

· 研究报告 ·

三七总苷对二甲基亚硝胺致肝纤维化大鼠胶原代谢的影响

张永生¹, 徐珊¹, 赵育芳², 朱飞叶¹

(¹浙江中医药大学药学院, 杭州 310053; ²厦门大学医学院, 厦门 361005)

摘要: 目的: 考察三七总苷对二甲基亚硝胺(DMN)致肝纤维化模型大鼠胶原代谢的影响。方法: 用DMN复制中度肝纤维化模型, 随机分为三七总苷组、干扰素组、三七总苷配合干扰素组、阴性对照组, 分别以相应的药物连续治疗8周, 检测各组大鼠血清肝功能、透明质酸及肝组织羟脯氨酸(Hyp)含量, 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: 中度肝纤维化大鼠模型经过连续8周的三七总苷治疗, Hyp含量明显少于模型对照组, 差异显著($P < 0.05$), 其血清学指标、肝纤维化分级等方面均出现了不同程度的改善。结论: 三七总苷能够降低大鼠胶原沉积, 减少DMN所致肝纤维化大鼠胶原含量。

关键词: 三七总苷; 二甲基亚硝胺; 肝纤维化; 胶原代谢

基金资助: 浙江省自然科学基金(No.Y2100684), 浙江省中医药科研基金(No.2006C013)

Effect of panax notoginsenosides on collagen metabolism of dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis rats

ZHANG Yong-sheng¹, XU Shan¹, ZHAO Yu-fang², ZHU Fei-ye¹

(¹College of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; ²Medical College of Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Objective: To observe the effect of panax notoginsenosides(PNS) on collagen metabolism of hepatic fibrosis model rats. Methods: DMN hepatic fibrosis model was used in this experimental research. After injected DMN, the rats were divided into 4 groups, including, a. PNS Treatment Group; b. INF- γ Treatment Group; c. PNS & INF- γ Treatment Group; d. Negative Control Group; In addition, 10 rats were arranged to be the Normal Control Group during the whole study. All rats received 8 weeks' treatment by PNS, INF- γ , PNS & INF- γ and saline solution, respectively. All rats were killed under anesthesia to observe the effect of PNS on the collagen metabolism of hepatic fibrosis rats compared with INF- γ after 8 weeks' treatment. The contents of liver Hydroxyproline, the index of liver function and Hyaluronic Acid (HA) were used to evaluate the function of PNS on the collagen metabolism on hepatic fibrosis rat model compared with INF- γ . Histological sections of liver from the killed rats were stained by Hematoxylin and Eosin, Sirius Red Stains, respectively. Results: After 8 weeks' treatment, the indexes of the liver function and HA in the PNS Treatment Group rats were markedly decreased compared with the Negative Control Group rats($P < 0.05$), the contents of Hydroxyproline and the grade of hepatic fibrosis in PNS Treatment Group rats liver were lower than those of Negative Control Group, respectively. Conclusion: PNS can improve the collagen contents on hepatic fibrosis rats by not only reduce the index of liver Hydroxyproline, but also by decrease the grade of hepatic fibrosis.

Key words: Panax notoginsenosides; Dimethylnitrosamine; Hepatic fibrosis; Collagen metabolism

Fund assistance: Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.Y2100684), TCM Research Foundation of Zhejiang Province (No.2006C013)

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, 越来越受到肝病研究者的重视和关注。肝纤维化病变以肝组织中大量以胶原为主要成分的细胞外基质增生为主要特征。针对胶原代谢的相关作用能

够评价相应的药物抗肝纤维化的功效。本研究在以往对肝纤维化证型研究的基础上^[1], 选用常用的活血化瘀中药三七的有效成分——三七总苷(PNS)^[2]作为研究对象, 以期通过对二甲基亚硝胺所致实验性肝纤维化大鼠肝脏胶原代谢的作用进行有

