

· 临床论著 ·

复方甘草酸苷改善慢性乙型肝炎患者肝脏炎症的机制研究

高学松¹ 高丽丽^{2,3} 芦红萍^{2,3} 刘顺爱^{2,3} 曹金凤^{2,3} 段雪飞¹ 成军^{2,3}

【摘要】目的 研究复方甘草酸苷改善慢性乙型肝炎患者肝脏炎症的机制。**方法** 将21例慢性乙型肝炎患者分为试验组(10例)与对照组(11例), 试验组患者给予复方甘草酸苷200 mg入液静脉输注, 同时给予苦参素注射液、还原型谷胱甘肽和多烯磷脂酰胆碱注射液保肝, 恩替卡韦抗病毒治疗; 对照组患者除不使用复方甘草酸苷外与治疗组治疗相同, 疗程均为2周。分别在治疗前后检测患者肝功能指标及多个细胞因子水平。**结果** 两组患者肝功能均有好转, 试验组ALT水平 $[(103.4 \pm 80.4) \text{ U/L}]$ 下降显著($t = 6.162, P = 0.000$); MCP-2治疗后 $[(40.25 \pm 14.51) \text{ pg/ml}]$ 较治疗前显著下降($t = 2.381, P = 0.041$); ENA-78治疗后较治疗前升高($t = -3.561, P = 0.006$)。试验组和对照组IL-16、6Ckine、TPO、SCF、TSLP、IL-33、IL-20、IL-21、IL-23、IL-28 α 、TRAIL和SDF-1 α + β 治疗前后差异均无统计学意义。试验组和对照组IL-18治疗前后均有所下降。**结论** 复方甘草酸苷可显著改善肝脏炎症, 抗炎的机制可能与抑制炎症因子MCP-2, 活化ENA-78有关。

【关键词】 肝炎, 乙型; 复方甘草酸苷; 单核细胞趋化蛋白2; 上皮来源的中性粒细胞活化肽-78

The mechanism research of compound glycyrrhizin attenuates inflammation of the liver in patients with chronic hepatitis B Gao Xuesong¹, Gao Lili^{2,3}, Lu Hongping^{2,3}, Liu Shun'ai^{2,3}, Cao Jinfeng^{2,3}, Duan Xuefei¹, Cheng Jun^{2,3}. ¹Department of General Medicine, ²Institute of Infectious Diseases, ³Beijing Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China
Corresponding author: Cheng Jun, Email: chengj0817@sina.cn

【Abstract】Objective To study the mechanism of reduction inflammation of the liver in chronic hepatitis B patients treatment with compound glycyrrhizin. **Methods** Total of 21 patients with chronic hepatitis B were divided into treatment group (10 cases) and control group (11 cases). Patients in both groups were given entecavir tablets 0.5 mg once a day, combined with the regular liver protecting therapy, including matrine injection, reduced glutathione for injection and polyene phosphatidylcholine injection. Patients in treatment group were given compound glycyrrhizin solution at dose of 200 mg by intravenous infusion. Patients in both groups were treated for 2 weeks. The liver function and level of multiple cytokines of patients were tested before and after treatment, respectively. **Results** The liver function of the patients in two groups were significantly improved. ALT levels $[(103.4 \pm 80.4) \text{ U/L}]$ decreased significantly in the treatment group ($t = 6.162, P = 0.000$); MCP-2 significantly decreased after treatment $[(40.25 \pm 14.51) \text{ pg/ml}]$ ($t = 2.381, P = 0.041$); ENA-78 also significantly increased ($t = -3.561, P = 0.006$). No significant differences were found in the change of IL-16, 6Ckine, TPO, SCF, TSLP, IL-33, IL-20, IL-21, IL-23, IL-28 α , TRAIL and SDF-1 α + β in the two groups. The levels of IL-18 were decreased in two groups after treatment. **Conclusions** The liver inflammation could be reduced by compound glycyrrhizin significantly. The mechanism may be related with the suppression of MCP-2 or activation of ENA-78.

