

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

李沧海, 霍海如, 周 军, 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: 研究桂枝汤对发热和低体温大鼠下丘脑组织内 15-PGDH 活性的影响, 进一步阐明桂枝汤体温双向调节作用机制。方法: 采用核素示踪技术测定酵母性发热和安痛定性低体温大鼠及桂枝汤处理组下丘脑组织内 15-PGDH 活性, 并观察其与体温变化的关系。结果: 皮下注射酵母可降低下丘脑 15-PGDH 活性, 桂枝汤灌胃可剂量依赖性地抑制该变化并促进发热大鼠体温的恢复, 两者呈正相关; 而腹腔注射安痛定后, 随着体温下降, 15-PGDH 活性有升高倾向, 桂枝汤可抑制该酶活性并加速体温恢复正常, 但两者呈弱相关。结论: 大鼠下丘脑内 15-PGDH 可能参与机体体温调节并可能是桂枝汤解热作用靶点之一, 但与其抗低体温作用关联不大。

关键词: 桂枝汤; 体温调节; 15-PGDH; 大鼠; 下丘脑

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2003)01-0027-04

Effect on Prostaglandin Dehydrogenase in Hypothalamus in Both the Pyretic and Hypothermia Rats by Guizhi Tang

LI Cang-hai, HUO Hai-ru, ZHOU Jun, GUO Shu-ying, JIANG Ting-liang

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

Abstract: To further highlight Guizhi Tang's mechanism of dual-directional thermoregulation, the 15-PGDH activity in pyretic and hypothermia rats was detected using isotopic tracing assay. A decrease in PGDH activity paralleled with a pronounced rise in body temperature in rat hypothalamus 5.5 hr after a s. c. yeast injection was observed and both the responses was counteracted by the treatment of Guizhi Tang orally in a dose-dependent manner. Aminopyrine induced a tendency to enhance PGDH activity and a marked drop in body temperature meanwhile in rats 1 hr later, but there was a poor relation between changes in body temperature and in activity of PGDH evoked by Guizhi Tang. Present data suggest that PGDH in hypothalamus may play a role in thermoregulation in rats and is also a target of antipyretic action of Guizhi Tang, but it probably does not contribute to anti-hypothermia action of Guizhi Tang.

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

近来文献倾向于认为前列腺素类(PGs)是机体体温调节的终端中枢介质^[1],而前列腺素 E₂(PGE₂)与发热密切相关,其在炎症或发热过程中主要由环氧化酶 II(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。在体内,15-羟基前列腺素脱氢酶(15-PGDH, EC 1.1.1.141)几乎是 PGE₂ 所有生物转化途径的起动环节,氧化产物活性较之其前体丧失 70%

以上^[2]。PGE₂ 旁分泌特点决定了局部生物转化对该部位的生物活性具有不可忽视的影响。脑内组织特别是体温调节中枢的 15-PGDH 是否通过灭活 PGE₂ 对体温调节产生一定的影响,其特点如何,尚未见报道。大鼠皮下注射酵母诱导的发热可被消炎痛完全阻断,系 PGE₂ 依赖性体温调节^[3]。我们以前的工作证实酵母性发热和安痛定性低体温大鼠下丘脑 PGE₂ 水平与体温变化相关,桂枝汤及其有效部位在促进两种模型大鼠体温向正常恢复的同时,也促使下丘脑 PGE₂ 水平趋于正常^[4,5]。因为外源性 PGs 从循环进入中枢而引起体温变化的假说倾向于被否定^[1],我们推测桂枝汤可能影响下丘脑部位 PGE₂ 的

收稿日期: 2002-10-25

基金项目: 国家“九五”攀登计划预选项目(中药现代化关键问题的基础研究)(970211018)

合成或者灭活/清除等生物过程。近来我们对 PGE_2 合成的关键酶——COX 的测定结果显示,发热和低体温大鼠下丘脑组织 COX 活性变化不明显,桂枝汤对之影响也较小,与体温变化不一致^[6]。那么,桂枝汤体温双向调节作用可能与 PGE_2 的生物转化或转运环节有关。为进一步阐明该机制,探讨桂枝汤对大鼠下丘脑 15-PGDH 活性的影响很有必要。

