

18 α , 18 β -甘草酸对小鼠急性肝损伤的保护作用 及其联合用药配伍比例探讨

张慧, 裴志东*, 陈莹, 康廷国*
(辽宁中医药大学, 辽宁大连 116600)

[摘要] **目的:**对比研究18 α -甘草酸, 18 β -甘草酸及二者联合用药对小鼠急性肝损伤的保护作用, 并筛选二者联合用药的最佳配伍比例。**方法:**小鼠随机被分为正常组, 模型组, 18 α -甘草酸, 18 β -甘草酸低、中、高剂量组(15, 30, 60 mg·kg⁻¹), 联合用药给药剂量均为60 mg·kg⁻¹, 联合用药1(18 α -甘草酸-18 β -甘草酸1:3)组、联合用药2(18 α -甘草酸-18 β -甘草酸2:3)组、联合用药3(18 α -甘草酸:18 β -甘草酸1:1)组。在造模前各治疗组*ip*给药7 d, 1次/d, 其他各组*ip*生理盐水; 末次给药1 h后, 除正常组*ip*生理盐水外, 其他各组均*ip* 0.1% 四氯化碳(CCl₄)花生油(20 mL·kg⁻¹)建立CCl₄诱导小鼠急性肝损伤模型, 观察18 α -、18 β -甘草酸高、中、低剂量(15, 30, 60 mg·kg⁻¹)组, 联合用药3个不同配伍比例组对急性肝损伤小鼠血清中和肝组织中丙氨酸转氨酶(ALT), 天冬氨酸转氨酶(AST)水平的影响, 并检测肝组织匀浆中超氧化物歧化酶(SOD)活力及丙二醛(MDA)含量, 同时筛选二者联合用药的最佳配伍比例。**结果:**与正常组比较, 模型组血清AST, 肝组织AST, ALT, MDA水平明显升高, SOD活力显著降低($P < 0.01$), 提示造模成功。与模型组比较, 18 α -甘草酸组, 18 β -甘草酸组均可降低小鼠血清中AST, 肝组织AST, ALT活力, MDA含量, 升高肝组织中SOD活力; 比较二者对急性肝损伤小鼠的保护作用, 结果18 β -甘草酸组对肝组织中AST, ALT水平影响优于18 α -甘草酸组, 其他指标无显著性差异; 二者联合用药的最佳配伍比例为2:3, 其对肝组织中AST活力及MDA含量的影响均优于单用18 α -或18 β -甘草酸治疗组。**结论:**18 α -与18 β -甘草酸可保护急性肝损伤小鼠, 后者保护作用比前者强, 二者配伍的最佳比例是2:3, 其对AST, MDA水平影响优于单用18 α -或18 β -甘草酸。

[关键词] 18 α -甘草酸; 18 β -甘草酸; 急性肝损伤; 保护作用; 配伍比例

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)02-0103-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016020103

Protective Effect and Combination Proportion of 18 α , 18 β -Glycyrrhizic Acid on Acute Liver Injury in Mice

ZHANG Hui, PEI Zhi-dong*, CHEN Ying, KANG Ting-guo*
(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the protective effect of 18 α - and 18 β -glycyrrhizic acid on acute liver injury in mice, and screen out their optimal combination proportion. **Method:** The mice were randomly divided into normal group, model group, high dose group (60 mg·kg⁻¹), middle dose group (30 mg·kg⁻¹), low dose group (15 mg·kg⁻¹) of 18 α - and 18 β -glycyrrhizic acid. With the drug dose of combined medication groups of 60 mg·kg⁻¹, combined medication 1 groups (18 α -glycyrrhizic acid-18 β -glycyrrhizic acid 1:3), combined medication 2 groups (18 α -glycyrrhizic acid-18 β -glycyrrhizic acid 2:3), combined medication 3 groups (18 α -glycyrrhizic acid-18 β -glycyrrhizic acid 1:1). Before the modeling, the drugs were injected once everyday for 7 days, the same volume of saline was given to normal group and model group. At 1 h after the last administration, the treated groups and model group were *ip* given 0.1% CCl₄ peanut oil (20 mL·kg⁻¹) to establish mouse model of

[收稿日期] 20150421(016)

[基金项目] 国家科技部科研行业专项(201407002); 辽宁省科技厅自然科学基金项目(2014010052-301)

[第一作者] 张慧, 博士/博士后, 教授, 从事中药药效物质基础研究, Tel: 0411-85890138, E-mail: syyycs@163.com

[通讯作者] *裴志东, 硕士, 副教授, 从事中药药效物质基础研究, Tel: 0411-85890128, E-mail: pzd87586078@163.com;

