

• 药理 •

桂皮醛解热作用及机制的实验研究

马悦颖¹, 李沧海², 郭建友^{1,3}, 赵保胜¹, 李兰芳¹, 郭淑英¹, 隋峰¹, 霍海如^{1*}, 姜廷良¹

(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. 中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700; 3. 中国科学院心理研究所, 北京 100101)

[摘要] 目的: 探讨桂皮醛解热作用及其作用机制。方法: 采用酵母诱致大鼠发热模型和白细胞介素-1 β (IL-1 β) 刺激小鼠脑微血管内皮细胞(bEnd. 3)作为实验体系, 采用酶联免疫法(ELISA)测定致热大鼠下丘脑组织及 bEnd. 3 细胞上清液中前列腺素 E₂(PGE₂) 含量。结果: 桂皮醛能有效抑制酵母所致大鼠发热反应, 显著降低发热大鼠下丘脑 PGE₂ 含量, 亦能明显抑制 IL-1 β 刺激 bEnd. 3 细胞 PGE₂ 的释放。结论: 桂皮醛具有明显的解热作用, 其解热机制可能与影响 PGE₂ 含量有关。

[关键词] 桂皮醛; 解热; 前列腺素 E₂; 下丘脑; 脑微血管内皮细胞

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)04-0022-04

Study on Antipyretic Effect and Its Mechanism of Cinnamaldehyde

MA Yue-ying¹, LI Cang-hai², GUO Jian-you^{1,3}, ZHAO Bao-sheng¹, LI Lanfang¹,
GUO Shu-ying¹, SUI Feng¹, HUO Hai-ru^{1*}, JIANG Ting-liang¹

(1. Tang Center for Herbal Medicine Research, Institute of Chinese Materia Medica,
China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Medical Experimental Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

3. Institute of Psychology Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the antipyretic effect and its mechanism of cinnamaldehyde. **Methods:** The rat febrile models induced by injecting fresh yeast subcutaneously and the mouse cerebral microvascular endothelial cells (bEnd. 3) stimulated by IL-1 β were adopted in the experiment. The contents of PGE₂ in the hypothalamus and in conditioned media of bEnd. 3 stimulated by IL-1 β were measured by ELISA, respectively. **Results:** Cinnamaldehyde showed marked antipyretic effect on the yeast-induced fever, and remarkably decreased the contents of PGE₂ in the hypothalamus of febrile rats and in the conditioned media of bEnd. 3 induced by IL-1 β . **Conclusions:** Cinnamaldehyde has obvious antipyretic effect, which might be related with the interfering the content of PGE₂.

[Key words] Cinnamaldehyde; pyretolysis; prostaglandin E₂; hypothalamus; cerebral microvascular endothelial cell

桂枝汤是治疗太阳中风的主方, 能解肌发表, 调和营卫, 用于外感伤寒表虚证。长期以来, 本课题组

对桂枝汤功效的现代研究发现, 其具有较好的解热作用^[1-3]; 进一步分离提取出的解热有效部位 A(Fr. A), 药理试验证明可通过影响发热信号传导通路上关键酶的活性和水平, 对体温有双向调节作用^[4,5]。化学研究表明, 桂皮醛在 Fr. A 组分中占 62.51%。PGE₂ 是目前发热机制学说中最重要的中枢介质, 已获得广泛的实验支持^[6]。近年来研究表明, 外周炎

[收稿日期] 2007-01-11

[基金项目] 国家自然科学基金资助课题(30572358)

[通讯作者] * 霍海如, Tel: (010) 64041008; Fax: (010) 64041008;
Email: huohr@yahoo.com.cn

症预激因子主要是通过刺激脑血管内皮细胞产生 PGE₂, 进入中枢完成信息输递, 引起发热^[7]。因此, 本实验主要考察了桂皮醛对大鼠酵母性发热的抑制作用及其对下丘脑 PGE₂ 含量的影响; 选择 IL-1 β 刺激 bEnd. 3 细胞为实验体系, 考察了桂皮醛对 PGE₂ 释放的影响, 以期验证桂皮醛为 Fr. A 中主要有效成分, 进一步探讨其解热作用机理。

