

# 复方甘草酸单铵和异甘草酸镁对化学损伤人肝细胞的保护作用

张群, 刘加群, 孙华丽, 陈鹏, 张建军

张群, 东南大学附属中大医院感染病科 江苏省南京市 210009  
刘加群, 河北秦皇岛市第三医院肝病科 河北省秦皇岛市 066001  
孙华丽, 陈鹏, 张建军, 泸州医学院附属医院感染病科 四川省泸州市 646000  
作者贡献分布: 此课题由张群与张建军设计; 研究过程由张群与刘加群操作完成; 数据分析由张群、孙华丽及陈鹏完成; 本论文写作由张群与张建军完成。  
通讯作者: 张建军, 教授, 646000, 四川省泸州市, 泸州医学院附属医院感染病科. zhangjianjun2535@163.com  
收稿日期: 2009-08-18 修回日期: 2009-09-05  
接受日期: 2009-09-07 在线出版日期: 2009-10-18

## Comparison of protective effects of compound ammonium glycyrrhetate and magnesium isoglycyrrhizinate on *D*-galactosamine- and carbon tetrachloride-injured human hepatocytes

Qun Zhang, Jia-Qun Liu, Hua-Li Sun, Peng Chen, Jian-Jun Zhang

Qun Zhang, Department of Infectious Diseases, Zhongda Hospital, Affiliated to Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China  
Jia-Qun Liu, Department of Hepatology, the Third Hospital of Qinhuangdao, Qinhuangdao 066001, Hebei Province, China  
Hua-Li Sun, Peng Chen, Jian-Jun Zhang, Department of Infectious Diseases, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China  
Correspondence to: Professor Jian-Jun Zhang, Department of Infectious Diseases, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China. zhangjianjun2535@163.com  
Received: 2009-08-18 Revised: 2009-09-05  
Accepted: 2009-09-07 Published online: 2009-10-18

## Abstract

**AIM:** To compare the protective effects of compound ammonium glycyrrhetate (CAG) and magnesium isoglycyrrhizinate (MI) on *D*-galactosamine (*D*-GalN)- and carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-injured human hepatocytes (L-02).

**METHODS:** After L-02 cells were treated with

CAG and MI, respectively, they were incubated with CCl<sub>4</sub> or *D*-GalN to induce cell injury. Cell growth was observed under an inverted microscope. The activity of aspartate aminotransferase (AST) and lactate dehydrogenase (LDH) and the content of glutathione (GSH) in culture supernatants were determined.

**RESULTS:** At a concentration of 1 g/L, both CAG and MI could improve the survival rate of cells, significantly inhibit *D*-GalN- and CCl<sub>4</sub>-induced release of AST and LDH and intracellular GSH depletion, and increase *D*-GalN- and CCl<sub>4</sub>-induced decrease in mitochondrial membrane potential. Both of the CAG and MI can inhibit *D*-GalN and CCl<sub>4</sub>-induced release of AST and LDH and intracellular GSH depletion (CCl<sub>4</sub>:  $7.59 \pm 1.27$ ,  $5.23 \pm 0.70$  vs  $3.33 \pm 0.40$ ; *D*-GalN:  $7.93 \pm 0.36$ ,  $5.40 \pm 0.52$  vs  $3.77 \pm 0.45$ ,  $P < 0.01$  or  $0.05$ ).

**CONCLUSION:** At a concentration of 1 g/L, both CAG and MI can exert protective effects on *D*-GalN and CCl<sub>4</sub>-injured human hepatocytes perhaps via a mechanism that is associated with improving intracellular GSH depletion. CAG is superior to MI in protecting injured L-02 hepatocytes.

**Key Words:** Galactosamine; Carbon tetrachloride; Glycyrrhizin; Hepatocyte; Drug effects

Zhang Q, Liu JQ, Sun HL, Chen P, Zhang JJ. Comparison of protective effects of compound ammonium glycyrrhetate and magnesium isoglycyrrhizinate on *D*-galactosamine- and carbon tetrachloride-injured human hepatocytes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(29): 3019-3022

