

·综述·

水飞蓟宾的抗肿瘤、抗氧化和免疫调节分子药理学机制研究进展

王红军, 姜媛媛, 路平, 王琼, 池岛乔*

(沈阳药科大学中日医药研究所, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 水飞蓟宾 (silibinin) 来源于菊科植物水飞蓟 (*Silybum marianum*), 为黄酮木脂素类化合物, 具有明显抗氧化和抗炎的特性, 临床上作为保肝药物长期应用于中国、德国和日本等国家。近年来发现水飞蓟宾有明显的抗肿瘤活性, 其主要机制为抑制肿瘤受体酪氨酸激酶 (receptor tyrosine kinase, RTK) 的活性, 如抑制表皮生长因子受体 1 (epidermal growth factor receptor 1, EGFR) 和胰岛素样生长因子 1 受体 (insulin-like growth factor 1 receptor, IGF-1R) 及其下游信号分子的活化。同时因为发现水飞蓟宾对羟自由基 ($\bullet\text{OH}$) 的选择性清除, 以及对核因子 κB (nuclear factor- κB , NF- κB) 的特异性抑制, 使其抗氧化和抗炎的分子机制更为明确。一些新的发现如水飞蓟宾通过抑制氧化应激和炎症反应而改善 β -淀粉样蛋白 (amyloid β protein, A β) 引起的认知功能障碍等对拓展水飞蓟宾的药用前景具有重要价值。本文对水飞蓟宾的分子药理机制进行总结, 主要从水飞蓟宾抑制肿瘤 RTK 信号转导、抗氧化与自由基清除、调节免疫与炎症 3 个方面进行了阐述。

关键词: 水飞蓟宾; 酪氨酸激酶; 抗氧化; 免疫调节

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 04-0413-09

An updated review at molecular pharmacological level for the mechanism of anti-tumor, antioxidant and immunoregulatory action of silibinin

WANG Hong-jun, JIANG Yuan-yuan, LU Ping, WANG Qiong, IKEJIMA Takashi*

(China-Japan Research Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: Silibinin, from milk thistle (*Silybum marianum*), is a flavonolignan with anti-oxidative and anti-inflammatory properties. It has been therapeutically used for the treatment of hepatic diseases in China, Germany and Japan. Recently, increasing evidences prove that silibinin is also a potent antitumor agent, and the major anti-tumor mechanism for silibinin is the prominent inhibition of the activities of receptor tyrosine kinases (RTKs) and their downstream signal molecules in a variety of tumor cell lines, such as epidermal growth factor receptor 1 (EGFR) and insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R) signaling pathways. Meanwhile, the evidences that silibinin selectively scavenges hydroxyl free radical ($\bullet\text{OH}$) and specifically inhibits the action of nuclear factor κB (NF- κB) provide more complicated explanations for its antioxidant and anti-inflammatory effects. Some new findings such as that silibinin attenuating the cognitive deficits induced by amyloid β protein (A β) peptide through its antioxidative and anti-inflammatory properties is valuable to broad the medical prospect of silibinin. In this review, we discuss the molecular pharmacological mechanisms of silibinin, focusing on its inhibition of tyrosine kinases, actions of antioxidation, free radical scavenging, immunoregulation and anti-inflammation.

Key words: silibinin; tyrosine kinase; antioxidation; immunoregulation

水飞蓟素 (silymarin) 为菊科植物水飞蓟的果

实或种子的总提取物, 其有效成分为黄酮木脂素类化合物, 主要包括水飞蓟宾 (silibinin, silybin)、异水飞蓟宾 (isosilybin)、水飞蓟宁 (silydianin)、水飞蓟

收稿日期: 2009-09-22.

*通讯作者 Tel / Fax: 86-24-23844463, E-mail: ikejimat@vip.sina.com

亭 (silychristin) 等 7 种化合物。水飞蓟宾具有 4 个手性中心, 天然的水飞蓟宾是等量的两种立体异构体水飞蓟宾 A (2*R*, 3*R*, 10*R*, 11*R*; 图 1) 和水飞蓟宾 B (2*R*, 3*R*, 10*S*, 11*S*) 的混合物, 约占水飞蓟素总量的 60%~70%, 是水飞蓟素的主要活性成分。水飞蓟宾作为保肝药物被广泛应用于治疗肝炎、肝硬化及代谢中毒性肝损伤等疾病, 其机制为抗氧化、抗脂质过氧化、抗纤维化、细胞膜稳定作用和调节肝再生能力等; 同时大量的研究表明, 水飞蓟宾还具有降血脂、保护心肌及抗糖尿病的作用。近几年的研究还发现, 水飞蓟宾具有抑制前列腺癌、结肠癌、膀胱癌、肺癌等癌症的作用, 以及神经保护和免疫调节作用, 使其越来越受到国内外广泛的关注。水飞蓟宾的药理作用在分子水平表现为抑制肿瘤蛋白酪氨酸激酶 (protein tyrosine kinase, PTK) 活性、清除氧自由基和抑制促炎性的 Th1 细胞因子产生, 因此本文针对这些主要机制进行总结与探讨。

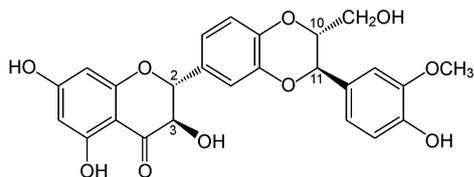


Figure 1 Chemical structure of silibinin A

1 水飞蓟宾对 PTK 途径的调节

PTK 在细胞内信号转导通路中占据十分重要的地位, 调节着细胞生长、分化、死亡等一系列生理生化过程。很多原癌基因和癌基因产物都具有 PTK 活性, PTK 的异常表达还与肿瘤的侵袭转移、新血管的生成和化疗抗性有关。PTK 按分子结构可分为受体型和非受体型。其中与肿瘤发生发展相关位于细胞膜上的 RTK 主要有表皮生长因子受体家族、IGF-1R、血管内皮生长因子受体 (VEGFR)、血小板源生长因子受体 (PDGFR); 非受体型 PTK 主要有 Src、Abl、Bcr 等。PTK 被激活后, 其经典下游信号转导途径为丝裂原活化蛋白激酶 (MAPKs) 途径和 PI3K-Akt 途径。对 RTK 信号途径的调节机制是水飞蓟宾抗肿瘤研究的主要内容。

1.1 抑制表皮生长因子受体信号转导 在非激活状态下, 表皮生长因子受体 1 (EGFR, HER1, ErbB1) 以蛋白单体形式存在于细胞膜上, 其特异性配体表皮生长因子 (EGF) 与 EGFR 结合可诱导两个邻近受体二聚化, 从而改变受体构象, 激活受体自身的 PTK 活性区域。EGFR 近年来已成为一个重要的治疗癌症

