

文章编号: 1000-5862(2018)02-0166-05

不同配比 18α -与 18β -甘草酸对酒精性肝损伤大鼠肝功能的影响

孙晓可 杨 飒 孟祥波 周程艳 赵燕燕*

(河北大学药学院 河北省药物质量分析控制重点实验室 河北 保定 071002)

摘要: 探讨不同配比 18α -与 18β -甘草酸(Gly)对大鼠酒精性肝损伤的影响。健康 SD 大鼠, 雄性, 随机分组, 每组 10 只, 即正常对照组(生理盐水)、模型对照组(生理盐水)、阳性药物对照组(水飞蓟宾)、7 个给药组(18α -Gly 与 18β -Gly 不同配比组, 配比为 10:0, 8:2, 6:4, 5:5, 4:6, 2:8, 0:10)。给药 4 周后, 检测不同组对血清酶、血清蛋白、总胆红素、胆汁酸及血糖调控的影响。结果显示: 18α -Gly 与 18β -Gly 各个配比均能降低血清酶 ALT、AST、 γ -GT、LDH 活性, 随着 18β -Gly 比例增加作用增强, 当 18α -Gly 与 18β -Gly 配比小于 4:6 时, 对缓解酒精性肝损伤和心肌损伤效果更佳; 当配比大于 8:2 时, 对酒精性肝损伤大鼠血清蛋白水平的改善作用更加显著。当配比小于 4:6 时, 明显降低 TBIL 和 TBA 水平, 显著改善酒精性肝损伤大鼠对血糖的调控能力。研究结果为新药研发和临床治疗的制剂选择提供依据。

关键词: 酒精性肝损伤; 肝功能; 不同配比; 18α -甘草酸和 18β -甘草酸

中图分类号: R 975.5 **文献标志码:** A **DOI:** 10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2018.02.09

0 引言

酒精性肝损伤(Alcoholic Liver Disease, ALD)是一个非常复杂的代谢性疾病, 包括脂肪肝、肝纤维化、酒精性肝炎和肝硬化等, 而酒精性肝损伤中有超过 40% 的患者发展为严重的肝硬化。流行病学研究表明, 饮酒量每增加 1 L 病人患肝硬化的概率男性增加 14%, 女性增加 8%^[1]。ALD 的发生发展涉及到多种因素, 如饮酒量、持续时间、酒的种类、饮酒方式、性别、种族, 还有一些相关风险因素如肥胖、基因等^[2]。目前主要使用类固醇治疗 ALD, 因此基于新的作用机制研发的相关药物用于治疗 ALD 具有重要意义。甘草, 豆科属多年生草本, 甘草药材原植物主要是光果甘草(*Glycyrrhiza glabra* L.)、胀果甘草(*Glycyrrhiza inflate* Batal)、甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) 3 种^[3-5]。甘草酸是甘草的有效成分, 适量的甘草酸具有抗炎作用, 在一定条件下能特异性结合到肝脏^[6]。甘草酸有 2 种差向异构体, 即 18α -甘草酸(18α -Gly)和 18β -甘草酸(18β -Gly)。有关研究表明, 18α -Gly 和 18β -Gly 在药理作用、不良反应及临床疗

效上均存在差异^[7], 18β -Gly 介导免疫反应的调节, 能有效减轻肝损伤引起的转氨酶的升高和肝毒性^[8-9]。近年来, 18α -Gly 和 18β -Gly 不同比例配比对药效方面的影响差异已引起人们的广泛重视^[10-14], 但对酒精性肝损伤大鼠肝功能指标和血糖的影响鲜见研究报道。本文通过不同配比 18α -Gly 和 18β -Gly 对酒精性肝损伤大鼠肝功能指标血清酶、血清蛋白、总胆红素、胆汁酸, 以及血糖调控的影响进行研究, 筛选出最佳比例, 为新药研发和临床合理用药选择提供依据。

1 材料

1.1 实验动物

雄性大鼠(Sprague-Dawley, 8 周龄), SPF 级, 100 只, 购于北京斯贝福生物技术有限公司, 许可证号: SCXK(京)2016-0002。

