

## 桂枝汤及其生物转化模拟产物对 IL-1 $\beta$ 介导的 bEnd. 3 细胞 PGE<sub>2</sub> 代谢通路的影响

陈冰<sup>1,2</sup>, 柏冬<sup>2</sup>, 李沧海<sup>1</sup>, 张畅斌<sup>1</sup>, 牛晓红<sup>3</sup>, 李兰芳<sup>1</sup>, 郭淑英<sup>1</sup>, 宋剑南<sup>2\*</sup>, 姜廷良<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院中药研究所唐氏中药研究中心, 北京 100700;

2. 中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700;

3. 中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700)

**[摘要]** **目的:** 研究桂枝汤及其生物转化模拟产物对白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )介导的小鼠脑微血管内皮细胞株(bEnd. 3)细胞前列腺素 E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)代谢通路的影响。**方法:** 制备了桂枝汤及桂枝汤生物转化模拟产物的含药血清(分别设五个浓度组), 采用酶联免疫吸附法(ELISA)和免疫印迹法(Western blot), 观察桂枝汤及其生物转化模拟产物对 IL-1 $\beta$  刺激的 bEnd. 3 细胞磷酸化丝裂原活化的蛋白激酶 p38(p-p38MAPK)、胞浆型磷脂酶 A<sub>2</sub>(cPLA<sub>2</sub>)、分泌型磷脂酶 A<sub>2</sub>(sPLA<sub>2</sub>)、环氧合酶 2(COX-2)、前列腺素 E 合成酶(PGE<sub>s</sub>)、15-羟基前列腺素脱氢酶(15-PGDH)、磷酸化核因子  $\kappa$ B(p-NF- $\kappa$ B)以及前列腺素 E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)分泌及表达的影响。**结果:** IL-1 $\beta$  作用于细胞 10 h 后, 各项指标均明显上调, 与对照组比较,  $P < 0.01$ 。除质量浓度为 2.5% 的桂枝汤含药血清对 PGE<sub>s</sub>, sPLA<sub>2</sub>; 终浓度为 1% 的模拟药对 PGE<sub>s</sub>; 终浓度为 2.5% 的含药血清对 PGE<sub>s</sub>, sPLA<sub>2</sub>, cPLA<sub>2</sub> 作用不显著外, 其他各浓度组与模型组比较均出现显著性差异。**结论:** 桂枝汤及其生物转化模拟产物对 IL-1 $\beta$  刺激 bEnd. 3 细胞合成 PGE<sub>2</sub> 的代谢酶系统有不同程度的抑制作用, 从而降低了前炎症介质和中枢发热介质 PGE<sub>2</sub> 的释放和分泌。结果提示, 桂枝汤及其生物转化模拟产物对脑微血管内皮细胞分泌 PGE<sub>2</sub> 具有相似的药效, 为模拟产物的应用和开发提供了实验支持。

**[关键词]** 桂枝汤; 生物转化模拟产物; 脑微血管内皮细胞; 前列腺素 E<sub>2</sub>

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)16-0128-05

## Effects of Guizhitang and It's Biotransformation Product on Catabolizing Enzymes of Prostaglandin E<sub>2</sub> in bEnd. 3 with Interleukin-1 $\beta$ Inducement

CHEN Bing<sup>1,2</sup>, BAI Dong<sup>2</sup>, LI Cang-hai<sup>1</sup>, ZHANG Chang-bin<sup>1</sup>, NIU Xiao-hong<sup>3</sup>,

LI Lan-fang<sup>1</sup>, GUO Shu-ying<sup>1</sup>, SONG Jian-nan<sup>2\*</sup>, JIANG Ting-liang<sup>1\*</sup>

(1. Tang Center for Herbal Medicine Research, Institute of Chinese Materia Medica,

China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Institute of Basic Theory, China Academy of Traditional Chinese Medicine Sciences, Beijing 100700, China;

