

肝龙胶囊联合复方甘草酸苷体外抗肝纤维化的作用

邵明园, 焦素月, 杨强丽, 周玄, 曹昌娥, 赖泳*
(大理大学 药学与化学学院, 云南 大理 671000)

[摘要] **目的:**通过检测肝龙胶囊联合复方甘草酸苷用药后人肝星状细胞系(LX-2)中I型胶原(Col-I), III型前胶原(PCIII), IV型胶原(IV-C), 层粘蛋白(LN), 透明质酸(HA), 转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)的含量及Col-I, 基质金属蛋白酶抑制剂1(TIMP-1) mRNA的表达变化, 探讨肝龙胶囊联合复方甘草酸苷对LX-2细胞的抗肝纤维化作用。**方法:**体外培养LX-2细胞, 将对数期细胞分为复方甘草酸苷用药组(3.125, 1.562, 0.781 g·L⁻¹), 空白组, 肝龙胶囊(0.938, 0.469, 0.235 g·L⁻¹)联合复方甘草酸苷(3.125, 1.562, 0.781 g·L⁻¹)交叉用药组, 采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测肝纤维化四项指标PCIII, IV-C, LN, HA和Col-I, TGF- β_1 的含量; 逆转录PCR(RT-PCR)检测Col-I和TIMP-1 mRNA的表达水平。**结果:**与复方甘草酸苷用药组比较, 联合用药组在24, 48 h时均可使HA, Col-I的含量降低($P < 0.05$), 在72 h可使LN, HA, Col-I, PCIII, TGF- β_1 的含量降低($P < 0.05$); 与空白组比较, 联合用药组可使TGF- β_1 含量明显降低($P < 0.05, P < 0.01$); 与复方甘草酸苷用药组比较, 联合用药组明显降低TIMP-1 mRNA的表达量($P < 0.05$), 且呈现时间依赖性; 与空白组比较, 联合用药组对Col-I mRNA在24 h呈现抑制作用($P < 0.05$), 在72 h时却使其表达量增加。**结论:**肝龙胶囊联合复方甘草酸苷用药组可使LX-2细胞LN, HA, Col-I, TGF- β_1 的含量降低, 抑制Col-I和TIMP-1 mRNA的表达, 效果优于复方甘草酸苷用药组。肝龙胶囊增强了复方甘草酸苷的体外抗肝纤维化作用。

[关键词] 肝龙胶囊; 复方甘草酸苷; 联合; 细胞外基质; 肝纤维化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)16-0133-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017160133

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170526.1016.038.html>

[网络出版时间] 2017-05-26 10:16

Anti-liver Fibrosis Effect of Ganlong Capsule Combined with Compound Glycyrrhizin Glucoside

SHAO Ming-yuan, JIAO Su-yue, YANG Qiang-li, ZHOU Xuan, CAO Chang-e, LAI Yong*
(College of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Dali 671000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the anti-liver fibrosis effect of Ganlong capsule combined with compound glycyrrhizin glucoside on human hepatic stellate cells by detecting the content of type I collagen (Col-I), type III procollagen (PCIII), type IV collagen (IV-C), laminin (LN), hyaluronic acid (HA), transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) and expression levels of Col-I, matrix metalloproteinase inhibitor 1 (TIMP-1) mRNA in human hepatic stellate cell line (LX-2). **Method:** LX-2 cells were cultured *in vitro*, and the logarithmic phase cells were divided into compound glycyrrhizin glucoside treatment groups (3.125, 1.562, 0.781 g·L⁻¹), blank control group, Ganlong capsule (0.938, 0.469, 0.235 g·L⁻¹) combined with compound glycyrrhizin glucoside (3.125, 1.562, 0.781 g·L⁻¹) groups. Then enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to detect the content of four markers of liver fibrosis (PCIII, IV-C, LN, HA) and the levels of Col-I and TGF- β_1 ; the expression levels of Col-I and TIMP-1 mRNA were detected by reverse transcription-PCR (RT-PCR). **Result:** As

[收稿日期] 20170320(001)

[基金项目] 云南省教育厅科学研究基金项目(ZD2014013)