1.2 主要仪器

7600S 全自动生化检测仪(日立建机株式会社); Synergy HT 型全自动酶标仪(Bio-TEK 美国伯

收稿日期: 2017-07-05

基金项目: 河北省自然科学基金(H2013201203)和河北大学医学学科专项资金(2014A1003)资助项目。

通信作者: 赵燕燕(1960-), 女, 天津市人, 教授, 博士, 主要从事药学, 以及将现代分离技术用于临床、药学、食品、环境等方面的研究。E-mail: zhaoyany606@163.com

腾仪器有限公司);高速台式离心机(上海知信实验仪器技术有限公司);EZ III血糖仪(艾康生物技术(杭州)有限公司)。

1.3 药品和试剂

异甘草酸镁注射液(18 α :18 β =500:1^[15]),正大天晴药业集团股份有限公司,批号160125104,规格50 mg·支⁻¹;注射用复方甘草酸单铵S(18 α :18 β =1:109^[15]),山西普德药业股份有限公司,批号20151201,规格40 mg·支⁻¹;水飞蓟宾胶囊(纯度>99%,天津天士力圣特制药有限公司,批号650701013,规格35 mg·粒⁻¹);谷丙转氨酶检测试剂盒、谷草转氨酶检测试剂盒、碱性磷酸酶检测试剂盒、 γ -谷氨酰转氨酶检测试剂盒、胆碱酯酶检测试剂盒、乳酸脱氢酶检测试剂盒、总蛋白检测试剂盒、白蛋白检测试剂盒、球蛋白检测试剂盒、总胆红素检测试剂盒、总胆汁酸检测试剂盒和磷酸肌酸激酶试剂盒均来源于南京建成生物工程研究所,批号20161018;无水乙醇(天津市风船化学试剂有限公司,批号20160301);生理盐水(石家庄四药有限公司,批号1604060503)。

2 方法

2.1 动物模型制备

SD雄性大鼠,适应性喂养1周后随机分为10组,每组10只,即正常对照组(Normal)、模型对照组(Model)、水飞蓟宾阳性药物对照组(Silymarin)、7个18 α -Gly与18 β -Gly不同配比药物组(配比为10:0, 8:2, 6:4, 5:5, 4:6, 2:8, 0:10)。水飞蓟宾溶液、18 α -Gly与18 β -Gly不同配比溶液均用0.9%氯化钠注射液配制。除正常对照组(0.9%氯化钠注射液,10 mL·kg⁻¹)外,各组灌胃(ig)40%乙醇,10 mL·kg⁻¹,制备大鼠酒精性肝损伤模型。药物组分别灌胃18 α -Gly和18 β -Gly不同配比溶液(10.83 mg·kg⁻¹),阳性药物对照组给予水飞蓟宾溶液(22.75 mg·kg⁻¹),正常对照组和模型对照组每100 g给予0.9%氯化钠注射液0.3 mL,连续灌胃4周。末次给药后禁食不禁水14 h,称质量,用10%水合氯醛3 mL·kg⁻¹麻醉,腹主动脉取血,血清在室温静置2 h,4 000 rpm离心10 min。

2.2 血清生化指标测定

给药4周时,取SD大鼠血清,按照试剂盒说明书中的规范操作步骤检测血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、 γ -谷氨酰转氨酶(γ -GT)、碱性磷酸酶(ALP)、乳酸脱氢酶(LDH)、胆碱

酯酶(CHE)、磷酸肌酸激酶(CK)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、球蛋白(GLO)、总胆红素(TBIL)、总胆汁酸(TBA)指标水平。

2.3 口服葡萄糖耐量试验(OGTT)

分别在大鼠给药2周和4周时,禁食不禁水12 h,尾静脉取血测定基础血糖。灌胃50%葡萄糖水(2.0 g·kg⁻¹),分别于灌胃给药15,30,60,90,120 min后取血,使用血糖仪检测血液中葡萄糖浓度,并采用梯形法计算“血药浓度-时间”曲线下面积(AUC)。

2.4 统计学处理

应用SPSS(19.0版)统计学软件对数据进行处理,并使用单因素方差(one-way ANOVA)分析结果。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $p < 0.05$ 具有统计学意义。

