

# 桂枝汤对发热及低体温大鼠下丘脑可溶性 一氧化氮合酶的影响

李沧海, 周 军, 霍海如, 齐 云, 郭淑英, 姜廷良(中国中医研究院中药研究所, 北京 100700)

**摘要:**目的:研究发热和低体温大鼠下丘脑可溶性 NOS 活性的变化及桂枝汤对之的影响。方法:利用分光光度法测定酵母性发热大鼠、安痛定性低体温大鼠及桂枝汤治疗组下丘脑部位 NOS 活性。结果:皮下注射酵母 5.5h 后大鼠下丘脑组织内 NOS 活性显著升高,而腹腔注射安痛定可使该部位 NOS 活性明显降低,与体温变化呈正相关;桂枝汤(p. o.)可剂量依赖性对抗酵母诱导的大鼠下丘脑 NOS 活性升高,与其解热作用平行;但在低体温模型上可进一步降低该区 NOS 活性,该作用与抗低体温作用呈负相关。结论:下丘脑可溶性 NOS 可能参与了大鼠体温调节;桂枝汤抑制酵母诱导的下丘脑 NOS 活性升高可能是其解热作用机制之一,但其抗低体温作用可能与该区 NOS 变化无关。

**关键词:**桂枝汤;体温调节;下丘脑;NOS

中图分类号:R285.5 文献标识码:B 文章编号:1005-9903(2003)02-0046-04

## Effect of Guizhi Tang on Hypothalamic Cytosolic NOS in Fever Rats and in Hypothermia Rats

Li Cang-hai, ZHOU Jun, HUO Hai-ru, QI Yun, GUO Shu-ying, JIANG Ting-liang

(Institute of Chinese Material Medica, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing, 100700, China)

**Abstract:** It has been demonstrated that nitric oxide play a role in thermoregulation, but very little is known about the mechanism in yeast-induced fever and aminopyrine-evoked hypothermia in rats. We have a hypothesis that Guizhi Tang, a formulum possesses dual thermoregulatory action, may exhibit anapyrexia or anti-hypothermia action via NO. To test the hypothesis, the cytosolic nitric oxide synthase in hypothalamus in both the fever and the hypothermia rats induced by yeast or aminopyrine accordingly was determined using a colorimetric assay. The NOS activity enhanced after a s. c. yeast-injection and decreased after an i. p. treatment of aminopyrine. Reversion in NOS and body temperature were observed in fever rats after the administration of Guizhi Tang orally at a dose dependent manner. While a confusing result obtained from the hypothermia rats treated with Guizhi Tang was that a recover of body temperature paralleled a continual decrease in NOS activity. Data suggested that the cytosolic NOS in hypothalamus participates the thermoregulation in rats and may also play a role in antipyretic action of Guizhi Tang, but not in its anti-hypothermia action.

**Key words:** Guizhi Tang; Thermoregulation; Hypothalamus; Nitric oxide synthase

与体温调节相关的外周信息如何向体温调节中枢传递并被整合,至今尚是令人困惑的问题。虽然这方面有诸多假说,如血脑屏障(BBB)炎症时期通透性增加,终板血管器(OVLT)区透过,特异的生物转运等,但均缺乏足够的实验依据,仍需进一步的论证。对于大多数外周信息分子难于透过的 BBB,近来的神经传入,气体信息分子弥散假说引起了人们的重视。其中一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOS)的广泛分布及其产物的易于弥散性使该系统在

这方面受到广泛的关注。文献报道<sup>[1,2]</sup>外周及中枢一氧化氮(NO)参与了多种动物的体温调节过程,并可能通过与中枢环氧合酶——前列腺素 E(COX-PGE)系统相互作用参与了酵母性发热。我们利用 NOS 抑制剂及 NO 供体也证实 NO 不但参与了酵母性发热和安痛定诱导的低体温,也参与了正常体温的调节(不论是外周给药还是中枢给药),且桂枝汤灌胃可以对抗两者诱导的体温异常(待发表)。为进一步探讨桂枝汤体温双向调节作用机制,本实验考察了桂枝汤对两种体温异常模型大鼠下丘脑 NOS 活性的影响。

## 1 实验材料

1.1 动物 雄性 Wistar 大鼠,体重 220 ± 20g,由中

收稿日期:2002-10-25

基金项目:国家攀登计划预选项目(中药现代化关键问题的基础研究)资助课题(NO.970211018)