【Key words】 Hepatitis B; Compound glycyrrhizin; Monocyte chemoattractant protein 2; Epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2015.04.013

基金项目: 北京市医院管理局重点医学专业发展计划(扬帆计划)(肝炎专业)(No. ZYLX201402)

作者单位: 100015 北京, 首都医科大学附属北京地坛医院综合科¹、传染病研究所²、新发突发传染病研究北京市重点实验室³

通讯作者: 成军, Email: chengj0817@sina.cn

HBV感染是导致肝脏炎症的决定性因素,慢性乙型肝炎最根本的治疗措施是抗病毒治疗,同时辅以抗炎、保护肝细胞膜和免疫调节等治疗,一定程度上可以提高临床疗效,延缓病情进展。本研究应用复方甘草酸苷治疗慢性乙型肝炎患者,对其作用机制进行探讨,现报道如下。

资料与方法

一、一般资料

1. 选择2013年11月至2014年12月首都医科大学附属北京地坛医院综合科收治的慢性乙型肝炎患者共21例,其中男性18例,女性3例,年龄21~52岁,平均年龄(34.2±8.5)岁。入组患者随机分为两组:试验组(10例)与对照组(11例)。试验组中男性9例,女性1例;年龄22~46岁,平均(33.3±7.6)岁。对照组中男性9例,女性2例;年龄21~52岁,平均(35.5±9.6)岁。试验组与对照组的年龄($F=0.440$, $P=0.515$)与性别($\chi^2=0.286$, $P=0.593$)比较差异均无统计学意义。研究经本院医学伦理委员会批准,患者均签署知情同意书。

2. 入组标准:诊断符合《慢性乙型肝炎防治指南》^[1]标准,血清ALT在正常值上限10倍以上。

3. 排除标准:①伴有HAV、HCV、HDV、HEV和HIV现症感染,或伴有自身免疫性肝病和遗传

性肝病者;②失代偿性肝病有下列之一指征者:血清白蛋白<30 g/L,凝血酶原时间较正常值上限延长2 s以上或凝血酶原活动度<60%,有腹水、食道静脉曲张破裂出血和肝性脑病等病史,脾功能亢进:白细胞计数< $3.5 \times 10^9/L$,血小板计数< $80 \times 10^9/L$,血红蛋白<100 g/L;③孕期或哺乳期妇女。

二、方法

1. 治疗方案:试验组给予复方甘草酸苷注射液200 mg/d,恩替卡韦0.5 mg/d,抗病毒治疗,以及苦参素注射液、还原型谷胱甘肽和多烯磷脂酰胆碱注射液,对照组除复方甘草酸苷外与治疗组相同,疗程为2周。

2. 检测方法:治疗前后分别检测肝功能、HBV表面标志物、HBV DNA载量;采用MILLIPLEX高通量多因子检测平台检测炎症因子MCP-2、IL-16、6Ckine、TPO、SCF、TSLP、IL-33、IL-20、IL-21、IL-23、IL-28 α 、TRAIL、SDF-1 α + β 和ENA-78(美国MILLIPORE公司产品,货号HCYP2MAG-62K);采用ELISA方法检测IL-18(美国eBioscience公司产品,货号BMS267/2)。

三、统计学处理

采用SPSS 22.0统计软件进行统计分析。患者年龄、治疗前后的ALT和所有炎症因子的检测结果为计量资料,采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间的比较采用成组设计资料的 t 检验;患者性别为计数资料,统计分析

表1 复方甘草酸苷对ALT的作用(U/L)

组别	例数	治疗前	治疗后	t	P
试验组	10	872.9±387.9	103.4±80.4	6.162	0.000
对照组	11	534.5±460.7	399.5±303.2	1.149	0.277

表2 多种细胞因子治疗前后的变化(pg/ml)

指标	试验组(10例)		t	P	对照组(11例)		t	P
	治疗前	治疗后			治疗前	治疗后		
MCP-2	48.00±20.82	40.25±14.51 ^a	2.381	0.041	43.68±11.53	48.9±15.09	-1.335	0.212
IL-16	30.03±17.49	27.45±23.22	0.567	0.584	21.80±21.40	50.90±86.47	-1.141	0.280
6Ckine	820.18±614.34	719.13±751.26	0.601	0.444	313.44±162.26	336.36±129.88	-1.095	0.299
SCF	17.01±17.81	13.06±9.79	1.496	0.169	9.00±4.43	10.78±4.60	-1.868	0.091
TSLP	7.49±11.01	7.57±14.80	-0.055	0.958	14.77±43.67	12.58±35.79	0.919	0.380
TPO	353.93±781.82	481.84±1318.01	-0.744	0.476	650.55±1949.11	514.51±1363.98	0.753	0.469
IL-20	19.39±10.09	16.61±5.39	1.335	0.215	15.36±4.57	15.74±4.59	-0.694	0.503
IL-21	3.26±3.24	2.71±2.79	0.978	0.354	1.78±0.67	1.92±1.04	-0.634	0.540
IL-33	23.98±51.67	28.59±74.65	-0.620	0.551	40.18±121.09	33.50±97.14	0.923	0.378
TRAIL	14.80±9.02	20.82±11.49	-1.942	0.084	20.65±10.82	22.58±10.26	-0.788	0.449
ENA-78	464.96±163.35	618.34±148.7 ^a	-3.561	0.006	476.57±241.70	571.36±341.83	-1.407	0.190
IL-28 α	120.45±369.13	93.95±284.36	0.989	0.349	4.87±2.61	5.38±3.38	-1.207	0.255
SDF-1 α + β	5817.30±2755.71	6170.60±2961.19	-1.624	0.139	4059.09±1543.63	3955.00±1487.51	0.337	0.743
IL-23	556.58±1234.91	572.82±1530.37	-0.160	0.876	1021.49±3223.75	835.15±2591.76	0.977	0.352
IL-18	168.97±149.65	120.87±74.41 ^a	3.079	0.012	119.00±72.73	86.11±53.23 ^a	2.429	0.045