3. Medical Experiment Center, China Academy of Traditional Chinese Medicine Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of Guizhitang and it's biotransformation product on catabolizing enzymes of prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) in bEnd. 3 with IL-1 $\beta$  inducement. **Method:** Using Elisa and Western blot methods to measure p-p38MAPK, cPLA<sub>2</sub>, sPLA<sub>2</sub>, COX-2, PGE<sub>s</sub>, 15-PGDH, p-NF- $\kappa$ B and PGE<sub>2</sub>. **Result:** Guizhitang and it's biotransformation product could inhibit the changes in p-p38MAPK, cPLA<sub>2</sub>, sPLA<sub>2</sub>,

**[收稿日期]** 20110415(006)

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(30572334)

**[第一作者]** 陈冰, 在读博士生, 助理研究员, 从事中药药理研究, E-mail: bingchen1205@163.com

**[通讯作者]** \* 宋剑南, 研究员, 博士生导师, E-mail: sjn2003@sina.com

\* 姜廷良, 研究员, 博士生导师, E-mail: jiangt2005@sohu.com

COX-2, PGE<sub>s</sub>, 15-PGDH, p-NF- $\kappa$ B and PGE<sub>2</sub> in bEnd.3 with IL-1 $\beta$  inducement. **Conclusion:** Guizhitang and its biotransformation product could inhibit the changing on catabolizing enzymes of PGE<sub>2</sub> in bEnd.3 with IL-1 $\beta$  inducement to various degrees. Guizhitang and its biotransformation product showed similar effects. It can provide experimental evidence on application development of biotransformation product.

[ **Key words** ] Guizhitang; biotransformation product; rat cerebral microvascular endothelial cells; prostaglandin E<sub>2</sub>

目前中药制剂因受到产地、炮制加工等影响,加之控制中药制剂质量标准尚不完善,存在制剂工艺粗放,单次服用剂量大等缺陷。而且因为服药对象的个体差异,同一方剂达到的药效也不尽相同。几千年来,汤剂是中药的主要服用方式,因此胃肠道的消化、吸收作用对中药方剂疗效有着重要影响,特别是肠道菌对药物成分的生物转化作用及其对吸收的影响是中药发挥整体效应的重要环节。宋剑南认为“除部分胃肠道药物外,中药方剂中真正的药物分子或前体即效应分子应是存在于通过消化道吸收后进入血液循环前(即进入门静脉)的一瞬间的那些物质之中,它们才是中药方剂整体效应的物质基础或方剂的效应物质。在此暂且将某一中药方剂中能被吸收的全部效应分子称之为该中药方剂的整体效应分子组”<sup>[1]</sup>。希望能建立一套以纯化中药、提高药效、改变传统给药方式为主要目的的集成方法。本项目前期研究中建立了复方中药体外消化道模拟的分离纯化方法<sup>[2]</sup>,以目前作用机制较为清楚的桂枝汤作为研究对象,制备了桂枝汤生物转化模拟产物(以下简称模拟药)。本实验从前列腺素 E 合成酶通路对桂枝汤及其模拟药进行药效学对比。

## 1 材料

**1.1 药材** 桂枝汤出自《伤寒论》,组方:桂枝 10 g,芍药 10 g,甘草 7 g,生姜 10 g,大枣 10 g。

**1.2 动物** 雄性 SD 大鼠,体重(250 ± 10)g,由中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物中心提供,合格证号 SCXK-(军)-2007-004。

**1.3 细胞** 小鼠脑微血管内皮细胞株(bEnd.3),由本实验室提供,复旦大学上海医学院生理与病理学系惠赠。

**1.4 试剂** DMEM 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清购自美国 Gibco 公司,II 型胶原酶购自美国 Sigma 公司。白介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 购自 PeproTech 公司(12747A2109)。一抗 15-羟基前列腺素脱氢酶(15-hydroxyprosta-glandin dehyd-

