

• 实验研究 •

三七总苷对肝纤维化模型大鼠的干预作用

张永生^{1*} 徐 珊¹ 赵育芳² 朱飞叶¹

(1. 浙江中医药大学, 浙江省杭州市滨江区滨文路 548 号, 310053; 2. 厦门大学中医学院)

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(Y2100684); 浙江省中医药科研基金资助项目(2006C013)

* 通讯作者: alex.yszhang@gmail.com, 18957130628

[摘要] **目的** 探讨三七总苷对二甲亚硝胺(DMN)致肝纤维化模型大鼠的干预作用。 **方法** 60 只 SD 大鼠, 随机选取 10 只作为正常组, 其余 50 只以 DMN 复制中度肝纤维化模型, 成功造模 37 只, 选取 8 只作为模型组, 剩余随机分为三七总苷组(8 只)、干扰素组(8 只)、三七总苷+干扰素组(7 只)、生理盐水组(6 只)。三七总苷组给予血栓通冻干粉 1.5mg/100g、干扰素组给予注射重组人干扰素 γ 8.675mg/100g、三七总苷+干扰素组给予以上两种药物、生理盐水组给予等量生理盐水, 以上均每日肌肉注射 1 次, 连续给药 8 周后检测各组大鼠血清肝功能、透明质酸, 结合常规病理 HE、苦味酸-天狼星红染色, 评价肝组织炎症及纤维化程度。 **结果** 正常组及各干预组与模型组血清总蛋白(TP)、白蛋白(Alb)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)和血清透明质酸比较差异均有统计学意义($P<0.05$); 各组分别与模型组大鼠肝纤维化分级半定量后分值比较差异均有统计学意义($P<0.05$); 三七总苷组、干扰素组、三七总苷+干扰素组 SSS 半定量计分分别与模型组比较, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。 **结论** 三七总苷能够改善 DMN 所致肝纤维化大鼠肝功能, 降低血清透明质酸含量, 改善肝纤维化病理分级。

[关键词] 三七总苷; 肝纤维化; 干扰素; 透明质酸

Effect of Notoginseng Total Glucoside on the Dimethylnitrosamine Induced Hepatic Fibrosis of Rat Models

ZHANG Yongsheng¹, XU Shan¹, ZHAO Yufang², ZHU Feiye¹

(1. Zhejiang University of Chinese Medicine, Hangzhou 310053; 2. College of Chinese Medicine, Xiamen University)

ABSTRACT **Objective** To observe the intervention effect of notoginseng total glucoside on the dimethylnitrosamine (DMN) induced hepatic fibrosis of rat models. **Methods** Of the 60 SD rats, 10 were randomly selected and put into the normal control group, the rest was made models of hepatic fibrosis to a medium degree induced by DMN. From the 37 successfully made models, 8 randomly selected were taken as the model control group. The rest of rats was randomized into notoginseng total glucoside group, 8 rats, interferon group, 8 rats, notoginseng total glucoside + interferon group, 7 rats, and physiological saline negative control group, 6 rats. The muscular injection with Freeze-dried Powder Xueshuantong for Injection (Xueshuantong) 1.5mg/100g, Recombinant Human Interferon γ for Injection (INF- γ) 8.675mg/100g, both Xueshuantong and INF- γ , and the physiological saline in the same dosage was given respectively, once a day, 8 weeks in succession. The effect on the inflammation and fibrosis degrees of hepatic tissues was evaluated by serum assaying on the indices of liver function and hyaluronic acid (HA) and the results of routine pathological HE and Sirius Red Stains examinations. **Results** The comparison of TP, Alb, ALT, AST, and HA in the normal control group and all intervention groups with the model control group showed a statistical difference ($P<0.05$), the comparison in the model control group with the negative control group showed a statistical difference ($P<0.05$), the comparison of the fibrosis score formed by the Semi Scoring System (SSS) of all groups with the model control group respectively showed a statistical difference ($P<0.05$), and the comparison of the SSS scores of the notoginseng total glucoside group, interferon group, and the notoginseng total glucoside + interferon group with the model control group respectively showed a statistical difference ($P<0.05$). **Conclusion** The notoginseng total glucoside is effectively improving the liver function, decreasing the serum HA, and improving the pathological degree of hepatic fibrosis of the rat models.

