

# 连翘酯苷 A 对酵母致热小鼠体温及 TRPA1 的影响

苏红昌<sup>1,2</sup>, 万红叶<sup>2</sup>, 刘翠玲<sup>2</sup>, 孔祥英<sup>2\*</sup>, 林娜<sup>2\*</sup>

(1. 承德医学院, 河北承德 067000; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** **目的:**通过观察连翘酯苷 A (forsythiaside A, FA) 对酵母致热小鼠体温的影响以及体温调节中枢及外周温度敏感瞬时感受器电位离子通道 (transient receptor potential, TRP) A<sub>1</sub> 表达影响, 明确 FA 的解热作用及可能的机制。**方法:**60 只雄性 C57BL/6 小鼠随机平均分为以下 6 组, 分别为正常组, 模型组, FA 不同剂量组 (2, 4, 8 mg·kg<sup>-1</sup>) 和阳性药阿司匹林组 (90 mg·kg<sup>-1</sup>)。除正常组外, 其他 5 组小鼠以背部皮下注射酵母混悬液法建立发热模型, 并于造模前以及造模后 17~22 h 检测小鼠体温情况; 造模后 22 h 处死小鼠, 取下丘脑和背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG), 通过免疫组化和 Western blot 方法检测 TRPA<sub>1</sub> 的表达水平。**结果:**与正常组比较, 注射酵母后模型组小鼠体温明显上升, 17 h 达到高峰期 ( $P < 0.01$ ), 下丘脑和背根神经节中 TRPA<sub>1</sub> 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, FA 剂量 4, 8 mg·kg<sup>-1</sup> 可显著降低酵母引起的小鼠体温升高, 上调下丘脑体温调节主要神经核团下丘脑室旁核 (PVN) 和视上核 (SO), 以及外周 DRG 中 TRPA<sub>1</sub> 水平 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。**结论:**FA 能降低酵母致热小鼠的体温, 其作用可能与其对下丘脑和 DRG 中 TRPA<sub>1</sub> 的有效调节有关。

**[关键词]** 连翘酯苷 A; 酵母; 瞬时感受器电位离子通道 A<sub>1</sub>

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)01-0134-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016010134

## Effect of Forsythiaside A on Temperature and Expression of TRPA1 in Mice with Yeast Induced Pyrexia

SU Hong-chang<sup>1,2</sup>, WAN Hong-ye<sup>2</sup>, LIU Cui-ling<sup>2</sup>, KONG Xiang-ying<sup>2\*</sup>, LIN Na<sup>2\*</sup>

(1. Chengde Medical University, Chengde 067000, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of forsythiaside A (FA) on body temperature, heat-regulating center and temperature-sensitive transient receptor potential (TRP) A<sub>1</sub> expression of mice with yeast induced fever, so as to elucidate the mechanism of the antipyretic effect and potential mechanism of FA. **Method:** Sixty male C57BL/6 mice were randomly divided into six groups: normal group, model group, different dosages (2, 4, 8 mg·kg<sup>-1</sup>) of FA-treated group, aspirin group (as the positive control, 90 mg·kg<sup>-1</sup>), with 10 mice in each group. The pyrexia model was induced by injection of yeast suspension subcutaneously. Rectal temperature was recorded before and 17-22 h after pyrexia induction. At the 22 h after injection of yeast, the mice were sacrificed to collect their hypothalamus and dorsal root ganglion (DRG). The expression of TRPA<sub>1</sub> was detected by immunohistochemistry and Western blot. **Result:** Compared with the normal group, the rectal temperature of the mice in the model group notably increased after injection of yeast, reaching the peak at 17 h ( $P < 0.01$ ). In the meanwhile, the TRPA<sub>1</sub> level in hypothalamus and DRG of the model group significantly reduced. Compared with the model group, FA (4, 8 mg·kg<sup>-1</sup>) group showed significant decrease in the elevated temperature of mice

