

有明显的预防作用。

参考文献

[1] Jang M, Cai L, Udeanl G O, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes[J]. Sci-

ence, 1997,275:218.

[2] Dietschy JM. Dietary fatty acids and the regulation of plasma low density lipoprotein cholesterol concentrations[J]. J Nutr, 1998, 128(2):444.

收稿日期:2005-10-27

## 6 种黄酮化合物对大鼠肝星状细胞胶原合成的抑制作用

刘 晔<sup>1</sup>, 齐荔红<sup>1</sup>, 章越凡<sup>2</sup>, 肖振宇<sup>2</sup>, 张 珉<sup>2</sup>, 张俊平<sup>2</sup> (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、根皮素、橙皮素和查尔酮对血清、巨噬细胞培养上清液和转化生长因子  $\beta_1$  刺激的大鼠肝星状细胞 HSC-T6 胶原合成的影响。方法:<sup>3</sup>H-脯氨酸掺入法测定细胞胶原合成。结果:黄颜木素、槲皮素、芹菜素、根皮素、橙皮素和查尔酮(12.5~50 $\mu$ mol/L)以浓度依赖方式抑制血清、巨噬细胞上清和转化生长因子  $\beta_1$  诱导的胶原合成。结论:黄颜木素、槲皮素、芹菜素、根皮素、橙皮素和查尔酮具有抑制肝星状细胞胶原合成的作用,可能具有潜在的肝纤维化治疗作用。

**关键词** 黄酮;星状细胞;胶原;巨噬细胞;转化生长因子

中图分类号:R962 文献标识码:A 文章编号:1006-0111(2006)02-0083-04

## Inhibitory effects of six flavonoids on collagen synthesis of rat hepatic stellate cells

Liu Ye<sup>1</sup>, Qi Li-Hong<sup>1</sup>, ZHANG Yue-Fan<sup>2</sup>, Xiao Zhen Yu<sup>2</sup>, ZHANG Min<sup>2</sup>, ZHANG Jun-Ping<sup>2</sup> (1. Department of Pharmacy, Fuzhou General Hospital, PLA Nanjing Military Area Command, Fuzhou 350001, China; 2. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**ABSTRACT Objective:** To study the effects of six flavonoids (fisetin, quercetin, apigenin, phloretin, hesperetin, and chalcone) on collagen synthesis of immortalized rat hepatic stellate cell line HSC-T6 cells. **Methods:** Collagen synthesis was determined by <sup>3</sup>H-proline incorporation. **Results:** Fisetin, quercetin, apigenin, phloretin, hesperetin, and chalcone (12.5~50 $\mu$ mol/L) concentration-dependently diminished collagen synthesis stimulated by serum, macrophage conditioned medium (MCM) and transforming growth factor $\beta_1$  (TGF $\beta_1$ ). **Conclusion:** The six flavonoids inhibited the collagen synthesis of hepatic stellate cells, which may have potential therapeutic effects against liver fibrosis.

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

肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)是肝纤维化发生发展的中心环节,为正常肝脏或纤维化肝脏细胞外基质主要产生的细胞<sup>[1]</sup>。HSC 活化、增殖以及合成各种细胞外基质成分受到多种因素的影响,其中活化的单核/巨噬细胞能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  $\beta_1$  (transforming growth factor  $\beta_1$ , TGF $\beta_1$ ),特别是 TGF $\beta_1$  与相应受体结合后能促进 HSC 大量增殖及 I 型胶原的表达和过度合成<sup>[2,3]</sup>。因此,抑制或阻断 TGF $\beta_1$  等纤维化

因子的产生和作用对纤维化的防治具有重要的意义。

前期我们报道了黄颜木素、槲皮素、芹菜素、根皮素、橙皮素和查尔酮等黄酮类化合物抑制 HSC 细胞增殖的作用<sup>[4]</sup>,还发现黄颜木素和槲皮素能抑制转化生长因子  $\beta_1$  刺激细胞胶原合成<sup>[5,6]</sup>。本文以大鼠肝星状细胞 HSC-T6<sup>[7]</sup>为靶细胞,选择血清、巨噬细胞条件培养液(Macrophage conditioned medium, MCM)和转化生长因子  $\beta_1$  (TGF $\beta_1$ )等刺激因素,进一步观察它们对细胞胶原合成的影响,为黄酮类化合物结构改造提供理论基础。

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.