## 摘要

**目的:** 研究2类甘草甜素类药物对半乳糖胺(*D*-GalN)和四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)损伤培养人肝细胞(L-02)的保护作用及差异。

**方法:** 培养L-02, 用复方甘草酸单铵(compound ammonium glycyrrhizin, CAG)和异甘草酸镁(magnesium isoglycyrrhizinate, MI)分别进行保

**背景资料**  
甘草甜素类药物是目前临床常用的保肝药。因其具有抗炎、抗氧化、抗肝脏毒物、稳定细胞膜、抗肝纤维化、调节免疫等功效, 在临床得以广泛运用。

**同行评议者**  
张国梁, 主任医师, 天津市第一中心医院消化内科;  
刘正稳, 教授, 西安交通大学医学院第一附属医院感染科

**创新盘点**  
目前临床使用于护肝的甘草甜素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。本研究期望克服以往的报道缺陷,体外培养人肝细胞,进行同等条件研究。

护后,再经D-GalN或CCl<sub>4</sub>处理。观察肝细胞生长状态、测定AST、LDH酶活力、及细胞内谷胱甘肽(GSH)含量。从而评价CAG和MI对D-GalN和CCl<sub>4</sub>损伤L-02的保护作用差异。

**结果:**浓度为1 g/L的CAG和MI均能提高细胞的存活率,显著抑制D-GalN和CCl<sub>4</sub>所致的AST及LDH释放。CAG抑制D-GalN和CCl<sub>4</sub>所致的AST与LDH效果显著好于MI(均 $P<0.05$ );浓度为1 g/L的CAG和MI均能显著抑制2种化学损伤细胞内的GSH降低(CCl<sub>4</sub>损伤:  $7.59 \pm 1.27$ ,  $5.23 \pm 0.70$  vs  $3.33 \pm 0.40$ ; D-GalN损伤:  $7.93 \pm 0.36$ ,  $5.40 \pm 0.52$  vs  $3.77 \pm 0.45$ ,  $P<0.01$ 或 $0.05$ ), CAG效果明显好于MI。

**结论:**1 g/L的CAG和MI 2种药物对D-GalN和CCl<sub>4</sub>致人肝细胞损伤均有保护作用,其机制与抑制GSH降低相关。2种甘草甜素药物相比较,CAG保护肝细胞效果好于MI。

**关键词:**半乳糖胺;四氯化碳;甘草甜素;肝细胞;药物作用

张群,刘加群,孙华丽,陈鹏,张建军. 复方甘草酸单铵和异甘草酸镁对化学损伤人肝细胞的保护作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(29): 3019-3022  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3019.asp>

## 0 引言

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<sup>2+</sup>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<sup>[1-3]</sup>。目前临床使用于护肝的甘草甜素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L-02作为护肝药物研究体系,比较不同甘草甜素类药物对D-GalN或CCl<sub>4</sub>损伤L-02保护作用之间的差别。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** L-02株购自川大华西医院; CAG为赤峰蒙欣药业公司产品。MI为正天晴公司产品。胎牛血清和1640培养基为Hyclone公司产品。D-GalN为BIO BASIC INC产品。CCl<sub>4</sub>购自重庆博艺化学试剂公司。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 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[4],药物浓度1-10 g/L护肝效果最佳。

本研究取2种甘草甜素药物(CAG、MI)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 g/L,用于构建肝细胞保护体系。不同终浓度的CAG和MI于细胞预培养24 h后加入。

**1.2.2 L-02细胞培养和D-GalN及CCl<sub>4</sub>处理:**用含100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养液调细胞密度为 $2 \times 10^8$ /L,接种于96孔培养板,置50 mL/L CO<sub>2</sub>孵箱中培养24 h后分别加入CAG或MI,并形成不同药物的终浓度,再以D-GalN 2 mmol/L浓度共培养24 h;或CCl<sub>4</sub> 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。

**统计学处理** 此实验为三复孔设计,所有数据以mean $\pm$ SD表示。采用SPSS16.0 for Windows中的AVONA对组间差异进行统计分析, $P<0.05$ 为统计学上差异有显著性。

## 2 结果

**2.1 2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和MI处理后,细胞贴壁率增加,呈条索状,提示2种药物均改善了L-02的生长状态。

CAG和MI浓度在1 g/L明显抑制AST( $P<0.05$ )和LDH( $P<0.05$ )释放,且以CAG效果最显著( $P<0.05$ )。2种甘草甜素药浓度在0.1, 0.01 g/L时与模型组比较无明显肝细胞保护作用(表1)。