rogenase, 15-PGDH) (sc-48908), 前列腺素 E 合成酶(prostaglandine synthase, PGE<sub>s</sub>) (sc-20771), 胞浆型磷脂酶 A<sub>2</sub> (cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>, cPLA<sub>2</sub>) (sc-55887), 环氧合酶 2 (cyclooxygenase-2, COX-2), 核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)、丝裂原活化的蛋白激酶 p38 (Mitogen activated protein kinase p38, p38MAPK) 抗体、内参购自 Santa Cruz 公司。二抗:辣根过氧化物酶标记的羊抗兔、羊抗小鼠 IgG 抗体购自北京中杉金桥有限公司,免疫印记法(Western Blot)发光液购自 Santa Cruz (sc-2048) 公司,免疫印记 PVDF 膜购自 Bio-Rad 公司。15-PGDH, PGE<sub>s</sub>, 前列腺素 E<sub>2</sub> (prostaglandin E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>), cPLA<sub>2</sub>, 分泌型磷脂酶 A<sub>2</sub> (secretory phospholipase A<sub>2</sub>, sPLA<sub>2</sub>) 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自 R&D 公司。其他试剂为国产分析纯。

**1.5 仪器** 超净工作台为北京半导体设备一厂公司产品。Power Pac Basic 电泳仪购自 BIO-RAD 公司;JY96-II 型超声细胞粉碎仪为宁波新芝电器公司;CliniBio 128D 型酶标仪为 ASYS Hitech 公司产品;SORVALL 低温离心机为 Biofuge stratos 公司;HW-8B 型超级微量恒温器为上海浦口分析仪器厂生产。各型离心机为德国科峻公司产品。

## 2 方法

**2.1 桂枝汤汤剂的制备** 按原方比例将所有饮片加 8 倍量水浸泡 1 h,煎煮 30 min,滤去药液,药渣加 6 倍量水,再煎煮 30 min,过滤,合并两次滤液,以蒸馏水调至适当浓度。

**2.2 模拟药制备**<sup>[2]</sup> 样品由本院基础所柏冬博士提供。20 mL 桂枝汤汤剂(饮片 1.0 g · mL<sup>-1</sup>)加入 100 mL 蛋白质浓度为 1 300 mg · L<sup>-1</sup> 的菌酶溶液(pH 7.5)中,充入氮气,42 °C 培养 36 h,反应完成后 7 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 15 min。取上清液,以膜孔径为 50 万道尔顿的超滤柱纯化,收集超滤液,减压浓缩至饮片 1.0 g · mL<sup>-1</sup>。采用 HPLC 指纹图谱分析,发

现桂枝汤汤剂经肠内菌酶转化后,原提取液中含有的肉桂酸、甘草苷、甘草酸均消失,芍药苷的含量也相对降低,同时色谱图中新生成了 32,41,54 min 甘草次酸色谱峰。指纹图谱对比表明:桂枝汤在肠内菌中的转化与在大鼠盲肠肠液中的转化基本一致。

**2.3 含药血清的制备** 大鼠随机分为 3 组:空白对照组、桂枝汤组、模拟药组各 10 只,分别以等量去离子水、桂枝汤汤剂、桂枝汤生物转化模拟产物按 10 倍临床等效剂量(按生药量计  $47 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) ig 给药,每天 2 次,共 5 次。于末次 ig 后 1 h,乙醚麻醉动物,无菌条件下,经腹主动脉取血,4 °C 静置 1 h,3 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min,分离含药血清。将同组大鼠含药血清混匀,56 °C 水浴 30 min 灭活血清,微孔滤膜过滤除菌,冻存管分装, -80 °C 保存备用。

**2.4 bEnd.3 细胞培养** 细胞培养于含  $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  L-谷氨酰胺、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  丙酮酸钠、碳酸氢钠  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  和 10 % 胎牛血清的 DMEM 培养液中。在 5%  $\text{CO}_2$ , 37 °C 的恒湿培养箱中培养。

