

人参皂苷 Rg3、干扰素 α 联合与单一用药治疗血吸虫病肝纤维化疗效对比

曾 瑾, 李 飞, 贾雪梅, 李翠英, 王 红
(昆明医科大学寄生虫学教研室, 云南 昆明 650500)

[摘要] **目的** 比较人参皂苷 Rg3、IFN- α 联合用药与单一用药抗日本血吸虫病肝纤维化的疗效。 **方法** 将 56 只雄性 ICR 小鼠随机分为 5 组 (A 组为正常对照组, B、C、D、E 组为治疗组), 除 A 组 8 只外, 其余 B、C、D、E 每组各 12 只。以腹部贴片法经皮肤感染 B、C、D、E 组小鼠, 每只小鼠感染尾蚴 18~22 条。10 周末, 以每鼠吡喹酮 1 次性灌胃 (300 mg/kg 体重) 杀虫治疗。继而分别以人参皂苷 Rg3 联合 IFN- α 使用和 2 者分别单独治疗 B、C、D 组小鼠, 连续 8 周; 第 18 周末, 取各鼠肝组织分别作苏木素-伊红 (HE) 染色和苦味酸-酸性品红 (VG) 染色, 观察分析各组小鼠肝脏胶原面积百分比及肝纤维化程度 (SSS 评分), 以比较人参皂苷 Rg3 和 IFN- α 联合用药与单一用药的治疗效果。 **结果** 肝纤维化小鼠经人参皂苷 Rg3、IFN- α 联合或单一分别治疗 8 周后, 肝脏仍有不同程度增大, 暗褐色, 质地略韧。肝脏内纤维增生、炎细胞浸润等病变比模型组减轻。3 组治疗组肝脏胶原面积百分比均降低 ($P < 0.05$); SSS 评分均低于实验对照组 2 分以上 ($P < 0.05$); 3 治疗组间胶原面积百分比及 SSS 评分没有统计学差异 ($P > 0.05$)。 **结论** 吡喹酮治疗后, 人参皂苷 Rg3 和 IFN- α 联合用药与单一用药一样, 均具有改善小鼠日本血吸虫病肝纤维化作用, 但 2 者合用疗效不优于单独用药, 没有协同作用。

[关键词] 肝纤维化; 血吸虫病; 人参皂苷 Rg3; 干扰素 α

[中图分类号] R383.2²*4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2012) 05-0015-04

Comparison of Combined and Respective Effects of Ginsenoside Rg3 and Interferon- α on Schistosomiasis Japonica Caused Hepatic Fibrosis in Mice

ZENG Jin, LI Fei, JIA Xue - mei, LI Cui - ying, WANG Hong
(Dept. of Parasitology, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To compare the combined and respective effects of ginsenoside Rg3 and IFN- α on murine hepatic fibrosis due to *Schistosoma japonicum*. **Methods** 56 adult male ICR mice were randomized into 5 groups: A, B, C, D and E group. Each group had 12 mice except for group A with 8. Group A was a normal control group. Mice in group B, C, D and E were infected with 18~22 cercariae of *S. japonicum* in one day via abdominal skin puncture respectively. 10 weeks later, the infected mice in the group B, C, D and E were treated with PZQ in a single oral dose to kill adult worms. Then, from the next day, mice in group B were treated with Ginsenoside Rg3 combined with IFN- α , mice in group C and D were treated with Ginsenoside Rg3 and IFN- α , respectively; mice in group E had no treatment, once a day for 8 weeks. After 8-week treatment, liver tissue samples of the paraffin-embedded sections were made into serial 4 μ m slices and were stained with hematoxylin eosin (HE) and van gieson (VG) to observe the histological changes, measure percentages of collagen fiber content in the liver tissue using graphic computing, and assess the scores through the semi-quantitative score scheme (SSS) or chronic hepatitis and liver fibrosis. **Results** After 8 weeks of treatment, mice in the B, C and

[基金项目] 云南省科技厅自然科学基金资助项目 (2010ZC106)

[作者简介] 曾瑾 (1978~), 女, 云南昆明市人, 医学硕士, 讲师, 主要从事人体寄生虫学教学和科研工作。

[通讯作者] 王红. E-mail:zhzji@sina.com

D treatment groups had an enlarged liver. The liver was firm and dark brown in color, but the degree of fiber hyperplasia and inflammatory infiltration were mitigated compared to the group E. The mean percentages of the collagen content in the group B, C and D, were lower than those of the group E ($P < 0.05$). Meanwhile, the SSS scores of the group B, C and D were lower 2 scores at least than the group E, respectively ($P < 0.05$).

