

· 综 述 ·

甘草次酸及其衍生物对炎症和免疫功能
影响的研究进展

缪雨青 周文丽 王杰军

甘草是中医治疗中最常用的草本植物,在中国古代就被广泛应用于外伤、肿胀及解毒,有“草药之祖”之美誉^[1,2]。而甘草的主要生物活性物质——甘草次酸(glycyrrhetic acid, GA)及其代谢产物 18 α -、18 β -甘草次酸(18 α GA、18 β GA)已经被证实具有很多药理作用,例如抗炎、保肝、调节免疫、抗肿瘤以及抗病毒等^[3],临床上主要用于治疗肝炎。近年来,GA 在抗肿瘤方面的研究越来越多,大多抗癌研究局限在 GA 及其衍生物对肿瘤细胞本身的直接作用,表现在其在一定浓度和剂量下可抑制各种癌细胞增殖,促进癌细胞凋亡,而对正常体细胞的毒性较小^[4-7]。超过 40 年的细胞毒性药物发展基本上没有给转移性疾病的治愈率带来多少改变,原因很可能是忽视了肿瘤微环境的作用,众所周知肿瘤的发生发展与炎症和免疫是密不可分的,因此笔者对 GA 及其衍生物在炎症和免疫方面的可能的作用位点及信号转导通路进行综述,旨在探讨其可否在炎症和免疫方面间接对抗肿瘤,从而为拓宽此药物的临床应用提供理论依据。现将 GA 及其衍生物在炎症免疫方面的作用靶点综述如下。

1 11 β -羟类固醇脱氢酶(11 β -hydroxysteroid dehydrogenase, 11 β -HSD)

18 β -GA 为 11 β -HSD 的抑制剂,11 β -HSD 是 GA 类糖皮质激素作用的主要靶点:11 β -HSD 是糖皮质激素作用的受体前调节的关键物质,GA 通过抑制 11 β -HSD(催化氧化反应,使皮质激素暂时失活)mRNA 的表达,抑制糖皮质激素失活,增强糖皮质激素的抗炎效应。Randall MJ 等^[8]的研究结果说明了这一点。Kratschmar DV 等^[9]则在 GA 不良反应的研究中发现 GA 对 11 β -HSD 抑制后,造成有活性的糖皮质激素进入盐皮质激素受体所在区并与其结合,发挥

其内在的盐皮质激素作用,因此临床应用该药常并发假醛固酮增多症。因此可以看出 11 β -HSD 是 GA 作为类皮质激素发挥抗炎效应的主要作用靶点。

2 花生四烯酸代谢相关酶

Ohtsuki K 等^[10]认为 GA 部分通过选择性地抑制与花生四烯酸(AA)发生级联反应的代谢酶——磷脂酶 A₂(PLA₂)和脂加氧酶(LOX)的活性,使得前列腺素(PG)、白三烯(LTB₄)等炎性介质无法产生,抑制 PG 的合成与释放,从而产生抗炎效应。Xie CF 等^[11]最近的研究也证明了异甘草酸镁通过在 AA 代谢中调节 COXs 和 LOX 通路抗炎:抑制脂多糖(LPS)诱导的 PLA₂ 的激活以及 AA 代谢产物(如前列腺素 E₂、前列腺环素、血栓烷 B₂ 和白三烯)的产生。此外, LPS 诱导的 AA 代谢相关酶包括环氧合酶(COX-2、COX-1)、5-LOX、血栓烷 B 和前列环素在转录水平被异甘草酸镁显著抑制。同时 PLA₂ 的抑制剂 GA, COX-2 的抑制剂阿司匹林均被发现有抗癌疗效,这提示它们很有可能是通过抑制这些代谢酶类抑制炎症从而发挥抗癌效应的。

