论著

文章编号:1000-5404(2005)24-2410-04

三七总皂苷对肝纤维化大鼠肝脏超微结构的影响

张荣华[1],李景怡[1],陈如泉[2],盛国光[3],艾国平[4],闫国和[4],粟永萍[4],肖桃元[5] (第三军医大学:[1]西南医院中西医结合科,[4]军事预防医学院防原医学教研室、全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,[5]高原军事医学系中心实验室,重庆 400038;湖北中医学院附属医院:[2]内科,[3]肝病科,武汉 430060)

提 要:目的 探讨三七总皂苷(PNS)对肝纤维化大鼠肝脏超微结构的影响及意义。**方法** 通过电镜观察大鼠肝脏的超微结构,以不同剂量PNS分别对肝纤维化大鼠进行预防和治疗。**结果** 肝纤维化大鼠可出现肝细胞胞浆内肿胀空泡和脂滴、微绒毛稀少、窦内皮细胞肥胖、细胞器增多、Disse间隙内胶原纤维增生等超微结构改变。PNS可减轻大鼠肝纤维化模型肝细胞内脂滴形成、内质网增生、线粒体肿胀及间质胶原增生。**结论** 无论治疗和预防组,PNS均可有效减轻肝纤维化大鼠肝脏超微结构的损伤。

关键词: 肝纤维化;三七总皂苷;超微结构;大鼠

中图法分类号: R282.71;R322.47;R575.202 **文献标识码:** A

Effects of panax notoginoside on hepatic ultrastructure in hepatic fibrosis rats

ZHANG Rong-hua[1], LI Jing-yi[1], CHEN Ru-quan[2], SHENG Guo-guang[3], AI Guo-ping[4], YAN Guo-he[4], SU Yong-ping[4], XIAO Tao-yuan[5] ([1]Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Southwest Hospital, [4]State Key Laboratory of Trauma, Burn and Combined Injury, Institute of Combined Injury, [5]Central Laboratory, College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [2]Department of Medicine, [3]Department of Hepatopathy, The Affiliated Hospital of Hubei Traditional Chinese Medical College, Wuhan 430060, China)

Abstract: Objective To investigate the effect and significance of panax notoginoside (PNS) on the hepatic ultrastructure in hepatic fibrosis rats. **Methods** Hepatic fibrosis (HF) rats were established by subcutaneous injection at one hind leg of pure CCl_4 at dose of 0.5 ml/100 g for the first time and then olive oil containing 40% CCl_4 at dose of 0.3 ml/100 g twice a week for 6 weeks. The normal controls were injected with physiologic saline. HF rats were simultaneously treated by different dose of PNS as the hepatic fibrosis was establishing or treated after establishment. The hepatic ultrastructure of all rats was observed by electron microscope. **Results** The change of hepatic ultrastructure could be observed in HF rats. There were swelling vacuoles and fatty drops in hepatic plasma; microvilli became exiguous. The number of organelle increased in endothelial cells of hepatic sinusoid and collagen fibre proliferated in hepatic Disse space. PNS would reduce formation of lipid droplet, proliferation of endoplasmic reticulum, swelling of mitochondrion and proliferation of interstitial collagen in hepatic cells of HF rats. **Conclusion** PNS could relieve the damage of hepatic ultrastructure in HF rats either for the purpose of prevention or cure.

Key words: hepatic fibrosis; panax notoginoside; ultrastructure; rat

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)指各种病因作用于肝脏,肝细胞发生坏死及炎症刺激时,肝脏内纤维结缔组织异常增生的病理过程。肝纤维化造成肝功异常,影响肝病预后,是慢性肝病发展到肝硬化的必经病理阶段。因此防治肝纤维化是攻克肝硬变的的突破口,防治肝纤维化具有重要意义。有研究表明,三七注射液有明显的降酶、退黄作用。三七总皂苷(panax notoginoside, PNS)可降低肝炎患者的ALT和黄疸指数。动物实验研究表明,三七的多种制剂可促进小鼠肝脏的白蛋白合成,PNS皮下注射或灌胃能升高^{3}H-亮氨酸脂

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39700185)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (39700185)

作者简介: 张荣华(1962-),女,河南省武陟县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事中西医结合治疗慢性肝病方面的研究。电话:(023)68754136,E-mail: zhrhlggg@163.com

