

## 甘草酸二铵改善 Con A 致小鼠肝损伤的作用研究

仲金秋<sup>1</sup>,曹玉珠<sup>1</sup>,徐宏江<sup>3</sup>,吴媛媛<sup>1</sup>,张婷婷<sup>1</sup>,李晓曼<sup>1</sup>,陈文星<sup>1,2</sup>,王爱云<sup>1,2\*</sup>,陆茵<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>南京中医药大学 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室;<sup>2</sup>南京中医药大学 江苏省中医药防治肿瘤协同创新中心;<sup>3</sup>中国药理学与毒理学研究所 正大天晴药业集团股份有限公司,南京 210023

**摘要:**探讨甘草酸二铵(Diammonium glycyrrhi zinate, DG)对刀豆蛋白(Concanavalin A, Con A)致小鼠肝损伤的保护作用及机制。连续给予 ICR 小鼠各保肝药的临床等效量 7 天后,再以 Con A 造成小鼠肝损伤。生化法检测血清中谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)含量;HE 染色观察肝组织病理学特征;通过药物代谢物与转氨酶异常大鼠血清共孵育,检测 DG 对转氨酶活性的直接作用;免疫组化、Western blot 检测肝组织中凋亡蛋白和炎症细胞因子的水平,探讨 DG 的保肝机制。结果显示,58.5 mg/kg DG 能够改善 Con A 所致小鼠肝脏病理损伤,降低小鼠血清中 AST、ALT 水平,而对 AST、ALT 的活性没有直接抑制作用;并且 DG 可以抑制肝细胞凋亡(下调 cleaved Caspase-3、cleaved PARP 以及 BAX/BCL-2 的表达)和炎症反应(降低 TGF- $\beta$ 1、COX-2、IL-6、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  等炎症因子水平)。综上所述,DG 可改善 Con A 致小鼠急性肝损伤,其作用机制可能与抑制细胞凋亡和炎症反应有关。

**关键词:**甘草酸二铵;18 $\alpha$ -甘草次酸;刀豆蛋白;肝损伤;炎症;凋亡

中图分类号:R285.5;R962

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.12.009

## Protective Effect of Diammonium Glycyrrhizin on Con A-induced Liver Injury in Mice

ZHONG Jin-qiu<sup>1</sup>, CAO Yu-zhu<sup>1</sup>, XU Hong-jiang<sup>3</sup>, WU Yuan-yuan<sup>1</sup>, ZHANG Ting-ting<sup>1</sup>,  
LI Xiao-man<sup>1</sup>, CHEN Wen-xing<sup>1,2</sup>, WANG Ai-yun<sup>1,2\*</sup>, LU Yin<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>Jiangsu Key Laboratory for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Materia Medica,  
School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine;<sup>2</sup>Jiangsu Collaborative Innovation Center of Traditional Chinese Medicine (TCM) Prevention and  
Treatment of Tumor, Nanjing University of Chinese Medicine;<sup>3</sup>Institute for Pharmacology & Toxicology, Chia Tai Tianqing Pharmaceutical Group Co., LTD, Nanjing 210023, China

**Abstract:** This study was to investigate the effect and the underlying mechanism of DG on the hepatotoxicity induced by Con A. In this study, a concanavalin A (Con A)-induced hepatitis mouse model was used to examine the effect of DG on hepatic injury. DG (58.5 mg/kg), silymarin (36.4 mg/kg) and bicyclol (9.75 mg/kg) equivalent to clinical dosage were orally administered to mice once daily for 7 consecutive days before Con A challenge. After that, blood samples were collected for serological detection, and histological analysis was carried out by hematoxylin-eosin staining. In order to investigate the molecular mechanism of DG's protective effect, the serum-drug incubation assay, immunohistochemistry and western blot were conducted. Hematoxylin-eosin staining showed that DG pre-treatment prevented Con A-induced liver structural damage in ICR mice. We also observed the reduced serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities. However, the serum-drug incubation assay indicated that DG cannot directly attenuate ALT and AST levels. Meanwhile, experimental results proved that DG pretreatment down-regulates cleaved Caspase-3, cleaved PARP, ratio of BAX/BCL-2 expression level and expression of TGF- $\beta$ 1, COX-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  inflammatory mediators. Taken together, DG can inhibit Con A-induced hepatic injury by inhibition of apoptosis and inflammation.

收稿日期:2018-04-04 接受日期:2018-06-22

基金项目:江苏省自然科学基金(BK20141243);江苏高校品牌专业建设工程(PPZY2015A070);江苏省重点实验室开放项目(JKLPSE201602);江苏省中药药效与安全性评价重点实验室资助项目(JKLPSE201610);江苏高校中药学优势学科建设工程(PAPD) [苏政办发(2014)37号文]

\*通信作者 Tel:86-25-85811237; E-mail: wangaiyun@njucm.edu.cn, luyingreen@126.com

**Key words:** diammonium glycyrrhizinate; 18 $\alpha$ -GA; concanavalin A; hepatic injury; inflammation; apoptosis

肝损伤是一类严重危害人类健康的疾病,是多种肝脏疾病共有的一种病理状态,当损伤程度超过其代偿能力时,则出现临床和生化的特征性改变;肝损伤的长期存在往往能够导致肝纤维化、肝硬化;甚至肝癌的发生,因此防治肝损伤是临床肝病治疗的主要环节之一<sup>[1]</sup>。

甘草酸二铵(Diammonium glycyrrhizinate, DG)是由甘草根中提取的成分,在我国应用于治疗肝炎已有数千年的历史。因其较甘草酸(Glycyrrhizin, GL)稳定性更好、溶解度更高且生物活性更强,目前已广泛应用于临床<sup>[2]</sup>。甘草酸二铵具有广泛的药理活性,包括抗炎、抗生物氧化、膜保护和免疫调节作用,并且具有类固醇类激素的作用等;口服摄入后,甘草酸二铵代谢为甘草酸,然后在肠道菌群的作用下水解成甘草次酸(Glycyrrhetic acid, GA):18 $\alpha$ -甘草次酸(18 $\alpha$ -Glycyrrhetic acid, 18 $\alpha$ -GA)和18 $\beta$ -甘草次酸(18 $\beta$ -Glycyrrhetic acid, 18 $\beta$ -GA),由肠道吸收。研究表明,18 $\alpha$ -GA在肝脏和十二指肠中的浓度明显高于18 $\beta$ -GA,是保肝和抗炎作用中的主要有效成分<sup>[3]</sup>。

