

# 桂枝汤主要成分对 PGE<sub>2</sub> 刺激的胚胎大鼠 下丘脑神经 cAMP-PKA 的影响\*

刘 敏<sup>1,2</sup>, 谭余庆<sup>1\*</sup>, 黄敬耀<sup>2</sup>, 霍海如<sup>1</sup>, 李兰芳<sup>1</sup>, 郭淑英<sup>1</sup>

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 江西中医学院, 江西 南昌 330006)

**[摘要]** 目的: cAMP-PKA(环磷酸腺苷-蛋白激酶 A)是细胞内非常重要的信号转导途径。本实验研究了桂枝汤四个主要组成成分, 桂皮酸、桂皮醛、芍药苷及甘草次酸, 不同组合对 PGE<sub>2</sub>(前列腺素 E<sub>2</sub>)刺激的胚胎大鼠下丘脑神经细胞内 cAMP-PKA 水平的影响。方法: 用放射法测定不同组合成分作用的细胞 cAMP 含量和 PKA 活性。结果: 各成分作用时, 桂皮酸(0.625μg/mL)、桂皮醛(10 0.625μg/mL)、芍药苷(0.625μg/mL)和甘草次酸(10μg/mL)对细胞 cAMP 含量或 PKA 活性有显著的降低作用; 在 27 组不同成分的组合中, 有 19 组对细胞 cAMP 含量、16 组对细胞 PKA 活性有显著的降低作用。结论: 桂皮酸、桂皮醛、芍药苷和甘草次酸的不同浓度组合可能与桂枝汤体温双向调节作用的物质基础有关, 其作用可能与调节 cAMP-PKA 通路有一定的关系。

**[关键词]** 桂枝汤; 胚胎大鼠; 下丘脑神经细胞; 前列腺素 E<sub>2</sub>; 环磷酸腺苷

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2006)02-0035-04

桂皮醛、桂皮酸、芍药苷和甘草次酸是桂枝汤提取物中的四个主要组成成分, 前期实验已证明这四个成分的不同组合可不同程度地降低大鼠脑微血管内皮细胞因 II-1 刺激而过量分泌的 PGE<sub>2</sub>。PGE<sub>2</sub> 是中枢最重要的发热介质之一<sup>[1]</sup>, 它可以通过与细胞表面专一受体结合, 进一步影响下一级神经细胞, 触发多条胞内信号转导通路, 促进神经递质、神经调质等的释放, 进而使体温调定点上移, 引起发热<sup>[2-3]</sup>。其中 cAMP-PKA 通路起着关键的作用<sup>[4]</sup>。本次实验在前期实验基础上, 以 PGE<sub>2</sub> 刺激的胚胎大鼠下丘脑神经细胞为对象, 探讨该四个成分的不同组合对 cAMP-PKA 信号通路中 cAMP 含量和 PKA 活性的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 药物与试剂** DMEM 高糖培养基、胰蛋白酶(Gibco); 新生牛血清(PAA); 胰岛素、多聚-L-赖氨酸(Sigma); 桂皮醛(国产, 95%); 甘草次酸对照品、芍药苷对照品(中国药品生物制品检定所); 桂皮酸(京司, AR); PGE<sub>2</sub>(Cayman, ≥99%); <sup>125</sup>I cAMP 放免试剂

