

邻甲氧基桂皮醛对 IL-1 刺激脑微血管内皮细胞 COX 活性及 PGE₂ 释放的影响

郭建友^{1,2}, 杨元宵³, 赵保胜¹, 刘洪斌¹, 李兰芳¹,
马悦颖¹, 郭淑英¹, 霍海如^{1*}, 姜廷良¹

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;
2. 中国科学院 心理研究所, 北京 100101; 3. 浙江中医学院, 浙江 杭州 310053)

[摘要] 目的: 观察桂枝汤有效部位 A 分离的邻甲氧基桂皮醛对发热相关的环氧酶 (COX) 和前列腺素 E₂ (PGE₂) 的影响。方法: 建立大鼠脑微血管内皮细胞 (rCMEC) 培养, 进行 因子相关抗原鉴定。待细胞生长至融合状态后加入不同含量的邻甲氧基桂皮醛 (12.5, 25, 50, 100, 200 μg mL⁻¹) 孵育 3 h, 之后以 30 ng mL⁻¹ 的 IL-1 刺激 12 h。ELISA 方法检测细胞培养液中 PGE₂ 的含量及细胞内 COX-1 和 COX-2 的活性。结果: 因子抗体免疫组化染色可见 90% 以上的培养细胞呈阳性, 确认为 rCMEC。暴露于 30 ng mL⁻¹ IL-1 后, rCMEC 内 COX-2 活性及释放的 PGE₂ 量显著增加, COX-1 活性变化无统计学差异。加入不同含量的邻甲氧基桂皮醛后, 随含量增加可下调 COX-1, COX-2 活性及 PGE₂ 量, 且呈剂量依赖关系; 至含量为 200 μg mL⁻¹ 时, COX-2 活性及释放的 PGE₂ 与 IL-1 单独作用组相比均有显著性差异, COX-1 活性虽有所降低, 但无统计学上的显著差异。结论: 邻甲氧基桂皮醛能下调 IL-1 刺激 rCMEC 释放升高的 PGE₂, 作用机制可能与抑制 COX-2 活性有关。

[关键词] 邻甲氧基桂皮醛; 脑微血管内皮细胞; 白介素 1; 环氧酶; 前列腺素 E₂

[中图分类号] R 285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-5302(2006)13-1087-04

桂枝汤为仲景群方之魁, 系解肌发表, 调和营卫之祖方, 临床上, 能使营卫不和所致的体温升高或体温偏低的病理状态趋于正常。前期研究工作证明桂枝汤能作用于环磷腺苷 (cAMP)、环磷鸟苷 (cGMP) 等多条信号转导通路, 影响下丘脑中前列腺素 E₂ (PGE₂) 的含量, 使下丘脑体温调定点向正常化移动, 对体温有双向调节作用^[1-3]。本所化学室对桂枝汤进行了提取分离, 获得了有效部位 A (Fr. A)。进一步的药理实验证明 Fr. A 与其全方类似, 通过影响发热信号传导通路上酶的活性和水平, 对体温有双向调节作用^[4,5]。邻甲氧基桂皮醛为桂枝汤 Fr. A 中分离获得的化学单体, 本实验研究以体外培养大鼠脑微血管内皮细胞 (rCMEC) 为研究对象, 观察 IL-1 作用下, 邻甲氧基桂皮醛对发热相关的环氧酶-1 (COX-1), 环氧酶-2 (COX-2) 及 PGE₂ 的影响, 探讨其

对体温影响的作用环节。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 雄性 SD 大鼠, 体重 70 ~ 80 g, 由中国医学科学院实验动物中心提供, 合格证为 SCXK 11-00-0006 号。

1.1.2 药物和试剂 邻甲氧基桂皮醛 (北京大学药学院, 桂枝汤 Fr. A 中分离获得), 标准胎牛血清 (Hyclone), 内皮细胞生长因子 (ECGF, Roche), IL-1 (Peprotech), 因子相关抗原多克隆抗体及免疫组化 SABC 染色试剂盒 (ZYMED), PGE₂ 含量 ELISA 测定试剂盒 (上海太阳生物技术公司), COX 活性 ELISA 检测试剂盒 (Cayman Chemical)。