**2.2 2种甘草甜素药物对CCl<sub>4</sub>损伤L-02的保护作用及差异** CCl<sub>4</sub>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 g/L浓度的2种甘草甜素药均显著降低AST和LDH释放( $P<0.05$ ), CAG效果最明显,优于MI( $P<0.05$ , 表2)。

**2.3 2种甘草甜素药物对GSH的影响及差异** 浓度为1 g/L的CAG和MI均能显著抑制CCl<sub>4</sub>和D-GalN所致L-02的GSH降低( $P<0.05$ ),观察2种药物的相互比较统计表,示CAG效果明显( $P<0.05$ ),护肝效果好于MI(表3)。

## 3 讨论

本实验检测了D-GalN<sup>[5]</sup>和CCl<sub>4</sub><sup>[6]</sup>处理L-02细胞活性、ALT和AST的时、量效特征。D-GalN 2

表 1 2种甘草甜素药对D-GalN损伤L-02 AST和LDH释放作用的影响 ( $n = 3$ )

分组	D-GalN(2 mmol/L)	药物浓度(g/L)	AST(U/L)	LDH(U/L)
溶剂对照	-	0.00	16.37 ± 3.54	122.83 ± 28.94
D-GalN模型	+	0.00	56.80 ± 3.08	208.60 ± 31.97
CAG	+	1.00	13.57 ± 6.09 <sup>b</sup>	122.33 ± 24.42 <sup>a</sup>
	+	0.10	46.63 ± 2.40 <sup>ad</sup>	192.03 ± 21.08 <sup>c</sup>
	+	0.01	50.10 ± 2.88 <sup>d</sup>	182.03 ± 15.96 <sup>c</sup>
MI	+	1.00	39.50 ± 0.82 <sup>bd</sup>	160.17 ± 16.78
	+	0.10	48.93 ± 3.23 <sup>ad</sup>	202.17 ± 22.91 <sup>c</sup>
	+	0.01	48.30 ± 1.80 <sup>ad</sup>	201.83 ± 21.89 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs D-GalN模型组; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 溶剂对照组.

表 2 2种甘草甜素药对CCl<sub>4</sub>损伤L-02 AST和LDH释放作用的影响 ( $n = 3$ )

分组	CCl <sub>4</sub> (10 mmol/L)	药物浓度(g/L)	AST(U/L)	LDH(U/L)
溶剂对照	-	0.00	12.67 ± 1.76	110.67 ± 20.50
CCl <sub>4</sub> 模型	+	0.00	69.73 ± 19.80	252.57 ± 85.77
CAG	+	1.00	11.27 ± 2.07 <sup>b</sup>	57.20 ± 10.89 <sup>ac</sup>
	+	0.10	50.63 ± 7.89 <sup>d</sup>	215.73 ± 67.19
	+	0.01	50.47 ± 4.99 <sup>d</sup>	230.53 ± 65.80 <sup>c</sup>
MI	+	1.00	34.47 ± 5.34 <sup>ad</sup>	149.17 ± 17.43
	+	0.10	55.40 ± 4.29 <sup>d</sup>	233.10 ± 56.33 <sup>c</sup>
	+	0.01	59.70 ± 6.34 <sup>d</sup>	230.90 ± 64.90 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs CCl<sub>4</sub>模型组; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 溶剂对照组.

表 3 2种甘草甜素药物对GSH的影响 ( $n = 3$ )

分组	药物浓度(g/L)	GSH	
		CCl <sub>4</sub>	D-GalN
溶剂对照	0.00	6.90 ± 1.04	8.03 ± 0.15
模型	0.00	3.33 ± 0.40	3.77 ± 0.45
CAG	1.00	7.59 ± 1.27 <sup>b</sup>	7.93 ± 0.36 <sup>b</sup>
	0.10	3.97 ± 0.32 <sup>c</sup>	4.27 ± 0.25 <sup>d</sup>
	0.01	3.90 ± 0.46 <sup>c</sup>	4.17 ± 0.15 <sup>d</sup>
MI	1.00	5.23 ± 0.70 <sup>a</sup>	5.40 ± 0.52 <sup>ad</sup>
	0.10	3.33 ± 0.29 <sup>d</sup>	4.10 ± 0.20 <sup>d</sup>
	0.01	3.40 ± 0.17 <sup>c</sup>	3.87 ± 0.42 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 模型组; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 溶剂对照组.

mmol/L处理24 h, CCl<sub>4</sub> 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. 本研究结果表明, 浓度为1 g/L的CAG和MI 2

#### 应用要点

本研究提示CAG对肝细胞的保护作用显著好于MI, 能很好指导临床医师对2种甘草甜素药的认识与使用.

