

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*

霍海如 谭余庆 李晓芹 郭淑英 周爱香 田甲丽 孙玉茹 贺玉琢 姜廷良
(中国中医研究中药研究所 北京 100700)

摘要 桂枝汤有效部位 A(Fr. A)对酵母致热大鼠下丘脑三磷酸肌醇(IP₃)和钙调蛋白(CaM)的降低及安痛定诱致低体温大鼠下丘脑 IP₃ 和 CaM 含量的升高均有明显的逆转效应,即使高体温大鼠下丘脑 IP₃ 和 CaM 升高,低体温大鼠 IP₃ 和 CaM 降低,分别使之趋向正常。结果提示,Fr. A 对体温的双向调节有中枢神经细胞内信息传递系统 IP₃ 和 CaM 参予。

关键词 桂枝汤有效部位 A 体温双向调节 三磷酸肌醇 钙调蛋白

Effect and Mechanism of Active Fraction A of Guizhi Decoction
(桂枝汤) on Dual-Directional Thermoregulation
——Effect on IP₃ and CaM in Hypothalamus of Rats

Huo Hairu, Tan Yuqing, Li Xiaogin, Guo Shuying, Zhou Aixiang,
Tian Jiali, Sun Yuru, He Yuzhou, Jiang Tingliang

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of TCM, Beijing 100700)

Abstract:Effect of Fr. A,active fractive A isolated from Guizhi decoction, on inositol 1,4,5 triphosphate (IP₃) and calmodulin (CaM) in hypothalamus in yeast-induced febrile rats and aminopyrine-induced hypothermal rats was studied. The results showed that IP₃ and CaM contents were significantly decreased in febrile rats,and markedly increased in hypothermal rats. Theose values were reversed to almost normal level in both models after administration of Fr. A. The results suggest that IP₃ and CaM in the thermoregulatory center take part in the dual-directional regulation of Fr. A.

Key words:Active fraction A of Guizhi decoction,Dual-directional thermoregulation,inositol 1,4,5 triphosphate,calmodulin

细胞内信息系统参予多种生理、病理过程的调节。以三磷酸肌醇 (inositol 1,4,5 triphosphate, IP₃) 和二酰甘油 (DG) 为第二信息使的信息传递系统是体内多种激素和递质类物质引起特定细胞功能改变的重要环节。前人和我们先前的研究发现,另一种第二信使 cAMP 参予体温的调节,桂枝汤可影响下丘脑中 cAMP 的含量,对体温呈现双向调

节作用^[1];但 IP₃ 是否参予体温调节,国内外尚未见报道。为了探究桂枝汤对体温双向调节作用的机理,我们观察了在体温变化过程中,下丘脑 IP₃ 和钙调蛋白 (calmodulin, CaM) 含量的变化,以及桂枝汤有效部位 A (Fr. A) 对该变化的影响,进而从第二信使分子的角度探讨桂枝汤对体温双调的作用机理。

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39470858)

1 实验材料

1.1 动物 Wistar 大鼠,雄性,体重 160±10g,由中国医学科学院动物研究中心提供,合格证号:医动字第 01-3008。

1.2 药品 Fr. A 为淡黄色粉末,由本所化学室提取,临用时配成所需浓度供动物口饲。鲜酵母购于北京第二食品厂,−40 C 冷冻保存。安痛定系北京制药厂出品,批号 930727。D-myo-IP₃[3H]测定试剂盒,由 Amershan 公司出品,CaM 测定试剂盒购自中国医学科学院基础医学研究所。

1.3 仪器 半导体温度测温仪(上海医用仪表厂),LS-9800 液体闪烁计数器(美国 Beckman 公司),Biofuge 28RS 台式高速离心机(德国 Heraeus 公司)。

2 实验方法

2.1 Fr. A 对高、低体温的影响 选取基础肛温在 36.5±0.5 范围的大鼠,以 12%鲜酵母悬液(2.4g/kg 体重)背部皮下注射诱致体温升高,3.5h 后测肛温,选取肛温升高≥0.8 C 者,随机分为 4 组,即正常对照组、酵母模型组、酵母+Fr. A 7.6 mg/kg 组及酵母+Fr. A 3.8mg/kg 组。灌胃给药,对照组及模型组给同体积生理盐水,1h 后,重复给药 1 次,剂量同前。第一次给药后 2h,测肛温,并计算肛温升高差值(药后 2h 肛温值—药前、即酵母致热 3.5h 后肛温)。