甘草酸二铵广泛应用于临床肝病治疗,但目前对于其保肝机制研究报道并不多。本研究首次采用Con A诱导的小鼠肝损伤模型研究甘草酸二铵的保肝作用,并利用分子生物学手段探索其可能的作用机制,为其在临床的应用提供实验依据。

## 1 材料与仪器

### 1.1 实验动物

SPF级雄性ICR小鼠60只,18~20 g,上海杰思捷实验动物有限公司,许可证号:SCXK(沪)2013-0006,动物合格证号:2010002607994。

SPF级雄性Wistar大鼠20只,180~220 g,扬州大学比较医学中心,许可证号:SCXK(苏)2012-0004,动物合格证号:NO.201613691。

### 1.2 药物

甘草酸二铵肠溶胶囊(江苏正大天晴药业股份有限公司);水飞蓟素胶囊(德国马博士大药厂);双环醇片(北京协和药厂);刀豆蛋白(sigma);双环醇(中检所);18 $\alpha$ -GA(江苏正大天晴药业股份有限公司, TQ0813-s03);水飞蓟宾(上海源叶生物科技有限公司);18 $\beta$ -GA( $\geq$ 98%)和苦参碱( $\geq$ 98%)购自

上海源叶生物科技有限公司。

### 1.3 试剂

谷草转氨酶测定试剂盒(IFCC法)、谷丙转氨酶测定试剂盒(IFCC法)(日本和光纯药工业株式会社);活化型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cleaved Caspase-3)、B淋巴细胞瘤-2基因编码蛋白(BCL-2)、BCL2相关X蛋白(Bcl-2 Associated X Protein, BAX)、多腺苷二磷酸核糖聚合酶(PARP)、 $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )抗体(美国Cell Signaling Technology公司);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、环氧合酶-2(COX-2)、羊抗兔IgG(H+L)-HRP抗体(巴傲得生物科技有限公司);转化生长因子- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)、环氧合酶-1(COX-1)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)抗体(Abcam公司);白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )(万类生物科技有限公司)、白细胞介素-10(IL-10)(美国Affinity Biosciences公司)。

### 1.4 仪器

台式冷冻离心机(美国Beckman公司, Allegra 30R);石蜡包埋仪(德国LEICA公司, EG 1150H+C);石蜡切片机(德国LEICA公司, RM2245);全自动生化分析仪(HITACHI, 日立7020);体视荧光显微镜(德国LEICA公司, M205FA);恒温培养箱(上海笃特科学仪器有限公司, HWP-9162);凝胶电泳仪(来自美国Bio-Rad, Mini Protean 3 Cell);凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司, ChemiDoc<sup>TM</sup>XRS+)。

## 2 实验方法

### 2.1 小鼠模型的给药与制备

实验小鼠适应性饲养5天后,称重,随机分为5组,每组12只,分别为空白组(Control),模型组(Con A),甘草酸二铵组(DG),水飞蓟素对照组(Silymarin),双环醇对照组(Bicyclol)。甘草酸二铵、水飞蓟素和双环醇的临床给药剂量,分别为450、280和75 mg/d,按体表面积折算的等效剂量比值(小鼠临床等效剂量=临床日用剂量(0.0026/0.02)计算药物的临床等效剂量,分别为58.5、36.4、9.75 mg/kg。各治疗组小鼠分别灌胃给药,给药体积为0.1 mL/10 g;空白组和模型组给予等体积生理盐水。连续给药7天,并称重。

第8天,小鼠称重,实验组按尾静脉单次注射

Con A 30 mg/kg 的药物剂量,给药体积为 0.05 mL/10 g (Con A 溶解于无菌生理盐水中,浓度为 6 mg/mL);空白组采用同体积生理盐水处理。其后所有小鼠禁食不禁水。

## 2.2 小鼠处理

造模 8 h 后,小鼠眼眶后静脉丛采血,每只小鼠收集血液 1~1.5 mL,于室温静置 1 h 后,4 ℃ 过夜。全血离心(2500 rpm,10 min,4 ℃)后取上层血清保存待用。解剖小鼠,分离肝、脾、胸腺后立即用生理盐水冲洗并称重。计算动物的各脏器指数,脏器指数=(脏器质量/体质量)×100。每只小鼠取肝脏同一叶浸泡于 4% 多聚甲醛中固定过夜,后用于组织病理学检查和免疫组织化学分析。剩余部分肝脏放入 -80 ℃ 冰箱冷冻保存,用于 Western blot 分析。

## 2.3 蛋白免疫印迹实验(Western blot)

称取 50 mg 肝组织中于玻璃匀浆器中,加入 1 mL RIPA 后置于冰上充分研磨,离心取上清液,采用 BCA 试剂盒进行蛋白含量测定。蛋白变性后 -80 ℃ 冰箱保存。配制 10% 聚丙烯酰胺凝胶,每孔 50 μg 蛋白上样。电泳条件为 40 mA,120 min,转膜条件为 100 V,90 min。一抗 BAX、BCL-2、PARP、IFN-γ、GAPDH、COX-2、cleaved Caspase-3、TGF-β1、COX-1、IL-1β、IL-6、TNF-α 和 IL-10 的稀释比例均为 1:1000。使用凝胶成像仪进行成像并利用 Photoshop 软件进行蛋白条带灰度分析。

## 2.4 小鼠肝组织病理学检查

肝脏组织在 4% 多聚甲醛中固定后,后依次进行常规脱水、石蜡包埋、切片烤片(4 μm)、HE 染色。显微镜下(200×)观察组织病理变化并拍照。

## 2.5 免疫组织化学

将肝组织石蜡切片常规脱蜡至水,抗原修复,封闭,cleaved Caspase-3 (1:200)、COX-2 (1:200) 或 Caspase-1 (1:500) 4 ℃ 孵育过夜,滴加二抗,DAB 显色,苏木精复染。显微镜下(200×)拍照,每组选取肝组织切片中 9 个互不重叠的视野,采用 Image Pro Plus 6.0 软件进行图像分析。

## 2.6 药物与转氨酶异常大鼠血清共孵育实验

### 2.6.1 收集大鼠 AST、ALT 水平异常的血清

WISTAR 大鼠适应性饲养 7 天。第 8 天称重,复制 Con A 诱导的大鼠肝损伤模型,方法同 2.1。造模 8 h 后,通过腹腔注射 10% 的水合氯醛麻醉大鼠,随后采用腹主动脉取血,分离血清。