注:^a与治疗前相比, $P<0.05$;MCP-2:单核细胞趋化蛋白2,IL-16:白细胞介素16,6Ckine:次级淋巴组织趋化因子,SCF:干细胞因子,TSLP:胸腺基质细胞分泌的淋巴细胞生成素,TPO:血小板生成素,IL-20:白细胞介素20,IL-21:白细胞介素21,IL-33:白细胞介素33,TRAIL:肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体,ENA-78:上皮来源的中性粒细胞活化肽-78,IL-28 α :白细胞介素28 α ,SDF-1 α + β :基质细胞衍生因子1 α + β ,IL-23:白细胞介素23,IL-18:白细胞介素18

采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、复方甘草酸苷对肝功能的作用

试验组与对照组在经过2周治疗后肝功能均有明显好转,两组患者ALT较治疗前均有所下降,但试验组ALT下降有统计学差异($t = 6.162$, $P = 0.000$),对照组ALT下降无统计学差异($t = 1.149$, $P = 0.277$),见表1。

二、复方甘草酸苷对细胞因子的作用

经过两周治疗后,较对照组相比,试验组MCP-2下降($t = 2.381$, $P = 0.041$),ENA-78升高($t = -3.561$, $P = 0.006$),差异均有统计学意义。试验组和对照组IL-16、6Ckine、TPO、SCF、TSLP、IL-33、IL-20、IL-21、IL-23、IL-28 α 、TRAIL和SDF-1 α + β 水平治疗前后差异均无统计学意义。试验组和对照组IL-18治疗前后均有所下降,差异具有统计学意义($t = 3.079$, $P = 0.012$; $t = 2.429$, $P = 0.045$),详见表2。

讨 论

复方甘草酸苷一种肝细胞膜保护剂,是以 β -甘草酸苷为主要成分并辅以甘氨酸半胱氨酸复合而成。复方甘草酸苷具有抗炎作用,目前已知的抗炎作用机制有两种,一种为通过抑制花生四烯酸的代谢水平,抑制细胞色素C的释放,从而抑制磷脂酶A2的活性,抑制补体的激活;一种为非特异性的抗炎及保护细胞膜的作用,抑制热休克蛋白90的表达从而降低糖皮质激素受体与配体的亲和力^[2-6]。基因表达谱芯片的原理是将cDNA或寡核苷酸片段固定在芯片上,用两种不同的荧光分子标记样品mRNA,杂交后分析荧光强度反映基因表达水平的变化。利用这个系统,可以同时对着同一个微量样本中的多种指标进行分析。本次研究通过对复方甘草酸苷治疗前后的慢性乙型肝炎患者的血液标本进行高通量的细胞因子分析,结果发现单核细胞趋化蛋白2(monocyte chemoattractant protein 2, MCP-2)和上皮来源的中性粒细胞活化肽-78(epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78, ENA-78/CXCL5)的变化差异具有统计学意义。

MCP-2又称为趋化因子配体8(Chemokine C-C motif ligand 8, CCL8)属于趋化因子家族成员,能趋化单核细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、T细胞和NK细胞至炎症区域激活炎症细

