

• 药理 •

桂枝汤对高、低体温大鼠下丘脑组织 转录因子 CREB 的影响

周 军^{1,2}, 李沧海¹, 霍海如^{1*}, 李兰芳¹, 姜 楠¹, 郭建友¹, 何希荣¹, 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. 首都体育学院, 北京 100080)

[摘要] 目的: 探讨体温变化时下丘脑组织中磷酸化 cAMP 反应元件结合蛋白(pCREB)的活性及桂枝汤调节体温作用与此关系。方法: 选用前列腺素受体 3(EP₃) 发热大鼠模型及氨基比林低体温大鼠模型, 采用比色法测定给予桂枝汤后大鼠下丘脑组织中 pCREB 活性。结果: 两种模型下丘脑组织中 pCREB 活性均有升高倾向, 以发热大鼠明显; 给予桂枝汤可使发热大鼠的 pCREB 活性降低, 而低体温大鼠的 pCREB 活性变化不明显。结论: pCREB 参与了大鼠的体温变化过程; 桂枝汤的解热作用可能与降低 pCREB 活性有关; pCREB 基本上不参与低体温机制的调节或仅有较弱调节作用, 桂枝汤的升温作用与其关系不明显。

[关键词] 桂枝汤; 大鼠; 体温; 下丘脑; cAMP 反应元件结合蛋白

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)04-0025-04

Effect of Guizhi Tang on CREB in Hypothalamus in Both Fever and Hypothermia Rats

ZHOU Jun^{1,2}, LI Cang-hai¹, HUO Hai-ru^{1*}, LI Lanfang¹,
JIANG Nan¹, GUO Jian-you¹, HE Xi-rong¹, 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. Capital Institute of Physical Education, Beijing 100080, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the changes of the activity of CREB in both fever and hypothermia Rats and the mechanism of thermoregulatory action of Guizhi Tang. **Methods:** The activity of CREB in hypothalamus in both fever and hypothermia rat pretreated with Guizhi Tang were measured via spectrophotometric method. **Results:** The pCREB activity in both model rats, especially in fever rats, enhanced, and treatment with Guizhi Tang counteracted the rise of pCREB in fever rats but not in hypothermia model. **Conclusion:** CREB may participate in the thermoregulation in rats and reduction in CREB may contributed to antipyretic action of Guizhi Tang, while the hypothermia production may be independent of CREB.

[Key words] Guizhi Tang; Rat; Body Temperature; Hypothalamus; CREB

[收稿日期] 2005-06-22

[基金项目] 国家自然科学基金重大研究计划资助(90209006)

[通讯作者] 霍海如, Tel: (010) 64041008; E-mail: hrhuo@sohu.com

体温变化是许多疾病的重要病理过程, 是下丘脑体温调节中枢调定点上移或下移所引起的调节性机体反应。为探讨桂枝汤对体温的双向调节作用机制, 承接以往的研究结果, 我们就发热过程中, 细胞

信号转导通路终端的核转录因子 cAMP 反应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)的变化及桂枝汤对其的影响进行了探讨。

1 材料与仪器

1.1 药物及试剂 硫前列酮(sulprostone, Sul), 购自 Calman 公司, 批号为 19116a; 氨基比林(aminopyrine, Amp), 北京市东环联合化工厂产品, 批号 990518, 生理盐水配成 10.0g/L 溶液; TransAM™ pCREB Transcription Factor Assay Kits, Lot No. 02901001, 及 Nuclear Extrant Kit, Lot No. 29702005, 均为 Actice Motif 公司产品。

桂枝(*Cinnamomum cassia* Presl, 广西上思)、赤芍(*Paeonia lactiflora* Pall., 内蒙多伦)、甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch., 内蒙古杭锦旗, 由北京卫仁饮片厂蜜制)、生姜(*Zingiber officinale* Rose., 山东莱芜)、大枣(*Ziziphus jujuba* Mill., 山西柳林), 所有药材均经中国中医科学院中药研究所生药室何希荣鉴定。按原方比例 10: 10: 7: 10: 10 配齐药物(生姜切片, 大枣剖开)混合, 加入 5 倍蒸馏水(W/W)浸泡 60min, 快速加热至沸腾, 而后保持微沸状态 15min, 趁热抽滤; 剩余药渣中加入 3 倍蒸馏水, 浸泡 30min, 快速加热至沸, 微沸 10min, 趁热抽滤。合并两次滤液, 水浴浓缩至 1kg 饮片/L, 4℃储存备用。