**[收稿日期]** 20150929(014)

**[基金项目]** 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (Z02096)

**[第一作者]** 苏红昌, 在读硕士, 中药药理及药性理论研究, E-mail: suhongchang138@163.com

**[通讯作者]** \* 孔祥英, 博士, 副研究员, 从事中药药理研究, E-mail: kongu0051@163.com;

\* 林娜, 博士, 研究员, 博士生导师, 从事中药药性理论和中药药理研究, Tel: 010-64014411-2869, E-mail: linna888@163.com

induced by yeast, and up-regulation in the expression of TRPA<sub>1</sub> in paraventricular nuclei (PVN), supraoptic nucleus (SO) and DRG ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** FA can reduce the temperature of fevered mice induced by yeast, which may be related to their effective regulation of TRPA<sub>1</sub> in hypothalamus and DRG.

[**Key words**] forsythiaside A; yeast; transient receptor potential A<sub>1</sub>

连翘是常用中药,性味苦寒,具有清热解毒、消肿散结、疏散风热等功效,临床中广泛用于对发热、急性感染性疾病等的治疗。连翘酯苷 A (forsythiaside A, FA) 是连翘的主要有效成分之一,研究证明其具有抗炎、抗感染、抗氧化和抗病毒等药理作用<sup>[1-4]</sup>。同时 FA 也是多种清热解毒配方制剂中的有效成分之一,但其对发热的作用尚未见报道。目前对于解热作用机制的研究主要集中于对炎症以及致热介质方面,而瞬时感受器电位离子通道蛋白(transient receptor potential, TRP)是近年发现的具有温度感知功能的蛋白,其广泛分布在体温调节通路上。本研究借助酵母致热小鼠模型,观察 FA 对发热小鼠体温调节的影响,并从体温调节中枢(下丘脑)及背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)2个方面研究温度敏感 TRPA<sub>1</sub> 表达的变化,探索其可能的作用机制,为 FA 的制剂研发及临床应用提供参考。

## 1 材料

**1.1 动物** C57BL/6 小鼠,雄性,体重(20 ± 2) g,中国食品药品检定研究院,SPF 级,动物合格证号 SCXK(京)2009-0017。

**1.2 药物及试剂** FA(中国食品药品检定研究院,批号 79916-77-1),酵母(安琪酵母股份有限公司,批号 CA10193),兔抗 TRPA<sub>1</sub> 抗体(以色列 Alomone labs 公司,批号 ACC037AN1002),RIPA 裂解液(批号 C1053),Bradford 蛋白定量试剂盒(批号 D1510)和 ECL 发光液(批号 P1010)均购自北京普利莱公司;辣根酶标记山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 ZB-2301),其他试剂均为国产分析纯。

**1.3 仪器** Power Pac™ Basic 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司),TD5A-WS 型低速台式离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司),MC-347 型电子体温计(欧姆龙有限公司)。

## 2 方法

**2.1 酵母致发热模型** 参照文献[5]方法,健康成年雄性 C57BL/6 小鼠,背部 *ih* 20% 酵母混悬液 10 mL·kg<sup>-1</sup>。正常组小鼠 *ih* 等体积生理盐水。

**2.2 分组与给药** 60 只小鼠随机分为 6 组,分别

为正常组,模型组,FA 不同剂量组(2,4,8 mg·kg<sup>-1</sup>)和阿司匹林组(90 mg·kg<sup>-1</sup>),每组 10 只。除正常组外,其他各组小鼠均 *ih* 酵母混悬液,造模后 16 h 分别腹腔注射不同剂量 FA(2,4,8 mg·kg<sup>-1</sup>)或者 *ig* 给予阿司匹林。正常组和模型组分别给予同体积的蒸馏水。

**2.3 体温监测** 将小鼠进行适应性饲养 3 d 后,禁食不禁水 12 h,实验当日,每隔 1 h 测体温 1 次,共测 3 次,取均值作为基础体温,3 次体温浮动超过 0.5 °C 者剔除。造模 16 h 后每隔 1 h 测体温 1 次,持续 6 h。

