

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

齐云, 霍海如, 周军, 郭淑英, 田甲丽, 姜廷良
(中国中医研究院中药研究所, 北京 100700)

摘要: 桂枝汤在对两种不同体温状态模型大鼠呈现解热或升温作用的同时, 对酵母诱导的发热大鼠, 可显著抑制其下丘脑中 AC 活性, 降低异常升高的 cAMP 含量; 而对安痛定诱导的低体温大鼠, 又可显著增强其下丘脑中 AC 活性, 增加异常降低的 cAMP 含量。实验结果提示: 桂枝汤对体温的双向调节作用可能部分是通过影响 AC 活性, 从而改变下丘脑细胞中 cAMP 含量来实现的。

关键词: 桂枝汤; 体温双向调节; 腺苷酸环化酶(AC); 环一磷酸腺苷(cAMP)

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2001)02-0025-04

Mechanism of Guizhi Decoction on Dual-directional Thermoregulation — Effect on AC Activity and cAMP Content in Hypothalamus of Febrile and Hypothermia Rats

Qi Yun, Huo Hai-ru, Zhou Jun, Guo Shu-ying, Tian Jia-li, Jiang Ting-liang
(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of TCM, Beijing 100700)

Abstract: In febrile rats induced by fresh yeast, Guizhi decoction could cut down body temperature with weakening AC activity and descending cAMP content in hypothalamus. On the other hand, in hypothermia model induced by aminopyrine, Guizhi decoction could go up body temperature with strengthening AC activity and increasing cAMP content in hypothalamus. The results indicate that Guizhi decoction may regulate body temperature in dual-direction by means of effecting AC activity and promoting or inhibiting hypothalamus intracellular metabolism of cAMP, a febrile medium in center.

Key words: Guizhi decoction; dual-direction thermoregulation; Adenyl cyclase(AC); Adenosine cyclic monophosphate (cAMP)

环一磷酸腺苷(cAMP)是一种重要的中枢发热介质^[1], cAMP 含量受腺苷酸环化酶(AC)和磷酸二酯酶(PDE)活性的影响; AC 活性增强使 ATP 大量转化为 cAMP, 反之, AC 活性减弱则 cAMP 的生成减少; PDE 活性增强可使 cAMP 降解为 5' AMP 而失去活性, 若 PDE 活性减弱, 则 cAMP 降解减少。我们先前的实验发现^[2], 桂枝汤对酵母致发热大鼠可解热, 对安痛定致低体温大鼠可升温, 这种双向调节部分是通过影响体温调节中枢中 cAMP 含量来实现的。之后又对两种模型大鼠下丘脑中 AC 及 PDE 活性的

经时变化进行了研究, 发现在动物体温升降的过程中, AC 的活性变化有时相过程, 而 PDE 活性的变化不明显, 因此认为模型动物体温的升降, 主要与 AC 活性的变化密切相关。为弄清桂枝汤对这两种模型动物下丘脑中 cAMP 双向调节作用的机制, 我们又进一步对这两种模型动物不同时段下丘脑中 AC 活性及 cAMP 含量的变化进行了动态时相观察。

1 材料和方法

1.1 药物及试剂 所用药材购于北京市药材公司, 经生药学鉴定, 其原植物分别为桂枝 *Cinnamomum cassia* Presl, 芍药 *Paeonia lactiflora* Pall., 甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch., 生姜 *Zingiber officinale* Rose., 大枣 *Ziziphus jujuba* Mill.。按《伤寒论》中的 10: 10: 7: 10: 10 的重量比例混合, 加 10 倍量水浸泡 1h, 煮沸

收稿日期: 2000-09-14

基金项目: 国家九五攀登项目“中药现代化关键问题的基础研究”资助课题 No: 970211018

45min, 头煎过滤取渣, 再加8倍的水煮沸30min, 过滤合并滤液水浴浓缩, 4℃冰箱保存, 临用时配制。实验对低体温模型及发热模型, 桂枝汤用量为10g生药/kg。鲜酵母购于北京第二食品厂; 安痛定为北京制药厂出品, 批号990308; ATP、茶碱为sigma公司产品; 白蛋白标准液为北京北化精细化学品有限责任公司产品; cAMP测定试剂盒购自中国科学院原子能研究所。其它试剂均为国产分析纯。

