

甘草次酸衍生物抗肝纤维化的实验研究

朱世超^{1,2}, 郑学敏², 张 玥³, 柳 璐³, 周植星^{2,4*}, 徐为人^{2*}

1. 天津医科大学药学院, 天津 300070

2. 天津药物研究院 天津市新药设计与发现重点实验室, 天津 300193

3. 天津中医药大学, 天津 300193

4. 国家食品药品监督管理总局药品审评中心, 北京 100038

摘要: 目的 探讨甘草次酸衍生物(TY501)对四氯化碳(CCl₄)致小鼠肝纤维化的保护作用及其机制。方法 采用经典CCl₄造模法建立小鼠肝纤维化模型, 给予高、中、低剂量(45、15、5 mg/kg) TY501干预治疗, 用秋水仙碱(0.36 mg/kg)作阳性对照。给药30 d后, 检测各组小鼠肝功能指标、肝纤维化指标、肝组织羟脯氨酸(Hyp)和转化生长因子-β1(TGF-β1)的量, 并取其肝组织进行病理学染色。结果 与模型组相比, TY501各治疗组肝功能指标(ALT、AST、ALP、ALB)、肝纤维化指标(HA、LN、PCIII、CIV)及肝组织Hyp、TGF-β1的量均有不同程度改善, 其中高剂量组改善作用最为明显($P < 0.05, 0.01$); 肝组织病理学切片显示, 给药组小鼠肝纤维化程度降低, 有逆转趋势。结论 TY501对CCl₄造成的肝纤维化有明显的保护作用。

关键词: 甘草次酸衍生物; TY501; 肝纤维化; 四氯化碳; 转化生长因子-β1; 羟脯氨酸

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)17-3554-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.17.016

Effect of TY501 on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice

ZHU Shi-chao^{1,2}, ZHENG Xue-min², ZHANG Yue³, LIU Lu³, ZHOU Zhi-xing^{2,4}, XU Wei-ren²

1. School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

2. Tianjin Key Laboratory of Molecular Design and Drug Discovery, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

4. Center for Drug Evaluation, State Administration of Food and Drug Administration, Beijing 100038, China

Abstract: Objective To explore the protective effects of glycyrrhetic acid derivatives (TY501) on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. **Methods** The mice liver fibrosis was established by classical CCl₄, and TY501 was given in three kinds of dosage (45, 15, and 5 mg/kg), with colchicine serving as control. After 30 d treatment, the liver function, fibrosis and the levels of Hyp and TGF-β1 were detected. Moreover, the histopathological changes were detected by HE and Masson staining. **Results** Compared with model group, the levels of ALT, AST, ALP, ALB, HA, LN, PCIII, CIV, Hyp, and TGF-β1 were all decreased, with high-dose group being the most significant ($P < 0.05, 0.01$). Histopathological examination showed that liver fibrosis of those mice treated with TY501 was improved to some extent. **Conclusion** TY501 can significantly protect carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis.

Key words: glycyrrhetic acid derivatives; TY501; liver fibrosis; carbon tetrachloride; transforming growth factor-β1; hydroxyproline

肝纤维化是多种病因导致的慢性肝脏疾病, 主要表现为肝内细胞外基质(ECM)增生或过度沉积, 随着病情的发展, 逐渐演变为肝硬化或肝癌。若在此进程中及时介入治疗、去除刺激因素则可逆转肝纤维化的进一步发展^[1]。因此, 抗肝纤维化是阻断肝硬化或肝癌的有效途径。

中药提取物甘草次酸及其衍生物可以减轻肝细胞损伤、促进肝细胞再生, 对多种模型造成的肝损伤均有保护作用^[2]。但该类物质在临床使用中常伴有醛固酮增多症, 也有报道称可引起甲状腺的中度抑制, 且其较差的水溶性及高剂量产生的不良反应也制约了其在临床上的应用^[2]。为了减少其不良反应,

