

第五章 討論

肺纖維化是一種複雜慢性發炎，及漸進式間質纖維化的疾病，它廣泛侵犯肺實質的肺泡壁，間質、血管、淋巴及氣管周圍的結締組織。顯微下，可看到發炎反應，纖維母細胞的增生及不正常的膠原蛋白聚集。造成肺纖維化的原因相當多，如感染、藥物、自體免疫疾病等等皆是。不過，大部分還是無確定原因者居多 (Idiopathic pulmonary fibrosis IPF)，且預後相當差，往往在診斷後 5-6 年即死亡。歷年來的研究發現，整個疾病發展過程中，發炎反應和間質細胞增生扮演很重要角色，當某個刺激進入肺部，造成肺部表皮細胞或血管內皮的損傷，便正常結構破壞，便會產生發炎反應，及細胞激素失調 (cytokine dysregulation)。在正常情況下，肺部組織含有上皮細胞、內皮細胞、不同的發炎細胞、及纖維母細胞，只不過他們是處於一個動態平衡，也就是抗纖維化 (如 MMPs、CD44、IFN- γ 、HGF、IL-7、IL-8、IL-12 等) 與促纖維化 (如 IL-1 β 、TNF- α 、PDGF、TGF-B 等) 維持平衡。當外來或內在的刺激產生後，會破壞這個平衡，造成上皮或內皮細胞的壞損，接著發炎細胞便開始聚集並分泌不同的細胞激素 (cytokines)，纖維母細胞開始移動及增生。細胞激素的釋放並非同時出現，一般相信吞噬細胞為主要調節細胞，一開始先是發炎前趨物的產生 (proinflammatory cytokines 如 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、PDGF)，然

後去刺激纖維母細胞產生不同的細胞激素，這些細胞激素的產生，反應肺部未來的變化，當促纖維化的 cytokines (如 TGF- β , PDGF) 表現較多時，便會造成膠原蛋白 collagen 及 fibronectin 等細胞外間質增生，而造成肺纖維化。反之，如果這個動態平衡正常時，便會促進 MMPs、gelatinase、或 CXC 的表現，往血管增生及組織修復方向走。目前為止，除了類固醇之外，偶輔以細胞毒殺劑，免疫抑制劑或膠原合成，纖維生成激素抑制劑 (附表一)。但實際上，各種搭配的療效仍有限。

因此，我們想建立一個肺纖維化的離體及活體動物模式，並試著尋找新的有效藥物，在文獻回顧中，發現 Radiation，Chemical inhalation，hyperbaric oxygen，CCl₄ 或 bleomycin (BLM) 的刺激都可誘發肺纖維化的產生，但最廣泛使用，且模式穩定，病理變化類似 idiopathic pulmonary fibrosis 的就是直接以 Bleomycin 氣管內給藥，在本論文所作的實驗結果與過去研究報導是一致的。BLM 的刺激，造成上皮細胞的傷害，大量的細胞激素 IL-1 β , IL-6, 及 TNF- α 被釋出，而這些都是 macrophage 最主要分泌的細胞激素。在第 7 天可以看到明顯的肺發炎反應；而肺纖維化的形成在第 14、21、28 天，且隨著時間越來越明顯。所以，在我們的實驗設計裏，實驗進行三週 (第 21 天) 是可行的，結果也印證肺纖維化隨著時間增長而愈嚴重 (圖四)。

既然動物模式已建立，那麼我們選擇的三七到底有沒有抑制纖

維化的效果呢？首先，我們嘗試從 C57BL/6 小老鼠作肺泡沖洗，然後以培養皿 (in vitro) 去培養肺的吞噬細胞 (macrophage)，經過 Lipopolysachoride (LPS) 的刺激後，以 ELISA 的方法來測巨噬細胞所產生的 cytokines 濃度，發現大量釋出 cytokines (IL-6, TNF- α)，但如果加入三七浸膏後，發現在濃度 400 ug/ml 下有明顯抑制發炎所產生的 fibrotic cytokines 的作用。

