基础研究 文章编号:0253-3626(2009)11-1491-04

甘草甜素类药对化学损伤人肝细胞的保护作用比较

张 群[1],张丽峰[2],陈 鹏[3],孙华丽[3],张建军[3]

(1.东南大学附属中大医院感染病科,南京 210009;2.成都中医药大学附属医院血管外科,成都 610072;3.泸州医学院附属医院感染病科,泸州 646000)

【摘 要】目的:研究 4 种(3 类)甘草甜素药物对半乳糖胺(D-GalN)和四氯化碳(CCl_4)损伤培养人肝细胞(L-02)的保护作用及差异,筛选出疗效好的药物,指导临床应用。方法:培养 L-02,用复方甘草酸单铵(Compound ammonium glycyrrhizin, CAG)、复方甘草酸苷(Compound glycyrrhizin,CG)、甘草酸二铵(Diammonium glycyrrihizinate,DG)和异甘草酸镁(Magnesium isoglycyrr hizinate, MI)分别进行保护,再经 D-GalN 或 CCl4 处理。观察肝细胞生长状态、测定 AST 及 LDH 酶活力、测定细胞内谷胱甘肽(GSH)含量。从而评价 CAG、CG、DG 和 MI 对 D-GalN 和 CCl_4 损伤 L-02 细胞的保护作用。结果:浓度为 1 mg/ml 时,CAG、CG、DG 和 MI 均能显著抑制 D-GalN 和 CCl_4 所致的 AST 及 LDH 释放,提高细胞的存活率。其中 CAG 抑制 D-GalN 所致的 AST 效果显著优于 CG、DG 和 MI($P<0.05$);CAG 抑制 CCl4 所致的 AST 及 LDH 释放的效果显著好于 DG 和 MI;CG 抑制 D-GalN 所致的 AST 和 LDH 释放效果显著($P<0.05$)好于 MI。浓度为 1 mg/ml 的 CAG、CG、DG 和 MI 4 种药物均能显著抑制 2 种化学损伤细胞内的 GSH 降低,其中 CAG 效果最明显($P<0.05$)。结论:1 mg/ml 的 CAG、CG、DG 和 MI 4 种药物对 D-GalN 和 CCl_4 致人肝细胞损伤均有保护作用,其机制可能与抑制 GSH 降低相关。4 种甘草甜素药物,CAG 保护肝细胞效果最为显著,CG、DG 和 MI 作用依次减低。

【关键词】半乳糖胺;四氯化碳;甘草甜素;肝细胞;药物作用

【中国图书分类法分类号】R965.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-08-18

Comparison of protective effect of glycyrrhizin drugs on human hepatocytes injured by D-galactosamine and carbon tetrachloride

ZHANG Qun, et al

(*Department of Infectious Diseases, the Affiliated Zhongda Hospital, Southeast University*)

【Abstract】*Ojective*: To investigate the effects and the differences of the four (3 categories) glycyrrhizin drugs in protecting human hepatocytes (L-02) from the injury of galactosamine (D-GalN) and carbon tetrachloride (CCl_4), and to screen a better one for clinical application. *Methods*: The cultured L-02 were pre-treated with compound ammonium glycyrrhizin(CAG), compound glycyrrhizin(CG), diammonium glycyrrihizinate(DG) and magnesium isoglycyrrhizinate(MI), respectively, for protecting these cells from the injury made with CCl4 or D-GalN. Then, the liver cell growth status were observed, and the AST and LDH enzyme activity in the cultural supernatant were determined, and cellular glutathione(GSH) content in the cultural supernatant were tested. All the values above were analyzed to compare the protective effects of the four glycyrrhizin drugs. *Results*: At the concentration of 1mg/ml, the four glycyrrhizin drugs could improve the survival rate of cells, and significantly inhibit release of AST and LDH induced by D-GalN or CCl_4. Moreover, the inhibition effect of CAG on AST release induced by D-GalN was significantly($P<0.05$) better than that of CG, DG and MI, and the inhibition effects of CAG on AST and LDH release induced by CCl_4 were significantly($P<0.05$) better than those of CG, DG and MI. The inhibition effects of CG on AST and LDH release induced by D-GalN were significantly($P<0.05$) better than that of MI. At the Concentration of 1 mg/ml, the four glycyrrhizin drugs could increase the decreased cell mitochondrial membrane potential caused by D-GalN or CCl_4. These four glycyrrhizin drugs could significantly inhibit the intracellular GSH abatement induced by D-GalN or CCl_4. Of which, CAG had the most significant effect($P<0.05$), and CG was better than MI($P<0.05$). *Conclusions*: At the concentration of 1 mg/ml, the four glycyrrhizin drugs have protective effects on the D-GalN or CCl_4 injured human hepatocytes. The mechanism of these protective effects may be increasing of the intracellular GSH abatement. Among the four glycyrrhizin drugs, CAG has the most significant effect for hepatocytes, and the effects were reduced in the order of CG, DG, and MI.