收稿日期: 2017-02-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81503130); 天津市应用基础与前沿技术研究计划(14JCQJC13000); 天津市应用基础与前沿技术研究计划(13JCZDJC28500)

作者简介: 朱世超, 男, 硕士研究生, 主要从事药理毒理学研究。E-mail: zhouzhx@cde.org.cn

***通信作者** 周植星, 男, 副研究员, 主要从事药理毒理学研究。Tel: (022)23006815 E-mail: zhouzx@tjipr.com

徐为人, 男, 研究员, 博士生导师, 主要从事药理研究与药物设计。Tel: (022)23006862 E-mail: xuwr@tjipr.com

本研究团队对甘草次酸母核进行改造,以脱氧甘草次酸为母体,在 11 位引入取代基异噻唑甲酰胺基团,合成甘草次酸衍生物地格氯唑(deoxyglycichloxazol, TY501)^[3],前期研究表明 TY501 在抗肺纤维化^[3]、肝损伤^[4]、胃溃疡^[4]、抗炎^[5]及肾损伤^[6]等适应症方面药效明显。本研究将着重考察 TY501 抗肝纤维化的药效作用,以期为临床治疗肝纤维化提供新药。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性昆明种小鼠 80 只,体质量(20±2)g,购自军事医学科学院实验动物中心,动物合格证号 2014-0001。

1.2 药物与试剂

四氯化碳(CCl₄,分析纯,批号 2003658301,天津市天河化学试剂厂);羧甲基纤维素钠(CMC-Na,化学纯,批号 F20131015,国药集团化学试剂有限公司);TY501(白色粉末,质量分数 97.8%,批号 20130512,天津药物研究院创新中心提供,实验前用 0.5% CMC-Na 配制为所需浓度);秋水仙碱(白色粉末,批号 13122321,东京化成工业株式会社,实验前用 0.5% CMC-Na 配制为所需浓度);透明质酸(HA)试剂盒、III 型前胶原(PCIII)试剂盒、IV 型胶原(CIV)试剂盒(Cloud-Clone Corp.);丙氨酸转氨酶(ALT)试剂盒、天冬氨酸转氨酶(AST)试剂盒、碱性磷酸酶(ALP)试剂盒(中生北控科技股份有限公司);羟脯氨酸(Hyp)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);转化生长因子-β1(TGF-β1)酶联免疫试剂盒(Cloud-Clone Corp.);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);市售食用橄榄油。

1.3 仪器

Sartorius BS124S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);HS3120 超声波清洗器(天津市恒奥科技发展有限公司);SELECTAA-2 型自动生化分析仪(荷兰威图公司);Sigma 3K-15 型台式冷冻离心机(德国 Sigma 离心机有限公司);L-500 型台式低速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);Spectra MAX M5 型酶标仪(美国 Molecular Devices 公司)。

2 方法

2.1 肝纤维化模型制备及分组给药

将 60 只小鼠随机分为 2 组,对照组 10 只,造模组 50 只。造模组 sc 20% CCl₄ 橄榄油溶液 5

mL/kg,每周 2 次,每次造模称体质量,连续给药 2 个月^[7];对照组 sc 同等剂量的橄榄油,在 2 个月造模期间,观察小鼠的饮食饮水、活动、精神状况以及形态变化等。造模 30 d 后将造模组随机分为 5 组:秋水仙碱(0.36 mg/kg,阳性对照)组, TY501 高、中、低剂量(45、15、5 mg/kg)组,模型组;模型组 ig 同等体积的 CMC-Na 溶液,各给药组 ig 相应剂量的药物,每天 1 次,连续给药 30 d,造模给药同时进行。

2.2 指标测定

2.2.1 一般情况观察 观察并记录小鼠的生存状态、体质量及肝脏的质量、形态、外观,计算肝脏指数。

2.2.2 肝功能及肝纤维化指标测定 给药结束后,小鼠禁食不禁水 12 h,眼眶取血,静置 2 h 后,以 3 500 r/min 离心 15 min,取血清待测;全自动生化分析仪测定肝功能指标 ALT、AST、ALP、白蛋白(ALB)及血清透明质酸(HA)、层黏连蛋白(LN)、PCIII 和 CIV 水平。

