

• 药理 •

## 桂枝汤对低体温大鼠下丘脑组织 蛋白激酶 A 和 C 活性的影响

周 军<sup>1,2</sup>, 李沧海<sup>1</sup>, 霍海如<sup>1\*</sup>, 李兰芳<sup>1</sup>,  
康旭亮<sup>1</sup>, 姜 楠<sup>1</sup>, 姜廷良<sup>1</sup>

(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: 研究低体温大鼠下丘脑蛋白激酶 A(PKA)、蛋白激酶 C(PKC)活性的变化及桂枝汤的升温作用机理。方法: 选用腹腔注射氨基比林低体温大鼠模型, 先观测桂枝汤(p. o.)对模型大鼠体温的影响, 继而采用放射性同位素法, 测定给予桂枝汤后低体温大鼠下丘脑组织中 PKA、PKC 的活性。结果: 桂枝汤可使低体温模型大鼠下丘脑组织中受抑的 PKA、PKC 活性显著增强, 促进体温恢复。结论: PKA、PKC 参与了大鼠的低体温过程, 桂枝汤的升高体温的作用可能与提高下丘脑组织中 PKA、PKC 活性有关。

[关键词] 低体温; 桂枝汤; 下丘脑; 蛋白激酶 A; 蛋白激酶 C

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)01-0020-03

## Effect of Guizhi Tang on the PKA and PKC Activities of Hypothalamus in Hypothermia Rats

ZHOU Jun<sup>1,2</sup>, LI Cang-hai<sup>1</sup>, HUO Hai-ru<sup>1\*</sup>, LI Lanfang<sup>1</sup>,  
KANG Xu-liang<sup>1</sup>, JIANG Nan<sup>1</sup>, JIANG Ting-liang<sup>1</sup>

(1 Tang Center for Herbal Medicine Research, Institute of Chinese Materia Medica,  
China Academy of TCM, Beijing 100700, China;  
2 Capital Institute of Physical Education, Beijing 100088, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the changes of the activity of protein kinase A(PKA) and C(PKC), and further investigate the mechanisms of anti-hypothermia action of Guizhi Tang. **Methods:** The hypothermia rats induced by i. p. aminopyrine were used to observe the action of Guizhi Tang on the body temperature and to detect the PKA and PKC activity in hypothalamus in model and Guizhi Tang-treated groups using isotopic tracing assay. **Results:** The drop of body temperature in rats induced by aminopyrine was counteracted and the PKA and PKC activities increased significantly after oral administration of Guizhi Tang. **Conclusions:** Both PKA and PKC may participate in the mechanism of hypothermia induction and the increases of PKA and PKC may contribute to the anti-hypothermia action of Guizhi Tang.

[Key words] Hypothermia; Guizhi Tang; Hypothalamus; PKA; PKC

[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(No: 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。在七跨膜受体信号转导过程中,蛋白激酶 A(PKA)和蛋白激酶 C(PKC)是胞内信号转导通路上的两个关键酶。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,我们选用氨基比林诱导大鼠体温降低的动物模型,就细胞信号转导通路上 PKA、PKC 的活性变化进行研究,探讨桂枝汤的升温作用机制。

## 1 实验材料

**1.1 药物及试剂** PKA、PKC 检测试剂盒均为 Promega 公司产品(批号分别为 152458、152443); [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, 比活度为 5 $\mu$ Ci/pmol, 放化纯度 > 95%, 为北京市福瑞生物工程公司产品(批号为 20021002); DEAE 纤维素(DE-52), Whatman 产品; 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。其它试剂均为分析纯。

桂枝(*Cinnamomum cassia* Presl, 广西上思)、赤芍(*Paeonia lactiflora* Pall., 内蒙多伦)、甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch., 内蒙杭锦旗, 由北京卫仁饮片厂蜜制)、生姜(*Zingiber officinale* Rosc., 山东莱芜)、大枣(*Ziziphus jujuba* Mill., 山西柳林), 所有药材均经中国中医研究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 $^{\circ}$ C 储存备用。

**1.2 动物** 雄性 Wistar 大鼠, 体重 200g  $\pm$  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。

**1.3 主要仪器及用具** 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; LS-9800 液体闪烁计数器, 美国 Beckman 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。

