

• 研究简报 •

桂枝汤有效成分苯丙烯类化合物干预 IL-1 β 刺激小鼠脑微血管内皮细胞释放 PGE₂ 的构效关系马悦颖¹, 尚明英², 李沧海³, 霍海如^{1*}, 蔡少青^{2*}, 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. 北京大学 药学院, 北京 100083; 3. 中国中医科学院 医学实验中心, 北京 100700)

关键词: 苯丙烯类化合物; 前列腺素 E₂; 构效关系; 脑微血管内皮细胞; 白介素 1; 桂枝汤

中图分类号: R289.12 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)07 - 0798 - 05

Structure-activity relationship of phenylallyl compounds inhibiting PGE₂ release in mouse cerebral microvascular endothelial cells induced by IL-1 β MA Yue-ying¹, SHANG Ming-ying², LI Cang-hai³, HUO Hai-nu^{1*},
CAI Shao-qing^{2*}, 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. School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China; 3. Medical Science Experimental Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

Abstract: To observe the effects of phenylallyl compounds on prostaglandin E₂ (PGE₂) release in mouse cerebral microvascular endothelial cells (bEnd.3) stimulated by IL-1 β , and to analyze their structure-activity relationship. Different concentrations of phenylallyl compounds were added separately, and the content of PGE₂ induced by IL-1 β in the culture media was measured by ELISA assay. The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of PGE₂ was calculated. Studies showed that phenylallyl compounds could affect the PGE₂ release differently in bEnd.3 cells induced by IL-1 β . Close relationships were shown between the inhibitory activities and the location and number of the substituent groups. In conclusion, phenylallyl compounds exhibited inhibitory activities at different extent on PGE₂ release in bEnd.3 cells stimulated by IL-1 β and presented certain structure-activity relationship.

Key words: phenylallyl compounds; prostaglandin E₂; structure-activity relationship; cerebral microvascular endothelial cell; interleukin-1; Guizhi decoction

前期研究发现,桂枝汤解热有效部位 A(Fr. A)在很小剂量(3.8 ~ 7.6 mg·kg⁻¹, po)即显示了明显的解热活性,并可降低发热动物下丘脑 PGE₂ 含

量^[1],经 LC/MS, GC/MS和化学分离确证,其含十余种苯丙烯类化合物,此类化合物为该部位的主要成分。由于 Fr. A中除桂皮醛、桂皮醇、2-甲氧基桂皮醛、香豆素、桂皮酸的含量较高外,其他组分的含量均较低,难以通过化学分离得到足够量的样品以测试其相应活性。本研究通过对 Fr. A进行化学分离,得到桂皮醛、桂皮醇、桂皮酸和 4-羟基桂皮酸等,并通过化学合成或市售获取较多的其他苯丙烯

收稿日期: 2006-11-29.

基金项目: 国家自然科学基金重大项目(90209006)。

* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 10 - 64041008,

E-mail: huohr@yahoo.com.cn

Tel / Fax: 86 - 10 - 82801693,

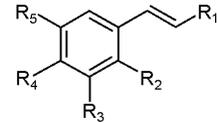
E-mail: sqcai@hsc.pku.edu.cn

类化合物,观察它们对白细胞介素-1 β (IL-1 β)刺激小鼠脑微血管内皮细胞(bEnd.3)释放前列腺素E₂(PGE₂)的影响并分析其构效关系。以遗传算法—支持向量回归等方法构建数学模型,对桂枝汤Fr.A内含量低微、难以分离的同类化合物活性进行预测,为进一步综合研究桂枝汤对体温的整合调节作用奠定基础。

现在一般认为,在外源性致热物质(如病原菌及其产物)或及内生致热原(如IL-1, IL-6, TNF及TNF等)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^[2-5],为介导发热的中枢终端介质,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^[6,7]。而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^[8],故先以IL-1 β 刺激大鼠微血管内皮细胞为体系^[9,10],考察Fr.A、桂皮醛等桂枝汤成分对PGE₂、环氧合酶等的影响^[10-15],在这些前期工作基础上,又选择IL-1 β -bEnd.3构建了实验体系,以评价桂枝汤主要解热成分苯丙烯类化合物的作用及其构效关系。

