費
 - b. 理想的篩檢工具

- c. 必須要作聚合？鏈鎖反應解離曲線
- d. 無法同一試管做多個基因分析
- e. 微量的檢體易產生錯誤的訊號

2. TaqMan Probes 的方法：

- a. 專一性高。
- b. 使用不同報告者即可同時偵測多個基因。
- c. 螢光值可直接代表聚合？鏈鎖反應增加量。
- d. 不可逆式的訊號累積。
- e. 價錢較貴。

二、在學習過程中獲得的啟示

在此次的學習過程中，由於閱讀諸多參考文獻資料，使吾人更能深入了解各種細胞激素及 NO 在肝硬化及門脈高壓所扮演的角色，因此能更明瞭肝硬化的生理及病理機轉。也因此獲取有關各種細胞激素及其拮抗劑應用於臨床治療上的可能性，比如 TNF- α 及 IL-12 可能作為病毒性肝炎的治療藥物。TNF- α 及 IFN- γ 也有潛力作為抗肝癌的實驗藥物。在往後的研究領域上，希望可應用於 C 型肝炎及酒精性肝炎的基礎研究上，使臨床的工作與基礎研究能有進一步的結合。今後對於肝臟分子生物學的領域，也因分子生物學及分子生物實驗的進一步了解，應有更深刻的啟發。

第三節 研究限制

一、動物模式

本研究所採用的動物模式—PVL 及 BDL 大白鼠，都是經確認的門脈高壓模式。雖然如此，動物與人體的狀況終究不完全相同，故從

動物實驗中觀察到的現象，不一定會發生在病人身上。如 BDL 大白鼠在術後第四週開始血中 IL-10 濃度下降〔135〕，但膽管阻塞的病患血中 IL-10 濃度的變化則從未有人報告。在文獻上僅有對原發性膽汁性肝硬化患者的研究，但結果卻大為分歧〔136,137〕。因此，在動物實驗得到的資訊和啟示，必須在病人身上予以印證，才能得到有用的結果。

二、檢測基因表現的方法

本研究係以 real time PCR 測定動物肝臟組織的 mRNA 來研判其肝臟組織對不同細胞激素的基因表現。雖然本研究團隊對 real time PCR 的操作技巧已甚能掌握，在嚴謹的控制下結果之可信度甚高。但如能加作免疫組織化學染色則更佳，因為只做 real time PCR 無法充分獲知哪一種細胞激素由何種細胞分泌。如果能有免疫組織染色法，來獲知分泌細胞激素的真正位置與細胞種類將使實驗更加完備。

第七章 結論與建議

第一節 結論

本研究的結果顯示，BDL 大白鼠與 PVL 大白鼠肝臟組織 TNF- α 的基因表現稍有上升趨勢，但未達統計學上的顯著差異；而 TGF- β 及 IFN- γ 的基因表現亦未如預期的增加。至於 IL-10 的基因表現在 BDL 大白鼠則是顯著地下降，其中涉及之機制及在臨床上之意義仍有待進一步之探討。

第二節 建議

在未來之研究將朝三個方向進行改善：(1) 在不同時間檢測實驗動物肝臟組織細胞激素的基因表現；(2) 加作免疫組織化學染色之研究；(3) 加作血漿細胞激素濃度的測定。

