

桂枝汤四个主要组成成分不同组合对 白细胞介素 1 β 刺激的脑微血管内皮细胞 分泌前列腺素 E₂ 的影响*

刘 敏^{1,2}, 谭余庆¹, 姜 楠¹, 黄敬耀², 霍海如¹, 李兰芳¹, 郭淑英¹

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

摘要:目的: 研究桂枝汤四个主要组成成分不同组合对白细胞介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β) 刺激的大鼠脑微血管内皮细胞分泌前列腺素 E₂(prostaglandin E₂, PGE₂) 的影响。方法: 通过放免法测定这些不同组合成分作用细胞后的上清液 PGE₂ 含量。结果: 组合中有 20 组成分组合能降低因 IL-1 β 刺激而产生的 PGE₂ 含量, 并有统计学意义。结论: 这些成分的组合有可能是桂枝汤有效部位 A 双向调节体温的物质基础。

关键词: 桂枝汤; IL-1 β ; 脑微血管内皮细胞; PGE₂

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2005)05-0059-03

Effects of Different Combinations of Four Components in Guizhi Decoction on IL-1 β Stimulated PGE₂ Secretion of Cerebral Microvascular Endothelial Cell*

LIU Min^{1,2}, TAN Yu-qing¹, JIANG Nan¹, HUANG Jing-yao², HUO Hai-ru¹, LI Lanfang¹, GUO Shu-ying¹

(1 Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China;

2 Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China)

Abstract: Objective: To investigate the effects of different combinations of four components in Guizhi decoction on secretion of prostaglandin E₂(PGE₂) by interleukin 1 β (IL-1 β) stimulation in rats cerebral microvascular endothelial cell (rCMEC). These four components are among the extracted fractions of Guizhi Decoction. Methods: The amounts of PGE₂ were measured by radioimmunoassay method. Results: Twenty of the combinations significantly decreased the excessive secretion of PGE₂ induced by IL-1 β in the supernatant of rCMEC. The results had the statistical signification. Conclusion: The above mentioned combinations might be the substance foundation of the Fr. A of the decoction in its dual-directional thermoregulation.

Key words: Guizhi Decoction; IL-1 β ; Rats cerebral microvascular endothelial cell (rCMEC); PGE₂

血脑屏障是血液和脑实质之间物质交换的屏障, 脑微血管内皮细胞则是构成血脑屏障的重要结构。它可以被血液或其周围组织细胞释放的许多活性物质如 IL-1 TNF 等细胞因子激活、合成并释放 NO, PGE₂, PGF₂, TXA₂ 等活性物质^[1-4]。桂枝汤是张仲景《伤寒论》中的名方, 诸多实验已证明桂枝汤对体温具有双向调节作用。本实验按照正交试验设计方法将桂枝汤的四个主要成分进行不同的组合, 作用于体外培养的大鼠脑微血管内皮细胞, 通过检测其 PGE₂ 含量变化来进一步探讨桂枝汤体温双向调

节的物质基础。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂 M199、胰蛋白酶、胎牛血清、胶原酶(Gibco); ECGF(ROCHE); 肝素钠(常州新华活性材料研究所); MTT(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); rhIL-1 β (北京邦定生物医学公司, 活性单位: 5×10^6 /mg); PGE₂ 放免试剂盒(北京东亚免疫技术研究所), 其它试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器 CO₂ 培养箱; 倒置生物显微镜; 医用净化工作台; 酶标仪; 放免液闪记数仪(Bekman)。

1.3 SD 大鼠脑微血管内皮细胞的培养 培养方法参照 Gordon 等的方法^[5,6], 并略加改进。取 70~80g 雄性 SD 大鼠(由中国医学科学院实验动物中心提

收稿日期: 2004-12-14

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

供), 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 断头, 75% 酒精浸泡数分钟, 无菌条件下分离鼠脑, 在 PBS (NaCl 8.00 g/L, KCl 0.20g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.56g/L, KH_2PO_4 0.2g/L, 三蒸水配制, 0.22 μm 微孔过滤除菌) 中清洗一遍后, 立刻放入含 8% 小牛血清的 M199 冲洗液内, 去除大血管、软脑膜、小脑和大脑髓质, 取大脑皮质。在烧杯中剪碎后, 经玻璃匀浆器匀浆, 收集大小在 75 μm 和 145 μm 中间的血管段。1500r \cdot min⁻¹ 离心 8min。弃上清, 将沉淀悬浮于 0.1% 胶原酶液中, 吹打后, 置 37℃ 水浴中孵育 20min, 再次 1500r \cdot min⁻¹ \times 5min 离心去上清。沉淀用培养液 (M199, 25% 胎牛血清, 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ECGF, 10U/mL 肝素钠, 100U/mL 青链霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NaHCO_3) 悬浮接种于明胶覆盖的培养瓶中, 放入 CO₂ 孵箱中静置 3d, 以后每 2~ 3d 换液 1 次。当细胞长成致密单层, 出现“铺路石”征象后可进行传代培养。