作者介绍:张 群(1976-),女,硕士,研究方向:感染病学。

通讯作者:张建军,男,教授,E-mail:zhangjianjun2535@163.com。

【Key words】Galactosamine; Carbon tetrachloride; Glycyrrhizin; Hepatocyte; Drug effects

甘草甜素类药物是目前临床常用的保肝药。其具有抗炎、抗氧化、抗肝脏毒物、稳定细胞膜、抗肝纤维化、调节免疫、抑制 Ca^{2+}内流、防止细胞凋亡以及增加内源性类固醇产生等多种功效，是其肝细胞保护作用的重要机制[1-4]。目前临床使用于护肝的甘草甜素类药物种类和制剂有多种，但缺乏相同条件下效果的比较研究。本研究以体外培养人肝细胞(L-02)作为护肝药物研究体系，比较不同甘草甜素类药物对半乳糖胺(D-GalN)或四氯化碳(CCl_4)损伤人肝细胞(L-02)的保护作用之间差别。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

L-02 株购自川大华西医院；CAG 为赤峰蒙欣药业公司产品，CG 购自日本米诺发源制药株式会社，DG、MI 为正大天晴公司产品；胎牛血清和 RPMI-1640 培养基为 Hyclone 产品，D-GalN 为 BIO BAsic INC 产品，CCl_4 为重庆博艺化学试剂公司产品；全自动生化仪(日立 7600)，酶标仪(Bio-Tek ELX800)，荧光分光光度计(Leica wetzar)。

1.2 实验方法

1.2.1 甘草甜素药物的配制和处理 参照甘草甜素研究文献[5]，药物浓度在 1 mg/ml 至 10 mg/ml 护肝效果最佳。本研究取 4 种甘草甜素药物原液和胎牛血清，按 9:1 的剂量加入细胞上清中，使甘草甜素药的终浓度分别为 0.01、0.1、1 mg/ml 3 组，用于构建肝细胞保护体系。不同终浓度(见上述)的 CAG、CG、DG、MI 于细胞预培养 24 h 后加入。

1.2.2 L-02 细胞培养和 D-GalN 和 CC14 处理 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液调细胞密度为 2×10^5 个 /ml，接种于 96 孔培养板，置 5 %CO_2 孵箱中培养 24 h 后分别加入 CAG、CG、DG、MI 并形成不同药物的终浓度(见上述)，再用以 D-GalN 2 mmol/L 浓度共培养 24 h；或 CC14 10 mmol/L 浓度共培养 2 h 后进行相关检测。此损伤模型条件经预试验确定。

1.2.3 甘草甜素药物护肝作用评价 倒置显微镜观察肝细胞生长状态；全自动生化分析仪测定 AST 和 LDH 酶活性；参照 Hadley 方法测定 GSH 含量。