參考文獻

1. Chen DS, Sung JL. Hepatitis B Virus infection in Taiwan. *N Engl J Med* 1997;297:668-9.
2. Chen DS, Sung JL. Hepatitis B Virus infection and its sequelae in Taiwan. *Gastroenterol Jpn* 1984; 19:363-6.
3. Chen DS, Kuo G, Sung JL, Lai MY, Sheu JC, Chen PJ, *et al.* Hepatitis C virus infection in an area hyperendemic for hepatitis B and chronic liver disease: the Taiwan experience. *J Infect Dis* 1990; 162:817-822.
4. Lee SD, Chan CY, Wang YJ, Wu JC, Lai KH, Tsai YT, Lo KJ. Seroepidemiology of hepatitis C Virus in infection in Taiwan. *Hepatology* 1991; 12:830-3.
5. Chen DS, Wang JT, Chen PJ, Wang TH, Sung JL. Hepatitis C Virus infection in Taiwan. *Gastroenterol Jpn* 1991;26(supple 3):164-6.
6. Chang SJ, Chen HC, Ying J, Lu CF, Ko YC. Risk factors of hepatitis C virus infection in a Taiwanese aboriginal community. *Kaohsiung J Med Sci* 1996;12: 241-7.
7. Lu SN, Chue PY, Chen IL, Wang JH, Huang JF, Peng CF, *et al.* Incidence of hepatitis C infection in a hepatitis C endemic township in southern Taiwan. *Kaohsiung J Med Sci* 1997; 13:605-8.
8. Lai HC, Chan CY. Clinical study of hypovascular hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol J Taiwan* 2003;20:117.
9. Anthony PP, Ishak KG, Nayak NC, Poulsen HE, Scheuer PJ, Sobin LH. The morphology of cirrhosis: definition, nomenclature and classification. *Bull WHO* 1977;55:521-40.
10. Anthony PP, Ishak KG, Nayak NC, Poulsen HE, Scheuer PJ, Sobin LH. The morphology of cirrhosis: definition, nomenclature and classification. *J Clin Pathol* 1978;31:395-414.

11. Leevy CM, Tygstrup N. *Standardisation of nomenclature, diagnosis criteria and diagnostic methodology for diseases of the liver and biliary tract*. Basel: Karger, 1976
12. Scheuer PJ. Liver biopsy in the diagnosis of cirrhosis. *Gut* 1970;11:275-8.
13. Millward-Sadler GH. Liver cirrhosis. In: MacSween M, Anthony PP, Scheuer PJ, Burt AD, Portmann BC, eds. *Pathology of the Liver*. Hong kong: Churchill Livingstone, 1994: 397-420.
14. Kuntz E, Kuntz HD. Clinical findings. In: Kuntz E, Kuntz HD, eds. *Hepatology, Principles and Practice*. Berlin: Springer-Verlag, 2001; 64-76.
15. Gatta A, Bolognesi M. Pathophysiology of portal hypertension. In: Baret AL, Sartor K, Youker JE, eds. *Portal Hypertension. Diagnostic Imaging and Imaging-guided Therapy*. Berlin: Springer-Verlag; 2000; 1-14.
16. Marteau P, Ballet F, Chazovilleres O. Effect of vasodilators on hepatic circulation in cirrhosis: a study in the isolated perfused rat liver. *Hepatology* 1989;8:820-3.
17. Poo JL, Braillon A, Hadengue A, Gaudin C, Lebrec D. Hemodynamic effects of terbutaline, a β_2 -adrenoreceptor agonist, in conscious rats with secondary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1992;15:459-63.
18. Cummings SA, Groszmann RJ, Kaumann AJ. Hypersensitivity of mesenteric veins to 5-hydroxytryptamine and ketanserin-induced reduction of portal pressure in portal hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 1986;89:501-13.
19. Bhathal PS, Groszmann HJ. Reduction of the increased portal vascular resistance of isolated perfused cirrhotic rat liver by vasodilators. *J Hepatol* 1985;3:25-37.