Conclusions Combined and respective ginsenoside Rg3 and IFN- α have similar anti-hepatofibrosis effects on schistosomiasis-induced hepatic fibrosis in mice after treatment of PZQ. However, in terms of the effects of anti-hepatofibrosis, there are no statistically significant differences among these three treatment groups. The effect of Rg3 combined with IFN- α on anti-hepatofibrosis is not better than that of either one singly.

[**Key words**] Hepatic fibrosis; Schistosomiasis; Ginsenoside Rg3; Interferon alpha

日本血吸虫病的主要危害在于虫卵沉积于宿主肝脏汇管区,引起肝纤维化.去除病因后主动肝纤维化仍可继续发展,因此在驱虫治疗基础上的抗纤维化治疗是必要的.有研究表明在抗血吸虫肝纤维化作用方面,两种药物的联合使用优于单一药物使用^[1,2],其机制可能是各种药物的作用机制和靶点不同.人参皂苷 Rg3、IFN- α 单独使用治疗小鼠血吸虫肝纤维化具有一定疗效^[3,4],本实验旨在观察联合使用两种药物对血吸虫病肝纤维化治疗是否有增强疗效作用.

1 材料与方法

1.1 实验动物

56 只成年健康雄性 ICR 小鼠,清洁级,体重 23~27 g,购自昆明医科大学实验动物中心.日本血吸虫尾蚴(皖鄂品系),购自江苏省血吸虫病防治研究所.

1.2 主要仪器与试剂

光学显微镜(2XA 851051)为上海光学仪器厂产品,电脑图像分析系统(显微图像分析系统, Nikon 50i)为日本尼康公司产品. Rg3 参一胶囊由吉林亚泰制药股份有限公司生产,批号 20060304;赛若金注射用重组人干扰素 α 1b 由深圳科兴生物工程技术有限公司生产,批号 20050324;吡喹酮片剂由南京制药厂有限公司生产,批号 20050412.

1.3 实验方法

56 只雄性 ICR 小鼠随机分为正常对照组(A 组)、人参皂苷 Rg3 与 IFN- α 联合治疗组(B 组)、人参皂苷 Rg3 治疗组(C 组)、IFN- α 治疗组(D 组)和实验对照组(E 组)5 组, A 组 8 只,其余每组 12 只.以腹部贴片法经皮肤攻击 B、C、D 和 E 组小鼠,每只小鼠感染日本血吸虫尾蚴 18~22 条.感染 10 周后,各感染组小鼠以吡喹酮一次性灌胃(300 mg/kg 体重)杀虫治疗.吡喹酮治疗后次日开始按体重每日给药治疗,连续 8 周^[5].

C 组每只小鼠予以人参皂苷 Rg3 3 mg/(kg·d)灌胃治疗^[6], D 组每只小鼠给予 IFN- α 500 IU/(g·d)于颈背部皮下注射治疗^[7]. B 组每只小鼠按相同剂量给予 Rg3 和 IFN- α 联合治疗. E 组小鼠不给予其他治疗,作为实验对照.用药 8 周末,每鼠分别取左叶肝组织^[7],立即放入 10% 甲醛溶液中固定,保存备用.

1.4 病变观察及疗效判定

1.4.1 观察肝脏组织病理学变化 固定保存的左叶肝组织于相同部位取材,石蜡包埋、连续切片(厚度为 4 μ m),每只小鼠肝脏组织切片均进行伊红-苏木素(HE)染色,显微镜下观察.