2.2.3 肝组织 Hyp 测定 称取肝脏组织湿质量 30~100 mg 放入试管,准确加水解液 1 mL,混匀。加盖后 95 ℃水解 20 min;调 pH 值至 6.0~6.8;取 3~4 mL 稀释的水解液加适量活性炭,混匀,3 500 r/min 离心 10 min,取上清 1 mL 进行检测,计算每克湿质量肝组织含有的 Hyp 量。

2.2.4 肝组织 TGF-β1 测定 取肝组织,生理盐水洗涤,匀浆,静置,离心,取上清。根据 BCA 试剂盒说明书测定上清液蛋白的量,按照 TGF-β1 酶联免疫试剂盒说明操作,酶标仪 450 nm 波长测定吸光度,计算上清液的 TGF-β1 浓度,再根据上清液蛋白浓度计算肝组织 TGF-β1 的量。

2.2.5 肝组织病理学检测 取各鼠相同部位肝叶,10%甲醛固定。分别进行苏木精-伊红(HE)染色及 Masson 染色,光学显微镜下观察并拍照,观察肝组织纤维化程度。

2.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件分析数据,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行组间比较。

3 结果

3.1 一般情况观察

与对照组相比,模型组小鼠毛发干枯、暗淡,注射部位出现硬块、溃烂,随着造模时间的延长,动物活动量逐渐减少,精神不振,常钻入垫料下卷曲而卧,饮食量减少;而给药组小鼠状态良好,毛

色有光泽, 整洁, 行动敏捷, 饮食状况良好。在模型制备及给药期间, 均有小鼠死亡, 其中造模前 30 d 内, 造模组死亡 10 只, 分组给药后模型组死亡 3 只, 秋水仙碱组死亡 2 只, TY501 低剂量组死亡 1 只, TY501 中剂量组死亡 1 只, 对照组和 TY501 高剂量组未见死亡; 给药后, 情况好转, 各给药组动物死亡率均低于模型组。

对照组小鼠肝脏边缘整齐, 颜色暗红, 质软, 表面平整光滑有光泽; 模型组肝脏颜色呈黄棕色, 表面粗糙无光泽, 凹凸不平, 大小不等颗粒状, 且发生黏连。经过 TY501 及秋水仙碱治疗 30 d 后, 给药组小鼠肝脏较模型组有一定的恢复, 表面虽仍有些许颗粒状, 但肝脏的颜色逐渐变为红色。

3.2 小鼠体质量变化及肝脏指数

每次给药前称体质量, 实验结束后, 解剖小鼠, 取肝脏称质量。与对照组相比, 模型组小鼠肝脏指数增大, 差异显著 ($P < 0.05$); 给药后, 小鼠肝脏指数逐渐降低, TY501 高剂量组降低最为明显, 与模型组相比, 差异显著 ($P < 0.05$)。给药过程中各

组小鼠体质量变化见表 1。

3.3 肝功能指标比较

与对照组相比, 模型组小鼠血清 ALT、AST、ALP 显著升高 ($P < 0.05$), ALB 显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 秋水仙碱组小鼠血清 ALT、AST 显著降低 ($P < 0.05$), TY501 中、高剂量组小鼠血清 ALT、AST 显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。见表 2。

3.4 肝纤维化指标比较

与对照组相比, 模型组小鼠血清 HA、LN、PCIII 及 CIV 的水平均显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 给药各组血清 HA、LN、PCIII 和 CIV 均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。见表 3。

3.5 肝组织 Hyp 和 TGF- β 1 水平比较

与对照组相比, 模型组小鼠肝组织 Hyp 的量显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 给药组小鼠肝组织 Hyp 的量均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与对照组相比, 模型组小鼠肝组织 TGF- β 1 的量显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 给药组小鼠肝组织 TGF- β 1 的量均显著降低 ($P < 0.05$)。见图 1。