通讯作者: 张永生, 浙江省杭州市滨江区滨文路548号浙江中医药大学药学院, 邮编: 310053, 电话: 0571-86613756
传真: 0571-86613606, E-mail: alex.yzhang@gmail.com

效地分析。

材料

1. 动物 清洁级SD大鼠60只, 雄性, 体质量(160±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提供清洁级饲养条件, SD大鼠自由饮水, 预饲养10d后进入正式实验研究。

2. 药品与试剂 二甲基亚硝胺(DMN)(化学纯, 批号: 19980505), 中国医药集团上海化学试剂公司产品, 以生理盐水稀释为1%浓度备用; 三七总苷, 注射剂, 商品名: 血栓通(冻干粉, 批号: 07025102), 150mg包装, 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 (IFN- γ)(冻干粉, 批号: 20070404), 100万IU包装, 上海克隆生物技术有限公司产品; Direct Red 80(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。

方法

1. 分组与造模 60只SD大鼠, 随机选取10只作为正常对照组, 其余50只大鼠以DMN复制中度肝纤维化模型^[3]。按10mg/kg体质量腹腔注射1%浓度DMN, 实验第1周连续用药3d, 后2-6周每周连续用药2d, 每天1次, 共13次。第6周末随机选取8只大鼠确认是否成功复制中度肝纤维化模型, 经HE及天狼星红染色显示8只大鼠全部成功复制中度肝纤维化病理改变, 作为模型对照组。中度肝纤维化模型复制成功后, 将剩余大鼠随机分为三七总苷组(8只)、干扰素组(8只)、三七总苷配合干扰素组(9只)、阴性对照组(6只)。

2. 给药 造模成功后, 连续药物干预8周。具体方法如下: 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^[4]。正常对照组: 正常饮水, 不作处理; 模型对照组: 造模成功后, 处死, 作为干预前对照; 三七总苷组: 每天以血栓通冻干粉150mg, 用0.9%氯化钠溶液5mL稀释, 按每100g体质量大鼠肌注0.05mL; 干扰素组: 每天以注射用重组人干扰素 γ 100万IU, 用0.9%氯化钠溶液5mL稀释, 按每100g体质量大鼠肌注0.05mL; 三七总苷配合干扰素组: 每天以血栓通冻干粉150mg, 用0.9%氯化钠溶液5mL稀释, 按每100g体质量大鼠肌注0.05mL; 在对侧以相应剂量注射重组人干扰素 γ (克隆伽玛)100万IU, 用5mL 0.9%氯化钠溶液稀释, 按每100g体质量大鼠肌注0.05mL; 阴性对照组: 每天在大鼠的大腿肌肉上注射同样剂量的0.9%氯化钠溶液。

3. 大鼠处理方法 按以上方法药物干预, 观察大鼠一般情况, 8周后, 以1%戊巴比妥钠40mg/kg剂量腹腔注射麻醉, 用酒精消毒腹部皮肤, 打开腹腔, 以一次性注射器在腹主动脉取血。取肝组织入中性福尔马林液中固定、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, 切片脱蜡至水后进行相应的病理染色。大鼠血液离心取血清后入-20℃冰箱备用。用放射免疫法^[5]检测血清透明质酸(HA), 并采用自动生化检测仪检测血清总蛋白(STP)、白蛋白(Alb)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)。

4. 病理组织学观察 分别进行常规HE染色、苦味酸-天狼星红胶原染色。分别按实验动物肝纤维化组织学VI级标准进行肝纤维化程度评判^[6]。在偏光显微镜下观察I、III型胶原的分布情况; 以上分级结果进行半定量转化后进行统计学处理。

5. 肝脏羟脯氨酸(Hyp)含量测定 采用文献报道的碱水解法^[7]检测每克肝组织中的Hyp含量, 以衡量肝组织中的胶原含量。

6. 统计学方法 计量资料指标均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 实验结果输入计算机, 建立数据库, 用SPSS 12统计软件进行方差分析、*F*检验、 χ^2 检验。