### 2.6.2 药物与大鼠血清共孵育<sup>[4]</sup>

配制各药物浓度为 18α-GA (11、22、44、88 μg/mL)、18β-GA (11、22、44、88 μg/mL);水飞蓟宾对照组 (7.5、15、30、60 μg/mL);双环醇对照组 (2.5、5、10、20 μg/mL);苦参碱 (10 μg/mL),均用 DMSO 溶解,pH7.2~7.4。取各浓度药物 1 μL 与 AST、ALT 异常升高的血清 200 μL 混匀,于 37 ℃ 分别孵育 0、2、4、6、8、10、12 h。一式 3 份。各药物终浓度如下:18α-GA (55、110、220、440 ng/mL)、18β-GA (55、110、220、440 ng/mL)、水飞蓟宾 (37.5、75、150、300 ng/mL)、双环醇 (12.5、25、50、100 ng/mL)、苦参碱 (50 ng/mL)。差值计算公式:Normalized (AST) = AST-AST control;Normalized (ALT) = ALT-ALT control。

## 2.7 血清转氨酶活性检测

采用 HITACHI 7020 全自动生化分析仪,按厂家试剂盒说明书设置参数后检测血清中 AST 和 ALT 水平。

## 2.8 统计学方法

所得数据以  $\bar{x} \pm s$  描述,采用 Graph pad Prism 软件 5.0 版本进行单因素方差分析 (One way analysis) 组间比较, $P < 0.05$  时具有统计学意义。

# 3 实验结果

## 3.1 甘草酸二铵对肝损伤小鼠的体质量和脏器指数的影响

如表 1、表 2 所示,各组小鼠体质量无显著差异,但模型组小鼠肝脏、脾脏和胸腺内脏指数较空白组显著增加 ( $P < 0.001$  或  $P < 0.05$ ),而且肉眼可见小鼠肝脏、脾脏和胸腺肿大,肝脏外表面充血。而 58.5 mg/kg 甘草酸二铵能够显著降低 Con A 诱导的小鼠肝脏指数异常 ( $P < 0.05$ );36.4 mg/kg 水飞蓟素对小鼠的脏器指数没有影响;9.75 mg/kg 双环醇能改善刀豆蛋白引起的小鼠脾脏脏器指数异常 ( $P < 0.05$ )。

## 3.2 甘草酸二铵对肝损伤小鼠的组织病理学和血清生化指标的影响

凋亡、炎症是 Con A 诱导急性肝损伤的重要病理机制。肝组织 HE 染色结果显示,空白组肝小叶结构完整,肝细胞围绕中央静脉呈放射状排列。模型组肝脏汇管区正常结构被明显破坏,细胞边界不清,胞浆呈絮状,部分细胞核缩小,炎性细胞浸润 (图 1A 中箭头所指)。各给药组肝小叶轮廓较模型组清晰,细胞形态相对完整,部分可见轻度病变,肝

表 1 甘草酸二铵对 Con A 所致肝损伤小鼠体质量的影响 ( $n = 12, \bar{x} \pm s$ )Table 1 Effect of DG on the body weight of mice ( $n = 12, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	1 d (g)	2 d (g)	3 d (g)	4 d (g)	5 d (g)	6 d (g)	7 d (g)	8 d (g)
空白 Control	-	23.63 ± 2.06	24.43 ± 2.03	25.33 ± 2.23	25.71 ± 2.42	25.81 ± 2.77	26.18 ± 3.29	26.49 ± 3.63	26.75 ± 3.94
模型 Model	-	23.25 ± 1.22	24.63 ± 1.26	25.41 ± 1.32	25.99 ± 1.08	26.73 ± 1.04	27.45 ± 0.83	27.98 ± 1.13	28.23 ± 1.24
甘草酸 二铵 DG	58.5	23.64 ± 1.40	24.95 ± 1.07	25.78 ± 1.33	26.27 ± 1.45	26.81 ± 1.79	27.43 ± 2.10	27.63 ± 2.36	27.97 ± 2.72
水飞蓟素 Silymarin	36.4	23.29 ± 1.38	24.44 ± 1.32	25.45 ± 1.70	26.04 ± 2.33	26.66 ± 2.80	27.64 ± 3.27	28.21 ± 3.63	28.63 ± 3.95
双环醇 Bicyclol	9.75	23.37 ± 1.56	24.75 ± 1.40	25.72 ± 1.64	26.51 ± 1.52	27.21 ± 1.52	28.37 ± 1.50	29.01 ± 1.60	29.47 ± 1.76

注:与空白组比较没有差异;与模型组比较没有差异。

Note:Compared with control group,no significant difference;compared with Model group,no significant difference.

表 2 甘草酸二铵对 Con A 所致肝损伤小鼠肝脏、脾脏和胸腺脏器指数的影响 ( $n = 12, \bar{x} \pm s$ )Table 2 Effect of DG on the liver,spleen and thymus viscera index of mice ( $n = 12, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	肝脏指数 Liver index (g/100 g)	脾指数 Spleen index (g/100 g)	胸腺指数 Thymus index (g/100 g)
空白 Control	-	5.32 ± 1.18	0.53 ± 0.15	0.30 ± 0.10
模型 Model	-	6.58 ± 0.50 <sup>###</sup>	0.84 ± 0.16 <sup>###</sup>	0.40 ± 0.05 <sup>#</sup>
甘草酸二铵 DG	58.5	5.85 ± 0.34 <sup>*</sup>	0.73 ± 0.17	0.39 ± 0.10
水飞蓟素 Silymarin	36.4	6.18 ± 0.50	0.77 ± 0.16	0.35 ± 0.09
双环醇 Bicyclol	9.75	6.45 ± 0.47	0.66 ± 0.13 <sup>*</sup>	0.35 ± 0.08

注:与空白组比较<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;<sup>###</sup> $P < 0.001$ ;与模型组比较<sup>\*</sup> $P < 0.05$ 。

Note:Compared with control group,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;<sup>###</sup> $P < 0.001$ ;Compared with Model group,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ .

细胞索排列整齐,肝组织病理学形态得到改善(图 1A)。此外,我们还对空白组、模型组和甘草酸二铵组小鼠肝组织切片进行了凋亡蛋白、炎症介质的免疫组化染色。结果显示,模型组小鼠肝组织中 cleaved Caspase-3 的表达显著增加( $P < 0.01$ ),而 58.5 mg/kg 甘草酸二铵能够下调肝组织中 cleaved caspase-3 的水平(图 1B)。同时,模型组小鼠肝组织中 Caspase-1 和 COX-2 的表达升高( $P < 0.001$ )。而 58.5 mg/kg 甘草酸二铵能够降低 caspase-1 以及

COX-2 的表达( $P < 0.01$ )(图 1C)。

血清转氨酶水平的检测结果与组织病理学变化结果相一致。如表 3 所示,模型组血清中 AST 和 ALT 水平显著升高( $P < 0.001$ ),58.5 mg/kg 甘草酸二铵能够降低小鼠血清中 AST 和 ALT 水平( $P < 0.001$  或  $P < 0.01$ );36.4 mg/kg 水飞蓟素也具有降低小鼠血清中 AST 和 ALT 的作用( $P < 0.05$  或  $P < 0.001$ );但是 9.75 mg/kg 双环醇仅能降低小鼠血清中 ALT 水平( $P < 0.05$ ),而对 AST 没有影响。

表 3 甘草酸二铵对 Con A 所致肝损伤小鼠血清 ALT 和 AST 水平的影响

Table 3 Effects of DG on the serum ALT,AST levels in mice

组别 Groups	<i>n</i>	剂量 Dose (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)
空白 Control	10	-	49.89 ± 10.41	144.15 ± 33.44
模型 Con A	10	-	98.53 ± 29.22 <sup>###</sup>	265.77 ± 75.29 <sup>###</sup>
甘草酸二铵 DG	10	58.5	65.90 ± 16.46 <sup>**</sup>	165.28 ± 32.74 <sup>**</sup>
水飞蓟素 Silymarin	12	36.4	58.08 ± 11.77 <sup>**</sup>	198.93 ± 44.27 <sup>*</sup>
双环醇 Bicyclol	10	9.75	71.77 ± 17.53 <sup>*</sup>	217.65 ± 43.26

注:与空白组比较,<sup>###</sup> $P < 0.001$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ;<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ;<sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ 。

Note:Compared with control group,<sup>###</sup> $P < 0.001$ ;Compared with Model group,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ;<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ;<sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ .

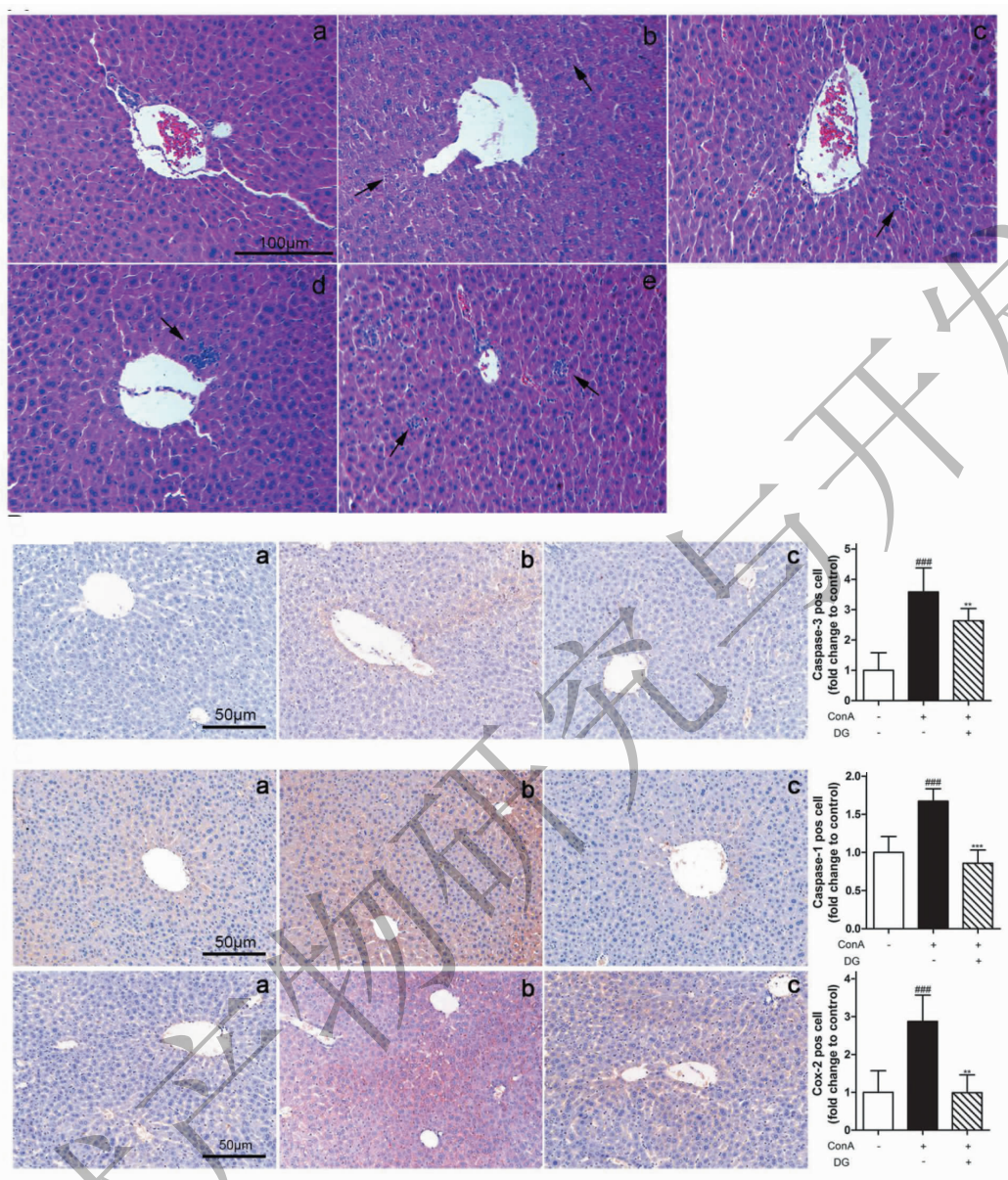


图1 甘草酸二铵对 Con A 所致肝损伤小鼠的组织病理学的影响 (200x)

Fig. 1 Effects of DG on histopathology in mice with Con A-induced hepatic injury (200x)

注:A:不同治疗组的肝组织 HE 染色;B:小鼠肝组织 cleaved-Caspase 3 的免疫组化分析;C:小鼠肝组织 Caspase-1、COX-2 的免疫组化分析;(a) 空白组;(b) 模型组;(c) 甘草酸二铵组;(d) 水飞蓟素对照组;(e) 双环醇对照组;与空白组比较,### $P < 0.001$ ;与模型组比较,\*\* $P < 0.01$ ;

Note:A:Liver tissue sections from the different treatment groups were stained with hematoxylin-eosin;B:Immunohistochemistry analysis of cleaved-Caspase 3 expression in mice liver tissues;C:Immunohistochemistry analysis of Caspase-1,COX-2 expression in mice liver tissues;(a) Control group,(b) Model group;(c) DG treatment group;(d) Silymarin treatment group;(e) Bicyclol treatment group;Compared with control group,### $P < 0.001$ ;Compared with Model group,\*\* $P < 0.01$ ;

