

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.16.010

异甘草酸镁对酒精性肝损伤模型大鼠的影响*

王丹丹, 乔进[△], 赵彦

(南通大学附属南通第三医院, 江苏 南通 226006)

摘要:目的 探讨异甘草酸镁对酒精性肝损伤模型大鼠肝脏中性粒细胞浸润和肝细胞氧化损伤的影响。方法 将48只SD大鼠随机分为正常对照组(等体积生理盐水)、模型组(等体积生理盐水),以及异甘草酸镁低、高剂量组(15 mg/kg, 45 mg/kg),各12只。第1~2周均灌胃50%乙醇(8 mL/kg),第3~8周均灌胃50%乙醇(12 mL/kg),复制酒精性肝损伤大鼠模型,同时正常对照组灌胃等体积生理盐水。复制模型的同时各组大鼠腹腔注射相应药物或生理盐水,每日1次,持续8周。苏木素-伊红(HE)染色,观察大鼠肝组织病理变化;测定大鼠血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)水平,肝组织匀浆中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)水平;采用免疫组化法测定大鼠肝组织匀浆中髓过氧化物酶(MPO)表达水平;采用Western blot法测定大鼠肝组织匀浆中5-脂氧化酶(5-LO)表达水平。结果 与模型组比较,异甘草酸镁低、高剂量组大鼠肝脏的坏死区域均减少,炎性细胞浸润均减轻;血清ALT及AST水平均显著降低;肝组织匀浆中MDA水平均显著降低,SOD水平均显著升高;MPO及5-LO蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 异甘草酸镁具有一定的肝脏保护作用,其机制可能与减轻肝细胞氧化应激损伤与抑制中性粒细胞浸润有关。

关键词:异甘草酸镁;酒精性肝损伤;大鼠;中性粒细胞浸润;氧化损伤;5-脂氧化酶

中图分类号:R965;R975+.5

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)16-0041-04

Effect of Magnesium Isoglycyrrhizinate on Model Rats with Alcoholic-Induced Liver Injury

WANG Dandan, QIAO Jin, ZHAO Yan

(Nantong Third Hospital Affiliated to Nantong University, Nantong, Jiangsu, China 226006)

Abstract: Objective To investigate the effect of magnesium isoglycyrrhizinate on neutrophil infiltration and oxidative damage of liver cells in model rats with alcoholic-induced liver injury. **Methods** A total of 48 SD rats were randomly divided into normal control group (equal volume of normal saline), model group (equal volume of normal saline) and magnesium isoglycyrrhizinate low- and high-dose groups (15 mg/kg, 45 mg/kg), with 12 rats in each group. The alcoholic-induced liver injury model rats were established by intragastric administration of 50% ethanol (8 mL/kg) from the first to the second week, and 50% ethanol (12 mL/kg) from the third to the eighth week, and the rats in the normal control group were given intragastric administration of equal volume of normal saline. Meanwhile, rats in each group were intraperitoneally injected with corresponding drugs or normal saline once a day for eight weeks. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of liver tissue. The levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in serum and malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in liver homogenate were detected. The expression of myeloperoxidase (MPO) in liver homogenate was detected by the immunohistochemistry. The expression level of 5-lipoxygenase (5-LO) in liver homogenate was detected by the Western blot. **Results** Compared with those in the model group, the necrotic areas of the liver and the inflammatory cell infiltration reduced significantly, the serum ALT and AST levels and the MDA level in liver homogenate decreased significantly, the SOD level in liver homogenate increased significantly, while the MPO and 5-LO protein expression levels reduced significantly in the magnesium isoglycyrrhizinate low- and high-dose groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Magnesium isoglycyrrhizinate has a certain protective effect on the liver, and its mechanism may be related to reducing oxidative stress damage of liver cells and inhibiting neutrophil infiltration.

