

4 种黄酮化合物对小鼠腹腔巨噬细胞纤维化因子产生及作用的影响

齐荔红¹, 刘 晔¹, 肖振宇², 王硕丰², 张 珉², 张俊平^{2*} (1. 南京军区福州总院药剂科, 福建 福州 350001; 2. 第二军医大学药学院药理学教研室, 上海 200433)

摘要 目的: 研究黄颜木素、槲皮素、芹菜素和根皮素对小鼠腹腔巨噬细胞纤维化因子的产生及作用的影响。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。巨噬细胞上清促肝星状细胞增殖和胶原合成分别采用结晶紫染色法和³H-脯氨酸掺入法测定。转化生长因子 β 活性采用肺上皮 Mv-1-Lu 细胞测定。结果: 黄颜木素、槲皮素、芹菜素和根皮素(12.5~50 μ mol/L)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 β_1 , 但对巨噬细胞产生促细胞增殖作用无影响。结论: 黄颜木素、槲皮素、芹菜素和根皮素具有减少促纤维化因子产生的作用。

关键词 黄酮; 星状细胞; 巨噬细胞; 转化生长因子

中图分类号: R931.71 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2006)05-0328-04

Inhibitory effects of four flavonoids on production and actions of fibrogenic cytokines released by mouse peritoneal macrophages

QI Li-hong¹, Liu ye¹, Xiao Zhen yu², Wang Shuo-feng², ZHANG min², ZHANG Jun-ping^{2*} (1. Department of Pharmacy, Fuzhou General Hospital, PLA Nanjing Military Area Command, Fuzhou 350001; 2. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT Objective: To study the effects of four flavonoids (fisetin, quercetin, apigenin, and phloretin) on production and actions of fibrogenic cytokines. **Methods:** Mouse peritoneal macrophages were primed with calcimycin 10^{-6} mol/L for 8h then elicited by lipopolysaccharides (LPS) 100g/L for 6h to induce fibrogenic cytokines. Proliferative and collagen stimulating activity in the macrophage culture supernatants was determined by crystal violet staining assay and [³H]-proline incorporation assay using rat hepatic stellate HSC-T6 cell. Transforming growth factor β (TGF β) activity was measured by [³H]-thymidine incorporation assay using Mv-1-Lu mink lung epithelial cell. **Results:** Fisetin, quercetin, apigenin, and phloretin (12.5~50 μ mol/L) concentration-dependently inhibit LPS-induced collagen stimulating activities and TGF β production whereas they did not inhibit proliferative activities released by macrophages. **Conclusion:** The four flavonoids reduced fibrogenic cytokines production and blockade of their actions on hepatic stellate cells.

KEY WORDS flavonoid; hepatic stellate cells; macrophages; transforming growth factor

肝纤维化的主要特征表现为肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSC) 的大量增殖和细胞外基质特别是胶原的过度合成。在肝纤维化形成过程中, 单核/巨噬细胞发挥着重要作用, 它们在肝脏受到病毒、寄生虫或化学物质损伤后, 激活并释放多种促纤维化细胞因子, 如血小板源生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)、转化生长因子 β_1 (transforming growth factor β_1 , TGF β_1) 等, 促进肝星状细胞激活、增殖和合成细胞外基质, 导致肝脏细胞外基质过度沉积而形成肝纤维化^[1,2]。因此, 抑制促纤维

化因子的产生或作用, 对肝纤维化的形成无疑具有重要的意义。

前期我们报道了黄颜木素、槲皮素、芹菜素和根皮素等黄酮类化合物抑制 HSC 细胞增殖和胶原合成的作用^[3], 还发现黄颜木素和槲皮素能抑制转化生长因子 β_1 刺激细胞胶原合成^[4,5]。本课题研究它们对巨噬细胞产生纤维化因子的影响, 以及对巨噬细胞纤维化因子诱导肝星状细胞增殖和胶原合成的作用。

1 材料和方法

1.1 药品和试剂 黄颜木素、槲皮素、芹菜素和根皮素 (Sigma 公司产品) 用二甲亚砜配制成

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30171087)
通讯作者: 张俊平 (1963-), 男, 副教授。
E-mail: jpzhang08@hotmail.com.