20. Schneider AW, Kalk JF, Klein CP. Effect of Losartan, an angiotensin II receptor antagonist, on portal pressure in cirrhosis. *Hepatology* 1999;29:334-9.
21. Jimenez W, Rodes H. Impaired responsiveness to endogenous vasoconstrictors and endothelium derived vasoactive factors in cirrhosis. *Gastroenterology* 1994;107:1201-3.
22. Rockey D. The cellular pathogenesis of portal hypertension: stellate cell contractility, endothelin, and nitric oxide. *Hepatology* 1997;25:2-5.
23. Zhang B, Calmus Y, Wen L, Sogni P, Lotersztajn S, Houssin D, Weill B. Endothelin-1 induces liver vasoconstriction through both ETA and ETB receptors. *J Hepatol* 1997;26:1104-10.
24. Asbert M, Gines A, Gines P, Jimenez W, Claria J, Salo J, Arroyo V, Rivera F, Rodes J. Circulating levels of endothelin in cirrhosis. *Gastroenterology* 1993;104:1485-91.
25. Moller S, Emmeluth C, Henriksen JH. Elevated circulating plasma endothelin-1 concentrations in cirrhosis. *J Hepatol* 1993;19:285-90.
26. Leivas A, Jimenez W, Bruix J, Bosch J, Arroyo V, Rivera F, Rodes J. Gene expression of endothelin-1 and ETA and ETB receptors in human cirrhosis: relationship with hepatic hemodynamics. *J Vasc Res* 1998;35:186-93.
27. Poo JL, Jimenez W, Munoz RM, Bosch-Marce M, Bordas N, Morales-Ruiz M, Perez M, Deulofeu R, Sole M, Arroyo V, Rodes J. Chronic blockade of endothelin receptors in cirrhotic rats: hepatic and hemodynamic effects. *Gastroenterology* 1999;116:161-7.
28. Sogni P, Smith APL, Gadano A, Lebrec D, Higenbottam TW. Induction of nitric oxide synthase II does not account for excess vascular nitric oxide production in experimental cirrhosis. *J Hepatol* 1997;26:1120-7.

29. Shah V, Haddad FG, Garcia-Gardena G, Frangos JA, Mennone A, Groszmann RJ, Sessa WC. Liver sinusoidal endothelial cells are responsible for nitric oxide modulation of resistance in the hepatic sinusoids. *J Clin Invest* 1997;100:2923-30.
30. Rockey DC, Chung JJ. Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension. *Gastroenterology* 1998;114:344-51.
31. Sarela AI, Mihaimed FMAM, Batten JJ, Davidson BR, Mathie RT. Hepatic and splanchnic nitric oxide activity in patients with cirrhosis. *Gut* 1999;44:749-53.
32. Bolognesi M Sacerdoti D, Merkel C, Gatta A. Relationship between portal blood flow measured by image-directed Doppler ultrasonography and hepatic blood flow measured by indocyanine green constant infusion in patients with cirrhosis. *J Clin Ultrasound* 1995;23:297-303.
33. Witte CL, Witte MH, Bair G, Mobley WP, Morton D. Experimental study of hyperdynamic vs. stagnant mesenteric blood flow in portal hypertension. *Ann Surg* 1974;179:304-10.
34. Vorobioff J, Bredfeldt JE, Groszmann RJ. Hyperdynamic circulation in portal-hypertensive rat model: a primary factor for maintenance of chronic portal hypertension. *Am J Physiol* 1983;244:G52-7.
35. Blendis LM. Portal hypertension. In: Lauth WW, ed. *Hepatic Circulation in Health and Disease*. Reven, New York, 1981:329-50.
36. Bernardi M, Trevisani F. Systemic and regional hemodynamics in pre-ascitic cirrhosis. *J Hepatol* 1997;27:588-91.
37. Benoit JN, Zimmerman B, Premen AJ, Go VL, Granger DN. Role of glucagon in splanchnic hyperemia of chronic portal hypertension. *Am J Physiol* 1986;251: G674-7.
38. Schrier RW, Arroyo V, Bernardi M, Epstein M, Henrikson JH, Rodes

- J. Peripheral arterial vasodilation hypothesis: a proposal for the initiation of renal sodium and water retention in cirrhosis. *Hepatology* 1988;8:1151-7.
39. Sherwin R, Joshi P, Hendler R, Felig P, Conn HO. Hyperglucagonemia in Lannec's cirrhosis The role of portal-sytemic shunt. *N Engl J Med* 1974;290: 239-42.
 40. Benoit JN, Womack WA, Hernandez L, Granger DN. "Forward" and "backward" flow mechanisms of portal hypertension. Relative contributions in a rat model of portal vein stenosis. *Gastroenterology* 1985;89:1092-6.
 41. Vallance P, Moncada S. Hyperdynamic circulation in cirrhosis. A role for nitric oxide. *Lancet* 1991;i:776-8.
 42. Bosch J, Pizcueta P, Feu F, Fernandez H, Garcia-Pagan CG. Pathophysiology of portal hypertension. *Gastroenterol Clin North Am* 1992;21:1-14.
 43. Sogni P, Moreau R, Gadano A, Lebrec D. The role of nitric oxide in the hyperdynamic circulatory syndrome associated with portal hypertension. *J Hepatol* 1995;23:218-24.
 44. Hori N, Okanoue T, Sawa Y, Kashima K. Role of calcitonin gene-related peptide in the vascular system on the development of the hyperdynamic circulation in conscious cirrhotic rats. *J Hepatol* 1997;26:1111-9.
 45. Fernandez-Rodriguez CM, Prada IR, Prieto J, Mntuenga LM, Elssasser T, Quiroga J, Moreiras M, Andrade A, Cuttitta F. Circulating adrenomedullin in cirrhosis: relationship to hyperdynamic circulation. *J Hepatol* 1998;98:250-6.
 46. Guevara M, Bru C, Gines P, Fernandez-Esparrach G, Sort P, Bataller R, Jimenez W, Arroyo V, Rodes J. Increased cerebrovascular resistance in cirrhotic patients with ascites. *Heptaology*

