

- Macapinlac H, Yeung H, Saltz L, Finn RD, Erdi Y, Humm J, Cohen AM, Larson S. Prospective assessment of primary rectal cancer response to preoperative radiation and chemotherapy using 18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Dis Colon Rectum* 2000;43:18-24
- 5 Whiteford MH, Whiteford HM, Yee LF, Ogunbiyi OA, Dehdashti F, Siegel BA, Birnbaum EH, Fleshman JW, Kodner JJ, Read TE. Usefulness of FDG-PET scan in the assessment of suspected metastatic of recurrent adenocarcinoma of the colon and rectum. *Dis Colon Rectum* 2000;43:759-767
- 6 Gualdi GF, Casciani E, Guadalajara A, D'Orta C, Poletini E, Pappalardo G. Local staging of rectal cancer with transrectal ultrasound and endorectal magnetic resonance imaging. *Dis Colon Rectum* 2000;43:338-345
- 7 Oku S, Nakagawa K, Momose T, Kumakura Y, Abe A, Watanabe T, Ohtomo K. FDG-PET after radiotherapy is a good prognostic indicator of rectal cancer. *Ann Nucl Med* 2002;16:409-416
- 8 Miller E, Lerman H, Gutman M, Figer A, Livshitz G, Even-Sapir E. The clinical impact of camera-based positron emission tomography imaging in patients with recurrent colorectal cancer. *Invest Radiol* 2004;39:8-12
- 9 Czernin J, Phelps ME. Positron emission tomography scanning: current and future applications. *Annu Rev Med* 2002;53:89-112
- 10 Tatlidil R, Jadvar H, Bading JR, Conti PS. Incidental colonic fluorodeoxyglucose uptake: correlation with colonoscopic and histopathologic findings. *Radiology* 2002;224:783-787
- 11 Tanaka T, Kawai Y, Kanai M, Taki Y, Nakamoto Y, Takabayashi A. Usefulness of FDG-positron emission tomography in diagnosing peritoneal recurrence of colorectal cancer. *Am J Surg* 2002;184:433-436
- 12 Moore HG, Akhurst T, Larson SM, Minsky BD, Mazumdar M, Guillem JG. A case-controlled study of 18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the detection of pelvic recurrence in previously irradiated rectal cancer patients. *J Am Coll Surg* 2003;197:22-28
- 13 Vitola J, Delbeke D. Positron emission tomography for evaluation of colorectal carcinoma. *Sem Roentgenol* 2002;37:118-128
- 14 Chun H, Kim CK, Krynczyk BR, Machac J. The Usefulness of a repeat study for differentiating between bowel activity and local tumor recurrence on FDG PET scans. *Clin Nucl Med* 2003;28:672-673
- 15 Montravers F, Grahek D, Kerrou K, Younsi N, Petegnief Y, De Beco V, Colombet-Lamau C, Talbot JN. Detection of recurrent colorectal carcinoma by <sup>18</sup>F-FDG: comparison of the clinical performances of FDG PET and FDG CDET. *Nucl Med Commun* 2004;24:105-113
- 16 Simo M, Lomena F, Setoain J, Perez G, Castellucci P, Costansa JM, Setoain-Quinquer J, Domenech-Torne F, Carrio I. FDG-PET Improves the management of patients with suspected recurrence of colorectal cancer. *Nucl Med Commun* 2002;23:975-982
- 17 Dimitrakopoulou-Strauss A, Strauss LG, Rudi J. PET-FDG as predictor of therapy response in patients with colorectal carcinoma. *Q J Nucl Med* 2003;47:8-13

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## 三七总皂甙对大鼠肝纤维化防治机制

王文兵, 戴立里, 郑元义

王文兵, 宜宾市第一人民医院消化内科 四川省宜宾市 644000  
戴立里, 郑元义, 重庆医科大学第二临床学院消化内科 重庆市 400010  
项目负责人: 王文兵, 644000, 四川省宜宾市第一人民医院消化内科.  
收稿日期: 2004-03-15 接受日期: 2004-05-11

### 摘要

目的: 观察三七总皂甙对实验性肝纤维化的防治作用, 并探讨其可能的机制.

