

甘草酸对非酒精性脂肪性肝炎大鼠治疗效果研究

周文丽

摘要 **目的** 研究甘草酸对非酒精性脂肪性肝炎(NASH)大鼠的治疗效果及其作用机制。**方法** 雄性SD大鼠40只随机分为5组:正常组,模型组,低、中、高剂量甘草酸治疗组(60、120、180mg/kg),以高脂饮食喂养16周构建大鼠NASH模型,于造模第7周起进行不同剂量甘草酸治疗10周,HE染色观察肝组织病理学变化,并对总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)及还原型谷胱甘肽(GSH)进行检测。**结果** 高脂饮食诱导的NASH大鼠模型中,肝组织可见肝细胞脂肪病变,血清中TC、TG、LDL-C、AST、ALT及MDA明显升高,HDL-C、SOD及GSH显著降低;而经过中、高剂量甘草酸治疗后发现,肝细胞脂肪病变程度降低,血清中TC、TG、LDL-C、AST、ALT及MDA明显降低,HDL-C、SOD及GSH明显升高,与模型组相比差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 甘草酸能够经过抑制氧化应激损伤、改变血脂水平来改善NASH大鼠肝功能及抑制肝脏病变程度,对NASH治疗具有潜在的临床意义。

关键词 甘草酸 非酒精性脂肪性肝炎 血脂 氧化应激

中图分类号 R9 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.09.034

Therapeutic Efficacy of Glycyrrhizic Acid on Rats with Non Alcoholic Steatohepatitis. Zhou Wenli. Department of Pharmacy, Tongji Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Hubei 430030, China

Abstract **Objective** To study the therapeutic efficacy and the mechanism of glycyrrhizic acid on rats with non alcoholic steatohepatitis (NASH). **Methods** A total of 40 male Sprague Dawley rats were randomly divided into five groups, including control group, model group, low-, middle-, and high-dose of glycyrrhizic acid groups. Rats were given high-fat diet for 16 weeks to construct the NASH model. Since the seventh week after the model establishment, the rats were treated with 60, 120, 180mg/kg glycyrrhizic acid for ten weeks. The pathologic changes in hepatic tissues were investigated with HE staining. The levels and activity of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), aspartate transferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), malonaldehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) were determined. **Results** The rats in the model group had aggravated hepatic fatty degeneration, increased TC, TG, LDL-C, AST, ALT and MDA, decreased HDL-C, SOD and GSH compared with control group ($P < 0.05$). After treatment with middle- and high-dose of glycyrrhizic acid, the rats in the glycyrrhizic acid group had decreased hepatic fatty degeneration, decreased TC, TG, LDL-C, AST, ALT and MDA, increased HDL-C, SOD and GSH compared with model group ($P < 0.05$). **Conclusion** Glycyrrhizic acid therapy can improve lipid metabolism disorder, and anti-lipid peroxidation in rats with non alcoholic steatohepatitis, and it has a potential clinical significance for the treatment of NASH.

Key words Glycyrrhizic acid; Non alcoholic steatohepatitis; Lipids; Oxidative stress

非酒精性脂肪性肝炎(non alcoholic steatohepatitis, NASH)为一种发生率较高的肥胖相关的代谢性疾病,其发病机制尚未完全研究清楚。前期报道氧化应激是导致NASH发生与发展的关键环节^[1]。于是,抑制氧化应激损伤是NASH防治或治疗的关键^[2]。NASH是成人和儿童慢性肝病的主要原因之一,可能会进一步加剧演变为肝纤维化、肝硬化及后期的肝

癌,并且流行病学调查发现NASH在我国的发生率越来越高^[3-6]。甘草酸(glycyrrhizic acid)主要提取于甘草植物的根茎,其表现出较好的医疗保健功能,可以调控物质代谢、调节酶活性、抗病毒、抗氧化应激损伤及参与免疫调节等作用^[7,8]。近年来研究发现,甘草酸在抗肝纤维化、抗氧化应激和抗肿瘤等方面表现出良好的效果^[9,10]。并且本实验室早期也研究表明甘草酸通过抗氧化作用来抑制肝纤维化细胞的增殖,免疫印迹实验结果发现甘草酸可以诱导Nrf2向细胞核内的转移,促使OH-1的表达^[11]。因此,笔者进

