

## 人参皂苷 Rg3、IFN- $\alpha$ 治疗血吸虫病肝纤维化的肝脏电镜观察

曾 瑾, 李 飞, 王 红, 李翠英, 贾雪梅  
(昆明医科大学病原生物学与免疫学系, 云南 昆明 650500)

**[摘要]** 目的 观察人参皂苷 Rg3、IFN- $\alpha$  抗血吸虫病肝纤维化的肝脏超微结构改变. 方法 将 48 只雄性 ICR 小鼠随机分为健康对照组 (A 组)、实验对照组 (B 组)、人参皂苷 Rg3 治疗组 (C 组) 及 IFN- $\alpha$  治疗组 (D 组) 等 4 组, 每组 12 只. 以腹部贴片法感染 B、C、D 各组小鼠, 每鼠感染血吸虫尾蚴 18 条~22 条. 肝纤维化造模 10 周, 给予 B、C、D 各组小鼠吡喹酮杀虫治疗. 以人参皂苷 Rg3 治疗 C 组小鼠、IFN- $\alpha$  治疗 D 组小鼠, 用药 8 周后, 常规方法制作肝脏组织切片 HE 染色和 VG 染色标本及投射电镜标本并观察, 比较治疗后小鼠肝脏组织超微结构变化. 结果 2 治疗组 (C、D 组) 小鼠肝窦周隙中胶原纤维较实验对照组明显减少, 未见肌成纤维细胞, 但可见贮脂细胞且数量比正常对照组增加; Rg3 治疗组肝血窦扩张明显; IFN- $\alpha$  治疗组胞浆内可见滑面内质网增生. 结论 人参皂苷 Rg3 和 IFN- $\alpha$  抗血吸虫病肝纤维化作用可能与促进肌成纤维细胞向贮脂细胞转变有关.

**[关键词]** 日本血吸虫; 肝纤维化; 人参皂苷 Rg3; IFN- $\alpha$

**[中图分类号]** R383.2<sup>4</sup> **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2013) 03-0035-06

## Electronic Microscope Observation of Schistosomiasis-induced Hepatic Fibrosis Treated by Ginsenoside Rg3 or IFN- $\alpha$

ZENG Jin, LI Fei, WANG Hong, LI Cui-ying, JIA Xue-mei  
(Faculty of Pathogen Biology and Immunology, Kunming Medical University,  
Kunming Yunnan 650500, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe ultrastructure changes of schistosomiasis-induced hepatic fibrosis treated by ginsenoside Rg3 and IFN- $\alpha$ , respectively. **Methods** 48 ICR-strain male mice were divided into 4 groups named as normal control group (A), infected control group (B), Rg3 treated group (C) and IFN- $\alpha$  treated group (D). There were 12 mice in each group. Mice in groups B, C and D were infected with 18~22 cercariae of *S. japonicum*. At 10 weeks post-infection, each mouse in groups B, C and D was treated by praziquantel (PZQ). At the second day of PZQ treatment, mice in group C were treated by ginsenoside Rg3 and mice in group D were treated by IFN- $\alpha$  for 8 weeks. After 8-week treatment, liver tissue samples of these mice were taken and observed by microscopy and electron microscopy. **Results** The collagen depositions in disse spaces were significantly reduced in mice of both treated groups C and D compared with the untreated group B. Furthermore, myofibroblasts was not observed in the samples from the 2 treated groups, but noticed more fat-storing cells in them than those of group A sample. The hepatic portal areas were expanded in the samples from the Rg3 treated group and the smooth endoplasmic reticulum were hypertrophied in the samples from the IFN- $\alpha$  treated group. **Conclusions** The promotion of myofibroblasts transforming into fat-storing cells might related to the mechanism of anti-hepatofibrosis effects of Ginsenoside Rg3 and IFN- $\alpha$  on schistosomiasis-induced hepatic fibrosis in mice.