1.4.2 小鼠肝脏胶原面积百分比的测定 各组小鼠肝组织切片进行苦味酸-酸性品红(VG)染色,显示肝脏中的胶原纤维,用电脑图像分析系统(200 倍)观察、分析肝脏内胶原沉积情况;每张切片于相同位置取 5 个视野,计算每个视野中胶原纤维所占的面积百分比(%),求出 5 个视野的平均值($\bar{x} \pm s$),作统计学分析.

1.4.3 各组小鼠肝脏纤维化 SSS 评分 结合 HE 及 VG 染色切片进行观察,采用 2003 年 9 月卫生部血吸虫病专家咨询委员会嘉兴会议推荐的《慢性肝炎肝纤维化半定量记分(SSS)方案》(显效:肝组织活检肝纤维化 SSS 评分较治疗前下降 ≥ 5 分;有效:肝组织活检肝纤维化 SSS 评分较治疗前下降 ≥ 2 分;无效:凡未达到有效标准者)^[8],对小鼠肝脏纤维化病变程度进行评分并作统计学分析,以观察比较人参皂苷 Rg3 和 IFN- α 联合用药与单一用药的治疗效果.

1.5 统计学处理

应用 SPSS 统计分析软件包统计分析所得数据,采用方差分析检验(检验水准 $\alpha = 0.05$).

2 结果

2.1 实验动物存活

从造模成功到实验结束, A、C、D、E 组小鼠无一死亡; B 组小鼠死亡 1 只。

2.2 肝脏组织病变情况

正常对照组小鼠肝小叶结构正常。实验对照组小鼠 HE 染色可见肝小叶内及门管区均可见大量虫卵肉芽肿; VG 染色见增生的纤维组织主要沿门管区走行分布, 门管区纤维组织增生明显, 纤维间隔多而粗大、致密, 已达到早期肝硬化水平。单一用药治疗组 HE 染色见肝小叶及门管区虫卵沉积、肉芽肿形成部位与实验对照组相似, 但虫卵肉芽肿较少、面积较小, 残存的正常肝小叶较多, 小叶结构紊乱较轻。中央静脉周围、小叶内及门管区炎性细胞浸润、纤维增生, 但增生程度较实验对照组减轻; 肝脏胶原纤维沉积主要位于门管区, 较局限, 门管区纤维化扩大不明显, 增生程度较实验对照组减轻。联合治疗组肝脏内虫卵肉芽肿、纤维增生、炎细胞浸润等病与 Rg3 治疗组、IFN- α 治疗组相似。

2.3 各组小鼠肝脏胶原面积对比

经单因素方差分析, 各组小鼠肝脏胶原面积百分比有统计学差异 ($P < 0.01$)。各组间比较显示, 小鼠肝脏胶原面积百分比联合治疗组 (B 组) (2.19 ± 1.47) %、Rg3 治疗组 (C 组) (2.32 ± 0.99) % 和 IFN- α 治疗组 (D 组) (1.55 ± 0.91) % 均显著低于实验对照组 (E 组) (11.19 ± 4.91) %, 与正常对照组 (A 组) (0.59 ± 0.16) % 无统计学差异。B、C、D 3 组之间差异无统计学意义, 见表 1。

2.4 各感染组小鼠肝脏纤维化程度 SSS 评分对比及疗效判定

经单因素方差分析, B、C、D 3 组小鼠肝脏纤维化程度 SSS 评分比较有统计学差异 ($P < 0.01$)。B 组评分 (2.86 ± 1.09) 低于 E 组 (8.08 ± 1.76) 5 分以上, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。B 组评分与 C 组 (2.83 ± 1.09) 和 D 组 (1.79 ± 1.50) 评分没有统计学差异。Rg3 和 IFN- α 联合用药与单一用药治疗小鼠肝脏纤维化均有效, 疗效没有差异, 见表 2。

3 讨论

本实验用日本血吸虫尾蚴 (皖鄂品系) 来感染小鼠, 经吡喹酮杀虫治疗后, 给予人参皂苷 Rg3、IFN- α 2 者联合使及单一使用进行治疗, 以观察和比较联合用药抗纤维化的作用及疗效。经人参皂苷 Rg3 和 IFN- α 联合治疗后, 小鼠肝脏组织 HE 染