盒(上海中医药大学); <sup>32</sup>P-PKA 放免试剂盒(Promega), 其它试剂均为市售分析纯。

**1.2 仪器** CO<sub>2</sub> 培养箱; 倒置生物显微镜; 医用净化工作台; SN-695B 型智能放免 γ 测量仪; 放免液闪记数仪(Bekmah)。

**1.3 胚胎大鼠下丘脑神经细胞的培养** 实验参照 Wilkinson 等<sup>[5]</sup>的方法并稍作改良。选孕 17~18d SD 胚胎大鼠(中国医学科学院实验动物中心提供), 分离下丘脑(视交叉-乳头体为前后界, 左右下丘脑沟为侧界, 深约 0.5~1mm), 经冰冷的 PBS 冲洗后, 仔细剪碎下丘脑组织成 1mm<sup>3</sup> 的小块。组织块中加入 0.125% 胰蛋白酶, 于 37℃ 水浴中消化 20min, 其间不断振荡。再用玻璃吸管轻柔吹打组织团块直至分散成单细胞悬液, 加入 DMEM 种植培养液(DMEM, 20% 新生牛血清, 14U/mL 胰岛素, 100U/mL 青霉素, 100μg/mL 链霉素)终止消化。1250rpm × 8min 离心, 弃上清。将沉淀悬浮于 DMEM 种植培养液中, 轻轻吹打后, 经孔径 145μm 尼龙滤网过滤, 收集滤液。经台盼兰常规染色的悬浮液滴置于白细胞计数板上镜检, 确定悬浮细胞的细胞密度和存活率(一般为 70%~80%), 最后用种植培养液稀释, 使悬浮液终浓度为 (4~5) × 10<sup>5</sup> 个细胞/mL, 并将其种植于预先铺有多聚-L-赖氨酸(50μg/mL, 用 PBS 配制)的 48 孔培养

**[收稿日期]** 2005-01-19

**[基金项目]** 国家中医药管理局科研课题(No: 02-03zp60)

**[通讯作者]** 谭余庆, Tel: (010) 64011599

板中, 300 $\mu$ L/孔。培养板置 CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育, 4h 后各孔补入种植液 200 $\mu$ L/孔。第 3 天吸出种植培养液并换上饲养培养液(种植培养液中新生牛血清降至 10% 即得) 并加入阿糖胞苷(3mg/L) 作用 24~ 48h, 以抑制神经胶质细胞的生长。之后每周换液 2 次, 培养后的下丘脑神经细胞在接种后 7~ 9d 即可用于实验。

**1.4 不同药物组合浓度的确定** 不同药物的组合方式见文献<sup>[6]</sup> 中相关内容。

**1.5 PGE<sub>2</sub> 造模浓度和造模时间的确定** 将培养的第 8d 下丘脑神经细胞孔分为 12 组, 每组 4 个复孔, 分别为 10min 空白对照组及模型组、30min 空白对照组及模型组、60min 空白对照组及模型组、90min 空白对照组及模型组、120min 空白对照组及模型组和 180min 空白对照组及模型组。加入 PGE<sub>2</sub>(终浓度<sup>[7]</sup> 为 10ng/mL) 后, 根据分组情况, 在各个不同时间点将各孔弃上清液, 立刻用 PBS 洗 2 遍, 每孔加入含 0.4% EDTA 磷酸缓冲液 0.5mL, 然后将培养板放入 - 80 $^{\circ}$ C 低温冰箱冻存, 以终止细胞内的生化反应。隔日后取出细胞培养板, 用超声细胞裂解仪超声细胞悬液 5s  $\times$  3 次, 3000rpm  $\times$  15min 离心, 收集上清液, 按试剂盒说明书步骤用放免法测定 cAMP 含量。

**1.6 环-磷酸腺苷(cAMP) 的提取和测定** 将培养第 8d 下丘脑神经细胞按培养孔分成 4 批, 共 42 个组, 每组设 4 个复孔, 其中每批都设空白对照组、模型组及不同药物组。药物组包括桂皮酸、桂皮醛、甘草次酸和芍药苷根据正交设计表 L<sub>27</sub>(3<sup>13</sup>) 组合成的 27 组成分组合, 以及 10 $\mu$ g/mL 或 0.625 $\mu$ g/mL 浓度的四个单一成分。各个成分组合加入相应的细胞孔作用 3h 后, 除空白对照组外各组都加入 PGE<sub>2</sub>(10ng/mL) 刺激(因组合中第 1 组恰好是 4 个成分浓度都为 0 的组合, 为避免重复, 故将第 1 批细胞孔中成分组合第 1 组作为此批细胞的模型组)。刺激 1h 后吸去培养液, 同上方方法测定 cAMP 含量。

