DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.04.002

文章编号:1000-5404(2000)04-0307-03

论著

三七抗肝纤维化的实验研究

张荣华[1],周子成[2],洪多伦[1],艾九松[1] (第三军医大学附属西南医院:[1]中医科;[2]消化内科;重庆 400038)

提 要:目的 探讨三七对四氯化碳(CCl_4)中毒性肝纤维化的防治作用。方法 复制大鼠CCl_4中毒性肝纤维化模型,并以秋水仙碱作为阳性治疗对照。采用光镜、电镜观察组织学改变,测定血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、白蛋白、球蛋白、透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)、肝组织羟脯氨酸(Hyp)含量,以反映肝细胞损伤及肝纤维化程度。将形态改变与功能变化相结合,对比分析三七对CCl_4中毒性肝纤维化的防治作用。结果 三七治疗后肝细胞损害、肝脏脂肪变性、炎细胞浸润的程度均较轻,成纤维细胞和胶原纤维增生亦较少。结论 三七对肝细胞损伤有一定保护作用,并可明显抑制肝组织中成纤维细胞及胶原纤维增生,是较理想的防治肝纤维化的药物。

关键词:肝纤维化;三七;透明质酸;层粘连蛋白;病理学;大鼠
中图法分类号: R575.205 文献标识码: A

Effects of Panax Notogenseng on CCl_4-induced liver fibrosis in rats

ZHANG Rong-hua, ZHOU Zi-cheng, HONG Duo-lun, AI Jiu-song (Department of Traditional Chinese Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of Panax Notoginseng (PN) on liver fibrosis (LF) induced with CCl_4. **Methods** The model of CCl_4-induced LF was established in rats and they were treated with PN or colchicine (Col). The histological changes were obseved with light and electron microscopy. Serum level of alanine aminotransferase (ALT), albumin, globulin, hyaluronic acid (HA) and laminin (LN) and hydroxyproline (Hyp) in liver tissues were determined to reveal the extent of liver damages. The Col-treated group served as the positive control. **Results** The extent of liver damages, fatty degeration and infiltration of inflammatory cells were less severe in the PN treated group than in the Col-treated group. The formation of fibroblasts and collagenous fibers was less in amount in the PN-treated group than in the Col-treated group. **Conclusion** PN exerts a protective effect on CCl_4-induced LF in rats and inhibits the formation of fibroblasts and collagenous fibers in liver tissues.

Key words: liver fibrosis; Panax Notoginseng; hyaluronic acid; laminin; pathology; rat

肝纤维化造成肝功异常,影响肝病预后,是慢性肝病发展至肝硬化的必经阶段。因此,防治肝纤维化具有重要意义。目前,国内外尚缺乏理想的抗肝纤维化的药物,中医中药的应用具有广阔的前景。为探讨三七的抗肝纤维化作用,我们采用四氯化碳(Carbon tetrachloride, CCl_4)中毒诱导的大鼠肝纤维化模型,研究三七对某些血清学指标、肝组织羟脯氨酸 Hydroxyproline, Hyp)含量变化和肝组织病理形态改变的影响,并与秋水仙碱的抗肝纤维化作用进行对比分析,为进一步研究三七防治肝纤维化作用和机制及指导临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性 Wistar 大鼠 107 只,SPF 级,体重 180~210 g,由第三军医大学动物中心提供。

1.2 药物及其配制

生三七粉(贵阳中药厂)制成 3%、6%、12%混悬液,秋水仙碱(法国 HOUDE 实验室)制成 0.0025%混悬液,4℃保存。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39700185)

作者简介:张荣华(1962—),女,河南省武陟县人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事中药防治肝纤维化方面的研究,发表论文 9 篇。电话:(023)65318301-73071

收稿日期:1999-07-08;修回日期:2000-01-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3 肝纤维化模型

每只大鼠首次后腿皮下注射纯 CCl4(重庆化学试剂厂) 0.05 ml/kg,以后注射 40%CCl_4 橄榄油 0.03 ml/kg(V/V),每周 2 次,共 9 周。