Key words: magnesium isoglycyrrhizinate; alcoholic-induced liver injury; rats; neutrophil infiltration; oxidative damage; 5-lipoxygenase

当前,全球每年约255万人由于长期饮酒导致死亡,约20%长期饮酒酗酒人群患有酒精性肝病(ALD),ALD主要表现为肝脏细胞的损伤、坏死及凋亡^[1]。临床治疗ALD的传统方案包括使用糖皮质激素或肿瘤坏死

因子- α 抑制剂^[2],由于上述药物的免疫抑制作用,使用后常会增加感染风险。异甘草酸镁属镁盐,具有良好的抗炎、抗氧化、抗病毒作用和保肝活性,临床主要用于治疗炎性肝脏疾病^[3],用于治疗药物性肝损伤、免疫

*基金项目:江苏省药学会-天晴医院药学基金[Q2019160];江苏省南通市卫生和计划生育委员会青年医学重点人才项目[WR2017011]。

第一作者:王丹丹,女,硕士,主管药师,研究方向为药理学,(电子信箱)522055043@qq.com。

[△]通信作者:乔进,男,硕士,副主任药师,研究方向为基础药理学,(电子信箱)felix_jo@163.com。

介导的肝损伤、脂肪肝时也有肝保护作用^[4-6]。有研究显示,异甘草酸镁可减少乙醇在体外诱导的脂质积累^[7],但其在体内有效治疗ALD的机制尚未明晰^[8]。本研究中探讨了异甘草酸镁对酒精性肝损伤模型大鼠的肝脏保护作用是否与减轻肝细胞氧化应激损伤及抑制中性粒细胞浸润有关。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

仪器: BH - NIC - B型倒置光学显微镜(日本Olympus公司); 722型分光光度计(上海分析仪器厂); Yil - 16G型低温离心机、TDL - 50B型离心机(上海安亭科学仪器厂); HH - S2型恒温水浴箱(河南金博仪器制造有限公司)。

试剂: 异甘草酸镁注射液(正大天晴药业集团股份有限公司,批号为200508104); 丙氨酸氨基转移酶(ALT,批号为140118010)试剂盒,天门冬氨酸氨基转移酶(AST,批号为140218007)试剂盒,丙二醛(MDA,批号为20180326)试剂盒,超氧化物歧化酶(SOD,批号为20180322)试剂盒,髓过氧化物酶(MPO)试剂盒(批号为20191211),均购自南京建成生物工程研究所; β - actin抗体(上海康成生物工程有限公司,批号为ab8226); 5 - 脂氧化酶(5 - LO)抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号为760700); 预染蛋白Marker(美国New England Biolabs公司,批号为00686128)。

动物: 清洁级SD大鼠,10周龄,雌雄各半,体质量160 ~ 180 g,购自南通大学实验动物中心,动物生产许可证号SCXK(苏)2018 - 001,动物使用许可证号SYXK(苏)2018 - 0031。饲养期间自由饮水,饲喂普通维持饲料。饲养环境为昼夜各半循环照明,湿度恒定,温度22 ~ 25 ℃。适应性喂养1周后开始实验。本研究中动物实验方案经实验动物伦理委员会批准,符合动物保护原则。

1.2 方法

1.2.1 复制模型与分组、给药

48只大鼠随机分为正常对照组(等体积生理盐水)、模型组(等体积生理盐水),以及异甘草酸镁低、高剂量组(15 mg / kg, 45 mg / kg),各12只。第1 ~ 2周灌胃50%乙醇(8 mL / kg),第3 ~ 8周均灌胃50%乙醇(12 mL / kg),复制酒精性肝损伤大鼠模型,同时正常对照组灌胃等体积生理盐水。复制模型的同时,各组大鼠腹腔注射相应药物或生理盐水,每日1次,持续8周。

1.2.2 观察指标

一般情况: 观察研究过程中各组大鼠的精神状态、生存情况等。

转氨酶水平: 末次给药后禁食12 h,麻醉大鼠,腹主动脉取血,常规离心,取上清液,按试剂盒说明书测定大鼠血清中ALT及AST的水平。

MDA及SOD水平: 末次给药后禁食12 h,处死大鼠,取肝组织,用生理盐水漂洗后吸干表面液体,置碎冰块上的玻璃皿中剪碎、匀浆,低温离心后取上清液,按试剂盒说明书测定大鼠肝组织匀浆中MDA及SOD的水平。

