

龙胆碱的解热作用及机制研究

刘学伟,曹敏,刘树民*

(黑龙江中医药大学中医药研究院,哈尔滨 150040)

[摘要] **目的:**比较龙胆水提液,龙胆碱及龙胆苦苷解热作用的差异,初步探讨龙胆碱的解热作用机制。**方法:**雄性 SD 大鼠,经筛选后随机分为空白对照组、发热模型组、龙胆碱组、龙胆苦苷组及龙胆水提组,采用干酵母皮下注射方法制备发热模型,于模型制备后 6 h,分别 ip 龙胆碱溶液($100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、龙胆苦苷溶液($200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)及 ig 龙胆水煎液($4\ 000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)后分别于各个时间点监测直肠温度,比较三者作用的差异性;采用放射免疫法测定大鼠血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1(IL-1)、白介素-6(IL-6)及下丘脑内环磷酸腺苷(cAMP)、前列腺素 E_2 (PGE $_2$)含量。**结果:**龙胆碱、龙胆苦苷、龙胆水提液,均能降低发热模型大鼠体温,三者对体温指数(TRI9)的影响分别为: $0.86 \pm 0.32, 1.56 \pm 0.27, 1.47 \pm 0.31$,与模型组比较,其差异具有显著性($P \leq 0.05$);放射免疫结果显示,给药组 IL-6、PGE $_2$ 含量分别为(42.46 ± 3.84), (103.30 ± 7.38) $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$,含量明显低于模型组,其差异具有显著性($P < 0.05$)。**结论:**龙胆碱、龙胆苦苷及龙胆水提液均具有一定的解热作用,但龙胆碱的解热作用强于后者,龙胆碱可能是中药龙胆解热作用的更直接物质;龙胆碱的解热作用机制可能与降低血清中 IL-6 水平,进而影响下丘脑 PGE $_2$ 含量有关。

[关键词] 龙胆碱;龙胆苦苷;干酵母;解热作用

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)24-0128-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20111017.0941.007 **[网络出版时间]** 2011-10-17 9:41

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20111017.0941.007.html>

Study on Antipyretic Effect and Its Mechanism of Gentianine

LIU Xue-wei, CAO Min, LIU Shu-min*

(Research Institute of Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To study the antipyretic effect and the mechanism of gentianine by comparing with variances of the antipyretic effect among from water extract of Gentianae Radix Et Rhizoma, gentianine and gentiopicroside. **Method:** The rat febrile models induced by injecting fresh yeast subcutaneously and treated with gentianine, gentiopicroside intraperitoneally and fed with water extract of Gentianae Radix Et Rhizoma, then the rectal temperature was monitored to show the differences of effect from those groups. The contents of tumor necrosis factor(TNF- α), interleukin-1(IL-1), interleukin-6(IL-6) in blood serum and cyclic adenosine monophosphate(cAMP), prostaglandin E_2 (PGE $_2$) in the hypothalamus were measured by radioimmunoassay(RIA), respectively. **Result:** Three drug administration groups(including gentianine, gentiopicroside and water extract of Gentianae Radix Et Rhizoma) showed marked antipyretic effect on the yeast-induced fever($P < 0.05$) and the effects were stronger on the gentianine group than other treated groups. Each treatment group showed remarkable decreased the contents of IL-6 in blood serum and PGE $_2$ in the hypothalamus of febrile rats. **Conclusion:** Gentianine, gentiopicroside and water extract of Gentianae Radix Et Rhizoma all have obvious antipyretic effect, but the effect of gentianine is strongest of

[收稿日期] 20110623(008)

[基金项目] 国家教育部科技重点项目(207029)

[通讯作者] *刘树民,教授,博士生导师,主要从事中药药性物质基础及中药药理学研究, Tel:0451-82196224, E-mail:lsm@hljucm.net

them and probably plays a more direct role in the antipyretic effect from *Gentianae Radix Et Rhizoma*, which might be related with decreasing the levels of IL-6 in serum and the interfering the content of PGE₂ in the hypothalamus.