3 NF- κ B 及相关炎症因子

Hasan SK 等^[12]的研究表明 18 β -GA 通过下调 NF- κ B 的表达而抑制 COX-2 和 iNOS 的表达。Ni YF 等^[13]的实验结果也表明甘草酸通过抑制 COX-2 和 iNOS 的表达可防止脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤,减轻肺水肿。此外,环磷酰胺处理过的小鼠血清 NF- κ B 和 iNOS mRNA 和蛋白表达水平均较对照组高,而 18 β -GA 则能下调它们的表达^[14]。除了 iNOS、COX-2、NF- κ B 还调控参与免疫反应的早期和炎症反应各阶段的其他许多分子,如:TNF- α 、IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、IL-12、趋化因子、黏附分子、AP-1/2 等,是炎症和免疫反应中的关键因子,与肿瘤也有密切的关系,是炎症和肿瘤的一大交叉点,因此更是 GA 潜在的抗癌作用靶点。如:GA 能下调 TNF- α 诱导的基质金属蛋白酶 9(MMP-9)和血管内皮生长因子(VEGF)的表达,从而抑制了肿瘤细胞的侵袭和转移,而该抑制作用是通过阻断磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B

作者单位:上海第二军医大学附属长征医院肿瘤科(上海 200082)

通讯作者:王杰军, Tel: 13801707057, Email: jiejunw@smmu.

edu.cn

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20180119. 102

(Akt) 通路依赖的 NF- κ B 活性实现的:GA 抑制了抑制因子 I κ B 的降解,抑制了 TNF- α 诱导的 DNA 结合活性和 NF- κ B 的活性^[15]。Shetty AV 等^[16]的研究发现 18 α -GA 通过下调 NF- κ B、VEGF 和 MMP-9 的表达阻止前列腺细胞(DU-145)前列腺细胞侵袭。Chang YL 等^[17]发现 GA 抑制 TNF- α 诱导的细胞间黏附分子 1(ICAM-1)的表达,导致单核细胞对人脐静脉内皮细胞黏附性降低。这种抑制作用归功于 GA 阻断了 JNK/c-JUN 和 I κ B/NF- κ B 两条信号通路,从而减少了活化蛋白-1(AP-1)和 NF- κ B 介导的 ICAM-1 的表达。Matsui S 等^[18]在 TNF- α 和 IL-4 刺激人胎儿肺成纤维细胞系(HFL-1)构建肺炎的体外模型中发现甘草酸和 α -甘草酸在低于产生细胞毒性剂量下使 IL-8 表达减少,同时也可轻微抑制嗜酸性粒细胞趋化因子 1(Eotaxin 1)的表达。这些结果表明甘草次酸衍生物可作为抗炎和抗过敏药物用于肺过敏性疾病。另外,文献[14]提到的 GA 缓解环磷酰胺诱导的肝毒性的研究中,环磷酰胺处理的大鼠血清中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 明显上升,18 β -GA 用药后这些升高的炎症因子的表达水平又明显降低。Kong SZ 等^[19]的研究中也证实了 GA 可下调炎症因子 IL-6、TNF- α 、IL-10 及 MMP-1、MMP-3 的表达。

上述这些能被 GA 下调的炎症因子大多在癌组织中也高表达,如果在患肿瘤个体应用 GA 同样也能降低这类高表达炎症因子的水平,是否就能缓解甚至抑制肿瘤的发展呢?此外,研究还表明 18 α -GA 可以下调前炎症因子/生长因子基因(HMGB1)、IL-6 和 IL-8 在 DU-145 细胞中的表达,同时上调细胞中非甾体抗炎基因 1(NAG-1)的表达,这些都证明了其在前列腺癌细胞中抗炎活性^[16]。

4 PI3K/Akt/人糖原合成酶激酶 3 β (GSK3 β)

Kao TC 等^[20]的研究则表明,甘草次酸及代谢产物通过作用于 PI3K/Akt/GSK3 β 信号通路抑制细胞因子 TNF- α 和 IL-1R 的产生从而抗炎,实验组还发现 GA 可以通过调控 PI3K 通路进而激活 AP-1、cAMP 反应元件(CRE)、糖皮质激素受体元件(GRE)和活化的 T 细胞核因子(NFAT)从而逆转糖皮质激素抵抗,增强糖皮质激素的抗炎效应^[3]。而最新一项关于感染性休克的研究中也证实 GA 的一衍生物——DGAE 减轻症状的机制为使 GSK3 β 失活从而降低 NO、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 在血清中的表达^[21]。这与文献[12-19]提到的 GA 降低炎症因子的表达一致,提示 PI3K/Akt/GSK3 β 也可能是 GA 在肿瘤微环境中的作用靶点。

