

注射用炎琥宁对脂多糖发热模型家兔解热机制的研究

刘用国, 王江融, 黄天宏, 许娇红, 张红雷

福建省药品检验所, 福建 福州 350001

摘要: **目的** 研究注射用炎琥宁对脂多糖发热模型家兔血清中细胞因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、cAMP、PGE₂)和下丘脑中升温介质(cAMP、PGE₂)的影响。**方法** 建立家兔脂多糖(10 EU/kg)发热模型, 监测不同时间点注射用炎琥宁对脂多糖发热模型家兔体温影响, 绘制平均升温曲线; 模型升温峰值时收集指标, ELISA法检测血清中细胞因子、下丘脑中升温介质变化。**结果** 注射用炎琥宁能显著降低脂多糖发热模型家兔的体温, 且量效关系较显著; 注射用炎琥宁能显著抑制发热模型家兔血清中IL-6、cAMP、PGE₂增加和下丘脑中cAMP、PGE₂的释放。**结论** 注射用炎琥宁对脂多糖发热模型家兔有较好的解热作用, 其解热效果可能与其抑制外周IL-6、cAMP、PGE₂增加和下丘脑cAMP、PGE₂释放有关。

关键词: 注射用炎琥宁; 脂多糖; 细胞因子; 解热机制

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2013)06-0851-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.06.009

Antipyretic mechanism of Potassium Sodium Dehydroandroan Drographolide Succinate for injection on lipopolysacchride -induced febris response in rabbits

LIU Yong-guo, WANG Jiang-rong, HUANG Tian-hong, XU Jiao-hong, ZHANG Hong-lei

Fujian Institute for Drug Control, Fuzhou 350001, China

Abstract: Objective To explore the effects of Potassium Sodium Dehydroandroan Drographolide Succinate for injection (PSDDSI) on the cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, cAMP, and PGE₂) in serum and the fever neurotransmitters (cAMP, PGE₂) in hypothalamus of rabbits in lipopolysacchride (LPS)-induced febris response. **Methods** The LPS-induced febris response in rabbits (10 EU/kg) was established. The body temperature of rabbits administered with PSDDSI in LPS-induced febris response was detected at different time points, and an average temperature rising curve was drawn. The indicators at warming peak time of the model were collected, and the contents of cytokines in the serum and fever neurotransmitters media in the hypothalamus were measured by ELISA-Kits method. **Results** PSDDSI could significantly reduce the body temperature of rabbits in LPS-induced febris response, and the dose-effect relationship was very significant; PSDDSI could significantly inhibit the release of IL-6 and cAMP in serum and PGE₂ and cAMP in hypothalamus of rabbits in LPS-induced febris response. **Conclusion** PSDDSI has a good antipyretic effect on LPS-induced febris response in rabbits. The mechanism may be related to the inhibition of cytokines in the serum and the fever neurotransmitters in the hypothalamus.

Key words: Potassium Sodium Dehydroandroan Drographolide Succinate for injection; lipopolysacchride; cytokines; antipyretic mechanism

注射用炎琥宁(Potassium Sodium Dehydroandroan Drographolide Succinate for Injection, PSDDSI)为穿心莲提取物经酯化、脱水、成盐精制而成的脱水穿心莲内酯琥珀酸半酯钾钠盐, 临床用于治疗病毒性肺炎和病毒性上呼吸道感染, 能抑制早期毛细血管通透性增高、炎性渗出、水肿, 疗效确切。注射用炎琥宁临床应用广泛, 但大都与抗病毒、抗炎类化学药联合用药^[1-2]。由于受原料、工艺以及临床应用不规范等条件限制, 临床报道注射用炎琥宁的不良反

应时有发生, 对其疗效的评价也褒贬不一。近年来, 注射用炎琥宁的不良反严重影响其临床应用, 且对于注射用炎琥宁一直缺乏基础性研究资料。本实验拟采用家兔脂多糖(LPS)发热模型研究注射用炎琥宁的解热机制, 探讨注射用炎琥宁对发热机体内生致热原以及升温中枢中升温介质变化的影响。

1 实验材料

新西兰兔, 普通级, 雌性, 上海市松江区松联实验动物场提供, 生产许可证: SCXK(沪)2012-

收稿日期: 2013-04-22

作者简介: 刘用国(1973—), 男, 硕士, 副主任药师, 从事药检药理和免疫药理研究。Tel: (0591)87520215 E-mail: lyg5567@163.com

