

差异是否引起体内生物利用度、临床疗效及副作用的不同,有待进一步研究证实。因此,由于上述差异的存在,建议医院在采购药品和临床选用药物时应加以考虑。

#### 参考文献:

[1] 中国药典 2005 年版二部[S]. 2005:458.

[2] 中国药典 2005 年版二部[S]. 附录. 2005:75~76.

[3] 胡祥珍,董 葵. Excel 在测定药物制剂溶出度参数数据处理中的应用[J]. 解放军药学报,2003,19(1):74.

收稿日期:2005-06-24

## 水飞蓟宾对小鼠腹腔巨噬细胞释放纤维化因子的影响

庄东平<sup>1</sup>,王硕丰<sup>2</sup>,章超凡<sup>2</sup>,桂 敏<sup>2</sup>,张 珉<sup>2</sup>,张俊平<sup>2</sup>(1. 福建省惠安县人民医院药剂科,福建 惠安 362100,2. 第二军医大学药学院药理学教研室,上海 200433)

**摘要 目的:**研究水飞蓟宾对小鼠腹腔巨噬细胞释放纤维化因子的影响。**方法:**小鼠腹腔巨噬细胞先后用卡西霉素和脂多糖刺激培养 24h 诱导纤维化因子。巨噬细胞培养上清中促胶原合成活性和转化生长因子  $\beta$  活性分别采用  $^3\text{H}$ -脯氨酸掺入法和肺上皮 Mv-1-Lu 细胞测定。**结果:**水飞蓟宾(6.25~50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )以浓度依赖方式抑制巨噬细胞产生胶原刺激活性和转化生长因子  $\beta_1$ 。**结论:**水飞蓟宾减少巨噬细胞释放促纤维化因子可能是其保肝抗硬化机制之一。

**关键词** 水飞蓟宾;巨噬细胞;转化生长因子;纤维化

中图分类号:R965

文献标识码:A

文章编号:1006-0111(2006)01-0020-03

## Effect of silybin on the fibrogenic cytokines production by mouse peritoneal macrophages

ZHUANG Dong-ping<sup>1</sup>, Wang Shuo-feng<sup>2</sup>, ZHANG Yue-fan<sup>2</sup>, GUI Min<sup>2</sup>, ZHANG Min<sup>2</sup>, ZHANG Jun-ping(1. Department of Pharmacy, Huian People Hospital, Huian 362100, China; 2. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**ABSTRACT Objective:** To study the effect of silybin on fibrogenic cytokines production by mouse peritoneal macrophages. **Methods:** Mouse peritoneal macrophages were primed with calcimycin  $10^{-6}$  mol/L for 8 h then elicited by lipopolysaccharides (LPS) 100 mg/L for 6 h to induce fibrogenic cytokines. Collagen stimulating activities and transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) activities in the macrophage culture supernatants were assessed by [ $^3\text{H}$ ]-proline incorporation assay using rat hepatic stellate HSC-T6 cell and [ $^3\text{H}$ ]-thymidine incorporation assay using Mv-1-Lu mink lung epithelial cell respectively. **Results:** Silybin (6.25~50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) inhibited LPS-induced collagen stimulating activities and TGF $\beta$  production in a concentration dependent manner. **Conclusion:** Hepatoprotective and antifibrotic properties of silybin may partly arise from its actions on fibrogenic cytokines production.

**KEY WORDS** silybin; macrophages; transforming growth factor; fibrosis

巨噬细胞合成和释放的多种细胞因子与肝纤维化的形成关系密切。根据它们在肝纤维化过程中的作用,可将其分为促肝纤维化细胞因子(如转化生长因子  $\beta_1$ 、血小板源生长因子、肿瘤坏死因子、白细胞介素-1,6,8等)和抗肝纤维化因子(如白细胞介素-10,干扰素- $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ 等)。这些细胞因子不仅参与肝星状细胞激活、增殖和胶原合成,还能调节细

胞外基质的降解<sup>[1,2]</sup>。水飞蓟宾为天然的黄酮木脂素类化合物,临床上对急慢性肝炎和肝硬化有较好的疗效<sup>[3]</sup>。为了解水飞蓟宾保肝抗硬化机制,本文研究水飞蓟宾对巨噬细胞产生纤维化因子的影响。

### 1 材料和方法

**1.1 药品和试剂** 水飞蓟宾由朝晖药厂提供(96%; mp167~168 $^{\circ}\text{C}$ ),用二甲亚砜配制成 50mg/mL,实验时用 DMEM 培养液稀释至所需浓度。卡

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.0171087)。

通讯作者:张俊平(1963-),男,副教授。E-mail:jpzhang08@hotmail.com.