Key Words notoginseng total glucoside; hepatic fibrosis; interferon; hyaluronic acid

肝纤维化是各种慢性肝病的常见病理学改变, 肝纤维化作为慢性肝病向肝硬化转变的关键阶段, 越来越受到重视和关注。近年来, 由于发现三七中

的活性成分皂苷类具有抗氧化、抗纤维化等作用, 虽然对三七总苷的保肝作用有少量的报道^[1], 但是对二甲亚硝胺(DMN)所致肝纤维化模型的作用

方面报道甚少。本研究选用三七的有效成分三七总苷(Panax Notoginsenoside, PNS)^[3]作为研究对象,通过与目前较为认可的抗肝纤维化因子-干扰素 γ (INF- γ)进行对照研究,旨在分析三七总苷抗肝纤维化的作用和机理。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级SD大鼠60只,雄性,体重(160 $\pm$ 20)g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,动物合格证号:SCXK(沪)2007-0005,浙江中医药大学实验动物中心饲养。

1.2 实验药物、试剂与仪器

DMN(化学纯,批号:19980505),中国医药集团上海化学试剂公司产品;三七总苷注射剂:血栓通(冻干粉,批号:07025102),广西梧州制药(集团)股份有限公司产品;注射用重组人干扰素 γ (冻干粉,批号:20070404),上海克隆生物高技术有限公司产品。Direct Red80(天狼星红,批号:1211662/40306226),德国Sigma-Aldrich公司产品;透明质酸放射免疫分析试剂盒(批号:20071101),上海海研医学生物技术有限公司产品。

自动脱水机(型号STP120, MICROM公司产品);自动包埋机(型号AP280-2, MICROM公司产品);切片机(型号HM335E, MICROM公司产品);智能放免测量仪(型号:SN-695B,上海原子核研究所日环仪器厂产品)及显微镜(Nikon eclipse80i显微镜, Eclipse LV100POL偏光显微镜, Nikon公司产品)。

1.3 动物分组与造模方法

60只SD大鼠,用随机数字表法选取10只作为正常组,其余50只以DMN复制中度肝纤维化模型^[4-6]。按10mg/kg体重腹腔注射1%浓度DMN,实验第1周连续用药3天,后2~6周每周连续用药2天,每天1次,第6周末大鼠死亡13只。将剩余37只大鼠用随机数字表法选取8只作为模型组,1%戊巴比妥钠40mg/kg剂量腹腔注射麻醉,腹主动脉取血,取肝组织常规石蜡包埋,行HE及天狼星红染色,经染色后病理学观察8只大鼠全部呈现中度肝纤维化病理改变。将剩余29只大鼠随机选取连续的29个数字,除以4,余数为0的属于三七总苷组(8只)、为1的属于干扰素组(8只)、为2的属于三七总苷+干扰素组(7只)、为3的属于生理盐水组(6只)。

1.4 给药与处理方法

三七总苷及干扰素 γ 的药物干预剂量以人的等效剂量为计算依据产生^[7],药物使用时用生理盐水5ml溶解。正常组:正常饮水,不作处理;模型组:造模成功后,处死,作为干预前对照;三七总苷组:血栓通冻干粉1.5mg/100g肌肉注射;干扰素组:注射用重组人干扰素 γ 0.675mg/100g肌肉注射;三七总苷+干扰素组:血栓通1.5mg/100g肌肉注射+对侧注射用重组人干扰素 γ 0.675mg/100g肌肉注射;生理盐水组:同样剂量的生理盐水。以上均每日1次,连续治疗8周。

1.5 检测指标

1.5.1 血清透明质酸(HA)和肝功能指标检测

大鼠血液离心取血清后入-20℃冰箱备用,采用放射免疫法^[8]检测HA;采用自动生化检测仪检测肝功能血清总蛋白(TP)、白蛋白(Alb)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)。

1.5.2 组织形态学观察 8周后,腹腔注射麻醉腹主动脉取血、取肝组织中性甲醛固定、无水酒精脱水、二甲苯透明后常规石蜡包埋,行4 μ m连续切片,常规HE、苦味酸-天狼星红胶原染色。经天狼星红染色的切片在显微镜下能够同时显示I、III型胶原的分布情况,在偏光显微镜下能够区分I、III型胶原的含量,I型胶原以红、黄为主,而III型胶原以绿色为主要特征;将以上分级结果进行半定量转化后进行统计学处理。