肝组织病理形态学: 取大鼠肝脏,苏木素 - 伊红(HE)染色,石蜡切片,脱蜡,染色,在显微镜下观察大鼠肝组织病理形态学。

肝组织MPO表达水平: 采用免疫组化法。将大鼠肝组织切片、脱蜡,梯度乙醇入水,用柠檬酸缓冲液修复抗原,3%过氧化氢溶液灭活,MPO - 抗体(1:200)4 ℃孵育过夜,37 ℃复温,30 min,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤3次,二抗(1:1 000)37 ℃孵育30 min,PBS洗涤3次,DAB显色,苏木素复染,透明,封片。采用JEDA801D形态学软件测定阳性信号的面积与平均灰度值。

5 - LO蛋白水平: 采用Western blotting法。取大鼠肝组织适量,加入RIPA蛋白裂解液,以BCA法测定蛋白含量。SDS - PAGE电泳后电转,恒流300 mA转膜150 min至PVDF膜上;用含5%脱脂牛奶的TBST室温封闭2 h,分别加入5 - LO一抗与 β - actin抗体4 ℃摇床孵育过夜;TBST洗涤2次,再加相应二抗室温反应1 h,TBST洗涤2次,加入ECL化学发光试剂,X线胶片曝光显影定影。通过Image J软件将条带灰度值数字化,计算各目的蛋白相对表达量。

1.3 统计学处理

采用SPSS 20.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,行单因素方差分析或 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

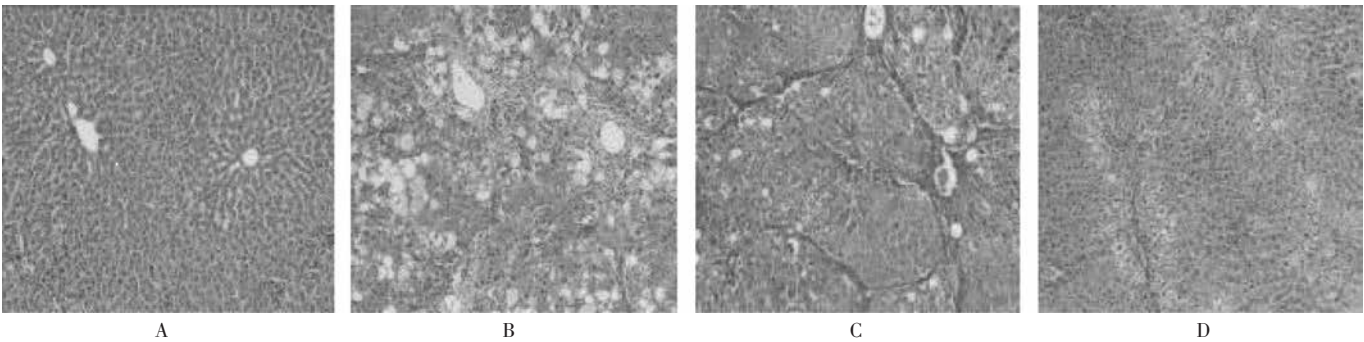
模型组大鼠灌胃乙醇,表现出反抗状态,灌胃后10 min,精神明显受到抑制,活动少。异甘草酸镁低、高剂量组大鼠上述症状较模型组显著减轻,活动增多。模型组大鼠在第6周与第7周分别死亡1只,剩余10只,异甘草酸镁低、高剂量组大鼠未见死亡。

2.2 肝组织病理形态学

正常对照组大鼠的肝组织结构排列紧致,肝细胞大小均匀;模型组大鼠肝细胞之间有空泡,排列不齐,较紊乱,部分肝细胞变性坏死;异甘草酸镁低、高剂量组大鼠肝细胞的变性不同程度改善,炎性细胞浸润程度较模型组减轻。详见图1。