- 1998;28:39-44.
47. Gatta A, Sacerdoti D, Bolognesi M, Merkel C. Portal hypertension: state of the art. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999;31:326-45.
 48. Perez-Ruiz M, Ros J, Morales-Ruiz M, Navasa M, Colmenero J, Ruiz-del-Arbol L, Cejudo P, Claria J, Rivera F, Arroyo V, Rodes J, Jimenez W. Vascular endothelial growth factor production in peritoneal macrophages of cirrhotic patients: regulation by cytokines and bacterial lipopolysaccharide. *Hepatology*. 1999;29:1057-63.
 49. Pak JM, Lee SS. Glucagon in portal hypertension. *J Hepatol* 1994;20:825-32.
 50. Kravetz D, Bosch J, Arderiu MT, Pizcueta MP, Casamitjana R, Rivera F, Rodes J. Effects of somatostatin on splanchnic hemodynamics and plasma glucagon in portal hypertensive rats. *Am J Physiol* 1988;254:G322-8.
 51. Hamilton G, Phing RC, Hutton RA, Dandona P, Hobbs KE. The relationship between prostacyclin activity and pressure in the portal vein. *Hepatology* 1982;2:236-42.
 52. Hou MC, Cahill PA, Zhang S, Wang YN, Hendrickson RJ, Redmond EM, Sitzmann JV. Enhanced cyclooxygenase-1 expression within the superior mesenteric artery of portal hypertensive rats: role in the hyperdynamic circulation. *Hepatology* 1998;27:20-7.
 53. Bruix J, Bosch J, Kravetz D, Mastai R, Rodes J. Effects of prostaglandin inhibition on systemic and hepatic hemodynamics in patients with cirrhosis of the liver. *Gastroenterology* 1985;88:430-5.
 54. Fernandez M, Garcia-Pagan JC, Casadevall M, Mourelle MI, Pique JM, Bosch J, Rodes J. Acute and chronic blockage in portal-hypertensive rats: influence in nitric oxide biosynthesis. *Gastroenterology* 1996;110:1529-35.
 55. Niederberger M, Martin PY, Gines P, Morris K, Tsai P, Xu DL,

- McMurtry I, Schrier RW. Normalization of nitric oxide production corrects arterial vasodilation and hyperdynamic circulation in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 1995;109:1624-30.
56. Forrest EH, Jones AL, Dillon JF, Walker J, Hayes PC. The effect of nitric oxide synthase inhibition on portal pressure and azygos blood flow in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1995;23:254-8.
57. Garcia-Pagan JC, Bosch J, Rodes J. The role of vasoactive mediators in portal hypertension. *Semin Gastrointest Dis* 1995;6:140-7.
58. Sieber CC, Groszmann RJ. Nitric oxide mediates hyporeactivity to vasopressor in mesenteric vessels of portal hypertensive rats. *Gastroenterology* 1992;103:235-9.
59. Castro A, Jimenez W, Claria J, Ros J, Martinez JM, Bosch M, Arroyo V, Piulats J, Rivera F, Rodes J. Impaired responsiveness to angiotensin II in experimental cirrhosis: role of nitric oxide. *Hepatology* 1993;18:367-72.
60. Balkwill F. Cytokines and cytokine receptors. In: Roitt I, Brostoff J, Male D, eds. *Immunology*. Edinburgh: Mosby 2000:119-29.
61. Kollas G, Douni E, Kassiotis G, Kontoyiannis D. On the role of tumor necrosis factor ad receptors in models of multiorgan failure, rheumatoid arthritis multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Immunol Rev* 1999;169:175-94.
62. Vaday GG, Lider O. Extracellular matrix moieties, cytokines, and enzymes: dynamic effects on immune cell behaviour and inflammation. *J Leukocyte Biol* 2000;74:457-71.
63. Rojkind M, Greenwel P. The liver as a bioecological system. In: Arias IM, Jakoby W, Popper H, eds. *The Liver: Biology and Pathology*. New York: Raven Press, 1988:707-16.
64. Gressner AM. Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney Int*

