

• 药理 •

发热大鼠脑组织 15-羟基前列腺素脱氢酶活性的 时相变化及桂枝汤的影响

李沧海, 周 军, 霍海如, 李兰芳, 姜廷良
(中国中医研究院中药研究所唐氏中药研究中心, 北京 100700)

摘要: 目的: 研究发热大鼠下丘脑和其他脑组织 15-PGDH 活性的时相变化及桂枝汤的影响。方法: 利用 Radio-TLC 法测定发热大鼠及桂枝汤治疗组脑组织不同时间的 15-PGDH 活性。结果: 皮下注射酵母后, 伴随体温的升高, 大鼠下丘脑 PGDH 活性先降低后逐渐恢复, 桂枝汤可阻止该酶早期的活性降低并升高至正常值以上; 其他脑组织 PGDH 活性也有类似变化, 但桂枝汤可抑制后期的 PGDH 活性向正常恢复。结论: 下丘脑 PGDH 活性降低, 参与了酵母性发热的早期机制, 升高该部位 PGDH 活性可能是桂枝汤解热机理之一。

关键词: 桂枝汤; 体温调节; 15-羟基前列腺素脱氢酶; 下丘脑; 大鼠

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1005-9903(2004)01-0022-04

Effect on the Time Course of the Cerebral Prostaglandin Dehydrogenase in Pyretic Rats by Guizhi Tang

Li Cang-hai, ZHOU Jun, HUO Hai-ru, LI Lanfang, JIANG Ting-liang

(Tang Center for Herbal Medicine Research Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700)

Abstract: Objective: To investigate the effect of Guizhi Tang on the time course of cerebral 15 hydroxy prostaglandin dehydrogenase(15-PGDH) in pyretic rats. Methods: The activity of 15-PGDH in hypothalamus and the other cerebral tissues at different time in rats were measured using radio-TLC assay. Results: Paralleled to a fever response induced by a s. c. injection of yeast, the activity of 15-PGDH decreased first, then followed by a gradual return to baseline. Treatment with Guizhi Tang inhibited the decrease of PGDH activity and enhanced it to above normal level; similar changes appeared to the other cerebral tissues while the recover in the later phase was inhibited by Guizhi Tang. Conclusion: Present data suggest that the decrease of the PGDH activity in hypothalamus may contribute to the early stage of fever-induction by yeast in rats and the increase of the enzyme may be one of the antipyretic mechanisms of Guizhi Tang.

Key words: Guizhi Tang; Thermoregulation; 15-PGDH; Hypothalamus; Rat

前列腺素 E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂) 是介导发热的最重要中枢介质, 桂枝汤及其有效部位 A 对抗酵母诱导的大鼠体温升高与降低发热动物下丘脑部位 PGE₂ 水平有关^[1,2], 而组织内 PGE₂ 浓度主要取决于局部的合成和代谢/转运之间的动态平衡, 即主要的限速合成酶和代谢/转运酶的变化。我们近来的实验结果初步证明, 桂枝汤对发热大鼠下丘脑组织的环氧合酶(cyclooxygenase, COX) 活性影响不明显, 而引起的 15-羟基前列腺素脱氢酶(15-hydroxyprosta-

glandin dehydrogenase, 15-PGDH) 活性变化与其解热作用相关^[3,4]。为进一步探讨 15-PGDH 与桂枝汤解热作用的关系, 我们利用另一种 15-PGDH 测定方法, 观察了在酵母性发热大鼠下丘脑及下丘脑以外的脑组织该酶活性的时相变化及桂枝汤的影响。

1 实验材料

1.1 动物 雄性 Wistar 大鼠, 体重 220 ± 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。

1.2 药品与试剂 桂枝汤煎液制备及鲜酵母来源同文献^[4]。PGE₂、15-keto-PGE₂、13, 14-dihydro-15-keto-PGE₂、PGF_{2α}、15-keto-PGF_{2α}、13, 14-dihydro-15-keto-