**1.7 蛋白激酶 A(PKA) 的提取和活性测定** 同上方方法刺激细胞, 刺激后 1h 后吸去培养液, 立刻用 PBS 洗 2 遍, 每孔加提取缓冲液 0.4mL(每 1000mL 中含 25mM Tris-HCl(pH7.4), 0.5mM EDTA, 0.5mM EGTA, 0.05% Triton X-100, 10mM  $\beta$ -巯基乙醇, 1 $\mu$ g/mL 亮肽素, 1 $\mu$ g/mL 抑肽酶, 4 $^{\circ}$ C 保存。使用前每 100mL 提取缓冲液中加入 0.5mL PMSF 保存液), 然后将培养板放入 - 80 $^{\circ}$ C 低温冰箱冻存。

第 3d 取出细胞培养板, 按试剂盒说明书步骤进行 PKA 活性测定和蛋白含量测定。

**1.8 统计学处理** 所有实验数据均用( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 显著性差异比较采用 *t* 检验。

## 2 结果

**2.1 一般细胞形态学观察** 分散的下丘脑神经细胞 3h 后贴壁, 多呈圆形或椭圆形, 折光性较强; 12h 时细胞聚集成簇, 仍有细胞分散生长; 24h 时细胞变形为三角形或多角形, 个别细胞有突起生长; 36h 时细胞长大, 轮廓清楚, 有突起生长; 48h 时可见胞体发出 1~ 数支细小的突起; 3d 后细胞的突起生长速度加快; 阿糖胞苷作用后, 神经细胞背景明显清晰, 随着培养时间的延长, 神经细胞的突起纵横交错; 6d 时细胞簇之间可有较粗的突轴连接, 神经细胞轮廓清晰, 胞体丰满呈圆形或梭形, 有较强的折光性, 在胞体周围有明亮的光晕; 到 7d 时, 神经细胞的胞体和突起长度均达高峰; 10d 后, 胞内开始出现空泡, 细胞周的光晕消失, 突起逐渐萎缩。

**2.2 PGE<sub>2</sub> 造模浓度和造模时间的确定** 试剂盒测定结果发现(图 1), PGE<sub>2</sub> 刺激 10min 和 60min 后, 两组的 cAMP 浓度与各自的空白对照组比较均有显著性差异( $P < 0.05$ ), 根据文献[7] 和课题组前期工作的结果, 最终将 PGE<sub>2</sub> 的造模浓度确定为 10ng/mL, 造模时间确定为 60min。

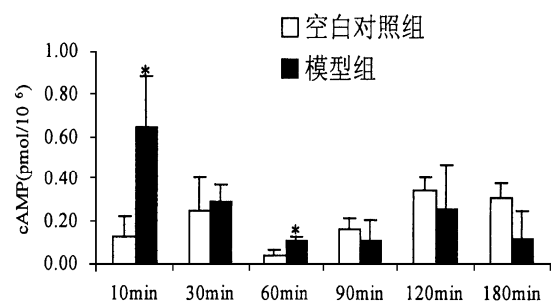


图 1 PGE<sub>2</sub> 造模浓度和造模时间的确定

**2.3 桂枝汤四成分不同组合对 PGE<sub>2</sub> 刺激的胚胎大鼠下丘脑神经细胞产生 cAMP 的影响** 通过 cAMP 试剂盒检测, 结果显示(图 2~ 5), 当加入 10ng/mL PGE<sub>2</sub> 后, 胚胎大鼠下丘脑神经细胞内 cAMP 含量明显高于空白对照组, 四成分的不同组合中第 2、3、4、5、7、8、9、10、12、16、17、18、20、22、23、24、25、26、27 组与模型组比较, cAMP 含量显著下降( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。这些组合都能显著降低因 PGE<sub>2</sub> 刺激而导致的 cAMP 含量升高。在单个成分中, 桂皮酸(10、0.625 $\mu$ g/mL)、桂皮醛(0.625 $\mu$ g/mL)、芍药苷

(0.625 $\mu$ g/mL) 和甘草次酸(10 $\mu$ g/mL) 对细胞 cAMP 含量有显著的降低作用( $P < 0.05$ )。以上实验说明不同浓度的成分组合, 对胚胎大鼠下丘脑神经细胞 cAMP 含量的影响要优于单一成分。