- Suppl* 1996;54:S39-45.
65. Friedman SL. Cytokines and fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 1999;19:129-40.
 66. McClain CJ, Barve S, Deaciuc I, Kugelmas M, Hill D. Cytokines in alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 1999;19:205-19.
 67. De Bleser PJ, Xu G, Rombouts K, Rogiers V, Geerts A. Glutathione levels discriminate between oxidative stress and transforming growth factor- β signaling in activated rat hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 1999;274:33881-7.
 68. Garcia-Trevijano ER, Iraburu MJ, Fontana L, Dominguez-Rosales JA, Auster A, Covarrubias-Pinedo A, Rojkind M. Transforming growth factor- β 1 induces the expression of α 1 (I) procollagen mRNA by a hydrogen peroxide-C/EBP β -dependent mechanism in rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999;29:960-70.
 69. Greenwel P, Dominguez-Rosales JA, Mavi G, Rivas-Estilla AM, Rojkind M. Hydrogen peroxide: a link between acetaldehyde-elicited α 1 (I) collagen gene upregulation and oxidative stress in mouse hepatic stellate cells. *Hepatology* 2000;31:109-16.
 70. Dominguez-Rosales JA, Mavi G, Levenson SM, Rojkind M. H₂O₂ is an important mediator of physiological and pathological healing responses. *Arch Med Res* 2000;3:15-20.
 71. Friedman SL. The cellular basis of hepatic fibrosis: mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993;328:1828-35.
 72. Pinzani M. Hepatic stellate (Ito) cells: expanding roles for a liver-specific pericyte. *J Hepatol* 1995;22:700-6.
 73. Devière J, Content J, Denys C, Vandebussche P, Schandene L, Wybran J, Dupont E. Excessive *in vitro* bacterial lipopolysaccharide-induced production of monokines in cirrhosis. *Hepatology* 1990;11:

- 628-34.
74. Chung RT, Podolsky DK. Cirrhosis and its complications. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw-Hill, New York; 2001:1754-67.
 75. Kravetz D, Bosch J, Arderiu M, Pilar Pizcueta M, Rodes J. Hemodynamic effects of blood volume restitution following a hemorrhage in rats with portal hypertension due to cirrhosis of the liver: influence of the extent of portal-systemic shunting. *Hepatology* 1989;9:808-14.
 76. Pizcueta MP, de Lacy AM, Kravetz D, Bosch J, Rodes J. Propranolol decreases portal pressure without changing portal-collateral resistance in cirrhotic rats. *Hepatology* 1989;10:953-7.
 77. Sikuler E, Kravetz D, Groszmann RJ. Evolution of portal hypertension and mechanisms involved in its maintenance in a rat model. *Am J Physiol* 1985;248:G618-25.
 78. Chu CJ, Lee FY, Chang FY, Wang SS, Lin HC, Wu SL, Tai CC, Lee SD. Hyperdynamic circulation in prehepatic portal hypertension: role of tumor necrosis factor-alpha. *Chin Med J (Taipei)* 1997;59:145-50.
 79. Lay CS, Yang CM, Tsai YT, Chen HI, Simchon S, Chien S. An animal study of portal hypertension. *Chin Med J (Taipei)* 1989;44:19-24.
 80. Lee FY, Wang SS, Yang MC, Tsai YT, Wu SL, Lu RH, Chan CY, Lee SD. Role of endotoxaemia circulation in rats with extrahepatic or intrahepatic portal hypertension. *J Gastroenterol Hepatol* 1996;11:152-8.
 81. Colombato LA, Albillos A, Groszmann RJ. Temporal relationship of peripheral vasodilatation, plasma volume expansion and the hyperdynamic circulatory state in portal-hypertensive rats.