[第一作者] 邵明园, 在读硕士, 从事药理学研究, Tel:18760954098, E-mail: 815384537@qq.com

[通讯作者] * 赖泳, 硕士, 教授, 从事临床药理学研究, Tel:010-2257412, E-mail: laiyong8879@163.com

compared with compound glycyrrhizin glucoside treatment group, combined drug use could decrease the content of Col-I, HA at 24 h and 48 h ($P < 0.05$), and reduce the content of LN, HA, Col-I, PCIII, TGF- β_1 at 72 h ($P < 0.05$). As compared with the blank control group, the combined drug use can significantly decrease the content of TGF- β_1 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). As compared with compound glycyrrhizin glucoside treatment group, the combined drug use could significantly decrease the expression of TIMP-1 mRNA ($P < 0.05$) in time-dependent manner; and as compared with the blank control group, the combined drug use showed the inhibition effect for Col-I mRNA at 24 h ($P < 0.05$), but the expression was increased at 72 h. **Conclusion:** Ganlong capsule combined with compound glycyrrhizin glucoside can decrease the content of LN, HA, Col-I, TGF- β_1 and inhibit the expression of Col-I and TIMP-1 in LX-2 cells, and the effect was better than that of compound glycyrrhizin glucoside treatment group. Ganlong capsule could enhance the anti-fibrosis effect *in vitro* of compound glycyrrhizin glucoside.

[Key words] Ganlong capsule; compound glycyrrhizin glucoside; drug combination; extracellular matrix; hepatic fibrosis

肝纤维化是肝脏不正常的组织修复反应,是一个可逆的分子、细胞、组织参与的动态的病理生理过程。几乎包括所有的酒精性肝病、病毒性肝炎、自身免疫、局部和代谢性疾病等慢性肝损伤都能形成肝纤维化。肝纤维化是肝脏内细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成与降解不平衡的结果,肝星状细胞是肝脏内 ECM 产生的主要细胞。当纤维化不受控制时,可以进一步进展为肝硬化或肝癌,严重威胁人们的健康^[1-3]。

目前,对于肝纤维化的治疗,还没有确切的药物。许多临床研究表明,中医药在预防和治疗肝纤维化上显示出一定的优势^[4-5]。复方甘草酸苷是临床治疗乙型病毒性肝炎常用的联合药,具有抗炎、改善肝功能的作用,同时也存在许多副作用^[6-7]。肝龙胶囊的主要成份是美洲大蠊提取物,美洲大蠊提取物是提取于昆虫美洲大蠊干燥虫体的有效物质^[8]。肝龙胶囊作为国家二类中药新药,用于治疗乙型病毒性肝炎,疗效好且毒副作用较小^[9-11]。研究表明,美洲大蠊提取物具有抗肿瘤、抑菌、调节免疫、抗炎、抗氧化、促进修复等作用^[12-14],还能显著降低肝纤维化小鼠血清中 III 型前胶原(PCIII), IV 型胶原(IV-C),层粘蛋白(LN),透明质酸(HA)的含量,具有护肝和抑制肝纤维化的作用^[15-16]。在前期研究中发现,美洲大蠊提取物对免疫性肝纤维化具有一定防治作用,但是治疗作用不明显^[17]。肝龙胶囊与其他抗肝纤维化药物联合方面未见研究报告,本研究将检测肝纤 4 项、基质金属蛋白酶抑制剂 1(TIMP-1),转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)等其他指标,旨在寻找治疗或逆转肝纤维化的药物。因此,本课题将探讨肝龙胶囊联合复方甘草酸苷的体外抗肝纤维化作用,以期为肝龙胶囊增强复方甘草酸苷抗

肝纤维化作用提供药理学理论依据。

1 材料

1.1 细胞株 人正常肝细胞(L-02)购自中国科学院上海细胞库,批号 HTCC01;人肝星状细胞系(LX-2)购自中南大学细胞库,批号 HTCC-4。

1.2 药物及试剂 肝龙胶囊(昆明赛诺制药有限公司,批号 13032402);复方甘草酸苷胶囊(潍坊中狮制药有限公司,批号 13054632);人 I 型胶原(Col-I),PCIII,IV-C, LN, HA 酶联免疫检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号均为 201411);人 TGF- β_1 酶联免疫检测试剂盒(深圳欣博盛生物科技有限公司,批号 H151225-107a);胎牛血清,DMEM 高糖培养基粉末(美国 Gibco 公司,批号分别为 1618862, 1710802);Trizol(上海起发实验试剂有限公司,批号 SL24223904); $2 \times Taq$ PCR MasterMix(上海 Thermo Scientific 公司,批号 002222377);DNA Marker D2000(北京天根生化科技有限公司,批号 H7104);Biowest 琼脂糖(北京基因科技有限公司,批号 111760);焦碳酸二乙酯(DEPC,北京索莱宝科技有限公司,批号 729b028)。