**[Key words]** *Schistosoma japonicum*; Hepatic fibrosis; Ginsenoside Rg3; IFN- $\alpha$

**[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, 主要从事医学寄生虫学教学与科研工作.

**[通讯作者]** 贾雪梅. E-mail: xmkj@yahoo.com.cn

日本血吸虫病是一种严重危害人类健康的人兽共患寄生虫病。其最大的危害在于虫卵沉积于肝脏引起纤维化。肝纤维化是以细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 沉积为特征的病理过程, 而肝星形细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 已被公认为肝内 ECM 堆积的关键因素。虽然, 血吸虫病肝纤维化的病因和光镜下的病理改变特点均与肝炎性、化学损伤性、酒精中毒性肝纤维化等有所不同, 但王雪莉<sup>[1]</sup>等学者发现, 电镜下血吸虫病肝纤维化和非血吸虫病肝纤维化细胞超微结构的改变却基本相同, 提示两者的发生、发展机制也许有许多相似之处, 认为 HSC 的激活同样是血吸虫病肝纤维化形成的中心环节。本实验用两种人参皂苷 Rg3、IFN- $\alpha$  药物<sup>[2,3]</sup>治疗小鼠血吸虫病肝纤维化, 进行肝脏超微结构变化的电镜观察, 现将结果报道如下。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物

48 只成年健康雄性 ICR 小鼠, 6 周龄, 清洁级, 购自昆明医科大学实验动物中心。动物摄食本中心生产的颗粒饲料, 饮用普通自来水。日本血吸虫尾蚴皖鄂品系, 逸自于江苏省血吸虫病防治研究所提供的中间宿主湖北肋壳钉螺。

### 1.2 主要试剂及仪器

Rg3 参一胶囊 (10 mg, 吉林亚泰制药股份有限公司产品) 购自广州百济抗肿瘤药房, 赛若金注射用重组人干扰素  $\alpha$  1b (10  $\mu$ m, 深圳科兴生物工程有限公司产品) 购自昆明市中医院西药房, 0.5% 羧甲基纤维素钠混悬液 (CMC-Na) 由昆明医科大学药学院提供, 3.5% 戊二醛、1% 锇酸、618 环氧树脂、醋酸铀、柠檬酸铅及 JEM-1011 型透射电镜、LKBR-V 型超薄切片机由昆明医科大学电子显微镜室提供。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 动物分组及模型建立** 将 48 只雄性 ICR 小鼠随机分为健康对照组 (A 组)、实验对照组 (B 组)、人参皂苷 Rg3 治疗组 (C 组) 及 IFN- $\alpha$  治疗组 (D 组) 等 4 组, 每组 12 只。将钉螺置于盛有去氯清水的玻璃指管中, 在 25 $^{\circ}$ C、光照条件下逸出血吸虫尾蚴, 以腹部贴片法经皮肤攻击感染 B、C、D 组小鼠, 每只小鼠感染尾蚴 18~22 条, 感染后将各组小鼠置于 23 $^{\circ}$ C~26 $^{\circ}$ C 的恒温房中, 全价饲料喂养。约 10 周后可以造成血吸虫病肝纤维化小鼠模型。

**1.3.2 药物治疗** 攻击感染尾蚴 10 周后, 称取 B、C、D 各组感染小鼠体重, 并以每鼠吡喹酮一次性灌胃治疗 (300 mg/kg 体重)。吡喹酮治疗次日开始, C 组每只小鼠予以人参皂苷 Rg3 3 mg/(kg·d) 灌胃治疗<sup>[4]</sup>; D 组每只小鼠予以 IFN- $\alpha$  500 IU/(g·d) 于颈背部皮下注射; 每天给药, 连续 8 周。B 组小鼠不给予治疗, 作为实验对照。