1.1.3 仪器 JY99 - IIB 型超声波细胞破碎仪 (宁波新芝科器研究所), 5415R 型高速离心机 (德国 Eppendorf), QM5001I 型倒置相差显微镜 (德国 Leica), BB16 型 CO₂ 培养箱 (美国 Heraeus), MODEL550 型酶标仪 (美国 Bio-Rad)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 rCMEC 的培养参考 Baiguera

[收稿日期] 2005-11-21

[基金项目] 国家自然科学基金重大项目 (90209006)

[通讯作者] * 霍海如, Tel: (010) 64041008, Fax: (010)

64041008, E-mail: hrhuo@sohu.com

等^[6]的方法,并略加改动,具体操作如下:取 70~80 g 雄性 SD 大鼠,1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,断头。75%乙醇浸泡 2~3 min,无菌条件下分离鼠脑,用 PBS 清洗后,立刻放入含 8%牛血清的冲洗液内,去除大血管,软脑膜,小脑和大脑髓质,收集大脑皮质。剪碎后,玻璃匀浆器中上下抽动 20 次,匀浆液经 80 目尼龙滤网过滤,收集滤液,再经 200 目尼龙滤网过滤,收集网上之血管段,1 500 r·min⁻¹离心 8 min。弃上清,将沉淀悬浮于 0.1%胶原酶液中,轻微吹打,37℃ 放置 20 min。取出悬浮液,1 500 r·min⁻¹离心 5 min,弃上清,冲洗液清洗沉淀,1 500 r·min⁻¹离心 5 min,反复 3 次,末次离心后,去上清,沉淀用 5 mL 培养液悬浮接种于明胶覆盖的培养瓶中。绝对静置 3 d,以后每 2~3 d 细胞换液,当细胞长满瓶壁 95%左右进行细胞传代,加入 0.25%胰酶 1~2 min 后,在倒置显微镜下见大部分内皮细胞收缩变团,而杂细胞仍然贴壁,此时终止消化并传代。

1.2.2 内皮细胞鉴定 显微镜下观察细胞形态,以因子相关抗原作免疫组化鉴定。胰酶消化细胞,以培养液调细胞浓度成 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,接种于预先放入载玻片的 6 孔培养板中。37℃ 培养箱内继续孵育 18 h,待细胞在玻片上长至汇合后,吸出培养液, PBS 冲洗,加入 -20℃ 丙酮固定 15 min。以 PBS 冲洗 2 次后,加入兔抗人因子相关抗原多抗,4℃ 过夜。按试剂盒说明逐一加入二抗等试剂,最后进行常规免疫细胞化学染色,DAB 发色。阴性对照用 PBS 液替代第一抗体。

1.2.3 给药及 IL-1 刺激 取培养的第 3~5 代大鼠脑微血管内皮细胞,以培养液稀释细胞浓度成 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,接种于 24 孔培养板内,每孔 1 mL。37℃,5%CO₂ 的培养箱中继续培养 24 h 至融合状态后,分别加入不同含量的邻甲氧基桂皮醛(12.5,25,50,100,200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)孵育 3 h,以 30 ng mL⁻¹的 IL-1 继续刺激 12 h;同时设 IL-1 单独作用组及未加 IL-1 刺激的细胞作为对照组(每组设 8 个复孔)。收集细胞外液,备测 PGE₂;将培养板底部细胞以 PBS 冲洗后,备测 COX 活性。

1.2.4 PGE₂ 含量测定 以 ELISA 法检测细胞外液中 PGE₂ 含量,按照试剂盒的操作步骤进行,酶标仪上于 490 nm 波长测定吸光度 A,结果以 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 表示。按下列计算公式计算细胞释放 PGE₂ 抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = (\text{IL-1 组 PGE}_2 \text{ 含量} - \text{给药组 PGE}_2 \text{ 含量}) / (\text{IL-1 组 PGE}_2 \text{ 含量} - \text{对照组 PGE}_2 \text{ 含量}) \times 100\%$$