### 3.3 甘草酸二铵体外对血清中的 AST、ALT 水平的影响

如表 4 和表 5 所示,阳性对照药苦参碱(50 ng/mL)在与血清孵育 10 h 后,能够降低血清中的 AST

水平( $P < 0.001$ )。18 $\alpha$ -GA、18 $\beta$ -GA 和双环醇不能直接降低血清中的 AST、ALT 水平。而水飞蓟宾(300 ng/mL)在与血清孵育 8 h 后,能够降低血清中的 ALT 水平( $P < 0.001$ )。



表4 18 $\alpha$ -GA、18 $\beta$ -GA 体外对血清中 AST 活性的影响 ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )Table 4 Serum AST activity from serum-18 $\alpha$ -GA, 18 $\beta$ -GA incubation assay ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

AST Change to control	浓度 Dose (ng/mL)	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h
空白 Control	-	-0.63 $\pm$ 0.81	0.60 $\pm$ 0.15	0.03 $\pm$ 0.44	-0.27 $\pm$ 0.26	-0.22 $\pm$ 0.65	-0.16 $\pm$ 1.72	-0.05 $\pm$ 2.30
DMSO	-	-1.27 $\pm$ 0.35	0.73 $\pm$ 0.26	-0.60 $\pm$ 0.38	-1.87 $\pm$ 0.10	0.32 $\pm$ 1.70	-2.43 $\pm$ 3.82	-2.51 $\pm$ 4.77
苦参碱 Matrine	50	-2.50 $\pm$ 1.18	-1.77 $\pm$ 0.36	-1.44 $\pm$ 0.76	-1.44 $\pm$ 0.91	-3.48 $\pm$ 0.36	-12.17 $\pm$ 0.38 <sup>***</sup>	-21.37 $\pm$ 0.47 <sup>***</sup>
18 $\alpha$ -GA	55	-4.30 $\pm$ 0.15	-7.87 $\pm$ 1.28	-3.64 $\pm$ 3.31	-6.03 $\pm$ 3.73	-1.93 $\pm$ 2.25	-3.43 $\pm$ 2.98	-0.80 $\pm$ 1.42
	110	-4.70 $\pm$ 1.55	-5.34 $\pm$ 0.32	-0.87 $\pm$ 2.63	-3.33 $\pm$ 2.95	-3.20 $\pm$ 3.76	-5.60 $\pm$ 1.27	1.40 $\pm$ 1.39
	220	-3.90 $\pm$ 2.93	-6.40 $\pm$ 1.67	-3.30 $\pm$ 1.36	-6.30 $\pm$ 1.72	-2.47 $\pm$ 4.30	-5.70 $\pm$ 1.69	0.03 $\pm$ 2.25
	440	-5.76 $\pm$ 1.86	-5.47 $\pm$ 0.36	-2.34 $\pm$ 0.35	-5.56 $\pm$ 1.16	-2.50 $\pm$ 0.30	-3.46 $\pm$ 2.30	1.70 $\pm$ 0.78
18 $\beta$ -GA	55	-0.17 $\pm$ 0.15	0.93 $\pm$ 0.26	-0.40 $\pm$ 0.35	0.03 $\pm$ 0.92	3.38 $\pm$ 0.80	-1.48 $\pm$ 4.03	-1.19 $\pm$ 3.72
	110	-1.37 $\pm$ 0.55	1.17 $\pm$ 0.47	1.07 $\pm$ 0.76	-1.93 $\pm$ 0.47	0.48 $\pm$ 0.15	-2.33 $\pm$ 4.50	-2.93 $\pm$ 4.58
	220	-1.43 $\pm$ 0.38	0.40 $\pm$ 1.08	-0.23 $\pm$ 0.23	-0.97 $\pm$ 0.60	0.22 $\pm$ 0.61	-4.95 $\pm$ 4.80	-3.49 $\pm$ 3.61
	440	-1.60 $\pm$ 0.20	-0.13 $\pm$ 0.59	0.77 $\pm$ 0.21	-2.33 $\pm$ 1.19	-0.65 $\pm$ 2.48	-2.25 $\pm$ 5.84	-1.89 $\pm$ 6.60
水飞蓟宾 Silibinin	37.5	-2.56 $\pm$ 1.22	-3.47 $\pm$ 2.77	-1.24 $\pm$ 2.55	-3.80 $\pm$ 1.01	-0.63 $\pm$ 0.55	-4.10 $\pm$ 4.77	-0.37 $\pm$ 1.97
	75	-4.03 $\pm$ 1.31	-5.00 $\pm$ 1.61	-1.54 $\pm$ 2.78	-2.16 $\pm$ 0.85	-4.23 $\pm$ 1.36	-1.93 $\pm$ 3.87	3.93 $\pm$ 4.02
	150	-3.60 $\pm$ 1.42	-2.30 $\pm$ 1.17	-1.47 $\pm$ 0.56	-5.23 $\pm$ 2.55	-2.67 $\pm$ 0.80	-1.23 $\pm$ 3.00	2.87 $\pm$ 2.97
	300	-5.03 $\pm$ 2.33	-7.04 $\pm$ 2.15	-3.44 $\pm$ 1.79	-3.66 $\pm$ 5.13	1.27 $\pm$ 2.66	3.20 $\pm$ 1.39	3.67 $\pm$ 2.80
双环醇	12.5	-0.73 $\pm$ 1.71	-3.84 $\pm$ 0.61	0.70 $\pm$ 0.25	0.20 $\pm$ 0.58	-2.93 $\pm$ 0.60	-4.26 $\pm$ 3.99	1.53 $\pm$ 2.38
Bicyclol	25	-0.93 $\pm$ 0.50	-3.30 $\pm$ 1.39	0.00 $\pm$ 1.50	-0.63 $\pm$ 3.36	-3.37 $\pm$ 2.06	-3.90 $\pm$ 1.92	3.97 $\pm$ 4.20
	50	-0.60 $\pm$ 3.44	-6.14 $\pm$ 2.12	-0.84 $\pm$ 0.67	0.13 $\pm$ 1.24	-1.43 $\pm$ 1.91	2.90 $\pm$ 0.42	1.97 $\pm$ 2.95
	100	-2.46 $\pm$ 0.95	-7.24 $\pm$ 0.65	0.00 $\pm$ 1.67	-0.03 $\pm$ 2.44	0.20 $\pm$ 3.55	2.84 $\pm$ 4.29	3.27 $\pm$ 2.71