1 材料

1.1 动物 雄性 Wistar 大鼠,体重 $220 \pm 20\text{g}$,由医科院实验动物研究所提供,合格证号 SCXK 11-00-0066。

1.2 药品与试剂 所用中药材均购于北京市药材公司,经生药学鉴定基原分别为桂枝 *Cinnamomum cassin* 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》原方 10: 10: 7: 10: 10(W/W) 配比混合药物置于烧杯中(大枣剖开)。加入 5 倍蒸馏水(W/W)冷浸 60min,快速加热至沸腾,而后保持微沸状态 15min,趁热抽滤。于药渣中加入 3 倍蒸馏水,浸泡 30min,加热至沸腾,维持微沸 10min,趁热抽滤,弃药渣,合并滤液,水浴上浓缩滤液至 1g 生药/ml,4℃储存,临用前配制所需浓度。鲜酵母购于北京第二食品厂,安痛定为北京制药厂产品。[5, 6, 8, 11, 12, 14, 15(n)-³H] PGE_2 购自 Amersham Pharmacia Biotech; L-戊二酸脱氢酶, $\beta\text{-NAD}^+$, α 酮戊二酸钠, Dextran(M. W. 68800) 购自 Sigma; PGE_2 购自晶美生物工程公司(Cayman 产品); EDTA, Cysteine 及 DTT 为 Boehringer 产品。其它均为市售 AR 级试剂。

1.3 仪器及设备 Eppendorf 公司 Centrifuge 5400 型高速冷冻离心机; SME 公司 PrepSpin 50 型超速离心机;中科院生物物理研究所中生生物工程高技术公司产品 ZS-3 半自动生化分析仪;上海医用仪表厂 WMY-01 型数字测温仪,用前用标准温度计校正。

2 方法

2.1 动物适应与测温 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 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 。将预先涂有适量凡士林的测温探头插入直肠 5cm。稳定时读数作为体核温度(T_{re})。正式实验前两天 08: 00a. m. 分别测定并记录 T_{re} ,与实验当天同一时间 T_{re} 的平均值作为基础体温。3 次 T_{re} 中最高值与最低值之差大于 0.5°C 者舍弃。

2.2 防污染措施 所用玻璃器材及手术器械等耐热器具经 180°C , 2hr 干热消毒;已配制的真溶液经微孔滤膜($0.22\mu\text{m}$)滤过,其它所用物品经高压灭菌(20Lbs, 30min)。

2.3 发热及低体温诱导和动物分组给药 基础体温 $37.2 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 的大鼠(除对照组外)背部皮下注射鲜酵母(2.4g/kg B. W.) 3.5hr 后,选取体温升高值 $\geq 0.8^\circ\text{C}$ 者,随机均分为 4 组,依次为酵母组(Yeast),酵母+桂枝汤大、中、小剂量组(Yeast+ GZT(h), Yeast+ GZT(m), Yeast+ GZT(l))。Yeast+ GZT(l)、Yeast+ GZT(m) 和 Yeast+ GZT(h) 组分别于注射酵母后 3.5hr 4.5hr 给予桂枝汤(5、10、20g 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,分别为正常组(Normal),安痛定组(Amp.) 及安痛定+桂枝汤高、中、低剂量组(Amp.+ GZT(h), Amp.+ GZT(m), Amp.+ GZT(l)),后四组均腹腔注射安痛定(1.43ml/kg)诱导体温降低,对照组注射同体积生理盐水。Amp.+ GZT(l)、Amp.+ GZT(m) 和 Amp.+ GZT(h) 组分别在注射 Amp. 前后 1hr 给予桂枝汤(5、10、20g 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 30min,首次给药 2hr 测定 T_{re} 后(结果以体温变化值 ΔT_{re} 表示,见图 1 和图 2),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。结果显示桂枝汤可以剂量依赖性地抑制酵母诱导的体温升高($r=0.97$),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($r=0.99$)。