收稿日期: 2005-05-24;**修回日期:** 2005-08-05

质在肝脏及血清蛋白中的放射程度，三七根总皂苷可促进大鼠肝脏 DNA 合成。在人体可升高血浆白蛋白。

本实验采用透射电镜技术，系统观察实验各组肝纤维化大鼠肝脏超微结构改变，并与药物处理组进行对照说明，探讨 PNS 对肝纤维化大鼠肝脏组织形态改变的作用机制。

1　材料与方法

1.1　主要试剂和仪器

试剂：四氯化碳，分析纯，重庆化学试剂总厂；橄榄油，化学纯，国产分装，上海化学试剂站分装厂；胆固醇，进口分装，广州南方化玻公司。

仪器：JEM-2000EX 透射电子显微镜（日本）；CX_7 全自动生化分析仪（美国 Backman）。

1.2　标本来源与处理

1.2.1　实验动物　　清洁级健康雄性 Wistar 大鼠 144 只，体质量 180～210 g，由第三军医大学实验动物中心提供，所有动物购回后饲养于西南医院动物室，室温（23 ± 1）℃，检疫 1 周，大鼠无不良反应，进食、饮水、活动正常者纳入实验，反之则剔除。

1.2.2　动物模型制作方法　　大鼠首次后腿皮下注射纯 CCl_4 0.5 ml/100 g，以后注射 40% CCl_4 橄榄油溶液 0.3 ml/100 g，每周 2 次，共 6 周。空白对照组皮下注射橄榄油，首次 0.5 ml/100 g，以后 0.3 ml/100 g，每周 2 次，共 6 周。

1.3　动物实验及分组

实验分两步进行：预防实验及治疗实验。预防实验将大鼠分为 4 组：①空白对照组；②肝纤维化模型组；③秋水仙碱组；④PNS 大、中小剂量组。PNS 标准品及秋水仙碱均用蒸馏水制成水溶液，PNS 大、中、小剂量组浓度分别为 PNS 1.2%、0.6%、0.3%，秋水仙碱浓度为 0.002 5%。用法为 0.5 ml/100 g，灌胃，1/d（相当于 60、30、15 mg/kg），秋水仙碱 0.002 5%（相当于 1.25×10^{-4} mg/kg），模型组及空白对照组灌以等量蒸馏水。预防实验在造模的同时给药，共 6 周；而治疗实验则在模型制备完毕后随机将动物分为上述 4 组并开始给药，共治疗 4 周。

1.4　标本采集

分别于造模 6 周和停止造模后 4 周处死动物。为便于统计处理，每组随机取 8 只用于各种指标检测。大鼠称体质量，3% 戊巴比妥钠 0.2 ml/100 g 腹腔注射，麻醉成功后股动脉放血，剖开腹腔取肝、脾称体质量后，于肝脏左叶相同部位留取肝组织切成 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小固定于 3% 戊二醛中，置 4 ℃保存。电镜标本用 3% 戊二醛和 1% 锇酸双重固定后，丙酮逐级脱水，70% 饱和醋酸铀作块染，环丙烷浸透后用环氧树脂 618 包埋。瑞典 LKB-Navo 超薄切片机切片（500Å），铅铀双染色 JEM-2000EX 透射电镜观察肝组织超微结构改变并照相。

2　结果

2.1　预防实验

空白对照组，6 周后，肝细胞超微结构正常（图 1）。肝细胞呈多边形，核圆形，位于细胞中心，核内常染色质多，异染色质少；胞浆内细胞器十分丰富，尤其是粗面内质网（rough endoplasmic reticulum，RER）、线粒体、高尔基器发达，滑面内质网（smooth endoplasmic reticulum，SER）也较多；RER 呈层状排列；线粒体形态多为圆形或椭圆形，嵴稀疏短小；高尔基器多见于毛细胆管附近，由 3～5 个扁平囊及大小泡所组成，泡内含有致密颗粒；SER 呈小泡状；糖原颗粒聚集，并排列成花簇状。肝细胞血窦面微绒毛丰富。

模型组：肝细胞超微结构有明显的改变（图 2）。可见单个或几个肝细胞坏死、破坏，吞噬细胞、中性粒细胞聚集。其余多数肝细胞胞浆内出现肿胀空泡和脂滴，其余细胞器减少或受挤压。血窦面微绒毛减少、稀疏，Disse 间隙变窄，有的可见胶原微纤维沉积。窦内皮细胞增生、肥胖，细胞器增多，细胞间窗孔减少，并出现紧密连接、细胞外基底膜等毛细血管化改变。肝星状细胞（hepatic stellate cell，HSC）易见，其胞浆内 RER 丰富，腔扩张。

