论著

文章编号:1000-5404(2007)23-2212-03

三七总皂甙对抗大鼠免疫性肝纤维化的实验研究

张桂灵[1],石小枫[2],冉长清[3],徐 曼[4],朱照静[4] ([1]浙江省余姚市人民医院感染科,余姚 315400;重庆医科大学:[2]附属第二医院感染科,教育部感染性疾病分子生物学重点实验室,重庆 400010,[4]基础医学院药学教研室,重庆 400016;[3]重庆市中药研究院中药药理室,重庆 400065)

提 要: 目的 进一步观察三七总皂甙抗大鼠免疫性肝纤维化的作用。**方法** 用牛血清白蛋白等复合因素致大鼠肝纤维化,同时给予三七总皂甙60 mg/kg和30 mg/kg皮下注射治疗,共6周。分离血清,检测肝功能;分离肝组织,作病理学纤维化程度分级和免疫组化观察Ⅰ、Ⅲ型胶原及TGF-β_1的合成表达。**结果** 三七总皂甙能降低血清转氨酶,增加肝脏白蛋白的合成,减轻肝纤维化程度,抑制免疫性肝纤维化大鼠Ⅰ、Ⅲ型胶原及TGF-β_1的合成表达。**结论** 三七总皂甙具有抗肝纤维化作用。

关键词: 三七总皂甙;肝纤维化;Ⅰ、Ⅲ型胶原;TGF-β_1

中图法分类号: R-33; R285, R575.2 **文献标识码**: A

Effects of total saponins of panax notoginseng against liver fibrosis in rats

ZHANG Gui-ling[1], SHI Xiao-feng[2], RAN Chang-qing[3], XU Man[4], ZHU Zhao-jing[4] ([1]Department of Infectious Diseases, Yuyao People's Hospital, Yuyao 315400; [2]Department of Infectious Diseases, Key Laboratory of Molecular Biology on Infection Diseases, Ministry of Education, The Second Affiliated Hospital, Chongqing 400010, [4]College of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016; [3]Institute of Chongqing Chinese Traditional Medicine, Chongqing 400065, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of total saponins of panax notoginseng (PNS) on the production of collagen Ⅰ, Ⅲ and TGF-β_1 in rats with experimental fibrosis. **Methods** Experimental fibrosis model was copied by intracutaneous injection of BSA and rats feeding on diet rich in lipid. From the 1st day after BSA injection, SPN (60 or 30 mg/kg) or Colchicine were given intracutaneously once a day for 42 days. All animals were sacrificed on the 43rd day. Their hepatic function was evaluated by determining the levels of ALT, AST, ALB in serum. The progression of hepatic fibrosis was confirmed by pathological analysis. Then type collagen Ⅰ, Ⅲ and TGF-β_1 were observed with immunohistochemical method. **Results** The BSA injection significantly elevated the levels of ALT and AST, while SPN treatment significantly down-regulated them. But the level of ALB was opposite to that of ALT or AST in SPN treatment group. The positive staining of the collagen Ⅰ, Ⅲ and TGF-β_1 was stronger in hepatic fibrosis model group than in SPN treatment group. The contents of the collagen were identical to the immunohistochemical results. **Conclusion** SPN has the protective effect against liver fibrosis.

Key words: total saponins of panax notoginseng; liver fibrosis; collagen Ⅰ, Ⅲ; transforming growth factor β_1

肝纤维化是慢性肝病的共同病理基础,阻止肝纤维化、肝硬化的形成和发展是医务工作者面临的难题。我们已观察到三七总皂甙对四氯化碳所致的大鼠肝纤维化有抑制作用[1,2],现研究三七总皂甙对免疫性肝纤维化大鼠的影响,期望用不同模型来探索三七总皂甙的抗肝纤维化作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

Wistar大鼠67只,5~6周龄,体质量120~150 g,雌雄各半,购自重庆市中药研究院实验动物研究室。

1.2 药物及主要试剂

三七总皂甙由重庆医科大学基础医学院药学教研室提供,

基金项目:国家自然科学基金(30671867);重庆市自然科学基金(2004)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30671867) and the Natural Science Foundation of Chongqing (2004)

作者简介:张桂灵(1975-),女,安徽省宿州市人,硕士,主治医师,主要从事病毒性肝炎方面的研究,发表论文5篇。电话:(0574)82273389,E-mail:zhgl2003@sohu.com