结果

1. 大鼠一般情况 正常组大鼠毛色光亮, 活动自如, 对外界刺激应激自如; 造模大鼠毛色枯黄缺少光泽, 易出现过度应激反应、烦躁, 在饲养笼中相互撕打, 饲料过度消耗。

2. 肝功能STP、Alb、ALT、AST情况 见表1。正常对照组及各干预组与模型对照组之间就STP、Alb、ALT、AST的比较差异均有统计学意义($P < 0.05$), 同时模型对照组与阴性对照组比较也有明显的差异($P < 0.05$)。但是三七总苷组、干扰素组、三七总苷配合干扰素组各组与阴性对照组之间差异无统计学意义。

表1 各组大鼠肝功能检测情况($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	STP (g/L)	Alb (g/L)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)
正常对照组	10	60.50±4.86	26.20±1.48	42.60±13.77	114.20±33.32
阴性对照组	6	57.00±2.28 [#]	24.50±1.97 [#]	40.17±7.25 [#]	109.67±13.03 [#]
模型对照组	8	44.13±1.89 [#]	37.00±2.00 [#]	73.88±21.68 [#]	276.13±35.93 [#]
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 [#]
三七总苷配合干扰素组	7	59.14±2.79 [#]	25.71±1.98 [#]	42.57±11.31 [#]	104.71±18.79 [#]

注: 与正常对照组比较, [#] $P < 0.05$; 与模型对照组比较, [#] $P < 0.05$ 。

3. 组织形态学观察结果 见表2。常规病理学HE染色及苦味酸-天狼星红染色病理学显示, 正常对照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-天狼星红染色显示小叶间和汇管区基本无胶原纤维分布, 仅在中央静脉及肝索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; 模型对照组大鼠HE染色镜下可见肝脏质地不均匀, 有程度不等的纤维包裹, 甚而形成假小叶, 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-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,可见主要为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,已经成功复制中度肝纤维化模型。

表2 各组肝纤维化分级情况

组别	n	肝纤维化分级(G)						
		0	I	II	III	IV	V	VI
正常对照组	10	10	0	0	0	0	0	0
阴性对照组	6	0	0	1	1	4	0	0
模型对照组	8	0	0	0	1	4	3	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
三七总苷配合干扰素组	7	0	1	3	3	0	0	0

表3 各处理组血清透明质酸HA含量测定结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HA (ng/mg)
正常对照组	10	91.53 ± 16.18
阴性对照组	6	162.66 ± 61.09 [#]
模型对照组	8	244.46 ± 81.40 [*]
三七总苷组	8	90.47 ± 13.01 ^{*#}
干扰素组	8	109.36 ± 50.13 ^{*#}
三七总苷配合干扰素组	7	82.36 ± 16.56 ^{*#}

注:与正常对照组比较,^{*}P<0.05;与模型对照组比较,[#]P<0.05;与阴性对照组比较,^{*}P<0.05。

表4 各处理组肝组织内Hyp含量测定($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Hyp (μg/mg)
正常对照组	10	0.2156 ± 0.0531
阴性对照组	6	0.3678 ± 0.0487 [*]
模型对照组	8	0.4550 ± 0.1020 [*]
三七总苷组	8	0.3390 ± 0.0631 ^{*#}
干扰素组	8	0.3791 ± 0.1673 [*]
三七总苷配合干扰素组	7	0.3740 ± 0.1290 [*]

注:与正常对照组比较,^{*}P<0.05;与模型对照组比较,[#]P<0.05。

在经过8周的药物干预后,结合实验所得数据(见表2),三七总苷组、干扰素组及三七总苷配合干扰素组纤维化分级均有不同程度的降低。在HE染色中可见肝细胞的炎症与模型对照组比较不显著,但肝组织内可见不同程度的炎症细胞浸润;在苦味酸-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;经过药物干预后,阴性对照组的镜下所见,虽然出血坏死、炎症程度与模型对照组比较有所减轻,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-天狼星红染色中显示胶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。