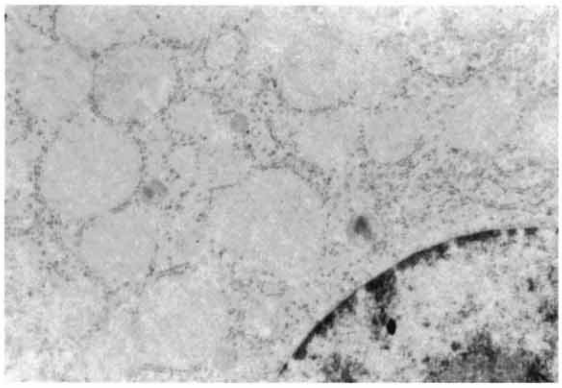
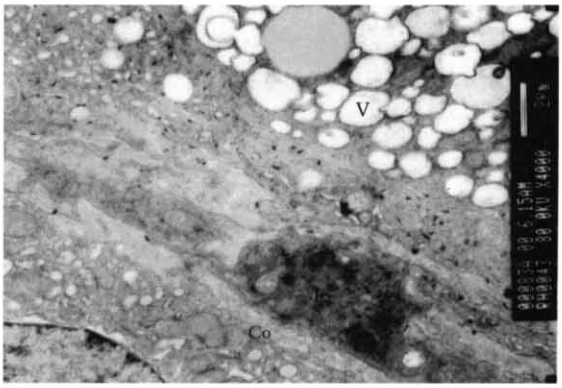


图 1　空白对照组，肝细胞超微结构正常　（TEM × 7 000）

Fig 1　The normal ultrastructure of hepatocytes in the control group　（TEM × 7 000）

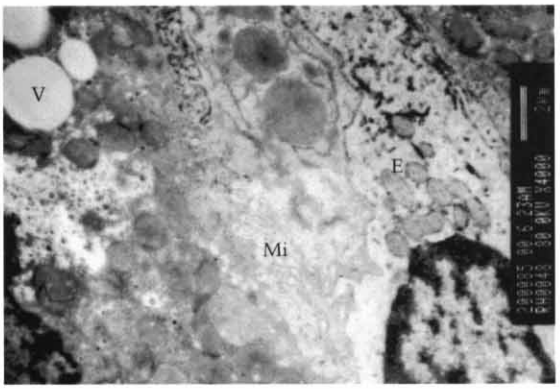


Many swelling vacuoles and lipid droplets and sparse microvilli in the cytoplasm of hepatocyte（V），obese endothelial cell in hepatic sinusoid and the increasing organells（E），proliferative collagen microfibrils of Disse sinusoid（Co）

图 2　模型组造模后 6 周肝细胞的超微结构　（TEM × 4 000）

Fig 2　Hepatocytes from hepatic fibrosis rats after 6-week establishment　（TEM × 4 000）

秋水仙碱组:肝细胞坏死不易见到,肝细胞内少量脂肪空泡,细胞核稍显不规则。窦内细胞增生,但毛细血管化不明显,Disse 间隙内仍见少量胶原纤维(图 3)。

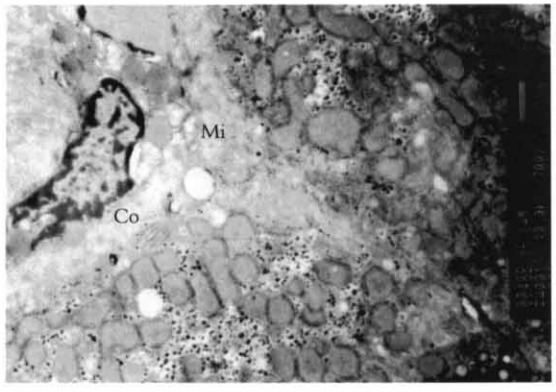


A small quantity of lipid droplets in the hepatic cytoplasm (V), abundant microvilli on the internal surface of the hepatic sinusoidand (Mi), obese endothelial cell in hepatic sinusoid and a small quantity of collagen in Disse sinusoid

图 3 预防实验秋水仙碱组肝细胞的超微结构 (TEM ×4 000)

Fig 3 Hepatocytes from rats in the preventive group treated with colchicine (TEM ×4 000)

PNS 组:大、中、小剂量组散在个别固缩退变肝细胞,其余肝细胞胞浆内有多少不一大脂质空泡,其他细胞器无异常。窦内皮细胞增生小剂量组较明显,Disse 间隙内可见少量胶原纤维增生。大剂量组少见胶原增生(图 4)。



Normal ultrastructure of hepatocytes, abundant microvilli on the internal surface of the hepatic sinusoidand (Mi), and a small quantity of collagen (Co) in Disse sinusoid