0011, 使用许可证: SYXK (闽) 2010-0007。

脂多糖 (Sigma, 100 mg/瓶, 批号 L2880); 注射用炎琥宁 (福建省闽东力捷迅药业有限公司, 80 mg/支, 批号 110501); 注射用赖氨匹林 (瑞阳制药有限公司, 0.9 g/瓶, 批号 10062201); IL-6 ELISA 试剂盒 (批号 MC156969)、IL-1 β ELISA 试剂盒 (批号 ME158808)、TNF- α ELISA 试剂盒 (批号 NA167869) 均为 Thermo Scientific 公司产品; PGE₂ ELISA 试剂盒 (批号 201202) /cAMP ELISA 试剂盒 (批号 201202A) 为美国 R & D 公司产品。BL3100 电子天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司); AE200 电子天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司); 低温高速冷冻离心机 (Heraeus 公司); RT6100 型酶标仪 (深圳雷杜公司); ZRY2D 型热原测温仪 (天津天大天发科技有限公司)。

2 实验方法

2.1 实验动物的准备

家兔, 体质量 2.5~3.5 kg, 在温度 (22 \pm 2) $^{\circ}$ C、相对湿度 50%~75% 实验环境中喂养。对家兔施行适应性测温操作, 1 次/d。实验前 10 h 禁食不禁水。测温仪探头上涂凡士林, 插入家兔直肠 6 cm (可在 6 cm 用胶布固定, 确保每次插入深度一致), 稳定 1 h 以后记录体温值。

2.2 对 LPS 发热模型家兔体温的影响

实验当日 9:00, 在造模给药前每次间隔 30 min 测家兔体温 3 次, 取其平均值作为基础体温, 其中若有体温超出 38.0 $^{\circ}$ C 或相邻两次体温差值大于 0.4 $^{\circ}$ C 的动物淘汰。筛选出合格家兔 36 只, 随机分为 6 组, 每组 6 只, 分别为对照组 (iv 0.9% 氯化钠注射液 10 mL/kg), 模型组 (iv LPS 10 EU/kg); 赖氨匹林阳性对照组 (iv LPS 10 EU/kg+赖氨匹林 30 mg/kg),

注射用炎琥宁高剂量 (iv LPS 10 EU/kg+注射用炎琥宁 80 mg/kg) 组、中剂量 (iv LPS 10 EU/kg+注射用炎琥宁 40 mg/kg) 组、低剂量 (iv LPS 10 EU/kg+注射用炎琥宁 20 mg/kg) 组。于给药后 1、2、3、4 h 监测记录各组家兔体温, 计算各组家兔在各监测点的升温值 (实测体温-基础体温), 绘制平均升温曲线。

2.3 对 LPS 发热家兔血清细胞因子和中枢升温递质的影响^[3]

给药 4 h 检测家兔体温后, 立即心脏采血, 3 000 r/min 离心 10 min, 分离出血清置于-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存待测。迅速取出全脑, 预冷 PBS 溶液漂洗 2~3 次洗去血迹, 冰浴上操作于视交叉与灰结节之间取下丘脑下丘脑组织加入生理盐水, 制备成 10% 脑匀浆, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清置于-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存待测。按试剂盒说明, 测定血清中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、cAMP、PGE₂ 及下丘脑中 cAMP、PGE₂。

2.4 统计方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间进行单因素方差分析。

3 实验结果

3.1 给药后各组家兔体温变化趋势

iv LPS 后, 模型组家兔体温较对照组显著升高 ($P < 0.01$), 最高时 (3 h) 升温值达到 1.2 $^{\circ}$ C, 提示模型成功。各给药组在给药后 1 h 即有降温作用。与模型组比较, 注射用炎琥宁高剂量组在给药 2~4 h 均能显著抑制 LPS 发热模型家兔体温升高 ($P < 0.01$); 注射用炎琥宁中剂量也能显著抑制发热模型家兔体温升高 (2~4 h: $P < 0.05$); 注射用炎琥宁低剂量组对发热模型家兔体温升高无明显影响 ($P > 0.05$)。赖氨匹林组在注射后 1 h 家兔体温基本恢复至正常水平。见表 1。