材料和方法

试验样品 桂皮酸、桂皮醛、桂皮醇等苯丙烯类化合物(图1)由北京大学药学院提供。其中桂皮酸(cinnamic acid, 编号1-1)、4-羟基桂皮酸(4-hydroxycinnamic acid, 编号1-13)、桂皮醛(cinnamaldehyde, 编号2-1)及桂皮醇(cinnamyl alcohol, 编号4-1)系从桂枝汤Fr.A中分离得到;2-甲基桂皮酸(2-methylcinnamic acid, 编号1-2)、4-甲基桂皮酸(4-methylcinnamic acid, 编号1-3)、2-甲氧基桂皮酸(2-methoxycinnamic acid, 编号1-4)、3-甲氧基桂皮酸(3-methoxycinnamic acid, 编号1-5)、4-甲氧基桂皮酸(4-methoxycinnamic acid, 编号1-6)、2,5-二甲氧基桂皮酸(2,5-dimethoxycinnamic acid, 编号1-7)、3,4-二甲氧基桂皮酸(3,4-dimethoxycinnamic acid, 编号1-8)、3,4,5-三甲氧基桂皮酸(3,4,5-trimethoxycinnamic acid, 编号1-9)、4-羟基-3-甲氧基桂皮酸(4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid, 编号1-10)、2-羟基桂皮酸(2-hydroxycinnamic acid, 编号1-11)、3-羟基桂皮酸(3-hydroxycinnamic acid, 编号1-12)、3,4-二羟基桂皮酸(3,4-dihydroxycinnamic acid, 编号1-14)、4-甲酰基桂皮酸(4-formylcinnamic acid, 编号



No.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
1-1*	COOH				
1-2	COOH	CH ₃			
1-3	COOH		CH ₃		
1-4*	COOH	OCH ₃			
1-5	COOH		OCH ₃		
1-6	COOH		OCH ₃		
1-7	COOH	OCH ₃	OCH ₃		
1-8	COOH		OCH ₃	OCH ₃	
1-9	COOH		OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
1-10*	COOH		OCH ₃	OH	
1-11*	COOH	OH			
1-12	COOH		OH		
1-13*	COOH		OH		
1-14	COOH		OH	OH	
1-15	COOH		CHO		
2-1*	CHO				
2-2*	CHO	OCH ₃			
2-3	CHO		OCH ₃		
2-4	CHO	OH			
2-5*	CHO		OCH ₃	OH	
3-1	COOCH ₃				
3-2	COOCH ₂ CH ₃				
3-3	OCOCH ₃				
4-1*	OH				
4-2	OH	CH ₃			
4-3*	OH	OCH ₃			
4-4	OH	OCH ₃			
4-5	OH	OCH ₃			
4-6	OH	OCH ₃	OCH ₃		
4-7	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	
4-8	OH	OH			
4-9	OH	OH			
4-10	OH	OH	OH		

Figure 1 The molecular structures of phenylallyl compounds. * Phenylallyl compounds existed in Guizhi decoction

1-15)、2-甲氧基桂皮醛(2-methoxycinnamaldehyde, 编号2-2)、4-甲氧基桂皮醛(4-methoxycinnamaldehyde, 编号2-3)、2-羟基桂皮醛(2-hydroxycinnamaldehyde, 编号2-4)、4-羟基-3-甲氧基桂皮醛(4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde, 编号2-5)、桂皮酸甲酯(methyl cinnamate, 编号3-1)、桂皮酸乙酯(ethyl cinnamate, 编号3-2)、醋酸肉桂酯(cinnamyl acetate, 编号3-3)共20个化合物购自北京百灵威化学技术有限公司;4-甲基桂皮醇(4-methoxycinnamyl alcohol, 编号4-2)、2-甲氧基桂皮醇(2-methoxycinnamyl alcohol, 编号4-3)、3-甲氧基桂