的靶点, 如设计抗体抑制 EGFR 与其配体结合 (如治疗结肠直肠癌单抗药物 Erbitux 和 ABX-EGF), 抑制受体的激酶活性 (治疗非小细胞肺癌的 Iressa 和 Tarceva)。大量研究结果表明, 抑制 EGFR 信号通路是水飞蓟宾抗肿瘤的重要机制。研究发现, 水飞蓟宾能抑制 EGF 引起的 EGFR 下游信号 ERK (extracellular regulated kinase 1/2, 细胞外信号调节激酶 1/2)、JNK (*c*-Jun amino-terminal kinase, *c*-Jun 氨基末端激酶)、p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase, 丝裂原活化蛋白激酶) 和 Akt (protein kinase B, 蛋白激酶 B, PKB) 的磷酸化, 以及转录因子 AP-1 (activator protein-1, 核转录因子激活蛋白-1) 和 NF- κ B 的活性^[1, 2]。有一项非常有趣的研究报道^[3], 用大鼠神经胶质瘤 9L 细胞 (不表达内源性 EGFR) 构建稳定表达 EGFR 的细胞株 9L-EGFR, 水飞蓟宾可以抑制外源性 EGF 引起的 EGFR 磷酸化, 并对 9L-EGFR 细胞以及对照组 A431 细胞产生明显的细胞毒作用, 而在对照组的 9L 细胞却没有明显的细胞毒作用; 这一实验证明, 在 9L 细胞模型中 EGFR 的表达是水飞蓟宾细胞毒作用的必要条件。表皮生长因子受体家族另一个亚型 HER2/ErbB2 也是重要的原癌基因, 是乳腺癌等癌症的药物设计靶点, HER2 没有配体结合区, 但其与 EGFR 形成的异型二聚体可被 EGF 激活。研究发现, 水飞蓟宾能直接抑制 HER2 转基因小鼠的 HER2 蛋白表达^[4]。TGF α 是 EGFR 的另一个重要配体, 晚期前列腺癌通常存在于 TGF α -EGFR 自分泌环路。研究表明, 水飞蓟宾能抑制前列腺癌 LNCaP 和 DU145 细胞 EGFR 的活化, 同时抑制 TGF α 的产生和分泌, 从而抑制 TGF α -EGFR 环路, 这对前列腺癌的防治具有重要意义^[5]。

1.2 抑制 IGF-1R 的激活 IGF-1R 以同型二聚体的形式广泛表达于多种类型的细胞表面, 与其配体 IGF-1 结合后发生自身的交互磷酸化, 进而激活下游的信号, 与肿瘤的发生发展密切相关。胰岛素生长因子结合蛋白-3 (IGFBP-3) 是 IGF-1 的负调控蛋白, IGFBP-3 与 IGF-1 结合后可阻断 IGF-1 对 IGF-1R 的结合与活化。IGFBP-3 除了可以抑制 IGFs 的活性以外, 还可以通过不依赖 IGFs 的途径直接作用于细胞表面有关受体, 抑制肿瘤。细胞因子如 TGF β 1、TNF α , 小分子化合物如维甲酸、雄激素和雌激素拮抗剂, 以及抑癌基因 *p53* 的抑癌作用, 均与 IGFBP-3 的表达和分泌有关。研究表明, 水飞蓟宾能显著上调 PC-3 前列腺细胞瘤和 SN12K1 肾细胞瘤裸鼠移植模型体内 IGFBP-3 表达水平^[6]。在前列腺瘤转基因 (TRAMP) 小鼠模型中, Raina 等^[7]报道口服水飞蓟宾可肿瘤特

异性地使 IGF-1R β 蛋白水平下调 50%, 并使 IGFBP-3 的蛋白水平上调 13 倍; Verschoyle 等^[8]的研究结果亦显示, 水飞蓟宾可使 TRAMP 小鼠血浆 IGF-1 水平降低 36%, 使 IGFBP-3 的蛋白水平上调 5.9 倍。因此依据多种细胞和动物模型研究结果, 水飞蓟宾抑制 IGF-1R 发挥抗癌作用主要通过诱导 IGFBP-3 的表达来实现。

水飞蓟宾能抑制 IGF-1R 的活化, 因此提示可以采用抑制 IGF-1R 的策略协同水飞蓟宾的抗肿瘤作用。在作者的研究中发现^[9], 水飞蓟宾能部分抑制乳腺癌 MCF-7 细胞 IGF-1R 的磷酸化, 而联合 IGF-1R 的特异抑制剂 tyrphostin AG1024 (竞争受体胞浆区 ATP 结合位点) 进一步抑制 IGF-1R 的磷酸化, 则能协同促进水飞蓟宾对 MCF-7 细胞的生长抑制与凋亡诱导作用, 实验证明 AG1024 促进了水飞蓟宾对死亡受体途径和线粒体凋亡途径的启动。

1.3 调节其他 PTK 途径 肿瘤过表达血管内皮生长因子 (VEGF) 及其受体 (VEGFR) 是肿瘤血管生成和维持生长的主要方式, Singh 等^[10, 11]发现水飞蓟宾能分别抑制人结直肠癌、前列腺癌移植小鼠以及乌拉坦诱导的肺癌小鼠体内肿瘤微血管生成, 检测到 VEGF 表达下调。Yang 等^[12]的研究表明, 水飞蓟宾能抑制结肠癌 LoVo 细胞分泌 VEGF, 上调 EA.hy 926 内皮细胞 VEGFR-1 (fms-like tyrosine kinase, Flt-1, VEGF 的负调控受体) 的 mRNA 水平, 而对 VEGFR-2 (kinase-insert-domain-containing receptor, KDR, VEGF 的正调控受体) 表达没有影响。还有研究表明, 水飞蓟宾抑制 JAK (Janus kinase)-STAT (signal transducer and activator of transcription) 途径, 诱导前列腺癌 DU145 细胞凋亡^[13]; 抑制胰岛素刺激的葡萄糖转运体 (GLUT)4 的转位^[14]; 下调黏着斑激酶 (FAK) 以及基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 的表达来抑制人骨肉瘤 MG-63 细胞的黏附和侵袭能力^[15]。

1.4 p53 与 SIRT1 参与水飞蓟宾对 RTK 的调节 很多研究表明, 水飞蓟宾抑制 PTK 表达伴随着抑癌蛋白 p53 表达的升高^[1, 4, 16, 17], 虽然尚缺乏直接的证据, 但这提示了水飞蓟宾诱导肿瘤死亡过程中 p53 和 PTK 表达调节的相关性。p53 干扰 RNA (RNAi) 能显著升高人永生化角肌细胞 (HKc) EGFR 的启动子活力, 并增加 EGFR 的 mRNA 和蛋白水平^[18]; p53 还能抑制 IGF-1R 启动子的活力及蛋白表达^[19]。作者的研究也发现, 抑制 p53 的活性能够对抗冬凌草甲素 (oridonin) 对 IGF-1R 的表达抑制作用^[20]。水飞蓟宾通常作为化