1 材料

1.1 药物和试剂 桂皮醛(化学纯, 北京旭东化工厂, 批号 000313); 阿司匹林肠溶片(陕西白鹿制药股份公司, 批号 20050521); 鲜酵母(河北马利食品有限公司, 批号 060211); IL-1 β (PEPROTICH 产品); DMEM 高糖培养基(Hyclone); 标准小牛血清(Hyclone); PGE₂ 含量 ELISA 测定试剂盒(苏州大学血栓室)。

1.2 动物 Wistar 大鼠, δ 体重(160~180)g, 军事医学科学院实验动物中心提供, 合格证编号 SCXK-(军)2002-0001。

1.3 细胞株 小鼠脑微血管内皮细胞株 bEnd. 3(来源于美国 ATCC, 复旦大学上海医学院生理病理学系金惠铭教授惠赠)。

1.4 主要仪器 WMY-01 型数字温度计(上海医用仪表厂); 离心机(SORVALL SUPPER T21); CO₂ 培养箱(HERAEUS 公司出品); 倒置生物显微镜(OLYMPUS); MODEL550 酶标仪(美国 BIO-RAD)。

2 方法

2.1 桂皮醛对酵母致热大鼠体温的影响^[8] 大鼠于室温为(22 \pm 1)℃的实验室适应 3 d, 每日适应性测肛温 2 次, 连续 2 d。选取基础体温(37.5 \pm 0.5)℃的大鼠, 背部皮下注射 20% 鲜酵母悬液 10 mL \cdot kg⁻¹。致热 3.5 h 后, 选取体温升高 1℃以上者, 随机分为 5 组(分组见表 1), 各组大鼠灌胃给药, 1 h 后重复给药 1 次, 剂量同前。于第 1 次给药后 1 h 和 2 h 分别测量体温, 并计算体温升高差值 ΔT (药后体温值-基础体温值)。于最后 1 次测肛温后, 立即将动物快速断头取脑, 干冰速冻, 于-20℃冻存, 备作下丘脑 PGE₂ 含量测定。

2.2 下丘脑 PGE₂ 含量测定 取冷冻脑组织, 分离下丘脑约 30 mg 置于玻璃匀浆器中, 加生理盐水 2.0 mL, 研磨制成匀浆, 4℃ 3 000 r/min 离心 15 min 后吸取上清, 以 ELISA 法测定 PGE₂ 含量。按照试剂盒的操作步骤进行, 酶标仪上于 490 nm 波长测定光密度值, 以 pg \cdot mg⁻¹ 组织湿重表示其含量。按下列公式

计算对下丘脑 PGE₂ 抑制率(%)。

抑制率(%) = (模型组 PGE₂ 含量 - 给药组 PGE₂ 含量) / (模型组下丘脑 PGE₂ 含量 - 正常组下丘脑 PGE₂ 含量) \times 100%。

2.3 桂皮醛对 IL-1 β 刺激 bEnd. 3 细胞释放 PGE₂ 的影响

2.3.1 细胞培养 bEnd. 3 细胞置于含 10% 小牛血清、青霉素和链霉素各 100 U \cdot mL⁻¹ 的 DMEM 高糖培养基中, 在 37℃, 5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱中常规培养。经 0.25% 胰酶-0.03% EDTA 的消化液分散传代, 取对数生长期细胞用于实验。

2.3.2 bEnd. 3 细胞培养液中的 PGE₂ 含量测定 取对数生长期 bEnd. 3 细胞, 稀释成 1 \times 10⁵ \cdot mL⁻¹, 接种于 96 孔板中, 180 μ L/孔。置于 5% 的 CO₂ 培养箱中继续培养 24 h 后, 加入桂皮醛 10 μ L/孔, (终浓度分别为 12.5, 25, 50, 100, 200 mg \cdot L⁻¹), 于药后 4 h 加入终浓度为 30 ng \cdot mL⁻¹ 的 IL-1 β 刺激, 12 h 后收集细胞上清液, 备测 PGE₂。同时以未加药物和 IL-1 β 刺激的细胞作为正常对照组, 以加 IL-1 β 刺激未加药物的细胞作为模型对照组。以 ELISA 法测定细胞上清液中的 PGE₂ 含量, 并计算其抑制率(方法同 2.2), 以 Bliss 法求出桂皮醛抑制 PGE₂ 释放的 IC₅₀。

2.4 统计学处理 所有的实验数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 各组间均数比较用 *t* 检验进行统计分析, 以 *P* < 0.05 为具有显著性意义。