**1.3.3 动物标本制作** 连续用药 8 周末, 将各组小鼠, 称取体重, 断颈法处死, 每鼠取其左叶肝组织<sup>[5]</sup>, 立即放入 10% 甲醛溶液中固定保存备检; 每组随机抽选 3 只小鼠取肝脏电镜标本 (1 mm  $\times$  1 mm  $\times$  1 mm), 立即放入预冷的 3.5% 戊二醛溶液中保存备检。将甲醛固定的肝组织进行乙醇系列脱水, 二甲苯透明, 并作石蜡包埋、连续切片 (厚度为 4  $\mu$ m), 脱蜡后进行苏木素-伊红 (HE) 染色和苦味酸-酸性品红 (VG) 染色观察。留取的肝组织电镜标本, 在预冷的 3.5% 戊二醛中作前固定 3 h 以上, 双蒸水清洗 4 次, 1% 锇酸后固定 2 h, 乙醇、丙酮逐级梯度脱水, 618 环氧树脂渗透包埋, LKBR-V 型超薄切片机切片, 醋酸铀和柠檬酸铅双染, JEM-1011 型透射电镜观察。

## 2 结果

### 2.1 正常对照组

小鼠肝脏大小正常, 红褐色, 表面光滑, 质脆柔软。HE 及 VG 染色观察, 肝小叶、肝细胞、肝血窦及肝门管区形态结构清晰, 胶原纤维主要分布于血管壁, 肝细胞之间及肝血窦内无胶原纤维分布。投射电镜观察肝细胞结构正常, 肝细胞核常染色质丰富、核仁明显; 线粒体、内质网等细胞器丰富, 超微结构正常 (图 1)。贮脂细胞 (fat-storing cell, FSC, Ito 细胞, HSC) 位于窦状隙周间隙 (肝窦周隙, Disse Space) 内, 呈梭形或杆状; 其最明显的特征是胞质内有大小不等、数目不一的脂滴; 由于脂滴积压, 胞核常凹陷并位于细胞一侧; 胞质内细胞器较少; 该细胞数量较少, 不易找到 (图 2)。Disse 间隙、肝血窦正常 (图 3)。

### 2.2 实验对照组

小鼠肝脏增大, 呈暗褐色, 质地硬如砂粒。肝脏表面不光滑, 包膜较紧张, 可见散在的浅沟纹及将肝脏划分成大小不等、形状不一、稍微隆起的分区。HE 及 VG 染色观察, 肝小叶内及门管区均可见大量虫卵肉芽肿, 并以门管区为重。肝门管区及虫卵肉芽肿周围可见明显的纤维增生。肝血窦受压变形, 窦壁增厚, 小叶中央静脉壁增厚, 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.肝小叶内及门管区胶原纤维明显增生,形成较粗大致密的纤维间隔,分割包绕肝小叶,大多数肝小叶结构被破坏.门管区血管壁及小叶中央静脉壁增厚.虫卵肉芽肿内有大量胶原纤维沉积,病灶周围肝血窦内胶原纤维增生.电镜观察实验对照组小鼠,肝细胞水肿,未见肌成纤维细胞和贮脂细胞.胶原纤维明显增加(图4~6).

### 2.3 人参皂苷 Rg3 治疗组

小鼠肝脏均有不同程度增大,呈暗褐色,质地略韧.肝脏表面不平,但较实验对照组光滑,表面灰黄色虫卵结节也较实验对照组细小.HE及VG染色观察,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.肝血窦壁无明显增厚,窦腔内炎细胞较少.电镜观察,小鼠肝细胞水肿,肝血窦扩张明显,Disse间隙也有扩张(图7).可见少量胶原纤维沉积(图8),明显多于正常对照组,较实验对照组减少.胞浆内未见滑面内质网增生,未见肌成纤维细胞,可见贮脂细胞(图9),数量多于正常对照组.

### 2.4 IFN- $\alpha$ 治疗组

小鼠肝脏暗褐色,质地略韧,增大程度和表面情况与Rg3治疗组情况相似.HE及VG染色观察到肝脏内虫卵肉芽肿、纤维增生、炎细胞浸润等病变.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.仅少数小叶内有虫卵肉芽肿形成,且病灶周围的肝小叶内胶原纤维沉积较少,偶见窦内胶原增生.小叶中央静脉壁轻度增厚,小叶内偶见纤细、疏松的纤维隔.病变情况明显比实验对照组减轻.投射电镜观察小鼠肝细胞轻度水肿,肝细胞血窦面微绒毛增多,胞浆内可见滑面内质网增生,但未见明显扩张(图10).未见肌成纤维细胞,可见贮脂细胞,数量多于正常对照组(图11).Disse间隙可见胶原纤维(图12、13),明显多于正常对照组,但较实验对照组减少.