PGF_{2α}均为 Cayman 公司产品, [³H] PGE₂ 购自 Amersham Pharmacia Biotech, CBB G-250、β-NAD⁺ 为 Sigma 产品, DTT、Tris-HCl、EDTA 为 Boehringer 产品, 硅胶板 (200 × 200mm, 0.20~0.25mm) 为青岛海洋化工厂产品, 其他试剂均为分析纯产品。

1.3 主要仪器 同文献⁴¹。

2 实验方法

2.1 防污染措施 参照文献⁴¹。

2.2 动物适应与测温 参照文献⁴¹, 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。使用数字温度计测量大鼠肛温作为其体温值。

2.3 动物发热诱导和分组给药 基础体温 37.2 ± 0.5℃的大鼠, 除正常组外, 背部皮下注射鲜酵母 (2.4g/kg B. W.), 3.5h 后选取体温升高值 ≥0.8℃者, 随机均分为 9 组, 依次为酵母 3.5、4.5、5.5、6.5、7.5h 组、酵母+桂枝汤 4.5、5.5、6.5、7.5h 组, 每组 12 只。酵母+桂枝汤 4.5h 组于注射酵母后 3.5h 给予桂枝汤 1 次, 其它给药组分别于注射酵母后 3.5h 和 4.5h 给予桂枝汤各一次(单次给药剂量为 20g 饮片/kg B. W., p. o.); 正常组及酵母组给予同体积蒸馏水。分组后每隔 1h 测温一次, 于相应时刻点迅速将动物断头取脑(1min 内完成), 于冰速冻, 于 -70℃冰箱保存备测。结果以体温变化值 ΔT (各时刻点肛温与基础体温的差值) 表示。

2.4 下丘脑 15-PGDH 活性测定 参照文献⁵¹, 略加改动。去除冷冻大鼠全脑表面可见血管, 快速取下丘脑组织, 精密称重, 加入 5 倍体积 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (PH7.4, 内含 1mM DTT, 1mM EDTA), 以电动玻璃匀浆器匀浆 (4 × 5s)。匀浆液先以 13000 × g 离心 20min, 上清液再以 105000 × g 离心 60min, 取适量上清液以 Bradford 法测定蛋白含量⁶¹, 加入适当匀浆缓冲液调蛋白质浓度至 1mg/ml, 于 -70℃冻存待测(所有操作均于 4℃下进行; 所用溶液及器皿均经预冷)。剥离下丘脑剩余的脑组织, 以剪刀剪碎, 酶样本制备同下丘脑。反应体系(终体积为 1ml) 包括 50mM Tris-HCl, PH7.4, 1μM DTT, 1mM NAD⁺, 10μg PGE₂(内含氚标 PGE₂ 30000cpm)。37℃水浴预温 5min, 加入 50μl 酶样本起始反应, 孵育 30 分钟, 加入 50μl 5N 枸橼酸终止反应, 2 倍体积乙酸乙酯提取 3 次, 合并有机相, 氮气吹干, 残渣复溶于 30μl 氯仿: 甲醇 (1:2, V:V), 用进样器取 10μl 点于硅胶 G 薄层板上, 吹干, 同时将 PGE₂、15-keto-PGE₂、13, 14-dihydro-15-keto-PGE₂、PGF_{2α}、15-keto-PGF_{2α}、13, 14-dihydro-15-keto-PGF_{2α} 点于同一硅胶板上, 以乙酸乙酯: 乙酸: 异辛烷: 水 (11:2:5:10, 上清相) 饱和并展开 16cm, 挥去有机溶剂, 10% 磷钼酸乙醇溶液显色, 将与 15-keto-PGE₂、13, 14-dihydro-15-keto-PGE₂、15-keto-PGF_{2α}、13, 14-dihydro-15-keto-PGF_{2α} 对应的斑块刮下, 以 2ml 无水乙醇振荡溶出, 吸取 1.5ml 加入闪烁瓶中, 加入 8ml 闪烁液 (PPO 4g, POPOP 40mg, 萘 60g, 甲苯 1000ml, 乙醇 570ml) 计数。以每 min 每 mg 蛋白产主的 15-keto-PGE₂、13, 14-dihydro-15-keto-PGE₂、15-keto-PGF_{2α}、13, 14-dihydro-15-keto-PGF_{2α} 的总量为 15-PGDH 活性单位 (pmol·mg⁻¹·pro·min⁻¹)。同时以灭活酶(沸水浴 5min) 作为空白, 以氚标 PGE₂ 计算回收率。