1.5.3 肝纤维化SSS半定量计分 按实验动物肝纤维化组织学VI级标准和改良的Chevallier肝纤维化SSS半定量计分标准进行肝纤维化程度评判^[5-6]。

1.6 统计学方法

采用SPSS 12.00统计软件进行数据处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。计量资料组内比较用 F 分析,方差齐时用 q 检验,方差不齐时用Dunnett T₃检验。

2 结果

2.1 各组大鼠肝功能TP、Alb、ALT、AST比较

表1示,正常组及各干预组与模型组TP、Alb、ALT、AST比较差异均有统计学意义($P<0.05$),但三七总苷组、干扰素组、三七总苷+干扰素组与生理盐水组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 各组大鼠HA比较

表2示,与正常组比较,各干预组、模型组、生理

表 1 各组大鼠肝功能 TP、Alb、ALT、AST 指标比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	TP(g/L)	Alb(g/L)	ALT(IU/L)	AST(IU/L)
正常组	10	60.50±4.86*	26.20±1.48*	42.60±13.77*	114.20±33.32*
模型组	8	44.13±1.89	37.00±2.00	73.88±21.68	276.13±35.93
生理盐水组	6	57.00±2.28*	24.50±1.97*	40.17±7.25*	109.67±13.03*
三七总苷组	8	58.50±3.66*	24.88±0.64*	44.13±3.91*	104.75±10.67*
干扰素组	8	57.38±2.97*	25.50±1.60*	43.38±4.81*	113.75±13.50*
三七总苷+干扰素组	7	59.14±2.79*	25.71±1.98*	42.57±11.31*	104.71±18.79*

注:与模型组比较,* $P<0.05$

盐水组 HA 均有统计学差异($P<0.05$);与生理盐水组比较,三七总苷组、干扰素组、三七总苷+干扰素组均有统计学差异($P<0.05$),但生理盐水组与模型组比较无统计学差异($P>0.05$),三七总苷组、干扰素组及三七总苷+干扰素组间比较无统计学差异($P>0.05$)。

表 2 各组大鼠 HA 比较($\text{ng/mg}, \bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	HA
正常组	10	91.53±16.18
模型组	8	244.46±81.40*
生理盐水组	6	162.66±61.09*
三七总苷组	8	90.47±13.01*△
干扰素组	8	109.36±50.13*△
三七总苷+干扰素组	7	82.36±16.56*△

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与生理盐水组比较,△ $P<0.05$

2.3 组织形态学观察结果

2.3.1 实验动物肝纤维化分级结果 表 3 示,正常组 10 只大鼠均未见纤维化变化,模型组中 8 只大鼠

表 3 各组大鼠肝纤维化分级情况(只)

组别	鼠数	0	I	II	III	IV	V	VI
正常组	10	10	0	0	0	0	0	0
模型组	8	0	0	0	1	4	3	0
生理盐水组	6	0	0	1	1	4	0	0
三七总苷组	8	0	0	7	1	0	0	0
干扰素组	8	0	0	5	2	1	0	0
三七总苷+干扰素组	7	0	1	3	3	0	0	0

有 4 只已经处于Ⅳ级水平,属于典型的中度肝纤维化改变,经治疗后各组均有不同程度的分级降低,其中以Ⅱ、Ⅲ级为多。

2.3.2 各组大鼠肝纤维化分级半定量计分比较 表 4 示,将相应的分级经 2G 转换,量化转换为半定量数值后,进行方差分析。正常组、三七总苷组、干扰素组及三七总苷+干扰素组分别与模型组比较差异均有统计学意义($P<0.05$);生理盐水组与正常组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 4 各组大鼠肝纤维化分级半定量计分比较(2G, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	半定量计分
正常组	10	1.00±0.00*△
模型组	8	21.00±9.50
生理盐水组	6	12.67±5.32
三七总苷组	8	4.50±1.41*
干扰素组	8	6.50±4.24*
三七总苷+干扰素组	7	5.43±2.51*

注:与模型组比较,* $P<0.05$;与生理盐水组比较,△ $P<0.05$

2.3.3 各组大鼠病理学结果 图 1 示,正常组大鼠肝小叶结构清晰,肝细胞多为单核,肝板呈条索状,围绕中央静脉呈放射状排列;在苦味酸一天狼星红染色显示小叶间和汇管区基本无胶原纤维分布,仅在中央静脉及肝窦内有轻微的胶原纤维分布,在偏光显微镜下基本未见红黄及绿色的胶原纤维。