1.4 不同浓度的药物的实验加样 将培养的第 3 代脑微血管内皮细胞消化后, 以 1×10^5 个/mL 密度铺到 96 孔板中, 分别加入含不同浓度的桂皮酸、桂皮醛、芍药苷及甘草次酸的 M199 不完全培养基 (使终浓度分别为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 对照组以 M199 不完全培养基代替, 每组 6 个复孔; 培养箱中培养 2d, 倒置显微镜下观察细胞的存活和生长情况。

1.5 四唑盐比色法 (MTT 法) 检测 将加入药物后培养 48h 的细胞, 每孔加入 100 μg MTT 溶液, 继续培养 4h, 形成紫色结晶, 吸出孔内液体, 加入 200 μL 的 DMSO 溶液, 振荡 10min, 使结晶充分溶解后, 在酶标仪上测定光吸收度, 测定波长为 490nm。实验结果用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间差异的显著性测定采用 *t* 检验。

1.6 不同药物组合对 IL-1 刺激的细胞产生 PGE₂ 的影响 将培养的第 3 代脑微血管内皮细胞消化, 以 1×10^5 个/mL 密度种植在 96 孔板中, 将孔分为 28 组 (在正交表 L₂₇(3¹³) 的基础上加一组空白实验组), 分别加入根据正交实验设计组合成的 27 组药物, 作用 3h 后, 除空白组外各组都加入 IL-1 β (30ng/mL) 刺激 (因第 1 组四个成分的浓度都为 0, 故可同时将其作为模型组)。刺激 24h 后取上清, 用 PGE₂ 放免试剂盒测定各组的 PGE₂ 含量。

2 结果

2.1 一般细胞形态学观察 经原代培养获取的微血管多为由数个或十几个细胞组成的、偶见有较粗或较长的血管片段。倒置显微镜下观察分离的微血

管段管壁光滑清晰, 形态各异, 长短不等呈单枝或多分枝状。混悬液内还有未分离干净的组织碎片及一些血细胞。种植入培养瓶后, 24~ 48h 可见微血管边缘生长的单个内皮细胞, 呈三角形或成长梭形。换液后, 可见大部分微血管片段贴壁, 细胞体积增大, 并逐渐收缩成为细胞团, 2~ 3d 后可见细胞团内细胞有伪足伸出, 并开始分裂增殖。4~ 5d 形成散在细胞群落, 7~ 10d 即可形成多个片状、单层生长的细胞。细胞紧密排列, 互不重叠, 呈单层“卵石样”结构。传代细胞初种时为明亮的圆球形。悬浮于培养液中, 1h 后, 大部分细胞贴壁, 分布均匀。2~ 4h 可见个别细胞变大, 呈扁平状并伸出细小的突起, 24h 细胞大部分展开, 胞体变大。一周后, 细胞增殖成单层片状 (见附图 1 2)。

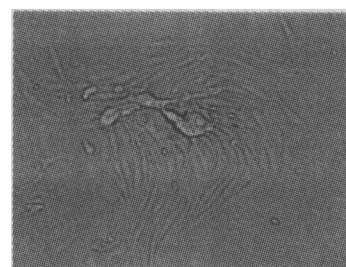


图 1 原代 rCMEC (× 200)

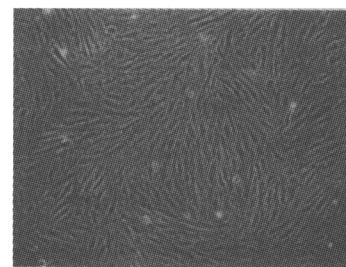


图 2 第三代 rCMEC (× 200)