1.4 动物分组及给药

将实验动物随机分为 4 组:①空白对照组(Control group),大鼠接受橄榄油(上海卫辉化学试剂厂)后腿皮下注射,首次 0.05 ml/kg,以后 0.03 ml/kg,每周 2 次。同时予 0.5%羧甲基纤维素钠溶液经口灌胃,5 ml/kg,1/d。②肝纤维化模型组(Model)。③秋水仙碱组(Colchicine)。模型组和秋水仙碱组在造模的同时分别予 0.5%羧甲基纤维素钠、0.0025%秋水仙碱灌胃,5 ml/kg,1/d。④三七组(Panax notoginseng, PN),在预实验取得最佳剂量后,造模的同时予 12%三七粉灌胃,5 ml/kg,1/d。

1.5 标本采集

各组每隔 3 周处死 8 只大鼠,最后一次处死大鼠为第 9 周末。用 3%戊巴比妥钠腹腔注射 0.02 ml/kg,麻醉后,经股动脉放血,分离血清,−20℃ 保存。留取肝组织标本。

1.6 检测指标及方法

1.6.1 应用 EX_7 全自动生化测定仪检测血清丙氨酸氨基转移酶(Alanine aminotransferase, ALT)、白蛋白(Albumin)、球蛋白(Globulin)含量。

1.6.2 应用上海第二军医大学海军医学研究所提供的透明质酸(Hyaluronic acid, HA)、层粘连蛋白(Laminin, LN)放免试剂盒,按说明操作,测定 HA、LN 含量。

1.6.3 肝组织 Hyp 含量按许志勤法[1]进行测定。

1.6.4 病理形态学观察 常规 HE 染色观察肝组织学改变,Van Gieson 胶原纤维染色观察胶原纤维增生情况,电镜观察肝脏超微结构变化。

1.7 统计学处理

采用第三军医大学医用数理统计程序进行统计学处理。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

对照组处死前均存活,每只体重增加(128±47)g。模型组实验中死亡 7 只,至 9 周处死前,每只体重增加(34±29)g,显著低于空白对照组($P<0.05$)。秋水仙碱组实验中死亡 4 只,每只体重增加(62±23.6)g,显著低于空白对照组($P<0.01$)而高于模型组($P<0.05$)。三七组实验中无死亡,与模型组比较 $P<0.05$,每只体重增加(87±36)g,显著高于模型组($P<0.01$)。死亡者均未列入统计。

2.2 三七对实验大鼠肝功能的影响

模型组、秋水仙碱组、三七组不同时相 ALT 含量均显著高于同期空白对照组($P<0.01$, $P<0.05$),而以模型组最高,显著高于其它同期各组($P<0.01$)。9 周时,三七组 ALT 低于秋水仙碱组($P<0.05$)。模型组不同时相白蛋白下降、球蛋白增加,与其它各组比较差异显著(除秋水仙碱组 6 周外),而 9 周时三七组球蛋白显著低于秋水仙碱组($P<0.05$),见表 1。

2.3 三七对大鼠血清 HA、LN 和肝组织中 Hyp 的影响

各组大鼠不同时相血清 HA、LN、肝 Hyp 均较空白对照组有不同程度升高,但 3 周时均无显著性差异,6 周时秋水仙碱组 Hyp 升高及三七组 3 项指标升高无统计学意义,各组以 9 周时 3 项指标升高(除三七组 Hyp 外)最为明显,而 2 个药物治疗组 6、9 周时各项指标显著低于同期模型组(除秋水仙碱组 6 周时血 HA、9 周时肝 Hyp 外),见表 2。

表 1 各组大鼠肝功能变化($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Tab 1 Changes of liver function in different groups of rats($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Group		ALT(IU/L)	Albumin(ρ_B/g·L^{-1})	Globulin(ρ_B/g·L^{-1})
Control	week3	38.47±4.39	34.51±1.69	24.19±1.57
	week6	37.59±5.32	35.09±1.87	23.78±1.45
	week9	39.63±5.13	35.55±2.09	24.01±1.62
Model	week3	225.38±99.78**	31.24±1.92**	27.76±2.20**
	week6	312.63±72.21**	27.82±2.93*	30.78±1.88
	week9	348.63±90.75**	24.41±2.81*	36.52±1.09
Colchicine	week3	58.38±12.68**△△	33.86±2.62	24.14±2.25
	week6	90.2±58.26*△△	32.10±3.97*	24.78±2.09*
	week9	110.0±37.55**△△	32.41±1.96△△	26.45±2.60
PN	week3	67.13±18.39**△△	34.83±1.58△△	24.01±2.50
	week6	97.63±38.59**△△	34.35±1.54△△	23.91±1.88
	week9	68.12±14.34**△△#	34.50±2.74△△	23.88±1.69