## 2 实验方法

**2.1 桂枝汤对氨基比林致低体温大鼠模型的影响** 动物适应实验室环境及模拟实验操作(抓握、灌

胃、测温等) 1 周。实验室按昼夜节律照明, 室温控制在 20  $\pm$  2 $^{\circ}$ C, 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(Tc)。实验前两天 08: 00a. m. 分别测定并记录 Tc, 与实验当天同一时间 Tc 中最高值与最低值之差大于 0.5 $^{\circ}$ C 者舍弃, 余为合格动物, 下同。将基础体温在 (37.2  $\pm$  0.5) $^{\circ}$ C 之间, 选取合格大鼠, 随机均分为 3 组(n = 10): 正常组(Ctr)、氨基比林模型组(Amp)、氨基比林+桂枝汤组(Amp + GZT)。实验前按 10mL/kg 灌胃给予桂枝汤(10g 饮片/kg), 60min 后同样重复给药 1 次。第 2 次给药的同时, 连同模型组立即腹腔注射氨基比林(100mg/kg, i. p), 正常组给予等体积生理盐水。分别记录注射氨基比林后 30、60、90、120min 各时间点的各组动物体温。

**2.2 桂枝汤对低体温大鼠下丘脑组织 PKA、PKC 活性的影响**

**2.2.1 抗低体温实验及取材** 将合格 Wistar 大鼠分为 4 组: 正常组(Ctr)、氨基比林模型组(Amp)、氨基比林+桂枝汤大(Amp+ hGZT, 20g 饮片/kg)、氨基比林+小剂量组(Amp+ 1GZT, 10g 饮片/kg)。给药方法及途径同上。第 2 次给药的同时, 连同模型组立即腹腔注射氨基比林(100mg/kg), 正常组给予等体积生理盐水。注射氨基比林后 1h, 即首次给与桂枝汤后 2h, 迅速测定体核温度(Tc), 随即断头取脑, 干冰速冻, -80 $^{\circ}$ C 低温冰箱冻存待测。

**2.2.2 预配溶液与酶样本的提取** 提取缓冲液 1000mL [25mM Tris-HCl (pH7.4), 0.5mM EDTA, 0.5mM EGTA, 0.05% Triton X-100, 10mM  $\beta$ -巯基乙醇, 1 $\mu$ g/mL 亮氨酸, 1 $\mu$ g/mL 抑肽酶], 4 $^{\circ}$ C 保存。使用前每 100mL 提取缓冲液中加入 0.5mL PMSF 保存液; 2M NaCl 1000mL; 1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1000mL (2M NaCl); 200mM NaCl 200mL。

将实验用匀浆器、提取缓冲液置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱预冷。称取冻存下丘脑组织约 50mg, 放入匀浆器中, 加入 2mL 提取缓冲液, 0 $^{\circ}$ C 环境下进行匀浆。将匀浆液倾入离心管中, 4 $^{\circ}$ C 下 14000r/min 离心 5min, 吸取上清液。取提取上清液 0.2、0.3mL 分装(PKA 测定、定蛋白含量), 余上清液倒入预先用提取缓冲液平衡过的 1mL DEAE 纤维素柱中过柱, 用 2mL 提取缓冲液洗柱, 然后用含有 200mM NaCl 的 2mL 提取缓冲液洗脱含有 PKC 的部分, 收集待测。

**2.2.3 PKA、PKC 活性测定** 按试剂盒步骤操作。酶活性单位为 pmol ATP/min/ $\mu\text{g}$  蛋白。

**2.3 数据处理** 实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 利用 one-way ANOVA 比较多组间均值差异显著性,  $q$  检验比较组间差异显著性。

### 3 结果

**3.1 桂枝汤对氨基比林致低体温大鼠模型的影响** 结果显示(图 1), 氨基比林在给药后 30min 即可明显诱导大鼠体温下降, 而桂枝汤可明显抑制大鼠的这种体温下降, 促使体温向正常恢复。

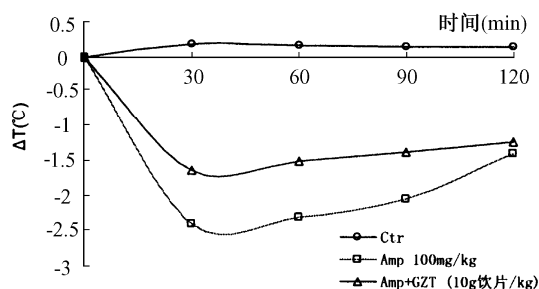


图 1 桂枝汤对氨基比林致大鼠低体温模型的影响

**3.2 桂枝汤对低体温大鼠下丘脑组织 PKA、PKC 活性的影响** 结果显示(图 2), 腹腔注射氨基比林可显著降低大鼠下丘脑 PKA 的活性。预先给予桂枝汤的大剂量组可显著升高 PKA 的活性, 桂枝汤小剂量组也有升高 PKA 活性的倾向; 腹腔注射氨基比林可显著降低大鼠下丘脑 PKC 的活性, 桂枝汤大、小剂量组均有显著升高 PKC 活性的作用。