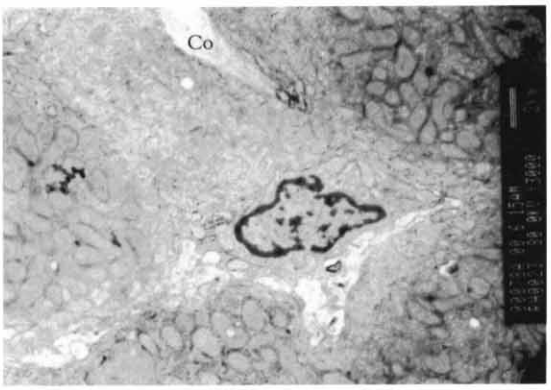
图 4 预防实验 PNS 大剂量组肝细胞的超微结构 (TEM ×3 000)

Fig 4 Hepatocytes from rats in the preventive group treated with massive PNS (TEM ×3 000)

2.2 治疗实验

模型组:停止造模后 4 周,肝组织病变与造模 6 周无明显差异,肝细胞肿胀空泡和脂滴有所减轻,但肝窦毛细血管化、胶原增生仍存在。

秋水仙碱组:肝细胞空泡变较模型组明显减轻,仅见胞核不够规则,异染色质增多,窦内皮细胞增生和毛细血管化减轻,Disse 间隙增宽,肝细胞微绒毛增多,胶原增生减少(图 5)。

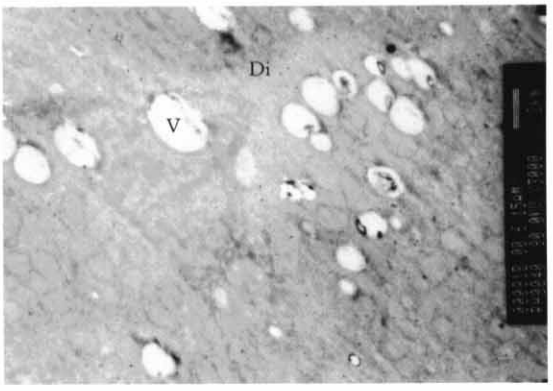


No abnormal ultrastructure of hepatocytes and a small quantity of collagen (Co) in Disse sinusoid

图 5 秋水仙碱治疗组肝细胞的超微结构 (TEM ×2 500)

Fig 5 Hepatocytes from rats in the therapeutic group treated with colchicine (TEM ×2 500)

PNS 组:肝细胞形态改变与秋水仙碱组基本相同,大剂量组肝细胞形态恢复较明显,仅肝细胞边缘残存一些脂质空泡,Disse 间隙明显增宽,微绒毛较多,胶原沉积减少(图 6)。



A small quantity of vacuoles (V) in hepatocytes and normal structure of Disse sinusoid (Di)

图 6 PNS 大剂量治疗组肝细胞的超微结构 (TEM ×4 000)

Fig 6 Hepatocytes from rats in the therapeutic group treated with massive PNS (TEM ×4 000)

3 讨论

肝纤维化大鼠由于细胞受损伤,微绒毛减少、断裂、脱落,使物质交换发生障碍。慢性肝损伤肝纤维化时,窦内皮细胞水肿,窗孔明显减少,内皮侧有不完整的基底膜形成,使肝窦逐渐演变为毛细血管,即肝窦毛

细血管化，造成微循环障碍。Disse 腔为独特的血管外膜，腔内有丰富的由肝窦面突入的微绒毛和不规则散在的少量的Ⅲ型胶原纤维及 HSC。HSC 的最典型特征是胞浆内含有电子密度低的脂滴，脂滴大小不等，数目不一，由于脂滴挤压，胞核常被挤向一侧，胞浆内细胞器较少。HSC 的主要功能为贮存维生素 A，调节肝小叶的血流量和清除外源性有毒物质，它与肝纤维化关系密切。在肝细胞受损而导致肝纤维化的过程中，HSC 可演变为成纤维细胞，产生大量胶原纤维，成为肝纤维化的物质基础[1]。