疗药物阿霉素、顺铂、紫杉醇^[21]等的增敏剂。然而在丝裂霉素 C (mitomycin C) 诱导的人黑色素瘤 A375-S2 细胞凋亡模型研究中, 却发现水飞蓟宾具有对抗丝裂霉素 C 的作用, 检测到丝裂霉素 C 诱导的 A375-S2 细胞 p53 的表达水平上调, 而加入水飞蓟宾则抑制了 p53 的表达^[22], 作者的研究还表明水飞蓟宾的这一保护机制与其消除 p53 对 IGF-1R 的抑制有关 (尚未发表)。

在哺乳动物中, 与酵母组蛋白去乙酰化酶 Sirtuin 家族蛋白 Sir2 (silent information regulator) 高度同源的 SIRT1 蛋白 (a mammalian homologue of yeast Sir2, 酵母 Sir2 基因在哺乳动物中的同源体) 参与调节细胞代谢与衰老。同时 SIRT1 还是重要的凋亡拮抗蛋白, 如 SIRT1 能去乙酰化 p53, 进而抑制 p53 依赖的转录活性及凋亡。在拮抗丝裂霉素 C 对 A375-S2 细胞的损伤过程中以及拮抗异丙肾上腺素 (β -肾上腺素受体激动剂) 对大鼠乳鼠心肌细胞的损伤^[23]过程中, 水飞蓟宾明显上调了 SIRT1 的表达, 同时抑制了 p53 的活化。这提示 SIRT1 是参与水飞蓟宾保护作用的重要因子, 然而这些研究都同时发现水飞蓟宾的保护作用依赖 PTK 的活性。作者在水飞蓟宾诱导 MCF-7 细胞凋亡的研究中发现, 水飞蓟宾以及 IGF-1R 抑制剂 AG1024 都显著抑制了 SIRT1 的表达, 这一现象说明了在不同细胞系水飞蓟宾可能通过调节 IGF-1R/SIRT1/p53 组成的回路中一个或几个环节, 表现为损伤与保护的双向调节机制。

2 水飞蓟宾的抗氧化作用和自由基清除作用

水飞蓟宾具有良好的抗氧化和自由基清除活性, 为氧化损伤相关疾病研究的理想工具。活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 包括超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$)、羟自由基 ($\cdot OH$)、过氧化氢 (H_2O_2) 和次氯酸 (HClO) 等, 其中羟自由基的性质最为活泼, 是引起自由基损伤的主要因子。正常 ROS 水平在生理过程中具有重要的细胞信号调节作用, 然而 ROS 水平异常升高与许多病理过程如慢性疲劳、早老症、癌症、自身免疫性疾病和心血管疾病等密切相关。构效关系研究结果显示, 水飞蓟宾的 2-CH₂OH-二噁烷结构与其抗肝毒作用有关^[24], 而二氢黄酮醇母核部分 3-, 5-, 7-的羟基结构与其强自由基清除作用有关, 2, 3-位脱氢成双键的衍生物 2, 3-脱氢水飞蓟宾 (2, 3-dehydrosilybin) 则表现出更强的抗氧化作用。

2.1 强的羟自由基清除能力以及超氧阴离子自由基诱导能力 红细胞是研究药物抗氧化作用的理想模型。红细胞携带着丰富的抗氧化酶系 (SOD、CAT、

GPx 等) 在血液中循环流动, 具有清除 ROS 的功能, 其抗氧化能力强弱与整个机体的抗氧化能力密切相关。然而红细胞处于高氧环境, 且其细胞膜含有多不饱和脂肪酸, 因此极易遭受自由基 (主要是 $\cdot\text{OH}$ 和高铁酰离子) 损伤引起脂质过氧化, 伴随产生脂质过氧化物和丙二醛 (malondialdehyde, MDA); MDA 可使蛋白质或酶上的氨基交联, 一方面使抗氧化酶失活, 另一方面影响膜蛋白功能引起红细胞膜的脆性及通透性增加, 并使血红蛋白外泄并被 H_2O_2 氧化生成高铁血红蛋白, 甚至释放出游离的铁离子加剧自由基反应和脂质过氧化。 H_2O_2 是环境致癌物如苯并[a]芘 (benzo[a]pyrene) 代谢解毒过程产生的 ROS 主要形式。Kiruthiga 等^[25]报道, 外源性 H_2O_2 所诱导的红细胞的抗氧化酶 (CAT、GPx、SOD 等) 活力下降及 MDA 水平升高, 均能被水飞蓟宾逆转。 H_2O_2 可自由扩散通过细胞的膜性结构, 但由于其反应较弱, 在一定浓度范围内往往表现出保护与损伤的双重作用, 但 H_2O_2 得电子后可生成活性很强的 $\cdot\text{OH}$ (如 Fe^{2+} 参与的 Fenton 反应), 或氧化铁离子形成高铁酰离子。因为 $\cdot\text{OH}$ 和高铁酰离子是造成细胞脂膜损伤后产生 MDA 的主要因素, 所以可以推测水飞蓟宾主要是通过清除强氧化的 $\cdot\text{OH}$ 或高铁酰离子, 保护脂膜稳定性, 减少 MDA 的产生, 进而恢复抗氧化酶的活力。

事实上有研究对水飞蓟宾的抗氧化特性进行评价, 发现水飞蓟宾不能有效清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 , 却可以迅速与 $\cdot\text{OH}$ 发生反应^[26, 27]。水飞蓟宾这一作用机制在作者的研究中也得到证明。线粒体呼吸链复合物通过“电子漏”机制产生 $\text{O}_2^{\cdot-}$, 是细胞内 ROS 的最主要来源; 而线粒体外膜间隙细胞色素 c (cytochrome c) 通过传递电子与呼吸链细胞色素 c 氧化酶一起清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 。作者发现在 MCF-7 细胞中, 水飞蓟宾诱导呼吸链产生 $\text{O}_2^{\cdot-}$, 同时促进细胞色素 c 从线粒体向细胞浆中转位, 破坏了线粒体自身的抗氧化防御作用, 因而导致高水平 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的产生和蓄积^[28]; 而当采用叔丁基过氧化氢 (tBHP) 诱导 $\cdot\text{OH}$ 损伤 MCF-7 细胞时, 水飞蓟宾则产生明显的保护作用, 说明水飞蓟宾选择性地清除 $\cdot\text{OH}$, 而对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 作用较弱。