方法: 以 CCl<sub>4</sub>、乙醇及胆固醇诱导大鼠肝纤维化模型, 同时给予三七总皂甙干预组三七总皂甙腹腔注射. 设立模型对照组和正常组. 于造模 6 wk 后大鼠全部处死, 取血清及肝组织标本. 应用放射免疫法检测血清 PC III、LN 含量, HE 染色观察肝组织形态学改变, VG 染色测定肝组织纤维表达情况, 免疫组织化学测定肝组织 desmin、 $\alpha$ -SMA、ICAM-1、LN、I 和 III 型胶原.

结果: 与模型组比较, 三七总皂甙组大鼠血清 PC III、LN 含量均明显降低; 形态学改变明显轻于模型组; 肝组织 desmin、 $\alpha$ -SMA、ICAM-1 染色强度均明显减弱; 三七总皂甙组肝组织 LN、I 和 III 型胶原染色轻于模型组, 但差异性不显著.

结论: 三七总皂甙对实验性肝纤维化形成具有一定的抑制作用. 其作用机制可能与抑制 HSC 活化, 诱导活化的 HSC 凋亡, 减少 I、III 型胶原和 LN 表达, 并减轻肝窦毛细血管化有关.

王文兵, 戴立里, 郑元义. 三七总皂甙对大鼠肝纤维化防治机制. 世界华人消化杂志 2004;12(8):1939-1942

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1939.asp>

### 0 引言

防治肝纤维化的发生发展, 对于改善慢性肝病的预后具有重要意义. 近年来国内许多学者以活血化瘀为主中药防治肝纤维化的研究业已取得可喜成果<sup>[1-6]</sup>. 具有活血化瘀功效的三七及其主要有效成分 PNS 在防治肝纤维化的实验研究中已得到重视<sup>[7]</sup>. 我们采用 CCl<sub>4</sub> 诱导大鼠肝纤维化模型, 给予 PNS 进行干预, 观察其对肝纤维化这一病理变化的阻断作用, 为 PNS 临床应用提供理论依据.

### 1 材料和方法

1.1 材料 Wistar 大鼠由重庆医科大学动物中心提供. 普

通饲料喂养, 自由进食进饮; 正常饲养 2 wk 后进行实验. PC III 放射免疫分析试剂盒, 购自上海海军医学研究所生物技术中心; LN 放射免疫分析测定盒, 购自上海海军医学研究所生物技术中心. 小鼠抗结蛋白(desmin), 为美国 Sigma 公司产品; 小鼠抗  $\alpha$ -平滑肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)抗体, 购自武汉博士得生物工程有限公司; 鼠抗细胞间黏附因子-1(ICAM-1)抗体, 购自北京中山生物技术有限公司. 药物及其他试剂: 血塞通注射液, 为昆明兴中制药有限公司产品, 本品为从五加科人参属植物三七提取的有效部位三七总皂甙制成的灭菌水溶液, 主要成分为人参皂甙 Rb<sub>1</sub>, 人参皂甙 Rg<sub>1</sub>, 三七皂甙 R<sub>1</sub>, 每支 5 mL (50 g/L); CCL<sub>4</sub>, 甲醛溶液及无水乙醇均购自重庆医科大学设备科. GC-911Y 放射免疫计数器, 中国科学技术大学科技实业总公司产品.

**1.2 方法** Wistar 大鼠 46 只, 雌雄各半, 质量 175–225 g, 随机分为 3 组, 其中正常对照组 10 只, CCL<sub>4</sub> 模型对照组 20 只, PNS 干预组 16 只. 将 CCL<sub>4</sub> 与色拉油混合配制成 400 mL/L 的溶液, 给予 CCL<sub>4</sub> 模型对照组和 PNS 干预组大鼠皮下注射, 首剂给予 5 mL/kg, 以后给予 3 mL/kg 体重; 正常对照组给予生理盐水皮下注射, 3 mL/kg 体重, 2 次 /wk, 造模时间为 6 wk. 造模同时给予 PNS 干预组大鼠 PNS, 60 mg/kg 体重, 1 次 /d, 正常对照组给予与 PNS 相同容积的生理盐水 ip, 连续注射 6 wk. 模型组和 PNS 干预组大鼠均给予 5g/L 的胆固醇-玉米粉饲料喂养, 含 100–150 mL/L 乙醇的自来水自由饮用; 正常对照组给予普通饲料喂养及自来水自由饮用. 分别于实验开始后 2 wk 末和 4 wk 末, 随机处死各组大鼠各一只, 取肝脏组织作石蜡切片, HE 染色观察病理学变化; 其余大鼠于 6 wk 末全部处死. 整个实验过程中, 正常对照组自然死亡 1 只, 存活率为 90%, CCL<sub>4</sub> 模型对照组死亡 10 只, 存活率为 50%, PNS 干预组死亡 3 只, 存活率为 81.2%. 给予 0.5% 的异戊巴比妥钠 100 mg/kg ip. 体外心脏采血, 4 °C 静置 4 h, 800 r/min 离心 5 min, 取血清 -20 °C 保存待检. 打开腹腔, 取肝脏, 从肝右叶中切取 1 cm × 1 cm × 3–5 mm 大小的组织, 置于 40 g/L 的甲醛溶液中固定, 石蜡包埋、切片. 取 6 wk 末的各组肝脏, SABC 法免疫组织化学染色检测  $\alpha$ -SMA, desmin, ICAM-1; LN、I 和 III 型胶原. 放免法检测 PC III, LN. 按 III 型前胶原放射免疫分析试剂盒(平衡法)说明书及层粘连蛋白放射免疫分析测定盒说明书进行操作.