另选取基础肛温在 37.0±0.5 范围的大鼠,随机分为 4 组,即正常对照组、安痛定模型组、安痛定+Fr. A 7.6mg/kg 组及安痛定+Fr. A 3.8 mg/kg 组。灌胃给药,对照组及模型组给同体积生理盐水,1h 后,重复给药 1 次,剂量同前,同时静脉注射安痛定 1.43ml/

kg(对照组注射同体积生理盐水)诱致体温下降。在注射安痛定后 2h,测肛温,并计算肛温降低差值(药后 3h 肛温值—基础肛温值)。

2.2 下丘脑组织取材及处理 动物检测肛温后,立即断头处死,迅速取脑,干冰速冻。取冰冻的脑组织,以灰结节及视交叉之间的中心点为中心确定并分离下丘脑,置于 5%的高氯酸钾溶液中,匀浆,并置冰浴 20min。取少量的匀浆用 Lowry 法作蛋白定量测定,其余匀浆 2000×g 离心 15min(4 C),上清液用 1.5M KOH 滴定 pH 至 7.5,再次离心(2000×g,15min,4 C),上清液置 −70 C 冰箱保存,供 IP₃ 测定。另取下丘脑组织,用 50mM Tris-HCL 缓冲液制成匀浆,18,000rpm 离心 50min,取上液,100 C 煮沸 5min,再离心(12,000rpm,30min),取上清,有 4.5mM Ca-Cl₂ 水溶液对半稀释,−70 C 冰箱保存,供 CaM 测定。

2.3 IP₃ 和 CaM 测定方法 按 IP₃ 试剂盒产说明书操作测定 IP₃ 含量;参照文献^[2]方法,以 PDE 法测定 CaM 含量。

2.4 统计学处理 下丘脑 IP₃ 含量以 pg/mg 蛋白表示,CaM 以 ng/mg 组织湿重表示,所有实验数据为均数±标准差,均数间显著性检验用 *t* 检验法。

3 实验结果

3.1 对大鼠高、低体温的影响 如表 1、2 所示,Fr. A 对酵母致大鼠体温升高有显著的降低作用,对安痛定诱致的体温降低有显著的回升作用,体温变化差值与模型组比较均有显著性差异,表明 Fr. A 可使高、低体温动物体温分别向正常水平方向进行调节。

表 1 Fr. A 对酵母致大鼠发热的影响($\bar{x}\pm s$, C)

组 别	剂量(mg/kg)	动物数	基础肛温	酵母 3.5h 后肛温	药后 2h 肛温	肛温升高差值
对照组		12	36.63±0.41	36.48±0.23	36.82±0.20	0.34±0.22
酵母组		12	36.40±0.46	37.55±0.54	38.71±0.62**	1.16±0.64**
Fr. A	7.6	11	36.24±0.43	37.36±0.46	37.87±0.37**	0.51±0.53 [#]
	3.8	12	36.33±0.23	37.55±0.36	37.97±0.43**	0.42±0.39**

与对照组比较 ** *P*<0.01;与酵母组比较 [#]*P*<0.05,***P*<0.01,下表剂量同。

表 2 Fr. A 对安痛定致大鼠低温的影响($\bar{x}\pm s$, $^{\circ}\text{C}$)

组别	动物数	基础肛温	药后 3h 肛温	肛温降低差值
对照组	10	37.05 $\pm$ 0.39	37.1 $\pm$ 0.23	+0.05 $\pm$ 0.19
安痛定	10	37.07 $\pm$ 0.52	36.26 $\pm$ 0.43**	-0.81 $\pm$ 0.50**
Fr. A	10	37.04 $\pm$ 0.31	36.65 $\pm$ 0.28 [#]	-0.39 $\pm$ 0.41 [#]
	9	37.02 $\pm$ 0.47	36.71 $\pm$ 0.40 [#]	-0.31 $\pm$ 0.50 [#]

与对照组比较 ** $P<0.01$, 与安痛定组比较[#] $P<0.05$

3.2 Fr. A 对大鼠下丘脑 IP₃ 含量的影响

如表 3 所示,酵母模型组大鼠下丘脑 IP₃ 含量明显低于正常对照组,Fr. A 在解热的同时,亦可使下丘脑 IP₃ 含量回升;安痛定模型组动物下丘脑 IP₃ 含量明显升高,Fr. A 在促使体温回升的同时,使下丘脑 IP₃ 含量下降。