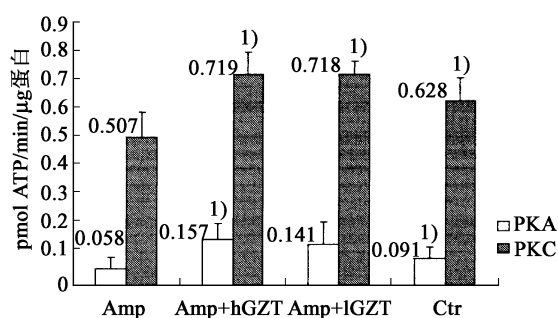


图 2 桂枝汤对低体温大鼠下丘脑组织 PKA、PKC 活性的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

注: 与模型对照组(Amp)比较, <sup>1)</sup>  $P < 0.05$

### 4 讨论

我们以往的研究多采用安痛定诱导大鼠体温降低来造模。氨基比林是安痛定的主要成分, 为非甾体类抗炎药的吡唑酮类药物, 临床剂量并不出现降至正常体温以下的低体温现象。但大剂量的氨基比林, 在室温环境下即可降低正常大鼠或家兔的体温<sup>[1]</sup>。氨基比林降低体温的作用部位是在中枢, 而

不是通过改变大鼠的体温调节行为<sup>[2]</sup>。因而, 本实验选用氨基比林诱导大鼠体温降低的动物模型。

研究发现, cAMP 是介导中枢性发热与低体温的主要信号转导物质之一<sup>[3,4]</sup>, 作为第二信使的 cAMP 要介导体温变化的效应, 则要将其信号下传激活 cAMP 依赖的蛋白激酶 PKA, PKA 是细胞内信号转导途径上的一个重要环节。本实验结果表明, 腹腔注射氨基比林可使大鼠下丘脑 PKA 的活性显著降低, 说明氨基比林诱导体温降低的机制有 PKA 参与。给予桂枝汤可显著升高 PKA 的活性, 表明桂枝汤抵抗低体温作用与降低 PKA 活性有关。

在以肌醇磷脂代谢为基础的细胞信号转导系统中, 二磷酸肌醇磷酸(PIP<sub>2</sub>) 在磷脂酶 C(PLC) 的作用下可产生两个胞内信使, 分别激动两个信号传递途径即三磷酸肌醇(IP<sub>3</sub>)/Ca<sup>2+</sup> 和二酰甘油(DG)/PKC 途径。IP<sub>3</sub> 通过与钙库上特异受体结合而使内部 Ca<sup>2+</sup> 释放, 胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度的升高可启动胞内 Ca<sup>2+</sup> 信号系统, 通过 Ca<sup>2+</sup>、钙结合蛋白依赖的酶类活性变化从而调控一系列生理反应; 而 DG 则通过激活 PKC, 以磷酸化的形式对许多蛋白质和酶类进行修饰, 从而调控其相应生理反应。其中 IP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup> 途径, 我们以往已探讨过它在桂枝汤双向调节体温方面的作用<sup>[5]</sup>, 但 DG/PKC 途径是否也参与了体温的调节过程, 尚未进行研究。本实验结果证实, 腹腔注射氨基比林可使大鼠下丘脑 PKC 的活性显著降低, 给予桂枝汤可显著升高 PKC 的活性, 提示大鼠体温降低与 PKC 活性有关。

本实验结果表明, 桂枝汤提高 PKA、PKC 的活性, 可能是桂枝汤升温作用的靶点之一。

### [参考文献]

- [1] Nishio A and Kanoh S. The antipyretic effects of aminopyrine and sodium acetylsalicylate on endotoxin induced fever in rabbits[J]. Nippon Yakurigaku Zasshi, 1981, 77(1): 9-13.
- [2] Polk DL and Lipton JM. Effect of sodium salicylate, aminopyrine and chlorpromazine on behavioral temperature regulation[J]. Pharmacol Biochem Behav, 1975, 3(2): 167-172.
- [3] Kandasamy SB, Williams BA. Central effects of dibutyryl cyclic AMP and GMP on the temperature in conscious rabbits[J]. Brain Res, 1983, 277: 311.
- [4] 陆大祥, 李楚杰. 环一磷酸腺苷在内生致热源双向热机制中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 1986, 2(1): 23-25.
- [5] 霍海如, 谭余庆, 李晓芹, 等. 桂枝汤有效部位 A 对体温双向调节作用机理研究——对下丘脑三磷酸肌醇和钙调蛋白含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 1998, 4(2): 25-28.