在模型组大鼠 HE 染色镜下可见肝脏质地不均匀,有程度不等的纤维包裹而形成假小叶,肝小叶失去正常结构,肝板排列紊乱,有散在坏死灶,可见肝细胞普遍变性坏死,在中央静脉及汇管区有大量中性粒细胞浸润;在苦味酸一天狼星红染色下在汇管区或中央静脉区有大量的胶原沉积,相互连接的纤维隔将肝小叶重新分割,形成结节样的假小叶;在偏光显微镜下有大量的红黄或绿色的胶原纤维着色,但是以红色或黄色为多,主要为Ⅰ型胶原,Ⅲ型胶原则相对较少。胶原的含量与正常组大鼠形成鲜明对比。

经过 8 周的药物干预后,三七总苷组、干扰素组及三七总苷+干扰素组纤维化分级均有不同程度地降低。在 HE 染色中可见肝细胞的炎症与模型组比较不显著,但肝组织内可见不同程度的炎症细胞浸润;在苦味酸一天狼星红染色下,各干预组的肝组织内胶原纤维增生不明显,一般仅局限于汇管区(见图 1);经过药物干预后,生理盐水组虽然出血坏死、炎症程度与模型组比较有所减轻,炎性细胞浸润程度也有不同程度的减低,但在 HE 染色下仍见有大量的纤维组织增生。苦味酸一天狼星红染色中显示胶

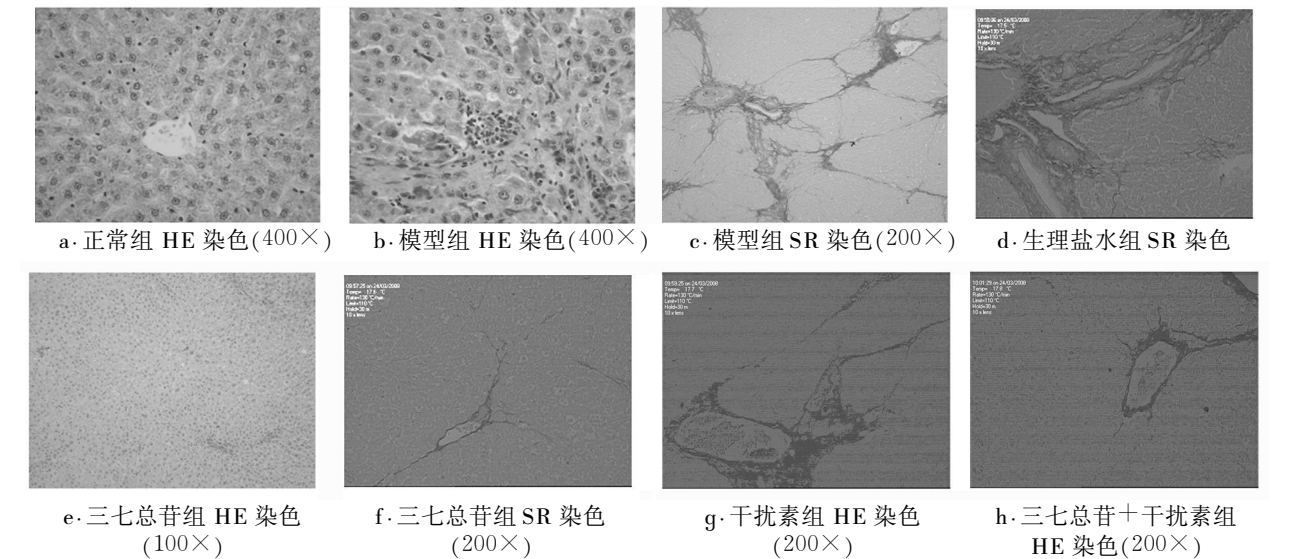


图 1 各组大鼠肝组织切片

原纤维化的增生显著,75%的镜下视野中可见粗大增生的胶原纤维,假小叶形成。

2.4 各组大鼠肝纤维化 SSS 半定量计分比较

表 5 示,与正常组比较,模型组和生理盐水组 SSS 半定量计分差异均有统计学意义($P<0.05$);与模型组和生理盐水组比较,三七总苷组、干扰素组、三七总苷+干扰素组 SSS 半定量计分差异均有统计学意义($P<0.05$);生理盐水组与模型组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 5 各组大鼠肝纤维化 SSS 半定量计分比较(分, $\bar{x}\pm s$)		
组别	鼠数	SSS
正常组	10	0
模型组	8	14.75±3.85*
生理盐水组	6	15.50±1.76*
三七总苷组	8	8.63±2.98△#
干扰素组	8	8.38±1.51△#
三七总苷+干扰素组	7	9.00±2.89△#