**统计学处理** 计量资料均使用计算机统计软件 SPSS 11.0 中 One-Way ANOVA 程序进行单因素方差分析, 并用 LSD 法进行两两比较.

## 2 结果

**2.1 肝脏组织形态学改变** HE 和 VG 染色显示, 2, 4, 6 wk 末, 正常对照组大鼠肝小叶结构完整, 无变性、坏死, 无炎症细胞浸润及纤维结缔组织增生. 2 wk 末, 模型对照组大鼠肝小叶结构完整, 出现广泛的肝细胞

脂肪变性、及散在的气球样变性, 中央静脉及汇管区有大量炎症细胞浸润, 并可见少数点状坏死, VG 染色无纤维结缔组织增生; PNS 干预组大鼠肝小叶结构完整, 肝细胞脂肪变性、气球样变性、炎症细胞浸润均较模型对照组轻, 无点状坏死及纤维结缔组织增生. 4 wk 末, 模型对照组大鼠肝小叶结构仍较完整, 但肝细胞脂肪变性、气球样变性、坏死及炎症细胞浸润较 2 wk 末明显, 出现片状坏死, VG 染色无纤维结缔组织增生; PNS 干预组大鼠肝小叶结构完整, 肝细胞脂肪变性、气球样变性、炎症细胞浸润均较模型对照组轻, 见少数点状坏死, 无纤维结缔组织增生. 6 wk 末, 模型对照组大鼠肝小叶正常结构被破坏, 部分区域出现假小叶形成, 肝细胞变性、坏死范围增大, 炎症细胞成团浸润, VG 染色可见纤维结缔组织增生; PNS 干预组大鼠肝小叶结构完整, 肝细胞变性、坏死及炎症细胞浸润均较模型对照组轻, 无假小叶形成, VG 染色无纤维结缔组织增生(图 1).

**2.2 肝脏  $\alpha$ -SMA, desmin, ICAM-1 的表达** 免疫组化染色显示, 正常对照组大鼠肝组织在中央静脉及汇管区无阳性染色出现; 模型对照组在中央静脉及汇管区均出现明显的阳性染色, ICAM-1 染色显示在部分中央静脉与中央静脉之间以及中央静脉与汇管区之间的区域也出现阳性染色; PNS 干预组在中央静脉及汇管区均出现阳性染色, 但程度较模型对照组轻, 在中央静脉与中央静脉之间以及中央静脉与汇管区之间无阳性染色出现. 高倍镜下, 模型对照组在中央静脉及汇管区  $\alpha$ -SMA, desmin, ICAM-1 染色阳性细胞数较 PNS 干预组明显增多(图 2–4).

**2.3 肝脏纤维组织增生 I, III 型胶原和 LN 免疫组化染色显示**, 正常对照组大鼠肝组织无阳性染色出现; 模型对照组在中央静脉与中央静脉之间以及中央静脉与汇管区之间出现阳性染色; PNS 干预组在中央静脉与中央静脉之间以及中央静脉与汇管区之间无阳性染色出现(图 5).

**2.4 血清 PC III, LN 与正常对照组相比**, 模型对照组和 PNS 干预组血清 PC III(m2=, m4), LN 均明显升高, 尤以 6 wk 末明显. 与模型对照组相比, PNS 干预组有比较明显的下降, 与组织学改变具有比较良好的相关性(表 1).