西霉素、脂多糖和 TGFβ<sub>1</sub> 购于 Sigma 公司,<sup>3</sup>H-脯氨酸和<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷酸(TdR)为中科院北京原子能研究所产品,结晶紫及其它化学试剂均为分析纯国产试剂。

**1.2 动物和细胞培养** ICR 小鼠,♀,体重(28 ± 3)g,购于第二军医大学实验动物中心(清洁级,证书号 28-48)。

大鼠肝星状细胞 HSC-T6 细胞<sup>[4]</sup>由 Friedman S L 博士(Liver center laboratory, San Francisco)提供。细胞用含有 10% 新生牛血清(NCS,杭州四季青生物工程材料研究所)的 DMEM 培养液(Gibco 产品)传代培养。

**1.3 巨噬细胞纤维化因子的诱生** 参照文献<sup>[5]</sup>,ICR 小鼠腹腔巨噬细胞 2 × 10<sup>6</sup> 先用卡西霉素 1 μmol/L 刺激 8h,用 PBS 洗涤 3 次后,加入脂多糖 100 μg/L 和水飞蓟宾再孵育 6h 诱生纤维化因子,实验同时设药物溶剂对照组。收集细胞培养上清液,-30℃ 贮存备用。

**1.4 HSC-T6 胶原合成的测定** 巨噬细胞上清中纤维化因子胶原合成刺激活性采用<sup>3</sup>H-脯氨酸同位素法<sup>[5]</sup>测定。将细胞浓度调整为 2.5 × 10<sup>5</sup> 个/mL,在 96 孔板上每孔加 100 μL,培养 24h 使之形成单层,以消除细胞生长对胶原合成的影响。然后加入含 50 μg/mL 的维生素 C 的药物与系列稀释的巨噬细胞培养上清液,同时加入每孔<sup>3</sup>H-脯氨酸 18.5 kBq。细胞孵育 48h 后用胰酶消化,收集于玻璃纤维滤纸上,用液闪仪测定细胞<sup>3</sup>H-脯氨酸掺入值(cpm),以稀释比(1:8)时 cpm 值表示。

**1.5 转化生长因子 β 活性的测定** 采用雌肺上皮 Mv-1-Lu 细胞<sup>3</sup>H-TdR 同位素法<sup>[5]</sup>测定。96 孔细胞培养板每孔加入 2.5 × 10<sup>4</sup> 个 Mv-1-Lu 细胞,在 37℃ CO<sub>2</sub> 孵箱中孵育 24 h。然后加入系列稀释的巨噬细胞培养上清液,孵育 36 h 后,每孔加入<sup>3</sup>H-TdR 7.4 kBq 再培养 12h。细胞用胰酶消化,收集于玻璃纤维滤纸上,用液闪仪测定细胞<sup>3</sup>H-TdR 掺入值(cpm),以稀释比(1:8)时 cpm 值表示 TGFβ 活性。

**1.6 统计学处理** 采用 ANOVA 和 t 检验判断差异的显著性。

## 2 结果

**2.1 水飞蓟宾对巨噬细胞产生促胶原合成因子的影响** 巨噬细胞与水飞蓟宾和脂多糖共孵后,收集细胞培养上清液,测定细胞上清液对肝星状细胞 HSC-T6 胶原合成的影响。结果显示,水飞蓟宾可显著抑制脂多糖诱导巨噬细胞产生促胶原合成因子的产

生(表 1)。

表 1 水飞蓟宾对脂多糖诱生的巨噬细胞促胶原合成因子的影响

水飞蓟宾(μg/mL)	胶原合成刺激活性(cpm)	抑制率(%)
对照组	20 994 ± 1 033	
6.25	18 753 ± 3 24 <sup>1)</sup>	10.67
12.5	16 285 ± 856 <sup>2)</sup>	22.43
25.0	13 870 ± 572 <sup>2)</sup>	33.93
50.0	12 963 ± 368 <sup>2)</sup>	38.25

n = 6, x ± s, <sup>1)</sup>P < 0.05, <sup>2)</sup>P < 0.01 vs control.