一步研究了甘草酸对 NASH 大鼠肝组织氧化应激损伤的影响,为 NASH 中药治疗提供新思路。

材料与方法

1. 材料:雄性 SD 大鼠 40 只,平均体重 $140 \pm 8\text{g}$,购自北京维通利华实验动物有限公司。甘草酸(美国 Sigma 公司,批号 AP20111024, $\geq 99\%$)。TC、TG、HDL - C、LDL - C、AST、ALT、MDA、SOD 及 GSH 试剂盒购自上海赢公生物技术有限公司。高脂饮食含 2% 胆固醇自制。

2. 方法:40 只雄性 SD 大鼠安置动物房,适应环境 1 周后进行分组,总分为 5 组,每组 8 只,模型组大鼠给予高脂饮食,低、中、高剂量甘草酸(60、120、180mg/kg)治疗组在高脂饮食喂养 7 周开始进行给药治疗 10 周。SD 大鼠给予充足食物和饮用水,饲养温度为 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 。16 周处死动物,采用 3% 戊巴比妥钠进行麻醉,并采用眶取血,然后处死大鼠,取出肝组织后进行后续实验研究。

3. 相关指标的分析方法:采用西门子全自动生化分析仪检测血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高

密度脂蛋白胆固醇(HDL - C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL - C)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)及丙氨酸氨基转移酶(ALT)指标;利用硫代巴比妥酸荧光法分析肝组织中丙二醛(MDA)含量;盐酸羟胺分析超氧化物歧化酶(SOD)活性;DTNB 法直接检测还原型谷胱甘肽(GSH)活性;石蜡切片进行 HE 染色后进行肝组织病理学分析。

4. 统计学方法:采用 SPSS 20.0 统计学软件进行统计分析,组间差异利用单因素方差分析进行统计,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 肝脏组织病理学检测结果:HE 染色后光镜下观察肝组织细胞形态,发现模型组大鼠肝组织可见肝细胞脂肪病变,小叶内炎症显著并存在点状坏死灶,还发现局部的肝细胞气球样变;经过不同浓度甘草酸治疗后发现大鼠肝组织脂肪病变和炎症分布与模型组相似,但是随着剂量的升高,病变也表现出不同程度的降低,如图 1 所示。

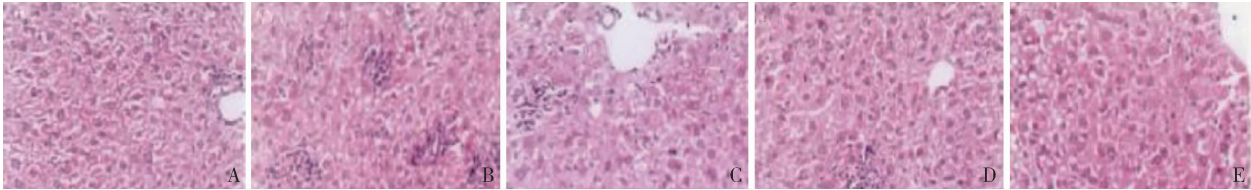


图 1 甘草酸对非酒精性脂肪性肝炎大鼠肝组织变的病理学影响(HE, $\times 400$)

A. 正常对照组;B. 模型组;C. 甘草酸低剂量组;D. 甘草酸中剂量组;E. 甘草酸高剂量组

2. 血脂及肝功能指标检测结果:各组大鼠血清中血脂(TC、TG、HDL - C、LDL - C)水平及肝功能指标(AST、ALT)检测结果如表 1。与对照组比较,模型组大鼠血清中 TC、TG、LDL - C、AST 及 ALT 明显升高,HDL - C 水平显著降低,差异有统计学意义($P <$

0.05)。经过不同浓度的甘草酸治疗后发现,大鼠血清中 TC、TG、LDL - C、AST 及 ALT 有下降趋势,而 HDL - C 水平表现出上升趋势;特别在中、高剂量组中趋势更为明显,它们与模型组相比上述指标的差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 甘草酸对非酒精性脂肪性肝炎大鼠血脂及肝功能指标影响