表 1 肝纤维化大鼠血清 PCIII, LN 变化情况(mean±SD, ug/L)

分组	n		PC III	LN
正常组	7	2 wk	53.422	28.281
		4 wk	53.699	29.483
		6 wk	54.7 ± 0.6	32.9 ± 1.7
模型组	8	2 wk	65.036	37.336
		4 wk	83.289	40.399
		6 wk	113.5 ± 1.3 <sup>b</sup>	52.3 ± 1.4 <sup>b</sup>
PNS 组	11	2 wk	64.235	33.069
		4 wk	73.651	36.627
		6 wk	87.5 ± 1.3 <sup>bd</sup>	39.2 ± 1.3 <sup>bd</sup>

<sup>b</sup>P<0.01 vs 正常组; <sup>d</sup>P<0.01 vs 模型组.

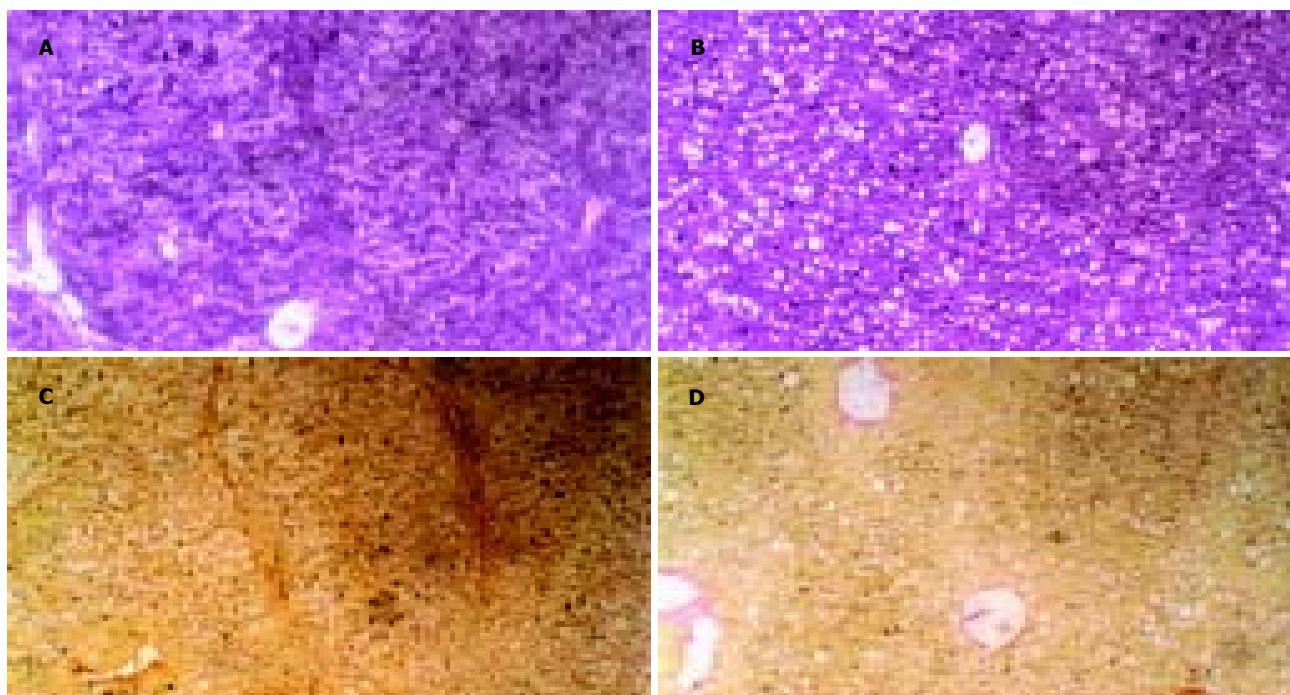


图1 大鼠肝组织学改变. A: 模型组 HE  $\times 100$ ; B: PNS 组 HE  $\times 100$ ; C: 模型组 VG  $\times 100$ ; D: PNS 组 VG  $\times 100$ .