3 结果

3.1 不同配比18 α -Gly与18 β -Gly对酒精性肝损伤大鼠血清酶的影响

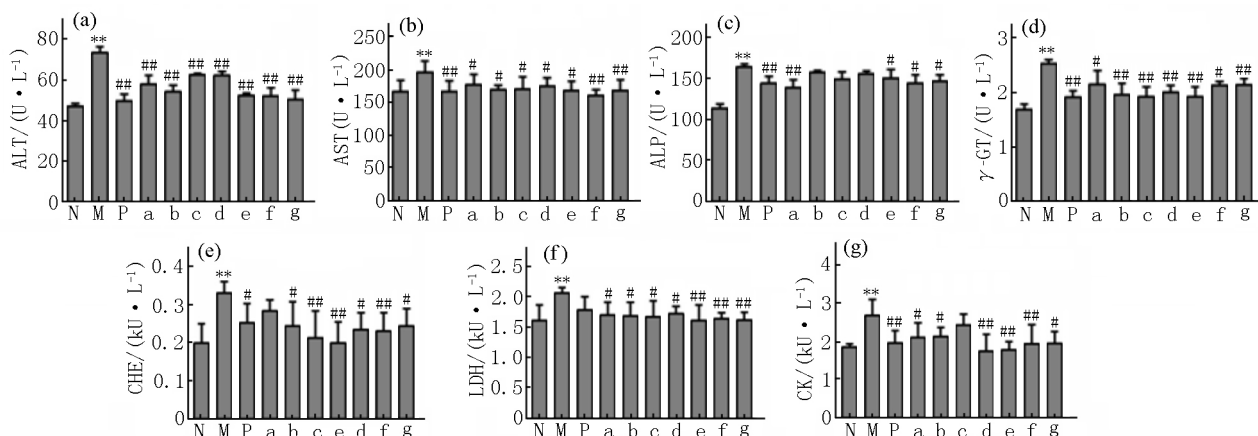
实验考察不同配比18 α -Gly与18 β -Gly对酒精性肝损伤大鼠血清酶的影响(见图1)。酒精性肝损伤导致肝功能降低,以及心肌细胞等受损,血清酶的活性会发生一系列变化。

肝细胞损伤,ALT、AST、ALP、 γ -GT和CHE活性升高。与正常对照组比较,酒精模型组大鼠血清中ALT、AST、ALP、 γ -GT、CHE的活性极显著升高($p < 0.01$)。与酒精模型组比较,当18 α -Gly与18 β -Gly配比为10:0时,ALT和ALP活性极显著下降($p < 0.01$),AST和 γ -GT活性显著下降($p < 0.05$);当配比为8:2时,ALT和 γ -GT活性极显著下降($p < 0.01$),AST和CHE明显下降($p < 0.05$);当配比为6:4和5:5时,ALT、 γ -GT和CHE活性极显著下降($p < 0.01$),AST活性明显下降($p < 0.05$);当配比为4:6时,ALT和 γ -GT活性极显著降低($p < 0.01$),AST、ALP和CHE活性明显降低($p < 0.05$);当配比为2:8时,ALT、AST和CHE活性极显著降低($p < 0.01$),ALP和 γ -GT活性明显降低($p < 0.05$);当配比为0:10时,ALT、AST和 γ -GT活性极显著降低($p < 0.01$),ALP和CHE明显降低($p < 0.05$),见图1(a~e)。

酒精导致肝细胞和心肌细胞等损伤,LDH活性升高。与正常对照组比较,酒精模型组大鼠血清中LDH明显升高($p < 0.01$)。与酒精模型组比较,当18 α -Gly与18 β -Gly配比为10:0、8:2、6:4和5:5时,LDH活性明显降低(均 $p < 0.05$);当配比为4:6、2:8和0:10时,LDH活性极显著降低($p < 0.01$)。见图1(f)。

酒精造成 CK 活性升高,引起心肌损伤.与正常对照组比较,酒精模型组 CK 明显升高($p < 0.01$).与酒精模型组比较,当 18α -Gly 与 18β -Gly 配比为 10:0 和 8:2 时,CK 明显降低($p < 0.05$);当配比为 5:5、4:6、2:8 和 0:10 时,CK 极显著下降($p < 0.01$),见图 1(g).结果表明, 18α -Gly 与 18β -Gly 不同配比对

血清酶活性影响不同.各配比均能降低或显著降低 ALT、AST、 γ -GT、LDH 活性,缓解酒精性肝损伤和心肌损伤,随着 18β -Gly 比例增加作用增强.当 18α -Gly 与 18β -Gly 配比为 4:6、2:8、0:10 时缓解酒精性肝损伤效果更佳.当 18α -Gly 与 18β -Gly 配比小于 5:5 时,对酒精性心肌损伤缓解能力更强.