1.3 仪器 Synergy HT 型多功能酶标仪(美国 Bio-Tek 公司),Series 型 CO₂ 恒温培养箱(美国 Thermo Scientific 公司),2720 型 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司),G:BOX 型凝胶成像系统(英国 Syngene 公司),DYY-6C 型电泳仪(北京市六一仪器厂),Smart Spec Plus 型核酸蛋白测定仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 将 LX-2 细胞从 -80 °C 超低温冰箱中取出复苏,用含 10% 胎牛血清及 1% 青链霉素抗生素的高糖 DMEM 完全培养基进行培养,细胞长至 80% ~ 90% 时用 0.2% 的胰蛋白酶消化传代置于

37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养,选取对数期生长良好细胞用于实验。

2.2 药物浓度和细胞给药 将对数期生长的 LX-2, L-02 细胞按每孔 100 μL 以 1 × 10⁵ 个/mL 的密度接种于 96 孔板中,实验分为复方甘草酸苷单独用药组(6.25, 3.125, 1.562, 0.781, 0.39 g · L⁻¹),空白组,肝龙胶囊(3.75, 1.875, 0.938, 0.469, 0.235 g · L⁻¹)与复方甘草酸苷(6.25, 3.125, 1.562, 0.781, 0.39 g · L⁻¹)交叉联合组,置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养。12 h 后,测量各组吸光度 A,选取肝龙胶囊和复方甘草酸苷联合对 L-02 细胞无明显抑制作用,对 LX-2 细胞存在明显抑制时的药物浓度作为联合药的最佳浓度,得表 1 所示药物浓度。并按此最佳药物浓度将肝龙胶囊分别和复方甘草酸苷进行交叉给药,置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱中分别培养 24, 48, 72 h 后进行以下实验。

表 1 肝龙胶囊和复方甘草酸苷进行交叉给药浓度
Table 1 Cross administration concentration of Ganlong capsule and compound glycyrrhizin glucoside

药物	浓度/g · L ⁻¹	编号
肝龙胶囊	0.938	A1
	0.469	A2
	0.235	A3
复方甘草酸苷	3.125	B1
	1.562	B2
	0.781	B3

2.3 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 法检测 Col-I,

表 2 PCR 引物序列、反应条件和产物大小

Table 2 Primer sequences, reaction conditions and product size of PCR

名称	引物序列	反应条件	片段大小/bp
Col-1	上游 5'-CCCGGGTTTCAGAGACAATTC-3'	95 °C 3 min, 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 15 s, 30 个循环, 72 °C 5 min	183
	下游 5'-TCCACATGCTTTATTCCAGCAATC-3'		
TIMP-1	上游 5'-GCGCCCTTTCATCTCTGTG-3'	94 °C 1 min, 94 °C 30 s, 60 °C 60 s, 72 °C 60 s, 30 个循环, 72 °C 7 min	420
	下游 5'-GCCAGGGAACCAGGAAGCTG-3'		
β-actin	上游 5'-TGACTGACTACCTCATGAAGAT-3'	94 °C 3 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环, 72 °C 5 min	296
	下游 5'-CATGATGGAGTTGAAGGTAGTT-3'		

2.4.4 琼脂糖凝胶电泳 取 PCR 扩增产物 5 μL 用 2% 的琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,电泳结果通过使用 Gel-pro 4.0 软件对条带进行灰度、面积扫描,以 β-actin 为内参半定量分析,其比值用于统计学分析。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件进行处

理,结果计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间的比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2.4 逆转录 PCR (RT-PCR) 法测细胞内 Col-1 及 TIMP-1 mRNA 的表达

2.4.1 LX-2 细胞内总 RNA 提取、鉴定和浓度测定 用 Trizol 试剂提取细胞内总 RNA,取 RNA 2 μL 用 0.1% 的 DEPC 处理水稀释 20 倍,用核酸蛋白测定仪检测纯度及浓度,总 RNA 纯度以 1.80 ~ 2.00 为合格,然后将总 RNA 置于 -20 °C 保存备用。

2.4.2 总 RNA 逆转录 根据 RevertAid™ M-MuLv 逆转录酶说明书,取模板 RNA 1 μg 和 A₁₈ 引物 1 μL,DEPC 灭菌水 10 μL 置离心管中离心混匀,65 °C 孵育 5 min 后,冰浴 2 min 后离心。置于冰上,依次加入 5 × Reaction Buffer 4 μL, Ribolock TMRibonuclease Inhibitor 1 μL, 10 mmol · L⁻¹ dNTP Mix 2 μL 和 RevertAid™ M-MuLv 逆转录酶 1 μL。轻弹管壁使其混匀,瞬时离心 3 s,将反应体系于 42 °C 孵育 60 min 之后,70 °C 终止反应 5 min,冰上冷却;将合成好的 cDNA 放置于 -20 °C 保存备用。