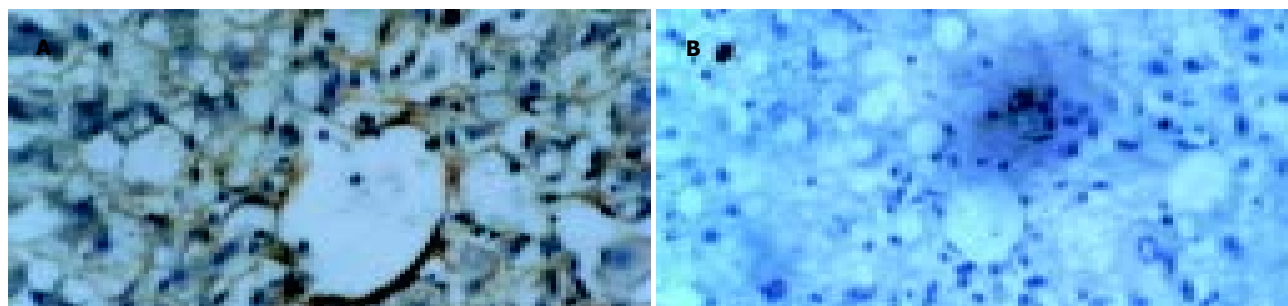


图2 大鼠6 wk 肝组织 SMA 表达(SABC  $\times 400$ ). A: 模型组; B: PNS 组.

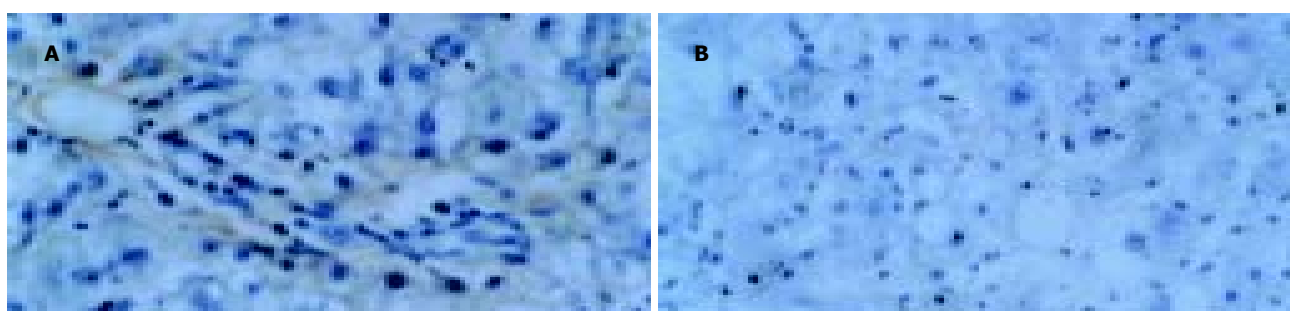


图3 大鼠6 wk 肝组织 desmin 表达(SABC  $\times 400$ ). A: 模型组; B: PNS 组.

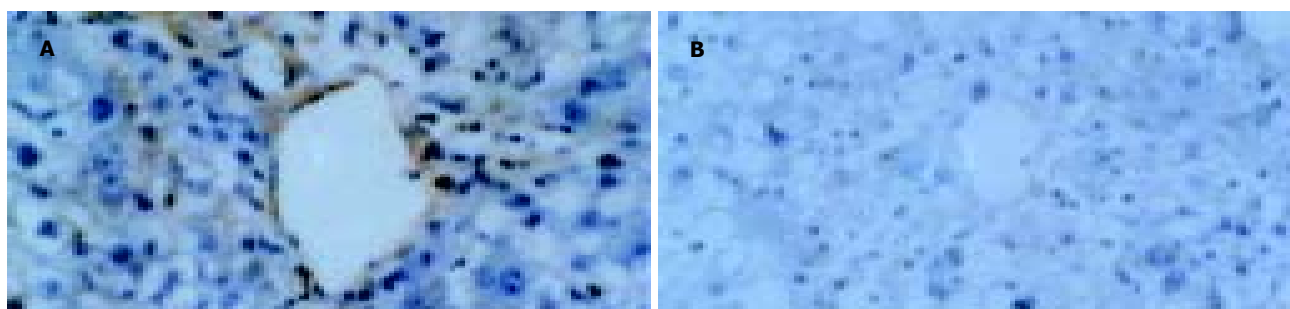


图4 大鼠6wk 肝组织 ICAM-1 表达(SABC  $\times 400$ ). A: 模型组; B: PNS 组.