皮醇 (3-methoxycinnamyl alcohol, 编号 4-4)、4-甲氧基桂皮醇 (4-methoxycinnamyl alcohol, 编号 4-5)、2,5-二甲氧基桂皮醇 (2,5-dimethoxycinnamyl alcohol, 编号 4-6)、3,4,5-三甲氧基桂皮醇 (3,4,5-trimethoxycinnamyl alcohol, 编号 4-7)、4-羟基-3-甲氧基桂皮醇 (4-hydroxy-3-methoxycinnamyl alcohol, 编号 4-8)、2-羟基桂皮醇 (2-hydroxycinnamyl alcohol, 编号 4-9)、3,4-二羟基桂皮醇 (3,4-dihydroxycinnamyl alcohol, 编号 4-10) 共 9 个化合物, 由桂皮酸经常规方法还原制得。共 33 个化合物。

实验试剂 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)。

主要仪器 CO₂ 培养箱 (Heraeus 公司); 倒置生物显微镜 (Olympus); Mode 550 酶标仪 (美国 BIO-RAD)。

细胞培养 小鼠脑微血管内皮细胞株 bEnd. 3 (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)。bEnd. 3 细胞于含 10% 小牛血清、100 u·mL⁻¹ 青霉素和 100 u·mL⁻¹ 链霉素的 DMEM 高糖培养基中, 置 37 °C, 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。

实验方法 取对数生长期 bEnd. 3 细胞, 以培养液稀释细胞成 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$, 接种于 96 孔板中, 180 μL 孔。5% CO₂ 培养箱中继续培养 24 h 后, 加入配制好的待测化合物 10 μL 孔, 终浓度分别为 0.15, 0.3, 0.6, 1.2 及 2.4 mmol·L⁻¹, 于药后 4 h 加入终质量浓度为 30 ng·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 (各设 6 个复孔)。以 ELISA 法测定细胞外液中的 PGE₂ 含量, 按照试剂盒的操作步骤进行, 酶标仪上于 490 nm 测定吸光度值, 以 pg·mL⁻¹ 表示其含量。按下列计算公式计算细胞释放 PGE₂ 抑制率^[3]。以 Bliss 法求出化合物抑制 PGE₂ 释放的 IC₅₀。抑制率 (%) = (IL-1 β 组 PGE₂ 含量 - 给药组 PGE₂ 含量) / (IL-1 β 组 PGE₂ 含量 - 正常组 PGE₂ 含量) × 100%。

统计学处理 所有的实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间均值比较采用 ANOVA 分析, 两组均数显著性比较采用 *q* 检验。

结果

IL-1 β 刺激后 bEnd. 3 细胞的培养液中的 PGE₂ 的含量显著升高, 与对照组比较有显著差异 ($P < 0.01$), 提示 bEnd. 3 细胞释放 PGE₂ 增多。加入不同浓度的待测化合物后, 培养液中的 PGE₂ 的含量有所改变, 化合物抑制效果呈现一定的构效关系, 苯丙烯类化合物对 bEnd. 3 细胞释放 PGE₂ 的抑制活性见表 1。在所实验的 33 个苯丙烯类化合物中, 以桂皮醛、桂皮醇、桂皮酸为桂枝汤中活性较强成分, 其抑制 bEnd. 3 细胞释放 PGE₂ 的 IC₅₀ 分别为 0.38, 0.44 和 2.03 mmol·L⁻¹。

Table 1 Inhibitory effect of phenylallyl compounds on release of PGE₂ in bEnd. 3 cells

No.	IC ₅₀ of PGE ₂ / mmol·L ⁻¹	No.	IC ₅₀ of PGE ₂ / mmol·L ⁻¹
1-1	2.03	2-1	0.38
1-2	0.97	2-2	0.40
1-3	0.53	2-3	0.44
1-4	8.85	2-4	0.98
1-5	6.32	2-5	0.40
1-6	1.39	3-1	3.43
1-7	0.61	3-2	40.96
1-8	0.64	3-3	11.69
1-9	0.37	4-1	0.44
1-10	0.92	4-2	3.33
1-11	2.46	4-3	4.71
1-12	1.30	4-4	2.85
1-13	0.96	4-5	1.57
1-14	0.62	4-6	0.53
1-15	13.33	4-7	0.45
		4-8	1.35
		4-9	4.01
		4-10	1.55