2.4.3 PCR 扩增 Col-I, TIMP-1, β-肌动蛋白 (β-actin) 以逆转录合成的 cDNA 为模板,25 μL 反应体系内含灭菌超纯水 8.5 μL, 2 × Taq PCR Master Mix 12.5 μL,正向引物、反向引物各 1 μL 及逆转录产物 cDNA 2 μL 进行扩增。反应条件及引物系列见表 2。

理,结果计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间的比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 肝龙胶囊与复方甘草酸苷联合对 LX-2 细胞 Col-I, PCIII, IV-C, LN, HA, TGF-β₁ 含量的影响 与空白组比较,肝龙胶囊和复方甘草酸苷联合可显著

降低 TGF- β_1 的含量,且呈时间依赖性 ($P < 0.05$),随着复方甘草酸苷浓度的升高 TGF- β_1 的含量逐渐降低。与复方甘草酸苷单用比较,联合用药在 24 h 可明显降低 LN, HA, Col-I 的含量 ($P < 0.05$);在

48 h 可明显降低 HA, Col-I, TGF- β_1 的含量 ($P < 0.05$);在 72 h 可使 LN, HA, Col-I, PCIII, TGF- β_1 含量降低 ($P < 0.05$);对 PCIII 的含量,联合用药与单独用药差异不明显。见表 3,4。

表 3 复方甘草酸苷单用及联合肝龙胶囊对 LX-2 细胞肝纤 4 项指标含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of compound glycyrrhizin glucoside alone and combined with Ganlong capsule on content of four indexes of hepatic fibrosis in LX-2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	LN			HA		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
A1B1	0.938 + 3.125	16.2 ± 0.6 ¹⁾	27.6 ± 2.1 ¹⁾	19.6 ± 3.4 ^{2), 3)}	1.1 ± 0.3 ³⁾	1.0 ± 0.2 ³⁾	3.5 ± 0.9
A1B2	0.938 + 1.562	16.4 ± 2.2 ^{1), 3)}	31.9 ± 3.1	35.2 ± 3.2 ³⁾	2.3 ± 0.3 ³⁾	2.6 ± 0.5 ³⁾	4.9 ± 0.8 ³⁾
A1B3	0.938 + 0.781	20.9 ± 2.0 ³⁾	37.5 ± 3.1	31.2 ± 3.2 ^{1), 3)}	4.5 ± 0.4 ³⁾	4.2 ± 0.6 ³⁾	3.7 ± 0.3 ³⁾
A2B1	0.469 + 3.125	17.5 ± 1.6 ¹⁾	21.6 ± 3.1 ^{1), 3)}	26.5 ± 0.9 ^{1), 3)}	2.4 ± 0.8	2.6 ± 0.4 ³⁾	3.2 ± 0.3
A2B2	0.469 + 1.562	23.1 ± 3.1	29.7 ± 5.2	30.4 ± 6.0 ^{1), 3)}	5.3 ± 0.8	5.1 ± 0.6	3.3 ± 0.6 ³⁾
A2B3	0.469 + 0.781	28.3 ± 2.1 ³⁾	35.4 ± 3.2	36.8 ± 3.6	5.8 ± 0.6 ³⁾	6.4 ± 0.5	5.5 ± 0.3 ³⁾
A3B1	0.235 + 3.125	17.3 ± 1.4 ¹⁾	30.7 ± 3.2	35.9 ± 3.6	2.5 ± 0.6	3.7 ± 0.7	4.2 ± 3.4
A3B2	0.235 + 1.562	22.6 ± 2.0	31.1 ± 3.1	37.5 ± 2.6	3.7 ± 0.5 ³⁾	3.5 ± 0.4	5.5 ± 1.1
A3B3	0.235 + 0.781	33.9 ± 3.6	30.6 ± 4.6	44.3 ± 5.8	7.6 ± 0.9 ³⁾	5.2 ± 0.9	7.1 ± 0.7
B1	3.125	17.8 ± 1.8 ¹⁾	31.2 ± 2.2	36.4 ± 4.6 ¹⁾	3.0 ± 1.0	4.2 ± 0.7	4.7 ± 0.4 ¹⁾
B2	1.562	26.5 ± 3.5	35.0 ± 1.4	41.4 ± 0.6	7.63 ± 0.9	7.4 ± 0.4	9.4 ± 0.6
B3	0.781	38.5 ± 3.5	35.2 ± 3.2	48.9 ± 4.9	12.2 ± 1.3	9.8 ± 0.6	11.7 ± 1.2
空白	-	25.1 ± 3.4	35.3 ± 3.6	35.3 ± 3.6	2.5 ± 0.3	5.0 ± 0.5	7.8 ± 0.6