表 1 注射用炎琥宁对 LPS 发热模型家兔升温的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Effects of PSDDSI on LPS-induced febris response in rabbits ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	不同时间点升温值/ $^{\circ}$ C			
		给药后 1 h	给药后 2 h	给药后 3 h	给药后 4 h
对照	—	0.14 \pm 0.06	0.15 \pm 0.05	0.18 \pm 0.08	0.13 \pm 0.08
模型	—	0.53 \pm 0.15 ^{△△}	0.78 \pm 0.22 ^{△△}	0.91 \pm 0.34 ^{△△}	0.78 \pm 0.29 ^{△△}
赖氨匹林	30	0.16 \pm 0.09 ^{**}	0.22 \pm 0.12 ^{**}	0.27 \pm 0.15 ^{**}	0.22 \pm 0.08 ^{**}
注射用炎琥宁	20	0.50 \pm 0.09	0.65 \pm 0.19	0.81 \pm 0.19	0.70 \pm 0.14
	40	0.41 \pm 0.17	0.58 \pm 0.18 [*]	0.64 \pm 0.15 [*]	0.58 \pm 0.15 [*]
	80	0.40 \pm 0.15	0.38 \pm 0.15 ^{**}	0.43 \pm 0.15 ^{**}	0.46 \pm 0.14 ^{**}

与对照组比较: ^{△△} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

^{△△} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

3.2 给药后发热家兔血清中细胞因子的变化

造模给药 4 h 后, 模型组家兔血清中细胞因子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、cAMP、PGE₂) 水平较对照组显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 注射用炎琥宁各剂量组对细胞因子 (TNF- α 、IL-1 β) 水平无明显影响 ($P > 0.05$); 注射用炎琥宁高剂量能够

明显降低发热家兔血清中细胞因子 IL-6 水平 ($P < 0.05$); 注射用炎琥宁高、中剂量组对 cAMP 水平降低的影响有显著性意义; 注射用炎琥宁各剂量组较模型组能明显抑制发热家兔血清中 PGE₂ 水平 ($P < 0.01$)。注射用炎琥宁对上述发热所致升高的细胞因子 IL-6、cAMP、PGE₂ 有显著的抑制作用。见表 2。

表 2 注射用炎琥宁对 LPS 发热模型家兔血清中细胞因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effects of PSDDSI on cytokines in the serum ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	细胞因子				
		IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	cAMP/(pg·mL ⁻¹)	PGE ₂ /(pg·mL ⁻¹)
对照	—	159.70 ± 18.93	214.87 ± 33.80	111.85 ± 23.25	23.08 ± 6.53	352.50 ± 23.32
模型	—	242.45 ± 34.67 ^{△△}	376.53 ± 31.13 ^{△△}	188.05 ± 25.21 ^{△△}	55.73 ± 13.49 ^{△△}	529.37 ± 36.54 ^{△△}
赖氨匹林	30	201.83 ± 18.76*	292.28 ± 27.99**	155.26 ± 28.44*	41.67 ± 9.39*	381.30 ± 49.66**
注射用炎琥宁	20	252.44 ± 36.03	346.82 ± 27.52	181.33 ± 27.66	45.56 ± 7.33	421.23 ± 37.87**
	40	263.52 ± 33.30	347.55 ± 25.91	158.58 ± 30.64	43.28 ± 13.17*	410.45 ± 40.84**
	80	246.97 ± 25.68	347.49 ± 35.21	147.05 ± 24.83*	39.78 ± 7.55**	372.77 ± 33.74**

与对照组比较: ^{△△} $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

^{△△} $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

3.3 给药后发热家兔下丘脑中升温递质的变化

造模给药 4 h 后, 模型组家兔下丘脑中升温递质 (cAMP、PGE₂) 水平较对照组显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 注射用炎琥宁高、中、低剂量组均能够明显降低发热家兔下丘脑中 cAMP 水平

($P < 0.01$); 与模型组比较, 注射用炎琥宁高、中剂量均能明显抑制发热动物下丘脑中 PGE₂ 水平 ($P < 0.05, 0.01$)。但注射用炎琥宁低剂量组下丘脑 PGE₂ 水平与模型组比较差异虽无显著性 ($P > 0.05$), 但其数值相对模型组仍明显减少。见表 3。