国医学科学院实验动物研究所提供,合格证号 SCXK 11-00-0006。

**1.2 药品与试剂** 桂枝汤煎液制备及鲜酵母、安痛定(Amp)来源同文献<sup>[3]</sup>。NOS测定试剂盒购自晶美生物工程公司(Cayman产品),其它试剂均为分析纯以上产品。

**1.3 主要仪器及设备** 同文献<sup>[3]</sup>。

## 2 方法及结果

**2.1 防污染措施** 参照文献<sup>[3]</sup>。

**2.2 动物适应与测温** 参照文献<sup>[3]</sup>。

**2.3 动物发热及低体温诱导和分组给药** 基础体温  $37.2 \pm 0.5$  °C 的大鼠,除正常组(Control)外,背部皮下注射鲜酵母(2.4g/kg B.W.) 3.5hr 后选取体温升高值  $\geq 0.8$  °C者,随机均分为4组,依次为酵母组(Yeast),酵母+桂枝汤大、中、小剂量(Yeast+ hGZT、Yeast+ mGZT、Yeast+ lGZT)组。给药组分别于注射酵母后 3.5hr 和 4.5hr 给予桂枝汤(20、10、5g 生药/kg, p. o.) 各一次,对照组及酵母组给予同体积蒸馏水。另取基础体温符合条件之大鼠,随机分为5组,分别为正常(Control)组,安痛定(Amp)组及安痛定+桂枝汤高、中、低剂量(Amp+ hGZT、Amp+ mGZT、Amp+ lGZT)组,后四组腹腔注射安痛定(1.43ml/kg)诱导低体温,对照组注射同体积生理盐水。给药组在注射 Amp 1h 前和注射后分别给予桂枝汤(20、10、

5g 生药/kg) 各一次,对照组及安痛定组给予同体积蒸馏水。测温间隔为 1hr,首次给药 2hr 测定 Tc 后,迅速将动物断头取脑(1min 内完成),干冰速冻,于 70 °C 冰箱保存备测。结果以体温变化值  $\Delta T_c$  (各个测量点体温与基础体温的差值)及体温指数 TRI (以梯形法计算)表示,见表 1 和表 2。表 1 和表 2 显示桂枝汤可以剂量依赖性地抑制酵母性发热峰值,降低 TRI,首次给药后 2hr 效果显著;而对于腹腔注射 Amp 诱导的低体温大鼠,桂枝汤也可明显促进体温向正常恢复,但抗低体温作用与剂量呈负相关。

**2.4 下丘脑 NOS 活性测定** 取冷冻脑组织,快速剥离下丘脑(以灰结节及视交叉之间的中心点为中心确定),精密称定,加入 10 倍体积 PBS(PH7.4),以玻璃匀浆器匀浆(4 × 5s)。匀浆液先以 10000 × g 离心 20min,上清液再以 105000 × g 离心 60min,上清相于 -70 °C 冻存待测(操作均于 4 °C 下进行,所有溶液及器皿均经预冷)。测定步骤按照 NOS 试剂盒说明书进行。结果以每 min 每 mg 蛋白生成 1nmol NO 为 NOS 活性单位( $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{pro} \cdot \text{min}^{-1}$ )表示,结果见图 1 和图 2。结果显示皮下注射酵母可诱导大鼠下丘脑可溶性 NOS 活性显著升高,灌胃桂枝汤可剂量依赖性地抑制该作用;而在 Amp 降低 NOS 的基础上,桂枝汤可使该酶活性进一步降低,但与剂量呈负相关。

表 1 桂枝汤对酵母性发热大鼠体温的影响( $\bar{x} \pm s$ ; n = 12)

组别	剂量 (g/kg)	酵母后 4.5h		酵母后 5.5h	
		$\Delta T_c$ (°C)	TRI <sub>3.5~4.5</sub>	$\Delta T_c$ (°C)	TRI <sub>3.5~5.5</sub>
Control	-	-0.20 ± 0.07	-0.19 ± 0.09	-0.10 ± 0.10	-0.30 ± 0.15
Yeast	-	2.31 ± 0.50	2.09 ± 0.52	2.21 ± 0.49	4.29 ± 1.00
Yeast+ lGZT	5.0	2.28 ± 0.30	2.02 ± 0.29	2.19 ± 0.45	4.21 ± 0.60
Yeast+ mGZT	10.0	1.88 ± 0.41*	1.81 ± 0.40	1.93 ± 0.32*	3.58 ± 0.74
Yeast+ hGZT	20.0	1.91 ± 0.40*	1.70 ± 0.38	1.49 ± 0.31***	3.50 ± 0.70*

注:与 Yeast 组比较\*  $P \leq 0.05$ ,\*\*\*  $P \leq 0.001$

表 2 桂枝汤对安痛定诱导大鼠体温的影响( $\bar{x} \pm s$ ; n = 10)

组别	剂量 (g/kg)	安痛定后 1h $\Delta T_c$ 和 TRI	
		$\Delta T_c$ (°C)	TRI <sub>1.0</sub> (°C·hr)
Control	-	-0.08 ± 0.13	-0.07 ± 0.09
Amp	-	-1.58 ± 0.18	-0.82 ± 0.26
Yeast+ lGZT	5.0	-0.75 ± 0.25***	-0.41 ± 0.17***
Yeast+ mGZT	10.0	-0.95 ± 0.20**	-0.50 ± 0.13**
Yeast+ hGZT	20.0	-1.71 ± 0.37	-0.89 ± 0.28