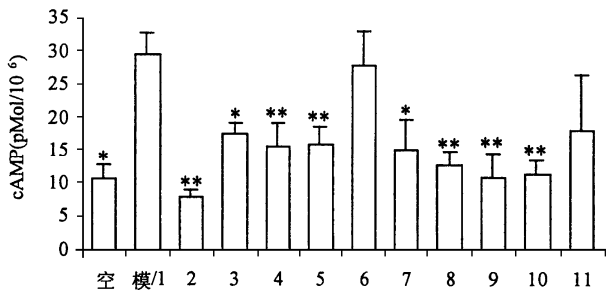


图 2 组合 1~ 11 对 PGE<sub>2</sub> 刺激的胚胎大鼠下丘脑神经元 cAMP 含量的影响

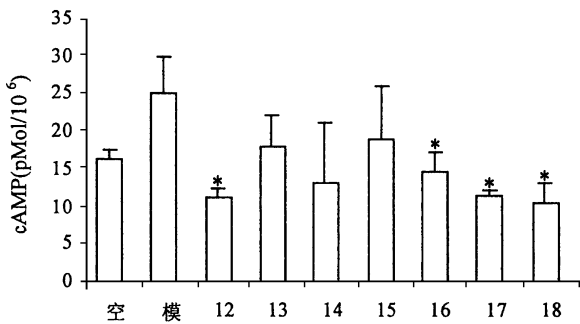


图 3 组合 12~ 18 对 PGE<sub>2</sub> 刺激的胚胎大鼠下丘脑神经元 cAMP 含量的影响

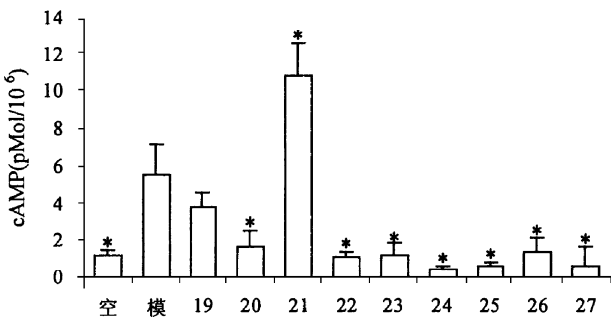


图 4 组合 19~ 27 对 PGE<sub>2</sub> 刺激的胚胎大鼠下丘脑神经元 cAMP 含量的影响

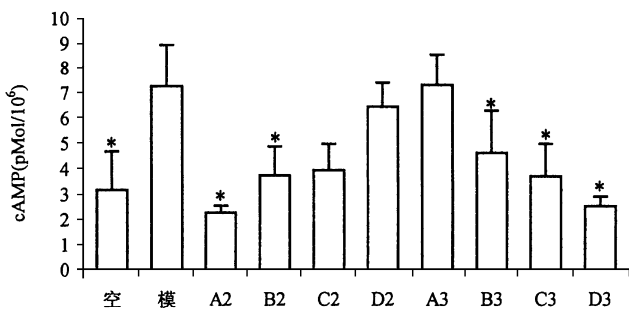


图 5 各成分单独作用对 PGE<sub>2</sub> 刺激的胚胎大鼠下丘脑神经元 cAMP 含量的影响

#### 2.4 桂枝汤四成份不同药物组合对 PGE<sub>2</sub> 刺激的胚胎大鼠下丘脑神经细胞 PKA 活性的影响 通过

PKA 试剂盒检测结果的分析(见图 6~ 9), 发现加入 PGE<sub>2</sub> 刺激的模型组细胞的 PKA 活性明显高于正常组细胞。四成分的不同组合加入细胞培养体系后, 第 2 3 4 6 7 8 9 10 11 16 18 21 22 23 24 25 26 相对模型组, PKA 活性都出现成统计学意义的下降( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。这些组合都能降低因 PGE<sub>2</sub> 刺激而产生 PKA 的活性升高。在单个成分中, 桂皮酸(0.625 $\mu$ g/mL)、桂皮醛(10 $\mu$ g/mL、0.625 $\mu$ g/mL), 芍药苷(0.625 $\mu$ g/mL) 和甘草次酸(10 $\mu$ g/mL) 对细胞 PKA 活性有显著的降低作用( $P < 0.05$ )。以上实验说明不同浓度的成分组合, 对胚胎大鼠下丘脑神经细胞内 PKA 活性的影响要优于单一成分。