**2.4 免疫组化染色** 于造模后 22 h 处死动物,取脑和背根神经节,4% 多聚甲醛溶液固定 48 h,石蜡包埋,5 μm 冠状面连续切片。取组织石蜡切片,脱蜡至水,PBS 冲洗 3 次,0.01 mol·L<sup>-1</sup> 柠檬酸缓冲液进行抗原修复,3% 的过氧化氢灭活内源性过氧化物酶室温孵育 10 min,PBS 洗涤后用 5% 血清封闭,滴加一抗(1:100 稀释),置 4 °C 过夜。用两步法免疫组化检测试剂盒进行下丘脑和 DRG 免疫组织化学染色。DAB 显色,脱水,透明,封片。应用专业图像分析软件 Image proplus6.0 测得免疫组化图像中阳性区域积分吸光度 IA,下丘脑和背根神经节组织分别在 200,400 倍视野下进行统计。

**2.5 Western blot 检测** 分别从下丘脑和 DRG 组织中提取蛋白,Bradford 蛋白质定量方法进行蛋白定量。10% 的 SDS-PAGE 电泳检测,湿法转移至 PVDF 膜,脱脂奶粉室温封闭 2 h,分别加入一抗(兔抗 TRPA<sub>1</sub> 或兔抗 GAPDH),4 °C 孵育过夜。TBST 洗膜后加入二抗(HRP 标记山羊抗兔二抗),室温孵育 2 h。TBST 洗涤 5 次后,ECL 发光法检测特异性条带,Quanti Scan 3.0 分析软件分析条带 IA。以目的蛋白的 IA/正常组的 IA 以校正误差,所得结果代表目的蛋白相对表达量。

**2.6 统计学分析** 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对酵母致热小鼠体温的影响** 与正常组比较,模型组小鼠经酵母诱导后 6 h 体温开始升高,17 h

时达到高温平台期,持续 2~3 h 后开始下降,观察期内每个时间点与正常组都有统计学的极显著差异( $P < 0.01$ )。与模型组比较,各剂量的 FA 腹腔给药后,观察期内均能不同程度降低发热小鼠的体温,

呈现一定的剂量依赖性;而作用时间点方面,造模后 19 h 降温作用最显著( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。阳性药阿司匹林也表现出很好的降低小鼠体温的作用,但持续时间较短,仅为 5 h。见表 1。

表 1 FA 对酵母诱导发热小鼠体温的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effects of forsythiaside A on body temperature of yeast-induced mice( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	0 h	17 h	18 h	19 h	20 h	21 h	22 h
正常	-	36.68 ± 0.34	36.08 ± 0.44	36.64 ± 0.63	36.94 ± 0.55	36.96 ± 0.51	36.90 ± 0.62	36.78 ± 0.19
模型	-	37.10 ± 0.29	38.38 ± 0.20 <sup>1)</sup>	38.65 ± 0.48 <sup>1)</sup>	38.67 ± 0.25 <sup>1)</sup>	38.38 ± 0.21 <sup>1)</sup>	38.17 ± 0.29 <sup>1)</sup>	37.98 ± 0.31 <sup>1)</sup>
阿司匹林	90	37.19 ± 0.23	37.64 ± 0.41 <sup>3)</sup>	37.30 ± 0.37 <sup>3)</sup>	37.80 ± 0.14 <sup>3)</sup>	37.56 ± 0.35 <sup>3)</sup>	37.80 ± 0.12 <sup>2)</sup>	37.68 ± 0.40
FA	2	37.04 ± 0.36	38.10 ± 0.56	38.45 ± 0.26	38.20 ± 0.22 <sup>3)</sup>	37.75 ± 0.57 <sup>2)</sup>	37.73 ± 0.38	37.51 ± 0.31 <sup>2)</sup>
	4	36.85 ± 0.51	37.98 ± 0.32 <sup>2)</sup>	38.63 ± 0.26	38.03 ± 0.38 <sup>3)</sup>	37.53 ± 0.53 <sup>3)</sup>	37.45 ± 0.51 <sup>2)</sup>	37.20 ± 0.38 <sup>3)</sup>
	8	37.01 ± 0.24	37.82 ± 0.58 <sup>2)</sup>	38.53 ± 0.35	37.83 ± 0.44 <sup>3)</sup>	37.31 ± 0.58 <sup>3)</sup>	37.55 ± 0.65 <sup>2)</sup>	37.48 ± 0.50 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup> $P < 0.01$ (图 1~4 同)。