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control; △: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* model; #: $P<0.05$ *vs* Colchicine

表 2 大鼠血清 HA、LN 和肝组织 Hyp 的变化($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Tab 2 Levels of HA、LN in serum and Hyp in liver tissue in different groups of rats($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Group		HA(ρ_B/μg·L^{-1})	LN(ρ_B/μg·L^{-1})	Hyp(mg/g)
Control	week3	97.32±15.28	32.47±5.01	2.01±0.39
	week6	98.45±16.03	33.38±4.56	2.22±0.41
	week9	100.13±17.1	33.86±4.28	2.39±0.46
Model	week3	116.16±20.2	37.48±5.79	2.86±0.77
	week6	139.69±18.97**	55.70±7.32**	3.56±0.77**
	week9	198.78±34.54**	85.56±12.34**	3.95±0.98**
Colchicine	week3	115.91±21.86	35.47±3.78	2.60±0.57
	week6	129.64±22.07**	40.01±6.14*△△	2.78±0.54△
	week9	147.51±21.89**△△	45.81±9.30**△△	3.11±0.42**
PN	week3	109.50±17.76	30.04±4.93	2.48±0.41
	week6	112.99±20.54△	37.44±4.90△△	2.80±0.64△
	week9	141.56±23.55*△△	39.20±4.93**△△	2.97±0.69△

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control; △: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* model

2.4 病理形态学观察

2.4.1 肝脾大体形态观察 模型组 3 周末肝脏开始肿大,9 周末停止肿大,韧度增加,有油腻感。其中有 1 只大鼠肝脏体积缩小,黄褐色,表面呈细结节状,有腹水。脾脏从第 6 周末开始

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

肿大, 9 周末肿大最明显。秋水仙碱组、三七组 3 周末肝脏开始肿大, 9 周末仍肿大, 但较模型组轻, 脾脏肿大不明显。

2.4.2 光镜观察　HE 染色和 Van Gieson 胶原纤维染色后观察, 见对照组肝小叶结构完整, 无变性、坏死、炎细胞浸润及纤维组织增生。模型组 3 周时肝细胞广泛脂肪变性, 可见少量增生的纤维组织; 6 周时肝细胞脂肪变性加重, 残存少量肝细胞; 9 周时肝组织大片脂肪变性, 呈空网状, 仅残存少量肝细胞, 变性肝组织中穿插纤维组织条索。秋水仙碱组 3 周时界板区大量脂肪空泡, 炎细胞浸润较多, 有少量纤维组织增生; 6 周时肝细胞呈大片网状变性坏死, 变性区有纤维细胞增生和炎细胞浸润, 小叶间少量纤维组织增生; 9 周时汇管区纤维组织增生, 并向周围放射生长, 可见再生肝细胞, 界板区纤维组织增生。三七组 3 周时肝细胞脂肪变性较模型组及秋水仙碱组轻, 汇管区少量纤维组织; 6 周时部分肝细胞脂肪变性, 肝内灶性炎细胞浸润, 肝小叶间和中央静脉周围少量纤维组织增生; 9 周时中央静脉周围大片肝细胞脂肪变性, 汇管区及界板区纤维组织少量增生。

2.4.3 电镜观察　模型组肝细胞胞浆内充满大小不等的脂肪空泡, 有的肝细胞核被挤压变形, 核内亦可见空泡。胞浆内滑面内质网增生, 呈典型的肝细胞中毒损伤后的超微结构特征性改变。变性的肝细胞内线粒体电子密度增强, 嵴模糊或消失呈均质状。而秋水仙碱组和三七组上述改变较轻微。

