

桂枝汤对发热及低体温大鼠下丘脑中腺苷酸环化酶和磷酸二酯酶活性的影响^{*}

齐 云^{1△} 霍海如¹ 田甲丽¹ 郭淑英¹ 李晓芹¹ 周爱香¹ 邹德嵩² 姜廷良^{1△}

内容提要 目的:观察桂枝汤对发热和低体温模型大鼠下丘脑中腺苷酸环化酶(AC)和磷酸二酯酶(PDE)活性的影响。方法:采用放射性同位素方法测定模型动物下丘脑中 AC 及 PDE 活性。结果:在酵母诱导发热模型大鼠中,桂枝汤可使下丘脑中 AC 活性明显降低($P<0.05$),而在安痛定诱导的低体温模型大鼠中,它可使 AC 活性明显增强($P<0.05$)。在两种模型中,桂枝汤对 PDE 活性的影响均不明显。结论:桂枝汤对体温的双向调节作用可能是部分通过影响 AC 活性来实现的。

关键词 桂枝汤 体温双向调节 腺苷酸环化酶 磷酸二酯酶

Effect of Guizhi Decoction on Adenyl Cyclase and Phosphodiesterase in Hypothalamus of Rats Models of Fever and Hypothermia QI Yun, HUO Hai-ru, TIAN Jia-li, et al *Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of TCM, Beijing (100700)*

Objective: To observe the effect of Guizhi Decoction (GZD) on adenyl cyclase (AC) and phosphodiesterase (PDE) activities in hypothalamus of rat models of fever and hypothermia. **Methods:** The AC and PDE activities in hypothalamus were determined using radio-isotope method. **Results:** GZD could lower the AC activity in yeast induced fever rat model ($P<0.05$), but cause rise of AC activity in aminopyrine induced hypothermia model ($P<0.05$). No significant influence of GZD on PDE activity was shown in both fever or hypothermia models. **Conclusion:** The bi-directional thermo-regulation effect of GZD might be partially due to influence on AC activity.

Key words Guizhi Decoction, bi-directional thermo-regulation, adenyl cyclase, phosphodiesterase

实验结果表明,环磷酸腺苷(cAMP)是一种重要的中枢发热介质⁽¹⁾,有学者发现内生性致热原(EP)所致家兔发热时,下丘脑和脑脊液中的 cAMP 含量与体温呈显著的正相关⁽²⁾,并认为脑脊液中 cAMP 含量增多主要源于下丘脑⁽³⁾。我们先前的实验还发现酵母所致发热和安痛定所致低体温大鼠下丘脑中 cAMP 含量随体温的高低而发生相应改变。桂枝汤对发热动物可解热,对低体温动物可升温,这种双向调节是部分通过影响体温调节中枢中 cAMP 含量来实现的⁽⁴⁾。由于 cAMP 含量受腺苷酸环化酶(AC)和磷酸二酯酶(PDE)活性的影响,即 AC 活性增强使三磷酸腺苷(ATP)大量转化为 cAMP;反之,AC 活性减弱时则 cAMP 的生成减少。PDE 活性增强可使 cAMP 降解

为 5'-腺苷酸(5'-AMP)而失去活性,若 PDE 活性减弱时则 cAMP 降解减少。因此,可以推断发热及低体温动物下丘脑中 cAMP 含量的增减必然有 AC 或 PDE 活性的相应变化。对此我们进行了以下的实验研究。

材料和方法

1 动物 健康 Wistar 大鼠,雄性,体重(180±20)g,由北京医科大学动物中心提供(合格证号:医动字第 01-3056)。动物适应实验室环境 3 天后,用经校正过的半导体温度计测量直肠温度(测量探头插入大鼠肛门 3.5cm,温度计下端用胶布固定,避免操作中探头插入深度的误差)。实验室温度控制在(20±2)℃。