胞,释放炎症因子^[7]。MCP-2与受体结合后,可诱导炎症细胞迁移,最终可以造成靶细胞的损伤^[8]。有研究表明在肝移植术后的急性肺损伤中,MCP-2在术后各个时间点血浆浓度均明显升高,在急性肺损伤中发挥重要的作用^[9]。除全身急性炎症反应或移植后发生的排异反应外,MCP-2在慢性感染中也发挥了重要作用。Fierro等^[10]发现HCV自发清除的患者血浆MCP-2水平升高。Mason等^[11]研究人巨细胞病毒(Human cytomegalovirus, HCMV)感染后终生潜伏的机制时发现,HCMV可以改变细胞的分泌蛋白质组,MCP-2分泌增加,可以使CD4⁺T细胞的分化、迁移改变,免疫监视功能受到抑制,有利于病毒的长期潜伏感染。Poole等^[12]发现MCP-2为hsa-miR-92a的作用靶点,HCMV潜伏感染后,病毒相关的IL-10分泌增加,下调hsa-miR-92a的表达,反向调节MCP-2。MCP-2与慢性乙型肝炎的相关性至今未见报道。本次研究发现,与对照组相比,经复方甘草酸苷治疗的试验组患者血浆MCP-2水平在治疗后出现明显下降,推断MCP-2可能参与HBV所致的肝脏炎症损伤;另一方面复方甘草酸苷改善肝脏炎症的机制可能是通过抑制MCP-2的表达,起到了类似于其在HCMV感染中的作用,从而抑制巨噬细胞等免疫细胞向受损肝细胞迁移,最终发挥减少肝脏细胞坏死、减轻炎症反应的作用。

ENA-78属于CXC细胞因子超家族,是一种重要的炎性介质,由单核细胞、巨噬细胞和T淋巴细胞等多种细胞合成释放。ENA-78还具有调节血管生成因子活性的作用。Jain使用干扰素联合利巴韦林治疗HIV/HCV重叠感染的患者时发现,实现持续病毒学应答相关的患者,ENA-78水平下降,认为ENA-78可以作为评估肝脏炎症的指标,可以预测抗病毒疗效^[13]。而Zekri等^[14]研究认为在HCV患者抗病毒治疗后血浆ENA-78水平显著下降,但与抗病毒应答无关。酒精性肝炎患者中肝脏组织中ENA-78表达显著上升,与预后不良相关^[15]。肝脏组织学表现为坏死性炎症和纤维化的慢性肝炎患者血浆ENA-78水平降低。出现临床并发症的肝硬化的患者,血浆ENA-78水平下降,而组织学ENA-78表达上升^[16]。ENA-78与肿瘤进展的关系较为确切。Zhou等^[17]发现ENA-78促进肝癌细胞增殖、侵袭及瘤内中性粒细胞浸润,ENA-78高表达与生存期缩短,肿瘤复发相关。ENA-78同样可以通过募集瘤内中性粒细胞浸润促进肝内胆管癌的生长和转移^[18]。进一步研究机制认为CXCR2/ENA-78通过PI3K/Akt/GSK-3 β /Snail的信号转导通路共同促

进上皮-间充质细胞转变利于肝癌细胞的扩散^[19]。Xu等^[20]认为ENA-78-CXCR2和ERK1/2通路在肝癌细胞的转移和侵袭中发挥了更重要的作用。目前未见ENA-78与慢性乙型肝炎的研究报道。本研究发现, 试验组患者血浆中ENA-78在治疗后水平升高, 是否因为复方甘草酸苷治疗改变了免疫调节, 是否与将来的抗病毒疗效相关, 尚需要进一步观察。

活化的巨噬细胞可以分泌IL-18, IL-18可以诱导活化的T细胞和NK细胞产生IFN- γ , 在免疫调节中发挥重要作用。研究表明, IL-18的基因多态性(-137C/G)与HBV感染肝脏炎症坏死程度相关^[21]。也有学者研究发现IL-18的基因多态性(-607A/A)与HBV的易感性有关^[22]。本次研究发现, 试验组和对照组, 治疗前后血浆IL-18水平均有差异, 也提示其与肝脏炎症程度相关, 与复方甘草酸苷治疗无明确相关性。

总之, 复方甘草酸苷可以有效改善肝脏炎症, 其作用机制涉及多个方面, 可能通过抑制MCP-2的表达, 从而抑制巨噬细胞、NK细胞向受损肝细胞迁移; 也有可能通过调节ENA-78增强抗病毒的疗效, 从而改善肝脏炎症, 但确切机制还需要进一步研究。本研究为复方甘草酸苷改善肝脏炎症的机制研究提供了一条新的思路。