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	PCIII			IV-C		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
A1B1	0.938 + 3.125	22.4 ± 2.2	29.3 ± 2.4	12.9 ± 1.6 ³⁾	10.7 ± 1.0 ³⁾	22.4 ± 2.1	10.5 ± 0.9
A1B2	0.938 + 1.562	24.5 ± 1.3	22.8 ± 2.3	16.6 ± 1.9 ³⁾	22.9 ± 2.9	25.6 ± 2.6	19.6 ± 1.4
A1B3	0.938 + 0.781	24.9 ± 0.5	42.6 ± 1.3	47.9 ± 11.0	23.9 ± 0.6	22.1 ± 2.8	21.3 ± 3.6
A2B1	0.469 + 3.125	36.6 ± 0.9	36.1 ± 3.2	39.0 ± 3.1	16.4 ± 3.5	12.5 ± 2.3	11.6 ± 0.9
A2B2	0.469 + 1.562	38.5 ± 2.5	32.4 ± 3.1	24.5 ± 2.6	4.2 ± 0.7	15.4 ± 1.2	13.7 ± 1.4
A2B3	0.469 + 0.781	17.1 ± 3.1 ³⁾	5.52 ± 1.1	25.3 ± 5.2	19.3 ± 1.9	14.9 ± 2.4	27.8 ± 3.8
A3B1	0.235 + 3.125	24.5 ± 3.1	24.9 ± 1.6	27.9 ± 2.0	21.9 ± 3.7	16.4 ± 0.7	9.3 ± 0.9
A3B2	0.235 + 1.562	31.1 ± 5.0	35.2 ± 3.8	23.2 ± 3.6	19.0 ± 6.3	20.7 ± 3.5	18.7 ± 1.9
A3B3	0.235 + 0.781	20.3 ± 5.3	18.7 ± 4.2	35.2 ± 5.8	22.3 ± 4.2	19.3 ± 3.4	21.1 ± 2.4
B1	3.125	25.0 ± 5.0	25.4 ± 5.1	25.8 ± 5.6	19.5 ± 3.2	16.9 ± 0.9 ¹⁾	9.8 ± 0.8 ²⁾
B2	1.562	35.0 ± 1.9	39.1 ± 1.8	27.1 ± 2.5	25.0 ± 4.2	24.6 ± 2.9	22.6 ± 3.2
B3	0.781	24.9 ± 2.3	23.3 ± 3.6	39.8 ± 5.6	26.9 ± 5.4	23.9 ± 5.2	25.7 ± 1.9
空白	-	18.7 ± 0.7	17.9 ± 0.8	19.9 ± 1.6	21.3 ± 5.0	20.3 ± 3.6	19.8 ± 3.4

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与复方甘草酸苷单独用药比较³⁾ $P < 0.05$ (表 4,5 同)。

3.2 肝龙胶囊与复方甘草酸苷联合对 LX-2 细胞中 Col-I, TIMP-1 mRNA 表达的影响 肝龙胶囊和复方甘草酸苷联合使用在 24 h 和 48 h 时对 Col-I mRNA 呈现抑制作用,但长时间观察 A1B3, A2B2, A2B3,

A3B1, A3B2 反而会增加其表达量;两者联合时对 TIMP-1 mRNA 表达的抑制作用较明显 ($P < 0.05$),且随时间的增加作用强度增加,并以 72 h 时效果显著 ($P < 0.01$),整体作用效果优于单独用药。见表 5。