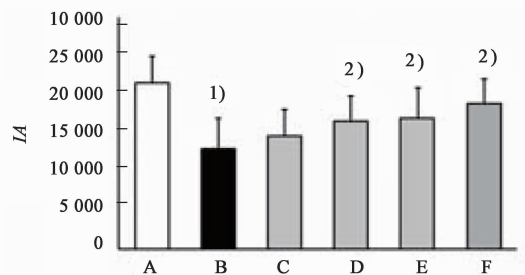
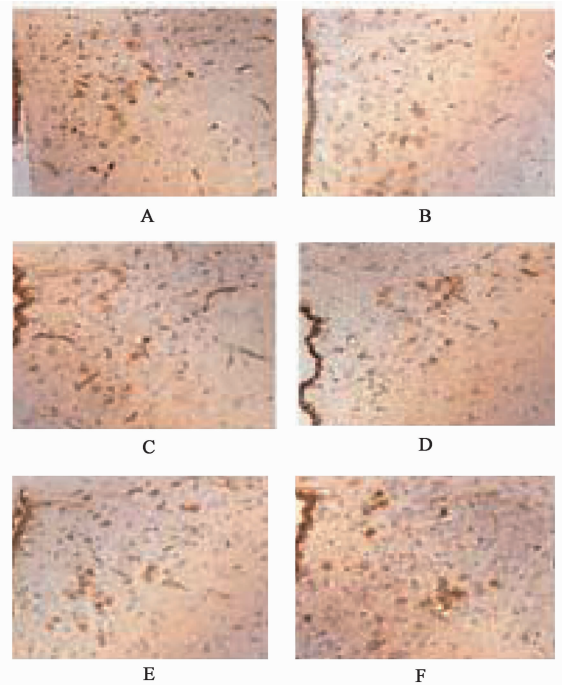
**3.2 对小鼠下丘脑 TRPA<sub>1</sub> 表达的影响** 经酵母诱导发热后,小鼠下丘脑主要体温调节神经核团下丘脑室旁核(PVN)和视上核(SO)的 TRPA<sub>1</sub> 的表达明显降低( $P < 0.01$ );而给予 4,8 mg·kg<sup>-1</sup>剂量的 FA 可以显著提高上述脑核团中 TRPA<sub>1</sub> 的表达( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );阿司匹林也具有类似的调节作用。见图 1,2。

**3.3 对小鼠 DRG 中 TRPA<sub>1</sub> 表达的影响** 经酵母诱导发热后,TRPA<sub>1</sub> 在小鼠 DRG 中的表达显著降低( $P < 0.01$ );而 4,8 mg·kg<sup>-1</sup>剂量的 FA 可以显著提高 TRPA<sub>1</sub> 的表达( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );这与下丘脑中的表达趋势一致;阿司匹林也具有显著提高 TRPA<sub>1</sub> 表达的作用。见图 3。

**3.4 对小鼠下丘脑和 DRG 中 TRPA<sub>1</sub> 的表达** 与正常组比较,模型组中下丘脑和 DRG 中 TRPA<sub>1</sub> 的表达均显著降低( $P < 0.01$ );而 4,8 mg·kg<sup>-1</sup>剂量的 FA 能显著提高 TRPA<sub>1</sub> 的表达( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ , 与模型组比较),这与免疫组化方法检测的结果基本一致。见图 4。