5 树突状细胞(DC)

Bordbar N 等^[22]研究表明,18 α -GA 和 18 β -GA 能上调 DC 细胞的表面分子 CD40、CD86 和 MHC II,表明 GA 促进了 DC 的成熟。GA 诱导的对 DC 细胞的免疫刺激能力是通过刺激 T 细胞的分化和 Th1 细胞因子 IL-12 的产生来实现的。然而 Kim ME 等^[23]的研究却有相反的结果:表型上, β -GA 显著抑制了 LPS 诱导的树突状细胞的表面分子 CD80、CD86、主要组织相容复合物 MHC I 和 MHC II 的表达,说明 β -GA 抑制了 DC 的成熟;功能上, β -GA 抑制 DC 分泌 IL-12 及其胞吞活性,此外, β -GA 处理也削弱了 DC 诱导 Th1 免疫应答的能力。出现上述不一致结果的可能原因是免疫系统是一把双刃剑,其本身就是非常复杂的,在不同疾病不同时期其功能状态均不一样,且 GA 对免疫系统为双向调节,GA 作用的不同阶段往往也会产生不一样的反应,但其确可能成为 GA 抗癌的靶点。

6 Th1/Th2 细胞

Matsui S 等^[18]的研究还发现甘草次酸衍生物还可增强 Th1 细胞因子 IFN- γ 、IL-2、IL-12 的表达,调整 Th2 细胞因子表达使 IL-10 表达增加,IL-4 表达减弱。Kim J 等^[24]在白色念珠菌的相关研究中也发现 GA 能增强 T 细胞的分化,并且与 Th2 免疫相比,GA 能显著增强 Th1 免疫应答,这提示了 GA 有 Th1 免疫佐剂活性,有利于治疗 Th1 相关疾病。Bordbar N 等^[22]发现 GA 能增加 Th1 细胞因子 IFN- γ 的分泌,增强 Th1 免疫应答,与文献[22]结果一致。在抗肿瘤免疫反应中,Th1 细胞主导机体的细胞免疫功能,分泌 Th1 类细胞因子,对抗肿瘤免疫反应起非常重要的作用;而 Th2 细胞起对抗 Th1 细胞的作用。因此 GA 对 Th1 免疫的增强作用是其抗肿瘤的又一大可能机制。

7 补体(complement,C)系统

甘草酸和 GA 可多靶点地抑制补体系统。最早 Kroes BH 等^[25]研究表明 GA 对人经典的补体激活途径有抑制作用,而对补体旁路激活途径无抑制作用, β -GA 是作用在 C2 水平上的。后来 GA 被发现能完全抑制 C3 α 被酪蛋白激酶 2 磷酸化,通过与补体 C3、C3a 和 C3 α 结合并改变它们的构象,使之不被磷酸化激活,进而产生抗炎作用^[26]。GA 还能通过阻断经典途径和 2 个补体旁路激活途径进而抑制补体溶解细胞的活性,但不影响免疫黏附,提示 GA 阻滞了 C5 或其后的补体级联过程,进而研究发现 GA 是抑制溶解途径中膜攻击复合物形成,从而阻止各种自身免疫性疾病和炎症性疾病中补体参与的膜攻击复合物对组

织的损伤^[27]。恶性肿瘤患者中 C 水平可较健康人高 2~3 倍,因此 GA 对补体系统的抑制也可作为抗肿瘤的机制。

8 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)

在实验性内脏利什曼病的研究中发现 18 β -GA 的抗利什曼虫活性依赖于 TLR2 和 TLR4 介导的 MyD88 - P38 - NF- κ B 信号通路的激活^[28]。另外,实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 的模型中发现 18 β -GA 通过抑制 MAPK 信号通路调制神经系统中小胶质细胞,显著减少前炎症因子,从而减少神经系统炎症和髓鞘损伤。研究还发现 GA 阻止了致炎性 T 细胞 (CD4⁺CD45⁺ 和 CD8⁺CD45⁺ T 细胞) 在神经系统中的募集,通过抑制趋化因子 CCL2、CCL3、CCL5、CXCL10 和 CCL20 的表达抑制了炎症浸润^[29],再次验证了上文提到的多处作用靶点。