2.3 实验室检测指标

血清转氨酶: 与正常对照组比较,模型组大鼠血清ALT及AST水平均显著升高($P < 0.01$);与模型组大鼠比较,异甘草酸镁低、高剂量组大鼠ALT及AST水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。详见表1。



A. 正常对照组 B. 模型组 C. 异甘草酸镁低剂量组 D. 异甘草酸镁高剂量组

图1 大鼠肝组织病理形态学(HE, × 200)

A. Normal control group B. Model group C. Magnesium isoglycyrrhizinate low-dose group D. Magnesium isoglycyrrhizinate high-dose group

Fig.1 Pathological morphology of liver tissue of rats (HE, × 200)

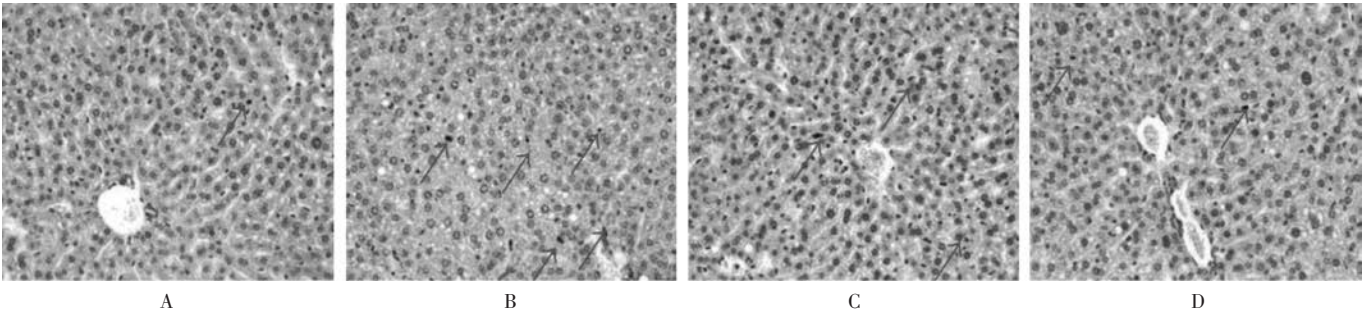
表1 各组大鼠血清及肝组织匀浆中检测指标比较($\bar{X} \pm s$)

Tab.1 Comparison of serum ALT and AST levels of rats in each group ($\bar{X} \pm s$)

组别	剂量(mg/kg)	ALT(U/L)	AST(U/L)	MDA(nmol/L)	SOD(U/mL)	MPO	5-LO
正常对照组(n=12)		39.36 ± 3.47	85.31 ± 6.95	2.17 ± 0.14	134.30 ± 9.28	0.05 ± 0.01	0.28 ± 0.02
模型组(n=10)		90.55 ± 7.01**	164.24 ± 12.36**	9.58 ± 0.31**	60.11 ± 4.87**	0.78 ± 0.13**	0.93 ± 0.05*
异甘草酸镁低剂量组(n=12)	15	77.14 ± 4.26*	122.77 ± 9.81*	7.04 ± 0.24*	90.13 ± 4.42*	0.46 ± 0.06*	0.48 ± 0.02*
异甘草酸镁高剂量组(n=12)	45	58.19 ± 5.03**	93.66 ± 7.12**	4.97 ± 0.22**	111.89 ± 5.26**	0.22 ± 0.02**	0.44 ± 0.03*

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

Note:Compared with those in the normal control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;Compared with those in the model group,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$.



A. 正常对照组 B. 模型组 C. 异甘草酸镁低剂量组 D. 异甘草酸镁高剂量组

图2 大鼠肝组织匀浆中MPO表达水平(苏木素, × 200)

A. Normal control group B. Model group C. Magnesium isoglycyrrhizinate low-dose group D. Magnesium isoglycyrrhizinate high-dose group