1.2 动物 Wistar大鼠, 雄性, 体重 165 ± 15 g, 由北京医科大学动物中心提供(合格证号: 医动字第01-3056号)。动物适应实验室环境三天后, 用经校正过的半导体温度计测量直肠温度(测量探头插入大鼠肛门内3.5cm, 温度计下端用胶布固定, 避免操作中探头插入深度的误差)。实验室温度控制在 22 ± 2 ℃。

1.3 仪器 半导体温度测温仪为上海医用仪表厂产品; 高速冷冻离心机Centrifuge5400为Eppendorf公司产品; LS9800型液体闪烁计数器, Beckman公司产品。

1.4 实验分组及步骤 选取基础体温在 $36 \sim 37$ ℃的大鼠随机分为25组, 分两批次进行实验。第一批次14组, 每组8~10只。除其中一组不作处理为正常对照组外, 其余13组以12%鲜酵母悬液(2.4g/Kg体重)背部皮下注射, 诱导体温升高为发热模型, 发热动物随机分为模型组及模型+桂枝汤组(简称给药组), 给药组于造模后第4h灌胃给药, 1h后重复给药一次, 剂量同前。模型组给同体积生理盐水; 第二批次11组, 每组7~8只。除其中一组不作处理为正常对照组外, 其余10组随机分为安痛定模型组和安痛定模型+桂枝汤组(简称给药组), 给药组灌胃给药, 首次给药后1h重复给药一次, 剂量同前。模型组给同体积生理盐水。末次灌胃后随即腹腔注射安痛定2.2ml/kg诱导体温下降, 并分别于造模后15min、45min、1h、1.5h、2.5h; 发热模型动物分别于1.5h、3h、4h、5h、6h、7h、8h、9h检测直肠温度后立即断头取脑(1min内完成), 干冰速冻, 于-20℃冰箱保存。

1.5 cAMP含量的测定 取冷冻脑组织, 剥离下丘脑(以灰结节及视交叉的中心点确定下丘脑), 称取60mg左右下丘脑组织, 切取其中一半下丘脑组织以5%的三氯醋酸1ml制备匀浆, 3000r/min离心10min, 取上清加5倍体积水饱和乙醚洗3次以除去三氯醋酸, 水相在75℃水浴上蒸干, 干渣重溶于TE缓冲液

(50mmol/l Tris, 含DETA 4mmol/l, PH7.5), 取40μl上清液按cAMP试剂盒说明书操作测定cAMP。测得cpm值根据标准曲线可算出每mg湿组织含cAMP的量, 用pmol/mg表示。

1.6 AC的活性测定^[3] 所余另一半下丘脑组织加入预冷的150mmol/l Tris-Maleate缓冲液1ml(pH7.4, 含5mmol/l MgSO₄), 在玻璃匀浆器内于冰浴中制成匀浆, 混合均匀的匀浆液取适量用Bradford法^[4]测定蛋白含量外, 取50μl匀浆液加入500μl酶反应液(含有50mmol/l Tris-Maleate缓冲液pH7.4, 5mmol/l MgSO₄, 8mmol/l 茶碱, 4mmol/l DTT, 1mmol/l EGTA, 1.5mmol/l ATP)中, 在30℃水浴保温15min, 于沸水加热3min终止反应, 冷却后于3000r/min离心10min, 取40μl上清液测定cAMP。测得cpm值根据标准曲线可算出cAMP的量, 以每min每mg蛋白分解ATP生成cAMP的量为AC活性单位, 用pmol/mg·min表示。

1.7 统计学方法 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 均数间显著性检验用t检验。

2 结果

2.1 桂枝汤对鲜酵母致发热大鼠不同时段体温及下丘脑中AC活性及cAMP含量的影响 从模型动物看, 鲜酵母皮下注射后4h动物体温明显增高, 至造模后9h体温仍居高不下。而造模后大鼠下丘脑中AC活性亦逐渐上升。至3h达峰值, 与正常对照组比较其差异具有统计学意义($P < 0.05$), 其后活性开始逐渐下降(此时动物正处于高体温状态), 5h达低谷, 后(7h至9h)又逐渐回升, 且明显高于正常对照组($P < 0.01$)。cAMP含量继AC活性3h显著升高后亦随之明显升高, 并一直保持在高位。桂枝汤解热作用于第一次给药3h后出现(与模型组比较, $P < 0.05$), 其对发热大鼠下丘脑中AC活性的显著抑制作用出现于第一次给药后第2.3h(与模型组比较, $P < 0.05$), cAMP含量继AC活性显著受抑制后随之明显降低(与模型组比较, $P < 0.05$)。