*康廷国, 教授, 从事中药品质评价研究, Tel: 0411-85890138, E-mail: kangtg@lnutcm.edu.cn

acute liver injury induced by CCl_4 . The samples of blood and liver from high dose group, middle dose group, low dose group and three combination proportion groups of 18α - and 18β -glycyrrhizic acid were analyzed, and level of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) were measured. **Result:** Compared with the normal group, the serum levels of AST, liver homogenate levels of AST, ALT, MDA in model group were remarkably higher ($P < 0.01$), levels of SOD was remarkably lower. Compared with the model group, 18α - and 18β -glycyrrhizic acid remarkably reduced the serum levels of AST, reduced liver homogenate levels of AST, ALT and MDA, and increased liver homogenate content of SOD. 18β -glycyrrhizic acid had a better effect on liver homogenate levels of AST, ALT than 18α -glycyrrhizic acid, and showed no significant difference in other indexes compared with 18β -glycyrrhizic acid. The optimal combination proportion of 18α - and 18β -glycyrrhizic acid is 2:3, with a better effect on liver homogenate levels of AST, MDA than simple 18α - or 18β -glycyrrhizic acid. **Conclusion:** 18α - and 18β -glycyrrhizic acid can protect acute liver injury in mice. The latter had a better protective effect than the former. Their optimal combination proportion is 2:3, with a better effect on liver homogenate levels of AST, MDA than simple 18α - or 18β -glycyrrhizic acid.

[Key words] 18α -glycyrrhizic acid; 18β -glycyrrhizic acid; acute liver injury; protective effects; combination proportion

甘草是豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis*, 胀果甘草 *G. inflata* 或光果甘草 *G. glabra* 的干燥根和根茎, 具有补脾益气, 清热解毒, 祛痰止咳, 缓急止痛, 调和诸药的功效^[1]。甘草中主要活性成分为甘草酸, 它以 18α - 和 18β -甘草酸 2 种差向异构体的形式同时存在于甘草中。目前, 国内外均有单以 18α -甘草酸(甘草酸二铵)和单以 18β -甘草酸(甘草酸单铵)为原料制成的相关制剂上市, 均用于治疗各种肝脏疾病, 2 种原料均从甘草中提取分离得到, 且 2 种原料制备时, 各自自身差向异构体均作为主要杂质需去除, 尚未见二者联合用药的制剂上市^[2], 且文献研究主要集中在对单一的 18α -或 18β -甘草酸药物的保肝机制和疗效研究^[3], 未见二者联合用药及最佳配伍比例筛选的研究报道, 未见联合用药与二者单独用药的对比研究。基于此, 本论文通过建立四氯化碳(CCl_4)小鼠急性肝损伤模型, 对比研究了 18α -甘草酸, 18β -甘草酸及二者联合用药对急性肝损伤小鼠的保护作用, 并筛选二者最佳配伍比例, 从而证实 18α 或 18β -甘草酸的各自差向异构体均有药效活性, 为其制备原料时保留各自差向异构体奠定基础, 亦为其配伍复方制剂的新药开发提供思路。

1 材料

1.1 动物 SPF 级昆明种小鼠, 雌雄各半, 体重 18~22 g, 由大连医科大学实验动物中心提供, 合格证号 SCXK(辽)2008-002。

1.2 药物及试剂 18α -甘草酸(池州东升药业有限公司, 批号 20121210, 标示量 86.8%), 18β -甘草酸(西安清乐生物科技有限公司, 批号 20130312, 标示

量 78.4%), 丙氨酸转氨酶(AST)试剂盒(批号 20130426), 天冬氨酸转氨酶(ALT)试剂盒(批号 20130417), 丙二醛(MDA)试剂盒(批号 20130515), 超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号 20130722)均购自南京建成生物工程研究所, CCl_4 (天津科密欧试剂有限公司, 批号 20121211)。

1.3 仪器 UV-1750 型分光光度计(日本岛津有限公司), Synergy H4 型酶标仪(美国伯腾仪器有限公司), H1650-W 型高速离心机(湖南湘仪实验仪器开发有限公司), HH-S 型水浴锅(巩义市予华仪器有限责任公司)。

2 方法

2.1 分组与给药 每组小鼠 10 只, 正常组和模型组每天 ip 等体积的生理盐水, 给药组的小鼠每日 ip 给药 1 次, 连续给药 7 d。

2.1.1 18α -甘草酸, 18β -甘草酸的对比实验 将小鼠分为正常组, 模型组, 18α -甘草酸, 18β -甘草酸低、中、高剂量(15, 30, 60 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组。