通讯作者:石小枫,电话:(023)63717934,E-mail:sxff2003@yahoo.com.cn

收稿日期:2007-02-07;**修回日期**:2007-04-16

纯度大于 95%；秋水仙碱由台湾省景德制药股份有限公司提供。Ⅰ、Ⅲ型胶原抗体购自上海医科大学病理学教研室，工作浓度 1∶50；TGF-β_1 免疫组化试剂盒购自迈新生物技术公司，工作浓度 1∶1 000；SP 试剂盒购自华美生物制品公司；牛血清白蛋白（bovine serum albumin，BSA）购自北方同正生物技术有限公司；肝功能试剂购自重庆市医学试剂研究所。

1.3　实验方法

1.3.1　免疫性肝纤维化模型的建立[3]　8 g/L BSA 生理盐水和等体积弗氏不完全佐剂的混合液 0.4 ml 给大鼠作皮下多点注射 5 次，第 1、2 次间隔 2 周，其后隔周 1 次；此后经尾静脉注射 8 g/L BSA，2 次/周，首次 5 g/L，浓度逐次递增 0.25 mg/L，末次为 8.0 g/L，共 12 次。同时配以高脂饲料喂养。

1.3.2　实验分组　Wistar 大鼠分为 5 组：正常对照组（10 只），肝纤维化模型组（14 只），秋水仙碱治疗组（0.2 mg/kg，13 只），三七总皂甙 60、30 mg/kg 两个治疗组（各 15 只），皮下注射连续治疗 42 d，然后断头处死，分离血清检测转氨酶（ALT、AST）。

1.3.3　病理观察　取肝脏左叶，10% 甲醛固定，石蜡包埋切片，常规 HE 染色，光镜下观察纤维增生程度并分为 6 级[4]。Ⅰ、Ⅲ型胶原及 TGF-β_1 免疫组化采用 ABC 法，DAB 显色，Ⅰ、Ⅲ型胶原显色程度及范围换算成显色指数进行统计学处理[5]。

1.4　统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 11.5 统计软件进行 t 检验和秩和检验。

2　结果

2.1　三七总皂甙对肝纤维化大鼠肝功能的影响

三七总皂甙 60、30 mg/kg 皮下注射治疗对转氨酶的升高有明显抑制作用，并能增加白蛋白的合成，秋水仙碱也有相似作用，其中对 ALT 的降低较明显。见表 1。

表 1　三七总皂甙对大鼠实验性肝纤维化 ALT、AST、ALB 的影响（$\bar{x} \pm s$）

组别	成活动物数	ALT（U/L）	AST（U/L）	ALB（g/L）
正常对照组	10	53.701 ± 8.61	75.31 ± 20.62	45.10 ± 5.21
肝纤维化模型组	13	231.41 ± 30.15	487.92 ± 53.31	28.54 ± 4.31
三七总皂甙治疗组（mg/kg）60	12	91.75 ± 12.16[a]	178.56 ± 19.34[a]	37.98 ± 3.22[a]
30	13	101.83 ± 16.27[a]	297.23 ± 53.25[a]	30.89 ± 3.52
秋水仙碱治疗组	11	93.20 ± 9.52[a]	443.15 ± 63.63	31.23 ± 2.31

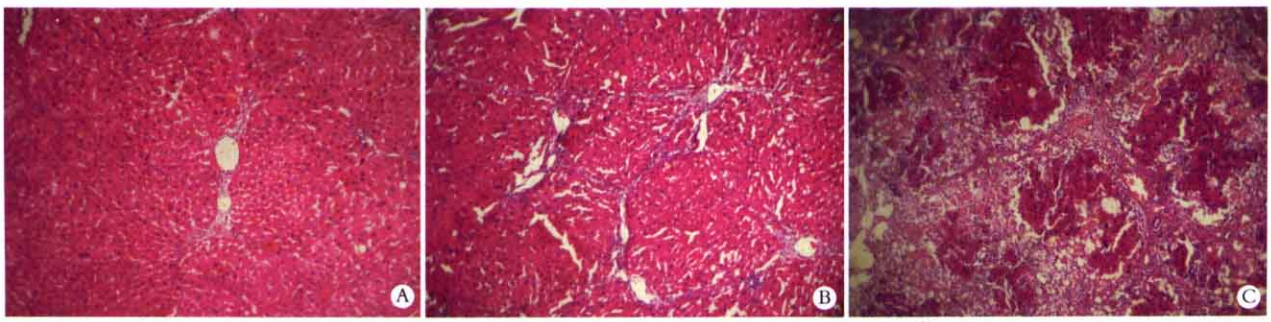
a：$P < 0.01$，与肝纤维化模型组比较

2.2　三七总皂甙对肝纤维化程度的影响

HE 染色见病理模型组肝小叶结构破坏，丧失正常结构，细胞变性坏死和炎性浸润，胶原纤维组织明显增生，形成纤维间隔，细胞结构凌乱，形成典型的假小叶，将肝小叶分隔成大小不等的肝细胞团，肝细胞广泛脂肪样变及坏死，炎症细胞浸润明显；三七总皂甙治疗组纤维有部分分割肝小叶，胶原纤维生成显著减少，未见完整假小叶形成，60 mg/kg 组的效果更为明显，呈一定的剂量效应关系（图 1）。表 2 从纤维化程度分级方面表明了三七总皂甙的抗肝纤维化作用。