2 药物 桂枝汤所用药材购于北京市药材公司,经生药学鉴定,其原植物分别为桂枝、芍药、甘草、生姜、大枣,按《伤寒论》中的 10:10:7:10:10 的重量比例混合,加 10 倍量水浸泡 1h,煮沸 45min,头煎过滤取渣,再加 8 倍的水煮沸 30min,过滤合并滤液并水浴浓缩,4℃ 冰箱保存,临用时配制。实验中对低体温模型

^{*} 国家“九五”攀登计划预选项目(中药现代化关键问题的基础研究)资助课题(No. 970211018)

1. 中国中医研究院中药研究所药理室(北京 100700) 2. 北京联合大学 97 级毕业实习生

△博士后 导师

及发热模型大鼠,桂枝汤用量分别为 10g/kg、20g/kg。

3 试剂和主要仪器 鲜酵母购于北京第二食品厂,安痛定为北京制药厂出品,批号 990308;ATP、cAMP、蛇毒(眼镜王蛇)、阴离子交换树脂(Dowex-1,氯型,200~400 目)、茶碱、腺苷等均为 Sigma 公司产品;cAMP 测定试剂盒、³H-cAMP(放射性比活性为 24Ci/mmol,放化纯度>95%)购自中国科学院原子能研究所。其他试剂均为国产分析纯。

半导体温度测温仪为上海医用仪表厂产品;LS9800 型液体闪烁计数器为 Beckman 公司产品。

4 方法

4.1 桂枝汤对发热大鼠体温的影响 选取基础体温(36.6±0.5)℃的大鼠,10%鲜酵母悬液(2.4g/kg 体重)2ml/100g 背部皮下注射诱导体温升高,正常组大鼠注射同体积生理盐水,3.5h 后测体温。选取体温升高 1℃以上的造模成功大鼠,随机分为 2 组,即发热模型组(简称发热组)和桂枝汤组。桂枝汤组大鼠灌胃给予 200%桂枝汤 1ml/100g。正常组及模型组大鼠给予同体积生理盐水,1h 后重复给药 1 次,剂量同前。首次给药后 4h 测体温,并计算体温升高差值(药后体温值-基础体温值),继而将大鼠快速断头取脑(1min 内完成),干冰速冻,于-20℃冰箱保存,备作下丘脑 AC、PDE 活性的测定。

4.2 桂枝汤对低体温大鼠体温的影响 选取基础体温(36.6±0.5)℃的大鼠,随机分为 3 组,即正常组、低温模型组(简称低温组)、桂枝汤组。桂枝汤组大鼠灌胃给予 100%桂枝汤 1ml/100g,正常组及低温组大鼠给予同体积生理盐水,1h 后重复给药(或生理盐水)1 次,剂量同前。低温组第 2 次灌胃后立即腹腔注射安痛定 2.2ml/kg 诱致体温下降。正常组大鼠注射同体积生理盐水,腹腔注射后 2.5h 测体温,并计算体温降低差值(基础体温值-腹腔注射后 2.5h 体温值),继而将大鼠快速断头取脑(1min 内完成),干冰速冻,于-20℃冰箱保存,备作下丘脑 AC、PDE 活性的测定。

4.3 AC 和 PDE 活性的测定 取冷冻脑组织,剥离下丘脑(以灰结节及视交叉的中心点确定下丘脑),称取 60mg 左右加入预冷的 1ml 匀浆介质(50mmol/L Tris-HCl, 5mmol/L MgSO₄, pH 7.5),在玻璃匀浆器内于冰浴中制成匀浆,1000r/min 离心 10min,取 0.5ml 上清作 PDE 活性测定用,剩余匀浆加入预冷的 50mmol/L Tris-Maleate 缓冲液(含 5mmol/L MgSO₄, pH 7.4)0.5ml 重悬,取混合均匀的粗酶液供 AC 活性测定用。万方数据

4.3.1 AC 的活性测定 按文献^[5]方法进行酶反应,产物 cAMP 测定按 cAMP 试剂盒说明书操作,测得 cpm 值根据标准曲线可算出每分钟每毫克组织分解 ATP 生成 cAMP 的量为其活性单位(用 pmol·mg⁻¹·min⁻¹表示)。