1.2 动物 雄性 Wistar 大鼠, 体重 200±20g, 由中国医学科学院实验动物研究所提供, 合格证号 SCXK 11-00-0006。适应实验操作 1w 后使用。

1.3 主要仪器 Centrifuge 5400 型高速冷冻离心机, Eppendorf 公司; PrepSpin 50 型超速离心机, SME 公司; ZS-3 半自动生化仪, 中科院生物物理研究所中生生物工程高技术公司; AB204-E 型电子天平, 瑞士 METTLER TOLEDO 公司; 上海医用仪表厂 WMY-01 型数字测温仪, 使用前用标准温度计校正; Bio-Rad 550 酶标仪, Bio-Rad 公司产品; 多道移液器、多道移液器储液池、振荡台、自制小手术钻、手术缝合器械等。

2 方法

2.1 解热实验 本实验是采用 EP₃ 受体选择性激动剂硫前列酮侧脑室注射诱导大鼠发热的模型^[1]。

2.1.1 动物的选择与处理 动物适应实验室环境及模拟实验操作(抓握、灌胃、测温等)1w。实验室按昼夜节律照明, 室温控制在 20±2℃, 颗粒饲料, 自由饮水。将涂有凡士林的测温探头插入直肠 5cm, 测

温计显示数字稳定后读取数字作为体核温度(T_c)。实验前两天 08: 00a. m. 分别测定并记录 T_c, 与实验当天同一时间 T_c 中最高值与最低值之差大于 0.5℃者舍弃, 余为合格动物。将基础体温在 37.2±0.5℃之间者, 定为合格大鼠, 下同。

2.1.2 防污染措施 所有玻璃器材、手术用具等耐高温器具均经 180℃ 2h 干热消毒, 已配制的终溶液经微孔滤膜(0.22μm)滤过。

2.1.3 脑室注射与观察 参照文献操作^[1], 方法如下: 首先用乙醚将大鼠浅麻醉, 手术野常规消毒后, 以两耳连线中点为中心, 纵形剪开约 1cm 大小皮肤, 暴露颅骨。精确定位后, 用自制的小手术钻轻钻颅骨并暴露硬脑膜, 用微量进样器侧脑室(坐标: P1.0mm, R1.5mm, H4.0 mm, Paxinos-Watson 图谱)注入相应制剂, 总体积 10μL, 推注时间 20s。注射完毕后迅速缝合皮肤, 以普鲁卡因棉球轻擦创口。注射后, 连续观察体温 2h, 测温间隔 30min。计算 ΔT(各时点体温与基础体温差值)。

将合格 Wistar 大鼠分为 4 组(n=6): 正常组(Ctr)、硫前列酮组(Sul)、Sul+ 桂枝汤大、小剂量组(Sul+ hGZT、Sul+ 1GZT)。桂枝汤大、小剂量组给药剂量分别为 20g/kg、10g/kg, 灌胃给药 1 次, 60min 后同剂量重复给药 1 次。第 2 次给药后 30 min, 除 Ctr 组外立即脑室注射 Sul(200ng/只), 方法同前。脑室注射后 30min, 即首次给药后 2h 迅速断头取脑, 干冰速冻, -80℃低温冰箱冻存待测。

2.2 抗低体温实验 将合格 Wistar 大鼠分为 4 组: 正常组(Ctr)、氨基比林模型组(Amp)、Amp+ 桂枝汤大剂量组(Amp+ hGZT)、Amp+ 桂枝汤小剂量组(Amp+ 1GZT)。桂枝汤大、小剂量组给药方法、剂量同 2.1.3 项下。第 2 次给药的同时, 连同模型组立即腹腔注射 Amp(100mg/kg, i. p), 正常组给予等体积生理盐水。腹腔注射 Amp 后 1h, 即首次给与桂枝汤后 2h, 迅速测定体核温度(T_c), 随即断头取脑, 干冰速冻, -80℃低温冰箱冻存待测。

2.3 溶液的配制 按试剂盒要求配制溶液, 所有溶液均实验当日配制。

2.4 样本的提取 所有操作过程于 4℃下进行。称取冻存下丘脑组织约 50mg, 用一干净刀片将组织切成小块, 收集入预冷的匀浆器中。加入 0.5mL 冰冷的完全溶解缓冲液, 匀浆速度加至最大维持 40s, 避免过热或起泡沫。在冰上孵育 30min 后, 4℃ 1000g