3 结果

3.1 桂皮醛对酵母致热大鼠体温的影响 见表 1。桂皮醛大、中剂量组在给药后 1, 2 h 与模型对照组比较, 出现显著的抑制体温升高作用(*P* < 0.01)。

3.2 桂皮醛对酵母致热大鼠下丘脑 PGE₂ 含量的影响 桂皮醛能明显抑制下丘脑中 PGE₂ 含量的升高(*P* < 0.05), 以桂皮醛组大鼠下丘脑 PGE₂ 含量同其发热高峰作直线相关分析, 二者呈正相关(*r* = 0.875 8, *P* < 0.001)。见表 2。

3.3 桂皮醛对 IL-1 β 刺激 bEnd. 3 细胞释放 PGE₂ 的影响 见表 3。IL-1 β 刺激后 bEnd. 3 的培养液中的 PGE₂ 的含量显著升高, 与正常对照组比较有显著差异(*P* < 0.05); 与模型对照组相比, 桂皮醛组(25, 50, 100, 200 mg \cdot L⁻¹) PGE₂ 释放明显下降(*P* < 0.05), 其抑制 bEnd. 3 释放 PGE₂ 的 IC₅₀ 为 50 mg \cdot L⁻¹。

表 1 桂皮醛对酵母致热大鼠体温的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (mg·kg ⁻¹)	基础体温 (℃)	ΔT (℃)		
			造模后 3.5 h	药后 1 h	药后 2 h
正常对照组	—	37.33 ± 0.21	0.15 ± 0.32 ²⁾	0.11 ± 0.23 ²⁾	0.12 ± 0.20 ²⁾
模型对照组	—	37.41 ± 0.34	1.64 ± 0.38	2.33 ± 0.38	2.19 ± 0.31
阿司匹林组	300	37.32 ± 0.25	1.57 ± 0.32	0.71 ± 0.26 ²⁾	0.55 ± 0.41 ²⁾
桂皮醛组	100	37.30 ± 0.15	1.55 ± 0.25	2.15 ± 0.25	2.03 ± 0.14
	200	37.21 ± 0.19	1.61 ± 0.32	1.89 ± 0.17 ²⁾	1.79 ± 0.32 ²⁾
	400	37.39 ± 0.27	1.63 ± 0.18	1.60 ± 0.34 ²⁾	1.46 ± 0.32 ²⁾

注:与模型对照组比较:¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (下同)

表 2 桂皮醛对酵母致热大鼠下丘脑 PGE₂ 含量的影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (mg·kg ⁻¹)	PGE ₂ (pg·mg ⁻¹)	抑制率 (%)
正常对照组	—	10.99 ± 3.75 ²⁾	—
模型对照组	—	26.98 ± 3.99	—
阿司匹林组	300	14.35 ± 3.70 ²⁾	77.43
桂皮醛组	100	24.53 ± 3.86	9.64
	200	21.93 ± 2.53 ¹⁾	27.01
	400	20.45 ± 2.34 ¹⁾	36.88

表 3 桂皮醛对 IL-1 β 刺激后 bEnd.3 培养液中 PGE₂ 含量的影响
($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 (mg·L ⁻¹)	PGE ₂ (pg·mL ⁻¹)	抑制率 (%)
正常对照组	—	3.78 ± 0.41 ²⁾	—
模型对照组	—	7.57 ± 1.59	—
桂皮醛组	12.5	6.55 ± 1.07	25.50
	25	6.02 ± 0.86 ¹⁾	38.75
	50	5.55 ± 1.18 ¹⁾	50.50
	100	5.07 ± 1.12 ²⁾	62.50
	200	4.53 ± 1.01 ²⁾	76.00

4 讨论

现在一般认为,体温调节中枢在下丘脑,PGE₂ 是目前发热机制学说中最重要的中枢介质^[9]。在外源性致热物质或/及内生致热原条件性地诱发单相或多相发热反应过程中,E 族前列腺素(主要为 PGE₂)的介导不可或缺^[10],为介导发热的中枢终端介质。本实验通过测定下丘脑组织中 PGE₂ 含量,结果显示大鼠酵母性发热时体温上升与下丘脑中 PGE₂ 浓度升高呈正相关($r = 0.8758, P < 0.001$)。同时在实验中,桂皮醛组下丘脑 PGE₂ 含量与模型组比较有显著降低($P < 0.05$),这些结果进一步验证了