参考文献

- 1 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)[J/CD]. 中国肝病杂志: 电子版, 2011, 3(1): 40-56.
- 2 Li JY, Cao HY, Liu P, et al. Glycyrrhizic acid in the treatment of liver diseases: literature review[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 872139.
- 3 Qu Y, Zong L, Xu M, et al. Effects of 18 α -glycyrrhizin on TGF- β 1/Smad signaling pathway in rats with carbon tetrachloride-induced liver fibrosis[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(2): 1292-1301.
- 4 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.
- 5 Kao TC, Wu CH, Yen GC. Glycyrrhizic acid and 18 β -glycyrrhetic acid recover glucocorticoid resistance via PI3K-induced AP1, CRE and NFAT activation[J]. Phytomedicine, 2013, 20(3-4): 295-302.
- 6 张耀武. 恩替卡韦联合复方甘草酸苷治疗代偿期活动性乙型肝炎肝硬化患者的临床研究[J/CD]. 中国肝病杂志: 电子版, 2013, 5(4): 37-41.
- 7 Rom S, Rom I, Passiatore G, et al. CCL8/MCP-2 is a target for mir-146a in HIV-1-infected human microglial cells[J]. FASEB J, 2010, 24(7): 2292-2300.
- 8 Liu H, Liu Z, Chen J, et al. Induction of CCL8/MCP-2 by mycobacteria through the activation of TLR2/PI3K/Akt signaling pathway[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56815.
- 9 沈宁, 王艳玲, 郭娜, 等. 肝移植急性肺损伤患者围手术期血浆Eotaxin和MCP-2变化及意义[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2011, 32(5): 612-615.
- 10 Fierro NA, González-Aldaco K, Torres-Valadez R, et al. Spontaneous hepatitis C viral clearance and hepatitis C chronic infection are associated with distinct cytokine profiles in Mexican patients[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2015, 110(2): 267-271.
- 11 Mason GM, Poole E, Sissons JG, et al. Human cytomegalovirus latency alters the cellular secretome, inducing cluster of differentiation (CD)4⁺ T-cell migration and suppression of effector function[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(36): 14538-14543.
- 12 Poole E, Avdic S, Hodgkinson J, et al. Latency-associated viral interleukin-10 (IL-10) encoded by human cytomegalovirus modulates cellular IL-10 and CCL8 Secretion during latent infection through changes in the cellular microRNA hsa-miR-92a[J]. J Virol, 2014, 88(24): 13947-13955.
- 13 Jain MK, Adams-Huet B, Terekhova D, et al. Acute and chronic immune biomarker changes during interferon/ribavirin treatment in HIV/HCV co-infected patients[J]. J Viral Hepat, 2015, 22(1): 25-36.
- 14 Zekri AR, Bahnassy AA, Mohamed WS, et al. Dynamic interplay between CXCL levels in chronic hepatitis C patients treated by interferon[J]. Virol J, 2013, 10: 218.
- 15 Dominguez M, Miquel R, Colmenero J, et al. Hepatic expression of CXC chemokines predicts portal hypertension and survival in patients with alcoholic hepatitis[J]. Gastroenterology, 2009, 136(5): 1639-1650.
- 16 Tacke F, Zimmermann HW, Trautwein C, et al. CXCL5 plasma levels decrease in patients with chronic liver disease[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2011, 26(3): 523-529.
- 17 Zhou SL, Dai Z, Zhou ZJ, et al. Overexpression of CXCL5 mediates neutrophil infiltration and indicates poor prognosis for hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2012, 56(6): 2242-2254.
- 18 Zhou SL, Dai Z, Zhou ZJ, et al. CXCL5 contributes to tumor metastasis and recurrence of intrahepatic cholangiocarcinoma by recruiting infiltrative intratumoral neutrophils[J]. Carcinogenesis, 2014, 35(3): 597-605.
- 19 Zhou SL, Zhou ZJ, Hu ZQ, et al. CXCR2/CXCL5 axis contributes to epithelial-mesenchymal transition of HCC cells through activating PI3K/Akt/GSK-3 β /Snail signaling[J]. Cancer Lett, 2015, 358(2): 124-135.
- 20 Xu X, Huang P, Yang B, et al. Roles of CXCL5 on migration and invasion of liver cancer cells[J]. J Transl Med, 2014, 12: 193.
- 21 Costa SF, Gama Florêncio SC, Fernandes FS, et al. IL-18, TNF, and IFN- γ alleles and genotypes are associated with susceptibility to chronic hepatitis B infection and severity of liver injury[J]. J Med Virol, 2015. [Epub ahead of print]
- 22 Motavaf M, Safari S, Alavian SM. Interleukin 18 gene promoter polymorphisms and susceptibility to chronic hepatitis B infection: a review study[J]. Hepat Mon, 2014, 14(7): e19879.

(收稿日期: 2015-06-02)

(本文编辑: 孙荣华)

高学松, 高丽丽, 芦红萍, 等. 复方甘草酸苷改善慢性乙型肝炎患者肝脏炎症的机制研究[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2015, 9(4): 490-493.