组别	大鼠数(只)	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL - C (mmol/L)	LDL - C (mmol/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)
对照组	8	1.96 ± 0.35	0.67 ± 0.14	1.24 ± 1.09	0.41 ± 0.15	84.3 ± 13.8	41.5 ± 17.4
模型组	8	$3.25 \pm 0.67^*$	$1.69 \pm 0.19^*$	$0.61 \pm 1.22^*$	$0.94 \pm 0.14^*$	$224.3 \pm 29.7^*$	$119.2 \pm 20.5^*$
甘草酸低剂量组	8	3.04 ± 0.62	1.35 ± 0.17	0.66 ± 1.21	$0.79 \pm 0.13^\#$	197.4 ± 27.4	101.5 ± 17.6
甘草酸中剂量组	8	$2.68 \pm 0.51^\#$	$1.04 \pm 0.14^\#$	$0.89 \pm 1.15^\#$	$0.64 \pm 0.12^\#$	$148.6 \pm 22.6^\#$	$75.8 \pm 17.5^\#$
甘草酸高剂量组	8	$2.17 \pm 0.39^\#$	$0.75 \pm 0.11^\#$	$1.21 \pm 1.11^\#$	$0.48 \pm 0.16^\#$	$97.8 \pm 17.5^\#$	$51.9 \pm 15.8^\#$

与对照组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, $^\#P < 0.05$

3. 氧化应激指标水平变化:各组大鼠氧化应激指标(MDA、SOD、GSH)检测结果如表 2。与对照组比

较,模型组大鼠 MDA 水平明显升高,SOD、GSH 活性则显著降低,它们之间比较差异均有统计学意义(P

<0.05)。经过低、中、高剂量的甘草酸治疗后发现,大鼠 MDA 水平有下降趋势,而 SOD、GSH 表现出上升趋势;特别在中、高剂量组中更为明显,它们与模型组相比上述指标的差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 甘草酸对非酒精性脂肪性肝炎大鼠氧化应激指标的影响

组别	大鼠数 (只)	MDA ($\mu\text{mol/L}$)	SOD (IU/g)	GSH (mg/g)
对照组	8	4.26 ± 1.17	224.3 ± 25.4	52.5 ± 6.4
模型组	8	9.68 ± 1.35 [*]	105.3 ± 14.2 [*]	21.5 ± 3.3 [*]
甘草酸低剂量组	8	8.57 ± 1.32	135.6 ± 16.7 [#]	29.8 ± 3.8
甘草酸中剂量组	8	7.05 ± 1.24 [#]	178.5 ± 18.4 [#]	39.7 ± 4.6 [#]
甘草酸高剂量组	8	5.01 ± 1.18 [#]	211.3 ± 24.6 [#]	48.1 ± 6.0 [#]

与对照组比较,^{*} $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$

讨 论

甘草酸安全无毒、热能低及溶血作用低等特性,在医疗保健及化妆行业应用较为广泛^[12]。其作用机制主要与激素受体结合,组织 Ca^{2+} 内流,活化或者抑制酶活性,从而调控物质代谢,调节胆碱能神经的兴奋性,有显著的抗氧化应激损伤等功效;并且在临床上的应用也较为广泛,尤其在肝脏疾病的治疗中^[13]。甘草酸能够诱导肝组织再生和功能复原,在肝脏切除的术后应用中较多;而且它还可以改善肝功能,缓解慢性肝脏疾病所导致肝癌的发生,这也许与甘草酸降低氧化应激损伤有关^[14]。

当代社会生活方式的改变,由于肥胖、高血脂、糖尿病等带来的 NASH 的发生风险也不断提升。部分 NASH 可进一步恶化为肝纤维化、肝硬化、甚至癌症,也是人们出现慢性肝病的主要原因之一。于是,有效对 NASH 进行控制可以很好地预防后期一系列肝病的发生,寻找良好的药物已是当前研究的热点^[15,16]。

本研究利用高脂饮食添加胆固醇方式饲养大鼠构建 NASH 模型,可以用于 NASH 治疗的机制研究。经过 16 周高脂饲养,模型组大鼠肝组织可见肝细胞脂肪病变,小叶内炎症显著并存在点状坏死灶,还发现局部的肝细胞气球样变,符合 NASH 的病症。并且大鼠血清中 TC、TG、LDL-C、AST 及 ALT 明显升高, HDL-C 显著降低,提示病变发展为脂肪性肝炎阶段,成功构建了 NASH 大鼠模型。前期报道关于 NASH 的发病起因中主要涉及“两次打击”学说,即脂类物质在肝组织中的堆积和氧化应激/脂质过氧化对肝细胞的损伤。其中 SOD 为抗氧化损伤中重要的酶之一, GSH 为一种有效的氧自由基清除剂, MDA 为具