肝细胞损伤时，线粒体肿胀变性、增生肥大，导致产生 ATP 的功能受到抑制，是最常见的病理改变。肝细胞的内质网很丰富，分布广泛，分为两类。RER 可分散单个存在，或排列成层状密集存在，还可扩张成囊泡状，RER 的主要功能为生成输出蛋白。RER 的发达程度反映着肝细胞的功能状态。各种损伤因子引起的肝细胞损伤，可反映于 RER。最常见的改变为 RER 膜上的多聚核蛋白体解聚及脱粒。CCl_4 中毒所致肝细胞损害时，可见 RER 膜上的多聚核蛋白体解聚及脱粒，此时蛋白质合成也骤降。由于 SER 内含有混合功能氧化酶系，其中终末氧化酶即细胞色素 P-450，对许多有害物质如机体代谢产物、药物等均可加以代谢，从而被解除毒性，或被转化为易于排泄的物质。由此不难理解在慢性 CCl_4 中毒过程中，可见到 SER 膜的增生。高尔基复合体主要对 RER 合成的蛋白质进行加工、浓缩、储存和运输。高尔基复合体变小，数量减少和消失多发生在细胞分泌活动减弱之时，如各种毒性因子造成的肝细胞 RER 脱颗粒和断裂，并伴有高尔基复合体的萎缩或消失。溶酶体为单层界膜包围的椭圆形小体，能消化大分子物质，还在细胞与组织的更新、复旧与重建等方面都有一定作用[2]。

肝脏是脂质代谢的主要器官，CCl_4 损伤 RER 结构，或抑制某些酶的活性，继而影响蛋白质合成，此时，由 SER 合成的脂质不能与蛋白质结合生成脂蛋白输入血液，因而堆积于细胞内形成脂肪变性。肝细胞内有多个大小不等的脂滴，并有 RER 池的扩张及膜上核蛋白体脱粒等形态改变。

近年来认为[3]，组成胶原纤维的胶原是在纤维细胞的 RER 中形成，并以胶原纤维形式分泌至细胞外，再聚合成有周期性横纹的胶原微纤维。在肝纤维化发生发展过程中，HSC 明显增生，并逐步过渡为成纤维细胞，合成胶原蛋白沉积于 Disse 腔内，增生的 HSC 主要分布于小叶周边、纤维间隔及临近间隔的肝小叶内，在后期 HSC 明显减少，可能与 HSC 转变为成纤维细胞有关，这种转变纤维间隔比小叶内更明显。

中药对肝细胞损伤、肝纤维化时肝脏超微结构变化的影响是近年研究热点之一。李天望等[4]用大鼠 CCl_4 肝纤维化模型，通过电镜观察到软肝冲剂可使大鼠肝细胞病变明显减轻，肝血窦内胶原纤维及贮脂细胞减少，说明软肝冲剂氏治疗肝纤维化有效方剂。我们的研究表明[5,6]，三七可以减轻大鼠 CCl_4 肝纤维化模型肝细胞内脂滴形成、内质网增生、线粒体肿胀及间质胶原增生，具有抗肝纤维化作用。

已有资料[7]表明，三七对肝损伤肝纤维化的超微结构改变具有显著的防治作用，以低剂量组效果更为显著。而 PNS 对肝纤维化超微结构的影响尚少见报道。我们在实验中观察到，PNS 和秋水仙碱用于实验性肝纤维化，可改善形态结构，减少 Disse 腔及 HSC 周围的胶原纤维，促进已形成的胶原的吸收。因此，药物防治组大鼠肝纤维化程度消退快，以 PNS 大剂量组效果更为显著。我们以复合因素造模形成肝纤维化主要与 HSC 和成纤维细胞有关。PNS 通过抗炎、抗坏死、防治 HSC 增生并转化为肌成纤维细胞，抑制成纤维细胞合成、分泌胶原，而达到抗肝纤维化目的。

参考文献：

[1] Wilasrusmee C, Siritheptawee S, Kanchanapanjapon S, *et al*. Ultrastructural changes in cirrhotic and noncirrhotic patients due to hepatectomy[J]. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2004, 11(4): 266 - 271.

[2] Xiao J C, Jin X L, Ruck P, *et al*. Hepatic progenitor cells in human liver cirrhosis: immunohistochemical, electron microscopic and immunofluorencence confocal microscopic findings[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(8): 1208 - 1211.

[3] 成令忠. 组织学[M]. 第 2 版. 北京：人民卫生出版社，1995. 1215.

[4] 李天望，陈胜铎. 软肝冲剂防治实验性肝纤维化超微结构及胶原纤维定量研究[J]. 中国中西医结合脾胃杂志，1996，4(3)：161 - 162.

[5] 张荣华，周子成，洪多伦，等. 三七、虫草菌丝对实验性肝纤维化预防作用的研究[J]. 重庆医学，2000，29(6)：483 - 486.

[6] 张荣华，周子成，洪多伦，等. 三七抗肝纤维化的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2000，22(4)：307 - 309.

[7] 刘宝源，高连相，杨西敏，等. 三七对小鼠肝损伤肝纤维化的防治作用[J]. 中西医结合肝病杂志，1998，8(S1)：113 - 115.

（编辑　王　红）