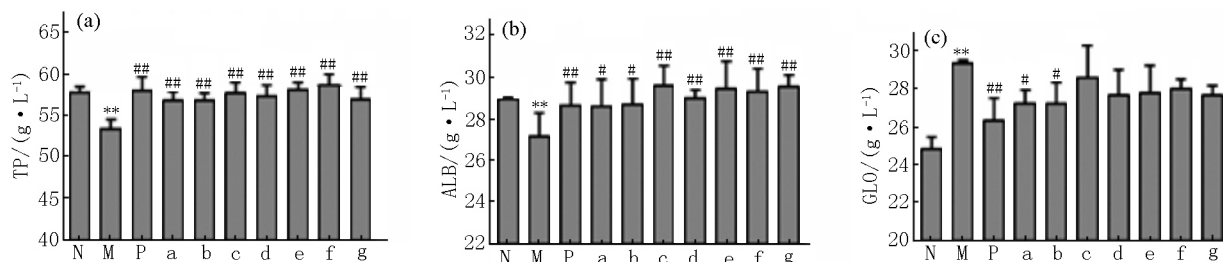
注: N: Normal; M: Model; P: Positive; a ~ g 分别代表 18α -Gly 与 18β -Gly 配比为 10:0 8:2 6:4 5:5 4:6 2:8 0:10. 下图同. 与正常对照组相比, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; 与酒精模型组相比 # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$.

图 1 不同配比 18α -Gly 与 18β -Gly 对酒精性肝损伤大鼠血清酶的影响($n = 8 \bar{x} + s$)

3.2 不同配比 18α -Gly 与 18β -Gly 对酒精性肝损伤大鼠血清蛋白的影响

实验考察不同配比 18α -Gly 与 18β -Gly 对酒精性肝损伤大鼠血清蛋白的影响(见图 2).血清白蛋白主要由肝脏合成,当酒精性肝损伤时,肝脏合成白蛋白能力下降,免疫系统合成大分子球蛋白能力升高.与正常对照组比较,酒精模型组 TP 和 ALB 含量

明显下降($p < 0.01$),GLO 含量显著升高($p < 0.01$).与酒精模型组比较,当 18α -Gly 与 18β -Gly 配比大于 8:2 时,明显升高 TP($p < 0.01$)和 ALB($p < 0.05$),降低 GLO 含量($p < 0.05$).当配比小于 6:4 时,显著升高 TP 和 ALB($p < 0.01$).结果表明,随着 18α -Gly 含量增加,对酒精性肝损伤大鼠血清蛋白水平的改善作用更加显著.



与正常对照组相比, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; 与酒精模型组相比 # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$.

图 2 不同配比 18α -Gly 与 18β -Gly 对酒精性肝损伤大鼠血清蛋白的影响($n = 8 \bar{x} + s$)

3.3 不同配比 18α -Gly 与 18β -Gly 对酒精性肝损伤大鼠血清总胆红素及总胆汁酸的影响

实验考察不同配比 18α -Gly 与 18β -Gly 对酒精性肝损伤大鼠血清中总胆红素和胆汁酸的影响(见图 3).酒精性肝损伤时肝细胞受损,使胆红素和胆汁酸的代谢和排泄功能发生障碍,血清浓度升高.

与正常对照组比较,酒精模型组大鼠血清中 TBIL 和 TBA 明显升高($p < 0.01$).与酒精模型组比较,当 18α -Gly 与 18β -Gly 配比为 8:2 时,显著降低 TBA($p < 0.01$);当配比小于 4:6 时,明显降低 TBIL($p < 0.05$)和 TBA($p < 0.01$, $p < 0.05$).随着 18β -

Gly 比例增加,能够显著改善酒精性肝损伤大鼠血清总胆红素和总胆汁酸水平.