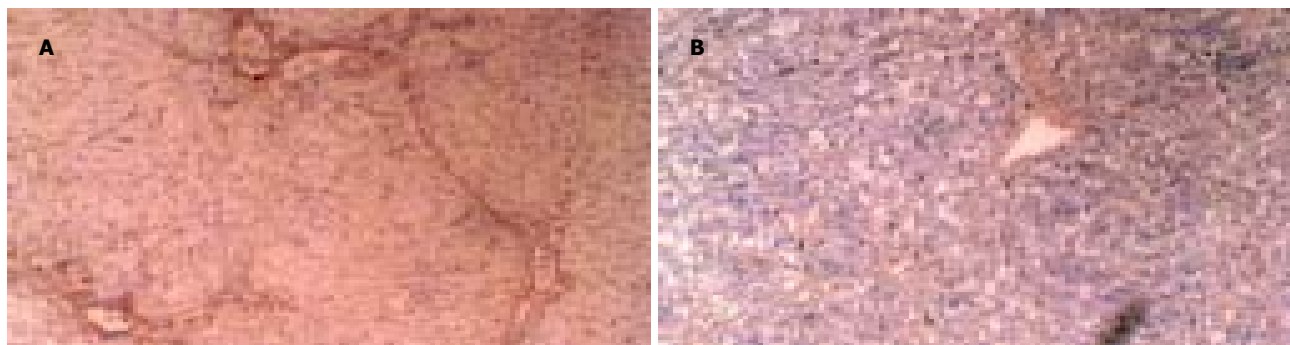


图5 大鼠6wk 肝组织LN表达(SABC × 100). A: 模型组; B: PNS组.

### 3 讨论

肝纤维化是许多肝脏疾病的中间发展环节<sup>[8-9]</sup>, 是大多数慢性肝病向肝硬化发展的共同病理过程<sup>[10]</sup>, 最终会发展为肝硬化<sup>[11]</sup>, 因而治疗肝纤维化具有极为重要的临床意义. 寻找有效治疗药物是目前肝病领域研究的热点<sup>[12-15]</sup>. 近年来中医药防治慢性肝病显示了光明的前景, 部分中药具有较好的抗纤维化效果<sup>[16-19]</sup>. I型胶原的显著增加是肝纤维化的特征性改变, 在肝纤维化过程中通过基因复制增加和 mRNA 稳定性增加而有 I 型胶原基因  $\alpha 1$  的表达增加<sup>[20]</sup>. 我们采用 CCl<sub>4</sub> 复制了慢性肝炎→肝纤维化的动物模型, 观察 PNS 对肝纤维化的防治作用. 从造模开始即给予 PNS 干预, 目的在于观察 PNS 对肝纤维化的防治作用, 同时观察 PNS 对肝细胞是否具有保护作用. 实验结果表明, 在 CCl<sub>4</sub> 诱导大鼠肝纤维化的过程中, 同时给予 PNS 进行防治, 大鼠肝组织  $\alpha$ -SMA, desmin, LN, ICAM-1 的表达, I, III 型胶原和 LN 的增生均明显低于模型对照组. 说明在慢性肝损伤的过程中 PNS 的应用可抑制 HSC 的激活与增生, 通过抑制 HSC 的激活从而减少胶原的形成与沉积, 达到抗肝纤维化的作用.

各种原因所致的肝纤维化的过程中一个显著的病理变化即为纤维间隔近旁肝窦毛细血管瘤化. 肝窦内皮细胞的失窗孔和内皮下连续性基底膜的形成是肝窦毛细血管瘤化的两个主要特征. 文献报道, 层粘蛋白在正常肝窦几乎不表达, 而在慢性肝炎碎片状坏死灶和肝硬化纤维间隔附近的肝窦明显表达, 肝硬化再生结节中的肝窦表达也增强. 表明层粘蛋白可作为肝窦毛细血管瘤化基底膜形成的一个重要标志. 实验结果表明, PNS 可抑制 HSC 的激活减少层粘蛋白的分泌及在 Disse 间隙的沉积, 可能减轻肝窦毛细血管瘤化的形成, 从而减轻肝细胞的损伤, 防止肝纤维化的形成并延缓其向肝硬化转变. 血清 PC III、LN 含量能够较好地反应慢性肝病炎症过程和纤维化程度<sup>[21]</sup>. 实验结果表明, PNS 干预后, 2 wk 末 PC III、LN 测得的含量即低于模型对照组, 随着干预的时间的延长, 到 6 wk 末 PC III、LN 含量则明显低于模型对照组. 从血清纤维化指标改变方面也证实了 PNS 对慢性肝损伤后肝纤维化的形成具有一定程度

的抑制作用.