## 3 讨论

日本血吸虫病的两大病理改变—虫卵肉芽肿和肝纤维化,有不同的发病机理.肝纤维化比肉芽肿在发病机理方面更为重要,它是导致日本血吸虫感染宿主发病、出现严重并发症与死亡的根本原因.

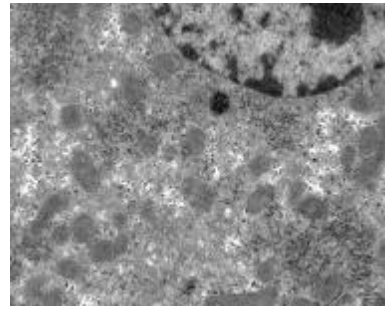


图1 正常肝细胞 (TEM×25 000)

Fig. 1 Normal hepatocyte (TEM×25 000)

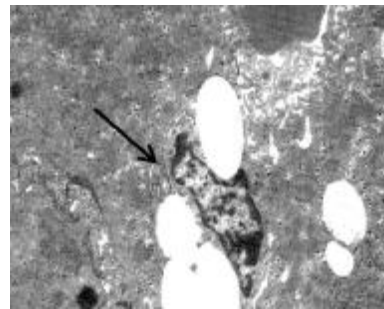


图2 贮脂细胞(↑) (TEM×12 000)

Fig. 2 Fat-storing cell (↑) (TEM×12 000)

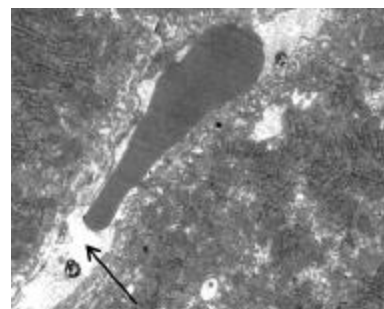


图3 正常肝血窦(↑) (TEM×12 000)

Fig. 3 Normal hepatic sinusoid(↑) (TEM×12 000)

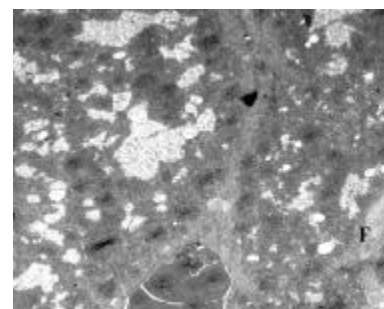


图4 胶原纤维(F) (TEM×6 000)

Fig. 4 Collagenous fiber (F) (TEM×6 000)