GA 及其衍生物药理作用广泛,能抑制炎症发生的多个环节和靶点,对免疫系统有双向调节作用,由于炎症免疫是交互作用的网状结构,因此各靶点之间又相互联系相互调控,如 MAPK 与 NF- κ B, NF- κ B 与趋化因子, C 与趋化因子, Th 细胞可分泌炎症因子等等,并不能完全严格区分。笔者选取近几年主要研究靶点为对象,旨在整理 GA 可能在肿瘤微环境中的作用位点,为深入研究其抗肿瘤的机制提供思路。

参 考 文 献

- [1] Wang ZY, Nixon DW. Licorice and cancer[J]. *Nutrit Cancer*, 2001, 39(1): 1-11.
- [2] Nomura T, Fukai T. Phenolic constituents of licorice (*Glycyrrhiza* species). *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe = Progress in the chemistry of organic natural products* [J]. *Progres Dans la Chimie des Substances Organiques Naturelles*, 1998, 73(13): 1-158.
- [3] Kao TC, Wu CH, Yen GC. Glycyrrhizic acid and 18beta-glycyrrhetic acid recover glucocorticoid resistance via PI3K-induced AP1, CRE and NFAT activation[J]. *Phytomedicine: Internat J Phytotherapy Phytopharmacol*, 2013, 20(3-4): 295-302.
- [4] Schwarz S, Csuk R. Synthesis and antitumour activity of glycyrrhetic acid derivatives[J]. *Bioorgan Med Chemistry*, 2010, 18(21): 7458-7474.
- [5] Yamaguchi H, Noshita T, Yu T, et al. Novel effects of glycyrrhetic acid on the central nervous system tumorigenic progenitor cells: induction of actin disruption and tumor cell-selective toxicity[J]. *Eur J Med Chemistry*, 2010, 45(7): 2943-2948.
- [6] Sharma G, Kar S, Palit S, et al. 18beta-glycyrrhetic acid induces apoptosis through modulation of Akt/FOXO3a/Bim pathway in human breast cancer MCF-7 cells[J]. *J Cellul Physiol*, 2012, 227(5): 1923-1931.
- [7] Song J, Ko HS, Sohn EJ, et al. Inhibition of protein kinase C alpha/beta1 and activation of c-Jun NH2-terminal kinase mediate glycyrrhetic acid induced apoptosis in non-small cell lung cancer NCI-H460 cells[J]. *Bioorgan Med Chemistry Lett*, 2014, 24(4): 1188-1191.
- [8] Randall MJ, Kostin SF, Burgess EJ, et al. Anti-inflammatory effects of levalbuterol-induced 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity in airway epithelial cells[J]. *Frontiers Endocrinol*, 2014, 5: 236.
- [9] Kratschmar DV, Vuorinen A, Da Cunha T, et al. Characterization of activity and binding mode of glycyrrhetic acid derivatives inhibiting 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2[J]. *J Steroid Biochemistry Molecular Biol*, 2011, 125(1-2): 129-142.
- [10] Ohtsuki K, Abe Y, Shimoyama Y, et al. Separation of phospholipase A2 in Habu snake venom by glycyrrhizin (GL)-affinity column chromatography and identification of a GL-sensitive enzyme[J]. *Biolog Pharmac Bull*, 1998, 21(6): 574-578.
- [11] Xie C, Li X, Wu J, et al. Anti-inflammatory activity of magnesium isoglycyrrhizinate through inhibition of phospholipase A2/arachidonic acid pathway[J]. *Inflammation*, 2015, 38(4): 1639-1648.
- [12] Hasan SK, Khan R, Ali N, et al. 18-beta glycyrrhetic acid alleviates 2-acetylaminofluorene-induced hepatotoxicity in Wistar rats: Role in hyperproliferation, inflammation and oxidative stress[J]. *Human Exp Toxicol*, 2015, 34(6): 628-641.
- [13] Ni YF, Kuai JK, Lu ZF, et al. Glycyrrhizin treatment is associated with attenuation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression[J]. *J Surgical Res*, 2011, 165(1): e29-e35.
- [14] Mahmoud AM, Al Dera HS. 18beta-glycyrrhetic acid exerts protective effects against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity: potential role of