表 3 注射用炎琥宁对 LPS 发热模型家兔下丘脑中升温递质的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effects of PSDDSI on fever neurotransmitters in the hypothalamus ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	cAMP/(pg·mL ⁻¹)	PGE ₂ /(pg·mL ⁻¹)
对照	—	55.88 ± 6.60	436.12 ± 72.97
模型	—	95.68 ± 10.25 ^{△△}	683.75 ± 109.60 ^{△△}
赖氨匹林	30	73.88 ± 9.77**	533.61 ± 86.02*
注射用炎琥宁	20	72.53 ± 18.99**	572.50 ± 115.93
	40	71.03 ± 12.63**	519.33 ± 174.81*
	80	61.92 ± 7.84**	500.58 ± 95.76**

与对照组比较: ^{△△} $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

^{△△} $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

4 讨论

目前研究表明^[4-7], 发热是由外源性致热物刺激机体的内生致热源细胞释放内生致热原, TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等作用于位于视前区下丘脑前部的体温正调节中枢, 释放中枢正调节介质 (PGE₂ 和 cAMP), 使体温调定点上移, 引起机体发热。Tang

等^[8]研究证明 LPS 能引起 TNF- α 的释放, 并引起其他细胞因子产生, 给敲除 IL-1 β 基因的动物注射 LPS 仍能引起发热, 而向去除了 IL-6 基因的动物注射 LPS, TNF- α 、IL-1 均不能引起发热, 表明 LPS 能绕过 IL-1 β 信息传导途径引起发热, IL-6 是发热信息传导通路下游的重要介质。能引起下丘脑体温调

定升高主要物质是 PGE₂, 可能是致热原引起发热的主要介质。cAMP 是脑内多种介质的第二信使, 脑内有较高浓度的 cAMP 和 cAMP 合成降解酶系, 说明 cAMP 可能是参与发热的末环节介质。

注射用炎琥宁自临床应用以来, 大多报道其功效及临床应用不良反应, 但一直缺乏解热机制的研究资料。本实验对注射用炎琥宁解热机制进行了探讨, 结果显示注射用炎琥宁能有效降低 LPS 发热模型家兔体温, 然而对发热信息传导通路上游 TNF- α 、IL-1 β 细胞因子水平变化无明显影响; 能够抑制发热家兔外周介导发热的细胞因子 (IL-6、cAMP、PGE₂) 水平升高; 并能抑制中枢升温介质 (PGE₂、cAMP) 水平的升高。提示注射用炎琥宁可能通过抑制 LPS 发热模型家兔外周发热信息传导通路的下游细胞因子的释放和中枢升温介质的释放而发挥解热作用。注射用炎琥宁是通过何种途径抑制上述细胞因子释放还有待更深入研究。

参考文献

[1] 朱舒兵, 喻锦扬, 唐晓红, 等. 注射用炎琥宁上市后安

全性再评价研究 [J]. 中国药房, 2011, 22(47): 4491-4493.

[2] 刘艳红, 冯 锋, 谢 宁, 等. 穿心莲内酯衍生物抗肿瘤、解热抗炎构效关系研究进展 [J]. 西北药学杂志, 2013, 28(1): 95-98.

[3] 左泽平, 王志斌, 高 阳, 等. 柴胡注射液对 LPS 发热大鼠解热机制的研究 [J]. 中药药理与临床, 2012, 28(4): 57-60.

[4] 刘用国. 外源性热原对体外人全血中 IL-6 细胞因子含量的影响 [D]. 福州: 福建医科大学, 2009.

[5] 李冠民, 黄清泉. 热原检查的研究进展及有关问题的探讨 [J]. 中国实验动物学杂志, 2002, 12(4): 232-235.

[6] Dinarello C A. Cytokines as endogenous pyrogens [J]. *J Infect Dis*, 1999, 179(Suppl 2): S294-S304.

[7] 谢新华, 董 军. 细胞因子与发热机制研究进展 [J]. 广东医学, 2005, 26(8): 1156-1158.

[8] Tang X, Marciano D L, Leeman S E, *et al*. LPS induces the interaction of a transcription factor, LPS-induced TNF- α factor, and STAT6 (B) with effects on multiple cytokines [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(14): 5132-5137.