## 2.2 水飞蓟宾对巨噬细胞产生 TGFβ 的影响

**2.2.1 TGFβ<sub>1</sub> 标准曲线的测定** TGFβ<sub>1</sub> 活性用 MV1LU 增殖抑制方法测定。基因重组的 TGFβ<sub>1</sub> (7.812 5 ~ 2 000 pg/mL) 与 Mv-1-Lu 细胞共同孵育 48h,测定其对增殖的抑制作用。结果 TGFβ<sub>1</sub> 可剂量依赖地抑制 Mv-1-Lu 的增殖(图 1)。

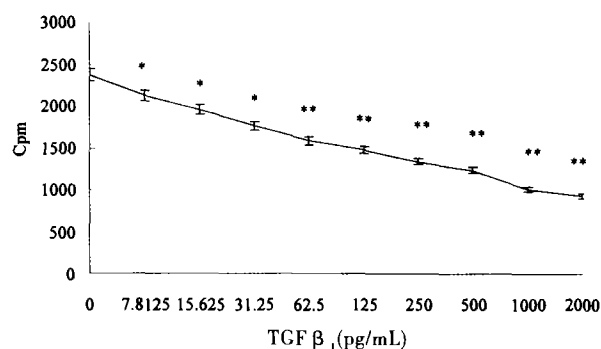


图 1 TGFβ<sub>1</sub> 活性的测定

n = 6, x ± s, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs control.

**2.2.2 巨噬细胞培养上清液中 TGFβ<sub>1</sub> 的测定** A23187 预刺激的巨噬细胞经 LPS 1 μg/mL 刺激 8h 后,取其上清,作用于 Mv-1-Lu 细胞,结果显示巨噬细胞上清可显著地抑制 Mv-1-Lu 细胞增殖,表明巨噬细胞可释放 TGFβ<sub>1</sub>(图 2)。

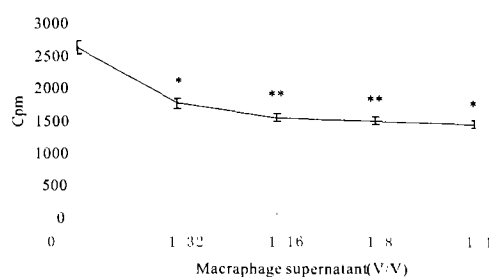


图 2 巨噬细胞培养上清液中 TGFβ<sub>1</sub> 的测定

n = 6, x ± s, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs control.

## 2.2.3 水飞蓟宾对巨噬细胞产生 TGFβ 的影响

水飞蓟宾与脂多糖同时加入巨噬细胞孵育,结果显示,水飞蓟宾剂量依赖地抑制脂多糖诱导巨噬细胞TGF $\beta$ 的产生(表2)。

表2 水飞蓟宾对脂多糖诱导巨噬细胞产生TGF $\beta$ 的影响

水飞蓟宾( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	转化生长因子活性(cpm)
对照组	1 506 $\pm$ 332
6.25	1 580 $\pm$ 237
12.5	1 694 $\pm$ 216 <sup>1)</sup>
25.0	2 165 $\pm$ 243 <sup>2)</sup>
50.0	2 787 $\pm$ 168 <sup>2)</sup>

$n=6$ ,  $\bar{x} \pm s$ , <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  vs control.