4. 血清透明质酸(HA)含量检测结果 见表3。与正常对照组比较,模型对照组、阴性对照组均有显著性差异(P<0.05);阴性对照组分别与三七总苷组、干扰素组、三七总苷配合干扰素组比较均有显著性差异(P<0.05);模型组与阴性对照组比较有显著性差异(P<0.05),而三七总苷组、干扰素及三七总苷配合干扰素组间比较差异无统计学意义。

5. 肝组织Hyp含量测定结果 见表4。各试验组(三七总苷组、干扰素组、三七总苷配合干扰素组)与正常对照组之间比较,在Hyp方面差异有统计学意义(P<0.05);经过8周的药物干预后,三七总苷组与模型对照组比较差异有统计学意义(P<0.05)。

讨论

三七[*Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen]是一味传统中药,为五加科(Araliaceae)人参属植物人参三七的干燥根,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^[8]。三七总苷是三七的主要活性成分,该成分具有改善心肌缺血、降血脂、降血压、抗血栓、抗休克、抗纤维化活性、抗炎镇痛、镇静、降血糖、抗衰老、增强免疫力的作用。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,可以用于相应疾病的干预。同时,在肝脏等疾病中,三七总苷具有保肝利胆等作用可能是发挥抗肝纤维化作用的主要物质基础^[9]。胶原代谢则是肝纤维化过程中肝星状细胞活化后的特征性环节之一,对肝组织中胶原代谢的评价则可为肝组织提供一个较为客观的指标,所以目前国际正在尝试利用肝脏弹性扫描仪(Fibroscan)^[10]进行肝弹性扫描,以评价肝脏的纤维化分级。

本研究选取的DMN肝纤维化模型是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四氯化碳(CCl₄)方法比较有造模死亡率低、肝纤维化形成稳定并且不易自行恢复等特点,已经成为肝纤维化基础研究特别是在早期肝硬化及肝癌等相关研究中的主要动物模型之一^[3]。在本研究中本课题组也发现与以往的研究比较,DMN模型复制过程中,大鼠的死亡率及自行恢复趋向较经典的四氯化碳方法为优,值得在今后研究中采用。

本实验研究利用对肝组织的纤维化病理分级结合肝组织Hyp含量检测来对肝组织的胶原代谢作出客观的评价。Hyp是一种非必需氨基酸,是机体胶原蛋白的主要成分之一,几乎所有的Hyp都存在于胶原中,被认为是胶原中的特征性氨基酸^[7]。

因此, Hyp含量的测定已成为衡量机体胶原含量的一个重要指标。比较治疗各组间肝组织纤维化程度, 各组已经在一定程度上反映肝脏胶原的总体分布区别, 这在肝纤维化的早、中期比较明显, 但是到了后期, 肝组织的胶原由于与前期的比较相对致密, 在病理观察的图像中相对密度增高, 并不能反映含量的同步性, 给含量的估算带来一定的不确定性。两者的结合运用应该可以很好地对肝脏的胶原含量进行一个较为准确的反映。

在研究中发现(见表4), 正常对照组大鼠肝纤维中的Hyp含量较少, 经过6周的DMN腹腔注射后, 模型对照组大鼠的肝Hyp含量呈大幅度上升, 其后的各药物干预8周后, 与模型对照组比较, 虽然各干预组(包括阴性对照组)的Hyp含量仍保持在一定的高水平(与正常对照组比较 $P < 0.05$), 但三七总苷组、干扰素组及三七配合干扰素组均有一定程度的下降, 阴性对照组也不例外, 但各干预组间的差异并不显著。提示各种药物在对DMN所致肝纤维化过程中对胶原的沉积和降解的作用差别不大。分析原因可能为以下几种: 第一, 各试验组的Hyp检测值的偏离值过大, 可能与实验中选取的大鼠样本数量较少有关; 第二, 结合对前期HA检测的阳性结果分析, 由于HA对活动性的动态胶原沉积有一定的实验意义, 但对已经稳定的胶原组织的评价不同步, 考虑与造模+干预(6+8周)的实验研究过程中, 肝纤维化的致病因子已经撤除, 但肝纤维化的进程一直在大鼠肝组织内持续发展等因素有关。因此, 进行长期的抗肝纤维化的治疗仍然非常有必要, 这也与目前已经形成的长期治疗干预的共识相符。