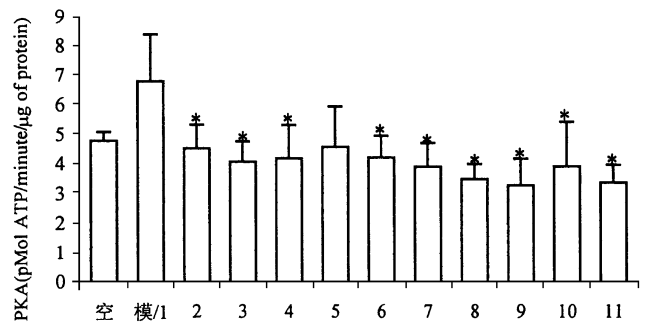


图 6 组合 1~ 11 对 PGE<sub>2</sub> 刺激的胚胎大鼠下丘脑神经元 PKA 活性的影响

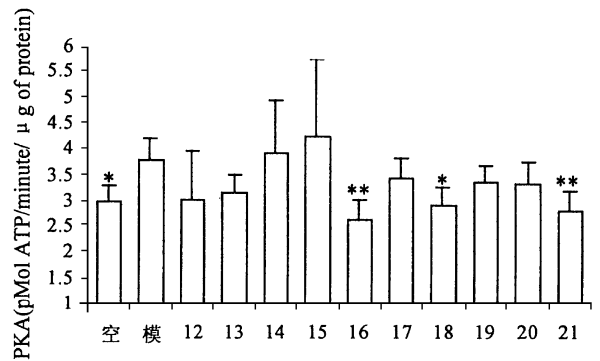


图 7 组合 12~ 21 对 PGE<sub>2</sub> 刺激的胚胎大鼠下丘脑神经元 PKA 活性的影响

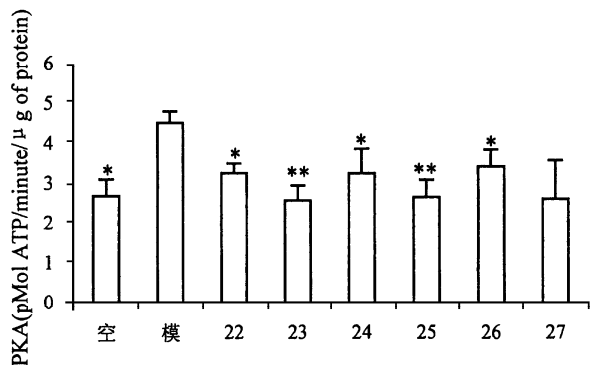


图 8 组合 22~ 27 对 PGE<sub>2</sub> 刺激的胚胎大鼠下丘脑神经元 PKA 活性的影响

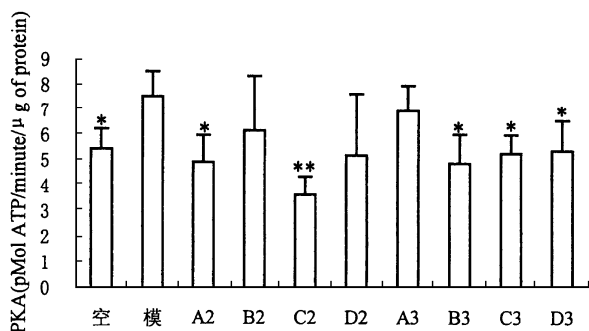


图 9 各成分单独作用对 PGE<sub>2</sub> 刺激的胚胎大鼠下丘脑神经元 PKA 活性的影响

注:与模型组比较,\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。A: 甘草次酸; B: 桂皮酸; C: 桂皮醛; D: 芍药苷。浓度 1: 0 $\mu$ g/mL, 浓度 2: 10 $\mu$ g/mL, 浓度 3: 0.625 $\mu$ g/mL。