1.3 统计学处理

此实验为 3 复孔设计，所有数据以均数士标准差($\bar{x}\pm s$)表示。采用 SPSS 16.0 for Windows 中的 ANOVA 对组间差异进行统计分析，$P\leq0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 4 种甘草甜素药物对 D-GalN 损伤 L-02 的保护作用及差异

D-GalN 与 L-02 细胞共同培养后，AST 和 LDH 释放增加。用 CAG、CG、DG 和 MI 处理后，细胞贴壁率增加，呈条索状，提示 4 种药物均改善了 L-02 的生长状态。

CAG、CG、DG 和 MI 浓度在 1 mg/ml 明显抑制 AST($P<0.05$)和 LDH($P<0.05$)释放，且以 CAG 效果最显著($P<0.05$)。4 种甘草甜素药浓度在 0.1、0.01 mg/ml 时与模型组比较无明显肝细胞保护作用(见表1)。

表 1 4 种甘草甜素药对 D-GalN 损伤 L-02 AST 和 LDH 释放作用

组 别	n	D-GalN(2 mmol/L)	药物浓度(mg/ml)	AST(U/L)	LDH(U/L)
溶剂对照	3	-	0.00	16.37 ± 3.54	122.83 ± 28.94
D-GalN 模型	3	+	0.00	56.80 ± 3.08	208.60 ± 31.97
		+	1.00	13.57 ± 6.09**	122.33 ± 24.42*
CAG	3	+	0.10	46.63 ± 2.40*▲▲	192.03 ± 21.08▲
		+	0.01	50.10 ± 2.88▲▲	182.03 ± 15.96▲
		+	1.00	32.53 ± 1.84**▲▲	146.50 ± 14.10*
CG	3	+	0.10	45.30 ± 4.04*▲▲	196.53 ± 21.00▲
		+	0.01	45.37 ± 3.92*▲▲	203.20 ± 23.25▲
		+	1.00	35.23 ± 4.93**▲▲	155.30 ± 24.52
DG	3	+	0.10	49.60 ± 0.82*▲▲	198.03 ± 16.52▲
		+	0.01	47.33 ± 4.78*▲▲	196.73 ± 12.09▲
		+	1.00	39.50 ± 0.82**▲▲	160.17 ± 16.78
MI	3	+	0.10	48.93 ± 3.23*▲▲	202.17 ± 22.91▲
		+	0.01	48.30 ± 1.80*▲▲	201.83 ± 21.89▲

注：* 与模型 D-GalN 组比较 *$P<0.05$，** $P<0.01$ ▲与溶剂对照组比较▲$P<0.05$，▲▲$P<0.01$

2.2 4 种甘草甜素药物对 CCl_4 损伤 L-02 的保护作用及差异

CCl_4 与 L-02 共同培养后，细胞活性显著降低，AST 和 LDH 释放增加。用 CAG、CG、DG 和 MI 处理后，死亡细胞减少，细胞贴壁率增加，改善了细胞生长状态，1 mg/ml 浓度的 4 种甘草甜素药均显著降低 AST($P<0.05$)释放和 LDH($P<0.05$)释放，CAG 效果最明显($P<0.05$)；而 CG、DG 和 MI 3 者之间两两比较，无显著统计学差异(见表 2)。

2.3 4 种甘草甜素药物对 GSH 的影响及差异

浓度为 1 mg/ml 的 CAG、CG、DG 和 MI 均能显著抑制 CCl_4 和 D-GalN 所致 L-02 的 GSH 降低($P<0.05$)，观察 4 种药物的相互比较统计表及均数图，示 CAG 效果最明显($P<0.05$)，CG 次之、且护肝效果明显好于 DG 和 MI($P<0.05$)，DG 与 MI 比较，护肝作用无显著差异(见表 3)。