2.5 统计学处理 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, q 检验比较两组间差异显著性。

3 实验结果

3.1 酵母性发热大鼠体温、下丘脑 15-PGDH 活性变化及桂枝汤的影响 如图 1 所示, 几乎所有大鼠在皮下注射酵母后约 3.5h 左右, 体温升高超过 1.2℃,

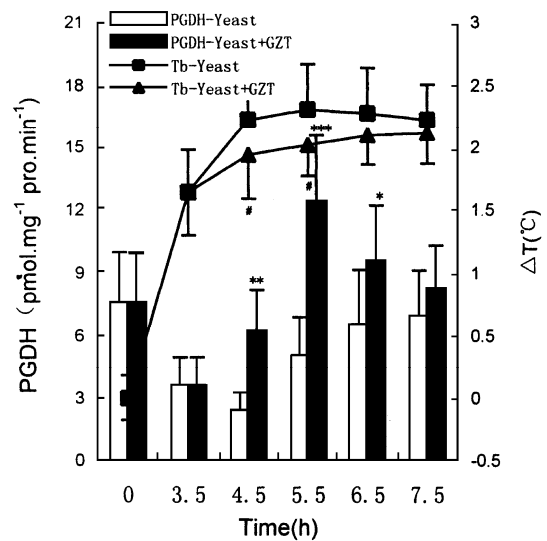


图 1 发热大鼠体温及下丘脑 PGDH 活性时相变化及桂枝汤的影响

注: 与酵母对应时间组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与酵母对应时间组相比, # $P < 0.05$

随后继续升高, 在本实验观察期间的 4.5~7.5h 阶段, 体温几乎维持峰值而波动不大; 灌服桂枝汤后, 体温较之酵母致热组为低, 4.5~5.5h (即药后 1~2h) 出现明显解热作用 ($P < 0.05$)。大鼠下丘脑 PGDH 活性在皮下注射酵母后 3.5h 降低至正常大鼠的 48% 左右, 在 4.5h 左右降至最低, 约为正常动物的 32%, 之后逐渐恢复, 7.5h 已接近正常大鼠 PGDH 水

平;另外,在 5.5h 时出现了明显的 13,14-dihydro-15-keto PGE₂ 斑点,而其他时间该斑点皆无。发热动物灌服桂枝汤后,PGDH 活性快速上升,完全阻止了酵母诱导的 PGDH 活性的进一步降低,使 PGDH 活性在 5.0~7.5h(即药后 1.5~4.0h)时段均高于正常大鼠,其中在 5.5h(药后 2h)左右出现的峰值较之正常大鼠升高 63%,之后快速下降,7.5h(药后 4h)左右约较正常大鼠酶活性升高 8%。

3.2 酵母性发热大鼠下丘脑以外的脑组织 15-PGDH 活性变化及桂枝汤的影响 结果见图 2。大鼠下丘脑以外的脑组织(简称其它脑组织)15-PGDH 活性较之下丘脑活性为低,约为后者的 70%左右。皮下注射酵母后,其他脑组织 15-PGDH 活性显著下降,最低活性出现在 3.5h 左右(约为正常动物的 31%),随后快速向正常恢复,7.5h 时活性约为正常大鼠的 85%;灌服桂枝汤后 1.5h 左右,反而有抑制向正常恢复的趋势,最强药效在 6.5h 即药后 3h 左右($P < 0.05$)。