- PPARgamma and Nrf2 upregulation [J]. *Genes Nutrition*, 2015, 10(6): 1–13.
- [15] Jayasooriya RG, Dilshara MG, Park SR, et al. 18beta-glycyrrhetic acid suppresses TNF-alpha induced matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor by suppressing the Akt-dependent NF-kappaB pathway [J]. *Toxicol In-Vitro*, 2014, 28(5): 751–758.
- [16] Shetty AV, Thirugnanam S, Dakshinamoorthy G, et al. 18alpha-glycyrrhetic acid targets prostate cancer cells by down-regulating inflammation-related genes[J]. *Int J Oncol*, 2011, 39(3): 635–640.
- [17] Chang YL, Chen CL, Kuo CL, et al. Glycyrrhetic acid inhibits ICAM-1 expression via blocking JNK and NF-kappaB pathways in TNF-alpha-activated endothelial cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31(5): 546–553.
- [18] Matsui S, Matsumoto H, Sonoda Y, et al. Glycyrrhizin and related compounds down-regulate production of inflammatory chemokines IL-8 and eotaxin 1 in a human lung fibroblast cell line[J]. *Int Immunopharmacol*, 2004, 4(13): 1633–1644.
- [19] Kong SZ, Chen HM, Yu XT, et al. The protective effect of 18beta-glycyrrhetic acid against UV irradiation induced photoaging in mice [J]. *Exp Gerontol*, 2015, 61(1): 147–155.
- [20] Kao TC, Shyu MH, Yen GC. Glycyrrhizic acid and 18beta-glycyrrhetic acid inhibit inflammation via PI3K/Akt/GSK3beta signaling and glucocorticoid receptor activation [J]. *J Agr Food Chemist*, 2010, 58(15): 8623–8629.
- [21] Luo J, Liu M, Wu X, et al. DGAEE, a newly synthesized derivative of glycyrrhetic acid, potentially attenuates mouse septic shock via its main metabolite DGA in an IL-10-dependent manner[J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 29(2): 583–590.
- [22] Bordbar N, Karimi MH, Amirghofran Z. Phenotypic and functional maturation of murine dendritic cells induced by 18 alpha- and beta-glycyrrhetic acid [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2014, 36(1): 52–60.
- [23] Kim ME, Kim HK, Kim DH, et al. 18beta-glycyrrhetic acid from licorice root impairs dendritic cells maturation and Th1 immune responses [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2013, 35(3): 329–335.
- [24] Kim J, Joo I, Kim H, et al. 18beta-glycyrrhetic acid induces immunological adjuvant activity of Th1 against *Candida albicans* surface mannan extract [J]. *Phytomedicine*, 2013, 20(11): 951–955.
- [25] Kroes BH, Beukelman CJ, van den Berg AJ, et al. Inhibition of human complement by beta-glycyrrhetic acid [J]. *Immunology*, 1997, 90(1): 115–120.
- [26] Kawakami F, Shimoyama Y, Ohtsuki K. Characterization of complement C₃ as a glycyrrhizin (GL)-binding protein and the phosphorylation of C3alpha by CK-2, which is potently inhibited by GL and glycyrrhetic acid *in vitro* [J]. *J Biol Chemistry*, 2003, 133(2): 231–237.
- [27] Xiao Y, Xu J, Mao C, et al. 18Beta-glycyrrhetic acid ameliorates acute *Propionibacterium acnes*-induced liver injury through inhibition of macrophage inflammatory protein-1alpha [J]. *J Biol Chemistry*, 2010, 285(2): 1128–1137.
- [28] Gupta P, Das PK, Ukil A. Antileishmanial effect of 18beta-glycyrrhetic acid is mediated by Toll-like receptor-dependent canonical and noncanonical p38 activation [J]. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 2015, 59(5): 2531–2539.
- [29] Zhou J, Cai W, Jin M, et al. 18beta-glycyrrhetic acid suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis through inhibition of microglia activation and promotion of remyelination [J]. *Sci Reports*, 2015, 5(2): 13713.

(收稿: 2016–07–29 在线: 2018–04–28)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