表 3 Fr. A 对下丘脑 IP₃ 含量的影响

组别	剂量(mg/kg)	例数	IP ₃ (pmol/mg 蛋白)
对照组		9	0.964 $\pm$ 0.401
酵母组		9	0.464 $\pm$ 0.254**
桂枝汤	7.6	10	0.731 $\pm$ 0.406
	3.8	10	1.107 $\pm$ 0.663 [#]
安痛定		10	1.546 $\pm$ 0.609*
桂枝汤	7.6	9	0.600 $\pm$ 0.490 ^Δ
	3.8	9	1.054 $\pm$ 0.586

与对照组比较 * $P<0.05$, ** $P<0.01$;

与酵母组比较[#] $P<0.05$;与安痛定组比较^Δ $P<0.01$

3.3 Fr. A 对大鼠下丘脑 CaM 含量的影响

如表 4 所示,酵母性发热大鼠下丘脑 CaM 含量降低,安痛定性低体温大鼠 CaM 含量升高;Fr. A 则可逆转高、低体温大鼠下丘脑 CaM 含量的变化,即使高体温大鼠下丘脑 CaM 含量升高,低体温大鼠 CaM 含量降低。

表 4 Fr. A 对下丘脑 CaM 含量的影响

组别	剂量(mg/kg)	例数	CaM(ng/mg 组织湿重)
对照组		12	65.26 $\pm$ 28.27
酵母组		10	42.13 $\pm$ 16.15*
桂枝汤	7.6	9	83.60 $\pm$ 31.75 ^{##}
	3.8	10	68.13 $\pm$ 21.48 ^{##}
安痛定		9	97.56 $\pm$ 28.34*
桂枝汤	7.6	8	68.60 $\pm$ 27.19 ^Δ
	3.8	8	78.30 $\pm$ 20.96

与对照组比较 * $P<0.05$, ** $P<0.01$;

与酵母组比较^{##} $P<0.01$;与安痛定组比较^Δ $P<0.05$

4 讨论

跨膜信息传递系统是信息传递的主要方式。作为第一信使的激素或递质(包括调质)

将信息传递到细胞,经过信息跨膜传递,再通过第二信使,引起细胞内发生反应。膜受体-磷脂酰肌醇代谢模式是许多激素或递质调节细胞内化学反应的方式。作为第二信使的 IP₃ 是动员和释放细胞内贮存钙的主要信息物质。Ca²⁺ 主要通过 CaM 对细胞功能发挥调节作用。IP₃ 和钙调蛋白在体温调节中的作用,除了王华东等^[3]发现在致热家兔的下丘脑中有钙离子浓度的降低以外,国内外尚未见 IP₃、国内也未见钙调蛋白与体温调节有关的报道。我们的实验观察到,在酵母性发热中,大鼠下丘脑 IP₃ 和 CaM 含量明显降低;在安痛定诱致的低体温动物中,下丘脑 IP₃ 含量明显升高,与体温呈负相关,表明 IP₃ 和 CaM 参与体温的调节。

Fr. A 对酵母致热大鼠下丘脑 IP₃ 和 CaM 的降低及安痛定诱致低体温大鼠下丘脑 IP₃ 和 CaM 含量的升高均有明显的逆转效应,表明 Fr. A 可通过对细胞内信息传递系统的影响对体温进行双向调节。

我们先前的工作表明,桂枝汤可影响下丘脑体温调节中枢中多种神经递质、神经调质的分泌、与受体的结合或代谢,对体温进行双向调节^[4],也可影响下丘脑组织中 cAMP 的含量。本实验发现桂枝汤的有效部位对高、低体温动物下丘脑组织中 IP₃ 和 CaM 含量异常的正常化调节作用,是由于影响细胞外的生物活性物质,或是由于另一信息 cAMP 的相互影响,还是细胞内其它分子的作用而呈现的,是我们进一步探讨的问题。

(本研究室高英杰、沈鸿和崔晓兰参加部分实验工作,特此致谢。)

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机理探讨——对下丘脑和血浆环核苷酸的影响. 中药药理与临床,1994(4):1

2 刘景生,刘晔,金荫昌. 钙调蛋白的制备及活性测定. 中国医学科学院学报,1985,7(6):453

-
- 3 王华东,李楚杰,屈洋,等. 下丘脑 $[Ca^{2+}]_i$ 、cAMP在家兔EGTA性发热机制中的作用. 中国病理生理学杂志,1996,12(4):402 向调节作用的机理探讨. 国家中医管理局科技进步三等奖,1994.
- 4 富杭育,周爱香,郭淑英,等. 桂枝汤对体温双 (收稿:1997-04-19)