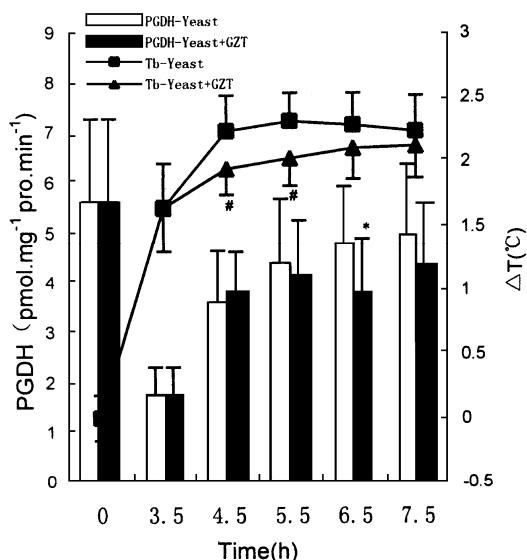


图 2 发热大鼠体温及下丘脑以外的其他脑组织 PGDH 活性时相变化及桂枝汤的影响

4 讨论

前列腺素类(PGs)是机体体温调节的终端中枢介质^[7],而 PGE₂ 与发热密切相关,其在炎症或发热过程中主要由 II 型环氧合酶(COX₂)即时、局部地合成并发挥生物活性,在合成细胞或邻近细胞内被快速灭活,半寿期仅 30min 左右。而 15-PGDH 几乎是大鼠所有前列腺素 E₂ 代谢途径的第一步,该酶先将 PGE₂ 上 15(s)-H 转移至 NAD⁺ 或 NADP⁺,生成 15-酮-PGE₂,继而激活邻位双键经 13,14-前列腺素还原酶(Δ^{13} -R)还原为 13,14-双氢-15-酮-PGE₂,活性丧失

90%以上,其后 β -氧化和 α -氧化可独立地进行,生成一系列氧化物^[8]。由于 9-酮前列腺素还原酶可以介导 PGE₂ \rightarrow PGF_{2 α} 转化,故本实验也将 15-keto PGF_{2 α} 、13,14-dihydro-15-keto PGF_{2 α} 作为该酶作用产物。我们以前的工作证明,皮下注射酵母可降低下丘脑 15-PGDH 活性,桂枝汤灌胃可剂量相关性地抑制该变化并促进发热大鼠体温的恢复,两者呈强相关,推测下丘脑 PGDH 可能参与桂枝汤的解热机制。观察酵母性发热大鼠脑内 PGDH 活性的时相变化及桂枝汤对之的影响,不仅可以探讨 PGDH 在发热中的作用,还可以进一步考察桂枝汤的解热机制是否与 PGDH 活性变化有关^[4]。我们的工作证实,桂枝汤的抗低体温作用与下丘脑 PGDH 变化呈弱相关^[4],加之低体温可能与前列腺素 D₂(PGD₂)有关,而 PGD₂ 并非 PGDH 的合适底物,故本实验并未考察皮下注射酵母可能引起的早期不稳定的低体温时相 PGDH 的活性变化。

对于正常大鼠,下丘脑 PGDH 活性明显高于其他脑组织。皮下注射酵母后 3.5h,伴随着体温的明显升高,下丘脑及脑组织 PGDH 活性均明显下降,其中后者已经达到最低值;4.5h,酵母性发热已几乎到达峰值,而下丘脑 PGDH 活性则降低至最低,灌胃桂枝汤不仅可以完全阻止该区 PGDH 活性的继续下降,而且呈明显上升趋势,其他脑组织该酶活性明显上升,与用药与否无关;注射酵母后 5.5h 体温略有上升,下丘脑 PGDH 活性已逐渐向正常水平恢复,桂枝汤升高该区 PGDH 活性至峰值,为正常水平的 1.63 倍,而其他脑组织 PGDH 活性继续向正常恢复,桂枝汤反而有抑制该酶恢复趋势;5.5~7.5h 间,体温略呈下降趋势,下丘脑 PGDH 活性继续向正常恢复,而给药组则逐渐降低,但仍高于正常水平,其他脑组织也向正常水平恢复,但给药组反而降低,至 6.5h 到达药效高峰,而后向正常恢复,该时段 PGDH 活性均低于对照组。