[**Key words**] gentianine; gentiopicroside; fresh yeast; antipyretic effect

龙胆为东北道地药材,具有清肝泻火之功,临床用于治疗肝火上炎所致的肝胆实火及湿热下注所致下焦湿热等证,有研究表明,龙胆水提液及龙胆泻肝复方制剂具有解热作用,多数学者认为,龙胆苦苷是龙胆中主要的活性成分,对其抗炎、保肝作用等亦有多方面的证实^[1-3];有文献报道龙胆苦苷经肠道菌群代谢后的产物之一为龙胆碱^[4],龙胆碱具有一定的抗高热惊厥及神经元保护作用^[5-6],本实验小组预实验结果显示,龙胆碱具有明显的解热作用。因此,本研究采用干酵母制备发热模型,比较龙胆水提液,龙胆碱及龙胆苦苷解热作用的差异,初步探讨龙胆碱的解热作用及机制,为高热惊厥的预防给药提供依据。

1 材料

1.1 动物 SD大鼠,雄性,体重(200±20)g,黑龙江中医药大学实验动物中心提供,清洁级,许可证号SCXK(沪)2006-003,大鼠于药物安全性评价中心实验室饲养,给予标准饲料和饮用水,室内温度为(22±1)℃、相对湿度为40%。

1.2 药物及试剂 龙胆药材购于哈尔滨市田园药材公司,经黑龙江中医药大学学生药学教研室王振月教授鉴定为正品龙胆 *Gentiana scabra* Bge.,质量符合2005年版《中国药典》一部相关规定;高活性干酵母(安琪酵母股份有限公司);大鼠肿瘤坏死因子-α(TNF-α),白介素-1(IL-1),白介素-6(IL-6),环磷酸腺苷(cAMP),前列腺素E₂(PGE₂)放免测试试剂盒由北京华英生物技术所提供;其他试剂均为市售分析纯。

1.3 仪器 MC-612型电子数字式温度计(欧姆龙有限公司),电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),KQ-50B超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),γ-911全自动放免计数器(中国科技大学实业总公司)。

2 方法

2.1 药物的制备

2.1.1 龙胆水提液的制备 称取适量龙胆药材,水煎煮后以16层纱布过滤,烘干成干膏后取适量加

0.9%生理盐水配成4 000 mg·L⁻¹的溶液备用。

2.1.2 龙胆苦苷溶液的制备 参考相关文献^[7]制备龙胆苦苷粗品(纯度经HPLC检测,含量>98%),临用时均以0.9%生理盐水配成200 mg·L⁻¹的溶液备用。

2.1.3 龙胆碱溶液的制备 依据前期实验^[8],其简要过程为:称取适量龙胆药材,粉碎,过(20~40)目筛,以乙醇与某溶剂按一定比例浸泡,80℃下回流提取3次,抽滤,减压回收,得浸膏,烘干至恒重,用酸水溶解,过滤去沉淀,得红棕色液体;将上述液体倒入预先装好的阳离子交换树脂柱中,以适量溶剂梯度洗脱,减压回收得粗品;粗品进行硅胶柱层析,然后依次改变洗脱液极性,薄层定性后合并相同组分,减压回收,得白色针状结晶,即为龙胆碱单体。经mp,UV,IR,1H NMR,¹³C NMR,MS鉴定,纯度经HPLC峰面积归一化法检测^[9],龙胆碱含量>98.4%)。称取适量龙胆碱,加入0.9%生理盐水,超声助溶后配成0.1 mg·L⁻¹的真溶液,至4℃冰箱内备用。

2.1.4 酵母悬液制备 称取干酵母10g,置于乳钵中,逐渐加入0.9%生理盐水磨为均匀的悬浆,最后定容为50 mL(20%),此液体在临用前配置。

2.2 发热模型的建立 参考相关文献^[10],取SD大鼠,以电子数字式温度计测定大鼠肛温,在温度计顶端涂少许液体石蜡,轻缓送入肛门约2 cm,放置约10 s,待电子数字式温度计发出蜂鸣声后读数。每日测定体温2次,连续3 d以上使大鼠适应体温操作,选取基础肛温在(37.0~38.0)℃、波动在0.5℃以内者纳入实验。将入选鼠随机分为空白对照组(25只)、发热模型组(25只)、龙胆碱组(25只),龙胆苦苷组(10只),龙胆水提组(10只)。造模前3 d,每日早晚测量大鼠的肛温,取其平均值作为正常基础体温。采用高活性干酵母造模,用20%干酵母混悬液注射入大鼠背部皮下10 mL·kg⁻¹,制备大鼠干酵母发热模型。