综合以上病理学观察、血清学及Hyp含量检测, PNS已经初步显示出了一定的抗DMN所致肝纤维化作用, 但是动物实验研究的结果与临床应用之间尚有配伍等关键因素。本研究结果可为根据肝纤维化的中医辨证分型合理配伍中药三七进行抗肝纤维化相关治疗提供实验证据。

参 考 文 献

[1] 徐珊,包剑锋,周敏,等.肝纤维化不同证型与血清透明质酸、转化生长因子- $\beta 1$ 关系的实验研究.中华中医药杂志,2009,24(2):199-201
XU Shan,BAO Jian-feng,ZHOU Min,et al.Experimental study on relationship of hyaluronic acid and transforming growth factor- $\beta 1$ with different TCM syndromes of liver fibrosis.China Journal of

- TCM and Pharmacy,2009,24(2):199-201
- [2] Won-Hwan Park,Soo-Kyung Lee,Cheorl-Ho Kim.A Korean herbal medicine,Panax notoginseng,prevents liver fibrosis and hepatic microvascular dysfunction in rats.Life Sciences,2005,76:1675-1690
- [3] 翁红雷,蔡卫民,汪国运,等. γ -干扰素抗肝纤维化实验研究.中华肝病杂志,1999,7(S):33-35
WENG Hong-lei,CAI Wei-min,WANG Guo-yun,et al.Experimental study of recombinant human gamma-interferon on anti-hepatofibrosis.Chinese Journal of Hepatology,1999,7(S):33-35
- [4] 袁盛榕.药理学实习教程.北京:世界图书出版公司,1994:13
YUAN Sheng-rong.Pharmacology Practice Course.Beijing:World Publishing Corporation,1994:13
- [5] 陈金国,路德元,叶天星.透明质酸放射分析及其对肝病的诊断价值.国外医学临床生物化学与检验学分册,1992,13(5):168
CHEN Jin-guo,LU De-yuan,YE Tian-xing.Clinical biochemistry and laboratory medicine.Foreign Medical Sciences,1992,13(5):168
- [6] 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.肝脏病杂志,1993,1(2):69-72
WANG Bao-en,WANG Hui-ji,ZHU Jia-xuan,et al.Experimental and clinical study of the therapeutic effect of composite salviae miltiorrhizae on liver fibrosis. Journal of Hepatology,1993,1(2):69-72
- [7] 杨秀颖,杜冠华.组织羟脯氨酸含量微量测定方法及应用.中国药理学通报,2004,20(7):836-837
YANG Xiu-ying,DU Guan-hua.Micro volume assay method of hydroxyproline in animal tissues and application.Chinese Pharmacological Bulletin,2004,20(7):836-837
- [8] Hongxiang Sun,Zhigang Yang,Yiping Ye.Structure and biological activity of protopanaxatriol-type saponins from the roots of Panax notoginseng.Int.Immunopharmacology,2006(6):14-25
- [9] 石小枫,刘杞,刘林,等.三七总苷抗实验性肝纤维化的研究.中药药理与临床,2004,20(1):12-14
SHI Xiao-feng,LIU Qi,LIU Lin,et al.Effect of total saponins of Panax notoginseng on liver cirrhosis in rats.Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica,2004,20(1):12-14
- [10] Foucher J,Chanteloup E,Vergniol J,et al.Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroScan): a prospective study.Gut,2006,55:403-408

(收稿日期:2011年5月3日)