以概率单位法(Probit)求出邻甲氧基桂皮醛抑制 PGE₂ 释放的 IC₅₀^[7]。

1.2.5 COX 活性测定 24 孔细胞培养板取出上清后,以 PBS 冲洗各孔 2 次。加入预冷的含 1%牛血清的 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 溶液,以细胞刮刮取细胞。2 000 r·min⁻¹,4℃ 离心 10 min,弃上清,加入冰冷的裂解液($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7.8),冰浴超声 3×4 s 后,10 000 r·min⁻¹,4℃ 离心 15 min。取上清以 Lowry 法测定蛋白含量,后以 Cayman Chemical 公司的 ELISA 检测试剂盒检测 COX-1 及 COX-2 的活性。以每 min 每 mg 蛋白生成的 PGH₂ 量代表 COX-1 及 COX-2 的活性,用 $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 表示其活性单位。按下列公式计算给药组细胞 COX-1 和 COX-2 活性抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = (\text{IL-1 组 COX 活性} - \text{给药组 COX 活性}) / (\text{IL-1 组 COX 活性} - \text{对照组 COX 活性}) \times 100\%$$

以概率单位法计算出邻甲氧基桂皮醛抑制 COX-1 和 COX-2 活性的 IC₅₀。

1.2.6 统计学处理 实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,显著性比较采用 Student *t* 检验进行统计分析。

2 结果

2.1 细胞鉴定结果

倒置相差显微镜下,见细胞折光度强,呈扁平的梭状细胞,边界清楚,胞浆丰富,铺路石状单层镶嵌状排列。因子抗体免疫组化染色后的阳性细胞占总细胞数 90%以上,细胞呈短梭形或多角形,胞浆丰富,内含棕黄色颗粒(图 1)。省略第一抗体的阴性对照片只见微弱的非特异背景着色,胞浆中未见棕黄色颗粒。

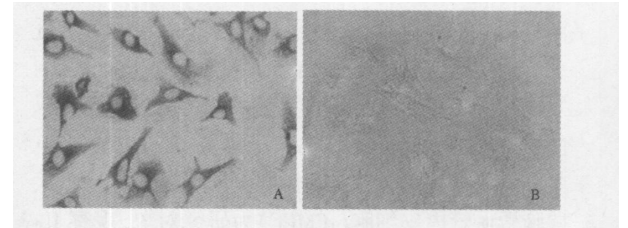


图 1 细胞免疫组化结果(×400)

A. 内皮细胞 因子抗体组化;B. 阴性对照

2.2 邻甲氧基桂皮醛对 PGE₂ 含量的影响

IL-1 刺激后培养液中 PGE₂ 含量显著升高,与对照组比较,有极显著差异($P < 0.01$)。提示 rCMEC 合成,释放的 PGE₂ 增多。加入不同含量的邻甲氧基桂皮醛作用后,培养液中 PGE₂ 含量明显下降,且呈

剂量依赖关系。在 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, PGE_2 抑制率为 47.36%, 与 IL-1 单独处理组比较已有显著性差异 ($P < 0.05$); 当 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, PGE_2 抑制率为 72.10% ($P < 0.01$)。其抑制细胞释放 PGE_2 的 IC_{50} 为 $55.67 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (表 1)。

表 1 邻甲氧基桂皮醛对 IL-1 刺激后 rCMEC 培养液中 PGE_2 含量的影响 (取 $\pm s, n = 8$)

组别	剂量	含量	抑制率
	$/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$/\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$	/ %
对照	-	3.56 ± 0.41	-
IL-1	0.03	$7.57 \pm 1.59^{1)}$	-
邻甲氧基桂皮醛	12.5	6.65 ± 1.42	23.07
	25	6.03 ± 1.83	38.39
	50	$5.67 \pm 1.52^{2)}$	47.36
	100	$5.14 \pm 0.92^{3)}$	60.58
	200	$4.68 \pm 0.99^{3)}$	72.10

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 IL-1 单独作用组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$

表 2 邻甲氧基桂皮醛对 IL-1 刺激后 rCMEC 内 COX-1, COX-2 活性的影响 (取 $\pm s, n = 8$)