- Hepatology* 1992;15:323-8.
82. Lebrec D, Blanchet L. Effect of two models of portal hypertension on splanchnic organ blood flow in the rat. *Clin Sci (Lond)* 1985;68:23-8.
 83. Fallon MB, Abrams GA, McGrath JW, Hou Z, Lou B. Common bile duct ligation in the rat: a model of intrapulmonary vasodilatation and hepatopulmonary syndrome. *Am J Physiol* 1997;274:G779-84.
 84. Sikuler E, Buchs AE, Yaari A, Keynan A. Hemodynamic characterization of conscious and ketamine-anesthetized bile-duct-ligated rats. *Am J Physiol* 1991;260:G161-6.
 85. Talor Z. Blunted pressor response to volume load in conscious dogs with chronic bile duct ligation. *Med Biol* 1982;60:217-20.
 86. Bosch J, Enriquez R, Groszmann RJ, Storer EH. Chronic bile duct ligation in the dog: hemodynamic characterization of a portal hypertensive model. *Hepatology* 1983;3:1002-7.
 87. Bomzon A, Rosenberg M, Gali D, Binah O, Mordehovitz D, Better OS, Greig PD, Blendis LM. Systemic hypotension and decreased pressor response in dogs with chronic bile duct ligation. *Hepatology* 1986;6:595-600.
 88. Lee SS, Girod C, Braillon A, Hadengue A, Lebrec D. Hemodynamic characterization of chronic bile duct-ligated rats: effect of pentobarbital sodium. *Am J Physiol* 1986;251:G176-80.
 89. Beyacrt R, Fiers W. Tumor necrosis factor and lymphotoxin. In: Mire-sluis A, Thorpe R, eds. *Cytokines*. Academic Press: San Diego, 1998:335-60.
 90. Fiers W. Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS Lett* 1991;285:199-212.
 91. Ruddle NH. Tumor necrosis factor (TNF-alpha) and lymphotoxin (TNF-beta). *Curr Opin Immunol* 1992;4:327-32.

92. Nophar Y, Kemper O, Brakebusch C, Englemann H, Zwang R, Aderka D, Holtmann H, Wallach D. Soluble forms of tumor necrosis factor receptors (TNF-Rs). The cDNA for the type I TNF-R, cloned using amino acid sequence data of its soluble form, encodes both the cell surface and a soluble form of the receptor. *EMBO J* 1990;9:3269-78.
93. Ruscetti FW, Birchenall-Roberts MC, McPherson JM, Wiltout RH. Transforming growth factor β 1. In: Mire-sluis A, Thorpe R, eds. *Cytokines*. Academic Press: San Diego, 1998:415-32.
94. Brown PD, Wakefield LM, Levinson AD, Sporn MB. Physicochemical activation of recombinant latent transforming growth factor-beta's 1, 2, and 3. *Growth Factors* 1990;3:35-43.
95. Massague J. Receptors for the TGF-beta family. *Cell* 1992;69:1067-70.
96. Franzen P, ten Dijke P, Ichijo H, Yamashita H, Schulz P, Heldin CH, Miyazono K. Cloning of a TGF beta type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF beta type II receptor. *Cell* 1993;75:681-92.
97. Lin HY, Wang XF, Ng-Eaton E, Weinberg RA, Lodish HF. Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell* 1992;68:775-85.
98. Lopez-Casillas F, Cheifetz S, Doody J, Andres JL, Lane WS, Massague J. Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system. *Cell* 1991;67:785-95.
99. Wang XF, Lin HY, Ng-Eaton E, Downward J, Lodish HF, Weinberg RA. Expression cloning and characterization of the TGF-beta type III receptor. *Cell* 1991;67:797-805.
100. De Maeyer E, De Maeyer-Guignard J. Interferon-gamma. In:

- Mire-sluis A, Thorpe R, eds. *Cytokines*. Academic Press: San Diego, 1998:391-8.
101. Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol* 1993;11: 571-611.
 102. Billiau A. Interferon-gamma: biology and role in pathogenesis. *Adv Immunol* 1996;62:61-130.
 103. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 1998;67:227-64.
 104. Valente G, Ozmen L, Novelli F, Geuna M, Palestro G, Forni G, Garotta G. Distribution of interferon-gamma receptor in human tissues. *Eur J Immunol* 1992;22:2403-12.
 105. Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:6934-8.
 106. Aguet M. Molecular cloning of interferon receptors: a short review. *Br J Haematol* 1991;79 Suppl 1:6-8.
 107. Lutfalla G, Gardiner K, Proudhon D, Vielh E, Uze G. The structure of the human interferon alpha/beta receptor gene. *J Biol Chem* 1992; 267:2802-9.
 108. Rodig S, Kaplan D, Shankaran V, Old L, Schreiber RD. Signaling and signaling dysfunction through the interferon gamma receptor. *Eur Cytokine Netw* 1998;9(3 Suppl):49-53.
 109. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993;11:165-90.
 110. de Waal Malefyt R, Yssel H, Roncarolo MG, Spits H, de Vries JE. Interleukin-10. *Curr Opin Immunol* 1992;4:314-20.
 111. Howard M, O'Garra A. Biological properties of interleukin 10. *Immunol Today* 1992;13:198-200.

112. Go NF, Castle BE, Barrett R, Kastelein R, Dang W, Mosmann TR, Moore KW, Howard M. Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *J Exp Med* 1990;172:1625-31.
113. Defrance T, Vanbervliet B, Briere F, Durand I, Rousset F, Banchereau J. Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. *J Exp Med* 1992;175:671-82.
114. Chojkier M, Groszman RJ. Measurement of portal-systemic shunting in the rat by using γ -labeled microspheres. *Am J Physiol* 1981;240:G371-5.
115. Franco F, Gigou M, Szekely AM, Bismuth H. Portal hypertension after bile duct obstruction. Effect of bile diversion on portal pressure in the rat. *Arch Surg* 1979;114:1064-7.
116. Daniluk J, Kandefers-Szerszen M, Borowska L. Tumor necrosis factor and interferon production by peripheral blood leukocytes of patients with alcoholic cirrhosis. *Arch Immunol Ther Exp* 1996; 44:97-101.
117. Lee FY, Lu RH, Tsai YT, Lin HC, Hou MC, Li CP, *et al.* Plasma interleukin-6 levels in patients with cirrhosis. Relationship to endotoxemia, tumor necrosis factor-alpha, and hyperdynamic circulation. *Scand J Gastroenterol* 1996;31:500-5.
118. Neuman M, Angulo P, Malkiewicz I, Jorgensen R, Shear N, Dickson ER, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta reflect severity of liver damage in primary biliary cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:196-202.
119. Perez-Paramo M, Munoz J, Albillos A, Rossi I, Alvarez-Mon M, Ortiz Berrocal J. Evaluation of the hemodynamic effects of tumor necrosis factor alpha factor in rats with portal hypertension using the

- radioactive microsphere technique. *Rev Esp Med Necl* 1998;17: 294-301.
120. Le Moine O, Soupison T, Sogni P, Marchant A, Moreau R, Hadengue A, *et al.* Plasma endotoxin and tumor necrosis factor-alpha in the hyperkinetic state of cirrhosis. *J Hepatol* 1995;23:391-5.
121. Yuen MF, Norris S, Evans LW, Langley PG, Hughes RD. Transforming growth factor-beta 1, activin and follistatin in patients with hepatocellular carcinoma and patients with alcoholic cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:233-8.
122. Flisiak R, Pytel-Krolczuk B, Prokopowicz D. Circulating transforming growth factors beta(1) as an indicator of hepatic function impairment in liver cirrhosis. *Cytokine* 2000;12:677-81.
123. Baer HU, Friess H, Abou-Shady M, Berberat P, Zimmermann A, Gold LI, Korc M, Buchler MW. Transforming growth factor betas and their receptors in human liver cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998;10:1031-9.
124. Napoli J, Prentice D, Niinami C, Bishop GA, Desmond P, McCaughan GW. Sequential increases in the intrahepatic expression of epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor, and transforming growth factor beta in a bile duct ligated rat model of cirrhosis. *Hepatology* 1997;26:634-33.
125. Bories PN, Campillo B, Scherman E. Up-regulation of nitric oxide production by interferon-gamma in cultured peritoneal macrophages from patients with cirrhosis. *Clin Sci (Lond)* 1999;97:399-406.
126. Fracchia M, Secreto P, Tabone T, Zaffino C, Pera A, Galatola G. Serum interferon gamma in primary biliary cirrhosis: effect of ursodeoxycholic acid and prednisone therapy alone and in combination. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000;12: 463-8.