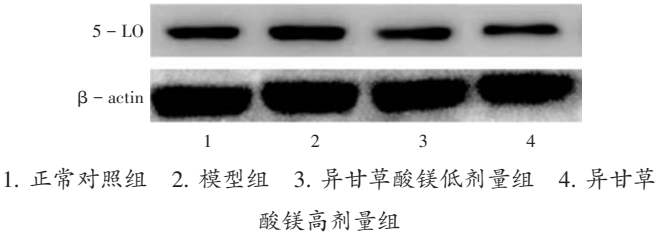
Fig.2 MPO expression levels in liver homogenate of rats (Hematoxylin, × 200)

肝组织匀浆中MDA及SOD:与正常对照组比较,模型组大鼠肝组织匀浆中MDA水平显著升高,SOD水平显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较,异甘草酸镁低、高剂量组大鼠MDA水平均显著降低,SOD水平均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。详见表1。

肝组织匀浆中MPO表达:正常对照组大鼠肝组织匀浆中MPO的阳性程度弱;与正常对照组比较,模型组大鼠肝组织匀浆中MPO阳性表达水平显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,异甘草酸镁低、高剂量组大鼠肝组织匀浆中MPO阳性表达水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。详见表1及图2。

肝组织匀浆中5-LO蛋白表达:与正常对照组比较,模型组大鼠肝组织匀浆中5-LO蛋白表达水平显

著升高($P < 0.05$);与模型组比较,异甘草酸镁低、高剂量组大鼠肝组织匀浆中5-LO蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$)。详见表1及图3。



1. 正常对照组 2. 模型组 3. 异甘草酸镁低剂量组 4. 异甘草酸镁高剂量组

图3 大鼠肝组织匀浆中5-LO蛋白表达水平

A. Normal control group B. Model group C. Magnesium isoglycyrrhizinate low-dose group D. Magnesium isoglycyrrhizinate high-dose group

Fig.3 5-LO protein expression levels in liver homogenate of rats

3 讨论

本研究中采用乙醇灌胃复制的大鼠肝损伤模型,对大鼠带来的病理与生理变化符合长期饮酒人群的生理与病理变化规律。该模型中,采用前2周与后6周同体积分数但不同剂量的乙醇灌胃,成功复制了大鼠模型。

ALT与AST均是肝损伤的敏感性指标,分别存在于肝脏细胞的细胞浆与线粒体内,当肝脏受到损伤时,两者均会从细胞内释放入血^[9-11]。本研究中,模型组大鼠血清中ALT及AST水平均显著高于正常对照组,异甘草酸镁低、高剂量组大鼠血清中ALT及AST水平均显著低于模型组;同时,模型组大鼠肝组织匀浆中MDA水平显著高于正常对照组,SOD水平显著低于对照组,提示大鼠经乙醇灌胃,肝组织处于氧化应激损伤状态;异甘草酸镁低、高剂量组肝组织匀浆中MDA水平较模型组显著降低,SOD水平显著升高,提示异甘草酸镁能通过降低肝脏氧化应激损伤来减轻乙醇对肝脏的损害。

中性粒细胞浸润在肝组织病变中发挥了极大的损害作用,进一步加重了肝组织损伤^[12-14]。模型大鼠肝脏中,大量浸润的中性粒细胞会进一步释放出炎性物质、细胞毒类物质来加重病理性伤害,进一步破坏肝功能,引起肝细胞损伤。MPO在机体内由中性粒细胞等分泌,是中性粒细胞的标记物,其表达水平的高低可直接反映组织的炎症程度^[15-16]。5-LO在肝脏中一般参与白三烯、花生四烯酸等的催化反应,介导炎性反应的发生与发展,参与炎性反应的放大过程。有研究发现,5-LO加快了中性粒细胞生成白三烯B₄的过程,白三烯B₄则导致了炎症发生^[17]。因此本研究中通过药物干预控制ALD模型大鼠肝组织中5-LO的表达,观察能否抑制肝脏疾病的发病及进展。

本研究中,异甘草酸镁低、高剂量组大鼠肝细胞中炎性细胞的浸润程度较模型组显著减轻,免疫组化结果显示,大鼠肝组织匀浆中MPO阳性表达水平及5-LO蛋白表达水平不同程度降低,提示不同剂量的异甘草酸镁对炎性反应的抑制程度不同。