注:与 DMSO 组比较, \*\*\*  $P < 0.001$ 。Note: Compared with DMSO group, \*\*\*  $P < 0.001$ .表5 18 $\alpha$ -GA、18 $\beta$ -GA 体外对血清中 ALT 活性的影响 ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )Table 5 Serum ALT activity from serum-18 $\alpha$ -GA, 18 $\beta$ -GA incubation assay ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

ALT Change to control	浓度 Dose (ng/mL)	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h
空白 Control	-	0.00 $\pm$ 0.95	0.00 $\pm$ 0.52	0.00 $\pm$ 0.60	0.00 $\pm$ 0.46	0.00 $\pm$ 2.83	0.00 $\pm$ 0.71	0.00 $\pm$ 1.50
DMSO	-	-2.67 $\pm$ 0.36	-2.38 $\pm$ 0.48	-2.10 $\pm$ 0.44	-2.60 $\pm$ 2.15	-2.60 $\pm$ 0.71	0.74 $\pm$ 0.99	0.50 $\pm$ 1.50
苦参碱 Matrine	50	-2.36 $\pm$ 1.96	-0.47 $\pm$ 0.74	0.17 $\pm$ 0.07	-1.39 $\pm$ 0.95	-1.39 $\pm$ 1.22	1.10 $\pm$ 1.51	0.65 $\pm$ 1.26
18 $\alpha$ -GA	55	-3.47 $\pm$ 1.10	-2.97 $\pm$ 0.29	-2.07 $\pm$ 1.68	-1.30 $\pm$ 2.36	-2.53 $\pm$ 1.15	-1.56 $\pm$ 1.42	-0.03 $\pm$ 0.65
	110	-3.84 $\pm$ 0.35	-1.57 $\pm$ 0.23	-2.30 $\pm$ 0.96	-1.23 $\pm$ 1.69	-4.26 $\pm$ 1.50	-1.66 $\pm$ 1.17	-1.37 $\pm$ 2.77
	220	-4.50 $\pm$ 0.74	-2.47 $\pm$ 0.59	-2.87 $\pm$ 0.47	-2.53 $\pm$ 0.32	-3.10 $\pm$ 0.65	-1.33 $\pm$ 0.70	-0.67 $\pm$ 1.12
	440	-3.97 $\pm$ 0.95	-2.47 $\pm$ 0.81	-2.37 $\pm$ 1.16	-3.87 $\pm$ 0.38	-4.23 $\pm$ 1.45	-1.76 $\pm$ 1.00	0.13 $\pm$ 0.57
18 $\beta$ -GA	55	-1.50 $\pm$ 0.29	-1.28 $\pm$ 1.02	-1.83 $\pm$ 3.51	-1.02 $\pm$ 1.59	3.28 $\pm$ 2.83	0.20 $\pm$ 6.49	-1.70 $\pm$ 9.92
	110	-1.33 $\pm$ 1.73	1.94 $\pm$ 4.62	-3.17 $\pm$ 0.58	-0.39 $\pm$ 1.26	1.56 $\pm$ 1.21	-0.34 $\pm$ 1.03	0.11 $\pm$ 1.45
	220	0.00 $\pm$ 2.08	0.61 $\pm$ 3.02	0.50 $\pm$ 1.00	2.22 $\pm$ 2.58	0.84 $\pm$ 0.59	-1.93 $\pm$ 4.41	-0.40 $\pm$ 2.98
	440	-3.33 $\pm$ 1.00	-1.17 $\pm$ 1.00	-4.17 $\pm$ 1.53	-4.17 $\pm$ 3.06	0.53 $\pm$ 0.55	-0.47 $\pm$ 0.67	0.20 $\pm$ 2.20
水飞蓟宾 Silibinin	37.5	-3.57 $\pm$ 1.01	-1.97 $\pm$ 0.95	-1.80 $\pm$ 1.59	-0.93 $\pm$ 0.84	-1.63 $\pm$ 0.36	0.64 $\pm$ 1.18	1.33 $\pm$ 0.86
	75	-4.17 $\pm$ 0.87	-2.47 $\pm$ 0.21	-2.07 $\pm$ 1.42	-1.43 $\pm$ 1.10	-3.20 $\pm$ 1.07	2.40 $\pm$ 0.29	2.17 $\pm$ 1.53

续表 5 (Continued Tab. 5)

ALT Change to control	浓度 Dose (ng/mL)	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h
	150	-4.50 ± 0.75	-1.13 ± 0.72	-1.73 ± 0.51	-0.87 ± 1.42	-4.23 ± 0.85	2.74 ± 2.93	1.73 ± 1.97
	300	-4.70 ± 1.18	-0.77 ± 2.33	-2.17 ± 1.50	-1.40 ± 1.90	-12.46 ± 5.46 <sup>***</sup>	-8.90 ± 4.48 <sup>***</sup>	-9.47 ± 9.20 <sup>***</sup>
双环醇 Bicyclol	12.5	-2.64 ± 0.12	-1.80 ± 0.26	-1.03 ± 0.15	0.83 ± 0.35	-3.13 ± 0.20	1.97 ± 1.91	2.27 ± 1.10
	25	-3.64 ± 1.59	-1.63 ± 0.76	-1.23 ± 1.57	-0.47 ± 1.56	-2.46 ± 1.29	2.64 ± 0.80	0.23 ± 7.87
	50	-2.77 ± 1.91	-3.53 ± 0.32	-1.57 ± 1.36	0.23 ± 2.06	-2.00 ± 0.15	1.90 ± 0.86	2.43 ± 1.27
	100	-3.10 ± 0.06	-3.37 ± 0.55	-0.33 ± 0.76	1.23 ± 1.50	-0.90 ± 1.99	4.54 ± 1.46	0.63 ± 4.19

注:与 DMSO 组比较,\*\*\* $P < 0.001$ 。

Note: Compared with DMSO group, \*\*\* $P < 0.001$ .