4.3.2 PDE 活性测定 按文献^[6]方法进行酶反应,最后酶的活性用每分钟每毫克组织水解³H-cAMP 的百分转化率表示。

5 统计学方法 采用 *t* 检验。

结 果

1 桂枝汤对发热、低体温大鼠体温的影响 见表 1、2。桂枝汤对酵母诱导大鼠体温升高有显著的降低作用,对安痛定诱导的体温降低有显著的回升作用,给药后体温及体温变化差值与模型组比较差异均有显著性,表明桂枝汤可使发热、低体温大鼠分别向正常水平方向进行调节。

表 1 桂枝汤对发热大鼠体温的影响 (℃, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	体温			
		基础	造模 3.5h	药后 4h	升高差值
正常	10	37.01±0.59	37.07±0.51	37.15±0.51	0.14±0.37
发热	10	37.08±0.42	38.45±0.28	38.92±0.26**	1.84±0.54**
桂枝汤	10	37.10±0.38	38.35±0.33	38.42±0.30 [△]	1.32±0.31 [△]

注:与正常组比较,**P*<0.05,***P*<0.01;与发热组比较,[△]*P*<0.05

表 2 桂枝汤对低体温大鼠体温的影响 (℃, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	体温		
		基础	药后 2.5h	降低差值
正常	10	36.87±0.40	37.50±0.43	-0.63±0.64
低温	10	36.89±0.32	35.39±0.60*	1.50±0.71*
桂枝汤	11	36.95±0.28	36.19±0.54 [△]	0.76±0.53 [△]

注:与正常组比较,**P*<0.01;与低温组比较,[△]*P*<0.05

2 桂枝汤对发热、低体温大鼠下丘脑中 AC、PDE 活性的影响 见表 3、4。桂枝汤对酵母诱导发热大鼠下丘脑中 AC 活性有显著的降低作用,而对安痛定诱导的低体温大鼠下丘脑中 AC 活性有显著升高的作用。但桂枝汤对两种模型大鼠下丘脑中 PDE 活性影响不明显。

表 3 桂枝汤对发热大鼠下丘脑中 AC、PDE 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	AC 活性	PDE 活性
		(pmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹)	(百分转化率·mg ⁻¹ ·min ⁻¹)
正常	10	2.21±0.23	6.26±0.46
发热	10	2.05±0.18	6.33±0.64
桂枝汤	10	1.69±0.38*	5.92±0.72

注:与发热组比较,**P*<0.05

表 4 桂枝汤对低体温大鼠下丘脑中 AC、PDE 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AC 活性	PDE 活性
		($\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	(百分转化率 $\cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)
正常	10	2.21 ± 0.23	6.26 ± 0.46
低温	10	2.07 ± 0.48	6.55 ± 0.55
桂枝汤	11	$2.56 \pm 0.18^*$	6.14 ± 0.69

注 与低温组比较, * $P < 0.05$

讨 论

cAMP 是目前国内学者很重视的中枢发热介质。蔡群等证实中枢注射活性稳定的 cAMP 衍生物 (db-cAMP) 不仅引起发热, 而且有 db-cAMP 热限的形成⁽⁷⁾。有人发现高温环境造成的过热则没有脑脊液 cAMP 含量的相应变化, 这表明在中枢 cAMP 升高与体温升高的因果关系中, 是 cAMP 增多引起体温升高, 而不是体温升高引起 cAMP 的增多⁽³⁾。我们以往的实验表明, 桂枝汤对体温具有双向调节作用, 并发现它可使发热动物下丘脑中异常增多的 cAMP 含量降低, 使低体温动物下丘脑中不足的 cAMP 含量升高⁽⁴⁾。cAMP 的含量是由 AC 和 PDE 的活性所决定, 前者能促进 cAMP 的合成, 而后者能促进 cAMP 的分解。为探讨桂枝汤为何能使造模动物下丘脑中 cAMP 含量向正常水平方向移动, 特对在同样样本中的 AC 和 PDE 活性进行了测定。结果显示, 桂枝汤在对两种模型不同体温状态的大鼠呈现解热或升温作用的同时, 对酵母诱导的发热大鼠 (下丘脑中 cAMP 含量异常升高), 可显著抑制 AC 活性; 而对安痛定诱导的低体温大鼠 (下丘脑中 cAMP 含量异常降低), 又可显著增强 AC 活性。但从实验可知, 桂枝汤对 PDE 活性的影响并不明显。因此, 我们认为桂枝汤对发热、低体温动物下丘脑中 cAMP 含量的双向调节主要是通过其对下丘脑中 AC 活性双向性影响来实现的, 即通过抑制发热大鼠下丘脑中 AC 活性, 使其中 cAMP 的合成减少, 从而达到降低该部位异常升高的 cAMP 含量; 通过促进低体温大鼠下丘脑中 AC 活性, 使其中 cAMP 的合成增多, 从而达到回升该部位异常降低的 cAMP 含量, 最终发挥其双向调节体温的作用。