2.2 不同浓度的桂皮酸、桂皮醛、芍药苷及甘草次酸对脑微血管内皮细胞存活的影响 表 1 显示不同浓度的桂皮酸、桂皮醛、芍药苷及甘草次酸对脑微血管内皮细胞的作用。实验结果表明, 桂皮酸、桂皮醛、芍药苷及甘草次酸终浓度为 0~ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的剂量组细胞存活率与空白对照组比较没有统计学意义, 即此浓度范围对细胞没有显著毒性, 综合文献报道以及体外实验给药剂量情况, 决定选用 3 个浓度水平即 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 开展正交实验设计研究, 用 M199 稀释成合适浓度的药物, 直接加入到细胞培养液中, 并注意调节细胞培养液 pH 值 7~ 7.4。

表 1 四成分对脑微血管内皮细胞的作用(OD 值)($\bar{x} \pm s, n=6$)

浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	桂皮酸	桂皮醛	芍药苷	甘草次酸
40	0.062 \pm 0.020	0.058 \pm 0.021	0.101 \pm 0.014 ²⁾	0.104 \pm 0.010 ¹⁾
20	0.063 \pm 0.008	0.094 \pm 0.009	0.108 \pm 0.007 ²⁾	0.119 \pm 0.012
10	0.067 \pm 0.008	0.120 \pm 0.009	0.116 \pm 0.005	0.113 \pm 0.008
5.0	0.068 \pm 0.015	0.121 \pm 0.006	0.119 \pm 0.017	0.118 \pm 0.004
2.5	0.078 \pm 0.020	0.116 \pm 0.018	0.118 \pm 0.004	0.120 \pm 0.009
1.25	0.094 \pm 0.017	0.110 \pm 0.009	0.115 \pm 0.012	0.122 \pm 0.004
0.625	0.088 \pm 0.019	0.111 \pm 0.009	0.119 \pm 0.003	0.120 \pm 0.005
对照组	0.096 \pm 0.020	0.092 \pm 0.022	0.122 \pm 0.004	0.119 \pm 0.006

注:与对照组比较,¹⁾: $P < 0.05$,²⁾: $P < 0.01$

表 2 不同药物组合对 30ng/mL IL-1 β 刺激的细胞产生 PGE₂ 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	组方	样本数	PGE ₂ 含量(ng/mL)
空白组		4	5.075 \pm 0.043 ¹⁾
I/模型组	A ₁ B ₁ C ₁ D ₁	4	5.209 \pm 0.025
2	A ₁ B ₁ C ₂ D ₂	3	5.081 \pm 0.040 ¹⁾
3	A ₁ B ₁ C ₃ D ₃	3	5.122 \pm 0.071
4	A ₁ B ₂ C ₁ D ₂	3	5.117 \pm 0.066
5	A ₁ B ₂ C ₂ D ₃	3	5.107 \pm 0.066
6	A ₁ B ₂ C ₃ D ₁	3	5.032 \pm 0.060 ¹⁾
7	A ₁ B ₃ C ₁ D ₃	3	5.104 \pm 0.096
8	A ₁ B ₃ C ₂ D ₁	3	4.963 \pm 0.067 ²⁾
9	A ₁ B ₃ C ₃ D ₂	3	4.963 \pm 0.116
10	A ₂ B ₁ C ₁ D ₂	3	5.010 \pm 0.083 ¹⁾
11	A ₂ B ₁ C ₂ D ₃	3	4.946 \pm 0.059 ²⁾
12	A ₂ B ₁ C ₃ D ₁	3	4.967 \pm 0.118 ¹⁾
13	A ₂ B ₂ C ₁ D ₃	3	4.812 \pm 0.124 ¹⁾
14	A ₂ B ₂ C ₂ D ₁	3	4.898 \pm 0.048 ²⁾
15	A ₂ B ₂ C ₃ D ₂	3	4.907 \pm 0.011 ²⁾
16	A ₂ B ₃ C ₁ D ₁	3	4.967 \pm 0.051 ²⁾
17	A ₂ B ₃ C ₂ D ₂	3	4.959 \pm 0.068 ¹⁾
18	A ₂ B ₃ C ₃ D ₃	3	5.035 \pm 0.067 ¹⁾
19	A ₃ B ₁ C ₁ D ₃	3	4.926 \pm 0.068 ¹⁾
20	A ₃ B ₁ C ₂ D ₁	3	5.066 \pm 0.052 ¹⁾
21	A ₃ B ₁ C ₃ D ₂	3	5.007 \pm 0.068 ²⁾
22	A ₃ B ₂ C ₁ D ₁	3	4.923 \pm 0.114 ¹⁾
23	A ₃ B ₂ C ₂ D ₂	3	5.024 \pm 0.030 ²⁾
24	A ₃ B ₂ C ₃ D ₃	3	4.907 \pm 0.068 ²⁾
25	A ₃ B ₃ C ₁ D ₂	3	5.079 \pm 0.082 ¹⁾
26	A ₃ B ₃ C ₂ D ₃	3	5.120 \pm 0.038 ¹⁾
27	A ₃ B ₃ C ₃ D ₁	3	5.050 \pm 0.084