2.2 桂枝汤对安痛定致低体温大鼠不同时段体温及下丘脑中AC活性及cAMP含量的影响 安痛定腹腔注射后15min动物体温明显降低(与正常对照组比较, $P < 0.05$); 至45min时动物体温降至最低点。AC活性在安痛定注射后15min、45min时明显下降, 与正常对照组比较其差异具有显著性($P < 0.05$), 其后活性逐步回升。在造模后15min, 动物体温已明显下降时, 下丘脑中cAMP量并未相应明显

降低,至45min时,cAMP含量才明显低于正常对照组($P < 0.01$)。灌胃给予桂枝汤的动物,其抗低体温的作用出现于造模后45min(此时为第1次给药后105min,正值模型组动物体温的最低点)。其对抗低体温大鼠下丘脑中AC活性下降的作用出现于造模后15min(与模型组比较, $P < 0.05$),亦即第一次给药

后的75min。给药组大鼠下丘脑中cAMP含量在45min时明显高于模型组($P < 0.05$)。动物的低体温状态于1h后基本恢复,1h、1.5h、2.5h模型组及给药组动物下丘脑中AC活性及cAMP含量与正常对照组比较,差异无显著性($P > 0.045$)。

表1 桂枝汤对鲜酵母致发热大鼠不同时段体温及下丘脑中AC活性及cAMP含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	体温(°C)			AC活性 (pmol/mg·min)	cAMP含量 (pmol/mg)
		基础体温	处死前体温	体温升高值		
正常	8	36.24 ± 0.16	36.69 ± 0.18	0.45 ± 0.18	117.93 ± 26.90	1.58 ± 0.79
模型	1.5h	36.21 ± 0.21	35.99 ± 0.56	-0.22 ± 0.52	150.90 ± 37.62	1.67 ± 0.86
	3h	36.10 ± 0.08	36.89 ± 0.34	0.79 ± 0.30 [△]	180.97 ± 38.90 [△]	2.27 ± 0.58
	4h	36.13 ± 0.15	37.38 ± 0.54 ^{△△}	1.34 ± 0.44 ^{△△}	154.50 ± 49.32	2.60 ± 0.80 [△]
5h	模型	36.27 ± 0.42	37.96 ± 0.17 ^{△△}	1.69 ± 0.44 ^{△△}	104.15 ± 23.14	2.06 ± 0.74
	给药	36.17 ± 0.14	38.00 ± 0.35	1.83 ± 0.39	157.04 ± 42.37	2.70 ± 0.98
6h	模型	36.28 ± 0.22	37.90 ± 0.48 ^{△△}	1.62 ± 0.48 ^{△△}	116.91 ± 27.20	2.56 ± 0.68 [△]
	给药	36.27 ± 0.28	37.87 ± 0.44	1.60 ± 0.52	80.70 ± 26.03 [*]	3.31 ± 1.01
7h	模型	36.26 ± 0.23	37.89 ± 0.23 ^{△△}	1.63 ± 0.24 ^{△△}	165.25 ± 37.56 [△]	2.81 ± 0.34 ^{△△}
	给药	36.35 ± 0.24	37.26 ± 0.65 [*]	0.91 ± 0.78 [*]	115.20 ± 26.15 ^{**}	3.06 ± 0.89
8h	模型	36.31 ± 0.14	38.06 ± 0.17 ^{△△}	1.76 ± 0.26 ^{△△}	193.09 ± 29.32 ^{△△}	3.28 ± 0.91 ^{△△}
	给药	36.32 ± 0.28	37.62 ± 0.32 [*]	1.30 ± 0.39 [*]	195.62 ± 36.15	2.27 ± 0.88 [*]
9h	模型	36.26 ± 0.24	38.06 ± 0.26 ^{△△}	1.8 ± 0.35 ^{△△}	224.32 ± 43.67 ^{△△}	3.88 ± 0.90 ^{△△}
	给药	36.28 ± 0.20	37.73 ± 0.42	1.46 ± 0.39	206.35 ± 46.13	2.67 ± 1.23 [*]