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,△ $P<0.05$;与生理盐水组比较,# $P<0.05$

3 讨论

三七为五加科人参属植物三七的干燥根,其味甘、微苦,性温,归肝、胃、心、小肠经,具有止血、散瘀、消肿、止痛、补虚、强壮等功效^[9]。研究中选取的 DMN 肝纤维化模型^[10]是 20 世纪 70 年代后发展起来的一种造模方法,DMN 具有基因毒性和免疫毒性,它诱导的肝纤维化模型与经典的 CCl₄ 方法比较有造模周期短、死亡率低、肝纤维化形成稳定、不易自行恢复等优点。

虽然肝功能是衡量肝脏生化功能及能量代谢的主要指标,是肝脏受损及代偿功能状况的良好指

标^[11]。但是在肝纤维化的病变过程中,影响肝功能的主要阶段在肝细胞变性、坏死的早期,以 TP、Alb、ALT、AST 等的改变最为显著。肝纤维化的四项检测(HA、LN、PCⅢ、C-Ⅳ)指标能够一定程度上反映肝纤维化的程度。由于蛋白同源性及含量程度等原因,在大鼠中仅有 HA 可以呈现出比较明显的差异。本研究发现,模型组大鼠与正常组比较,肝功能指标差异有统计学差异($P<0.05$),这与相关的文献报道相符^[12]。但在后期即中度肝纤维化形成和药物干预 8 周后,肝脏的组织修复已经达到一个平衡,各实验组之间在肝功能方面的差异无统计学意义,可能与肝脏功能得到暂时的代偿平衡有关。但 HA 的检测结果表明,正常组与模型组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。经过药物 8 周的干预后,各实验组与正常组、模型组及生理盐水组之间比较差异均有统计学意义($P<0.05$),在绝对数值上尤其与模型组之间的差异最大,而生理盐水组次之,显示出一定检测值之间的等级梯度。与血清肝功能的比较上来综合考虑,可以从另一个侧面看出,肝脏的损伤在祛除致病因子后,肝功能在一定的时期得到了恢复,但是由于肝纤维化的进程仍进一步的发展,HA 保持在一定的高水平,这与大多数的文献报道一致^[13]。本研究发现,三七总苷组与生理盐水组比较,血清学 HA 指标中可见已经表现出了一定改善作用,但与肝功能检测指标未见比较理想的结果,可能与肝脏胶原在肝组织中的沉积是一个动态的过程有关。

本研究中三七总苷组、干扰素组及三七总苷+干扰素组的病理学分级均未有明显差异,但与模型

组及生理盐水组之间的差异均具统计学意义,说明与普遍认同的干扰素比较,三七总苷已经显现出了一定的预防肝纤维化的作用。我们认为,三七总苷对肝纤维化的干预作用可能与前期的保肝利胆及皂苷类化学成分的抗氧化作用等有一定的关系。但是对相应的肝功能检测除了与模型组之间有差异外,并未得出相应的阳性结果。因为肝功能的损害在前期,但是到了病变后期,肝功能已经得到逐步代偿恢复,此时肝纤维化的进程并未停止,同时也从一个侧面印证了肝纤维化进程持续进行的观点。所以有必要对各种慢性肝病在未进入肝纤维化阶段及早进行预防和抗肝纤维化治疗。这对降低慢性肝病的病理分级和减少肝硬化的风险有一定的积极作用。

综上,三七总苷能够改善 DMN 所致肝纤维化大鼠肝功能,降低血清 HA 含量,改善肝纤维化病理分级。在经过 8 周的药物干预后,针对各组 HA 含量测定结果显示,三七总苷组与干扰素组及三七总苷+干扰素组之间无统计学差异,鉴于针对 IFN- γ 的研究已经充分证实,该制剂有肯定的抗肝纤维化的作用,但是加入三七总苷后并未显示出明显的叠加效应,并且与单纯三七总苷应用也无差异,可能与样本含量较少有关,今后应该提高样本含量作相应的深入对比研究。

参考文献

- [1]余万桂,张恒文,晏年春,等.三七总皂甙对肝纤维化小鼠血清酶学及 NO 的影响[J].中药药理与临床,2005,21(5):22—24.
- [2]张桂灵,石小枫,冉长清,等.三七总皂甙对抗大鼠免疫性肝纤维化的实验研究[J].第三军医大学学报,2007,29(23):2212—2214.