表 1 TY501 对肝纤维化小鼠体质量及肝脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of TY501 on body weight and liver coefficient of mice with liver fibrosis ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	动物数/只	给药后体质量/g					肝脏指数/%
			第 5 天	第 10 天	第 15 天	第 20 天	第 25 天	
对照	—	10	46.5±3.1	48.5±3.3	50.7±3.7	51.1±3.0	52.1±4.5	3.57±0.32
模型	—	5	41.2±4.8	41.3±4.3*	42.7±4.8*	43.5±5.4*	45.5±5.0*	5.90±0.65*
秋水仙碱	0.36	6	43.4±3.6	43.6±3.0	45.2±3.3	44.8±2.9	47.0±3.3	5.53±0.37
TY501	5	7	43.1±3.6	43.0±4.2	45.4±4.7	45.9±4.7	46.7±4.7	5.71±0.95
	15	7	45.5±3.1	45.3±3.3	47.1±3.1	46.5±2.4	47.3±2.8	5.55±0.86
	45	8	42.6±5.1	43.3±7.0	45.2±6.2	44.6±7.5	48.0±6.1	5.41±0.24 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group

表 2 TY501 对肝纤维化小鼠肝功能指标的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of TY501 on liver function index of mice with liver fibrosis ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	动物数/只	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	ALP/(U·L ⁻¹)	ALB/(μmol·L ⁻¹)
对照	—	10	17.0±4.8	131.4±15.3	84.0±11.4	27.7±1.0
模型	—	5	1018.3±348.9*	868.2±340.8*	159.1±25.1*	24.8±1.4*
秋水仙碱	0.36	6	828.3±240.4 [#]	661.2±217.8 [#]	166.3±22.7	25.3±0.9
TY501	5	7	833.9±307.8	711.2±352.5	144.8±26.8	25.2±1.0
	15	7	772.8±283.7 [#]	712.9±204.7 [#]	170.9±29.4	24.4±1.4
	45	8	519.2±200.4 ^{##}	551.4±215.9 ^{##}	119.4±31.6 [#]	23.3±0.7

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$, 下同

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group, same as below

表 3 TY501 对肝纤维化小鼠血清 HA、LN、PCIII 及 CIV 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effects of TY501 on contents of HA, LN, PCIII, and CIV in serum of mice with liver fibrosis ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	动物数/只	HA/(μg·L ⁻¹)	LN/(μg·L ⁻¹)	PCIII/(μg·L ⁻¹)	CIV/(μg·L ⁻¹)
对照	—	10	209.0±44.5	241.4±55.8	89.2±21.1	229.1±41.5
模型	—	5	330.3±58.2*	368.2±60.5*	156.1±35.1*	393.9±51.4*
秋水仙碱	0.36	6	258.3±42.7 [#]	361.2±67.1	136.3±42.4	333.6±42.7 [#]
TY501	5	7	283.9±67.2	351.4±52.5	144.5±36.3	349.2±60.5 [#]
	15	7	252.2±63.4 [#]	322.9±44.7 [#]	150.9±29.6	323.1±55.5 [#]
	45	8	239.2±50.4 ^{##}	318.4±45.4 [#]	119.8±40.9 ^{##}	288.0±39.3 ^{##}