注:与正常对照组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与相同时间点模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。(下表同)

表2 桂枝汤对安痛定致低体温大鼠不同时段体温及下丘脑中AC活性及cAMP含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	体温(°C)			AC活性 (pmol/mg·min)	cAMP含量 (pmol/mg)
		基础体温	处死前体温	体温降低值		
正常	7	36.46 ± 0.29	36.37 ± 0.28	0.09 ± 0.48	45.23 ± 10.25	2.06 ± 0.54
15min	模型	36.43 ± 0.31	35.87 ± 0.35 [△]	0.56 ± 0.30 [△]	33.12 ± 4.11 [△]	1.90 ± 0.28
	给药	36.52 ± 0.22	36.09 ± 0.36	0.44 ± 0.35	40.03 ± 5.76 [*]	1.85 ± 0.56
45min	模型	36.54 ± 0.13	35.64 ± 0.43 ^{△△}	0.9 ± 0.41 ^{△△}	32.54 ± 9.30 [△]	1.28 ± 0.28 ^{△△}
	给药	36.46 ± 0.29	36.11 ± 0.07 [*]	0.34 ± 0.23 ^{**}	37.33 ± 14.89	1.86 ± 0.53 [*]
1h	模型	36.55 ± 0.21	36.22 ± 0.34	0.34 ± 0.28	40.44 ± 8.26	2.01 ± 0.37
	给药	36.44 ± 0.32	36.16 ± 0.44	0.28 ± 0.54	38.07 ± 7.79	2.24 ± 0.31

3 讨论

cAMP是目前国内学者很重视的中枢发热介质,蔡群等^[5]证实,中枢注射db-cAMP(属性稳定的cAMP衍生物)不仅引起发热,而且有db-cAMP热限的形成。王文仪等^[1]发现环境高温造成的过热则没有脑脊液cAMP含量的相应变化,这表明在中枢cAMP升高与体温升高的因果关系中,是cAMP增多引起体温升高而不是体温升高引起cAMP的增多。cAMP的含量由AC和PDE的活性所决定,前者能促进cAMP的合成,而后者能促进cAMP的分解。为探讨桂枝汤为何能使造模动物下丘脑中cAMP含量向正常水平方向移动及其作用特点,本实验特对不同时段同一样本下丘脑中AC活性及cAMP含量进行

了测定。

结果显示,桂枝汤在对两种模型不同体温状态的大鼠呈现解热或升温作用的同时,对酵母诱导的发热大鼠(下丘脑中cAMP含量异常升高),可显著抑制AC活性;而对安痛定诱导的低体温大鼠(下丘脑中cAMP含量异常降低),又可显著增强AC活性。即通过抑制发热大鼠下丘脑中AC活性,使其中cAMP的合成减少,从而达到降低该部位异常升高的cAMP含量;通过促进低体温大鼠下丘脑中AC活性,使其中cAMP的合成相对增多,从而达到回升该部位异常降低的cAMP含量,最终发挥其双向调节体温的作用。

AC、cAMP的变化曲线与体温的变化曲线见图

1、图2(图中T及AC cAMP值均为与正常组的差值,为使变化趋势更明显,AC差值图1缩小100倍,图2缩小10倍):从图1可以发现,桂枝汤给药后第1h至给药后第5h(即图中第5~9h),发热大鼠AC活性及cAMP含量的变化趋势并不相同,AC活性是从降低至升高的时相过程,而cAMP含量却是从升高至降低的过程。一般情况下,cAMP的含量高低是AC和PDE活性相互作用的结果,从我们以前的实验可知,该模型主要与AC活性的变化密切相关,而PDE活性在整个发热过程中变化并不明显。这种AC活性与cAMP含量的背离现象提示桂枝汤可能还有阻断cAMP与细胞内蛋白激酶A(PKA)结合的作用(使细胞内游离的cAMP量短暂增多)。因为实验所测定的cAMP仅仅是组织中游离的cAMP,而细胞中与PKA结合的cAMP早在实验的第一步便已随PKA除去。当然,桂枝汤阻断cAMP与细胞内蛋白激酶A(PKA)结合这种推测是否正确还有待实验进一步地验证。