综上所述,异甘草酸镁具有一定的肝脏保护作用,其机制可能与减轻肝细胞氧化应激损伤与抑制中性粒细胞浸润有关。

参考文献

- [1] 刘岩,苏琳. 酒精性肝病基层诊疗指南(2019年)[J]. 临床肝胆病杂志,2021,37(1):36-40.
- [2] 朱平生,焦炎杰,付双楠,等. 酒精致大鼠肝损伤早期血清生物标志物水平的变化规律[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(2):129-133.
- [3] 奚之骏,许丽雯,祁雯,等. 五种保肝药物对药物性肝损害的

疗效分析:一项网状Meta分析研究[J]. 中国医院药学杂志,2019,39(2):183-190.

- [4] SUI M,JIANG X,CHEN J,et al. Magnesium isoglycyrrhizinate ameliorates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation by regulating ferroptosis signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2018,106(10):125-133.
- [5] 任发燕,王超,谭喜莹,等. 异甘草酸镁预防胃癌化疗药物致肝损伤的药物经济学评价[J]. 中国药房,2020,31(13):1613-1617.
- [6] 杜晓菲,陈杰,黄春洋,等. 异甘草酸镁治疗自身免疫样药物性肝损伤的效果和安全性[J]. 临床肝胆病杂志,2020,36(6):1330-1333.
- [7] LU C,XU W,SHAO J,et al. Blockade of hedgehog pathway is required for the protective effects of magnesium isoglycyrrhizinate against ethanol induced hepatocyte steatosis and apoptosis [J]. IUBMB Life,2017,7(69):1-13.
- [8] YAN T,WANG H,CAO L,et al. Glycyrrhizin Alleviates Nonalcoholic Steatohepatitis via Modulating Bile Acids and Meta-Inflammation[J]. Drug Metab Dispos,2018,46(9):1310-1319.
- [9] 周霖,王肖辉,荆自伟,等. 鹿茸多肽对四氯化碳诱导的小鼠肝纤维化的保护作用及其机制研究[J]. 中药新药与临床药理,2021,32(3):338-345.
- [10] 张勇勇,李三强,宋影,等. 解整合素-金属蛋白酶9在小鼠急性酒精性肝损伤过程中的表达分析[J]. 中国临床药理学杂志,2018,34(18):2164-2166.
- [11] 李崇尧,陈莹莹,宋鹏,等. 增塑剂 DIDP 对肝脏氧化应激损伤及 VitE 拮抗作用研究[J]. 生态毒理学报,2019,14(6):170-178.
- [12] KAWACHI S,HINES IN,LAROUX FS,et al. Nitric oxide synthase and postischemic liver injury [J]. Biochem Biophys Res Commun,2000,276(3):851.
- [13] 钟敬波,徐成. 促红细胞生成素对大鼠肝缺血再灌注损伤氧自由基、细胞间黏附分子-1的表达及中性粒细胞浸润的影响[J]. 中国临床药理学杂志,2019,35(4):358-360.
- [14] DAS S,MARAS JS,HUSSAIN MS,et al. Hyperoxidized albumin modulates neutrophils to induce oxidative stress and inflammation in severe alcoholic hepatitis [J]. Hepatology, 2017,65(2):631-646.
- [15] 刘湘钰,刘宽智,张新建. 丹皮酚抑制大鼠肝缺血再灌注损伤中性粒细胞浸润及 TNF- α 释放[J]. 广州中医药大学学报,2019,36(9):1421-1425.
- [16] 侯月辉,朱哲,李覃,等. 曲美他嗪抑制自噬减少中性粒细胞胞外核酸网形成[J]. 中国药理学通报,2020,36(4):527-534.
- [17] LI P,OH DY,BANDYOPADHYAY G,et al. LTB₄ promotes insulin resistance in obese mice by acting on macrophages,hepatocytes and myocytes [J]. Nature Medicine, 2015,21(3):239-247.

(收稿日期:2022-01-11;修回日期:2022-03-15)