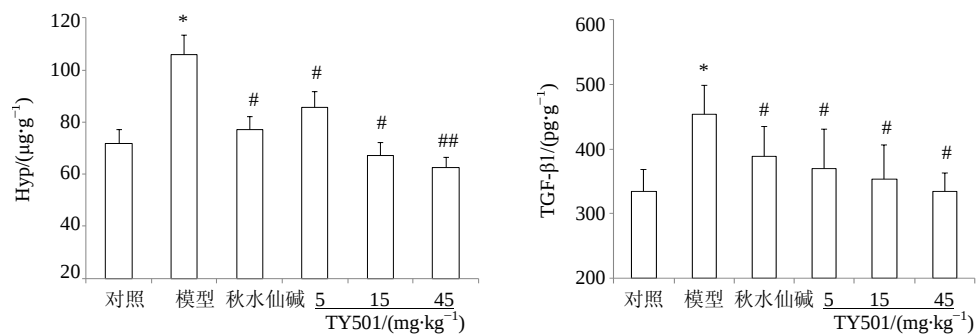


图 1 TY501 对肝纤维化小鼠肝组织 Hyp 和 TGF-β1 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 1 Effects of TY501 on levels of Hyp and TGF-β1 in liver tissue of mice with liver fibrosis ($\bar{x} \pm s$)

3.6 肝脏病理组织形态观察

3.6.1 HE 染色 光镜显示对照组小鼠肝脏组织结构正常,界限清晰,肝细胞完整;模型组肝细胞肿大,排列紊乱,出现不同程度的变性、坏死,并出现大量空泡;秋水仙碱组肝细胞明显发生好转;TY501 给药组病变较模型组轻,肝细胞完整、清晰,尤以高剂量组改善明显,见图 2。

3.6.2 Masson 染色 光镜显示对照组小鼠肝小叶结构完整,肝细胞索排列整齐;模型组出现胶原纤维沉积,肝细胞索排列紊乱,浊肿明显,形成结节样的假小叶;秋水仙碱组肝细胞情况好转;TY501

给药组较模型组减轻,尤以高剂量组改善最为明显。见图 2。

4 讨论

肝纤维化是机体对慢性肝损伤的一种修复反应,是慢性肝病共有的病理变化。激活的肝星状细胞(HSC)是促进 ECM 过度沉积的主要细胞^[8],多种细胞因子参与了 HSC 的激活,TGF-β1 被认为是最重要的因素^[9],其不但可激活 HSC 而且可以调节 ECM 的合成和降解平衡。TGF-β1 拮抗剂或已成功用于治疗实验性肝纤维化,常用于抑制由二甲基亚硝胺、胆管结扎及 CCl₄ 诱导的纤维化^[10]。迄今为