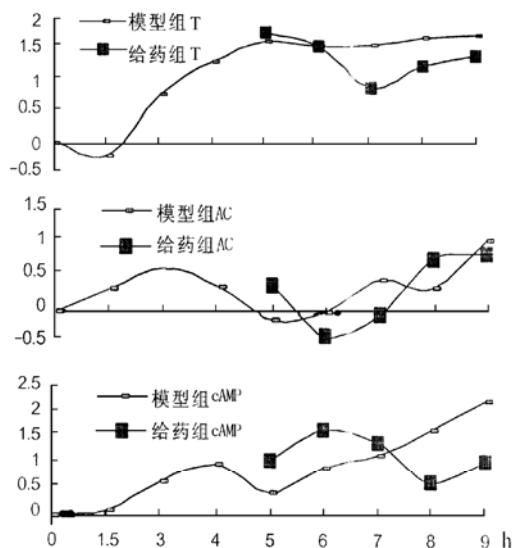


图1 桂枝汤对鲜酵母致发热大鼠体温及下丘脑中AC活性和cAMP含量的影响

实验还显示,桂枝汤对发热大鼠下丘脑中AC活性的抑制作用发生于造模后AC活性从上升→下降→再上升的起点,由于AC活性第一次的上升,使下丘脑中cAMP含量已处于高水平。自然,桂枝汤对AC活性第二次上升的抑制作用难于使cAMP含量完全恢复至正常水平。因此,体温的变化趋势也只是上升受抑,而多不能降至正常。而且,造模后第9h,给药组大鼠体温虽低于模型组,然其差异无显著性($P > 0.05$),表明桂枝汤虽有抑制体温上升的

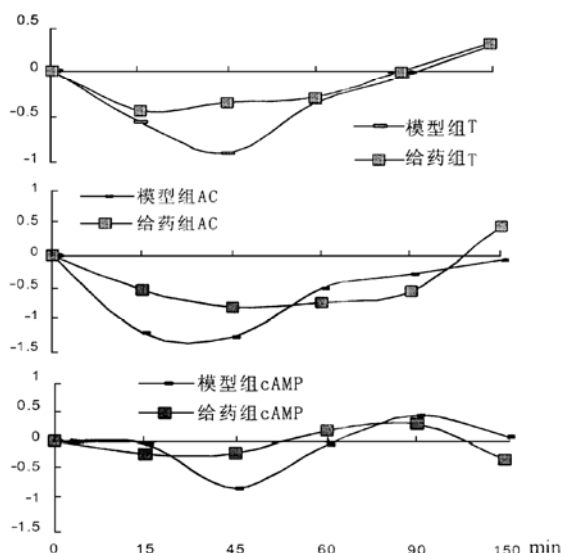


图2 桂枝汤对安痛定致低体温大鼠体温及下丘脑中AC活性和cAMP含量的影响

作用,但其作用不强,维持时间也不长,这与中医临床经验相吻合。

从图2可见,在低体温大鼠模型中,安痛定腹腔注射15min后,动物体温虽已明显降低,此时下丘脑中cAMP含量却并未明显减少。这说明该模型体温下降的始动环节不依赖于cAMP。但桂枝汤对低体温大鼠下丘脑AC活性的下降有对抗作用,而从造模后45min,给药组动物体温及cAMP含量均显著高于模型组的结果说明:桂枝汤抗低体温的机理却可能部份是通过对抗下丘脑细胞膜AC活性的下降,使胞内cAMP合成量不至于降低太多来实现的。

参考文献:

[1] 杨惠玲,潘景轩,吴伟康.高级病理生理学[M].北京:北京科学出版社,1998.102-103.
 [2] 富杭育,周爱香,查显元,等.桂枝汤对体温双向调节作用机理探讨——对下丘脑和血浆中环核苷酸的影响[J].中药药理与临床,1994,(4):1.
 [3] 张书岭,尹桂山.组织匀浆腺苷酸环化酶的简易测定法[J].河北医学院学报,1991,12(2):18.
 [4] Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72(2): 248-254.
 [5] 蔡群,李楚杰.CAMP热限及其与致热原热限的关系研究[J].中国病理生理杂志,1988,4(1):18.