离心 10min。将上清液移至一新预冷的分离管中,再次离心,条件同上。将上清液倒入另一相同的管中,此为提取样本, - 80℃冻存。

2.5 pCREB 活性检测

检测原理 本实验采用的 TRANS-AM 试剂盒,运用 ELISA 方法检测。利用一个与 96 孔板相连的寡核苷酸,使组织抽提物中的转录因子活化形式与这个寡核苷酸特异性连接。用于检测转录因子的一抗识别活化的与靶 DNA 连接的转录因子。再用抗 IgG 偶联物和显色反应,则可得到定量的结果。本试剂盒在 3~ 5h 就可完成全部分析,比凝胶转移分析技术敏感性要强 10 倍。

检测步骤 按试剂盒说明操作,酶标仪以 450nm 波长读取吸收值,以 655nm 波长作为参考值,pCREB 的活性以 OD 值表示。

3 结果

3.1 发热大鼠 pCREB 的活性变化 结果显示,侧脑室注射 Sul 可诱导大鼠下丘脑 pCREB 活性的显著升高。预先给予桂枝汤的大、小剂量组均可显著降低 pCREB 的活性,其活性值近于正常组值,见图 1。

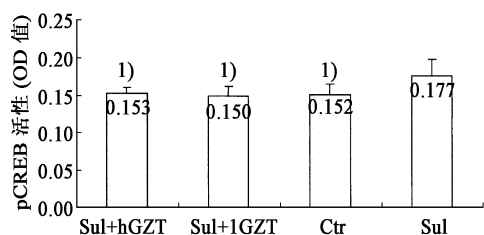


图 1 发热大鼠下丘脑 pCREB 活性变化($\bar{x} \pm s, n=6$)

注:与模型对照组(Sul)相比,¹⁾ $P < 0.05$

3.2 低体温大鼠 pCREB 的活性变化 结果显示,腹腔注射 Amp 可使大鼠下丘脑 pCREB 的活性略微升高,但无统计学意义。预先给予桂枝汤的大、小剂量组可使升高的 pCREB 活性有降低倾向,但均无统计学意义,见图 2。

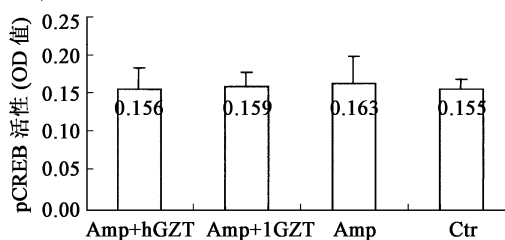


图 2 低体温大鼠下丘脑 pCREB 的活性变化($\bar{x} \pm s, n=6$)

4 讨论

前列腺素 E₂ 是介导体温升高的最重要的中枢介质^[2]。我们最近的研究证实,下丘脑中前列腺素的合成和代谢酶的活性变化与大鼠发热有密切关

系。有研究表明,PGE₂ 受体中的 EP₃ 可能是 PGE₂ 诱导体温升高的关键受体^[3]。为此,本研究选用了一种 EP₃ 选择性激动剂 Sul,通过侧脑室注射,成功复制了大鼠发热模型^[1]。本实验即是采用此模型进行研究。

CREB 于 80 年代后期被发现。它是一种细胞核内调控因子,通过自身磷酸化实现调节转录的功能,PKA 就是其实现磷酸化的蛋白激酶。当作用于细胞的外界信号通过一定的通路激活蛋白激酶时(如信号 cAMP/PKA),使 CREB 磷酸化,与相关基因上的特定部位相结合,从而启动转录发生^[4,5]。CREB 磷酸化和脱磷酸化受多种因子的调控^[4-6],广泛参与神经系统中神经营养因子和神经肽的调节。

我们最近的实验已经证实^[7],cAMP/PKA 通路参与了机体体温的调节,而作为终端信号的 CREB 对体温变化有无影响,正是本实验要探讨的内容。本次实验结果显示,侧脑室注射 Sul 可诱导大鼠下丘脑 pCREB 活性的显著升高,桂枝汤可显著降低 pCREB 的活性,其活性值近于正常组值。实验表明,pCREB 参与了 EP₃ 大鼠发热的调控,降低 pCREB 的活性是桂枝汤解热作用的靶点之一。腹腔注射 Amp 也可使大鼠下丘脑 pCREB 的活性略微升高,但无统计学意义。给予桂枝汤可使升高的 pCREB 活性有所降低,但也无统计学意义。这表明,pCREB 基本上不参与低体温机制的调节或仅有较弱调节作用。