127. Louis H, LeMoine O, Peny MO, Gulbis B, Nisol F, Goldman M, Deviere J. Hepatoprotective role of interleukin-10 in galactosamine/lipopolysaccharide induced liver injury. *Gastroenterology* 1997;112:935-42.
128. Louis H, LeMoine O, Peny MO, Quertinmont E, Fokan D, Goldman M, Deviere J. Production and role of interleukin-10 in concanavalin-A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 1997;25:1382-9.
129. Swain MG, Appleyard C, Wallace J, Wong H, Le T. Endogenous glucocorticoids released during acute toxic liver injury enhance hepatic IL-10 synthesis and release. *Am J Physiol* 1999;276:G199-205.
130. Marchant A, Amraoqui Z, Gueydan C, Bruyns C, LeMoine O, Vandenbeeke P, *et al.* Methylprednisolone differentially regulates IL-10 and tumor necrosis factor production during murine endotoxemia. *Clin Exp Immunol* 1996;106:91-6.
131. Tabardel Y, Duchateau J, Schmartz D, Marecaux G, Shahla M, Barvais L, Leclerc JL, Vincent JL. Corticosteroids increase blood interleukin-10 levels during cardiopulmonary bypass in men. *Surgery* 1996;119:76-80.
132. Vander Poll T, Barber AE, Coyle SM, Lowrey SF. Hypercortisolemia increases plasma interleukin-10 concentrations during human endotoxemia. A clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:3604-6.
133. Wang SC, Tsukamoto H, Rippe RA, Schrum L, Ohata M. Expression of interleukin-10 by *in vitro* and *in vivo* activated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 1998;105:302-8.
134. Tsukamoto H. Is interleukin-10 antifibrogenic in chronic liver injury? *Hepatology* 1998;28:1707-9.

135. Lee BS, Kim NJ, Jeong HY, Lee HY, Kang DY, Noh SM. Changes in serum cytokine concentration: a morphological study of liver cirrhosis induced by common bile duct ligation in rats. *Korean J Intern Med* 2003;18:6-12.
136. Nagano T, Yamamoto K, Matsumoto S, Okamoto R, Tagashira M, Ibuki N, Matsumura S, Yabushita K, Okano N, Tsuji T. Cytokine profile in the liver of primary biliary cirrhosis. *J Clin Immunol* 1999;19:422-7.
137. Krams SM, Cao S, Hayashi M, Villanueva JC, Martinez OM. Elevations in IFN-gamma, IL-5, and IL-10 in patients with the autoimmune disease primary biliary cirrhosis: association with autoantibodies and soluble CD30. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;80:311-20.

個人履歷

中文姓名：賴學洲

英文姓名：Hsueh-chou Lai

出生年月日：1962年5月21日

中國醫藥學院中醫系(76-82)

E-mail：t674233@ms54.hinet.net

經歷：

82-85 中國醫藥學院附設醫院內科部住院醫師

85-87 中國醫藥學院附設醫院內科部住院總醫師及研究員

87-88 中國醫藥學院附設醫院急診部主治醫師

88 迄今中國醫藥學院附設醫院消化系內科主治醫師

醫學會專科醫師：

中華民國內科醫學會

中華民國消化系內科

中華民國消化系內視鏡

中華民國中西整合醫學會