注:与 Amp 组比较\*\*  $P \leq 0.01$ ,\*\*\*  $P \leq 0.001$

## 3 讨论

一氧化氮是 L-精氨酸上胍基在一氧化氮合酶催化下释放的气体分子,继而激活可溶性鸟苷酸环化酶,通过升高胞内 cGMP 水平发挥广泛的生物学效应。虽然 NO 半寿期极短,但其具有脂溶性高易于透过生物膜、合成酶分布广泛等特点,推测其作用几乎可不受限于机体内任何生物屏障;加之 NOS 在血管内皮细胞和神经细胞上丰度较高,为 NO 参与外周—中枢信息传递提供了物质基础。近来越来越多的文献报道 NO 参与了高等生物的体温稳态维持这个古老而又复杂的系统<sup>[4]</sup>。在外周,NO 可通过扩张

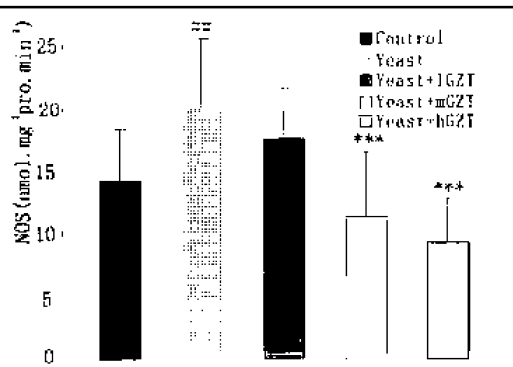


图1 桂枝汤对酵母诱导的发热大鼠下丘脑 NOS 活性的影响

注:与对照(Control)比较<sup>##</sup>  $P \leq 0.01$ ; 与酵母组(Yeast)比较, <sup>\*\*\*</sup>  $P \leq 0.001$

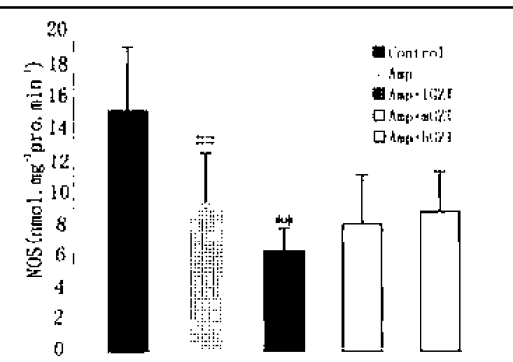


图2 桂枝汤对安痛定诱导的低体温大鼠下丘脑 NOS 活性的影响

注:与对照组(Control)比较<sup>##</sup>  $P \leq 0.01$ ; 与安痛定组(Amp)比较<sup>\*</sup>  $P \leq 0.01$

皮肤血管加强散热, 加强呼吸功能和载氧血红蛋白的稳定性, 抑制肝脏分解 ATP 等环节降低体核温度, 但 NO 继发的低血压又可抑制该效应, 这可能是一些文献报道 NO 对于 LPS 性发热动物影响不一致的原因之一。而在中枢, NO 与体温变化的关系较为复杂, 可因动物种属和状态、致热原及给药部位不同而不同, 具有明显的条件性, 实验结果分歧较大甚至完全相反, 如在离体实验, 它对视前区前下丘脑(POAH)的这部分热敏神经元兴奋, 而对另一部分热敏神经元则为抑制, 对于 IL-1 兴奋或抑制神经元则均表现为对抗<sup>[4]</sup>。对于发热动物, 其作用机制可能涉及与 COX-PGE<sub>2</sub> 系统的条件性相互作用, 如激活或者硝基化 COX 以调控 PGE 的产生, 提高 PGE<sub>2</sub> 对棕色脂肪组织(BAT)的兴奋作用等<sup>[2]</sup>。对于大鼠, 外周给予 NOS 抑制剂可降低甚至完全阻断 LPS JL-1 等致热原诱导的发热及应激性体温升高, 但大剂量也可使正常动物出现类似发热反应<sup>[4,6,7]</sup>; 在中枢,

NO 供体可加强大鼠发热反应, 但外周应用 NO 则可显著降低发热及正常大鼠体核温度<sup>[4,8,9]</sup>, 当然与上述观点相反的报道也不少<sup>[10]</sup>, 这些均说明 NO 参与了大鼠体温调节过程。总的来说, 体温对于 NO 的反应, 实际上可看作中枢和外周作用的叠加或整合<sup>[5]</sup>。