## 1 材料和方法

**1.1 药品和试剂** 黄颜木素、槲皮素、芹菜素、根皮素、橙皮素和查尔酮(Sigma 公司产品)用二甲亚砜配制成 50 mmol/L,实验时用 DMEM 培养液稀释至所需浓度。卡西霉素、脂多糖和 TGF $\beta_1$  购于 Sigma 公司,3H-脯氨酸为中科院北京原子能研究所产品,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 巨噬细胞条件培养液的制备** 参照文献<sup>[8]</sup>,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℃ 贮存备用。

**1.4 胶原合成的测定** 采用<sup>3</sup>H-脯氨酸同位素法<sup>[5]</sup>。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 10% NCS 或 MCM 或 TGF $\beta_1$  再培养 48h,同时加入每孔<sup>3</sup>H-脯氨酸 18.5 kBq。细胞用胰酶消化后,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)。采用下式计算化合物抑制 MCM 或 TGF 促胶原合成作用的百分比。半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)采用 Curveexpert 1.3 软件(<http://www.ebicom.net/~dhyams/cftp.htm>)计算。

$$\text{Inhibition \%} = (\text{CPM}_{\text{MCM或TGF}} - \text{CPM}_{\text{Drug}}) / (\text{CPM}_{\text{MCM或TGF}} - \text{CPM}_{\text{control}}) \times 100$$

**1.5 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 黄酮化合物对血清刺激的 HSC-T6 细胞胶原合成的影响** 选定 10% 的血清作为刺激因素,观察 6 种黄酮化合物对 HSC-T6 细胞胶原合成的影响。6 种黄酮化合物作用 48h 后可剂量依赖地抑制细胞胶原合成。ANOVA 分析 6 种化合物作用无显著性差异(表 1)。

**2.2 黄酮化合物对巨噬细胞条件培养基促胶原合**

成的影响 巨噬细胞条件培养基(MCM)稀释比为 1:4,与 HSC-T6 细胞作用,MCM 可显著促进细胞胶原合成,增加百分率为 106.1% ( $P < 0.01$ )。以 MCM(1:4)为刺激因素,观察 6 种黄酮化合物对 MCM 促 HSC-T6 细胞胶原合成的影响。结果表明,6 种黄酮化合物均具有抑制作用,IC<sub>50</sub> 分别为 17.4, 18.2, 12.0, 16.8, 25.1, 25.4。黄颜木素、槲皮素、芹菜素、根皮素在高浓度(50 μmol/L)则完全抑制 MCM 促胶原合成的作用(表 2)。

表 1 黄酮化合物对血清刺激的 HSC-T6 细胞胶原合成的影响

药物处理/μmol/L	胶原合成/cpm	抑制率/%
对照组	3089 ± 258	
黄颜木素		
6.25	3092 ± 219	0
12.5	2865 ± 125	7.42
25	2736 ± 304 <sup>1)</sup>	11.42
50	2318 ± 235 <sup>2)</sup>	24.95
槲皮素		
6.25	2848 ± 246	7.80
12.5	2761 ± 116 <sup>1)</sup>	10.62
25	2518 ± 257 <sup>1)</sup>	18.48
50	2153 ± 464 <sup>2)</sup>	30.30
芹菜素		
6.25	3051 ± 247	1.2
12.5	2668 ± 314 <sup>1)</sup>	13.62
25	2288 ± 425 <sup>2)</sup>	25.90
50	2114 ± 310 <sup>2)</sup>	31.56
根皮素		
6.25	3019 ± 653	2.23
12.5	2650 ± 582 <sup>1)</sup>	14.20
25	2142 ± 536 <sup>2)</sup>	30.65
50	2088 ± 461 <sup>2)</sup>	32.40
橙皮素		
6.25	3138 ± 241	1.59
12.5	2753 ± 94	10.87
25	2362 ± 277 <sup>2)</sup>	23.54
50	2287 ± 259 <sup>2)</sup>	25.97
查尔酮		
6.25	2963 ± 407	4.10
12.5	2573 ± 288 <sup>1)</sup>	16.70
25	2493 ± 326 <sup>2)</sup>	19.29
50	2405 ± 288 <sup>2)</sup>	22.14