有代表性的氧化应激损伤产物^[17]。本研究中模型组大鼠 MDA 水平显著提升,而 SOD 和 GSH 活性则明显受到抑制,说明脂质过氧化在 NASH 发生发展过程中扮演着重要的角色。而经过中、高剂量甘草酸治疗后发现,肝细胞脂肪病变程度降低,血清中 TC、TG、LDL-C、AST、ALT 及 MDA 明显降低, HDL-C、SOD 及 GSH 明显升高,与模型组比较,差异有统计学意义,表明甘草酸具有抗脂质过氧化及改善肝功能的功效。李丽等纳入中药在 NASH 治疗中的文献进行 Meta 分析,发现中医药治疗 NASH 有明显疗效,从肝脾肾辨证论治在痊愈率、有效率和改善肝功能方面均明显优于西药,中药治疗未发现严重不良反应。综上所述,甘草酸能够经过抑制氧化应激损伤、改善血脂水平来提升 NASH 大鼠肝功能及抑制肝脏病变程度,对 NASH 治疗具有潜在的临床价值。

参考文献

- Ashraf NU, Sheikh TA. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in the pathogenesis of Non-alcoholic fatty liver disease[J]. Free Radic Res, 2015, 49(12):1405-1418
- Leach NV, Dronca E, Vesa SC, et al. Serum homocysteine levels, oxidative stress and cardiovascular risk in non-alcoholic steatohepatitis[J]. Eur J Intern Med, 2014, 25(8):762-767
- Jiang CM, Pu CW, Hou YH, et al. Non alcoholic steatohepatitis a precursor for hepatocellular carcinoma development[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(44):16464-16473
- Rosso N, Chavez-Tapia NC, Tiribelli C, et al. Translational approaches: from fatty liver to non-alcoholic steatohepatitis[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(27):9038-9049
- Wang X, Li W, Zhang Y, et al. Association between vitamin D and non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: results from a meta-analysis[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(10):17221-17234
- Xiong J, Wang J, Huang J, et al. Non-alcoholic steatohepatitis-related liver cirrhosis is increasing in China: a ten-year retrospective study[J]. Clinics(Sao Paulo), 2015, 70(8):563-568
- Wang YM, Du GQ. Glycyrrhizic acid prevents enteritis through reduction of NF- κ B p65 and p38MAPK expression in rat[J]. Mol Med Rep, 2016, 13(4):3639-3646
- Ming LJ, Yin AC. Therapeutic effects of glycyrrhizic acid[J]. Nat Prod Commun, 2013, 8(3):415-418
- Li JY, Cao HY, Liu P, et al. Glycyrrhizic acid in the treatment of liver diseases: literature review[J]. Biomed Res Int, 2014, 14:872-879
- Liang B, Guo XL, Jin J, et al. Glycyrrhizic acid? inhibits apoptosis and fibrosis in carbon-tetrachloride-induced rat liver injury[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(17):5271-5280
- 周文丽. 甘草酸对大鼠肝星状细胞氧化应激抑制作用的机制研究[J]. 广东药科大学学报, 2017, 33(3):408-411

(转第 62 页)

型、HPV-52 型、HPV-58 型为河南省 HPV 感染常见亚型,包含高危型 HPV-16 型、HPV-52 型和 HPV-58 型的新型多价宫颈癌疫苗可能为该省宫颈癌的预防和治疗提供更高的保护作用。应特别重视河南省 25 岁及以下女性 HPV 的筛查和健康教育宣传,同时关注 56~60 岁妇女 HPV 感染情况(特别是 HPV-52 型和 HPV-58 型的感染情况),及时发现宫颈癌高危人群和宫颈上皮内瘤变及宫颈癌的早期病变人群,实现宫颈癌的早期预防。