#### 4 讨论

发热是由于内源性或者外源性致热源作用使体温调定点上移而引起的调节性体温升高,是多种疾病的重要病理过程和临床表现,也是疾病发生的重要信号。持续高热可引起代谢障碍以及各系统功能紊乱,甚至威胁生命。因此发热机制的探讨以及解热药的研究与开发一直是学者们关注的热点。目前以 NSAID 为代表的解热镇痛剂是临床应用最多、最广泛的一类药物。但其具有严重的胃肠道反应等副



A. 正常组; B. 模型组; C. 阿司匹林组; D. FA 2 mg·kg<sup>-1</sup>组; E. FA 4 mg·kg<sup>-1</sup>组; F. FA 8 mg·kg<sup>-1</sup>组(图 2~4 同)

图 1 FA 对酵母诱导发热小鼠下丘脑神经核团 PVN 中 TRPA<sub>1</sub> 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 1 Effect of FA on expression of TRPA<sub>1</sub> in PVN of yeast-induced mice( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

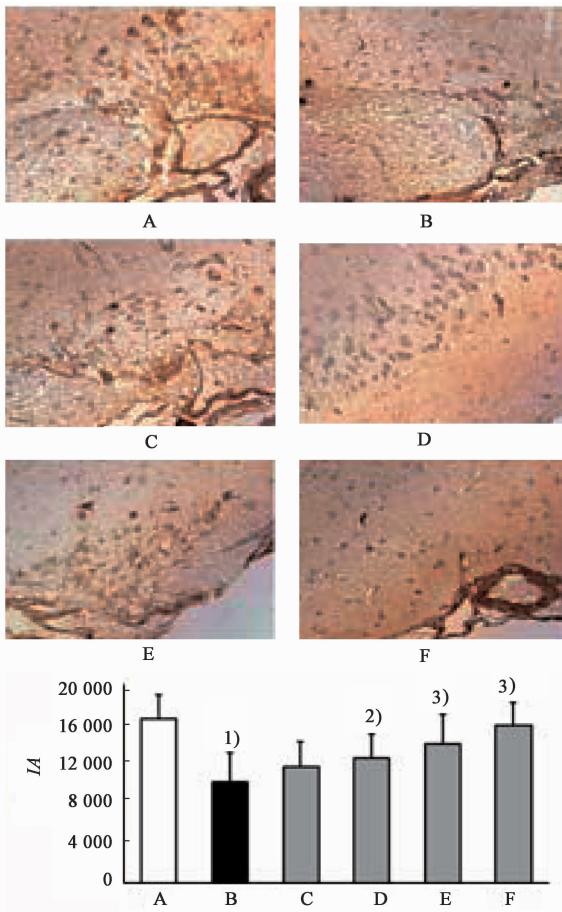


图 2 FA 对酵母诱导发热小鼠下丘脑神经核团 SO 中 TRPA<sub>1</sub> 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 2 Effect of FA on expression of TRPA<sub>1</sub> in SO of yeast-induced mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

作用。中药及其主要有效成分以其安全、有效性等诸多优势受到医学界普遍关注。连翘是清热解毒的常用中药,研究证明其主要有效成分 FA 有抗炎、抗氧化等作用,但其解热作用未见报道。本研究通过皮下注射酵母的方法成功复制了小鼠发热模型,并借此模型观察到 FA 腹腔注射显著抑制由酵母诱导的小鼠体温异常升高,提示 FA 具有较好的解热作用。