模型组/1: A1B1C1D1; 2: A1B1C2D2; 3: A1B1C3D3; 4: A1B2C1D2; 5: A1B2C2D3; 6: A1B2C3D1; 7: A1B3C1D3; 8: A1B3C2D1; 9: A1B3C3D2; 10: A2B1C1D2; 11: A2B1C2D3; 12: A2B1C3D1; 13: A2B2C1D3; 14: A2B2C2D1; 15: A2B2C3D2; 16: A2B3C1D1; 17: A2B3C2D2; 18: A2B3C3D3; 19: A3B1C1D3; 20: A3B1C2D1; 21: A3B1C3D2; 22: A3B2C1D1; 23: A3B2C2D2; 24: A3B2C3D3; 25: A3B3C1D2; 26: A3B3C2D3; 27: A3B3C3D1

### 3 讨论

cAMP 是细胞内重要的第二信使,起着将细胞外刺激信号转化为细胞内各种生理活动的媒介作用,它可与 cAMP 依赖性的蛋白激酶 A (PKA) 的结合亚基结合,使其激活。激活后的 PKA 既可以使细胞内多种蛋白质磷酸化而发挥生物学作用,还可以作用于 cAMP 反应元件结合蛋白,调节基因表达。因此,cAMP-PKA 信号转导途径在细胞内机制中占有非常重要的地位<sup>[8]</sup>。本实验试图通过桂枝汤四个提取成分的不同组合观察对胚胎大鼠下丘脑神经细胞 cAMP-PKA 信号通路的影响。结果显示,桂枝汤提取物中四个主要成分的不同组合能不同程度地降低胚

胎大鼠下丘脑神经细胞因 PGE<sub>2</sub> 刺激而导致的 cAMP-PKA 水平升高,其作用优于此四个单一成分。这一结果表明,桂皮酸、桂皮醛、芍药苷和甘草次酸不同浓度的组合可能与桂枝汤体温双向调节作用的物质基础有关,其作用可能与调节 cAMP-PKA 通路有一定的关系。

### 【参考文献】

- [1] 李楚杰. 发热机制研究的新进展[J]. 中国病理生理杂志, 1990, 6(5): 375-380.
- [2] 谭余庆, 李晓芹, 霍海如, 等. 桂枝汤有效部位 A 对体温双向调节作用及其机理研究—对大鼠下丘脑 PGE<sub>2</sub> 含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 1998, 4(2): 11-13.
- [3] 齐云, 李沧海, 郭淑英, 等. 桂枝汤对体温双向调节作用机理探讨—对发热及低体温大鼠下丘脑 PGE<sub>2</sub> 含量及 COX 活性的影响[J]. 中药药理与临床, 2001, 17(6): 1-3.
- [4] Kammer GM. The adenylate cyclase-cAMP-PKA pathway and regulation of the immune response[J]. Immunol Today, 1988, 9(7-8): 222.
- [5] Wilkinson M, Gibson CJ, Bresslev BH, et al. Hypothalamic neurons in dissociated cell culture[J]. Brain Res, 1974, 82: 129.
- [6] 刘敏, 谭余庆, 姜楠, 等. 桂枝汤四个主要组成成分不同组合对 IL-1 刺激的脑微血管内皮细胞分泌 PGE<sub>2</sub> 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(5): 59.
- [7] Karen S. Mark, William J. Trickler, and Donald W. Miller. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Induces Cyclooxygenase-2 Expression and Prostaglandin Release in Brain Microvessel Endothelial Cells [J]. Pharmacology And Experimental Therapeutics, 2001, 297(3): 1051-1058.
- [8] 李莉, 李正莉, 朱长庚, 等. 谷氨酸和白细胞介素-1 $\beta$  致痫大鼠海马与 cAMP 含量的变化[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2003, 32(6): 582-588.