2.1.2 18α -甘草酸, 18β -甘草酸联合用药配伍比例筛选 将小鼠分为正常组, 模型组, 18α 甘草酸组(60 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 18β -甘草酸组(60 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 联合用药 1(18α -甘草酸- 18β -甘草酸 1:3)组, 联合用药 2(18α -甘草酸- 18β -甘草酸 2:3)组, 联合用药 3(18α -甘草酸- 18β -甘草酸 1:1)组。

2.2 CCl_4 诱导的急性肝损伤小鼠模型的建立 将 2.1 中各组小鼠末次给药 1 h 后, 模型组和治疗组均按 20 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ip 0.1% 的 CCl_4 花生油溶液造模, 同时正常组给予等体积的生理盐水, 禁食不禁水^[4]。

2.3 ALT,AST 活性检测 造模 16 h 后,摘取各组小鼠眼球取血,静置 30 min,3 000 r·min⁻¹离心 15 min,取上清液即为血清,按 AST 试剂盒说明书操作测定血清中 AST。取血后处死小鼠,取肝脏,用生理盐水洗去血液,用滤纸吸干,加生理盐水处理制成 10% 肝组织匀浆,同时 3 500 r·min⁻¹离心 15 min,分离上清液,分别按 AST,ALT 试剂盒说明书操作。

2.4 MDA,SOD 检测 造模 16 h 后处死小鼠,剖取肝脏,用生理盐水洗去血液,滤纸吸干,用生理盐水制成 10% 肝组织匀浆,3 500 r·min⁻¹离心 15 min,分离上清液,按说明书测定肝组织 SOD 活性和 MDA 含量,采用考马斯亮蓝蛋白测试法测定蛋白含量。

2.5 统计学处理方法 使用 SPSS 19.0 软件分析实验结果,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因

素方差分析法,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 18 α ,18 β -甘草酸对急性肝损伤小鼠保护作用
3.1.1 对 ALT,AST 水平的影响 与正常组比较,模型组血清 AST,肝组织 AST,ALT 水平明显升高 ($P < 0.01$),提示造模成功。与模型组比较,18 α -甘草酸中、高剂量组和 18 β -甘草酸高剂量组小鼠血清 AST 水平均有降低 ($P < 0.01, P < 0.05$);18 α -甘草酸高剂量组和 18 β -甘草酸中、高剂量组可不同程度降低小鼠肝组织中 AST,ALT 的水平 ($P < 0.01, P < 0.05$);18 α -、18 β -甘草酸两者比较显示,18 β -甘草酸组对肝组织中 AST,ALT 水平影响明显优于 18 α -甘草酸 ($P < 0.01, P < 0.05$),而 18 α -甘草酸对血清中的 AST 水平影响明显优于 18 β -甘草酸。见表 1。

表 1 18 α ,18 β -甘草酸对急性肝损伤小鼠血清和肝匀浆中 AST,ALT,SOD,MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of 18 α , 18 β -glycyrrhizic acid on level of ALT and AST and lever homogenate levels of SOD, MDA in mice with acute liver injury ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	血清 AST /U·L ⁻¹	肝组织匀浆			
			ALT /U·L ⁻¹	AST /U·L ⁻¹	MDA /nmol·mg ⁻¹	SOD /U·mg ⁻¹
正常	-	88 ± 13 ²⁾	179 ± 30 ²⁾	415 ± 29 ²⁾	3.1 ± 0.5 ²⁾	20.0 ± 5.3 ²⁾
模型	-	152 ± 23	251 ± 16	711 ± 23	7.1 ± 0.9	12.7 ± 2.2
18 α -甘草酸	15	136 ± 29 ³⁾	257 ± 21	733 ± 62	8.9 ± 1.0	13.9 ± 2.6
	30	127 ± 25 ¹⁾	248 ± 19	691 ± 34	6.9 ± 0.8	12.2 ± 2.6
	60	105 ± 16 ²⁾	234 ± 18 ¹⁾	662 ± 46 ¹⁾	5.4 ± 0.6 ¹⁾	16.2 ± 3.0 ²⁾
18 β -甘草酸	15	161 ± 17	268 ± 21	701 ± 46	6.7 ± 1.0	12.9 ± 3.2
	30	179 ± 22 ⁴⁾	213 ± 22 ^{2,3)}	624 ± 40 ^{2,3)}	7.0 ± 0.8	13.2 ± 3.0
	60	128 ± 30 ¹⁾	196 ± 28 ^{2,4)}	554 ± 45 ^{2,4)}	5.0 ± 0.6 ¹⁾	15.2 ± 3.8 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与同剂量 18 α -甘草酸比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.1.2 对 MDA 含量,SOD 活力的影响 与正常组比较,模型组小鼠肝组织 MDA 含量升高,SOD 活力降低 ($P < 0.01$),提示造模成功。与模型组比较,18 α ,18 β -甘草酸高剂量组均可显著降低 MDA 活力 ($P < 0.05$),显著升高 SOD 活力 ($P < 0.05, P < 0.01$);18 α -、18 β -甘草酸对急性肝损伤小鼠肝组织中 MDA 与 SOD 活力影响基本一致。见表 2。