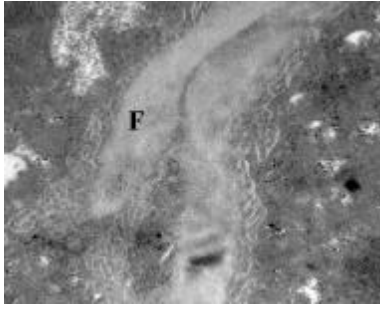


图 5 胶原纤维(F) (TEM × 15 000)  
**Fig. 5 Collagenous fiber (F) (TEM × 15 000)**

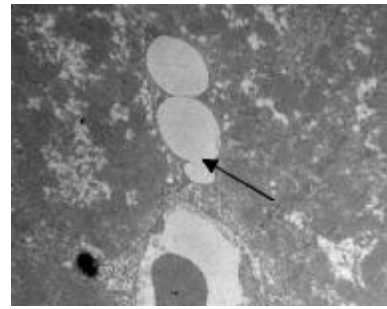


图 9 贮脂细胞(↑) (TEM × 6 000)  
**Fig. 9 Fat-storing cells (↑) (TEM × 6 000)**

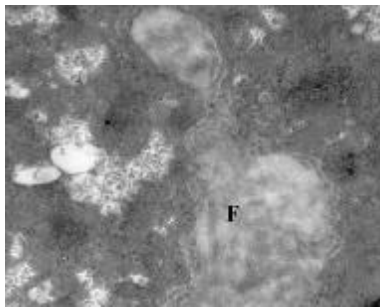


图 6 胶原纤维(F) (TEM × 20 000)  
**Fig. 6 Collagenous fiber (F) (TEM × 20 000)**

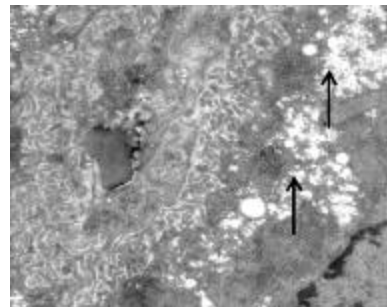


图 10 滑面内质网增生肥大(↑) (TEM × 15 000)  
**Fig. 10 Hypertrophy and hyperplasia of smooth endoplasmic reticulum(↑) (TEM × 15 000)**

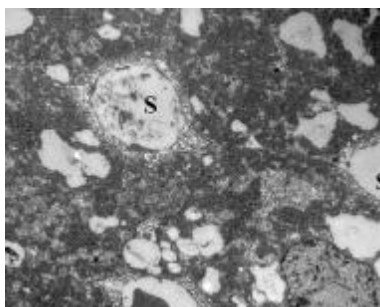


图 7 肝血窦扩张(S) (TEM × 4 000)  
**Fig. 7 Dilation of hepatic sinusoid(S) (TEM × 4 000)**

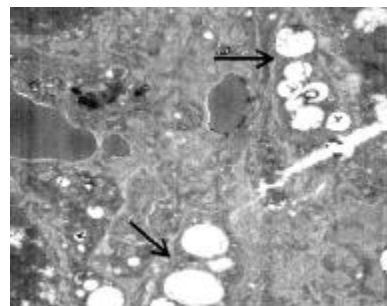


图 11 贮脂细胞(↑) (TEM × 8 000)  
**Fig. 11 Fat-storing cells (↑) (TEM × 8 000)**

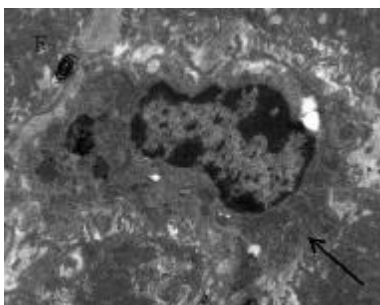


图 8 枯否氏细胞(↑)胶原纤维(F) (TEM × 12 000)  
**Fig. 8 Kupffer cell (↑)Collagenous fiber (F) (TEM × 12 000)**

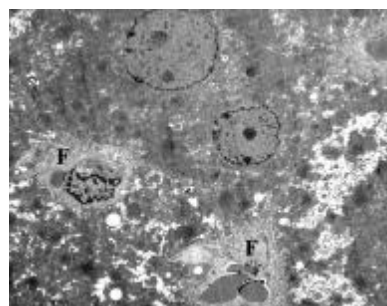


图 12 胶原纤维(F) (TEM × 4 000)  
**Fig. 12 Collagenous fiber (F) (TEM × 4 000)**

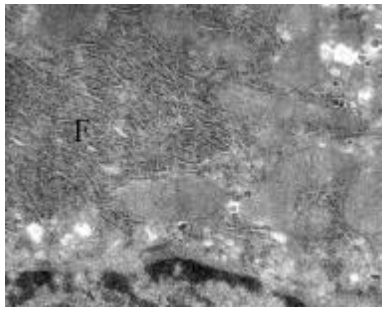


图 13 胶原纤维(F) (TEM  $\times 30\ 000$ )

Fig. 13 Collagenous fiber (F) TEM  $\times 30\ 000$

其形成是因为机体长期处于对血吸虫虫卵抗原的免疫应答状态,致使免疫功能紊乱,从而表现为各种细胞因子平衡失调.作为损伤修复中心介质的HSC活化并大量增殖,产生过量的胶原和其他基质蛋白,超过了机体的降解能力,致使基质在肝内过量沉积.因此,血吸虫病在彻底杀虫的基础上仍有必要进行抗纤维化治疗<sup>[6]</sup>.