NOS 分为结构型(cNOS, 包括 nNOS 或 NOS<sub>1</sub> 及 eNOS 或 NOS<sub>3</sub>) 和诱导型(iNOS 或 NOS<sub>2</sub>), 前者在神经细胞和血管内皮细胞上较为丰富, 其活性依赖于胞内钙离子的浓度, 所产生少量的 NO 维持生理状态的血管功能调节及信号转导等; 后者在应激条件下在相关细胞和血管等部位高表达, 可持续大量产生 NO, 参与了病理防御反应等。文献倾向于认为主要是 iNOS 介导应激条件下的体温调节, 也有 nNOS 参与发热调控的报道<sup>[11]</sup>。本文酶制备为胞液部分, 测定结果可认为是 nNOS 和 iNOS 活性之和, 而活性的改变可能主要由后者决定, 因为 eNOS 绝大部分与质膜结合, 而在成熟大鼠脑组织中, nNOS 和 iNOS 则主要存在胞浆内<sup>[12]</sup>。

本实验的结果显示, 皮下注射酵母可诱导下丘脑可溶性 NOS 活性升高, 而桂枝汤可以剂量依赖性抑制之, 并降低酵母发热峰值和体温反应指数, 其作用强度与解热作用相应, 提示 nNOS 和/或 iNOS 参与了酵母诱导的体温升高, 桂枝汤可能通过降低下丘脑 NOS 活性而发挥解热作用。至于 nNOS 和 iNOS 在酵母性发热过程中的作用及桂枝汤解热作用主要涉及哪种亚型, 还有待进一步研究; 腹腔注射安痛定后 1hr 伴随着 T<sub>c</sub> 下降, 大鼠下丘脑 NOS 活性较之正常组明显降低, 给予桂枝汤能促进低体温恢复, 但下丘脑可溶性 NOS 活性均低于模型动物, 提示桂枝汤对抗安痛定性低体温作用与下丘脑可溶性 NOS 活性改变无关或关系不大。总之, 对于酵母性发热和安痛定性低体温大鼠, 给予桂枝汤均可降低模型动物下丘脑可溶性 NOS 活性, 但和其促进体温恢复正常作用一样, 量效关系不同。这涉及到桂枝汤体温双向调节作用的物质基础, 有待进一步研究。

参考文献:

[ 1 ] Gersberger R. Nitric oxide and body temperature control [ J ]. News Physiol Sci, 1999, 14: 30-36.  
[ 2 ] Lin JH, Lin MT. Nitric oxide synthase-cyclooxygenase pathways in organum vasculosum laminae terminalis: possible role in pyrogenic fever in rabbits [ J ]. Br J Pharmacol, 1996, 118( 1 ): 179-185.

- [ 3 ] 李沧海, 霍海如, 周军, 等. 桂枝汤对发热及低体温大鼠下丘脑 15-羟基前列腺素脱氢酶活性的影响[ J ]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9( 1 ): 27-30.
- [ 4 ] Schic ER, Riedel W, and Simon M. Role of nitric oxide in temperature regulation[ J ]. Prog Brain Res, 1998, 115: 87-110.
- [ 5 ] Simon E. Nitric oxide as peripheral and central mediator in temperature regulation[ J ]. Amino acids, 1998, 14( 1-3 ): 87-93.
- [ 6 ] Roth J, Voigt BS and Zeisberger E. Inhibition of nitric oxide synthase results in a suppression of interleukin 1 beta-induced fever in rats[ J ]. Life Sci, 1998, 62( 22 ): PL 345-350.
- [ 7 ] Paula DD, Steiner AA and Branco LG. The nitric oxide pathway is an important modulator of stress-induced fever in rats[ J ]. Phys Behav, 2001, 70( 5 ): 505-511.
- [ 8 ] Soszynski D. The inhibition of nitric oxide synthase suppresses LPS- and psychological stress -induced fever in rats [ J ]. Physiol Behav, 2001, 72( 1-2 ): 65-72.
- [ 9 ] Jung JK, Sohn UD, and Lee SY. The hypertbermic effect of nitric oxide in central nervous system[ J ]. Korean J Physiol Pharm, 2001, 5( 1 ): 93-98.
- [ 10 ] Steiner AA, Jose AR and Samuel MM. Antipyretic role of the NO- cGMP pathway in the anteroventral preoptic region of the rat brain[ J ]. Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol, 2002, 282: 584-593.
- [ 11 ] Perotti CA, Nogueira MS, Antunes R. J. , et al. Effects of a neuronal nitric oxide synthase inhibitor on lipopolysaccharide-induced fever[ J ]. Braz J Med Biol Res, 1999, 32 ( 11 ): 1381-1387.
- [ 12 ] Busconi L and Michel T. Endothelial nitric oxide synthase N-terminal myristoylation determines subcellular localization [ J ]. J Biol Chem, 1993, 268( 12 ): 8410-8413.