TRP 是近年来发现存在于细胞膜或胞内细胞器膜上的阳离子非选择性通道。TRP 家族中多个家庭成员具有温度感知的生理功能,其中 TRPA<sub>1</sub> 在温度低于 17 °C 时被激活,辣椒素、肉桂油等天然的辛辣成分也可激活。它还参与疼痛的感觉传导,并且与炎症反应相关<sup>[6-8]</sup>。研究已证明 TRPA<sub>1</sub> 的激动剂 Icilin 可以诱导大鼠发热<sup>[9]</sup>。下丘脑是体温调控的高级中枢,尤其一些神经核团在体温调控中发挥重要作用,如下丘脑室旁核 PVN,视上核 SO 和视前区-

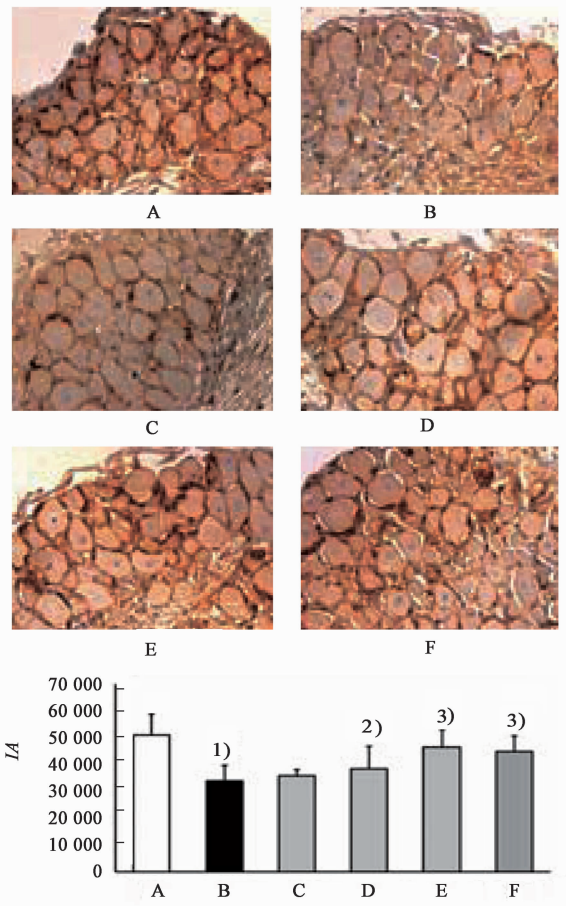


图 3 FA 对酵母诱导发热小鼠 DRG 中 TRPA<sub>1</sub> 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 3 Effect of FA on expression of TRPA<sub>1</sub> in DRG of yeast-induced mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

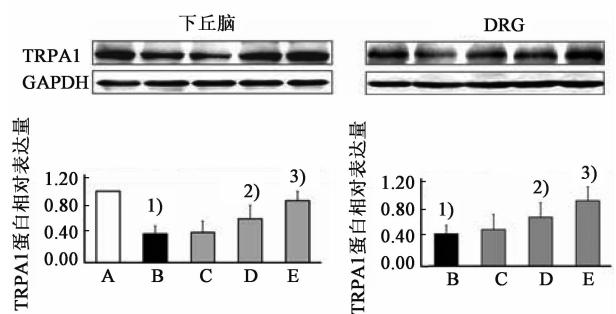


图 4 FA 对酵母诱导发热小鼠下丘脑和 DRG 中 TRPA<sub>1</sub> 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 4 Effect of FA on expression of TRPA<sub>1</sub> in hypothalamus and DRG ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

下丘脑前部 (preoptic-anterior hypothalamus area, PO/AH)。PVN 主要在体温异常时发挥作用,而不仅在体温的日节律性调节。文献报道温度敏感性蛋白 TRPA<sub>1</sub> 在体温调节中枢有丰富的表达。笔者的结果也表明,正常小鼠的体温调节中枢如下丘脑以

及特异性核团 PVN, SO 有一定水平的 TRPA<sub>1</sub> 表达, 经酵母诱导体温升高后, TRPA<sub>1</sub> 的表达显著降低; 而给予 FA 可以不同程度提高 TRPA<sub>1</sub> 的表达, 8 mg · kg<sup>-1</sup> FA 达到与阳性药阿司匹林接近的水平。