本实验用日本血吸虫尾蚴来制备小鼠肝纤维化动物模型,用IFN- $\alpha$ 、人参皂苷Rg3来治疗小鼠血吸虫病肝纤维化.用药8周后,通过HE染色及VG染色观察到两治疗组小鼠肝脏内虫卵肉芽肿、胶原纤维增生、炎性细胞浸润等病理学改变,可见肝小叶及门管区胶原纤维沉积、血管壁增厚,肝血窦胶原纤维增生及小叶内纤维间隔形成,但肝脏病理学病变情况比不给予抗纤维化治疗的实验对照组减轻<sup>[2,3]</sup>.目前研究认为,在虫卵肉芽肿向肝纤维化发展的过程中,HSC起了很重要的桥梁作用<sup>[7,8]</sup>.所以减少HSC数目、抑制HSC活化是肝纤维化逆转的重要途径.使活化的HSC数目减少主要通过两条途径<sup>[9]</sup>:通过细胞凋亡使细胞死亡;使活化的细胞回到静止态.在慢性VitA过多症以及用胰岛素、消炎痛和视黄酸等处理CCl<sub>4</sub>诱导的肝纤维化模型等研究中发现,肌成纤维细胞向贮脂细胞转变,贮脂细胞数量明显增多,肝内胶原含量明显减少<sup>[10-12]</sup>.本实验中发现,药物治疗组小鼠肝脏中未见肌成纤维细胞,但贮脂细胞多于正常小鼠.说明IFN- $\alpha$ 和人参皂苷Rg3可能是通过抑制HSC,促进其凋亡,促进肌成纤维细胞向贮脂细胞转变来发挥抗血吸虫病肝纤维化作用的.

肝脏的解毒作用主要由肝细胞内的滑面内质网(smooth endoplasmic reticulum, SER)来完成. SER肥大、增殖可视为肝细胞对药物的一种适应性反应,增强了机体处理药物的能力<sup>[13]</sup>.本实验超微电镜观察发现,经IFN- $\alpha$ 治疗的小鼠肝细胞胞质内可见SER明显肥大、增殖,而经人参皂苷Rg3治

疗的小鼠肝细胞内未见此现象.说明人参皂苷Rg3的使用并未引起滑面内质网的适应性改变,可长期使用.

另外,本实验还发现,经人参皂苷Rg3治疗的小鼠肝脏组织中肝血窦明显扩张.肝窦被认为是肝脏的毛细血管,但与机体其它部位的毛细血管不同,肝窦内皮细胞下缺乏基底膜且其内皮层为非连续性.目前认为<sup>[14]</sup>,贮脂细胞为肝脏特异性周皮细胞,是一种位于外周微血管周围的平滑肌细胞样细胞,具有调节毛细血管血流的作用.在正常肝脏中,处于静息状态的贮脂细胞具有收缩性,可以调节肝血窦血流.血管活性物质对贮脂细胞收缩性的调节可能在调节肝血窦血流方面起着重要作用.其中,NO是一个重要的血管舒张剂,它可以通过旁分泌或自分泌机制对贮脂细胞舒缩状态产生调节作用.有学者研究发现<sup>[15,16]</sup>,人参皂苷Rg3可以诱导NO产生,而起到舒张血管的作用.因此,认为人参皂苷Rg3治疗的小鼠肝脏组织中肝血窦明显扩张可能与人参皂苷Rg3可以诱导NO产生有关.

本研究结合电镜技术,从超微结构上阐述了人参皂苷Rg3和IFN- $\alpha$ 具有抗血吸虫病肝纤维化作用的科学依据.进一步说明2种药物的抗血吸虫病肝纤维化作用的机制还有待于更深入的研究.