### 4 参考文献

- 1 陈斌, 孙克伟, 谢凤瑛, 陈翔, 葛金文. 当归抗大鼠免疫性肝纤维化的实验研究. 湖南中医学院学报 2002;22:1-3
- 2 袁柱婷, 单长民, 姜学连, 栾希英, 李珂珂, 三棱、莪术抗大鼠免疫性肝纤维化研究. 中国中药杂志 2002;27:929-932
- 3 崔东来, 姚希贤, 姚金锋, 郭煜. 丹参抗大鼠肝纤维化作用与机制研究. 中华临床医药杂志 2002;3:5-7
- 4 陈斌, 孙克伟, 刘明德, 谢凤瑛, 熊焰, 褚裕义. 莪术对免疫性肝纤维化大鼠肝细胞膜功能的影响. 湖南中医学院学报 2003;23:7-8
- 5 刘成, 赵俊芳, 刘成海, 胡义扬, 徐列明, 刘平. 丹酚酸 B 对转化生长因子  $\beta$ -1 促肝星状细胞分泌胶原的影响. 肝脏 2003;8:20-22
- 6 宋仕玲, 龚作炯, 张全荣, 黄团新. 金三莪对实验性肝纤维化大鼠 TGF- $\beta$ -1、Smad3、Smad7 及 CTGF 表达的影响. 天津中医药 2004;21:62-65
- 7 武凡, 张树三, 康格非. 三七皂甙对肝纤维化大鼠分泌磷脂酶 A<sub>2</sub> 和肿瘤坏死因子表达的影响. 中华肝病杂志 2003;11:51-52
- 8 秦建平, 蒋明德. 肝星状细胞的表型及调控与肝纤维化. 世界华人消化杂志 2001;9:801-804
- 9 周馨, 李宜海, 李定国. 库普弗细胞与肝纤维化. 世界华人消化杂志 2002;10:65-68
- 10 何云, 王建宾, 王宇明. 慢性肝炎肝纤维化程度诊断方法的进展. 世界华人消化杂志 2001;9:1305-1309
- 11 陈文慧, 刘平, 徐光福, 陆雄, 熊卫国, 李风华, 刘成海. 脂质过氧化在二甲基亚硝胺大鼠肝纤维化形成过程中的作用. 世界华人消化杂志 2001;9:645-648
- 12 张盈涛, 袁新明, 李欣, 李恒力. 螺内酯对肝纤维化大鼠 I/III 型胶原蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 2001;9:1120-1124
- 13 Wang JY, Guo JS, Yang CQ. Expression of exogenous rat collagenase in vitro and in a rat model of liver fibrosis. World J Gastroenterol 2002;8:901-907
- 14 Xu JW, Gong J, Chang XM, Luo JY, Dong L, Hao ZM, Jia A, Xu GP. Estrogen reduces CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in rats. World J Gastroenterol 2002;8:883-887
- 15 Liu P, Hu YY, Liu C, Zhu DY, Xue HM, Xu ZQ, Xu LM, Liu CH, Gu HT, Zhang ZQ. Clinical observation of salvianolic acid B in treatment of liver fibrosis in chronic hepatitis B. World J Gastroenterol 2002;8:679-685
- 16 姚希贤, 唐有为, 姚冬梅, 修贺明. 益肝煎剂对实验性肝纤维化大鼠 I, III 型胶原蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 2001;9:263-267
- 17 杨晴, 颜迎春, 高彦欣. 去纤软肝胶囊抗肝纤维化的实验与临床研究. 世界华人消化杂志 2001;9:1246-1249
- 18 刘玉侃, 沈薇. 虫草菌丝对大鼠实验性肝纤维化肝细胞增生的影响. 世界华人消化杂志 2002;10:388-391
- 19 沈敏, 邱德凯, 陈颖, 熊伍军. 重组肝细胞再生增强因子丹参及苦参对大鼠纤维细胞的作用. 世界华人消化杂志 2001;9:1129-1133
- 20 Yata Y, Scanga A, Gillan A, Yang L, Reif S, Breindl M, Brenner DA, Rippe RA. Dnase I-hypersensitive sites enhance  $\alpha 1(I)$  collagen gene expression in hepatic stellate cells. Hepatology 2003;37:267-276
- 21 罗瑞虹, 杨绍基, 谢俊强. 肝纤维化血清标志物的诊断意义. 中华肝病杂志 2001;9:148-150