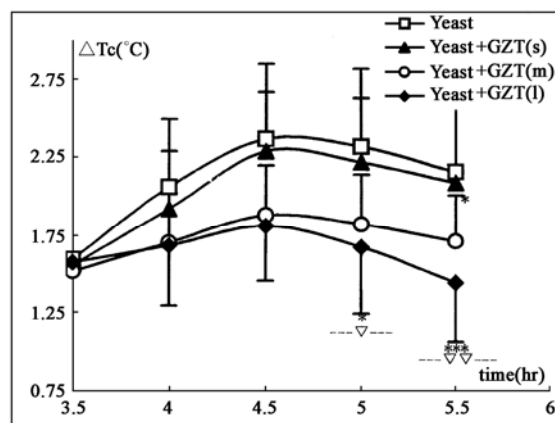


图1 桂枝汤对酵母性发热大鼠体温的影响($n=12$)

注:与模型组比较* $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$;发热大鼠多组间比较 $\nabla P \leq 0.05$, $\nabla\nabla P \leq 0.01$ (下同)

2.4 15-PGDH 活性测定^[7] 取出冷冻脑组织,快速剥离下丘脑,精密称定,加入 5 倍体积磷酸钾缓冲液

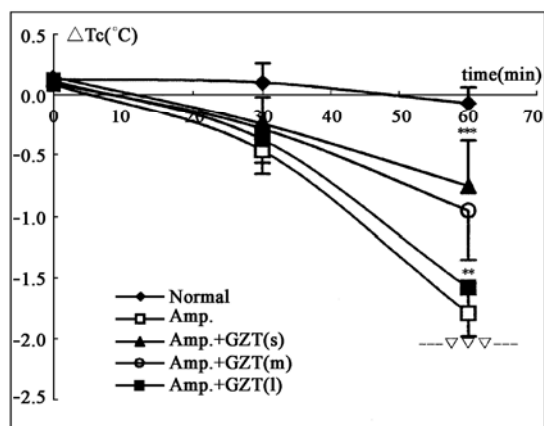


图2 桂枝汤对安痛定诱导大鼠低体温的影响

注: 低体温大鼠多组间比较 $\nabla \nabla \nabla P \leq 0.001$

(50mM 磷酸钾, pH7.5, 内含 1mM 半胱氨酸, 1mM EDTA) 匀浆 ($4 \times 5s$)。匀浆液先以 $10000 \times g$ 离心 20min, 上清液再以 $105000 \times g$ 离心 60min, 取适量上清液以 Lowry 法测定蛋白含量, 其余加入适当匀浆缓冲液至蛋白质浓度 1mg/ml, 于 -70°C 冻存待测(所有操作均于 4°C 下进行; 所有溶液及仪器、器皿均经预冷)。反应体系(终体积为 1.0ml) 包括 0.1M 磷酸钾缓冲液, pH7.5, 内含 1mM EDTA, 14M DTT, 5mM 氯化铵, 1mM α 酮戊二酸钠, 1mM NAD^+ , 14M PGE_2 (内含氘标 PGE_2 50000cpm), 100 $\mu\text{g/ml}$ 戊二酸脱氢酶。37 $^\circ\text{C}$ 水浴预温 5min, 加入 50 μl 酶样本起始反应, 孵育 10min, 加入 0.3ml 10% 活性炭混悬液(溶于 1% 右旋糖苷) 终止反应。室温放置 5min, $1000 \times g$ 离心 5min, 吸取上清液 0.8ml 置于闪烁瓶, 加 10ml 闪烁液计数。以每分每毫克蛋白生成 NADH 的量为 15-PGDH 活性单位 ($\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) (见图 3)。结果显示皮下注射酵母可诱导大鼠下丘脑 15-PGDH 活性显著降低, 桂枝汤灌胃可剂量依赖性地抑制该作用 ($r=0.99$); 而 Amp. 有升高该酶倾向, 桂枝汤可抑制该酶活性 ($r=0.78$)。

2.5 统计学处理 所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 利用 one-way ANOVA 比较多组间均值差异, t-test 比较两组间显著性差异。r 为量效相关系数, R 为体温变化与酶活性变化相关系数。