表 4 复方甘草酸苷单用及联合肝龙胶囊对 LX-2 细胞 Col-I, TGF-β₁ 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of compound glycyrrhizin glucoside alone and combined with Ganlong capsule on content of Col-I, TGF-β₁ in LX-2 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	Col-I/μg·L ⁻¹			TGF-β ₁ /ng·L ⁻¹		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
A1B1	0.938 + 3.125	16.3 ± 1.2 ³⁾	16.7 ± 1.3 ³⁾	19.1 ± 2.0 ³⁾	1 213.2 ± 24.0	975.2 ± 32.2 ¹⁾	887.0 ± 28.6 ¹⁾
A1B2	0.938 + 1.562	21.2 ± 0.9 ³⁾	23.2 ± 0.7 ³⁾	22.0 ± 0.6 ³⁾	1 061.0 ± 18.1	1 073.4 ± 22.3 ¹⁾	1 011.8 ± 31.0 ¹⁾
A1B3	0.938 + 0.781	23.2 ± 0.9 ³⁾	23.8 ± 0.4 ³⁾	23.5 ± 0.8	960.3 ± 20.1 ³⁾	956.9 ± 19.0 ^{1, 3)}	788.8 ± 49.2 ^{1, 3)}
A2B1	0.469 + 3.125	25.1 ± 0.6 ³⁾	26.1 ± 0.5 ³⁾	26.4 ± 0.6	790.5 ± 45.0 ^{1, 3)}	812.1 ± 42.3 ^{1, 3)}	644.1 ± 32.8 ^{1, 3)}
A2B2	0.469 + 1.562	24.1 ± 0.4 ³⁾	28.2 ± 0.8	24.7 ± 0.7	930.3 ± 51.2 ³⁾	902.0 ± 31.5 ¹⁾	818.8 ± 47.2 ²⁾
A2B3	0.469 + 0.781	25.0 ± 2.1 ³⁾	30.1 ± 3.0 ³⁾	29.3 ± 4.3	1 343.0 ± 42.3	1 041.8 ± 21.0 ¹⁾	926.9 ± 42.5 ²⁾
A3B1	0.235 + 3.125	31.4 ± 2.6	34.1 ± 5.1	33.6 ± 2.3	903.6 ± 58.7	877.1 ± 24.7 ^{1, 3)}	818.8 ± 35.8 ²⁾
A3B2	0.235 + 1.562	32.7 ± 2.8	31.8 ± 3.9	37.1 ± 4.6	1 078.4 ± 45.8	888.7 ± 24.2 ¹⁾	867.1 ± 21.0 ²⁾
A3B3	0.235 + 0.781	27.9 ± 2.0	45.8 ± 5.9	36.2 ± 6.0	1 040.1 ± 44.2	1 071.7 ± 25.0	988.5 ± 30.6 ²⁾
B1	3.125	31.9 ± 1.9	34.6 ± 6.5	34.1 ± 1.9 ¹⁾	962.6 ± 37.6	936.1 ± 18.9 ¹⁾	877.8 ± 32.1 ²⁾
B2	1.562	36.6 ± 1.7	35.7 ± 3.1	41.0 ± 5.3	1 142.4 ± 121.2	952.7 ± 16.8 ¹⁾	931.1 ± 19.8 ¹⁾
B3	0.781	32.5 ± 2.3	50.4 ± 6.9	40.8 ± 4.8	1 092.1 ± 35.8	1 123.7 ± 45.0	1 040.5 ± 49.5 ¹⁾
空白	-	23.9 ± 3.5	37.2 ± 1.6	46.3 ± 5.8	951.9 ± 15.7	1 288.1 ± 37.4	1 835.7 ± 119.0