因此水飞蓟宾的主要抗氧化机制可以解释为, 当氧化应激形式为 $\cdot\text{OH}$ 时, 水飞蓟宾能直接通过理化反应将其清除, 同时抑制脂质过氧化反应, 减少 MDA 等产生; 而对抗 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 产生的氧化应激则主要依赖水飞蓟宾能够及时清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 或 H_2O_2 所转化的 $\cdot\text{OH}$ 等反应性较强的自由基, 从而减少或消除 $\cdot\text{OH}$ 等对抗氧化酶系的抑制, 并维持非酶类抗氧化物

GSH、维生素 E、C 及 β -胡萝卜素等的水平来实现。一定水平的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 可以参与细胞内信号转导或调节氧还敏感蛋白表达, 促进细胞生长或存活, 作者在水飞蓟宾诱导 MCF-7 细胞凋亡的研究中发现, 水飞蓟宾诱导的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 可对抗其凋亡诱导作用, 因此水飞蓟宾对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot\text{OH}$ 这两种不同形式 ROS 的双向调节作用也是其重要作用机制之一。

2.2 抑制 UV 诱导的氧化应激 UV 照射皮肤可引起光老化和癌症。日光中的 UV 按波长分为 3 种, UVA (320~400 nm)、UVB (290~320 nm) 和 UVC (100~290 nm)。自然环境下, 全部的 UVC 和大部分 UVB 在臭氧层被吸收, 而 UVA 不被臭氧层吸收, 皮肤接触到的紫外线 95% 以上是 UVA。UV 诱导细胞损伤通过两个不同的机制: 第一是直接途径, 细胞内发色基团/光敏物质如 RNA、DNA 和蛋白质携带的芳香氨基酸等, 可以直接吸收 UV 光子导致光化学反应, 以 DNA 碱基损伤为代表; 第二为间接途径, 光敏物质吸收 UV 光子成为激发的单线态, 与其他分子通过电子传递形成自由基或 ROS。研究报道^[29-31]了水飞蓟宾对抗 3 种波长 UV 对人永生化的角朊 HaCat 细胞诱导的损伤。然而其中只有在 Svobodová 等^[29]报道的 UVA 诱导的 HaCat 细胞损伤中, 水飞蓟宾以抗氧化作用为主要保护机制: 水飞蓟宾抑制 ROS 产生和膜的脂质过氧化, 减少细胞内 ATP 和 GSH 的消耗, 并抑制了 caspase-3 的活力和 DNA 单链的断裂。因此, 水飞蓟宾通过自由基清除作用对抗 UVA 的损伤, 而对抗 UVB 和 UVC 的作用则可能主要与 DNA 损伤修复有关。

2.3 抑制 β 淀粉样肽引起的记忆缺陷 阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种比较严重的中枢神经系统退行性疾病, 严重损害患者的认知功能。目前, AD 的发病机制还不是十分清楚, 但大量研究显示 β -淀粉样蛋白 (amyloid β protein, A β) 是各种因素诱发 AD 的共同通路, 是 AD 形成和发展的关键因素之一。A β 是构成 AD 脑特征性病老年斑的核心成分, 也是神经原纤维缠结以及血管淀粉样变性的生化基础; A β 引起的认知障碍又与氧化应激和炎症有关, A β 诱导脑内的氧化应激和炎症反应, 引起神经元损伤, 导致学习记忆功能障碍。在临床上对 AD 有效的预防和治疗药物仍十分缺乏, 水飞蓟宾对一些脑内损伤模型具有保护作用, 但其对 A β 诱导的认知功能障碍以及氧化应激和炎症反应的作用尚未见报道。作者利用小鼠侧脑室注入淀粉样 β 蛋白 25-35 (A β_{25-35}) 建立非转基因 AD 模型, 初步研究了水飞蓟

宾对 $A\beta$ 诱导的认知功能损伤的影响和潜在的作用机制。作者发现水飞蓟宾能够对抗 $A\beta$ 引起的短期空间记忆、长期识别记忆以及关联记忆的损伤, 但是并不影响小鼠的运动能力、探索行为和痛阈。此外, 水飞蓟宾能显著抑制 $A\beta$ 诱导的海马区 MDA 的产生, 同时升高 GSH 的水平^[32]。另外, 还发现水飞蓟宾能明显逆转 $A\beta$ 引起的海马区和杏仁核 iNOS 蛋白和硝基酪氨酸水平升高^[33]。这提示了水飞蓟宾可以通过自由基清除和抗氧化机制改善 AD 症状 (图 2)。

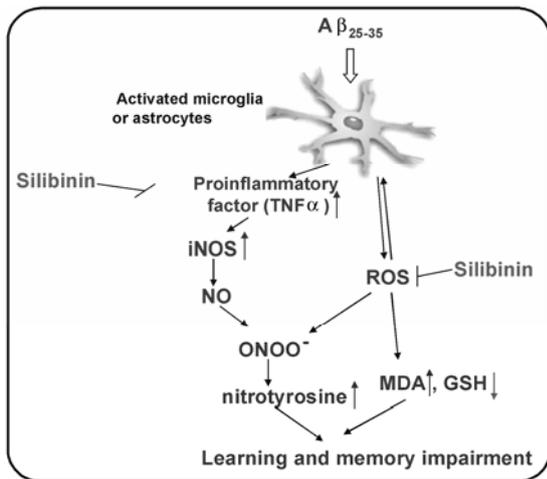


Figure 2 Silibinin attenuates the impairment of learning and memory induced by $A\beta$ peptide through its antioxidative and anti-inflammatory properties

2.4 心肌保护作用 线粒体通过氧化磷酸化合成 ATP, 是心脏收缩/舒张的供能器, 线粒体功能的异常则会导致 ROS 的产生; 而过氧化物大量堆积、抗氧化能力下降又会加重线粒体和心肌细胞损伤。作者在研究异丙肾上腺素对大鼠乳鼠心肌细胞损伤的实验中发现, 异丙肾上腺素能明显上调 MDA 水平, 而 SOD 活力明显下降; 同时还检测到了线粒体膜电位降低, 以及细胞色素 c 从线粒体向胞浆转位。用水飞蓟宾预处理, 能清除 MDA, 恢复 SOD 活力, 并抑制线粒体的损伤^[34]。

2.5 抑制酒精性肝损伤 乙醇可以通过诱导活性氧产生造成肝损伤, 如乙醇能诱导肝细胞表达细胞色素 P450 2E1 (CYP2E1), 而 CYP2E1 能氧化乙醇产生羟乙基自由基, 是酒精性肝损伤的主要原因。研究显示, 水飞蓟宾明显抑制乙醇对 CYP2E1 的诱导和活性氧的生成, 并能恢复抗氧化酶的活力^[35, 36]。 $O_2^{\cdot-}$ 或 $\cdot OH$ 在铁离子存在的条件下, 可能通过非酶性反应参与肝微粒体产生羟乙基自由基。水飞蓟宾对 $O_2^{\cdot-}$ 清除能力很差, 同时对铁离子的螯合作用也极微弱,