Konradi 等^[8]实验发现,在氟哌啶醇诱导大鼠纹状体 PENK 基因表达中,给药 10min 后即可观察到 CREB 的磷酸化。国内也有研究报道^[9],用 LPS 刺激培养的血管内皮细胞 15~ 120min,均可诱导 pCREB 的产生,这与本实验用 Sul 诱导大鼠下丘脑 pCREB 产生的时间相一致。已知胞浆中有多种蛋白激酶,如 PKA、PKC、钙调蛋白激酶(CaMK)等,可使 CREB 磷酸化^[10]。本次实验虽未就可以活化 CREB 的多种酶活性进行测定,无法判断有多少种途径最终活化了转录因子 CREB,但至少可以说明 cAMP/PKA 途径是介导 CREB 磷酸化参与发热调控的一个重要途径,下调 pCREB 的活性是桂枝汤发挥其解热作用的靶点之一。

细胞外界刺激引起信号转导,可通过转录调节因子调节来影响基因表达实现,处于信号传递链终端的蛋白质磷酸化和脱磷酸化,对生物效应有着直接的调节作用。在我们以往的研究中已证实桂枝汤

具有降低胞内 cAMP、PKA 活性的作用,这可能是桂枝汤通过调节 CREB 的磷酸化与脱磷酸化而发挥解热作用的机理之一。本实验尚观察到低体温大鼠下丘脑 CREB 活性与正常大鼠相比较基本上无变化,这提示 CREB 基本上不参与低体温机制的调节或仅有较弱调节作用。我们考虑,这是否与 CREB 磷酸化过程受多个激酶调节^[11,12],抑或是低温状态下 AP-1 的作用加强限制了 CREB 的磷酸化,因而在低体温大鼠下丘脑未显示明显活性改变有关? 尚有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 李沧海,周军,霍海如,等. 前列腺素 EP₃ 受体诱导发热及其机制初探[J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(4): 664-665, 672.

[2] Sugimoto Y, Narumiya S, Ichikawa A, et al. Distribution and function of prostanoid receptors: studies from knockout mice [J]. Progress in Lipid Research, 2000, 39(4) : 289-314.

[3] Shibuya I, Setiadji SV, Ibrahim N, et al. Involvement of postsynaptic EP₄ and presynaptic EP₃ receptors in actions of prostaglandin E₂ in rat supraoptic neurons [J]. J Neuroendocrinol, 2002, 14(1) : 64-72.

[4] Kwok R P, Lundblad J R, Chrivia J C, et al. Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB[J]. Nature, 1994, 370(6486) : 223-226.

[5] Deisseroth K, Bitto H, Tsier R W. Signaling from synapse to

nucleus postsynaptic CREB phosphorylation during multiple forms of hippocampal synaptic plasticity[J]. Neuron, 1996, 16(1) : 89-101

- [6] Konradi C and Heckers S. Haloperidol-induced Fos expression in striatum is dependent upon transcription factor cyclic AMP response element binding protein[J]. Neurosci, 1995, 65: 1051-1061.
- [7] 齐云,霍海如,周军,等. 桂枝汤对体温双向调节作用机理探讨-对下丘脑中腺苷酸环化酶活性及环-磷酸腺苷含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, 7(2) : 25-28.
- [8] Konradi C, Kobierski LA, Nguyen TV, et al. The cAMP-response element-binding protein interacts, but Fos protein does not interact, with the proenkephalin enhancer in rat striatum[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 7005-7009.
- [9] 单佑安,罗向东,苏踊跃,等. 脂多糖刺激血管内皮细胞激活 cAMP 反应元件结合蛋白[J]. 中华创伤杂志, 2001, 17(11) : 684-687.
- [10] Curtis J, Finlbeiner S. Sending signals from the synapse to the nucleus: possible roles for CaMK, Ras/ERK, and SAPK pathway in the regulation of synaptic plasticity and neuronal growth[J]. J Neurosci: Res. 1999, 58: 88-95.
- [11] Bohm M, Moellmann G, Cheng E, et al. Identification of p90 (RSK) as the probable CREB-Ser(133) kinase in human melanocytes[J]. Cell, Growth and Differentiation. 1995, 6: 291-302.
- [12] Xing J, Ginty D D, Greenberg M E. Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by PSK2, a growth factor-regulated CREB kinase[J]. Science, 1996, 273: 959-963.