2.3 给药方法及体温监测 结合预实验,于造模后6 h,分别按100,200 mg·kg⁻¹ ip 龙胆碱及龙胆苦苷

溶液,龙胆水提组按 $4\ 000\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 于模型后立即 ig 龙胆碱水提液,对照组及模型组注射同体积生理盐水,于 ip 龙胆碱及龙胆苦苷溶液后 0.5,1.5,3,6 h 各测大鼠肛温 1 次,记录体温变化。

2.4 生物样本处理及检测方法 根据预实验所确定的体温下降期,即药效发挥时间,于给药后 2 h,从空白组、模型组及龙胆碱给药组分别随机选取 15 只大鼠(余者继续监测体温),快速断头处死,接取躯干血,离心分离血清, $-80\ ^\circ\text{C}$ 保存备用供 TNF- α ,IL-1,IL-6 测定。取血后同时迅速于冰浴内取全脑,以灰结节及视交叉之间的中心点为中心确定下丘脑的位置,切取大鼠下丘脑,各称取约 50 mg 组织置于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 冰箱以供下丘脑组织 PGE₂,cAMP 含量测定。参照试剂盒说明书,所有样品由北京英华生物公司代测。

2.5 统计方法 应用 SPSS 14.0 软件进行统计学

处理,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均数差异比较采用 *t* 检验,多组均数间差异比较采用 ANOVA 分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 龙胆碱、龙胆苦苷及龙胆水提液解热作用 监测大鼠发热过程中体温变化,记录每只大鼠各时间点体温值,将同一时间点各个样本取平均值,作 *t* 检验,见表 1,同时计算体温发热指数(TRI₀),见表 2。造模后 6 h 大鼠体温达到最高值,龙胆碱组给药后 0.5 h 体温开始下降,至 3 h 后体温开始回升,但仍低于模型组($P < 0.05$);龙胆苦苷组及龙胆水提液组给药后,约 1.5 h 后起效,两组与模型组比较,体温有所降低,其差异具有显著性($P < 0.05$),龙胆碱与龙胆苦苷、龙胆水提液比较,解热作用更加明显,其差异具有显著性($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠直肠温度的比较($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	给药剂量 /mg·kg ⁻¹	基础体温 /°C	直肠温度/°C				
			造模后 6 h	给药后 0.5 h	给药后 1.5 h	给药后 3 h	给药后 6 h
对照	-	37.41 ± 0.52	37.60 ± 0.45	37.10 ± 0.26	37.44 ± 0.32	37.35 ± 0.24	37.30 ± 0.31
模型	-	37.51 ± 0.21	39.04 ± 0.35	39.32 ± 0.41	39.25 ± 0.35	39.47 ± 0.36	39.27 ± 0.23
龙胆碱	100	37.80 ± 0.32	39.30 ± 0.30	37.84 ± 0.46 ^{1,2,3)}	37.92 ± 0.28 ^{1,2,3)}	38.48 ± 0.45 ¹⁾	38.83 ± 0.52 ¹⁾
龙胆苦苷	200	37.41 ± 0.41	39.23 ± 0.30	39.00 ± 0.46	38.89 ± 0.28 ¹⁾	38.98 ± 0.37 ¹⁾	39.04 ± 0.52
龙胆水提	4 000	37.32 ± 0.26	39.43 ± 0.30	39.44 ± 0.38	38.94 ± 0.26 ¹⁾	38.88 ± 0.25 ¹⁾	38.94 ± 0.44 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$;与苦苷组比较²⁾ $P < 0.05$;与龙胆水提组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