且在较高浓度下才能与乙醇竞争结合 $\cdot OH$, 因此水飞蓟宾抑制酒精性肝损伤主要通过直接清除羟乙基自由基实现。

2.6 抑制冷藏/再灌注损伤 肝脏移植是治疗晚期肝脏疾病的有效手段, 而冷藏/再灌注损伤是导致移植肝原发性无功能的重要原因。实验发现, 水飞蓟宾在大鼠肝冷藏/再灌注损伤模型中表现出较强保护作用。冷藏/再灌注可促进脂质过氧化反应 (+40%), 提高 $O_2^{\cdot-}$ (+147%) 水平而降低 GSH (-23%) 水平, 抑制线粒体呼吸控制率 (RCR; -37%) 和 ATP (-57%) 的量。冷藏液加入水飞蓟宾可使 ATP 水平和 RCR 分别升高 39% 和 16%, 同时显著抑制了脂质过氧化物和 $O_2^{\cdot-}$ 的产生^[37]。生理条件下约有 2%~4% 的 O_2 在线粒体呼吸链生成 $O_2^{\cdot-}$, 冷藏过程中因缺血使线粒体呼吸链失活, 并使呼吸链复合物处于还原态, 再灌注时大量 O_2 内流并在还原态的呼吸链得电子形成 $O_2^{\cdot-}$; 另外缺血还可以引起肝细胞内钙超载, 也可影响线粒体功能, 使 ATP 合成减少、ROS 产生增加, 或者高水平的钙通过诱导黄嘌呤氧化酶的生成, 间接促进 ROS 产生。由于检测到大量脂质过氧化物的产生, 推测其原因与 $\cdot OH$ 等强反应性的自由基形成有关, 水飞蓟宾的保护机制仍可能与其清除 $\cdot OH$ 等自由基密切相关。

2.7 调节糖代谢与脂代谢 水飞蓟宾具有明显的降血糖作用, 其机制与水飞蓟宾抑制糖代谢相关激酶活力有关。水飞蓟素的药物制剂 (如 Legalon[®]) 已被用于降低 2 型糖尿病患者的血糖水平。糖异生作用增强是 2 型糖尿病患者血糖水平升高的一个主要因素, 有研究报道水飞蓟宾能抑制葡萄糖-6-磷酸酶活性, 使葡萄糖-6-磷酸不能水解, 从而抑制了肝脏的糖异生作用^[38]。细胞葡萄糖传感与 ROS 代谢密切相关, 在糖代谢异常的情况如糖尿病, 细胞外的高糖水平诱导糖酵解途径活化, 导致过多的丙酮酸生成, 后者进入三羧酸循环提供过多的供氢体 (NADH 和 FADH₂) 给呼吸链, 最终产生高水平的 ROS。ROS 可诱导胰岛 β 细胞损伤从而减少胰岛素的产生, 同时 ROS 又与胰岛素抗性有关, 如抑制葡萄糖转运体 4 (GLUT-4) 的表达; 另外 ROS 还是糖尿病患者并发血管病变的关键因素。研究表明在二羟丙酮 (dihydroxyacetone, DHA) 表面灌流的大鼠肝细胞模型中, 水飞蓟宾能通过抑制丙酮酸激酶活力而抑制糖酵解途径, 并减少糖酵解作用诱导的 ROS 产生^[39]。因此, 水飞蓟宾一方面通过抑制糖异生作用控制血糖水平, 另一方面抑制过度的糖酵解作用还能抑制

ROS 的产生,使其在治疗糖尿病及其并发症方面具有良好的前景。

单核细胞对动脉内皮的黏附是动脉粥样硬化早期表现之一。低密度脂蛋白 (LDL) 含有大量的不饱和脂肪酸,在氧自由基的作用下可生成脂类自由基,介导更多的脂质过氧化反应,最终形成多种活性醛(如 MDA)。这些活性醛与 LDL 中的脂质蛋白结合,产生新的抗原决定簇,形成氧化性低密度脂蛋白(oxLDL)。oxLDL 的产生会诱导单核细胞活化并黏附到炎症血管内皮后转化成巨噬细胞,巨噬细胞通过表面的清道夫受体 (scavenger receptor, SR) 无限制地识别摄取 oxLDL,最后凋亡形成充满脂质的泡沫细胞,导致胆固醇在血管处聚积,引起动脉粥样硬化病变。因此,抑制 oxLDL 的形成可以阻止动脉粥样硬化病变或促使其消退。水飞蓟宾能阻止 LDL 氧化生成 oxLDL,从而抑制了单核细胞和巨噬细胞的 SR 和 FcγR 对 oxLDL 所携带的氧化特异抗原决定簇(如 MDA 修饰的 LDL) 的识别^[40],因此其抗动脉粥样硬化功能是通过抗氧化和清除自由基作用实现的。

3 水飞蓟宾对免疫反应及炎症的调节

NF-κB 是参与免疫反应与炎症调节的重要核转录因子,NF-κB 与 NF-κB 抑制蛋白 (inhibitor of NF-κB, IκB) 结合后因其蛋白转位信号区域被屏蔽而滞留在胞浆。而刺激因子如 TNFα、白介素-1 (IL-1)、脂多糖 (LPS) 或 T 细胞受体 (TCR) 信号可将 IκB 磷酸化,IκB 磷酸化后将导致 IκB 被泛素化降解,NF-κB 因而可以转位细胞核,调节如细胞因子、生长因子、免疫受体、黏附因子和诱导型 NO 合酶 (iNOS) 等的表达。在不同的细胞模型中,水飞蓟宾都显示对 NF-κB 活性的抑制作用。研究表明水飞蓟宾能抑制 IκBα 的磷酸化与降解,抑制 NF-κB 从胞浆向胞核转位,抑制 NF-κB 依赖的报告基因的转录,而且 IκB 激酶 α (IKKα) 可能为水飞蓟宾的一个直接作用位点^[41, 42]。因此,水飞蓟宾可用于依赖 NF-κB 转录活性的炎症因子 (TNFα、IFNγ、IL-2、IL-6、IL-8、iNOS) 所引起的免疫相关疾病或炎症。

3.1 细胞免疫调节 一般而言,促炎性的辅助性 T 细胞亚群 1 (Th1) 细胞因子 (如 IL-2、IFNγ、TNFα) 和抗炎性 Th2 细胞因子 (如 IL-4、IL-5、IL-10、IL-13) 处于相对平衡状态,Th1/Th2 细胞因子失衡将导致免疫失调。很多研究表明,水飞蓟宾抑制了 Th1 细胞因子的过量产生。过度的免疫刺激会引起肝损伤,如病毒性肝炎和自身免疫性肝炎,这种病理过程依赖于 CD4⁺ T 细胞的活化。给小鼠静脉注射刀豆素 A (Con