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

**2.3 黄酮化合物对 TGF  $\beta_1$  促胶原合成的影响**

TGF $\beta_1$  (2 ng/mL)能增加细胞胶原合成,增加百分

率为 82.1% ( $P < 0.01$ )。以  $TGF\beta_1$  2ng/ml 为刺激因素,观察 6 种黄酮化合物对  $TGF\beta_1$  促 HSC-T6 细胞胶原合成的影响。结果表明,6 种黄酮化合物均具有抑制作用,  $IC_{50}$  分别为 21.2, 19.1, 17.6, 18.4, 20.2, 26.6。除查耳酮外,其余化合物在高浓度 (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 则完全抑制  $TGF\beta_1$  促胶原合成的作用 (表 3)。

表 2 黄酮化合物对巨噬细胞条件培养基刺激的 HSC-T6 细胞胶原合成的影响

药物处理 / $\mu\text{mol/L}$	胶原合成 / cpm	抑制率 / %	$IC_{50}$
对照组	1 0054 $\pm$ 423		
巨噬细胞条件培养基(1:4)	2 0723 $\pm$ 4041 <sup>3)</sup>		
黄颜木素			17.4
6.25	19503 $\pm$ 1468	11.43	
12.5	15744 $\pm$ 1904 <sup>1)</sup>	53.33	
25	12662 $\pm$ 3625 <sup>2)</sup>	75.55	
50	9421 $\pm$ 655 <sup>2)</sup>	105.9	
槲皮素			18.2
6.25	20416 $\pm$ 4270	2.88	
12.5	15440 $\pm$ 1598 <sup>1)</sup>	49.50	
25	12068 $\pm$ 2224 <sup>2)</sup>	81.12	
50	8416 $\pm$ 265 <sup>2)</sup>	115.35	
芹菜素			12.0
6.25	18734 $\pm$ 3325	18.64	
12.5	14400 $\pm$ 2530 <sup>1)</sup>	59.26	
25	10220 $\pm$ 725 <sup>2)</sup>	98.44	
50	8644 $\pm$ 1048 <sup>2)</sup>	113.22	
根皮素			16.8
6.25	20590 $\pm$ 2976	1.25	
12.5	14874 $\pm$ 2708 <sup>1)</sup>	54.82	
25	11004 $\pm$ 169 <sup>2)</sup>	91.10	
50	8711 $\pm$ 424 <sup>2)</sup>	112.58	
橙皮素			25.1
6.25	20877 $\pm$ 3666	1.44	
12.5	16926 $\pm$ 1207 <sup>1)</sup>	35.59	
25	13882 $\pm$ 1178 <sup>2)</sup>	64.12	
50	11412 $\pm$ 569 <sup>2)</sup>	87.27	
查尔酮			25.4
6.25	19926 $\pm$ 4106	7.47	
12.5	16497 $\pm$ 1503 <sup>1)</sup>	39.61	
25	14120 $\pm$ 1305 <sup>1)</sup>	61.89	
50	12220 $\pm$ 439 <sup>2)</sup>	79.70	

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

### 3 讨论

肝纤维化的主要特征表现为细胞外基质特别是胶原的过度沉积。现已证实,肝星状细胞是纤维化肝脏细胞外基质主要产生的细胞,而肝星状细胞合成各种细胞外基质成分受到多种因素的影响,其中血清中含有大量的生物活性物质,活化的单核/巨噬细胞能释放多种促纤维化细胞因子,如血小板