3 讨论

近来 PGE_2 作为最重要的发热中枢介质又得到强有力的支持, 而 PGD_2 可能与低体温有关^[8,9]。PGs 合成限速酶 COX 两种亚型 COX_1 和 COX_2 倾向于与不同磷脂酶 A_2 (PLA_2) 偶联, 并利用不同来源的花生四烯酸作为底物, 他们各自的产物有所差异并可能介导不同的体温调节反应。15-PGDH 几乎是大鼠所

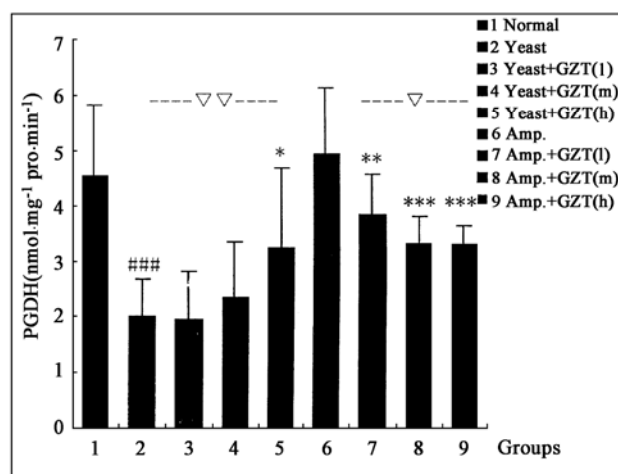


图3 桂枝汤对发热及低体温大鼠下丘脑 PGDH 的影响

注: 模型组与对照组比较 $### P \leq 0.001$; 用药组与对应模型组间比较 $\nabla P \leq 0.05$, $\nabla \nabla P \leq 0.01$

有前列腺素 E_2 代谢途径的第一步, 继而激活邻位双键经 13, 14-前列腺素还原酶 ($\Delta^{13}\text{-R}$) 还原为 13, 14-双氢-15-酮- PGE_2 , 活性丧失 90% 以上。其后另外两条代谢途径 β -氧化和 ω -氧化可独立地进行, 生成一系列氧化物^[2]。

15-PGDH 分为两种亚型: NAD^+ -依赖性 PGDH (I 型) 和 NADP^+ -依赖性 PGDH (II 型), 均位于胞浆即细胞匀浆的高速离心上清相, II 型较之 I 型虽具有更广泛的底物谱且具有羰基还原酶活性, 但由于他们对前列腺素 E 的 K_m 相差悬殊(前者至少要比后者小一个数量级) 以及它们的辅酶在体内的主要存在形式不同(分别为 NAD^+ 、 NADPH), 决定了 I 型 15-PGDH 在 PGE_2 局部灭活中占主导地位^[2,10], II 型仅在特定情况下构成对 I 型的补充, 故 15-PGDH 一般指 I 型即 NAD^+ -依赖性 PGDH。本实验仅加入 NAD^+ , 测定的结果代表 I 型 PGDH 活性。

PGE (主要指 PGE_1 和 PGE_2) 是 15-PGDH 的理想底物, 而 PGD_2 并非 PGDH 的合适底物, 故本实验并未设计以 PGD_2 为底物进行该酶的活性测定, 虽然 PGD_2 可能与低体温有关。测定 15-PGDH 活性的方法有紫外分光光度法、荧光分光光度法、核素示踪法, 其中前两种方法需要较纯的酶制备; 核素示踪法利用 PGE_2 上 15(s) 位氘在脱氢酶作用下转移至 NAD^+ 或 NADP^+ , 可以右旋糖苷包被的活性炭混悬液分离。故以 15(s)-[$^{15}\text{-}^3\text{H}$] PGE_2 作为示踪底物较为特异, 但需要 15-PGDH 和较复杂的制备。本法以 [5, 6, 8, 11, 12, 14, 15(n)- ^3H] PGE_2 替代 15(s)-[^3H] PGE_2 作为底物测定该酶, 在较短的反应时间内干扰相对较少, 因为在胞浆内直接以 PGE_2 为底物的脱氢

反应,如 9-酮前列腺素还原酶(9-KPR, EC 1.1.1.189)的逆反应是 NADP⁺ 依赖性的;另外还有以层析技术(TLC-radio 或 HPLC-radio assay)分离并测定 PGDH,虽然可以同时测定几种代谢物的含量,但均比较繁琐^[11]。