表 1 各组小鼠肝脏胶原面积百分比 $[(\bar{x} \pm s), \%$]

Tab. 1 Mean percentage of collagen area in murine livers in different groups $[(\bar{x} \pm s), \%$]

组别	n	肝脏胶原面积百分比
A 组 (18 周)	8	$1.16 \pm 0.50^{**}$
B 组 (治疗后 8 周)	11	$2.19 \pm 1.47^{**}$
C 组 (治疗后 8 周)	12	$2.32 \pm 0.99^{**}$
D 组 (治疗后 8 周)	12	$1.55 \pm 0.91^{**}$
E 组 (治疗后 8 周)	12	11.19 ± 4.91

与 E 组比较, $^{**}P < 0.01$ 。

表 2 各感染组小鼠肝脏纤维化程度 SSS 评分 $(\bar{x} \pm s)$

Tab. 2 SSS scores of pathological changes in murine livers in infected groups $(\bar{x} \pm s)$

组别	n	SSS 评分
B 组 (治疗后 8 周)	11	$2.86 \pm 1.67^{**}$
C 组 (治疗后 8 周)	12	$2.83 \pm 1.09^{**}$
D 组 (治疗后 8 周)	12	$1.79 \pm 1.50^{**}$
E 组 (治疗后 8 周)	12	8.08 ± 1.76

与 E 组比较, $^{**}P < 0.01$ 。

色及 VG 染色镜下观察, 肝脏内虫卵肉芽肿、炎细胞浸润及胶原纤维沉积、纤维间隔形成等病变情况明显比实验对照减轻, 与 Rg3 治疗组、IFN- α 治疗组情况相似, 表明 2 药联合使用与单一使用均可有效抑制胶原沉积和虫卵肉芽肿炎性反应。与实验对照组相比, 联合治疗组小鼠胶原面积百分比显著降低; 肝脏纤维化程度 SSS 评分较下降 >5 分, 达到治疗有效标准, 且差异均有统计学意义。说明人参皂苷 Rg3 和 IFN- α 联合使用也可使病鼠肝脏中胶原纤维沉积明显减少, 肝脏纤维化程度降低。

人参皂苷 Rg3 可能通过提高小鼠非特异性免疫功能和特异性 (包括细胞免疫和体液免疫) 免疫功能的作用^[6,8], 以及抗炎症反应、抗氧化损伤、改善组织代谢及抗脂质过氧化等作用^[9]来减轻病鼠肝脏中胶原纤维的沉积。研究认为^[10-15], IFN- α 可通过抑制肝星状细胞活化、下调基质金属蛋白酶组织抑制因子-1 的水平、抑制转化生长因子- β 1 的生成及其活性、减轻肝脏炎症、上调基质金属蛋白酶-1 的基因表达和诱导肝星状细胞的凋亡等途径减轻肝纤维化的程度。

本实验的联合治疗组与人参皂苷 Rg3、IFN- α 单独治疗组间小鼠肝脏中胶原面积百分比和肝脏纤维化程度 SSS 评分差异无统计学意义, 说明此

(下转第 27 页)

- [6] RIBATTI D, VACCA A, RUSNATI M, et al. The discovery of basic fibroblast growth factor/fibroblast growth factor-2 and its role in haematological malignancies [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2007, 18(3-4): 327 - 334.
- [7] GROTHE C, TIMMER M. The physiological and pharmacological role of basic fibroblast growth factor in the dopaminergic nigrostriatal system [J]. *Brain Res Rev*, 2007, 54(1): 80 - 91.
- [8] WOOLFORD J, TORIUMI M. The enhancement of nerve regeneration using growth factors: brief review [J]. *J Long Term Effal Implants*, 1995, 5(1): 19.
- [9] 蔡文琴, 郑世彬. 组织学[M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 844 - 847.
- [10] 秦煜, 裴国献, 吴岚晓. 周围神经损伤修复模式应用基础研究的研究进展[J]. *中国临床康复*, 2002, 6(4): 572 - 573.
- [11] 龚炎培, 顾玉东. 乳鼠坐骨神经条件培养基促进周围神经再生的实验研究[J]. *中华手外科杂志*, 1996, 2: 185 - 188.
- [12] STOCKER K M, SKERMAN L, KEES S, et al. Basic FGF and TGF-beta, influence commitment to melanogenesis in neural crest-derived cells of avian embryos [J]. *Development*, 1991, 111(2): 635.