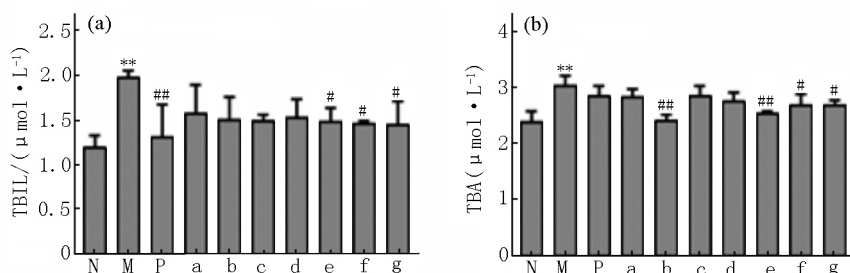
3.4 不同配比 18α -Gly 与 18β -Gly 对酒精性肝损伤大鼠糖代谢的影响

实验考察不同配比 18α -Gly 与 18β -Gly 对酒精性肝损伤大鼠糖代谢的影响.酒精性肝损伤大鼠肝细胞受损,使肝糖原储存与动员及糖异生功能发生障碍.

给药 2 周时,与正常对照组比较,酒精模型组血糖浓度和“血糖浓度-时间”曲线下面积(AUC)无显著性差异($p > 0.05$),见图 4(a).给药 4 周时,与正常对照组比较,酒精模型组血糖浓度无显著性差异

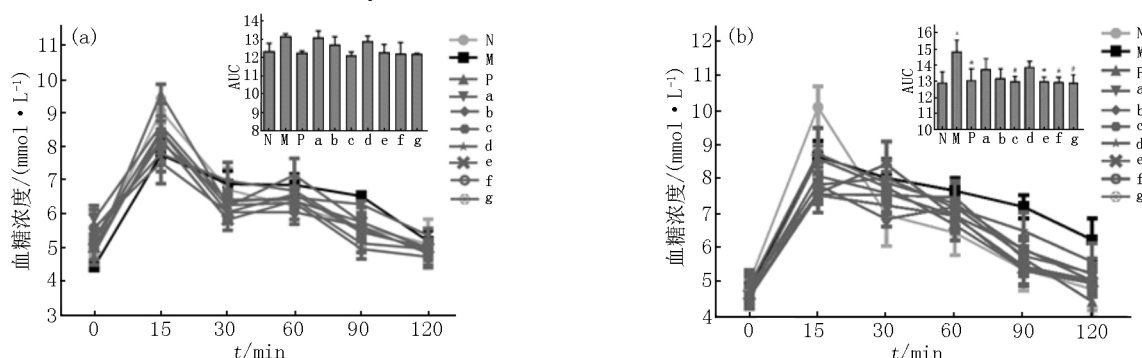
($p > 0.05$) ,AUC 明显升高 ($p < 0.05$) ;与酒精模型组相比,当18 α -Gly与18 β -Gly配比为6:4、4:6、2:8和0:10时,能显著降低AUC($p < 0.05$),使血糖总含量降低,见图4(b)。结果表明:随着18 β -Gly增

加,能显著降低AUC($p < 0.05$),使血糖总含量降低。当配比小于4:6时,可以明显改善酒精性肝损伤大鼠对血糖的调控能力。



注:与正常对照组相比,* $p < 0.05$,** $p < 0.01$;与酒精模型组相比,# $p < 0.05$,## $p < 0.01$ 。

图3 不同配比18 α -Gly与18 β -Gly对酒精性肝损伤大鼠血清总胆红素和总胆汁酸的影响($n = 8$, $\bar{x} + s$)



与正常对照组相比,* $p < 0.05$,** $p < 0.01$;与酒精模型组相比,# $p < 0.05$,## $p < 0.01$ 。

图4 不同配比18 α -Gly与18 β -Gly对2周(a)和4周(b)酒精性肝损伤大鼠糖耐量试验的影响($n = 8$, $\bar{x} + s$)