表 2 4 种甘草甜素药对 CCl_4 损伤 L-02 AST 和 LDH 释放作用

组 别	n	CCl_4(10 mmol/L)	药物浓度(mg/ml)	AST(U/L)	LDH(U/L)
溶剂对照	3	−	0.00	12.67 ± 1.76	110.67 ± 20.50
CCl_4 模型	3	+	0.00	69.73 ± 19.80	252.57 ± 85.77
		+	1.00	11.27 ± 2.07**	57.20 ± 10.89*▲
CAG	3	+	0.10	50.63 ± 7.89▲▲	215.73 ± 67.19
		+	0.01	50.47 ± 4.99▲▲	230.53 ± 65.80▲
		+	1.00	20.23 ± 7.26*	119.47 ± 28.52
CG	3	+	0.10	48.17 ± 1.63▲▲	234.30 ± 62.42▲
		+	0.01	48.73 ± 2.76▲▲	232.87 ± 69.82▲
		+	1.00	26.97 ± 1.76*▲▲	145.30 ± 10.23
DG	3	+	0.10	51.27 ± 0.64▲▲	239.80 ± 65.87▲
		+	0.01	53.83 ± 1.19▲▲	235.43 ± 41.71▲
		+	1.00	34.47 ± 5.34*▲▲	149.17 ± 17.43
MI	3	+	0.10	55.40 ± 4.29▲▲	233.10 ± 56.33▲
		+	0.01	59.70 ± 6.34▲▲	230.90 ± 64.90▲

注：* 与模型 CCl_4 组比较 *$P<0.05$，** $P<0.01$ ▲与溶剂对照组比较▲$P<0.05$，▲▲$P<0.01$

表 3 4 种甘草甜素药物对 GSH 的影响

组别	n	药物浓度(mg/ml)	GSH	
			CCl_4	D-GalN
溶剂对照	3	0.00	6.90 ± 1.04	8.03 ± 0.15
模型	3	0.00	3.33 ± 0.40	3.77 ± 0.45
		1.00	7.59 ± 1.27**	7.93 ± 0.36**
CAG	3	0.10	3.97 ± 0.32▲	4.27 ± 0.25▲▲
		0.01	3.90 ± 0.46▲	4.17 ± 0.15▲▲
		1.00	6.13 ± 10.49**	6.57 ± 0.98*
CG	3	0.10	4.17 ± 0.06▲	4.13 ± 0.15▲▲
		0.01	3.90 ± 0.20▲	4.33 ± 0.49▲▲
		1.00	5.17 ± 0.06*	5.67 ± 0.55*▲▲
DG	3	0.10	3.73 ± 0.31▲▲	4.13 ± 0.35▲▲
		0.01	3.70 ± 0.36▲▲	4.20 ± 0.26▲▲
		1.00	5.23 ± 0.70*	5.40 ± 0.52*▲▲
MI	3	0.10	3.33 ± 0.29▲▲	4.10 ± 0.20▲▲
		0.01	3.40 ± 0.17▲	3.87 ± 0.42▲▲

注：* 与模型组比较 *$P<0.05$，** $P<0.01$ ▲与溶剂对照组比较▲$P<0.05$，▲▲$P<0.01$

3 讨 论

本实验检测了 D-GalN[6]和 CCl_4[7]处理 L-02 细胞活性、ALT 和 AST 的时、量效特征。D-GalN 2 mmol/l 处理 24 h,$CCl_4$10 mmol/l 处理 2 h 对细胞活性抑制率接近 50%,ALT 和 LDH 释放显著增加。以此构建 L-02 2 种化学损伤模型,用于药物护肝作用的研究。

肝脏是物质代谢的中心,当肝功能受损时,物质代谢过程受到障碍,很多酶就会从肝脏逸出[8]。本研究结果表明,浓度为 1 mg/ml 的 CAG、CG、DG、MI 4 种药物均可显著抑制两种损伤模型 AST 和 LDH 升高,证明甘草甜素类药物在抗氧化、抗肝脏毒性、稳定细胞膜方面功效显著[9],其中以 CAG 护肝效果最为明显。