3.2 18 α ,18 β -甘草酸联合用药治疗急性肝损伤的最佳配伍比例

3.2.1 对 AST,ALT 水平的影响 18 α -与 18 β 甘草酸各联合用药组与模型组比较,比例为 1:3 和 2:3 联合用药组可明显降低小鼠肝组织 ALT,AST 水平 ($P < 0.05, P < 0.01$),比例为 1:1 联合用药组可明显降低小鼠肝组织 AST 水平,ALT 水平变化不明显。

各联合用药组与单用 18 α -或 18 β -甘草酸组比较,比例为 1:3 时对肝组织中 ALT 水平影响优于单用 ($P < 0.05$);比例为 2:3 和 1:1 时,对肝组织中 AST 水平影响优于单用 ($P < 0.05, P < 0.01$)。由此

可见,比例为 1:3 和 2:3 时,可同时降低肝组织 AST,ALT 水平,且二者对 AST 或 ALT 水平的影响均优于单用 18 α -或 18 β -甘草酸,因此确定此项实验联合用药比例为 2:3 或 1:3。见表 2。

3.2.2 对 MDA 含量,SOD 活力的影响 18 α ,18 β -甘草酸各联合用药组与模型组比较,比例为 2:3 联合用药组的肝组织 MDA 含量明显降低,SOD 活力明显升高 ($P < 0.01$);比例为 1:3 联合用药肝组织 SOD 活力明显升高 ($P < 0.01$),对 MDA 含量无显著影响;比例为 1:1 联合用药组的肝组织 MDA 含量明显降低 ($P < 0.05$),对 SOD 活力无影响。各联合用药组与单用 18 α 或 18 β -甘草酸比较结果显示,比例为 2:3 时,对肝组织中 MDA 含量影响优于单用 18 α -或 18 β -甘草酸 ($P < 0.05, P < 0.01$)。由此可见,比例为 2:3 联合用药组同时对急性肝损伤小鼠肝组织中 MDA,SOD 有调节作用,且作用优于单用 18 α -或 18 β 甘草酸,因此根据此项实验初步确定联合用药筛选比例为 2:3。见表 2。

表 2 18 α ,18 β -甘草酸联合用药对急性肝损伤小鼠血清和肝匀浆中 AST,ALT,MDA,SOD 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of combination of 18 α -glycyrrhizic acid and 18 β -glycyrrhizic acid on level of ALT, AST, MDA, SOD in mice with acute liver injury ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	血清 AST /U·L ⁻¹	肝 ALT /U·L ⁻¹	肝 AST /U·L ⁻¹	MDA /nmol·kg ⁻¹	SOD /U·mg ⁻¹
正常	-	80 ± 18 ²⁾	168 ± 31 ²⁾	438 ± 99 ²⁾	3.3 ± 0.9 ²⁾	20.4 ± 5.1 ²⁾
模型	-	142 ± 20	234 ± 25	724 ± 72	7.3 ± 0.9	13.0 ± 2.0
18 α -18 β (1:3)	15:45	133 ± 19	184 ± 25 ^{2,3,5)}	652 ± 93 ¹⁾	7.5 ± 0.5	18.6 ± 3.7 ²⁾
18 α -18 β (2:3)	24:36	139 ± 15	256 ± 15 ¹⁾	525 ± 96 ^{2,4,5)}	4.1 ± 0.7 ^{2,3,6)}	16.6 ± 3.4 ²⁾
18 α -18 β (1:1)	30:30	157 ± 25	230 ± 28	557 ± 79 ^{2,4)}	5.0 ± 0.8 ¹⁾	12.4 ± 3.5
18 α -甘草酸	60	99 ± 29 ²⁾	210 ± 39 ¹⁾	657 ± 66 ¹⁾	5.2 ± 0.9 ¹⁾	16.3 ± 4.2 ²⁾
18 β -甘草酸	60	116 ± 27 ¹⁾	202 ± 25 ²⁾	581 ± 100 ²⁾	7.2 ± 0.7	18.3 ± 2.7 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01; 与 18 α -甘草酸比较³⁾ P < 0.05, ⁴⁾ P < 0.01; 与 18 β -甘草酸比较⁵⁾ P < 0.05, ⁶⁾ P < 0.01(表 4 同)。