4 讨论

长期大量饮酒导致酒精性肝损伤,使肝功能降低,出现多种肝功能指标异常,血清酶(AST、ALT、ALP、 γ -GT、CHE、LDH、CK)、血清蛋白(TP、ALB、GLO)、血清胆红素(TBIL)和胆汁酸(TBA)是反映肝功能,以及判断肝细胞有无受损、受损严重程度及预后情况的重要指标。肝细胞受损,血清酶活性增强,CHE活性降低,但当肝细胞脂肪变性时,能够诱导CHE活性升高^[16]。实验结果显示,酒精性肝损伤模型使CHE活性增高,说明长期大量饮酒能够导致肝细胞脂肪变性,使LDH、CK活性升高,说明长期大量饮酒能够导致心肌细胞的损伤。血清ALB主要由肝脏合成,酒精性肝损伤使肝脏合成白蛋白能力下降,TP含量降低,免疫系统合成GLO能力升高。肝细胞参与胆红素和胆汁酸的代谢与排泄,肝细胞受损时,胆红素代谢减少,胆汁酸合成和排泄受阻,胆红素随胆汁排泄减少,返流入血液含量升高。肝脏是血糖代谢的重要器官,研究表明,脂联素能够抑制糖异生并促进葡萄糖的摄取,降低血糖浓度^[17-19]。酒精能够降低脂联素的含量,同时,肝脏损伤使肝糖原储存与动员及糖异生功能发生障碍,大量饮酒能

够导致血糖浓度升高。

本实验研究了不同配比18 α -Gly与18 β -Gly对酒精性肝损伤大鼠肝功能的影响。结果表明,18 α -Gly与18 β -Gly配比不同对肝功能的影响不同。18 α -Gly与18 β -Gly各个配比均能降低血清酶ALT、AST、 γ -GT、LDH活性,随着18 β -Gly比例增加作用增强,当配比小于4:6时,对缓解酒精性肝损伤和心肌损伤效果更佳;各个配比均能升高血清蛋白水平,但只有当配比大于8:2时,才能够降低GLO含量,对酒精性肝损伤大鼠血清蛋白水平的改善作用更加显著;当配比小于4:6时,明显降低TBIL和TBA水平,显著改善酒精性肝损伤大鼠对血糖的调控能力。本实验针对相关指标的检测结果,以判断长期大量饮酒对肝功能损伤程度或肝病种类,通过比较分析18 α -Gly与18 β -Gly的不同配比对相关指标的影响,为新药研发提供依据;同时,结合课题组前期对上市甘草酸制剂中18 α -Gly与18 β -Gly的含量比例分析^[15],为临床治疗的制剂选择提供依据。

5 参考文献

- [1] Louvet A, Mathurin P. Alcoholic liver disease: mechanisms of injury and targeted treatment [J]. Nat Rev Gas-