#### [参考文献]

- [1] 王雪莉,张玲敏,唐福星,等. 小鼠血吸虫病肝纤维化的超微结构动态观察[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2002,4(20):216-219.
- [2] 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):81-84.
- [3] 曾瑾,李飞,贾雪梅,等. 人参皂苷Rg3和干扰素 $\alpha$ 抗小鼠血吸虫病肝纤维化效果的比较[J]. 中国病原生物学杂志,2011,6(11):825-827.
- [4] 王庭富,孟正木. 人参皂甙Rg3对免疫功能的影响[J]. 中国药科大学学报,1999,30(2):133-135.
- [5] 夏启荣,何峰主编. 肝硬化的诊断与治疗[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:2.
- [6] 蔡卫民,陈智,陈峰,等. 血吸病患者吡喹酮治疗后一年B超及血清生化变化[J]. 中华传染病杂志,1997,15(1):20.
- [7] 杨艳宏,蔡卫民,金国梁,等. 日本血吸虫卵肉芽肿与纤维化关系的研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志,1999,11(6):321-323.
- [8] 杨艳宏,蔡卫民,金国梁,等. 日本血吸虫感染兔肝肌

- 成纤维细胞的动态变化及其意义 [J]. 中华医学杂志, 1999, 79(11):870 - 873.
- [9] RIPPE R A. Life or death: the fate of the hepatic stellate cell following hepatic injury [J]. *Hepatology*, 1998, 27 ( 5 ): 1 447 - 1 448.
- [10] PINHEIRO-MARGIS M, MARGIS R, BOROJEVIC R. Collagen synthesis in an established liver tissue cell line (GRX) during induction of the fat-storing phenotype [J]. *Exp Mol Pathol*, 1992, 56:108.
- [11] MARGIS R, PINHEIRO-MARGIS M, DE SILVA LF, et al. Effects of retinol on proliferation, cell adherence and extracellular matrix synthesis in a liver myofibroblastor lipocyte cell line (GRX) [J]. *Int J Exp Pathol*, 1992, 73:125.
- [12] PARISE E R, CHEHTER L, NOGUEIRA M D, et al. Effects of vitamin a administration on collagen and sulfated glycosaminoglycans content in the livers of rats treated with carbon tetrachloride [J]. *J Lab Clin Med*, 1992, 119:676.
- [13] 史景泉, 陈意生, 卞修武主编. 超微病理学 [M]. 北京: 化学工业出版社现代生物技术与医药科技出版中心, 2005:40 - 41.
- [14] 张南生, 张秀华, 李文峰. 人参皂昔Rg3的研究进展 [J]. *医药导报*, 2006, 25(7):687 - 689.
- [15] 朱永红, 聂青和. 储脂细胞与肝脏循环 [J]. *国外医学 (流行病学传染病学分册)*, 1998, 25(1):17 - 20.
- [16] KANG Y J, SOHN J T, CHANG K C. Relaxation of canine corporal smooth muscle relaxation by ginsenoside saponin Rg3 is independent from eNOS activation [J]. *Life Sci*, 2005, 77(1): 74 - 84.
- (2013 - 02 - 15 收稿)

(上接第 30 页)

- matrix metalloproteinase immobilized on agarose beads [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 16 098 - 16 103.
- [10] IREDALE J P, BENYON R C, PICKETING J, et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors [J]. *J Clin Invest*, 1998, 102(3):538 - 549.
- [11] BENYON R C, ARTHUR M J. Extracellular of matrix degradation and the role of hepatic stellate cells [J]. *Semin Liver Dis*, 2001, 21:373 - 384.
- [12] 姜宪辉, 叶华, 孙雷. MMP-1、TIMP-1 在肝纤维化组织中的表达及其病理意义 [J]. *医学信息*, 2008, 21(12): 2 291 - 2 294.
- [13] 蔡卫民, 张彬彬. 八项肝纤维化血清标志物比较研究 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2004, 4(4):219 - 222.
- (2013 - 01 - 15 收稿)