### 3.4 甘草酸二铵对肝损伤小鼠肝细胞凋亡的影响

如图 2 所示,模型组小鼠肝组织中 BAX/BCL-2 显著升高,同时 cleaved Caspase-3、cleaved PARP 的表达也显著上调( $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ )。而 58.5

mg/kg 甘草酸二铵能降低肝组织中 cleaved caspase-3、cleaved PARP、BAX/BCL-2 表达水平( $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ )。因此推测甘草酸二铵能够改善 Con A 致小鼠肝损伤组织的凋亡。

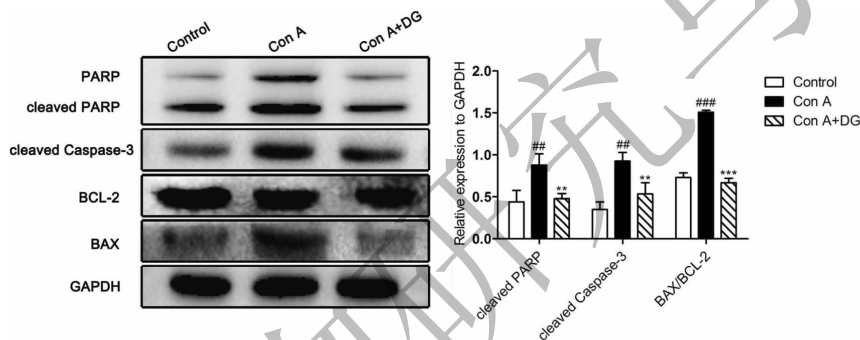


图 2 甘草酸二铵对 Con A 所致肝损伤小鼠组织中凋亡蛋白的影响

Fig. 2 Effects of DG on hepatic apoptosis in mice with Con A-induced hepatic injury

注:与空白组比较,## $P < 0.01$ ;### $P < 0.001$ ;与模型组比较,\* $P < 0.01$ ;\*\*\* $P < 0.001$ 。

Note: Compared with control group, # $P < 0.05$ ; ## $P < 0.01$ ; ### $P < 0.001$ ; Compared with Model group, \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

### 3.5 甘草酸二铵对肝损伤小鼠炎症反应的影响

如图 3 所示,模型组小鼠肝组织中 Caspase-1、COX-2、TGF- $\beta$ 1、IL-6、IL-10、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  的表达升高,COX-1 表达下降( $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ )。而 58.5 mg/kg 甘草酸二铵能够降低 TGF- $\beta$ 1、caspase-1 以及 COX-2 表达水平,上调 COX-1 的表达,同时降低 IL-6、IL-10、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  的表达水平( $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ )。因此推测甘草酸二铵能够保护小鼠免受 Con A 诱导的肝脏组织炎症反应。

## 4 讨论

Con A 经尾静脉单次注射,能够引起 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IFN- $\gamma$  和 IL-1 $\beta$  等多种细胞因子的分泌,导致肝脏组织炎性细胞浸润,诱发炎症和凋亡,进而导致急性肝损伤<sup>[5,6]</sup>。该模型与人类肝炎的发病机理及病理

学特征极为相似,能够很好地模拟临床自身免疫性肝炎(AIH)、急性病毒性肝炎和药物中毒引起的肝炎等,因而在保肝药研究中被广泛应用<sup>[7]</sup>。水飞蓟素、双环醇分别为天然和人工合成的常见保肝药,保肝机制各不相同,在保肝药的研究中都常被用作阳性对照药<sup>[8,9]</sup>。水飞蓟素可以通过抗脂质过氧化反应维持细胞膜的流动性、从而改善肝功能;还可以中断肝肠循环,对抗毒物所致的肝损伤<sup>[10,11]</sup>。双环醇能够通过清除自由基、抑制氧化应激、保护肝细胞核 DNA 免受损伤、减轻线粒体损伤,从而发挥降低血清转氨酶和抗肝损伤、抗肝纤维化以及抗肝炎病毒的活性<sup>[12]</sup>。因此,本研究并以这两种保肝药作为对照药,通过复制 Con A 肝损伤模型,检测肝功能、肝脏病理组织和分子生物学指标来综合评判甘草酸二铵的肝保护作用,并初步探讨其作用机制。

AST、ALT 升高是判断急性肝损伤严重程度的重

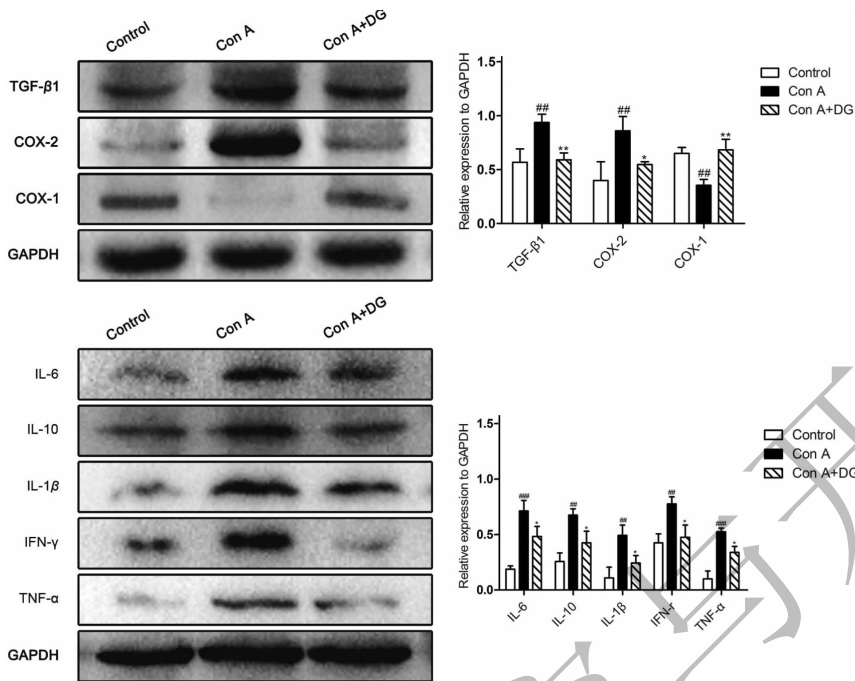


图3 甘草酸二铵对 Con A 所致肝损伤小鼠组织中炎症因子水平的影响

Fig.3 DG inhibited inflammation in mice with Con A-induced hepatic injury

注:与空白组比较,### $P < 0.01$ ;#### $P < 0.001$ ;与模型组比较,\* $P < 0.05$ ;\*\* $P < 0.01$ 。

Note:Compared with control group,### $P < 0.01$ ;#### $P < 0.001$ ;Compared with Model group,\* $P < 0.05$ ;\*\* $P < 0.01$ 。

要指标<sup>[5]</sup>。本研究表明,甘草酸二铵在保护小鼠免受 Con A 所致肝脏病理损伤的同时,可以降低小鼠血清中 AST 和 ALT 水平。人体药代动力学研究显示,甘草酸二铵肠溶胶囊口服摄入后,在体内被代谢成 18 $\alpha$ -GA 和 18 $\beta$ -GA,最高血药浓度为 95.57  $\pm$  43.06 ng/mL<sup>[13]</sup>。为验证甘草酸二铵是否会直接降解血清中的 AST 和 ALT,本文以苦参碱为阳性对照药<sup>[4]</sup>,进行了药物-转氨酶异常血清共孵育实验。结果表明,18 $\alpha$ -GA 和 18 $\beta$ -GA 均不能直接降低血清中 AST、ALT 水平。因此,我们推测甘草酸二铵是通过保护肝细胞,减少 AST、ALT 外溢来发挥降酶作用的。