**2.5 分组** bEnd.3 分 5 组:正常对照组(C);模型组(M);桂枝汤含药血清组(Y);模拟药组(G);模拟药含药血清组(Z)。其中 Y,G,Z 组分设不同浓度及高浓度对照组。

**2.6 药物对 IL-1 $\beta$  刺激 bEnd.3 分泌 15-PGDH, PGE<sub>s</sub>, PGE<sub>2</sub>, cPLA<sub>2</sub>, sPLA<sub>2</sub> 的影响** 以胰酶将细胞消化成  $2 \times 10^6/\text{mL}$  密度,接种于 24 孔培养板内,每孔 0.5 mL。培养箱中继续培养 24 h,待细胞长至融合状态后,换液,以无血清 DMEM 液继续培养 24 h 后倾出,按照实验分组分别给予药物(Y,Z 组分别加终浓度为 2.5 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 % 的含药血清;G 组加浓度 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 % 的模拟药) 孵育 36 h,再加入终浓度为  $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 IL-1 $\beta$  刺激 bEnd.3 细胞 10 h。吸取细胞外液,以 ELISA 法测定

PGE<sub>2</sub>, 15-PGDH, PGE<sub>s</sub>, cPLA<sub>2</sub>, sPLA<sub>2</sub> 水平。用酶标仪在 450 nm 波长依序测量各孔的吸光度(A)。

**2.7 药物对 IL-1 $\beta$  刺激 bEnd.3 表达 COX-2, 15-PGDH, PGE<sub>s</sub>, cPLA<sub>2</sub>, p-NF- $\kappa$ B, p-p38MAPK 的影响** 以  $6 \times 10^5/\text{瓶}$  的密度将细胞接种于  $25 \text{ cm}^2$  培养瓶中,细胞处理同 2.6,收集细胞,裂解,提蛋白,定量,电泳后切胶,按  $1 \text{ mA}/\text{cm}^2$  电流 2.5 h 将蛋白转到 PVDF 膜上,以相应二抗室温孵育 3 h,然后通过化学发光成像系统捕获图像。

**2.8 统计方法** 实验数据结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用统计软件 SPSS 10.0 进行单因素方差分析。组间比较采用 SNK 检验。 $P < 0.05$  有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 桂枝汤含药血清对 IL-1 $\beta$  刺激 bEnd.3 分泌 15-PGDH, PGE<sub>s</sub>, PGE<sub>2</sub>, cPLA<sub>2</sub>, sPLA<sub>2</sub> 的影响** IL-1 $\beta$  作用于细胞后,各项指标均明显上调,与对照组比较, $P < 0.01$ 。桂枝汤含药血清可明显降低 IL-1 $\beta$  的作用,除质量终浓度为 2.5% 的桂枝汤含药血清对 PGE<sub>s</sub>, sPLA<sub>2</sub> 作用不显著外,其余剂量均呈现显著性差异,且随着药物剂量的增大,效果更加显著;其中终浓度为 20% 的桂枝汤含药血清对 15-PGDH, sPLA<sub>2</sub> 的抑制作用最为明显,数值已基本接近正常;结果见表 1。

**3.2 模拟药对 IL-1 $\beta$  刺激 bEnd.3 分泌 15-PGDH, PGE<sub>s</sub>, PGE<sub>2</sub>, cPLA<sub>2</sub>, sPLA<sub>2</sub> 的影响** IL-1 $\beta$  作用于细胞后,各项指标均明显上调,模拟药可明显降低 IL-1 $\beta$  的作用,除终浓度为 1% 的模拟药对 PGE<sub>s</sub> 作用不显著外,其余剂量均呈现显著性差异,随着药物剂量的增大,效果增强;其中终浓度为 5% 的模拟药对 15-PGDH, sPLA<sub>2</sub> 的抑制作用最为明显。结果见表 2。

**3.3 模拟药含药血清对 IL-1 $\beta$  刺激 bEnd.3 分泌 15-PGDH, PGE<sub>s</sub>, PGE<sub>2</sub>, cPLA<sub>2</sub>, sPLA<sub>2</sub> 的影响** IL-1 $\beta$