2.3　Ⅰ、Ⅲ型胶原免疫组化染色结果

肝组织Ⅰ、Ⅲ型胶原免疫组化观察结果显示，Ⅰ型胶原肝纤维化模型组假小叶中央静脉周围呈强阳性染色，主要分布于纤维组织增生的汇管区，Disse 间隙有沉积、纤维间隔呈强阳性染色；三七总皂甙及秋水仙碱组部分 Disse 间隙、汇管区及中央静脉周围其阳性着色较肝纤维化模型组少，纤维间隔染色较弱。Ⅲ型胶原与Ⅰ型胶原基本相似，换算成显色指数的结果见表 3。



A：三七总皂甙 60 mg/kg 治疗组；B：三七总皂甙 30 mg/kg 治疗组；C：肝纤维化模型组

图 1　大鼠肝组织病理学检查结果　（HE × 100）

表 2　4 组大鼠肝纤维化程度分级情况

组别	成活动物数	纤维化分级						
		0	1	2	3	4	5	6
正常对照组	10	10						
肝纤维化模型组	13	0	0	2	1	1	4	5
三七总皂甙治疗组（mg/kg）60	12	0	3	5	2	1	0	1[b]
30	13	0	1	3	4	3	1	1[a]
秋水仙碱治疗组	11	0	1	4	1	3	1	1[a]

a：$P < 0.05$，b：$P < 0.01$，与肝纤维化模型组比较

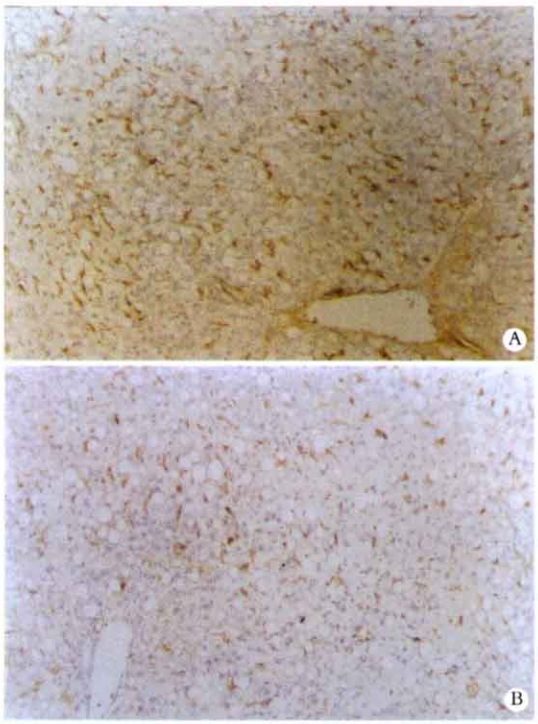
表 3　三七总皂甙对大鼠肝纤维化Ⅰ、Ⅲ型胶原的影响

组别	成活动物数	Ⅰ型胶原	Ⅲ型胶原
正常对照组	10		
肝纤维化模型组	13	0.81 ± 0.43	1.50 ± 0.81
三七总皂甙治疗组（mg/kg）60	12	0.33 ± 0.21[b]	0.60 ± 0.36[b]
30	13	0.51 ± 0.46	0.79 ± 0.40[b]
秋水仙碱治疗组	11	0.31 ± 0.29[a]	0.70 ± 0.56[a]

a：$P < 0.05$，b：$P < 0.01$，与肝纤维化模型组比较

2.4 TGF-β_1的免疫组化染色结果

肝纤维化模型组胶原纤维组织间隙、细胞膜及细胞质的TGF-β_1阳性染色明显，主要见于肝星状细胞周围；三七总皂甙60 mg/kg治疗组的TGF-β_1阳性染色程度较肝纤维化模型组减弱，散在分布于Disse间隙、炎症细胞及其周围(图2)。因此，三七总皂甙60 mg/kg治疗组的TGF-β_1的表达量低于肝纤维化模型组，而三七总皂甙30 mg/kg治疗组及秋水仙碱组的TGF-β_1的表达和肝纤维化模型组类似。