表 2 各给药组对发热大鼠解热的体温反应指数 TRI₀ 的影响($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	$\Delta T/^\circ\text{C}$	TRI ₀ /°C·h ⁻¹
对照	-	0.24 ± 0.14	0.45 ± 0.26
模型	-	2.12 ± 0.25 ¹⁾	8.82 ± 0.48 ¹⁾
龙胆碱	100	0.86 ± 0.32 ³⁾	5.46 ± 0.39 ³⁾
龙胆苦苷	200	1.56 ± 0.27 ²⁾	7.73 ± 0.56
龙胆水提	4 000	1.47 ± 0.31 ²⁾	7.04 ± 0.61 ²⁾

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$;与发热模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 龙胆碱对干酵母发热模型大鼠血清 TNF- α ,IL-1,IL-6 及下丘脑 PGE₂,CAMP 含量的影响。实验结果见表 3,由表 3 可知,龙胆碱组能够明显抑制血清中 IL-6 及下丘脑内 PGE₂ 的含量升高,与模型组比较,差异具有显著性($P < 0.05$);而对下丘脑内 CAMP,血清中 IL-1,TNF- α 含量则无明显影响。

4 讨论

龙胆为东北道地药材,系龙胆科植物龙胆、三花

龙胆、条叶龙胆或坚龙胆的干燥根及根茎,味苦、性寒,具有清肝泻火之功,临床用于治疗肝火上炎所致的肝胆实火及湿热下注所致下焦湿热等证,而龙胆水提液及龙胆复方制剂亦具有解热作用^[11-12]。目前,对于龙胆的化学成分的药理作用研究表明,龙胆中主要活性成分为龙胆苦苷,龙胆苦苷具有抗炎、保肝、镇痛、健胃等诸多药理作用^[1-3],但对其解热作用鲜有报道。本实验研究表明,龙胆水提液、龙胆苦苷均具有一定的解热作用,但作用不明显,结合现有文献,推测其解热作用可能是其抗炎的继发作用。龙胆碱解热作用较强,半数剂量的龙胆碱的解热作用仍强于龙胆苦苷。研究表明^[4],龙胆苦苷在体内经肠道菌群的作用,迅速降解为龙胆碱,因此,推测龙胆苦苷的解热作用可能是通过口服该药后经代谢转变成龙胆碱后而发挥的协同解热作用,而龙胆碱的解热作用更为突出和明显,龙胆碱可能是中药龙胆解热作用的更直接物质。

目前对发热的过程与机制已有较深的认识,发热

表3 龙胆碱对发热大鼠血清及下丘脑各致热因子的影响($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量	PGE ₂	CAMP	IL-6	IL-1	TNF- α
	/mg·kg ⁻¹	/ng·L ⁻¹	/nmol·L ⁻¹	/ng·L ⁻¹	/ μ g·L ⁻¹	/ μ g·L ⁻¹
对照	-	44.89 \pm 4.21 ¹⁾	8.55 \pm 0.12	54.51 \pm 4.11 ¹⁾	0.24 \pm 0.05 ¹⁾	0.96 \pm 1.12 ¹⁾
模型	-	50.84 \pm 6.46	9.65 \pm 1.01	148.41 \pm 8.44	0.35 \pm 0.06	1.24 \pm 0.97
龙胆碱	100	42.46 \pm 3.84 ¹⁾	8.87 \pm 0.57	103.30 \pm 7.38 ¹⁾	0.28 \pm 0.02	1.34 \pm 0.76