表 1 桂枝汤含药血清对 IL-1 $\beta$  刺激 bEnd.3 分泌 15-PGDH, PGE<sub>s</sub>, PGE<sub>2</sub>, cPLA<sub>2</sub>, sPLA<sub>2</sub> 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	15-PGDH	PGE <sub>2</sub>	PGE <sub>s</sub>	sPLA <sub>2</sub>	cPLA <sub>2</sub>
对照	12.89 ± 0.58 <sup>2)</sup>	3.60 ± 0.54 <sup>2)</sup>	40.02 ± 1.21 <sup>2)</sup>	200.69 ± 54.18 <sup>2)</sup>	14.82 ± 1.69 <sup>2)</sup>
20% Y-C	12.64 ± 0.31 <sup>2)</sup>	3.99 ± 0.78 <sup>2)</sup>	39.18 ± 2.31 <sup>2)</sup>	222.86 ± 25.06 <sup>2)</sup>	13.77 ± 0.91 <sup>2)</sup>
模型	24.71 ± 1.35	9.08 ± 0.32	95.07 ± 8.15	568.41 ± 44.86	34.84 ± 2.10
2.5% Y	20.16 ± 0.61 <sup>2)</sup>	7.99 ± 0.30 <sup>2)</sup>	86.95 ± 2.15	464.02 ± 48.29	29.83 ± 0.77 <sup>1)</sup>
5% Y	16.26 ± 0.67 <sup>2)</sup>	7.04 ± 0.30 <sup>2)</sup>	74.69 ± 5.18 <sup>1)</sup>	418.47 ± 23.41 <sup>2)</sup>	25.55 ± 1.49 <sup>2)</sup>
10% Y	14.44 ± 0.72 <sup>2)</sup>	6.02 ± 0.19 <sup>2)</sup>	65.03 ± 3.10 <sup>2)</sup>	378.38 ± 32.98 <sup>2)</sup>	23.56 ± 2.09 <sup>2)</sup>
15% Y	13.66 ± 0.91 <sup>2)</sup>	5.00 ± 0.18 <sup>2)</sup>	60.52 ± 5.59 <sup>2)</sup>	279.61 ± 37.87 <sup>2)</sup>	22.01 ± 1.64 <sup>2)</sup>
20% Y	12.26 ± 0.78 <sup>2)</sup>	4.43 ± 0.28 <sup>2)</sup>	53.90 ± 4.41 <sup>2)</sup>	197.19 ± 18.91 <sup>2)</sup>	18.34 ± 1.50 <sup>2)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ (表 2 ~ 3 同)。

表 2 模拟药对 IL-1 $\beta$  刺激 bEnd.3 分泌 15-PGDH, PGE<sub>s</sub>, PGE<sub>2</sub>, cPLA<sub>2</sub>, sPLA<sub>2</sub> 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	15-PGDH	PGE <sub>2</sub>	PGE <sub>s</sub>	sPLA <sub>2</sub>	cPLA <sub>2</sub>
对照	11.37 $\pm$ 0.37 <sup>2)</sup>	4.05 $\pm$ 0.34 <sup>2)</sup>	36.42 $\pm$ 3.05 <sup>2)</sup>	223.36 $\pm$ 24.80 <sup>2)</sup>	12.72 $\pm$ 1.92 <sup>2)</sup>
5% G-C	10.74 $\pm$ 0.36 <sup>2)</sup>	3.70 $\pm$ 0.29 <sup>2)</sup>	31.78 $\pm$ 2.61 <sup>2)</sup>	208.81 $\pm$ 14.27 <sup>2)</sup>	12.69 $\pm$ 2.12 <sup>2)</sup>
模型	24.26 $\pm$ 1.19	8.12 $\pm$ 0.30	88.01 $\pm$ 7.80	527.37 $\pm$ 37.74	33.75 $\pm$ 1.45
1% G	18.54 $\pm$ 1.19 <sup>2)</sup>	6.73 $\pm$ 0.12 <sup>2)</sup>	85.80 $\pm$ 2.91	455.25 $\pm$ 17.66 <sup>1)</sup>	29.46 $\pm$ 1.34 <sup>1)</sup>
2% G	16.01 $\pm$ 0.52 <sup>2)</sup>	6.03 $\pm$ 0.18 <sup>2)</sup>	63.59 $\pm$ 4.56 <sup>2)</sup>	383.60 $\pm$ 24.19 <sup>2)</sup>	26.33 $\pm$ 1.02 <sup>2)</sup>
3% G	14.37 $\pm$ 0.32 <sup>2)</sup>	5.34 $\pm$ 0.20 <sup>2)</sup>	47.94 $\pm$ 5.48 <sup>2)</sup>	328.72 $\pm$ 47.88 <sup>2)</sup>	22.80 $\pm$ 0.97 <sup>2)</sup>
4% G	13.17 $\pm$ 0.78 <sup>2)</sup>	5.04 $\pm$ 0.11 <sup>2)</sup>	41.36 $\pm$ 2.99 <sup>2)</sup>	318.75 $\pm$ 17.18 <sup>2)</sup>	20.68 $\pm$ 1.76 <sup>2)</sup>
5% G	11.41 $\pm$ 0.86 <sup>2)</sup>	4.46 $\pm$ 0.14 <sup>2)</sup>	38.49 $\pm$ 1.75 <sup>2)</sup>	213.20 $\pm$ 34.00 <sup>2)</sup>	17.31 $\pm$ 2.37 <sup>2)</sup>