表 5 复方甘草酸苷单用及联合肝龙胶囊对 LX-2 细胞 Col-I 和 TIMP-1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 Effect of compound glycyrrhizin glucoside alone and combined with Ganlong capsule on expression of Col-I and TIMP-1 mRNA in LX-2 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量 /g·L ⁻¹	Col-I/β-actin			TIMP-1/β-actin		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
A1B1	0.938 + 3.125	0.39 ± 0.06 ^{1, 3)}	0.66 ± 0.05	0.58 ± 0.12	0.15 ± 0.03 ^{1, 3)}	0.11 ± 0.01 ^{1, 3)}	0.10 ± 0.02 ²⁾
A1B2	0.938 + 1.562	0.30 ± 0.04 ^{1, 3)}	0.30 ± 0.03 ^{1, 3)}	0.48 ± 0.07	0.18 ± 0.06 ^{1, 3)}	0.15 ± 0.05 ^{1, 3)}	0.19 ± 0.04 ²⁾
A1B3	0.938 + 0.781	0.39 ± 0.05 ^{1, 3)}	0.41 ± 0.12 ^{1, 3)}	0.93 ± 0.23	0.22 ± 0.02 ^{1, 3)}	0.12 ± 0.04 ^{1, 3)}	0.11 ± 0.03 ²⁾
A2B1	0.469 + 3.125	0.46 ± 0.11 ^{1, 3)}	0.49 ± 0.15	0.51 ± 0.13	0.27 ± 0.04 ^{1, 3)}	0.10 ± 0.02 ^{1, 3)}	0.08 ± 0.01 ^{2, 3)}
A2B2	0.469 + 1.562	0.42 ± 0.11 ^{1, 3)}	0.55 ± 0.14	0.92 ± 0.24	0.26 ± 0.07 ^{1, 3)}	0.26 ± 0.05 ¹⁾	0.17 ± 0.03 ²⁾
A2B3	0.469 + 0.781	0.48 ± 0.21 ³⁾	0.51 ± 0.18	1.07 ± 0.29	0.33 ± 0.09 ^{1, 3)}	0.27 ± 0.07 ^{1, 3)}	0.14 ± 0.04 ²⁾
A3B1	0.235 + 3.125	0.34 ± 0.08 ^{1, 3)}	0.88 ± 0.26	1.00 ± 0.21	0.26 ± 0.04 ^{1, 3)}	0.27 ± 0.06 ¹⁾	0.09 ± 0.08 ^{2, 3)}
A3B2	0.235 + 1.562	0.47 ± 0.13 ³⁾	0.49 ± 0.15	1.19 ± 0.32	0.29 ± 0.06 ^{1, 3)}	0.13 ± 0.05 ^{1, 3)}	0.17 ± 0.02 ²⁾
A3B3	0.235 + 0.781	0.58 ± 0.13	0.56 ± 0.12	0.66 ± 0.11	0.30 ± 0.03 ^{1, 3)}	0.16 ± 0.04 ^{1, 3)}	0.16 ± 0.03 ²⁾
B1	3.125	0.69 ± 0.04	0.54 ± 0.10	0.55 ± 0.11	0.29 ± 0.08 ¹⁾	0.24 ± 0.06	0.15 ± 0.04 ²⁾
B2	1.562	0.60 ± 0.07	0.62 ± 0.05	0.61 ± 0.06	0.38 ± 0.11	0.31 ± 0.05	0.16 ± 0.04 ²⁾
B3	0.781	0.70 ± 0.16	0.57 ± 0.13	0.65 ± 0.09	0.44 ± 0.12	0.35 ± 0.09	0.15 ± 0.02 ²⁾
空白	-	0.71 ± 0.20	0.73 ± 0.15	0.69 ± 0.09	0.51 ± 0.13	0.54 ± 0.12	0.52 ± 0.08

4 讨论

肝脏疾病威胁着人类的健康,肝纤维化是慢性肝病向肝硬化发展的中间环节,是 ECM 过度积累的结果。肝星状细胞是产生 ECM 的主要细胞,肝星状细胞的激活,ECM 的产生和消除、促纤维化因子表达、炎症因子分泌等都和肝纤维化的发生发展密切相关^[18]。因此,通过采取抑制肝星状细胞活化,抑制促纤维化因子和炎症反应产生,促进 ECM 降解等措施都有望能阻止或逆转肝纤维化的发生发展。

目前,肝组织活检是诊断肝纤维化的标准,但是存在创伤、出血、感染等许多缺点,于是以血清指标的无创诊断便具有重要的意义。ECM 的主要成分是 PCIII, IV-C, Col-I, LN, HA。伴随着肝纤维化的形成,各种 ECM 和促纤维化因子等会有相应的含量变化。研究发现肝纤维化指标 HA, PCIII, IV-C 水平与纤维化肝程度具有正相关的关系,能反映肝纤维化的程度^[19-21]。故检测 ECM 产物含量变化便可对纤维化作出评估。

具有抗炎、抗病毒、保护肝功能等作用的复方甘草酸苷主要由半胱氨酸、甘氨酸、甘草酸一铵组成。复方甘草酸苷能降低慢性乙型肝炎患者血清中 LN, HA, PCIII, IV-C 的水平,减轻患者的肝纤维化及炎症反应,进而改善肝功能^[22]。本研究中,肝龙胶囊联合复方甘草酸苷显著降低 TGF- β_1 , LN, HA, Col-I 的含量,使 ECM 减少,改善肝纤维化,其抗肝纤维化作用可能是阻断了 TGF- β_1 /Smad 信号传导通路实现的。本研究结果与陈家斌^[23]和陈暉^[24]的研究结果相近,表明其他抗肝炎药物联合复方甘草酸苷能有效改善肝纤维化程度,控制肝纤维化指标,保护肝细胞。对于 PCIII, IV-C,在高浓度联合条件下抑制效果较好,而且在 24 h 时抑制作用明显。对 Col-I mRNA 的影响,高浓度联合时抑制作用明显,低浓度时抑制不明显。对 TIMP-1 mRNA 的影响,效果显著优于单独用药,且呈现时间依赖性。本研究中,肝龙胶囊增强复方甘草酸苷的抗肝纤维化作用,两者具有较强的协同作用。

[参考文献]

[1] Novo E, Cannito S, Paternostro C, et al. Cellular and molecular mechanisms in liver fibrogenesis [J]. Arch Biochem Biophys, 2014, 548(1): 20-37.