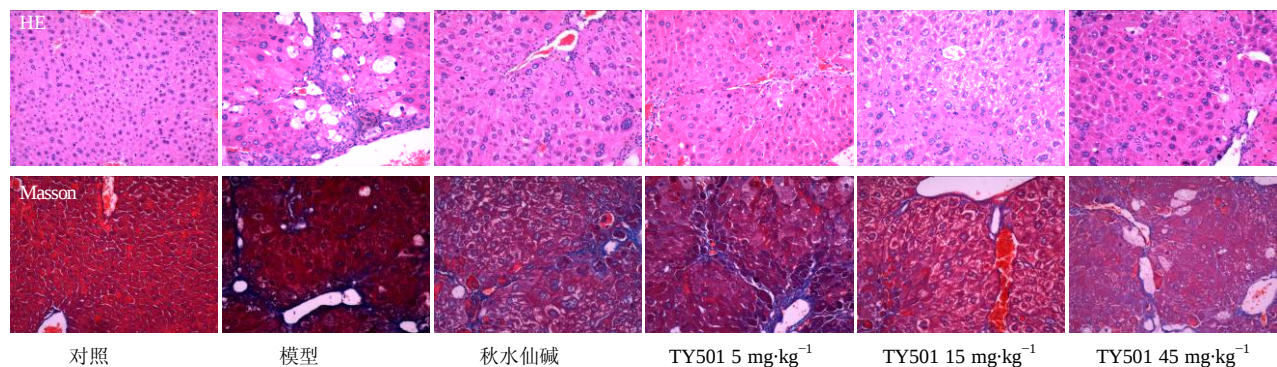


图 2 各组小鼠肝组织病理学改变

Fig. 2 Pathological changes of liver of mice in each group

止人们并未发现有效的方法来治疗肝纤维化与肝硬化,比较常用的方法是肝脏移植。因此急需开发出治疗肝纤维化更有效的药物。

最近调查研究表明,中药提取物可以作为治疗慢性肝脏疾病的替代疗法^[11],中医药治疗慢性肝病有数千年的历史,目前从中药中提取的一些小分子物质,如水飞蓟宾^[12]和甘草次酸^[13]具有抗肝纤维化作用。甘草酸类化合物保肝作用明确,对多种模型的肝损伤具有保护作用,可以减轻肝细胞坏死,降低血清 ALT 水平,抗肝纤维化,促进肝细胞再生。但临床上应用该药常伴有假醛固酮增多症,限制了其在临床上的应用。为了增加甘草次酸的药理活性,降低其副作用,本实验室对其进行了大量的化学合成和结构改造,合成了一系列五环三萜类新型化合物并申请了专利,药效学研究结果显示,在多种急、慢性炎症模型中,TY501 具有良好的抗炎活性^[14-16],其在抗炎、保肝和免疫调节等方面的活性均强于甘草次酸,且长期给药毒性低,具有很好的成药性。前期急性肝损伤实验表明,50 mg/kg TY501 药效显著,但与模型组相比小鼠体质量有所下降,因此该剂量下可能存在一定毒性,而本实验周期较长,所以剂量设置为 5、15、45 mg/kg。

本实验采用 CCl₄ 造模,CCl₄ 主要通过细胞色素 P450 产生反应中间体,如 CCl₃· 自由基与 CCl₃OO· 自由基,这些自由基可以与细胞内的核酸、蛋白质及脂质结合,改变脂质代谢、促进 HSC 的激活,向细胞间质释放胶原纤维,导致肝脏纤维化,诱发肝癌^[17-19]。此造模方法简便易行、廉价、耗时短且在形态学及病理生理学的某些方面与人的肝纤维化比较相似,因此目前仍采用此方法造模^[20]。大量研究表明秋水仙碱具有抗纤维化和抗炎的作用,其可降低肝纤维化向肝硬化发展的速度,甚至扭转这一进程。现已被用来治疗慢性肝脏疾病,其可能主要通过减少炎症因子、PCIII 的水平来发挥抗肝纤维化的作用^[21-22]。故本研究采用秋水仙碱作为阳性对照,从实验结果可以看出秋水仙碱组小鼠肝脏纤维化程度明显降低,与模型组相比,差异具有统计学意义。

本实验中与对照组相比,模型组小鼠肝功能指标 ALT、AST 显著上升,肝脏 Hyp 的量明显增加,纤维化指标(HA、LN、PCIII 和 CIV)及病理切片分析显示模型组小鼠肝脏损伤严重,有明显纤维化特征。因此以上结果说明 CCl₄ 诱导的肝纤维化模型

复制成功;同时从实验结果也可看到, TY501 给药后 ALT、AST 水平,肝纤维化指标 HA、LN、PCIII 和 CIV 水平及 Hyp 的量均显著降低,与模型组相比,差异具有统计学意义,提示 TY501 对 CCl₄ 致小鼠肝纤维化有保护作用。与对照组相比,模型组小鼠肝组织 TGF-β1 的水平显著升高,给药后 TY501 高剂量组 TGF-β1 水平降低,与模型组相比,差异具有统计学意义,提示 TY501 可能是通过拮抗 TGF-β1 的表达来发挥抗肝纤维化作用。综上所述, TY501 对 CCl₄ 造成的肝纤维化确有保护作用,但其确切机制仍需进一步研究。