A：肝纤维化模型组；B：三七总皂甙60 mg/kg治疗组

图2 2组大鼠TGF-β_1的免疫组化染色结果 (ABC染色×100)

3 讨论

肝纤维化实质是细胞外基质(extracellular matrix，ECM)合成与代谢失衡，导致ECM异常沉积。ECM包括胶原、非胶原糖蛋白及蛋白多糖，其中胶原是最重要的ECM。肝脏胶原有Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ型，以Ⅰ、Ⅲ型为主。肝纤维化发病原因各异，但形成肝纤维化的机制有相似之处。就疾病而言，病因治疗是关键，但慢性病毒性肝炎其病因治疗有一定难度，因此，根据疾病发展的不同阶段，采取相应的治疗措施也不失为一种有效手段。

近年来，我国科学工作者从具有活血化瘀、软坚散结等作用的中药中发现了大量抗肝纤维化的药物。在临床应用中主要以复方制剂为主，其组成复杂，相互之间的作用也难于阐明，临床疗效难以令人满意。因此，探明有效成分，并与细胞生物学微观研究相结合，是进一步发掘有效新药的必由之路，也是中医药走向现代化的形势所趋。三七为传统的活血化瘀中药，其主要活性成分为皂甙。文献[1,2,6]表明：在四氯化碳致大鼠肝纤维化模型中，三七总皂甙能明显改善四氯化碳所致的大鼠肝纤维化程度；抑制Ⅰ、Ⅲ型胶原的合成表达；降低肝组织胶原的合成、降低升高的转氨酶；对肝纤维化的血清血标志物HA、pCⅢ、LN也有明显的降低作用；和肝纤维化模型组相比，还能抑制TGF-β_1在肝组织中的表达，可有效减轻肝纤维化大鼠肝脏超微结构的损伤。

本研究进一步观察了三七总皂甙在免疫性肝纤维化中的作用，结果表明：三七总皂甙60、30 mg/kg能降低免疫性肝纤维化大鼠的血清转氨酶、促进肝脏白蛋白的合成；通过肝纤维化程度分级分析可知，三七总皂甙能明显改善受损肝脏的病理形态，降低纤维化程度；能抑制Ⅰ、Ⅲ型胶原的合成表达。因此，我们通过对两种肝纤维化动物模型的观察，认为三七总皂甙具有抗肝纤维化的作用。

众所周知，肝纤维化的形成和发展受多种因素的影响，其中影响ECM代谢的细胞因子调控失衡是重要原因之一。肝星状细胞是ECM产生的主要来源，而细胞因子在肝星状活化过程中发挥着重要作用，TGF-β_1是一类多功能生长因子，主要由Kuppfer细胞产生，能使单个细胞胶原合成增加60%～80%，被认为是肝纤维化形成的关键因子[7]。本实验及以前的实验表明，肝纤维化模型组肝纤维组织中TGF-β_1的表达量强于三七总皂甙治疗组，这可能是由于三七总皂甙改善肝脏微循环，减轻局部炎症反应，引起了TGF-β_1的表达减少，或者是由于三七总皂甙具有较强的抑制Ⅰ、Ⅲ型胶原合成的作用，减轻了肝脏的纤维化而间接地使TGF-β_1的表达自发降低，其机制值得进一步研究。

参考文献：

[1] 石小枫，徐 曼，刘 杞. 三七总皂甙对肝纤维化大鼠Ⅰ、Ⅲ胶原及TGF-β_1的影响[J]. 中药药理与临床，2001，17(2)：7－8.

[2] 石小枫，刘 杞，刘 林，等. 三七总皂苷抗实验性肝纤维化的研究[J]. 中药药理与临床，2004，20(1)：12－14.

[3] 王宝恩，王志富，殷蔚黄，等. 实验性免疫性肝纤维化模型的研究[J]. 中华医学杂志，1989，69(9)：503－505.

[4] 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.

[5] 徐列明，刘 平，刘 成，等. 桃仁提取物抗肝窦毛细血管化的实验研究[J]. 肝脏病杂志，1993，1(2)：73－76.

[6] 张荣华，李景怡，陈如泉，等. 三七总皂苷对肝纤维化大鼠肝脏超微结构的影响[J]. 第三军医大学学报，2005，27(24)：2410－2413.

[7] Gressner A M. Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fat-storing cells[J]. J Hepatol，1995，22(2 Suppl)：28－36.

(编辑 龙 亮)