源生长因子、转化生长因子  $\beta_1$ 、肿瘤坏死因子、成纤维细胞因子、内皮细胞生长因子、白细胞介素 - 1, 6 等,特别是转化生长因子  $\beta_1$  是最强的胶原合成促进因子。因此,本实验我们以激活的永生型大鼠肝星状细胞 HSC-T6 为靶细胞,选择血清、巨噬细胞条件培养基和转化生长因子  $\beta_1$  为刺激因素,观察黄酮类化合物抑制胶原合成的作用。实验结果表明:6 种黄酮化合物均可抑制血清、巨噬细胞条件培养基和转化生长因子  $\beta_1$  促 HSC-T6 细胞胶原合成的作用,表明它们具有潜在的抗肝纤维化的作用。

表 3 黄酮化合物对转化生长因子  $\beta_1$  刺激的 HSC-T6 细胞胶原合成的影响

药物处理 / $\mu\text{mol/L}$	胶原合成 / cpm	抑制率 / %	$IC_{50}$
对照组	3688 $\pm$ 225		
转化生长因子 $\beta_1$ ( $TGF\beta_1$ , 2ng/ml)	6717 $\pm$ 699 <sup>3)</sup>		
黄颜木素			21.2
6.25	6723 $\pm$ 443	0	
12.5	5889 $\pm$ 576 <sup>1)</sup>	27.35	
25	4150 $\pm$ 909 <sup>2)</sup>	84.74	
50	3385 $\pm$ 116 <sup>2)</sup>	110.00	
槲皮素			19.1
6.25	6866 $\pm$ 553	0	
12.5	5378 $\pm$ 840 <sup>1)</sup>	44.20	
25	4164 $\pm$ 101 <sup>2)</sup>	84.28	
50	3303 $\pm$ 36 <sup>2)</sup>	112.7	
芹菜素			17.6
6.25	6538 $\pm$ 484	0	
12.5	5328 $\pm$ 159 <sup>1)</sup>	45.86	
25	3964 $\pm$ 502 <sup>2)</sup>	90.88	
50	2909 $\pm$ 347 <sup>2)</sup>	125.72	
根皮素			18.4
6.25	6394 $\pm$ 462	10.66	
12.5	5669 $\pm$ 393 <sup>1)</sup>	34.59	
25	4016 $\pm$ 289 <sup>2)</sup>	89.17	
50	3375 $\pm$ 185 <sup>2)</sup>	110.33	
橙皮素			20.2
6.25	6800 $\pm$ 731	0	
12.5	5312 $\pm$ 974 <sup>1)</sup>	46.38	
25	4382 $\pm$ 582 <sup>2)</sup>	77.09	
50	3555 $\pm$ 724 <sup>2)</sup>	104.39	
查尔酮			26.6
6.25	6946 $\pm$ 566	0	
12.5	6162 $\pm$ 240	18.32	
25	4554 $\pm$ 110 <sup>2)</sup>	71.41	
50	4115 $\pm$ 133 <sup>2)</sup>	85.90	

$n = 6, \bar{x} \pm s, ^1) p < 0.05, ^2) p < 0.01$  vs  $TGF\beta_1, ^3) p < 0.01$  vs control.

化合物结构分析发现,4-羟基与胶原抑制活性密切相关,因为查尔酮缺失 4'-羟基或橙皮素 4'-羟基变为 4'-甲氧基时,其抑制活性显著降低;而苯并吡喃酮环与其胶原合成抑制活性无关,因为

根皮素无苯并吡喃酮环存在,仍然显示较强的抑制活性,这些结果与我们前期文献报道它们抑制细胞增殖的结果相似<sup>[4]</sup>。构效关系分析将为进一步结构改造寻找更有效的抗肝纤维化药物提供依据。