50mmol/L, 实验时用 DMEM 培养液稀释至所需浓度。卡西霉素、脂多糖和 TGFβ₁ 购于 Sigma 公司, ³H-脯氨酸和 ³H-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^[6]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^[7], ICR 小鼠腹腔巨噬细胞 2 × 10⁶ 先用卡西霉素 1 μmol/L 刺激 8h, 用 PBS 洗涤 3 次后, 再用脂多糖 100 μg/L 孵育 6h 诱生纤维化因子, 实验设药物处理组和药物溶剂对照组。收集细胞上清 -30 °C 贮存备用。纤维化因子活性用 HSC-T6 细胞测定细胞增殖和胶原合成能力。

巨噬细胞条件培养液(macrophage conditioned medium, MCM)参照文献^[7]制备, ICR 小鼠腹腔巨噬细胞先后用卡西霉素 1 μmol/L 和脂多糖 100 μg/L 刺激培养, 然后用 PBS 洗涤 3 次, 再用 DMEM 培养液孵育 24h, 收集细胞上清 -30 °C 贮存备用。

1.4 HSC-T6 细胞增殖试验 巨噬细胞培养上清液中纤维化因子促增殖活性采用结晶紫染色法^[7]测定。96 孔细胞培养板每孔加入 1 × 10⁴ 个 HSC-T6 细胞, 在 37 °C CO₂ 孵箱中孵育 24h。然后加入系列稀释的巨噬细胞培养上清液, 再孵育 48h, 最后用结晶紫染色法测定 595nm 处吸光度 A 值 A₅₉₅, 以稀释比(1:8)时 A₅₉₅ 表示促增殖能力。

试验黄酮类化合物对巨噬细胞条件培养液(MCM)促细胞增殖的影响, 则 1 × 10⁴ 个 HSC-T6 细胞培养过夜后, 将细胞培养上清液弃去, 加入含 0.4% NCS 的培养液再孵育 48h, 然后加入药物与 MCM(1:4, v/v)孵育 24h, 最后测定 A₅₉₅。

1.5 HSC-T6 胶原合成的测定 巨噬细胞培养上清液中纤维化因子胶原合成刺激活性采用 ³H-脯氨酸同位素法^[7]测定。将细胞浓度调整为 2.5 × 10⁵ 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 ³H-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 ³H-脯氨酸掺入值

(cpm), 以稀释比(1:8)时的 cpm 值表示。

试验黄酮类化合物对巨噬细胞条件培养液(MCM)促细胞胶原合成的影响, 则 HSC-T6 细胞培养过夜后, 细胞培养液以 2% NCS, MCM (1:4, v/v), 50 μg/mL 的维生素 C 以及药物或药物溶剂替换。

1.6 转化生长因子 β 活性的测定 采用雕肺上皮 Mv-1-Lu 细胞 ³H-TdR 同位素法^[7]测定。96 孔细胞培养板每孔加入 2.5 × 10⁴ 个 Mv-1-Lu 细胞, 在 37 °C CO₂ 孵箱中孵育 24h。然后加入系列稀释的巨噬细胞培养上清液, 孵育 36h 后, 每孔加入 ³H-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 ³H-TdR 掺入值(cpm), 以稀释比(1:8)时的 cpm 值表示 TGFβ 活性。

1.7 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 黄酮化合物对巨噬细胞产生促增殖因子的影响

小鼠巨噬细胞经卡西霉素启动后, 脂多糖诱导的细胞培养上清液可促进 HSC 细胞增殖, 增殖率为 28.2% (P < 0.01)。研究 6 种黄酮化合物对脂多糖诱导巨噬细胞产生促增殖因子产生的影响, 则将化合物与脂多糖同时加入巨噬细胞, 收集细胞培养上清液, 测定细胞培养上清液促 HSC-T6 细胞的增殖作用。为消除化合物对 HSC-T6 细胞的直接作用, 我们采用 1:8 稀释的巨噬细胞条件培养基来测定。结果表明, 药物预孵育处理后, 巨噬细胞条件培养基的促增殖作用与对照相比, 作用无显著性差异(见表 1)。

表 1 黄酮化合物对脂多糖诱生的巨噬细胞促 HSC-T6 细胞增殖因子的影响

药物处理(μmol/L)	细胞增殖活性(A ₅₉₅)
对照组	0.89 ± 0.03
巨噬细胞条件培养基(1:8)	1.24 ± 0.06
黄颜色素	
12.5	1.20 ± 0.03
25	1.19 ± 0.03
50	1.24 ± 0.01
槲皮素	
12.5	1.14 ± 0.07
25	1.18 ± 0.08
50	1.19 ± 0.01
芹菜素	
12.5	1.18 ± 0.02
25	1.09 ± 0.06
50	1.19 ± 0.03
根皮素	
12.5	1.14 ± 0.08
25	1.17 ± 0.01
50	1.18 ± 0.06

n = 6, $\bar{x} \pm s$

2.2 黄酮化合物对巨噬细胞产生促胶原合成因子的影响 脂多糖诱导的细胞培养上清液能促进 HSC-T6 细胞胶原合成, 稀释比为 1:8 时增加百分率为 72.9% ($P < 0.01$)。4 种黄酮化合物剂量依赖地抑制脂多糖诱导巨噬细胞促胶原合成因子的产生 (见表 2)。