- tro Hepat 2015 ,12(4) : 231-242.
- [2] O'shea R S ,Dasarathy S ,McCullough A J. Alcoholic liver disease [J]. Hepatology 2010 51(1) : 307-328.
- [3] Hayashi H ,Sudo H. Economic importance of licorice [J]. Plant Biotechnol-Nar 2009 26(1) : 101-104.
- [4] Ming L J ,Yin A. Therapeutic effects of glycyrrhizic acid [J]. Nat Prod Commun 2013 8(3) : 415-418.
- [5] 张丽平 梁玉玲 许恒飞. 胀果甘草细胞的悬浮培养 [J]. 河北大学学报: 自然科学版 2008 28(6) : 659-663.
- [6] Negishi M ,Irie A ,Nagata N ,et al. Specific binding of glycyrrhetic acid to the rat liver membrane [J]. Biochim Biophys Acta 1991 ,1066(1) : 77-82.
- [7] Li Jianyuan ,Cao Hongyan ,Liu Ping ,et al. Glycyrrhizic acid in the treatment of liver diseases: Literature review [J]. Biomed Res Int 2014 2014(8) : 872139.
- [8] Guo Xiaoling ,Liang Bo ,Wang Xuwei ,et al. Glycyrrhizic acid attenuates CCL₄-induced hepatocyte apoptosis in rats via a p53-mediated pathway [J]. World J Gastroenterol , 2013 ,19(24) : 3781-3791.
- [9] Jeong H G ,You H J ,Park S J ,et al. Hepatoprotective effects of 18 β -glycyrrhetic acid on carbon tetrachloride-induced liver injury: inhibition of cytochrome p450 2E1 expression [J]. Pharmacol Res 2002 46(3) : 221-227.
- [10] Ukil A ,Biswas A ,Das T ,et al. 18 β -Glycyrrhetic acid triggers curative Th1 response and nitric oxide up-regulation in experimental visceral leishmaniasis associated with the activation of NF- κ B [J]. Journal of Immunology , 2005 ,175(2) : 1161-1169.
- [11] Wu Xudong ,Zhang Luyong ,Gurley E ,et al. Prevention of free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity by 18 β -glycyrrhetic acid through lysosomal and mitochondrial pathways [J]. Hepatology 2008 47(6) : 1905-1915.
- [12] Xiao Yichuan ,Xu Jingwei ,Mao Chaoming ,et al. 18 β -glycyrrhetic acid ameliorated propionibacterium acnes-induced acute liver injury through inhibition of MIP-1 α [J]. Journal of Biological Chemistry 2009 285(2) : 1128-1137.
- [13] Zeng Chunxiang ,Yang Qing ,Hu Qin. A comparison of the distribution of two glycyrrhizic acid epimers in rat tissues [J]. European Journal of Drug Metabolism & Pharmacokinetics 2006 31(4) : 253-258.
- [14] Zou Qiaogen ,Wei Ping ,Li Jing ,et al. Simultaneous determination of 18 α - and 18 β -glycyrrhetic acid in human plasma by LC-ESI-MS and its application to pharmacokinetics [J]. Biomedical Chromatography Bmc 2009 23(1) : 54-62.
- [15] 赵燕燕 石敏健 刘丽艳 等. 4 代甘草酸制剂主成分异构体及有关物质含量差异分析与变化趋势 [J]. 药物分析杂志 2014 34(2) : 247-254.
- [16] 杨文东 纪永利 赵登贤. 脂肪肝患者血清胆碱酯酶水平观察 [J]. 检验医学 2000 ,15(1) : 33.
- [17] Ding Wenxiao ,Zhang Qiang ,Dong Yanbin ,et al. Adiponectin protects the rats liver against chronic intermittent hypoxia induced injury through AMP-activated protein kinase pathway [J]. Scientific Reports 2016 6: 34151-34162.
- [18] Rogers C Q ,Ajmo J M ,You M. Adiponectin and alcoholic fatty liver disease [J]. Jumb Life 2008 60(12) : 790-797.
- [19] Yamauchi T ,Kamon J ,Minokoshi Y ,et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase [J]. Nat Med , 2002 8(11) : 1288-1295.

The Effect of Different Proportion of 18 α - 18 β - Glycyrrhizic Acid on the Liver Function in Alcoholic Liver Disease Rat

SUN Xiaoke ,YANG Sa ,MENG Xiangbo ,ZHOU Chengyan ,ZHAO Yanyan *

(College of Pharmaceutical Science ,Key Laboratory of Pharmaceutical Quality Control of Hebei Province ,
Hebei University ,Baoding Hebei 071002 ,China)

Abstract: The objective is that investigating protective effects of different proportion of 18 α - and 18 β - glycyrrhizic acid(Gly) on alcoholic liver injury in rats. Healthy male rats are randomly divided into equally ten groups ,respectively normal control group(saline) ,model group(saline) ,positive drug control group(silymarin) ,7 given drug groups(different ratios of 18 α -Gly and 18 β -Gly group and ratios are 10:0 8:2 6:4 5:5 4:6 2:8 0:10) . At the fourth week ,blood are collected to determine serum ferment and proteins ,total bilirubin and acid bile. Blood glucose is measured. The results show that different proportions of 18 α - and 18 β -glycyrrhizic acid all effectively reduced ALT ,AST , γ -GT and LDH activity. The alcoholic liver injury and myocardial injury can be better improved when the ratio is less than 4:6. And the serum protein level in alcoholis liver injury rat is improved when the ratio is greater than 8:2. The level of TBIL and TBA. And is attenuated when the ratio is less than 4:6. And the proportion is less than 4:6 that obviously improves the ability of regulating the blood glucose of rats with alcoholic liver injury. It can be applied to selection of new drug research and clinical treatment with a basic experiment data.

Key words: alcoholic liver disease; liver function; different proportion; 18 α -glycyrrhizic acid and 18 β -glycyrrhizic acid

(责任编辑: 刘显亮)