参考文献

- Jemal A, Bray F, Center MM, *et al.* Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2):69-90
- Li J, Huang R, Schmidt JE, *et al.* Epidemiological features of human papillomavirus (HPV) infection among women living in Mainland China [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(7):4015-4023
- Jit M, Brisson M, Portnoy A, *et al.* Cost-effectiveness of female human papillomavirus vaccination in 179 countries: a PRIME modelling study [J]. *Lancet Glob Health*, 2014, 2(7):e406-414
- Li N, Hang D, Yang L, *et al.* Persistence of type-specific human papillomavirus infection among Daqing City women in China with normal cytology: a pilot prospective study [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(46):81455-81461
- Zeng Z, Yang H, Li Z, *et al.* Prevalence and genotype distribution of HPV infection in China: analysis of 51,345 HPV genotyping results from China's largest CAP certified laboratory [J]. *J Cancer*, 2016, 7(9):1037-1043
- Taghizadeh E, Taheri F, Abdolkarimi H, *et al.* Distribution of human papillomavirus genotypes among women in Mashhad, Iran [J]. *Inter-virology*, 2017, 60(1-2):38-42
- de Sanjose S, Diaz M, Castellsague X, *et al.* Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis [J]. *Lancet Infect Dis*, 2007, 7(7):453-459
- Siegler E, Shiner M, Segev Y, *et al.* Prevalence and genotype distribution of HPV types in women at risk for cervical neoplasia in Israel [J]. *Isr Med Assoc J*, 2017, 19(10):635-639
- Wiltong SM, Steenbergen RDM. Molecular events leading to HPV-induced high grade neoplasia [J]. *Papillomavirus Res*, 2016, 2:85-88
- Galati L, Peronace C, Fiorillo MT, *et al.* Six years genotype distribution of human papillomavirus in Calabria Region, Southern Italy: a retrospective study [J]. *Infect Agent Cancer*, 2017, 12:43

- Xue Y, Zhang W, Chen M, *et al.* "U" shape of age-specific prevalence of high-risk human papillomavirus infection in women attending hospitals in Shanghai, China [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2009, 145(2):214-218
- Wang YY, Li L, Wei S, *et al.* Human Papillomavirus (HPV) infection in women participating in cervical cancer screening from 2006 to 2010 in Shenzhen City, South China [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(12):7483-7487
- Chen X, Xu H, Xu W, *et al.* Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus in 961,029 screening tests in southeastern China (Zhejiang Province) between 2011 and 2015 [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):14813
- 李晓阳,郭青. 北京石景山地区人乳头瘤病毒(HPV)感染的分子流行病学研究 [J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(8):866-868
- 满宝华,汪坚,黄艳梅. 1372 例宫颈感染人乳头瘤病毒基因分型的探讨 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2014, 6(2):110-112
- Zhao JW, Xu JJ, Yan M, *et al.* Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus: implications for cancer screening and vaccination in Henan province, China [J]. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2016, 49(2):237-240
- Wang R, Guo XL, Wisman GB, *et al.* Nationwide prevalence of human papillomavirus infection and viral genotype distribution in 37 cities in China [J]. *BMC Infect Dis*, 2015, 15:257
- Wang T, Wu MH, Wu YM, *et al.* A population-based study of invasive cervical cancer patients in Beijing: 1993-2008 [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2015, 128(24):3298-3304
- Li Z, Liu F, Cheng S, *et al.* Prevalence of HPV infection among 28,457 Chinese women in Yunnan Province, southwest China [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:21039
- Ye J, Cheng X, Chen X, *et al.* Prevalence and risk profile of cervical human papillomavirus infection in Zhejiang Province, southeast China: a population-based study [J]. *Virol J*, 2010, 7:66
- Hou R, Xu C, Zhang S, *et al.* Distribution of human papillomavirus genotype and cervical neoplasia among women with abnormal cytology in Beijing, China [J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2012, 119(3):257-261
- Shen Y, Gong JM, Li YQ, *et al.* Epidemiology and genotype distribution of human papillomavirus (HPV) in women of Henan Province, China [J]. *Clin Chim Acta*, 2013, 415:297-301
- Zhong TY, Zhou JC, Hu R *et al.* Prevalence of human papillomavirus infection among 71,435 women in Jiangxi Province, China [J]. *J Infect Public Health*, 2017, 10(6):783-788

(收稿日期:2017-11-06)

(修回日期:2017-11-28)

(接第 146 页)

- 张明发,沈雅琴. 甘草酸及其苷元甘草次酸的糖皮质激素样作用 [J]. *现代药物与临床*, 2011, 26(1):33-35
- Guo XL, Liang B, Wang XW, *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
- 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
- 王慧超,叶红军,韦始亮,等. 复方甘草甜素脂质体干预大鼠非

酒精性脂肪性肝炎的疗效观察 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2008, 24(3):199-201

- Musso G, Gambino R, Cassader M, *et al.* A meta-analysis of randomized trials for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Hepatology*, 2010, 52(1):79-104
- Garvin JL, Ortiz PA. The role of reactive oxygen species in the regulation of tubular function [J]. *Acta Physiol Scand*, 2003, 179(3):225-232

(收稿日期:2017-11-19)

(修回日期:2017-11-29)