肝细胞内 GSH 减少,提示肝细胞损伤伴随氧化还原态被破坏。细胞内恒定的 GSH 浓度是保持细胞稳定氧还原电位的前提,与细胞生命活动正常进行密切相关,氧还原电位降低将触发细胞凋亡[10],本研究结果证明了 4 种药物可改善细胞内 GSH 降低,提高细胞存活率。上述 4 种药物对损伤 L-02 保护作用,以 CAG 最为显著。

综上所述,4 种甘草甜素药均能显著改善肝功能,从不同层面起到肝细胞的保护作用,以 CAG 对肝细胞的保护制剂最为显著,CG、DG、MI 作用依次减低。4 种甘草甜素药物差异主要为有效成分甘草酸分子结构式的不同,以及甘氨酸、盐酸半胱氨酸的含量不同。第二代甘草甜素药 CAG 和 CG 是以 β 体甘草酸单铵为主要成分,还含有甘氨酸和盐酸半胱氨酸,第三代甘草甜素药 DG 是 α 体甘草酸二铵盐,不含有甘氨酸和盐酸半胱氨酸,第四代甘草甜素药 MI 为单一 18-α 异构体,也不含有甘氨酸和盐酸半胱氨酸。甘氨酸主要用以对抗甘草酸单铵的水钠潴留作用,近年来研究显示,甘氨酸具有抗炎、免疫调节和细胞保护等作用,动物实验表明,它在缺血再灌注损伤、休克、酒精性肝炎、肝硬化、关节炎、急性坏死性胰腺炎、肿瘤和药物中毒等多种疾病中发挥有效的治疗作用,目前其作用机制尚不明确,可能通过抑制钙离子信号的传导、阻止炎性细胞的激活、减少氧自由基和其他毒性因子的合成、降低肿胀细胞胞膜的通透性等多种机制发挥辅助性或协同性的保护作用;盐酸半胱氨酸具有解毒功能,参与细胞的还原过程和肝脏内的磷脂代谢,能保护肝细胞不受损害。CAG 因含有甘氨酸和盐酸半胱氨酸比例较高,可能使其较 CG、DG、MI 具有更好的肝细胞保护作用。至于是否因甘草酸分子结构式不同,导致四种甘草甜素药护肝作用存在差异,目前尚不能定论,需要进一步深入研究。

参 考 文 献

[1] 姜兆金,雷明君.甘草酸二铵联合复方丹参治疗慢性乙型肝炎肝纤维化的临床研究[J].肝脏,2007,12(2):159-160.

[2] 祖红梅.甘草酸二铵治疗抗痨药物性肝损害的疗效观察[J].中国实用医药,2008,3(3):92-93.

[3] 孟繁平,李悍卫,赵 平,等.异甘草酸镁辅助治疗慢性乙型肝炎的临床观察[J].肝脏,2007,12(4):318-319.

[4] 黄剑峰.异甘草酸镁的药理作用与临床评价[J].中外健康文摘,2007,10(4):103-104.

[5] 陈尉华,徐中南,陆伦根,等.异甘草酸镁对培养肝细胞增殖影响的实验研究[J].肝脏,2006,11(1):15-17.

[6] 李国涛,陈国民.D-半乳糖胺研究的回顾和展望[J].肝脏,2004,3(9):209-210.

[7] 汪 涛,姜 华,陆国才,等.四氯化碳肝脏毒性机制的研究进展[J].毒理学杂志,2007,4(21):338-339.

[8] 鞠 洋,骆 勤,党月兰.红毛五加多糖对四氯化碳肝损伤大鼠的保护作用[J].中药药理与临床,2005,21(3):25-26.

[9] Angeh J E,Huang X,Sattler I,et al.Antimicrobial and anti-inflammatory activity of four known and one new triterpenoid from combretum imberbe (combretaceae) [J]. J Ethnopharmacol,2007,110(1):56-60.

[10] Han D,Hanawa N,Saberi B,et al.Mechanisms of liver injury 111: Role of glutathione redox status in liver injury[J].Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,2006,291(1):G1-G7.

(责任编辑:冉明会)