参考文献

- [1] 刘妙娜,王 腾,李 巍,等. 桦木酸抗肝纤维化作用的实验研究 [J]. 华中科技大学学报:医学版, 2015, 44(6): 682-690.
- [2] 聂慧慧,阴红涛. 甘草次酸及其衍生物的研究进展 [J]. 海峡药学, 2016, 28(8): 14-17.
- [3] 耿艳艳,于 冰,周植星,等. 甘草次酸衍生物 TY501 抗肺纤维化作用及机制研究 [J]. 中国药理学通报, 2015, 31(2): 210-215.
- [4] 靳如芳,刘 静,张金晓,等. 甘草次酸及其衍生物 TY501 对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 增殖的影响 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(4): 255-257.
- [5] 符海霞. 甘草次酸衍生物 TY501 的药效学研究 [D]. 天津:天津医科大学, 2009.
- [6] 崔李平,王玉丽,张士俊,等. 甘草次酸衍生物对大鼠肾损伤的保护作用 [J]. 中草药, 2011, 42(6): 1177-1179.
- [7] 闫冰川,丁常清,江伟焱,等. 长期腹腔注射四氯化碳诱导小鼠肝纤维化模型的建立 [J]. 中华实验外科杂志, 2015, 32(6): 1464-1465.
- [8] Sarem M, Znaidak R, Macias M, et al. Hepatic stellate cells: It's role in normal and pathological conditions [J]. *Gastroenterol Hepatol*, 2006, 29(2): 93-101.
- [9] Breitkopf K, Haas S, Wiercinska E, et al. Anti-TGF-beta strategies for the treatment of chronic liver disease [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2005, 29(Suppl 11): 121-131.
- [10] Dooley S, Ten D P. TGF-beta in progression of liver disease [J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 347(1): 245-256.
- [11] Ferrucci L M, Bell B P, Dhotre K B, et al. Complementary and alternative medicine use in chronic liver disease patients [J]. *J Clin Gastroenterol*, 2010, 44(2): 40-45.
- [12] Jia J D, Bauer M, Cho J J, et al. Antifibrotic effect of silymarin in rat secondary biliary fibrosis is mediated by downregulation of procollagen alpha1 (I) and TIMP-1 [J].

- J Hepatol*, 2001, 35(3): 392-398.
- [13] Chen S, Zou L, Li L, *et al.* The protective effect of glycyrrhetic acid on carbon tetrachloride-induced chronic liver fibrosis in mice via upregulation of Nrf2 [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): 1932-6203.
- [14] 汤立达, 王建武, 雍建平, 等. 新型 11-脱氧甘草次酸-30-酰胺衍生物的研究 [J]. 中草药, 2006, 37(1): 20-25.
- [15] 汤立达, 王建武, 张士俊, 等. 新型含异噻唑的甘草次酸酰胺类衍生物的合成研究 [J]. 中草药, 2006, 37(3): 332-337.
- [16] 靳如芳, 刘 静, 张金晓, 等. 甘草次酸及其衍生物 TY501 对小鼠巨噬细胞 RAW264. 7 增殖的影响 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(4): 255-257.
- [17] Go J, Kim J E, Koh E K, *et al.* Protective effect of gallotannin-enriched extract isolated from *Galla Rhois* against CCl₄-induced hepatotoxicity in ICR mice [J]. *Nutrients*, 2016, 8(3): 107-125.
- [18] Nussler A K, Wildemann B, Freude T, *et al.* Chronic CCl₄ intoxication causes liver and bone damage similar to the human pathology of hepatic osteodystrophy: a mouse model to analyse the liver-bone axis [J]. *Arch Toxicol*, 2014, 88(4): 997-1006.
- [19] Cholbi M R, Paya M, Alcaraz M J. Inhibitory effects of phenolic compounds on CCl₄-induced microsomal lipid peroxidation [J]. *Cell Mol Life Sci*, 1991, 47(2): 195-199.
- [20] Li C H, Piao D M, Xu W X, *et al.* Morphological and serum hyaluronic acid, laminin and type IV collagen changes in dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis of rats [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(48): 7620-7624.
- [21] Nikolaidis N, Kountouras J, Giouleme O, *et al.* Colchicine treatment of liver fibrosis [J]. *Hepatol-Gastroenterol*, 2006, 53(68): 281-285.
- [22] Muntoni S, Rojkind, Muntoni S. Colchicine reduces procollagen III and increases pseudocholinesterase in chronic liver disease [J] *World J Gastroenterol*, 2011, 16(23): 2889-2894.