#### 参考文献:

- [1] Alcolado R, Arthur MJP, Iredale JP. Pathogenesis of liver fibrosis [J]. Clin Sci, 1997, 92(2): 103.
- [2] Friedman SL, Arthur MJ. Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium. Direct enhancement of matrix synthesis and stimulation of cell proliferation via induction of platelet-derived growth factor receptors [J]. J Clin Invest, 1989, 84(6): 1780.
- [3] Czaja MJ, Weiner FR, Flanders KC, et al. In vitro and in vivo association of transforming growth factor-beta-1 with hepatic fibrosis [J]. J Cell Biol, 1989, 108(6): 2477.
- [4] 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.
- [5] 张 珉, 张俊平, 王杰松, 等. 黄酮木素对 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.
- [6] 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.
- [7] Friedman SL, Lalazar A, Wong L, et al. HSC-T6 cells, an immortalized rat hepatic stellate cell line [J]. Hepatology, 1997, 27(5): 338A.
- [8] 田 鸣, 张俊平, 钱定华, 等. 蛋白激酶 C 抑制剂和钙调素抑制剂对小鼠腹腔巨噬细胞释放肿瘤坏死因子的抑制作用 [J]. 中国药理学报, 1993, 14(5): 447.

收稿日期: 2005-09-14

## 注射用氨苄西林钠/氯唑西林钠与不同溶媒配伍稳定性的研究

张利斌, 张晓庆, 刘明忠 (上海市肺科医院药剂科, 上海 200433)

**摘要** 目的: 研究注射用氨苄西林钠/氯唑西林钠(氨氯青霉素钠)与 5 种常用输液在不同放置时间、不同温度下的配伍稳定性。方法: 将注射用氨苄西林钠/氯唑西林钠用 5 种常用输液分别配成溶液, 用高效液相色谱法测定各配伍液中氨苄西林钠、氯唑西林钠的含量。结果: 样品与 5% 葡萄糖注射液和葡萄糖氯化钠注射液配伍时, 随着放置时间和温度的升高, 各组溶液中氨苄西林钠和氯唑西林钠的含量下降, 其中以葡萄糖注射液中者最为显著。结论: 氨氯青霉素钠在 5% 葡萄糖和葡萄糖氯化钠注射液中不稳定。

**关键词** 氨苄西林钠; 氯唑西林钠; 配伍性; 稳定性

**中图分类号:** R944.1<sup>+</sup>1      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1006-0111(2006)02-0086-04

## Study on compatible stability of ampicloxacillin sodium for injection in five infusions

ZHANG Li-bin, ZHANG Xiao-qing, LIU Ming-zhong (Department of Pharmacy, Shanghai Pulmonary Hospital, Shanghai 200433, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the compatible stability of ampicloxacillin sodium for injection in five infusions in different time and different temperature conditions. **Methods:** Ampicloxacillin sodium was dissolved in five infusions. Ampicillin and cloxacillin in ampicloxacillin sodium for injection were determined by HPLC, and the color changes of all infusions were observed. **Results:** The ampicillin and cloxacillin contents in ampicloxacillin sodium for injection declined with time and temperature increased. The most distinct were 5% glucose injection. **Conclusion:** Ampicloxacillin sodium for injection wasn't stable in 5% glucose, glucose and sodium chloride injection.

**KEY WORDS** ampicloxacillin; ampicillin; cloxacillin; compatibility; stability.

注射用的氨苄西林钠/氯唑西林钠(氨氯青霉素钠)是氨苄西林钠和氯唑西林钠的混合粉针剂,

是目前临床上较强的抗革兰阳性菌药物。本品中氨苄西林钠为广谱半合成青霉素, 氯唑西林钠为耐酸、耐酶半合成青霉素。氨氯青霉素钠具有氨苄西林钠和氯唑西林钠两者的特点, 即对革兰阳性菌和阴性菌均有广谱杀灭作用, 又对耐青霉素的金黄色葡萄

作者简介: 张利斌(1980-), 男, 本科, 药师。  
E-mail: leebinz@gmail.com.