A) 诱导 T 细胞依赖的肝损伤,模拟自身免疫性肝炎,研究发现水飞蓟宾不影响 CD4⁺ T 细胞在肝内的聚集,但抑制了肝内的 TNFα、IFNγ、IL-2、IL-4、iNOS 水平,而升高了 IL-10 水平^[43];同时水飞蓟宾还抑制了 NF-κB 的活化,由于 NF-κB 介导 TNFα、IFNγ、IL-2 和 iNOS 的表达,可以推测抑制 NF-κB 活性是水飞蓟宾保护作用的一个主要机制。

炎症因子如 TNFα 是介导肝脏损伤的重要介质,由于 NF-κB 一方面可介导 TNFα 的表达,另一方面 NF-κB 又是 TNFα 信号通路下游的转录因子,而水飞蓟宾对 NF-κB 的抑制可以有效阻断这种正反馈回路。水飞蓟宾能显著抑制赫曲毒素 A (ochratoxin A, OTA) 和 LPS 刺激的大鼠离体肝和离体枯否细胞对 TNFα 的分泌作用,并明显减少两个细胞毒指标谷氨酸脱氢酶 (GLDH) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 的水平^[44]。说明水飞蓟宾对抗肝脏炎症损伤的机制是同时通过抑制 TNFα 分泌和抑制 TNFα 活性的双重作用来完成的,而这一作用很可能是通过抑制转录因子如 NF-κB 的活性来实现的。

用髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白 (MOG) 等抗原诱导实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE),可用于研究多发性硬化症 (multiple sclerosis, MS) 的炎症机制。实验发现 MOG 诱导的 EAE 模型中,水飞蓟宾非特异性地下调了 Th1 细胞因子 IL-2 和 IL-12,在体外水飞蓟宾还促进脾细胞 Th2 细胞因子 IL-4 的产生^[45]。组织学检查也证明了水飞蓟宾能明显减轻 EAE 小鼠的脊髓的脱髓鞘作用和炎症细胞浸润。因此水飞蓟宾可能通过抑制 NF-κB 活性减少 Th1 细胞因子的产生,从而改善 MS/EAE 相关症状。另外,树突细胞 (dendritic cells, DCs) 对炎症因子如 TNFα 和 LPS 高度敏感,未成熟的 DCs 在外周接受刺激信号后会迅速成熟,并分泌细胞因子刺激初始 T 细胞 (naive T cell) 分化。水飞蓟宾能通过抑制小鼠骨髓来源 DCs 的成熟和 DCs 对 IL-12 (Th1 细胞诱导因子) 的分泌,来抑制 Th1 细胞免疫应答;实验还发现,水飞蓟宾抑制 MAPKs 的活化以及 NF-κB 的核转位,这提示了其通过抑制 MAPKs 和 NF-κB 的活化,减少 IL-12 和其他 Th1 细胞因子的产生,进而抑制 DCs 的成熟^[46]。

3.2 炎症与肿瘤 肿瘤细胞或其微环境产生的细胞因子可以维持一种慢性炎症和免疫抑制状态,促进肿瘤增殖或转移。很多研究表明水飞蓟宾的抗炎作用与其抑制 NF-κB 等转录因子的活性有关。Chittezhath 等^[47]联合应用 3 种细胞因子 IFNγ、IL-1、TNFα 刺激人肺癌 A549 细胞,水飞蓟宾抑制了这些细胞因

子诱导的 MAPKs 的活化, 不同程度地抑制了转录因子 STAT-1、AP-1 和 NF- κ B 的活性; 下调了 HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α) 和 iNOS 的表达。在 UVB 诱导的 SKH-1 小鼠皮肤癌模型中, 也发现水飞蓟宾下调了 STAT-3、NF- κ B 的活性, 并降低 HIF-1 α 、环氧合酶 2 (COX2)、iNOS、VEGF 的表达, 从而通过抑制炎症和血管生成发挥抗肿瘤作用^[48]。转录因子如 NF- κ B 是联系肿瘤与炎症的关键因子, NF- κ B 被炎症因子激活以后, 可通过调节多种蛋白的表达如 c-IAP (inhibitor of apoptosis proteins)、B 细胞淋巴瘤因子 2 (B cell lymphoma/leukemia-2, BCL-2)、BCL-x_L (B cell lymphoma/leukemia-x_L, BCL-x_L) 和 iNOS 等, 使肿瘤细胞逃避凋亡、促进细胞周期进程、诱导肿瘤转移和血管生成。水飞蓟宾通过抑制 NF- κ B 等转录因子的活性, 进而抑制炎症因子、存活因子和抗凋亡因子的表达, 起到抗炎和抗肿瘤的作用。

3.3 抗氧化作用与免疫调节 一些研究表明水飞蓟宾的免疫调节作用与其抗氧化能力有关。在丙型肝炎和肝脂肪性病变的患者中, 水飞蓟宾和抗氧化剂维生素 E 的复合物可以抑制多种细胞因子 (如 IFN- γ 和 TNF α) 的产生, 而且也影响着机体的免疫状态^[49]。在非酒精性脂肪肝 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) 的大鼠模型中, 水飞蓟宾的抗炎和抗氧化作用也密切相关^[50]。作者研究的小鼠皮肤 UVB 损伤模型中, UVB 显著诱导炎症反应 (照射部位表皮增厚形成红斑, 淋巴细胞增殖并向炎症部位迁移) 和氧化应激 (MDA 水平上调, SOD 活性下降)。水飞蓟宾或维生素 C (VC) 可以明显抑制炎症反应保护皮肤, 研究发现水飞蓟宾下调了 UVB 诱导的 TNF α 、IFN γ 和 IL-1 β 的表达, 同时抑制了参与炎症反应的 MAPKs (ERK、JNK 和 p38) 和 Akt 蛋白的活化。这些研究均表明, 水飞蓟宾能通过抗氧化机制抑制免疫与炎症反应, 事实上 NF- κ B 也是受氧化调节的转录因子^[51], 除水飞蓟宾以外还有很多抗氧化剂如 N-乙酰半胱氨酸 (N-acetylcysteine, NAC) 和二硫化氨基甲酸吡咯烷 (pyrrolidine dithiocarbamate, PDTTC) 也具有抑制 NF- κ B 活性的功能。

4 结语

水飞蓟作为保肝药物其应用历史可追溯到两千年以前, 目前水飞蓟素临床上用于毒伞蕈 (*Amanita phalloides*) 中毒的救治疗效确切, 而水飞蓟素和水飞蓟宾对酒精性肝损伤、慢性肝炎和肝硬化等疾病的临床疗效仍需深入研究与考察。本文在分子水平上对水飞蓟宾的药理机制进行总结, 以期以后的基