接著，動物實驗 (in vivo) 的部分，每天要餵食多少三七呢？我們根據過去的報導，選擇了 0.5 mg/kg/day，1 mg/kg/day 及 2 mg/kg/day 三個不同劑量去試驗，發現如果是 2 mg/kg/day 餵食的話，C57BL/6 小鼠 7 天內的死亡率高達 57 %。反之，0.5 mg/kg/day 餵食的死亡率則是零，而那些死去的老鼠經 autopsy 後，發現整個肺實質，肺泡內發炎相當嚴重，且有 hyaline membrane 覆蓋其上，整個 pathology 類似 ARDS 的變化，所以我們採用 0.5 mg/kg/day 的劑量當 in vivo 的評估。

在整個動物實驗中，從單獨 BLM 誘發肺纖維化，BLM 誘發後第 2 天開始給三七及 BLM 誘發肺纖維化第 7 天開始給三七，三組不同的條件中，將肺泡沖洗液 (Bronchoalveolar lavage) 取出，測定其中細胞素的含量，結果發現，BLM 刺激損害肺部，就如同 Lipopolysacharide (LPS) 刺激一樣，都會造成大量 fibrotic cytokines (IL-1 β 、IL-6、TNF- α)

的產生，尤其是第一週的時候，而後隨著時間逐漸衰退，取而代之 TGF- β 逐漸上升，其尖峰值約在第 2 週出現。因此，我們了解到肺部纖維化的產生，是在 pro-inflammatory cytokine 出現後，TGF- β 增加而促進纖維化的形成，這與發表過的文章是一致的。至於，三七的給予治療，除 IL-6 於第 14 天時，異常的高於單獨 BLM 組外，也可看到 IL-1 β , IL-6, TNF- α 於三七治療後，都有下降的趨勢，但僅有第七天開始給予三七治療組，cytokine 降低的幅度，才具有統計學上的意義。這代表著，晚期 (第 7 天)三七的給藥治療較早期 (第 2 天)給藥對於抑制 fibrotic cytokines 來的有效，甚至早期的給藥反而可能刺激其他 fibrotic cytokine 的產生。

而病理組織分析上，我們分別以 Hematoxylin and Sirius red 染色，在顯微觀察上，依據 1988 年 pulmonary fibrosis score，將不同肺纖維化的程度分為 0-8 分，九個等級。得知，肺纖維化的嚴重度，隨著時間 0 至 21 天，越來越嚴重；但三七的給予，不管早晚，都將使肺纖維化程度明顯改善，尤其是 7 天開始給予三七的治療，改善更明顯。然而，其中也發覺第二天給予三七的治療，反而在前 7 天會造成組織發炎破壞更嚴重。如此變化和每天餵食 2 mg/kg/day 造成前 7 天內 57% 死亡相結合，我們可以推測早期給予三七的劑量與死亡率是有關係的。因為早期給藥給的劑量越高，誘發組織發炎破壞就更嚴重。

由上述的結果，我們可以推想中醫藥清熱解毒與活血化癥藥物的藥理作用差別。在 SARS 期間，很多研究多著重於清熱解毒藥物，如金銀花、板藍根、黃芩...等，其主要的的作用在於這些藥物都有明顯的抗發炎作用(anti-inflammatory response)。因為 SARS 的發展很快，到了 1-2 週，會有 cytokine storm 的現象，大量釋放 TNF- α , IL-1 β , 及 IL-6。所以，需藉助這些藥物去治療及預防大量細胞激素的釋放，避免造成嚴重肺損傷和急性呼吸窘迫的徵象，其他肺炎初期治療亦如此。然而，我們知道肺纖維化是逐漸形成的，疾病較晚期產生，如 ARDS 在 2 週後及其它可知更久的結締組織疾病或藥物，或未知更久不明原因的肺纖維化。真正要治療已成形的肺纖維化，在中醫理論上是要活血化癥，在我們所選的三七，它具備了此效果，性味上屬甘溫，實驗結果印證了此類藥物的給予，不宜在早期肺剛損傷發炎的時候，等到發炎反應的尖峰過後再給予是較適合的，因為活血化癥藥較會促進免疫的活化，所以不適合太早在發炎時期給予。