注:与模型组比较,¹⁾: $P < 0.05$,²⁾: $P < 0.01$ 。

A 甘草次酸, B 桂皮酸, C 桂皮醛, D 芍药苷。

浓度 1: 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 浓度 2: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 浓度 3: 0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$

2.3 不同药物组合对 IL-1 β 刺激的细胞产生 PGE₂ 的影响 通过 PGE₂ 试剂盒检测结果的分析(见表 2),发现组方 8、11、14、15、16、21、23、24 相对模型组, PGE₂ 含量显著下降, $P < 0.01$ 。组方 2、6、10、12、13、17、18、19、20、22、25、26 相对模型组, PGE₂ 含量也都出现成统计学意义的下降。这些组合都能降低因 IL-1 β 刺激而产生 PGE₂ 的含量。

3 讨论

下丘脑的前列腺素 E₂ 作为最重要的中枢发热

介质之一^[7,8],其来源较复杂。近年来国外采用 COX2 的定位杂交技术对脂多糖(LPS)致发热大鼠脑组织 COX2 的 mRNA 的表达进行研究,认为引起发热的 PGE₂ 来源于脑血管及柔脑膜,进一步的研究认为主要是脑血管内皮细胞通过 COX2 提高了 PGE₂ 的水平而引起发热^[9]。

以往的大量实验已证实桂枝汤及其有效部位 A 对体温具有双向调节作用,但有效部位 A 是一个多组分组成的复杂的混合物,桂枝汤体温双向调节作用的物质基础仍未知。本实验通过 IL-1 β 刺激脑血管内皮细胞造模,从桂枝汤组成成分中选取了具有代表作用的四个单一成分,用正交设计搭配组合实验药物,为证实国外文献中对引起发热的 PGE₂ 来源于脑血管及柔脑膜,主要是脑血管内皮细胞;二则为在有效部位的基础上,从单一化合物的角度进一步探讨桂枝汤体温双向调节作用的物质基础。

实验结果表明引起发热的 PGE₂ 确有可能来源于脑血管内皮细胞,27 组药物组合中绝大多数都能降低有 IL-1 β 刺激脑血管内皮细胞引起的 PGE₂ 升高,说明我们选取的这四种成分可能就是桂枝汤体温双向调节作用的诸多物质基础中的几种,它们可能是通过降低 PGE₂ 的分泌量来实现体温调节作用的。

参考文献:

- [1] 陈云波,何燕飞. 血管内皮细胞的生物学功能[J]. 生物学通报, 1999, 29(11): 11-13.
- [2] 曾正培. 血管内皮的内分泌功能[J]. 中华内科杂志, 1998, 37(2): 77-78.
- [3] Anggard EE. The endothelium: the body's largest endocrine gland[J]. Endocrinol, 1990, 127: 371-375.
- [4] Inagami T, Naruse M, Richard H. Endothelium as an endocrine organ[J]. Annu Rev Physiol, 1995, 57: 171-189.
- [5] Gordon EL, Danielsson PE, Nguyen TS, et al. A comparison of primary cultures of rat cerebral microvascular endothelial cells to rat aortic endothelial cells[J]. In Vitro Cell Dev Biol, 1991, 27A(4): 312-326.
- [6] 许彦刚,刘勇. 大鼠脑皮质微血管内皮细胞培养和形态学观察[J]. 微循环技术杂志, 1997, 2: 63-65.
- [7] Coccani F, Akarsu ES. Prostaglandin E₂ in the pathogenesis of fever: An update[J]. Ann N Y Acad Sci, 1971, 856: 76281.
- [8] 富杭育,周爱香,查显元,等. 桂枝汤对下丘脑前列腺素 E₂ 的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 1993, 13(11): 667-669.
- [9] Cao C Y, Matsumura K, Yamagata K, et al. Endothelial cell of the rat brain vasculature express cyclooxygenase-2 mRNA in response to systemic interleukin-1 β : a possible site of prostaglandin synthesis responsible for fever[J]. Brain Res, 1996, 733: 263-272.