讨论

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, 于脑室或视前区/下丘脑前部微量注射 PGE₂, 几乎所有动物均有发热反应^[16]。但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^[17]。近十年的研究结果逐渐揭示, 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^[7,18]。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。经一系列试验证实,苯丙烯类化合物干预 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苯丙烯类化合物提供了理论基础^[12,19,20]。

通过对这些化合物抑制细胞 PGE₂释放的 IC₅₀结果分析,可以初步看出桂皮醛类化合物呈现出较好的抑制作用,桂皮醇类化合物次之,桂皮酸类化合物作用较差。并且与其侧链取代基的位置和数目有一定关系。① 化合物基本结构相同,其活性强弱顺序为:桂皮醛类化合物 > 桂皮醇类化合物 > 桂皮酸类化合物 > 桂皮酸酯类 (IC₅₀ 0.38 < 0.44 < 2.03 < 11.69 mmol·L⁻¹)。② 桂皮酸类化合物:对位单甲基取代,活性明显增强;对位单甲氧基取代,活性增强不明显;邻位、间位单甲氧基取代,活性降低或消失;邻位(稍降低)或间位(稍增强)单羟基取代对活性影响不明显;羟基及甲氧基的取代数目增加,活性增强。③ 桂皮醇类化合物:对位单甲基取代,活性明显降低;邻位、间位或对位单甲氧基取代,活性降低;其活性强弱顺序为:对位 > 间位 > 邻位;甲氧基取代数目越多,活性越强,但其活性低于桂皮醇;羟基取代,活性降低;羟基取代数目增加,活性有所增强,但仍低于无羟基取代的桂皮醇。④ 桂皮醛类化合物:邻位或对位甲氧基单取代,对活性无明显影响;邻位羟基单取代,活性降低。由于化合物的数量有限,本文只进行了初步的构效关系分析,有待获得更多的苯丙烯类化合物开展研究,以便进一步得出具有指导意义的规律。

中药复方作用具有多成分、多靶点、多层次等特点,然而关于多成分及其作用的具体形式尚缺少相关研究。本课题组根据现代中药研究成果结合多年来桂枝汤研究经验,提出以下假说:中药复方活性成分呈现“系列物”形式存在,它们对体内某一“级联反应”的一些节点或呈拮抗或呈协同,并具结构特异性,其终末效应为该类成分的“整合”调节作用。为验证该假说,本实验选取桂枝汤解热活性部位 Fr. A 中主要活性成分苯丙烯类化合物作为工具“系列物”,以白细胞介素——脑血管内皮细胞组成体外体系,考察了 Fr. A 中主要苯丙烯化合物及其系列类似化合物对 PGE₂系列代谢酶的影响,并按它们的自然比例组方观察了终末效应——释放 PGE₂的影响,采用等效线法对它们的相互作用进行了分析。本实验通过对 30 余种苯丙烯类化合物,就 IL-

1 β 刺激 bEnd.3 系统评价干预 PGE₂释放的活性,以其 IC₅₀为实验数据构建了遗传算法-支持向量回归模型^[21],并将该模型的预测活性值与实测活性值进行比较,平均误差为 0.207 0,均方误差为 0.013 6,显示出了很高的准确性(另文发表)。鉴于对桂枝汤中一些含量低、难分离的苯丙烯类化合物活性的成功预测,为继续探讨桂枝汤有效部位 A 中,其他衍生物或同系物的整合作用以及不同同系物间的整合作用奠定了基础,同时也为结合计算机科学,有选择地进行活性测试,减少生物活性实验,降低研究成本,加速研究进程及构造出活性更强的化合物提供了思路,为中药复方研究进行了有益的探索、尝试。