3.2.3 最佳配伍比例的确定 上述结果显示, 18 α ,18 β -甘草酸联合用药为 2:3 时,可同时影响 AST,ALT,MDA,SOD;联合用药为 1:3 时,仅对 AST,ALT,SOD 活力有影响,对 MDA 无影响;联合用药为 1:1 时,仅对 AST,MDA 有影响,对 ALT,SOD 无影响。结果同时提示,联合用药为 2:3 时,对肝组织中 AST,MDA 活力影响均优于单用 18 α -或 18 β -甘草酸;1:3 时,仅对肝组织中 ALT 水平影响优于单用 18 α -或 18 β -甘草酸,其他无明显差异;1:1 时,仅对肝组织中 AST 水平影响优于单用 18 α -或 18 β -甘草酸,其他无明显差异。基于此,联合用药为 2:3 时对 CCl₄ 诱导的急性肝损伤小鼠各项生化指标均有保护作用,且优于单用 18 α -或 18 β -甘草酸,因此确定联合用药最佳比例为 2:3。

4 讨论

CCl₄ 肝损伤模型是筛选具有保肝降酶作用药物的常用模型之一。研究表明 CCl₄ 一方面在肝脏经细胞色素 P₄₅₀ 激活为·CCl₃ 自由基和·Cl 自由基,这 2 种自由基会攻击肝细胞膜上的磷脂分子,并和位于细胞膜上的脂质和蛋白质大分子进行共价结合,引起蛋白质代谢障碍和脂质过氧化反应,从而破坏膜的完整性,使内源性转氨酶释放到细胞外,导致血清和肝组织中的转氨酶活性显著升高,从而引起急性肝损伤。所以 ALT,AST 可以在一定程度上反映肝细胞的损伤程度;另一方面·CCl₃ 可抑制细胞膜和微粒体膜上钙泵活性,引起钙离子内流。在这 2 种作用下,导致肝细胞膜的变化,继而引起各项生化指标改变。SOD 是体内重要的抗氧化物质,可以清除自由基,减弱氧化应激状态。MDA 为脂质过氧化物,其含量越高,说明肝细胞膜脂质过氧化越强^[5-7]。

本研究发现,18 α -、18 β -甘草酸均可明显降低急性肝损伤小鼠血清中 AST,肝组织中 AST,ALT,

MDA 水平,显著升高 SOD 活力,且呈一定量效关系;18 β -甘草酸对肝组织中 AST,ALT 水平影响优于 18 α -甘草酸,对血清中 AST 水平影响低于 18 α -甘草酸,二者对肝组织中 MDA,SOD 影响基本一致,无显著性差异;确定了 18 α ,18 β -甘草酸联合用药的最佳配伍比例为 2:3,其对生化指标 AST,ALT,MDA,SOD 均有不同程度的影响,对肝组织中 AST 水平,MDA 的影响均优于单用 18 α -或 18 β -甘草酸;基于上述实验,提示 18 α 或 18 β -甘草酸的各自差向异构体均有药效活性,为二者制备原料时保留各自差向异构体,而不作为杂质除去奠定基础,本论文亦为研究二者配伍复方制剂的新药开发提供思路。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科学出版社,2010:81.
- [2] 戴雯. 甘草酸制剂最新研究进展[J]. 中华医学信息导报,2015,30(5):14.
- [3] 黄群荣,马哲. 甘草酸的药理作用研究进展[J]. 药物评价研究,2011,34(5):384-387.
- [4] 童方念,罗超,罗丹,等. 山奈酚对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 西安交通大学学报:医学版,2014,35(6):816-819.
- [5] 周军,张福华. 桑叶黄酮对四氯化碳诱导的小鼠急性肝损伤保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(15):269-272.
- [6] 崔红花,于治成,沈志滨,等. 狗肝菜不同相对分子质量多糖对四氯化碳所致大鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(9):185-189.
- [7] 郭又嘉,蒙明瑜,焦扬,等. 玉郎伞黄酮对四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(18):198-202.

[责任编辑 聂淑琴]