[2] Duval F, Moreno-cuevas J E, Gonzalez-garza M T, et al. Liver fibrosis and protection mechanisms action of medicinal plants targeting apoptosis of hepatocytes and hepatic stellate cells [J]. Adv Pharmacol Sci, 2014, doi: 10.1155/2014/373295.

[3] 戴晨曦,马翠,宋丽娟,等.我国乙型病毒性肝炎流行趋势的动力学模型拟合分析[J].第三军医大学学报,2015,37(22):2301-2306.

[4] 张朝阳,路霞,王慧欣,等.解郁软坚活血颗粒联合西药治疗乙型肝炎代偿期肝硬化 86 例临床观察[J].河北中医,2015,37(10):1498-1500.

[5] 张清.逍遥散加丹参和鳖甲联合恩替卡韦对慢性乙型肝炎肝纤维化患者的临床疗效[J].中国医药导报,2015,12(21):135-138.

[6] Matsumoto Y, Matsuura T, Aoyagi H, et al. Antiviral activity of glycyrrhizin against hepatitis C virus *in vitro* [J]. PLoS One, 2013, 8(7): e68992.

[7] 张颖,王颖.复方甘草酸苷的临床应用及其不良反应[J].临床合理用药杂志,2012,5(17):160.

[8] 李宇驰,徐妍,杨永寿,等. HPLC 法测定肝龙胶囊中肌苷的含量[J].大理大学学报,2016,15(12):40-42.

[9] 杜一民,李楠,陈鸿珊,等.新药肝龙胶囊对雏鸭体内鸭乙型肝炎病毒的抑制效果[J].大理学院学报,

2006,5(4):6-8.

[10] 张旭强,吴红兵,彭丽,等.肝龙胶囊对大鼠慢性酒精性肝损伤的防治作用研究[J].中国中药杂志,2013,38(13):2197-2201.

[11] 彭家乐,禹正杨.美洲大蠊提取物药理作用及临床应用研究进展[J].医药前沿,2014,4(32):347-348.

[12] 余昕,周洁,欧丽兰,等.美洲大蠊不同提取物及不同提取方法对肿瘤细胞的细胞毒性作用[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(15):153-156.

[13] ZHANG H W, WEI L Y, ZHAO G, et al. Periplaneta americana extract used in patients with systemic inflammatory response syndrome [J]. World J Emerg Med, 2016, 7(1): 50-54.

[14] 黄非.美洲大蠊提取物药理作用的研究进展[J].基层医学论坛,2017,21(1):106-108.

[15] 夏超,王佳佳,李芳群,等.美洲大蠊水提取物对免疫性肝纤维化大鼠的保护作用[J].安徽医科大学学报,2016,51(2):199-204.

[16] 王艳荣,王利娜,张秋瓚,等.美洲大蠊提取物对实验性肝纤维化大鼠的保护作用[J].天津医药,2013(12):1195-1198.

[17] 郝芳芳,李春艳,赖泳,等.美洲大蠊对免疫性肝纤维化大鼠肝功能的影响[J].安徽农业科学,2012,40(18):9715-9716.

[18] SU T H, KAO J H, LIU C J. Molecular mechanism and treatment of viral hepatitis-related liver fibrosis [J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(6): 10578-10604.

[19] 陈丽,邓泽虎.透明质酸、III型前胶原及IV型胶原水平与肝纤维化程度的相关性研究[J].检验医学与临床,2016,13(12):1659-1660.

[20] Hassan S, Syed S, Kehar S I. Review of diagnostic techniques of hepatic fibrosis [J]. J Pak Med Assoc, 2014, 64(8): 941-945.

[21] Neuman M G, Cohen L B, Nanau R M. Hyaluronic acid as a non-invasive biomarker of liver fibrosis [J]. Clin Biochem, 2016, 49(3): 302-315.

[22] 彭福江,张天晓,袁美蓉.复方甘草酸苷对慢性乙型肝炎患者肝功能、肝纤维化指标及炎症因子的影响[J].海南医学院学报,2017,23(4):485-488.

[23] 陈家斌.恩替卡韦联合复方甘草酸苷治疗代偿期乙型肝炎肝硬化的临床疗效[J].医学综述,2016,22(11):2286-2288.

[24] 陈暉.复方丹参注射液联合复方甘草酸苷对乙肝肝纤维化指标的影响[J].牡丹江医学院学报,2016,37(4):45-46.

[责任编辑 周冰冰]