表 2 黄酮化合物对脂多糖诱导的巨噬细胞促胶原合成因子的影响

药物处理 ($\mu\text{mol/L}$)	促胶原合成活性 (cpm)	抑制率 (%)
对照组	12 138 \pm 1 119	
巨噬细胞条件培养基 (1:8)	20 994 \pm 1 033 ³⁾	
黄颜色素		
12.5	15 383 \pm 767 ²⁾	63.36
25	14 703 \pm 724 ²⁾	71.03
50	12 915 \pm 481 ²⁾	91.22
槲皮素		
12.5	18 252 \pm 624 ¹⁾	30.96
25	18 405 \pm 3 013 ²⁾	29.23
50	15 920 \pm 382 ²⁾	57.29
芹菜素		
12.5	21 073 \pm 1 616	0
25	15 217 \pm 1 105 ²⁾	65.23
50	12 400 \pm 642 ²⁾	97.04
根皮素		
12.5	18 955 \pm 1 778 ¹⁾	23.02
25	13 249 \pm 329 ²⁾	87.45
50	11 169 \pm 681 ²⁾	110.90

$n = 6, \bar{x} \pm s, ^1) P < 0.05, ^2) P < 0.01$ vs MCM, ³⁾ $P < 0.01$ vs control.

2.3 黄酮化合物对巨噬细胞产生 TGF β 的影响

TGF 是已知的最重要的促肝纤维化介质之一, 可促进 HSC 细胞过度合成胶原等 ECM 成分。在肝纤维化过程中, 巨噬细胞是 TGF β 的一个重要来源。因此, 我们研究 4 种黄酮化合物对巨噬细胞产生 TGF β 的影响。黄酮化合物与脂多糖同时加入巨噬细胞孵育 6h, 收集细胞培养上清液, 用 MV1LU 细胞测定上清液中 TGF β 活性。结果显示, 脂多糖诱导的巨噬细胞培养上清液能显著促进 TGF β 释放 ($P < 0.01$)。4 种黄酮化合物剂量依赖地抑制脂多糖诱导巨噬细胞 TGF β 的产生 (见表 3)。

3 讨论

巨噬细胞合成和释放的细胞因子对肝脏的作用表现为加强肝细胞间通讯, 参与细胞生长、分化、受体表达, 调节细胞的活化过程, 参与炎症反应和组织修复等。现已证明, 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 β_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- γ, α, β 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^[8]。本文着重研究 4 个黄酮类化合物对巨噬细胞释放的肝纤维化细胞因子的作用。

表 3 黄酮化合物对脂多糖诱导巨噬细胞产生 TGF β 的影响

药物处理 (mol/L)	TGF β 活性 (cpm)
对照组	2 480 \pm 146
巨噬细胞条件培养基 (1:8)	1 506 \pm 3 323
黄颜色素	
12.5	1 797 \pm 227
25	2 099 \pm 211 ¹⁾
50	2 768 \pm 24 ²⁾
槲皮素	
12.5	1 870 \pm 251
25	2 094 \pm 139 ¹⁾
50	2 652 \pm 133 ²⁾
芹菜素	
12.5	1 785 \pm 126 ¹⁾
25	2 103 \pm 93 ²⁾
50	2 522 \pm 185 ²⁾
根皮素	
12.5	1 675 \pm 235 ¹⁾
25	2 053 \pm 218 ²⁾
50	2 714 \pm 198 ²⁾

$n = 6, \bar{x} \pm s, ^1) P < 0.05, ^2) P < 0.01$ vs MCM, ³⁾ $P < 0.01$ vs control.

血小板源生长因子是一种强效的肝星状细胞促有丝分裂剂, 主要由巨噬细胞合成, 约占巨噬细胞产生的总的促增殖活性的 50% ~ 70%^[9]。本实验结果显示, 4 个黄酮类化合物对巨噬细胞释放促肝星状细胞增殖因子无影响, 表明它们不能抑制巨噬细胞产生血小板源生长因子。但是, 我们发现 4 种黄酮化合物对巨噬细胞产生促胶原合成因子具有显著的抑制作用。由于 TGF β (主要是 TGF β_1) 是迄今为止被认为最强的促肝纤维化因子。在四氯化碳、酒精等诱导的实验性肝纤维化模型中, 均显著增加 TGF β_1 mRNA 表达, 肝纤维化患者体内也含有高水平的 TGF β 。此外, TGF β_1 在纤维化的起始和持续发展中起关键作用, 表现在: ①刺激 HSC 转化为肌成纤维样细胞, 后者产生细胞外基质; ②诱导细胞外基质基因的表达, 包括胶原、蛋白多糖和结构性糖蛋白; ③通过抑制基质胶原酶的产生并提高基质金属蛋白酶抑制因子的产生来抑制细胞外基质降解^[8]。为此, 我们进一步研究 4 种黄酮化合物对巨噬细胞产生 TGF β 的影响。结果表明, 4 种黄酮化合物显著抑制巨噬细胞产生 TGF β , 这个结果与它们抑制巨噬细胞产生促纤维化因子的结果相一致, 说明这些化合物主要是通过抑制 TGF β 起作用。鉴