总之,从代谢产物结构来看,本实验条件下生成 15-keto PGE₂ 的量(除酵母发热 5.5h 组外),远远大于其他三种产物(13,14-dihydro-15-keto PGE₂ > 15-keto PGF_{2 α} > 13,14-dihydro-15-keto PGF_{2 α})。从空间分布方面来看,下丘脑部位 PGDH 活性或其表达较其它脑组织平均值为高,这提示该部位 PGE₂ 的迅速、即时灭活,防止有害的积累具有较重要的生物学意义,是否直接参与 PGE₂ 体温方面的反应活性,尚有待进一步的证实。从时相方面来看,皮下注射酵母诱导

的体温升高期,下丘脑 PGDH 活性降低及最小值的到达时间与体温的升高及体温峰值的到达时间均表现一致,呈一定负相关,至于在发热后期,该酶活性与体温的改变关联不大;另外,在 5.5h 时,体温升高已达峰值,13, 14-dihydro-15-keto PGE₂ 处出现了明显斑点,而在其他组该位置未能观察到明显斑点,说明介导 15-keto PGE₂ → 13, 14-dihydro-15-keto PGE₂ 转化的 Δ¹³-R 活性明显升高,而桂枝汤治疗组对应时刻点 15-keto PGE₂ 生成量远远大于该时刻酵母发热组,也显示桂枝汤可明显抑制 Δ¹³-R 活性,或者显著促进 15-keto PGE₂ 向其他产物的转化,该作用是否与其解热作用有关也有待进一步的研究。其它脑组织 PGDH 活性变化与体温变化相比,在发热早期,前者的 PGDH 酶活性降低迅速,在时相上似乎超前者 1h 左右,这与 PGE₂ 的即时、快速代谢特点不符,况且桂枝汤呈现解热作用的同时,而这些组织的 PGDH 活性反呈下降趋势。故推测在大鼠脑组织中,下丘脑部位 PGDH 活性的降低可能参与了酵母性发热的早期机制,该酶并未参与发热的维持;而桂枝汤升高 PGDH 活性,从而加速该区 PGE₂ 的灭活可能是其解热作用机理之一。

参考文献:

[1] 富杭育,周爱香,查显元,等.桂枝汤对体温双向调节作

用的机理探讨——对下丘脑前列腺素 E₂ 的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 1993, 13(11): 667-669.

- [2] 谭余庆,李晓芹,霍海如,等.桂枝汤有效部位 A 对体温的双向调节作用及其机理研究——对大鼠下丘脑前列腺素 E₂ 含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 1998, 4(2): 11-13.
- [3] 齐云,李沧海,郭淑英,等.桂枝汤对体温双向调节作用机理研究——对发热及低体温大鼠下丘脑 PGE₂ 含量及 COX 活性的影响[J]. 中药药理与临床, 2002, 17(6): 1-3.
- [4] 李沧海,霍海如,周军,等.桂枝汤对发热及低体温大鼠 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.
- [5] Pichaud F, Roux S, Frenco JL, et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ induces NAD⁺-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase in human neonatal monocytes[J]. Blood, 1997, 89(6): 2105-2112.
- [6] Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. Anal Biochem. 1976, 72(2): 248-254.
- [7] Cocciani F, Akarsu ES. Prostaglandin E₂ in the pathogenesis of fever. An update[J]. Ann N Y Acad Sci, 1971, 856: 76-81.
- [8] Samuelsson B, Granstrom E, Green K, et al. Metabolism of prostaglandins[J]. Annu Rev Biochem, 1975, 44: 669-695.