桂皮醛为桂枝汤解热作用的主要有效成分,其解热作用机理可能与对下丘脑中 PGE₂ 升高的抑制有关。

目前,关于外源性致热物质(如病原菌及其产物)和内生致热原(如 IL-1、IL-6、TNF 及 TNF 等)如何引起脑内 PGE₂ 升高,一直存在争议^[11]。有报道脑血管内皮细胞不但不是该过程的“屏障”,而是外周致热原向中枢信息传递的主要“中介”,即外周炎症预激因子通过刺激脑血管内皮细胞产生的 PGE₂,进入中枢完成信息传递,引起发热^[12]。而脑血管内皮细胞源性 PGE₂ 通过载体辅助或其他形式进入中枢,是致热原由外周向中枢信号传递的主要形式^[13]。在外源性致热物质刺激外周免疫细胞产生的内生致热原中,IL-1 β 占有相当重要的地位^[14]。因此,选择炎症预激因子 IL-1 β 刺激脑血管内皮细胞组成体外评价体系,是一个较为合适的模型。本实验显示,桂皮醛干预 IL-1 β 刺激脑血管内皮细胞释放 PGE₂ 的作用强弱与整体动物实验解热药效存在较高的一致性,也为该系统用于评价桂皮醛解热作用提供了理论基础。

综上所述,本文从体内和体外实验角度对桂皮醛解热作用及其机制进行了探讨,进一步证明了具有良好解热作用的桂皮醛为桂枝汤解热作用的主要有效成分之一,此研究也为桂枝汤和桂皮醛制剂进一步深度开发利用提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] 富杭育,周爱香,郭淑英,等.桂枝汤对白细胞介素 1、干扰素、肿瘤坏死因子所致发热的作用[J].中药药理与临床,1994,3:1-3.
- [2] 李沧海,周军,霍海如,等.桂枝汤对发热及低体温大鼠下丘脑可溶性一氧化氮合酶的影响[J].中国实验方剂学杂志,2003,9(4):31-33.

- [3] 周军, 方素萍, 齐云, 等. 桂枝汤对大鼠佐剂性关节炎的防治作用研究[J]. 中药药理与临床, 2000, 16(6): 1-3.
- [4] 谭余庆, 李晓芹, 霍海如, 等. 桂枝汤有效部位 A 对体温的双向调节作用及其机理研究——对大鼠下丘脑 PGE₂ 含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 1998, 4(2): 11-13.
- [5] 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 E₂ 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): 1289-1292.
- [6] 王迪浚. 病理生理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994. 1276-1278.
- [7] Matsumura K, Kobayashi S. Signaling the brain in inflammation: the role of endothelial cells [J]. Front Bioscience, 2004, 9: 2819-2826.
- [8] 李沧海, 周军, 霍海如, 等. 桂枝汤及其活性成分对 EP₃ 受体激动剂诱导发热的影响[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(11): 1056-1060.
- [9] Coceani F, Akarsu E. Prostaglandin E₂ in the pathogenesis of fever: an update[J]. Ann NY Acad Sci, 1998, 850: 76-82.
- [10] Engblom D, Saha S, Engstrom L, *et al.* Microsomal prostaglandin E synthase-1 is the central switch during immune induced pyresis[J]. Nat Neurosci, 2003, 6: 1137-1138.
- [11] Blatteis CM, Li SX, Li ZH, *et al.* Cytokines, PGE₂ and endotoxic fever: a re assessment[J]. Prostaglandins & Other Lipid Mediators, 2005, 76: 1-18.
- [12] Romanovsky AA, Almeida MC, Aronoff DM, *et al.* Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions[J]. Frontiers in Bioscience, 2005, 10: 2193-2216.
- [13] Kis B, Isse T, Snipes JA, *et al.* Effects of LPS stimulation on the expression of prostaglandin carriers in the cells of the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers[J]. J Appl Physiol, 2006, 100: 1392-1399.
- [14] Deak T, Bellamy C, Bordner KA. Protracted increases in core body temperature and interleukin 1 following acute administration of lipopolysaccharide: implications for the stress response[J]. Physiol Behav, 2005, 85: 296-307.