3　讨论

本研究以 CCl_4 复制肝纤维化动物模型, 使肝细胞发生变性坏死, 通过炎症肝脏结缔组织增生, 分割肝小叶, 最后导致肝硬变。肝纤维化的实质是由于胶原和其他细胞外基质 (ECM) 的合成与降解失衡, 导致 ECM 在肝内过量沉积[2]。参与肝纤维化的细胞外基质成分包括胶原蛋白、非胶原性糖蛋白和蛋白多糖 3 大类[3]。HA 是构成 ECM 中蛋白多糖的主要成分, 是反映肝内皮细胞功能和肝硬化程度的指标, 其对慢性肝损伤和肝纤维化的诊断价值已得到普遍承认[4]。LN 是一种重要的结构糖蛋白, 当肝细胞受损伤时, 各种细胞因子及 ECM 本身的破坏可激活 LN 的合成, LN 升高程度与肝纤维化程度呈正相关[5]。胶原纤维主要由胶原蛋白所构成, Hyp 为胶原蛋白所特有的氨基酸成分, 其在肝脏中的含量可反映胶原代谢的变化情况, 与肝纤维化程度相平行。

根据中医辨证, 结缔组织增生性疾病 (包括肝纤维化和肝硬化) 与血瘀证相关, 而活血化瘀药物对此类疾病有独特的功效。在肝纤维化的治疗中, 目前以活血化瘀及益气活血法应用得最为广泛。

三七是经典的止血活血良药。临床观察发现, 三七有利胆、退黄、降酶等作用, 可提高慢性肝病患者的血浆白蛋白[6]。药理研究证实, 三七对动物实验性急性肝损伤有明显的防治作用, 其有效成分三七总皂甙是缺血再灌注损伤的有效保护药物[7], 但其对肝纤维化的防治研究报道甚少。

本研究结果表明, 三七可显著降低血清 ALT、球蛋白, 升高白蛋白, 减轻肝细胞脂肪变性及炎细胞浸润, 说明三七具有保护肝细胞、肝细胞损伤的作用。结果还表明, 三七组 6、9 周时血 HA、LN、肝 Hyp 与同期模型组相比显著降低, 且病理观察提示三七可明显地拟制肝组织中成纤维细胞及胶原纤维增生, 说明三七确能抑制肝脏胶原纤维合成与沉积, 具有抗肝纤维化作用。

秋水仙碱已用于临床治疗慢性肝病, 长期应用可防治实验性和临床病人的肝纤维化和肝硬化, 并有抑制胶原分泌的作用, 被认为是治疗人类肝纤维化的有希望的药物[8]。从本研究结果分析, 秋水仙碱确有抗肝纤维化作用, 且血清学指标变化与形态学改变相吻合。

本研究表明, 三七有保护肝细胞、减轻 CCl_4 中毒性肝脏损害、减少胶原蛋白合成、促进胶原蛋白分解的作用, 是较理想的防治肝纤维化的药物, 其作用比秋水仙碱强, 作用机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] 许志勤, 高兴兰 . 组织羟脯氨酸测定方法的改进[J]. 解放军预防医学杂志, 1990, 8(1): 40－42.

[2] Friedman S L. The cellular basis of hepatic fibrosis mechanism and strategies[J]. Engl J Med, 1993, 328(25): 1 828－1 835.

[3] Bissell D M, Friedman S L, Maher J J, *et al*. Connective tissue biology and hepatic fibrosis: report of a conference[J]. Hepatology, 1990, 11(3): 488－498.

[4] Plebani M, Burlina A. Biochemical makers of hepatic fibrosis [J]. Chin Biochem, 1991, 24(3): 219－239.

[5] Misaki M, Shima T, Yano Y, *et al*. Basement membrane-related and type Ⅲ procollagen-related antigens in serum of patient with chronic viral liver disease[J]. Clin Chem, 1990, 36(3): 522－524.

[6] 陶文生, 韩淑芳 . 三七有利胆、退黄、降酶等作用[J]. 中医杂志, 1994, 35(2): 71.

[7] 梁力建, 何　强, 吕明德, 等 . 三七总皂甙对大鼠肝缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 新消化病学杂志, 1997, 5(7): 419－420.

[8] Cedillo A, Mourelle M, Muriel P. Effect of colchicine and trimethylcolchicinic acid on CCl_4-induced cirrhosis in the rat [J]. Pharmacology Toxicology, 1996, 79(4): 241－246.

(编辑　潘式文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net