种药物均可显著抑制2种损伤模型AST和LDH升高. 而AST主要存在与线粒体内, 线粒体膜受损伤时, 可逸出线粒体, 进一步逸出细胞外, 可见对于2种化学毒物所致损伤, 线粒体是2种甘草甜素类药物护肝的主要作用环节, 已有提及甘草甜素类药物护肝活性可能与保护线粒体有关, 本研究结果较好证明该类物质改善D-GalN和CCl<sub>4</sub>所致AST释放的作用环节, 阐明了药物作用机制, 进一步证实了甘草甜素药在抗氧化、抗肝脏毒性、稳定细胞膜方面功效显著<sup>[7-8]</sup>. 与MI相比较, CAG护肝效果较为明显.

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化还原电位的前提, 与细胞生命活动正常进行密切相关, 氧化还原电位降低将触发细胞凋亡<sup>[9]</sup>, 本研究结果证明了2种药物可改善细胞内GSH降低, 提高细胞存活率. 上述2种药物对损伤L-02保护作用, 以CAG为显著.

总之, 2种甘草甜素药对2种模型损伤的保护作用, 主要涉及细胞氧化应激和氧化还原电位环节. 其中改善线粒体膜电位是甘草甜素药护肝

**同行评价**  
本研究结果对认识复方甘草酸单铵和异甘草酸镁的作用效果和临床用药选择具有一定参考意义。

作用的主要作用环节. 本研究结果显示CAG对肝细胞的保护作用显著好于MI. 第2代甘草甜素药CAG是以 $\beta$ 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4代甘草甜素药MI为单一18- $\alpha$ 异构体, 2种药物之间差异为有效成分甘草酸分子结构式的不同, 以及是否含有甘氨酸、盐酸半胱氨酸. CAG含有甘氨酸和盐酸半胱氨酸, MI则不含有. CAG中, 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, 他在缺血再灌注损伤、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, 可能使其较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2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.

#### 4 参考文献

- 1 祖红梅. 甘利欣治疗抗癆药物性肝损害的疗效观察. 中国实用医药 2008; 3: 92-93
- 2 孟繁平, 李悍卫, 赵平, 金波, 向轶. 异甘草酸镁辅助治疗慢性乙型肝炎的临床观察. 肝脏 2007; 12: 318-319
- 3 黄剑峰. 异甘草酸镁的药理作用与临床评价. 中外健康文摘·临床医师版 2007; 4: 103-104
- 4 陈尉华, 徐中南, 陆伦根, 曾民德, 刘梅, 茅益民, 曹爱平, 夏春光, 房静远. 异甘草酸镁对培养肝细胞增殖影响的实验研究. 肝脏 2006; 11: 15-17
- 5 李宏涛, 陈国民. D-氨基半乳糖研究的回顾和展望. 肝脏 2004; 9: 209-210
- 6 汪涛, 姜华, 陆国才, 袁伯俊, 余佳红. 四氯化碳肝脏毒性机制的研究进展. 毒理学杂志 2007; 21: 338-339
- 7 Singh B, Sahu PM, Lohiya RK, Sharma MK, Singh HL, Singh S. Anti-inflammatory activity of alkanoids and triterpenoids from *Trichodesma amplexicaule* Roth. *Phytomedicine* 2006; 13: 152-156
- 8 Angeh JE, Huang X, Sattler I, Swan GE, Dahse H, Härtl A, Eloff JN. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of four known and one new triterpenoid from *Combretum imberbe* (Combretaceae). *J Ethnopharmacol* 2007; 110: 56-60
- 9 Han D, Hanawa N, Saberi B, Kaplowitz N. Mechanisms of liver injury. III. Role of glutathione redox status in liver injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G1-G7

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

#### • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》参考文献要求

**本刊讯** 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在“Pang *et al*”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注角码号. 如马连生<sup>[1]</sup>报告……, 潘伯荣 *et al*<sup>[2-5]</sup>认为……; PCR方法敏感性高<sup>[6-7]</sup>. 文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed, 《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献, 包括《世界华人消化杂志》(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和 *World Journal of Gastroenterology* (<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>). 期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页. (科学编辑: 李军亮 2009-10-18)