础研究和临床应用提供有益参考。目前国外正在进行的水飞蓟宾临床研究主要有: 作为接受肝毒性化疗患者的解毒剂; HIV 感染中植物来源制剂与处方药的相互作用; 丙型肝炎的治疗; 卵巢癌患者血清学复发的预防; 前列腺癌治疗已进入 II 期临床实验阶段。在基础研究方面, 细胞和分子生物学及药物研究模型的发展为考察水飞蓟宾的作用机制提供了极大帮助, 关于水飞蓟素和水飞蓟宾的研究报道也日益增多。然而研究中也存在很多问题亟待解决, 例如由于受到植物来源和提取工艺的影响, 水飞蓟素的含量及各活性成分比例不一, 为其药理机制研究增加难度; 而且即使单一组分水飞蓟宾存在的两个非对映体, 也可能会表现出不同的药理活性, 如水飞蓟宾的弱雌激素受体激动性, 主要与水飞蓟宾 B 的作用有关。因此为更准确地定位水飞蓟宾的作用机制, 单独考察水飞蓟宾 A 和水飞蓟宾 B 的作用机制是必要的。再者应该通过对水飞蓟宾化合物分子的标记和追踪, 在考察其体内代谢分布的基础上, 进一步阐明水飞蓟宾细胞内分布和结合特点, 为其药效研究提供指导。另外, 水飞蓟宾抗肿瘤方面对前列腺癌细胞系和 EGFR 及 NF- κ B 信号途径的研究较多, 但对其他细胞系和其他激酶如 IGF-1R 途径的作用机制仍需要进一步考察。

水飞蓟宾在抗肿瘤、抗氧化、抗炎、高安全性等方面表现出良好的应用和开发前景, 目前作者还针对水飞蓟宾在自噬、衰老、神经退行性疾病等方面的作用, 开展了细胞/干细胞/癌干细胞、线虫及动物体内模型研究, 随着水飞蓟宾分子药理机制的深入阐明, 必将为临床治疗提供更为有力的支持。

References

- [1] Li L, Gao Y, Zhang L, et al. Silibinin inhibits cell growth and induces apoptosis by caspase activation, down-regulating survivin and blocking EGFR-ERK activation in renal cell carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2008, 272: 61-69.
- [2] Singh RP, Dhanalakshmi S, Mohan S, et al. Silibinin inhibits UVB- and epidermal growth factor-induced mitogenic and cell survival signaling involving activator protein-1 and nuclear factor-kappaB in mouse epidermal JB6 cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5: 1145-1153.
- [3] Qi L, Singh RP, Lu Y, et al. Epidermal growth factor receptor mediates silibinin-induced cytotoxicity in a rat glioma cell line [J]. *Cancer Biol Ther*, 2003, 2: 526-531.
- [4] Provinciali M, Papalini F, Orlando F, et al. Effect of the silybin-phosphatidylcholine complex (IdB 1016) on the

- development of mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice [J]. *Cancer Res*, 2007, 67: 2022–2029.
- [5] Tyagi A, Sharma Y, Agarwal C, et al. Silibinin impairs constitutively active TGF α -EGFR autocrine loop in advanced human prostate carcinoma cells [J]. *Pharm Res*, 2008, 25: 2143–2150.
- [6] Cheung CW, Taylor PJ, Kirkpatrick CM, et al. Therapeutic value of orally administered silibinin in renal cell carcinoma: manipulation of insulin-like growth factor binding protein-3 levels [J]. *BJU Int*, 2007, 100: 438–444.
- [7] Raina K, Blouin MJ, Singh RP, et al. Dietary feeding of silibinin inhibits prostate tumor growth and progression in transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model [J]. *Cancer Res*, 2007, 67: 11083–11091.
- [8] Verschoyle RD, Greaves P, Patel K, et al. Evaluation of the cancer chemopreventive efficacy of silibinin in genetic mouse models of prostate and intestinal carcinogenesis: relationship with silibinin levels [J]. *Eur J Cancer*, 2008, 44: 898–906.
- [9] Wang HJ, Tashiro S, Onodera S, et al. Inhibition of insulin-like growth factor 1 receptor signaling enhanced silibinin-induced activation of death receptor and mitochondrial apoptotic pathways in human breast cancer MCF-7 cells [J]. *J Pharmacol Sci*, 2008, 107: 260–269.
- [10] Singh RP, Gu M, Agarwal R. Silibinin inhibits colorectal cancer growth by inhibiting tumor cell proliferation and angiogenesis [J]. *Cancer Res*, 2008, 68: 2043–2050.
- [11] Singh RP, Deep G, Blouin MJ, et al. Silibinin suppresses *in vivo* growth of human prostate carcinoma PC-3 tumor xenograft [J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28: 2567–2574.
- [12] Yang SH, Lin JK, Huang CJ, et al. Silibinin inhibits angiogenesis via Flt-1, but not KDR, receptor up-regulation [J]. *J Surg Res*, 2005, 128: 140–146.
- [13] Agarwal C, Tyagi A, Kaur M, et al. Silibinin inhibits constitutive activation of Stat3, and causes caspase activation and apoptotic death of human prostate carcinoma DU145 cells [J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28: 1463–1470.
- [14] Nomura M, Takahashi T, Nagata N, et al. Inhibitory mechanisms of flavonoids on insulin-stimulated glucose uptake in MC3T3-G2/PA6 adipose cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31: 1403–1409.
- [15] Hsieh YS, Chu SC, Yang SF, et al. Silibinin suppresses human osteosarcoma MG-63 cell invasion by inhibiting the ERK-dependent c-Jun/AP-1 induction of MMP-2 [J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28: 977–987.
- [16] Gu M, Dhanalakshmi S, Mohan S, et al. Silibinin inhibits ultraviolet B radiation-induced mitogenic and survival signaling, and associated biological responses in SKH-1 mouse skin [J]. *Carcinogenesis*, 2005, 26: 1404–1413.
- [17] Singh RP, Dhanalakshmi S, Agarwal C, et al. Silibinin strongly inhibits growth and survival of human endothelial cells via cell cycle arrest and downregulation of survivin, Akt and NF- κ B: implications for angioprevention and antiangiogenic therapy [J]. *Oncogene*, 2005, 24: 1188–1202.
- [18] Bheda A, Creek KE, Pirisi L. Loss of p53 induces epidermal growth factor receptor promoter activity in normal human keratinocytes [J]. *Oncogene*, 2008, 27: 4315–4323.
- [19] Werner H, Maor S. The insulin-like growth factor 1 receptor gene: a downstream target for oncogene and tumor suppressor action [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2006, 17: 236–242.
- [20] Wang HJ, Li D, Yang FY, et al. Oridonin induces human melanoma A375-S2 cell death partially through inhibiting insulin-like growth factor 1 receptor signaling [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2008, 10: 787–798.
- [21] Zhou L, Liu P, Chen B, et al. Silibinin restores paclitaxel sensitivity to paclitaxel-resistant human ovarian carcinoma cells [J]. *Anticancer Res*, 2008, 28: 1119–1127.
- [22] Jiang YY, Wang HJ, Wang J, et al. The protective effect of silibinin on human melanoma A375-S2 cells against mitomycin c induced intrinsic apoptosis [J]. *J Pharmacol Sci*, 2009, 111: 137–146.
- [23] Zhou B, Wu LJ, Li LH, et al. Silibinin protects against isoproterenol-induced rat cardiac myocyte injury through mitochondrial pathway after up-regulation of SIRT1 [J]. *J Pharmacol Sci*, 2006, 102: 387–395.
- [24] Khan SA, Ahmad B, Alam T. Synthesis and antihepatotoxic activity of some new chalcones containing 1, 4-dioxane ring system [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2006, 19: 290–294.
- [25] Kiruthiga PV, Shafreen RB, Pandian SK, et al. Silymarin protection against major reactive oxygen species released by environmental toxins: exogenous H₂O₂ exposure in erythrocytes [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2007, 100: 414–419.
- [26] Fu H, Lin M, Muroya Y, et al. Free radical scavenging reactions and antioxidant activities of silybin: mechanistic aspects and pulse radiolytic studies [J]. *Free Radic Res*, 2009, 43: 887–897.
- [27] Fu H, Katsumura Y, Lin M, et al. Fast repair activities towards dGMP hydroxyl radical adducts by silybin and its analogues [J]. *J Radiat Res*, 2008, 49: 609–614.
- [28] Wang HJ, Jiang YY, Wei XF, et al. Silibinin induces protective superoxide generation in human breast cancer MCF-7 cells [J]. *Free Radic Res*, 2010, 44: 90–100.
- [29] Svobodová A, Zdarilová A, Walterová D, et al. Flavonolignans from *Silybum marianum* moderate UVA-induced oxidative damage to HaCaT keratinocytes [J]. *J Dermatol Sci*, 2007,