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

激活物引发内生致热原细胞分泌内生致热原(EP)(如 IL-1, IL-6, TNF, INF)等, EP 直接或通过中枢介质(PGE₂, cAMP, CRH, AVP 等)间接作用于下丘脑, 进而使体温调定点上移, 机体产热多或散热少, 故引起体温上升。酵母菌作为一种外源性致热原, 皮下注入形成炎症灶, 引起动物体温升高, 此法为长时程热相的经典方法^[10]。研究证实, 酵母菌致热可引起机体诸多 EP 含量改变, 其中, PGE 是体温调节有关的最主要的介质, 尤其是在感染性热中。发热时动物脑脊液内 PGE 水平增高; 应用解热药物退热后, 其 PGE 水平下降。将 PGE 注入不同种属动物体内, 可导致不同的发热效应。解热镇痛药物可抑制合成酶系统, 和体温调节有关的其他中枢介质也和 PGE 有关^[13-14]。因此, 在发热的发病机制中, PGE 占有重要的地位; IL-6 是多种发热的中间物质, 目前已知多种细胞可以自发或在不同刺激后产生 IL-6, 其生物学效应呈现多样性, 在发热机制中具有举足轻重的作用^[15], 由实验在大鼠注入 IL-6 脑室所致的发热可被预用消炎痛所抑制, 而且认为 IL-6 可能通过 PGE 作用于体温调节中枢, 引起发热^[16], 本实验结果显示, 酵母菌致热会引起血清中多种 EP 含量升高, 给药后在体温下降期血清中 IL-6 含量明显降低, 而 PGE₂ 含量也呈下降趋势, 考虑到龙胆碱为单一结构, 存在多靶点的作用的可能性较小, 因此认为龙胆碱可能通过抑制 IL-6 的生成进而阻断 PGE₂, 或直接对抗 IL-6 的作用而发挥解热作用。

[参考文献]

[1] 陈长勋, 刘占文, 孙峥, 等. 龙胆苦苣抗炎药理作用研究[J]. 中草药, 2003, 34(9): 814.
 [2] 刘占文, 陈长勋, 金若敏, 等. 龙胆苦苣的保肝作用研究[J]. 中草药, 2002, 31(1): 47.
 [3] 陈雷, 王海波, 孙晓丽, 等. 龙胆苦苣镇痛抗炎药理作用研究[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20: 903.

[4] 杨肖锋, 宋纯清. 龙胆苦苣的肠内菌群代谢研究[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(11): 673.
 [5] 刘树民, 刘学伟, 姚素媛, 等. 龙胆碱对高热惊厥模型大鼠所致海马区神经细胞损伤的保护作用研究[J]. 中医药学报, 2009, 37(6): 11.
 [6] 姚素媛, 刘学伟, 刘树民, 等. 龙胆碱对高热惊厥模型大鼠脑内氨基酸类神经递质含量及海马区 GABAB、Glu 受体的影响[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(12): 2875.
 [7] 赵勇, 张儒, 孙文基. 大孔吸附树脂富集秦艽叶中龙胆苦苣的工艺研究[J]. 中药材, 2007, 30(12): 1583.
 [8] 刘学伟, 刘天宇, 刘树民. 正交设计法优化龙胆中龙胆碱提取工艺[J]. 中国药房, 2009, 20(33): 2582.
 [9] 韦欣. 粗茎秦艽及其生物碱类成分研究[D]. 成都: 四川大学硕士学位论文. 2005: 27.
 [10] 卢芳, 董培良, 刘树民, 等. 三种热病证候模型最佳造模方法的探索与评价[J]. 山东中医杂志, 2009, 28(2): 114.
 [11] 王德健, 李巧云, 徐世军, 等. 龙胆草水提物的抗炎解热作用研究[J]. 四川省卫生管理干部学院学报, 2007, 26(1): 3.
 [12] 唐卡毅. 龙胆泻肝胶囊、龙胆泻肝汤临床应用研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2009, 18(10): 1197.
 [13] 王宝恩. 内科感染性疾病的中西医结合治疗[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 1987: 20.
 [14] Mackowiak P A, Bartlett J G, Borden E C, et al. Concepts of fever, recent advances and lingering dogma[J]. Clin Infect Dis, 1997, 25(1): 1.
 [15] 李沧海, 霍海如, 姜廷良. 利用基因敲除小鼠研究发热机制的进展[J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(9): 1151.
 [16] Trautwein C, Boker K, Manns M P, et al. Acute phase reaction as a contribution to early mechanisms[J]. Gut, 1994, 35: 1163.

[责任编辑 聂淑琴]