除中枢部位在温度感受以及体温调节中发挥重要作用外, 外周如 DRG 也存在丰富的温度感知神经元, 它们接受外周初级感觉信息的传入, 而整合传送到脊髓等中枢, 进而调节机体对温度反应。既往研究证明 DRG 神经元具有丰富的 TRPA<sub>1</sub> 的表达<sup>[10]</sup>, 且其介导温度、机械以及炎症等外周刺激的传入。笔者的实验结果发现, 经酵母诱导后, 小鼠体温升高到 38.5 °C, 同时 DRG 中 TRPA<sub>1</sub> 的表达显著降低。而经 FA 治疗后, 随着发热小鼠体温的抑制, DRG 中 TRPA<sub>1</sub> 的表达也明显升高, 这与高级中枢神经核团 PVN, SO 的表达呈现基本一致的趋势。

综上所述, 连翘的有效成分 FA 能有效降低由酵母诱导的发热小鼠的体温; FA 发挥解热作用的机制可能与其提高体温调控高级中枢下丘脑 PVN 和 SO 核团以及外周温度感受神经元 DRG 中 TRPA<sub>1</sub> 的表达有关。相关作用机制有待进一步的研究证实。

[参考文献]

[ 1 ] Cheng G, Zhao Y, Li H, et al. Forsythiaside attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in the bursa of Fabricius of chickens by downregulating the NF-kappaB signaling pathway [ J ]. *Exp Ther Med*, 2014, 7(1) :179-184.

[ 2 ] Lu T, Piao X L, Zhang Q, et al. Protective effects of *Forsythia suspensa* extract against oxidative stress induced by diquat in rats [ J ]. *Food Chem Toxicol*,

2010, 48(2) :764-770.

[ 3 ] Qu H, Zhang Y, Wang Y, et al. Antioxidant and antibacterial activity of two compounds ( forsythiaside and forsythin ) isolated from *Forsythia suspensa* [ J ]. *J Pharm Pharmacol*, 2008, 60(2) :261-266.

[ 4 ] Wang H M, Wang L W, Liu X M, et al. Neuroprotective effects of forsythiaside on learning and memory deficits in senescence-accelerated mouse prone (SAMP8) mice [ J ]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2013, 105:134-141.

[ 5 ] 潘思源. 各种酵母的致热作用 [ J ]. *中国药理学通报*, 2008, 5(4) :252-255.

[ 6 ] Asgar J, Zhang Y, Saloman J L, et al. The role of TRPA<sub>1</sub> in muscle pain and mechanical hypersensitivity under inflammatory conditions in rats [ J ]. *Neuroscience*, 2015, 310:206-215.

[ 7 ] Fajardo O, Meseguer V, Belmonte C, et al. TRPA<sub>1</sub> channels mediate cold temperature sensing in mammalian vagal sensory neurons: pharmacological and genetic evidence [ J ]. *J Neurosci*, 2008, 28 ( 31 ) : 7863-7875.

[ 8 ] Honda K, Shinoda M, Furukawa A, et al. TRPA<sub>1</sub> contributes to capsaicin-induced facial cold hyperalgesia in rats [ J ]. *Eur J Oral Sci*, 2014, 122(6) :391-396.

[ 9 ] Ding Z, Gomez T, Werkheiser J L, et al. Icilin induces a hyperthermia in rats that is dependent on nitric oxide production and NMDA receptor activation [ J ]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 578(2/3) :201-208.

[ 10 ] Zhao M, Isami K, Nakamura S, et al. Acute cold hypersensitivity characteristically induced by oxaliplatin is caused by the enhanced responsiveness of TRPA<sub>1</sub> in mice [ J ]. *Mol Pain*, 2012, doi: 10. 1186/1744-8069-8-55.

[责任编辑 周冰冰]