作用于细胞后,各项指标均明显上调,模拟药含药血清可明显降低 IL-1 $\beta$  的作用,除终浓度为 2.5% 的含药血清对 PGE<sub>s</sub>, sPLA<sub>2</sub>, cPLA<sub>2</sub> 作用不显著外,其余

剂量均呈现显著性差异,随着药物剂量的增大,效果增强;其中终浓度为 20% 的模拟药含药血清对 sPLA<sub>2</sub> 的抑制作用最为明显。结果见表 3。

表 3 模拟药含药血清对 IL-1 $\beta$  刺激 bEnd.3 分泌 15-PGDH, PGE<sub>s</sub>, PGE<sub>2</sub>, cPLA<sub>2</sub>, sPLA<sub>2</sub> 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	15-PGDH	PGE <sub>2</sub>	PGE <sub>s</sub>	sPLA <sub>2</sub>	cPLA <sub>2</sub>
对照	13.76 $\pm$ 0.30 <sup>2)</sup>	3.79 $\pm$ 0.11 <sup>2)</sup>	41.01 $\pm$ 1.29 <sup>2)</sup>	233.75 $\pm$ 17.43 <sup>2)</sup>	17.47 $\pm$ 1.07 <sup>2)</sup>
20% Z-C	13.27 $\pm$ 0.16 <sup>2)</sup>	3.66 $\pm$ 0.29 <sup>2)</sup>	39.69 $\pm$ 0.81 <sup>2)</sup>	235.75 $\pm$ 11.91 <sup>2)</sup>	18.15 $\pm$ 0.53 <sup>2)</sup>
模型	25.36 $\pm$ 0.74	9.36 $\pm$ 0.41	93.46 $\pm$ 6.89	573.82 $\pm$ 40.39	32.73 $\pm$ 0.77
2.5% Z	23.33 $\pm$ 0.70 <sup>1)</sup>	8.13 $\pm$ 0.22 <sup>1)</sup>	93.60 $\pm$ 3.72	500.10 $\pm$ 26.07	32.08 $\pm$ 1.44
5% Z	19.03 $\pm$ 0.75 <sup>2)</sup>	7.24 $\pm$ 0.39 <sup>2)</sup>	81.09 $\pm$ 2.42 <sup>1)</sup>	378.59 $\pm$ 42.84 <sup>2)</sup>	29.86 $\pm$ 0.76 <sup>1)</sup>
10% Z	16.57 $\pm$ 0.69 <sup>2)</sup>	6.63 $\pm$ 0.10 <sup>2)</sup>	65.08 $\pm$ 1.96 <sup>2)</sup>	357.97 $\pm$ 29.60 <sup>2)</sup>	26.28 $\pm$ 0.71 <sup>2)</sup>
15% Z	14.95 $\pm$ 0.42 <sup>2)</sup>	6.01 $\pm$ 0.34 <sup>2)</sup>	66.78 $\pm$ 0.91 <sup>2)</sup>	300.37 $\pm$ 36.12 <sup>2)</sup>	21.62 $\pm$ 1.14 <sup>2)</sup>
20% Z	15.06 $\pm$ 0.81 <sup>2)</sup>	5.04 $\pm$ 0.21 <sup>2)</sup>	64.06 $\pm$ 0.69 <sup>2)</sup>	235.80 $\pm$ 30.40 <sup>2)</sup>	20.38 $\pm$ 0.78 <sup>2)</sup>