### 3 讨论

肝脏实质细胞和非实质细胞均参与了肝纤维化的形成<sup>[6]</sup>。目前比较公认的观点是,肝星状细胞是肝纤维化发生的关键。此外,肝脏的巨噬细胞即库普弗细胞在肝纤维化发生发展过程中也起着重要作用。肝实质受到各种致病因素损伤时,库普弗细胞激活并释放细胞因子如成纤维细胞生长因子 $\beta_1$ 、血小板源生长因子、肿瘤坏死因子、白细胞介素-1、6等,激活肝星状细胞,促进星状细胞增殖和产生胶原,使细胞外基质过度沉积。故肝星状细胞和巨噬细胞均是研究抗肝纤维化药物的靶标。前期我们研究发现,水飞蓟宾能显著抑制肝星状细胞HSC-T6细胞增殖和胶原合成<sup>[7]</sup>,本文我们研究其对巨噬细胞产生促胶原合成因子和转化生长因子 $\beta$ 的影响。

实验结果显示,水飞蓟宾显著抑制巨噬细胞释放促胶原合成因子,进一步研究发现抑制巨噬细胞产生TGF $\beta$ 与抑制促胶原合成因子平行,说明水飞蓟宾主要是通过抑制TGF $\beta$ 起作用。在实验性肝纤维化模型和肝纤维化患者均有高水平的TGF $\beta$ 表达,此外,TGF $\beta_1$ 在体外直接促进肝星状细胞合成胶

原,也能抑制肝星状细胞胶原酶表达及促进基质金属蛋白酶抑制剂的产生,从而抑制细胞外基质的降解,还能促进肝星状细胞表达血小板源生长因子及其受体,促进肝星状细胞增殖,因此TGF $\beta$ (主要是TGF $\beta_1$ )是迄今为止公认的最强促肝纤维化因子<sup>[8,9]</sup>。因此,水飞蓟宾减少巨噬细胞释放TGF $\beta$ 可能是其保肝抗硬化机制之一。

### 参考文献:

- [1] Gressner AM, Bachem MG. Cellular communications and cell matrix interactions in the pathogenesis of fibroproliferative diseases: liver fibrosis as a paradigm [J]. *Ann Biol Clin*, 1994, 52: 205.
- [2] Peterson TC, Isbrucker RA. Fibroproliferation in liver disease: role of monocyte factors [J]. *Hepatology*, 1992, 15: 191.
- [3] Flora K, Hahn M, Rosen H, et al. Milk thistle (Silybum Marianum) for the therapy of liver disease [J]. *Am J Gastroenterol*, 1998, 93(2): 139.
- [4] Friedman SL, Lalazar A, Wong L, et al. HSC-T6 cells, an immortalized rat hepatic stellate cell line [J]. *Hepatology*, 1997, 27(5): 338A.
- [5] Zhang JP, Zhang M, Jin C, et al. Matrine inhibits production and actions of fibrogenic cytokines released by mouse peritoneal macrophages [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22(8): 765.
- [6] 李晓玉,李俊. 免疫药理学新论[M]. 北京:人民卫生出版社,2004:200-228.
- [7] 张民,张俊平,王杰松,等. 水飞蓟宾对大鼠肝贮脂细胞HSC-T6增殖和胶原合成的影响[J]. *第二军医大学学报*, 2000, 21(10): 932.
- [8] Tsukamoto H. Cytokine regulation of hepatic stellate cells in liver fibrosis [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 1999, 23: 911.
- [9] Tiggeleman AM, Boers W, Lanthorst C, et al. Collagen synthesis by human liver (myo)fibroblasts in culture: evidence for a regulatory role of IL-1 beta, IL-4, TGF beta and IFN gamma [J]. *J Hepatology*, 1995, 23: 307.

收稿日期:2005-09-05

## 一阶导数分光光度法测定水飞蓟宾脂质体的包封率

张良,赵益华(中国人民解放军第515医院药局,江苏江阴214431)

**摘要** 目的:建立一种测定水飞蓟宾脂质体包封率的方法。方法:采用一阶导数分光光度法,中间波长为275nm和317nm,测定波长分别为274、276、316、318nm。结果:在0~30.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时 $\delta$ 与水飞蓟宾浓度呈良好的线性关系, $r=0.9995$ ,样品的回收率100.8%, $RSD=0.8\%$ ( $n=9$ )。结论:以一阶导数分光光度法测定水飞蓟宾脂质体的包封率切实可行。

**关键词** 一阶导数分光光度法;水飞蓟宾脂质体;包封率

作者简介:张良(1979-),男,药师。Tel:(0510)2921023, E-mail: jyzl131@tom.com