BAX 与 BCL-2 是一对互相拮抗的凋亡相关蛋白,BAX/BCL-2 的比值决定凋亡的启动,进而激活细胞凋亡下游的 Caspase-3,而 PARP 剪切是 Caspase-3 激活的指标<sup>[14]</sup>。本研究结果显示,甘草酸二铵下调肝损伤小鼠肝脏中 BAX/BCL-2 的比值,抑制小鼠肝组织中凋亡蛋白 PARP、cleaved Caspase-3 的表达,说明甘草酸二铵具有抑制肝细胞凋亡的作用。在 Con A 诱导的肝损伤中,Caspase-1 可以调节 pro-IL-1 $\beta$  和 pro-IL-18 的活化,进而诱导 T 淋巴细胞增殖<sup>[15]</sup>。同时也伴随 TGF- $\beta$ 1 表达失衡和肝细

胞内 COX-2 表达上调后前列腺素(PGs)的生成<sup>[16,17]</sup>。本研究结果表明,甘草酸二铵能抑制 Con A 所致小鼠肝组织中 Caspase-1、TGF- $\beta$ 1、COX-2、IL-6、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  等炎症因子的上调,和 COX-1 的下调,显示其作用机理与抑制抗炎和细胞凋亡有关。

综上所述,甘草酸二铵肠溶胶囊能够改善 Con A 致小鼠肝损伤,并通过保护肝细胞来降低血清 AST、ALT 水平,其降酶保肝的作用可能与抑制小鼠肝脏组织细胞凋亡以及炎症细胞因子的水平相关。

参考文献

- 1 Zou Y, Xiong JB, Ma K, et al. Rac2 deficiency attenuates CCl4-induced liver injury through suppressing inflammation and oxidative stress [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 94: 140-149.
- 2 Zhu X, Chen C, Ye D, et al. Diammonium glycyrrhizinate up-regulates PGC-1 $\alpha$  and protects against A $\beta$ 1-42-induced neurotoxicity[J]. *PLoS One*, 2012, 7: e35823.
- 3 Li JY, Cao HY, Liu P, et al. Glycyrrhizic acid in the treatment of liver diseases: literature review[J]. *Biomed Res Int*, 2014; 872139.
- 4 Nie HM(聂红明), Jin SG(金树根), Li YD(李运东), et al. Effects of sophora flavescens preparations on *in vitro* ser-



- um cholinesterase and transaminase activities [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med* (上海中医药杂志), 2009, 43 (4): 67-69.
- 5 Heymann F, Hamesch K, Weiskirchen R, *et al.* The concanavalin A model of acute hepatitis in mice [J]. *Lab Anim*, 2015, 49(S1): 12-20.
  - 6 Zimmermann HW, Trautwein C, Tacke F. Functional role of monocytes and macrophages for the inflammatory response in acute liver injury [J]. *Front Physiol*, 2012, 3: 56.
  - 7 Wang HX, Liu M, Weng SY, *et al.* Immune mechanisms of concanavalin a model of autoimmune hepatitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18: 119-125.
  - 8 Huang SM (黄思茂), Gao Y (高雅), Cao HK (曹后康), *et al.* Protective effects and functional mechanism of clerodendrum philippinum Schauer var. simplex mloadenke total flavonoids on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in mice [J]. *Natl Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2018, 30: 212-217.
  - 9 Sang XX (桑秀秀), Wang RL (王睿林), Han YZ (韩延忠), *et al.* Oxymatrine protects against liver injury induced by con A in mice through suppressing host immune response [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2017, 23: 125-130.
  - 10 Luangchosiri C, Thakkinstian A, Chitphuk S, *et al.* A double-blinded randomized controlled trial of silymarin for the prevention of antituberculosis drug-induced liver injury [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 15: 334.
  - 11 Lovelace ES, Wagoner J, MacDonald J, *et al.* Silymarin suppresses cellular inflammation by inducing reparative stress signaling [J]. *J Nat Prod*, 2015, 78: 1990-2000.
  - 12 Yu HY, Wang BL, Zhao J, *et al.* Protective effect of bicyclol on tetracycline-induced fatty liver in mice [J]. *Toxicology*, 2009, 261 (3): 112-118.
  - 13 Zhao WJ (赵文静), Wang BJ (王本杰), Wei GM (魏春敏), *et al.* HPLC-MS determination and pharmacokinetic study of glycyrrhetic acid in human plasma [J]. *J Shandong Univ: Health Sci* (山东大学学报: 医学版), 2008, 11: 1110-1112.
  - 14 Zhou XN (周晓楠), Song XL (宋雪兰), Li Y (李艳), *et al.* The protective effects of 4-hydroxybenzaldehyde on cerebral ischemia reperfusion injury [J]. *Chi Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2017, 33: 1729-1735.
  - 15 Ahmed M, Shaban Z, Yamaji D, *et al.* Induction of proinflammatory cytokines and caspase-1 by leptin in monocyte/macrophages from holstein cows [J]. *J Vet Med Sci*, 2007, 69: 509-514.
  - 16 Wang L, Tu L, Zhang J, *et al.* Stellate cell activation and imbalanced expression of TGF- $\beta$ 1/TGF- $\beta$ 3 in acute autoimmune liver lesions induced by con A in mice [J]. *Biomed Res Int*, 2017: 2540540.
  - 17 Yin H, Cheng L, Langenbach R, *et al.* Prostaglandin I(2) and E(2) mediate the protective effects of cyclooxygenase-2 in a mouse model of immune-mediated liver injury [J]. *Hepatology*, 2007, 45: 159-169.
- (上接第 2132 页)
- 17 Beatty GL, O'Dwyer PJ, Clark J, *et al.* Phase I study of the safety, pharmacokinetics (PK), and pharmacodynamics (PD) of the oral inhibitor of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO1) INCB024360 in patients (pts) with advanced malignancies [J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31: 3025.
  - 18 Levitt NC, Eskens FA, O'Byrne KJ, *et al.* Phase I and pharmacological study of the oral matrix metalloproteinase inhibitor, MMI270 (CGS27023A), in patients with advanced solid cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7: 1912-1922.
  - 19 Yang EB, Zhao YN, Zhang K, *et al.* Daphnetin, one of coumarin derivatives, is a protein kinase inhibitor [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 260: 682-685.