References

- [1] Tan YQ, Li XQ, Huo HR, et al. Effect and mechanism of active fraction A of Guizhi Decoction on Dual-directional The moregulation-Effect on prostaglandin E₂ in hypothalamus of rats [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 1998, 4: 11 - 13.
- [2] Ushikubi F, E. Sugimoto SY, Murata T, et al. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP₃ [J]. 1998, Nature, 395: 281 - 284.
- [3] Li S, Wang Y, Matsumura K, et al. The febrile response to lipopolysaccharide is blocked in cyclooxygenase-2 (-/-), but not in cyclooxygenase-1 (-/-) mice [J]. Brain Res, 1999, 825: 86 - 94.
- [4] 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.
- [5] Oka T, Oka K, Kobayashi T, et al. Characteristics of the moregulatory and febrile responses in mice deficient in prostaglandin EP₁ and EP₃ receptors [J]. J Physiol, 2003, 551: 945 - 954.
- [6] 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.
- [7] Romanovsky AA, Almeida MC, Aronoff DM, et al. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions [J]. Front Biosci, 2005, 10: 2193 - 2216.
- [8] 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.
- [9] Guo JY. Studies on the Effects of Phenylallyl Compounds

- on Catabolizing Enzymes of PGE₂ and Its Integrated Action [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences, 2006.
- [10] Guo JY, Huo HR, Liu HB, et al. Release of PGE₂ by IL-1 β stimulated cerebral microvascular endothelial cells at different time point [J]. J Med Postgraduates (医学研究生学报), 2005, 18: 503 - 505.
- [11] Guo JY, Ma YY, Yang YX, et al. Changes of 15-PGDH activity in cerebral microvascular endothelial cells stimulated by IL-1 β at different time point [J]. J Med postgraduates (医学研究生学报), 2006, 19: 330 - 333.
- [12] Guo JY, Yang YX, Zhao BS, et al. Effect of cinnamylalcohol on activity of COX and PGE₂ release in cerebral microvascular endothelial cells stimulated by IL-1 [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2006, 41: 596 - 599.
- [13] Guo JY, Huo HR, Zhao BS, et al. Cinnamaldehyde reduces IL-1 β -induced cyclo-oxygenase-2 activity in rat cerebral microvascular endothelial cells [J]. Eur J Pharm, 2006, 537: 174 - 180.
- [14] Guo JY, Huo HR, Zhao BS, et al. Effect of 3-phenyl-2-propene-1-ol on PGE₂ release from rat cerebral microvascular endothelial cells stimulated by IL-1 β [J]. Am J Chin Med, 2006, 34: 685 - 693.
- [15] Jiang N, Huo HR, Li LF, et al. Effects of Fr. A in Guizhi Tang on the excretion of PGE₂ and signal transduction components in cerebral microvascular endothelial cells stimulated by IL-1 [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2004, 9: 1289 - 1292.
- [16] Coceani F, Akarsu E. Prostaglandin E₂ in the pathogenesis of fever an update [J]. Ann NY Acad Sci, 1998, 850: 76 - 82.
- [17] Blatteis CM, Li SX, Li ZH, et al. Cytokines, PGE₂ and endotoxic fever: a re-assessment [J]. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2005, 76: 1 - 18.
- [18] Matsumura K, Kobayashi S. Signaling the brain in inflammation: the role of endothelial cells [J]. Front Biosci, 2004, 9: 2819 - 2826.
- [19] Guo JY, Huo HR, Liu HB, et al. Effect of cinnamaldehyde on COX-1 and COX-2 and PGE₂ cerebral microvascular endothelial cells induced by IL-1 [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med (中药药理与临床), 2005, 21: 16 - 18.
- [20] Li CH, Zhou J, Huo HR, et al. Effect of Guizhi Tang and its active components on the fever induced by EP₃ agonist [J]. China J Chin Mat Med (中国中药杂志), 2003, 28: 1056 - 1060.
- [21] Zhang SJ, Zhao YN, Song YX, et al. Feature Selection in Predicting the Activity of Cyclooxygenase-2 Inhibitors [C] // Proceedings of the IASTED International Conference on Artificial Intelligence and Applications, 2006, Innsbruck: ACTA Press, 2006: 383 - 387.