组别	剂量 $/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	COX-1		COX-2	
		活性/ $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$	抑制率/ %	活性/ $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$	抑制率/ %
对照	-	70.96 ± 14.83	-	261.75 ± 62.09	-
IL-1	0.03	92.57 ± 23.75	-	$403.06 \pm 65.55^{1)}$	-
邻甲氧基桂皮醛	12.5	89.25 ± 16.51	15.36	386.60 ± 56.60	11.66
	25	87.31 ± 29.47	24.34	368.31 ± 50.45	24.60
	50	86.24 ± 25.77	29.30	352.59 ± 51.91	35.72
	100	85.81 ± 31.18	31.28	$345.24 \pm 55.82^{2)}$	40.92
	200	84.94 ± 26.58	35.31	$322.51 \pm 64.28^{2)}$	57.00

注:与对照组比¹⁾ $P < 0.01$;与 IL-1 单独作用组比²⁾ $P < 0.05$

3 讨论

体温调节内源性致热因子(如 IL-1)并不能直接穿越血脑屏障进入下丘脑,可能作用于血脑屏障(BBB)和血管终板器(OVLT),产生和释放特定的生物活性物质 PGE_2 等进入大脑中枢。BBB 是脑与循环系统之间的一个重要界面,它的主要结构是具有紧密连接的 rCMEC。本实验对 rCMEC 进行原代及传代培养,因子相关抗原免疫组化染色进行鉴定,以内源性致热因子 IL-1 刺激后观察其释放的发热中枢介质 PGE_2 。研究结果表明 IL-1 可导致 rCMEC 释放的 PGE_2 明显增加,提示 IL-1 可引起机体的发热反应。在邻甲氧基桂皮醛作用下,随含量增加显著下调升高的 PGE_2 ,并呈现一定的剂量依赖关系,提示邻甲氧基桂皮醛能下调机体异常升高的体温。

目前研究证明 COX 存在 2 种异构体。COX-1 属于结构酶,在细胞中稳定表达;COX-2 为诱导酶,

2.3 邻甲氧基邻甲氧基桂皮醛对 COX-1 和 COX-2 活性的影响

IL-1 刺激后 rCMEC 内 COX-2 活性显著提高,与对照组比较有极显著性差异 ($P < 0.01$);COX-1 活性虽有所增加,但无统计学上显著差异。加入不同含量的邻甲氧基桂皮醛后,细胞内 COX-1 和 COX-2 活性均降低,且呈剂量依赖关系。在 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,COX-2 活性抑制率为 40.92%,与 IL-1 单独处理组比较已有显著性差异 ($P < 0.05$),COX-1 活性抑制率为 31.28%,差异无统计学意义;当 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,COX-2 活性抑制率为 57.00% ($P < 0.05$),COX-1 活性抑制率为 35.31%,差异仍无统计学意义。邻甲氧基桂皮醛抑制 COX-2 的 IC_{50} 为 $134.06 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;由于本实验邻甲氧基桂皮醛最高剂量对 COX-1 活性抑制率为 35.31%,未及 50%抑制率,不求其对 COX-1 活性的抑制率(表 2)。

在某些刺激因素的作用下,如细胞因子,LPS 等诱导产生,参与许多病理生理过程。IL-1 刺激下,脑微血管内皮细胞内 COX-2 活性较 IL-1 单独处理组增高有显著性差异,COX-1 活性虽有增高,但无统计学上显著差异,表明 IL-1 影响 COX-2 活性为主。在不同含量邻甲氧基桂皮醛作用后,随含量增加可下调 COX-1 和 COX-2 活性,并呈现剂量依赖关系。在邻甲氧基桂皮醛含量为 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,COX-2 活性与 IL-1 单独处理组比较存在明显差别,COX-1 活性虽有降低,但无统计学上显著差异。由于本实验最高剂量组对 COX-1 活性未达到 50%的抑制率,未能求出其对 COX-1 活性的 IC_{50} 。结果表明邻甲氧基桂皮醛主要作用于 COX-2 活性,可能通过降低 IL-1 诱导下增高的 COX-2 活性,最终使 PGE_2 的合成减少。