- [3]Park WH, Lee SK, Kim CH. A Korean herbal medicine, *Panax notoginseng*, prevents liver fibrosis and hepatic microvascular dysfunction in rats [J]. Life Sci, 2005, 76(15): 1675—1690.
- [4]翁红雷,蔡卫民,汪国运,等. γ -干扰素抗肝纤维化实验研究[J].中华肝病杂志,1999,7(S1):33—35.
- [5]王宝恩,王惠吉,朱家璇,等.中药复方丹参不同剂型治疗肝纤维化的实验研究与临床观察[J].肝脏病杂志,1993,1(2):69—72.
- [6]王泰龄,刘霞,周元平,等.慢性肝炎炎症活动度及肝纤维化程度计分方案[J].中华肝病杂志,1998,6(4):195—197.
- [7]袁盛榕.药理学实习教程[M].北京:世界图书出版公司,1994:13.
- [8]陈金国,路德元,叶天星.透明质酸放免分析及其对肝病的诊断价值[J].国外医学临床生物化学与检验学分册,1992,13(4):168.
- [9]Sun H, Yang Z, Ye Y. Structure and biological activity of protopanaxatriol-type saponins from the roots of *Panax notoginseng*[J]. Int Immunopharmacol, 2006, 6(1): 14—25.
- [10]Fort J, Pilette C, Veal N, et al. Effects of long-term administration of interferon alpha in two models of liver fibrosis in rats[J]. J Hepatol, 1998,29(2): 263—270.
- [11]曾民德,陆伦根,茅益民.肝纤维化的诊断方法及其评估(上)[J].中华肝病杂志,2006,11(2): 102—105.
- [12]Weng HL, Cai WM, Liu RH. Animal experimental and clinical study of effect of gamma-interferon on hepatic fibrosis[J]. World J Gastroenterol, 2001, 7(1): 42—48.
- [13]王丽春,赵连三.肝纤维化的实验动物模型[J].中国实验动物学报,2004,12(4):246.

(收稿日期:2011-01-11;修回日期:2011-05-10)

[编辑:侯建春]

(上接第 1670 页)

气机,益智安神功效。精合状,气机畅,抑郁症自解。抑郁症因中枢去甲肾上腺素(NE)和五羟色胺(5-HT)及其受体功能低下,也有研究认为抑郁症患者存在中脑边缘系统多巴胺功能失调,多巴胺受体功能低下^[6]。舒肝补肾解郁汤可能与马普替林同样影响抑制了突触前膜对 5-HT 和 NE 的再摄取。本研究结果表明,舒肝补肾解郁汤协同马普替林治疗抑郁症可进一步改善症状优于单一应用舒肝补肾解郁汤或抑郁药物。研究组的药物不良反应例数明显少于对照组,特别是对震颤、口干、便秘、视物模糊、心慌、排尿困难、心电图异常不良作用有明显的改变,并且应用舒肝补肾解郁汤可以减少抑郁药物的用量。

参考文献

- [1]中华医学会精神分会.中国精神障碍分类与诊断标准[S].3版.济南:山东科学技术出版社,2001:76.
- [2]李清福,刘渡舟.中医精神病学[M].天津:天津科学技术出版社,1989:449—450.
- [3]张明园.精神科评定量表手册[M].长沙:湖南科学技术出版社,1998:121—126,133—136,197—202.
- [4]雷载权.中药学[M].上海:上海科学技术出版社,2010.
- [5]陈彦方.CCMD-3 相关精神障碍的治疗与护理[M].济南:山东科学技术出版社,2001:143.
- [6]沈渔邨.精神病学[M].3版.北京:人民卫生出版社,1984:103.

(收稿日期:2011-02-28;修回日期:2011-6-24)

[编辑:叶 晨]