于 TGF β 在肝纤维化发生发展中的重要作用,结果提示这些黄酮化合物可能通过抑制 TGF β 达到防治肝纤维化的目的。

参考文献:

- [1] Alcolado R, Arthur MJP, Iredale JP. Pathogenesis of liver fibrosis [J]. Clin Sci, 1997, 92(2): 103.
- [2] 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.
- [3] Zhang M, Zhang JP, Ji HT, et al. Effect of six flavonoids on proliferation of hepatic stellate cells *in vitro*[J]. Acta Pharmacol Sin, 2000, 21(3): 253.
- [4] 张珉,张俊平,王杰松,等. 黄颜色素对 HSC-T6 细胞增殖和胶原合成的影响[J]. 第二军医大学学报, 1999, 20(5): 304.
- [5] Kang LP, Qi LH, Zhang JP, et al. Effect of genistein and quercetin on proliferation, messenger RNA levels and synthesis of collagen by rat hepatic stellate cells[J]. Acta Pharmacol Sin, 2001, 22(9): 793.
- [6] Friedman SL, Lalazar A, Wong L, et al. HSC-T6 cells, an immortalized rat hepatic stellate cell line[J]. Hepatology, 1997, 27(5): 338A.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Peterson Tc, Isbrucker RA. Fibroproliferation in liver disease: role of monocyte factors[J]. Hepatology, 1992, 15: 191.

收稿日期: 2005-09-05

不同产地穿山龙薯蓣皂苷元含量的比较研究

李宝德¹, 高晓旭² (1. 舒兰合成药业有限公司, 吉林 舒兰 132600; 2. 北华大学林学院食品科学系, 吉林 吉林 132013)

摘要 目的: 考察不同产地穿山龙薯蓣皂苷元含量, 确定穿山龙薯蓣皂苷元的最佳产地。方法: 用 RP-HPLC 测定穿山龙薯蓣皂苷元的含量。结果: 不同产地的穿山龙薯蓣皂苷元含量差异很大, 以黑龙江、内蒙、辽宁, 所产含量较高, 其中黑龙江最高, 为 1.49%。结论: 黑龙江可以定为穿山龙薯蓣皂苷元的最佳产地。

关键词 药材产地; 穿山龙; 薯蓣皂苷元; 含量比较

中图分类号: R931.7 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2006)05-0331-04

Comparison of contents of diosgenin in *Dioscorea nipponica* Makino from different producing areas

LI Bao-de¹, GAO Xiao-xu² (1. JiLin Shulan Synthetic Pharmaceutical Co. Ltd, Shulan 132600 China; 2. Department of Food Science and Engineering, Forest College, BeiHua University, Jilin 132013 China)

ABSTRACT Objective: To determine the contents of diosgenin in *Dioscorea nipponica* Makino produced in different areas and find the best producing area. **Methods:** The contents of diosgenin in *Dioscorea nipponica* Makino were determine by a RP-HPLC method. **Results:** It shows that the content varies greatly in different producing areas. The content of diosgenin is higher in Henlongjiang, Neimeng, Hebei, among which the content in Heilongjiang is the highest (1.49%). **Conclusion:** Heilongjiang can considered as the optimal producing area of diosgenin in *Dioscorea nipponica* Makino.

KEY WORDS different producing areas; *Dioscorea nipponica*; diosgenin; contents of comparision

穿山龙为薯蓣科植物穿龙薯蓣 (*Dioscorea nipponica* Makino) 的根茎, 在祖国传统医学中应用广泛^[1], 有效成分主要是薯蓣皂苷 (dioscin), 其水解产物——薯蓣皂苷元 (diosgenin) 是目前合成各种甾

体药物的重要合成原料^[2]。最新的药理研究表明, 薯蓣皂苷元具有抑制骨肉瘤细胞中环氧化酶 (COXs) 的活性^[3], 还具有降低胆固醇^[4,5], 抗高脂血症^[6,7], 刺激肝素细胞生长与调控胆汁分泌等作用^[8,9], 是备受关注的天然化合物之一。

目前, 还没有发现关于不同产地穿山龙薯蓣皂苷元含量比较性研究的报道。本研究中应用 RP-

作者简介: 李宝德 (1968-), 男, 学士. Tel: 13630620918, (0432) 8255062.