3.4 不同药物处理方法对 IL-1 $\beta$  刺激 bEnd.3 细胞 cPLA<sub>2</sub>, COX-2, p-NF- $\kappa$ B, p-p38MAPK, 15-PGDH, PGE<sub>s</sub> 蛋白表达的影响 IL-1 $\beta$  作用于细胞 10 h 后,细胞 cPLA<sub>2</sub>, COX-2, p-NF- $\kappa$ B, p-p38MAPK, 15-PGDH, PGE<sub>s</sub> 蛋白表达均显著增加,桂枝汤含药血

清、模拟药及模拟药含药血清均可降低 IL-1 $\beta$  介导的 cPLA<sub>2</sub>, COX-2, p-NF- $\kappa$ B, p-p38MAPK, 15-PGDH, PGE<sub>s</sub> 蛋白的表达,随药物浓度增高,效果更加显著。见图 1。

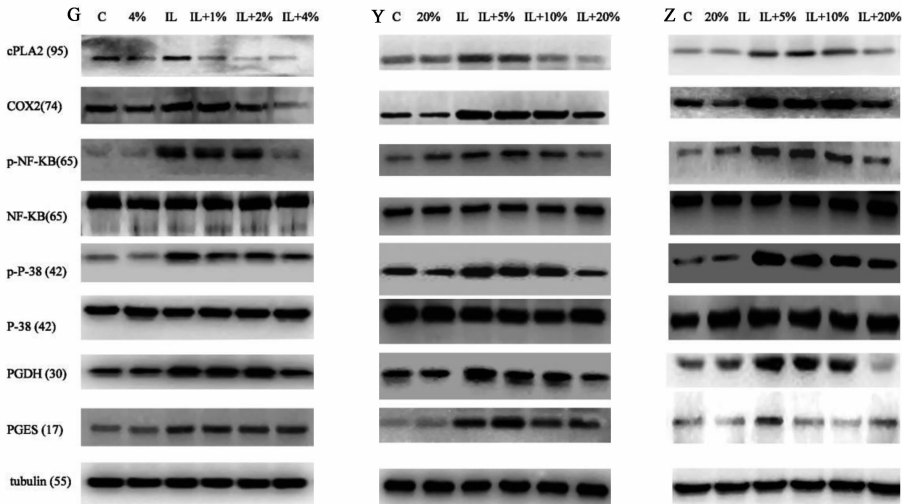


图 1 药物对细胞 cPLA<sub>2</sub>, COX-2, p-NF- $\kappa$ B, p-p38MAPK, 15-PGDH, PGE<sub>s</sub> 蛋白表达的影响

#### 4 讨论

传统中药大部分以口服形式入药,经消化道、肠

道菌群作用后,有的直接被排泄,有的被选择性吸收,最后随血液循环到达全身各个部位的靶器官、组

织,最终发挥药理作用。针对中药复方的研究,项目组认为:中药复方的化学物质基础以及各物质在体内发生的相互作用才是其药理学作用的研究根本,只有阐明这种整体作用,才能把握复方用药的精髓。从整体效应、活性成分群、多组分整合角度对中药进行研究已经成为今后的发展趋势<sup>[1]</sup>。

在本项目前期工作中<sup>[3-5]</sup>发现桂枝汤汤剂在大鼠胃、十二指肠中没有发生明显转化,在肠道下端转化明显,其中肠内菌群起到很强的转化作用。针对桂枝汤在大鼠体内的消化、吸收的特点,设计了针对桂枝汤整体效应分子组的体外生物转化模拟方案,以桂枝汤生物转化模拟产物对大鼠 ig,取门静脉血进行分析,可明显检测到芍药苷代谢物、葡萄糖醛酸甘草素、肉桂酸和甘草次酸,与口服桂枝汤后门静脉血中成分基本一致,但含量明显提高,模拟产物达到提高生物利用度的目的。本实验拟通过药效学方法对模拟方案进行验证。