AC 促进 cAMP 的生成, PDE 促进 cAMP 的分解, 在生理状态下, 这种合成与分解的速度应该有一个平衡点, 这种平衡保证了 cAMP 含量在正常范围内的小幅度波动。实验中模型动物发热和低体温的形成, 可

能正是由于这种平衡被破坏。然而, 本研究发现发热及低温模型大鼠 AC 与 PDE 活性与正常组比较, 其差异并无显著性。因此, 我们推测 AC 或 PDE 活性可能存在一个时相的变化过程, 即是从平衡→打破平衡→重建平衡的发展过程。而在上述实验中, 其处死动物时间可能正处于动物重建平衡阶段。为验证这一考虑, 我们又设计了另一个实验, 以此观察两种模型大鼠在不同时段下丘脑中 AC、PDE 的活性变化 (待发表资料)。结果发现在酵母致发热动物中, AC 活性在造模后 3h 达峰值 (与正常组比较, $P < 0.05$), 其后活性迅速下降, 至 5.5h 达最低谷 (与正常组比较, $P < 0.05$; 我们认为这可能是动物热限形成的主要原因之一), 其后活性逐渐回升接近正常水平, PDE 在整个过程中变化不大; 而在安痛定致低体温动物中, AC 活性在 45min 时降至低谷 (与正常组比较, $P < 0.05$), 之后活性逐步回升。1.5、3.5、5.5h 时 AC 的活性虽均低于正常, 但差异无显著性。在整个实验中, PDE 活性在正常水平上下小幅度波动。而本实验所测定的 AC 及 PDE 活性值分别是酵母造模后 7.5h 及安痛定造模后 2.5h, 此时 AC 活性均从低位回升至正常水平附近, 已与正常组无明显差异。

参 考 文 献

1. 杨惠玲, 潘景轩, 吴伟康主编. 高级病理生理学. 北京: 北京科学出版社, 1998: 102—103.
2. 杜葵琴, 邢德君, 计国仪, 等. 家兔发热时不同脑区组织腺苷酸环化酶和丘脑下部磷酸二酯酶活性的变化. 白求恩医科大学学报 1992; 18(1): 21—23.
3. 徐方云, 李楚杰. 家兔 EP 性发热时血浆、脑脊液和不同脑区组织 cAMP 含量的变化. 中国病理生理杂志 1997; 13(1): 52—55.
4. 富杭育, 周爱香, 查显元, 等. 桂枝汤对体温双向调节作用机理探讨——对下丘脑和血浆中环核苷酸的影响. 中药药理与临床 1994; (4): 1—4.
5. 张书岭, 尹桂山. 组织匀浆腺苷酸环化酶的简易测定法. 河北医学院学报 1991; 12(2): 18—20.
6. 张林华, 吴兆峰, 刘秉文, 等. 一种快速可靠的 3, 5—cAMP 磷酸二酯酶活力测定法. 生物化学与生物物理进展 1986; (3): 58—61.
7. 蔡 群, 李楚杰. cAMP 热限及其与致热原热限的关系研究. 中国病理生理杂志 1988; 4(1): 18—20.

(收稿 2000—06—20 修回 2000—11—01)