注射酵母 5.5hr 后下丘脑 15-PGDH 较之正常组活性下降,这与下丘脑部位 PGE₂ 水平升高引起发热相协调。桂枝汤灌胃可加速大鼠体温向正常恢复的同时,其下丘脑部位降低的 15-PGDH 活性也趋向恢复,二者表现强相关($R=0.99$)。暗示大鼠下丘脑 PGDH 可能参与了发热过程,也提示桂枝汤可能通过升高该区 15-PGDH 活性参与了其解热作用。但实验结果也显示了脑区 PGDH 活性较低的特点^[12]。故 15-PGDH 对该区 PGE 的灭活与体温调节特别是发热的关系尚待进一步的实验验证。在安痛定诱导低体温的同时,15-PGDH 活性有上升倾向;但桂枝汤抗低体温作用以小剂量较强,其次为中剂量和大剂量,三者虽然均表现抑制该酶活性,但活性改变与体温变化呈弱相关($R=0.72$),提示桂枝汤对下丘脑 15-PGDH 的抑制作用与其抗低体温作用关联不大。结合以前我们对下丘脑 PGE₂ 的研究结果^[4,5],我们推测,在桂枝汤对抗安痛定性低体温过程中,下丘脑部位 PGE₂ 水平的恢复似乎不依赖于该区 15-PGDH 活性的变化。下面几个方面可能有助于本实验结果的解释:我们的实验证实,安痛定中氨基比林在诱导低体温过程中起决定作用,而氨基比林诱导低体温的作用部位可能主要在外周^[12];另有报道低体温可能与中枢内 PGD₂ 等另外一些介质水平变化有关,但 PGD₂ 并非 15-PGDH 的合适底物;从诱导时间来看,在酵母性发热大鼠上可能存在 PGDH 表达量的差异,而在安痛定性低体温大鼠上,此差异由于时间较短难以体现,因为有文献报道一些非甾体类抗炎药具有抑制 15-PGDH 活性但诱导 15-PGDH 在某些组织高表达的双重属性^[7]。至于桂枝汤抗低体温是否与下丘脑其他介质如 PGD₂ 有关,或者涉及 POAH 特定部位及体温负调节中枢——腹中隔区和中杏仁核一些活性物质水平改变,以及是否是桂枝汤对抗安痛定外周作用的结果,其在双向体温调节中表现的复杂量效关系的物质基础是什么,均有待进一步研

究。

参考文献:

- [1] Cocciani F, Akarsu ES. Prostaglandin E₂ in the pathogenesis of fever. An update[J]. Ann N Y Acad Sci, 1971, 856: 76-81.
- [2] Samuelsson B, Granstrom E, Green K, et al. Metabolism of prostaglandins[J]. Annu Rev Biochem, 1975, 44: 669-695.
- [3] Ataoglu H, Dogan MD and Mustafa F. Candida albicans and Saccharomyces cerevisiae cell wall mannans produce fever in rats: role of nitric oxide and cytokines[J]. Life Sci, 2000, 67(18): 2247-2256.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Frenkian M, Segond N, Pidoux E, et al. Indomethacin, a cox inhibitor, enhances 15-PGDH and decreases human tumoral C cells proliferation[J]. Prostaglandins & other lipid mediators, 2001, 65: 11-20.
- [8] Ushikubi F, Segi E, Sugimoto Y, et al. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3[J]. Nature, 1998, 395(6699): 281-284.
- [9] Dogan MD, Ataoglu H, Akarsu ES, et al. Effects of selective cyclooxygenase enzyme inhibitors on lipopolysaccharide induced dual thermoregulatory changes in rats[J]. Brain Res Bull, 2002, 57(2): 179-185.
- [10] Hansen SH. 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase. A review[J]. Prostaglandins, 1976, 12(4): 647-679.
- [11] Tai HH. Enzymatic synthesis of (15s)-[15-3H] prostaglandins and their use in the development of a simple and sensitive assay for 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase[J]. Biochemistry, 1976, 15(21): 4586-4592.
- [12] 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.