(2012-02-22 收稿)

(上接第17页)

剂量的人参皂苷 Rg3 与 IFN- α 联合使用尚未见对血吸虫病肝纤维化的增强疗效作用, 考虑可能与治疗时间短有关, 其相互协同作用也许会随着治疗时间延长而逐渐显现, 扩大实验样本量、延长疗程及加大剂量是否能增加疗效尚需进一步研究.

[参考文献]

- [1] 徐邦和, 熊衍珉, 王沁, 等. 黄芪丹参加常规护肝药治疗血吸虫病肝纤维化 [J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2010, 22(6): 613 - 615.
- [2] 黄海燕, 焦云桃, 艾国, 等. 安络化纤丸联合 γ -干扰素对血吸虫病肝纤维化鼠 TIMP-1 及 TGF- β 1 的影响 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2009, 19(1): 30 - 34.
- [3] 王伟雅, 李飞, 贾雪梅, 等. α 干扰素治疗小鼠日本血吸虫病肝纤维化实验研究 [J]. *昆明医学院学报*, 2007, 28(3): 25 - 29.
- [4] 曾瑾, 王红, 贾雪梅, 等. 人参皂苷 Rg3 抗血吸虫病肝纤维化作用的实验研究 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2011, 29(2): 107 - 110.
- [5] 乌文琳, 蔡卫民, 陈名刚, 等. 日本血吸虫病肝纤维化诊断与疗效评估方案(草) [J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2004, 16(3): 229 - 230.
- [6] 王庭富, 孟正木. 人参皂甙 Rg-3 对免疫功能的影响 [J]. *中国药科大学学报*, 1999, 30(2): 133 - 135.
- [7] 夏启荣, 何峰. 肝硬化的诊断与治疗 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 2.
- [8] 张仲苗, 江波, 章荣华, 等. 人参皂甙 Rg3 对小鼠免疫功能的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2004, 20(6): 4 - 6.
- [9] 周嘉鹤, 陈彦凡, 陈少贤. 参一胶囊对慢性缺氧所致肝胆脂质过氧化的影响 [J]. *浙江中西医结合杂志*, 2004, 14(1): 21 - 22.
- [10] GUERRET S, DESMOULIERE A, CHOSSEGROS P, et al. Long - term administration of interferon alpha in nonresponder patients with chronic hepatitis C: fol2 low - up of liver fibrosis over 5 years [J]. *J Viral Hepat*, 1999, 6(2): 125 - 133.
- [11] SAKA IDA I, NOGATOM I A, HIRONAKA K, et al. Quantitative analysis of liver fibrosis and stellate cell changes in patients with chronic hepatitis C after interferon therapy [J]. *Am J Gastroenterol*, 1999, 94(2): 489 - 496.
- [12] 饶慧英, 魏来. 干扰素对肝星状细胞活化的影响 [J]. *世界华人消化杂志*, 2005, 13(4): 440 - 442.
- [13] 黄以群, 王崇国, 周明行, 等. 干扰素 α 抗肝纤维化的作用 [J]. *中华传染病杂志*, 2002, 20(2): 94 - 96.
- [14] 黄宇琦, 王宇, 高毅, 等. α -干扰素对大鼠肝纤维化间质胶原酶基因表达的调控 [J]. *世界华人消化杂志*, 2005, 8(5): 579 - 580.
- [15] 许伟华, 杨发林, 吕晓霞, 等. 干扰素 α 对肝纤维化大鼠肝星状细胞凋亡的诱导作用 [J]. *山东大学学报(医学版)*, 2002, 40(5): 427 - 428.

(2012-02-22 收稿)