大量研究证明<sup>[6-8]</sup>,桂枝汤可对抗刺激物(如白介素 1、干扰素、肿瘤坏死因子、内毒素等)的致热作用,调节 COX, PGE<sub>2</sub>, 5-羟色胺等中枢发热介质和三磷酸肌醇等第二信使及内源性降温物质的含量。在 IL-1 等内生致热原诱发发热反应过程中, PGE<sub>2</sub> 是最重要的介质<sup>[9]</sup>。已经证实<sup>[10-12]</sup>,桂枝汤的有效部位 A 中 6 个苯丙烯类成分即可通过影响细胞内 PGE<sub>2</sub> 合成代谢主要靶点发挥药效学作用。本实验研究发现,桂枝汤及其生物转化模拟产物均可降低 IL-1 $\beta$  刺激 bEnd. 3 细胞 p-p38MAPK, cPLA<sub>2</sub>, sPLA<sub>2</sub>, COX-2, PGE<sub>s</sub>, 15-PGDH, p-NF- $\kappa$ B 以及 PGE<sub>2</sub> 的分泌及表达。这为体外模拟产物直接进行体外药效学实验研究提供了有力证据,该方法在尊重中医药理论基础,对改进中药复方剂型,提高临床疗效降低毒副作用、扩大中药用药途径方面起到了指导作用。

### [参考文献]

[1] 宋剑南. 辨证论治的整体调节与中药整体效应分子组[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2006, 8(3): 54.

[2] 柏冬. 制备中药汤剂整体效应分子组的生物模拟技术集成研究[D]. 北京: 中国中医科学院基础所, 2009.

[3] 柏冬, 范斌, 牛晓红, 等. HPLC-系统内标法测定桂枝汤中芍药苷、甘草苷、肉桂酸、桂皮醛和甘草酸[J]. 中草药, 2010, 41(3): 387.

[4] 柏冬, 范斌, 宋剑南. 多波长高效液相色谱法同时测定桂枝汤中 5 种有效成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(1): 1.

[5] 柏冬, 牛晓红, 范斌, 等. 桂枝汤在肠道不同部位的吸收研究[J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(2): 167.

[6] 姜楠, 霍海如, 李兰芳, 等. 桂枝汤有效部位 A 对 IL-1 刺激的大鼠脑微血管内皮细胞前列腺素 E<sub>2</sub> 及其主要信号转导元件的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(11): 1289.

[7] 赵保胜, 刘洪斌, 马悦颖, 等. 桂枝汤含药血清对小鼠巨噬细胞 Toll 样受体 3, 4 型及其下游信号转导通路元件的影响[J]. 中药药理与临床, 2007, 23(3): 1.

[8] 李沧海, 周军, 霍海如, 等. 发热大鼠脑组织 15-羟基前列腺素脱氢酶活性的时相变化及桂枝汤的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(1): 22.

[9] Busbridge N J, Dascombe M J, Tilders F J, et al. Central activation of thermogenesis and fever by interleukin-1 $\beta$  and interleukin-1 $\alpha$  involves different mechanisms[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1989, 162(2): 591.

[10] 郭建友, 马悦颖, 杨元宵, 等. 白细胞介素 1 $\beta$  刺激脑微血管内皮细胞内 15-羟基前列腺素脱氢酶的经时变化[J]. 医学研究生学报, 2006, 19(4): 330.

[11] 郭建友, 杨元宵, 赵保胜, 等. 桂皮醇对 IL-1 刺激脑微血管内皮细胞 COX 活性及 PGE<sub>2</sub> 释放的影响[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(8): 596.

[12] Guo J Y, Huo H R, Zhao B S, et al. Effect of 3-Phenyl-2-Propene-1-ol on PGE<sub>2</sub> release from rat cerebral microvascular endothelial cells stimulated by IL-1 $\beta$  [J]. Am J Chin Med, 2006, 34(4): 685.

[责任编辑 聂淑琴]