- 48: 213–224.
- [30] Dhanalakshmi S, Mallikarjuna GU, Singh RP, et al. Dual efficacy of silibinin in protecting or enhancing ultraviolet B radiation-caused apoptosis in HaCaT human immortalized keratinocytes [J]. *Carcinogenesis*, 2004, 25: 99–106.
- [31] Li LH, Wu LJ, Tashiro S, et al. Silibinin prevents UV-induced HaCaT cell apoptosis partly through inhibition of caspase-8 pathway [J]. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29: 1096–1101.
- [32] Lu P, Mamiya T, Lu L, et al. Silibinin prevents amyloid beta peptide-induced memory impairment and oxidative stress in mice [J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 157: 1270–1277.
- [33] Lu P, Mamiya T, Lu L, et al. Silibinin attenuates amyloid {beta}25-35 peptide-induced memory impairments: implication of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in mice [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, 331: 319–326.
- [34] Zhou B, Wu LJ, Tashiro S, et al. Protective effect of silibinin against isoproterenol-induced injury to cardiac myocytes and its mechanism [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2007, 42: 263–268.
- [35] Brandon-Warner E, Sugg JA, Schrum LW, et al. Silibinin inhibits ethanol metabolism and ethanol-dependent cell proliferation in an *in vitro* model of hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2010, in press.
- [36] Das SK, Vasudevan DM. Protective effects of silymarin, a milk thistle (*Silybum marianum*) derivative on ethanol-induced oxidative stress in liver [J]. *Indian J Biochem Biophys*, 2006, 43: 306–311.
- [37] Ligeret H, Brault A, Vallerand D, et al. Antioxidant and mitochondrial protective effects of silibinin in cold preservation-warm reperfusion liver injury [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 115: 507–514.
- [38] Guigas B, Naboulsi R, Villanueva GR, et al. The flavonoid silibinin decreases glucose-6-phosphate hydrolysis in perfused rat hepatocytes by an inhibitory effect on glucose-6-phosphatase [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2007, 20: 925–934.
- [39] Detaille D, Sanchez C, Sanz N, et al. Interrelation between the inhibition of glycolytic flux by silibinin and the lowering of mitochondrial ROS production in perfused rat hepatocytes [J]. *Life Sci*, 2008, 82: 1070–1076.
- [40] Wallace S, Vaughn K, Stewart BW, et al. Milk thistle extracts inhibit the oxidation of low-density lipoprotein (LDL) and subsequent scavenger receptor-dependent monocyte adhesion [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56: 3966–3972.
- [41] Tyagi A, Singh RP, Ramasamy K, et al. Growth inhibition and regression of lung tumors by silibinin: modulation of angiogenesis by macrophage-associated cytokines and nuclear factor-kappaB and signal transducers and activators of transcription 3 [J]. *Cancer Prev Res (Phila Pa)*, 2009, 2: 74–83.
- [42] Tai KY, Shieh YS, Lee CS, et al. Axl promotes cell invasion by inducing MMP-9 activity through activation of NF-kappaB and Brg-1 [J]. *Oncogene*, 2008, 27: 4044–4055.
- [43] Schümann J, Prockl J, Kiemer AK, et al. Silibinin protects mice from T cell-dependent liver injury [J]. *J Hepatol*, 2003, 39: 333–340.
- [44] Al-Anati L, Essid E, Reinehr R, et al. Silibinin protects OTA-mediated TNF-alpha release from perfused rat livers and isolated rat Kupffer cells [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2009, 53: 460–466.
- [45] Min K, Yoon WK, Kim SK, et al. Immunosuppressive effect of silibinin in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Arch Pharm Res*, 2007, 30: 1265–1272.
- [46] Lee JS, Kim SG, Kim HK, et al. Silibinin polarizes Th1/Th2 immune responses through the inhibition of immunostimulatory function of dendritic cells [J]. *J Cell Physiol*, 2007, 210: 385–397.
- [47] Chittezhath M, Deep G, Singh RP, et al. Silibinin inhibits cytokine-induced signaling cascades and down-regulates inducible nitric oxide synthase in human lung carcinoma A549 cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7: 1817–1826.
- [48] Gu M, Singh RP, Dhanalakshmi S, et al. Silibinin inhibits inflammatory and angiogenic attributes in photocarcinogenesis in SKH-1 hairless mice [J]. *Cancer Res*, 2007, 67: 3483–3491.
- [49] Falasca K, Ucciferri C, Mancino P, et al. Treatment with silybin-vitamin E-phospholipid complex in patients with hepatitis C infection [J]. *J Med Virol*, 2008, 80: 1900–1906.
- [50] Haddad Y, Vallerand D, Brault A, et al. Antioxidant and hepatoprotective effects of silibinin in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2010, in press.
- [51] Surh YJ. NF-kappa B and Nrf2 as potential chemopreventive targets of some anti-inflammatory and antioxidative phytonutrients with anti-inflammatory and antioxidative activities [J]. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2008, 17 Suppl 1: 269–272.