中药及其方剂由活性物质群构成,它们按一定要求配伍组合,通过多靶点,多途径经整合发挥作

用。桂枝汤 Fr. A 所表现的对体温的双向调节作用,可能就是其所含多种成分,多途径,多靶点整合调节作用的结果^[8]。邻甲氧基桂皮醛作为桂枝汤 Fr. A 中分离获得的化学单体,其对发热有关的 COX 及 PGE₂作用与 Fr. A 一致^[4,5],通过降低 COX-2 活性,减少 PGE₂的释放。今后笔者将继续对桂枝汤 Fr. A 中分离获得的其他化合物进行实验研究,观察 IL-1 刺激下它们对内皮细胞 COX 活性及 PGE₂释放的影响,为中药方剂的多成分,多途径,多靶点的整合作用提供一定的理论依据。

[参考文献]

- [1] 富杭育,周爱香,查显元,等. 桂枝汤对体温双向调节作用机理的探讨——对下丘脑前列腺素 E₂的影响. 中西医结合杂志, 1993, 13(11):667.
- [2] 王建华,张永祥. 中药药理与临床研究进展. 北京:军事医学

科学出版社, 2002: 187.

- [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 PGE₂含量及 COX 活性的影响. 中药药理与临床, 2001, 17(6):1.
- [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. 中国实验方剂学杂志, 1998, 4(2):11.
- [5] 霍海如,李晓芹,谭余庆,等. 桂枝汤有效部位 A 对体温双向调节作用及其机理研究:对下丘脑 NE, DA, 5-HT 含量的影响. 中国实验方剂学杂志, 1998, 4(3):14.
- [6] Baiguera S, Conconi MT, Guidolin D, et al. Ghrelin inhibits *in vitro* angiogenic activity of rat brain microvascular endothelial cells. Int J Mbl Med, 2004, 14(5):849.
- [7] 张文贵,林福生,李北波. 药理学计算与程序. 北京:人民卫生出版社, 1988: 100.
- [8] 姜廷良. 论中药复方药效物质基础和作用机理研究的意义. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(4):195.

Effect of 2-methoxycinnamaldehyde on activity of COX and PGE₂ release in cerebral microvascular endothelial cells stimulated by IL-1

GUO Jian-you^{1,2}, YANG Yuan-xiao³, ZHAO Bao-sheng¹, LIU Hong-bin¹, LI Lan-fang¹,
MA Yue-ying¹, GUO Shu-ying¹, HUO Hai-ru¹, JIANG Ting-liang¹

- (1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. Institute of Psychology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;
3. Zhejiang College of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of 2-methoxycinnamaldehyde (isolated from fraction A of Guizhi Tang) on activity of COX and PGE₂ release in rat cerebral microvascular endothelial cells (rCMEC) stimulated by IL-1. **Method:** rCMEC were cultured, and identified by immunohistochemistry for von Willebrand factor (vWF factor, a marker for all endothelial cells) in cytoplasm of the cells. Different concentrations of 2-methoxycinnamaldehyde were added respectively and incubated for 3 hours, then stimulated for another 12 hours by IL-1. Activities of COX-1 and COX-2 in rCMEC, and production of PGE₂ in the conditioned media were measured by ELISA. **Result:** Positive immunostaining for vWF factor was present diffusely in the cytoplasm of > 90% rCMEC. After being exposed to 30 ng · mL⁻¹ IL-1, the activity of COX-2 in rCMEC and the production of PGE₂ in conditioned media were higher than those of control group, while there was no difference on activity of COX-1 in the two groups. 2-methoxycinnamaldehyde could down-regulate them in concentration-dependently, and significant differences on the activity of COX-2 and amount of PGE₂ were showed in 200 μg · mL⁻¹ concentration. **Conclusion:** 2-methoxycinnamaldehyde can affect the PGE₂ release in rCMEC induced by IL-1, which might be related with its inhibition on the activity of COX-2.

[Key words] 2-methoxycinnamaldehyde; cerebral microvascular endothelial cells; IL-1; COX; PGE₂

[责任编辑 刘 强]