

• 实验研究 •

热毒宁注射液对内生致热原性发热家兔的解热作用及其机制研究

常秀娟^{1,2}, 孙晓萍^{1,2}, 李 威^{1,2}, 唐兴梅^{1,2}, 周 军^{1,2}, 王振中^{1,2}, 萧 伟^{1,2*}

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

摘 要: **目的** 考察热毒宁注射液对内生致热原性发热家兔的解热作用及其机制研究。**方法** 48 只家兔随机分为 6 组, 每组 8 只, 分别为对照组、模型组、安乃近注射液 (0.024 g/kg) 组和热毒宁注射液 (1.02、2.04、5.08 g/kg) 组。对照组、模型组给予等量生理盐水, 给药容积 5 mL/kg。除对照组耳缘 iv 生理盐水外, 其他各组给药 0.5 h 后耳缘 iv 内生致热原 (1.5 mL/kg)。测定家兔注射内生致热原后 4 h 内体温, 记录平均体温的变化 (ΔT)。发热 1 h 后测定家兔血清中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平以及脑脊液、下丘脑中环磷酸腺苷 (cAMP)。**结果** 热毒宁注射液 5.08、2.04 g/kg 组与模型组比较, 各时间点的 ΔT 明显降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 0.01)。热毒宁注射液 1.02、2.04、5.08 g/kg 组下丘脑、脑脊液中 cAMP 水平及血清 IL-1 β 、TNF- α 水平与模型组比较明显减少 ($P < 0.05$)。**结论** 热毒宁注射液对家兔内生致热原性发热有显著的解热作用, 通过减少血清中 IL-1 β 、TNF- α 水平, 降低脑脊液和下丘脑中 cAMP 含量来发挥解热作用。

关键词: 热毒宁注射液; 内生致热原; 解热作用; 环磷酸腺苷**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2015)11-1307-04**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2015.11.001

Antipyretic effects of Reduning Injection on rabbits with fever induced by endogenous pyrogen and its mechanism

CHANG Xiu-Juan^{1,2}, SUN Xiao-ping^{1,2}, LI Wei^{1,2}, TANG Xing-mei^{1,2}, ZHOU Jun^{1,2}, WANG Zhen-zhong^{1,2}, XIAO Wei^{1,2}

1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd., Lianyungang 222001, China

2. State Key Laboratory of New- tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective To investigate the antipyretic effects of Reduning Injection on rabbits with fever induced by endogenous pyrogen and its mechanism. **Methods** Forty-eight rabbits were divided randomly into six groups, and each group had eight animals. They were control group, model group, Analgin Injection (0.024 g/kg) group, and Reduning Injection (1.02, 2.04, and 5.08 g/kg) groups. All rabbits were administered solution with volumes of 5 mL/kg, and ear iv endogenous pyrogen (1.5 mL/kg) at 0.5 h after administration except control group with normal saline. Body temperature changes of rabbit with fever induced by endogenous pyrogen during 4 h were observed and recorded. Levels of IL-1 β and TNF- α in serum and cAMP in the hypothalamus and cerebrospinal fluid were measured after fever for 1 h. **Results** Body temperature of fever rabbits were reduced significantly in Reduning injection groups, as well as the levels of cAMP in the hypothalamus and cerebrospinal fluid, IL-1 β /TNF- α in serum. Compared with model group, body temperature changes of rabbit in Reduning Injection (5.08 and 2.04 g/kg) groups were significantly decreased, with significant difference between two groups ($P < 0.05$, 0.01). The levels of IL-1 β , TNF- α in serum and cAMP in the hypothalamus and cerebrospinal fluid in Reduning Injection (1.02, 2.04, and 5.08 g/kg) groups were obviously reduced

收稿日期: 2015-10-22

基金项目: 国家科技部重大新药创制项目 (2013ZX09402203)

作者简介: 常秀娟 (1981—), 女, 硕士, 工程师, 研究方向为药理学。Tel: (0518)81152299 E-mail: cxj045@163.com

*通信作者 萧 伟, 男, 研究员级高级工程师, 博士, 研究方向为中药新药的研究与开发。Tel: (0518)81152337 E-mail: wzzh-nj@163.net

($P < 0.05$). **Conclusion** Reduning Injection has obvious antipyretic effects on rabbits with fever induced by endogenous pyrogen, and it can reduce the levels of IL-1 β and TNF- α in the serum, and decrease the contents of cAMP in the hypothalamus and cerebrospinal fluid. **Key words:** Reduning Injection; endogenous pyrogen; antipyretic effect; cAMP

发热是临床常见的病理过程,其中各种病原微生物及其毒素、抗原抗体复合物等外源性致热原作用于体内巨噬细胞,产生内生致热原,主要包括白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6 (IL-6)。它们是一组内源性的不耐热的小分子蛋白质,可直接或间接作用于体温调节中枢,通过中枢发热介质介导体温调节,发放升温信息传至效应器,引起产热增多,散热减少,从而把体温调到一个新的较高水平,也就是机体对致热原作用的一种调节性体温升高反应^[1-2]。热毒宁注射液处方由金银花、栀子和青蒿3味常用中药组合而成,主要用于外感风热所致流感、高热不退、咳嗽、上呼吸道感染等症,临床上退热作用迅速、抗病毒效果显著^[3-4]。本实验通过复制内生致热原性发热家兔模型,观察热毒宁注射液对发热家兔下丘脑、脑脊液中环磷酸腺苷(cAMP)水平变化的影响,探讨解热机制,为热毒宁注射液的进一步开发及临床应用提供依据。

1 材料

1.1 药物与试剂

热毒宁注射液,规格10 mL/支,26 g/支,批号150103,江苏康缘药业股份有限公司;安乃近注射液,规格2 mL:0.5 g,批号1410020121,上海现代哈森(商丘)药业有限公司;脂多糖(LPS),货号L2660, Sigma公司;环磷酸腺苷(cAMP)放免试剂盒,批号20150710,北京华英生物技术研究所;IL-1 β 、TNF- α 放免试剂盒,批号20150720,北京华英生物技术研究所。

1.2 动物

新西兰长耳兔,雄性,体质量2.0~2.5 kg,普通级,购于南京市浦口区莱芙养殖场,合格证号SCXK(苏)2014-0004。于普通环境中饲养,12 h/12 h明暗交替,温度22~25 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度50%~60%,动物自由进食饮水,适应7 d后开始实验。

1.3 仪器

r-911全自动放免计数仪,中国科技大学实业总公司;ZRY-2D型智能热原仪,天大天发科技有限公司;SHY-A水浴恒温振荡器,金坛市佳美仪器有限公司。

2 实验方法

2.1 内生致热原的制备^[5]

取家兔肝素化全血,按7 mg:1 L加入LPS,置37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中振荡培育,1 h后离心(4 $^{\circ}\text{C}$, 3 000 r/min, 10 min)去血浆,加入与血浆等量的无热原生理盐水,继续振荡培育6 h,离心取上清,置4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。全部操作均在无菌条件下进行,所得内生致热原做耐热试验,证明无内毒素污染方可使用。

2.2 分组

实验前3 d将新西兰兔置于实验环境中模拟实验操作(包括捉拿、固定、安放温度计)以使其适应实验条件。实验前3 d每天10:00用电子体温计记录直肠温度,所有探头均经标准温度计校正。测温时将兔置于固定盒中,温度计探头涂以甘油,插入肛门内10 cm,并用小夹固定于尾根部,待兔稳定后30 min记录直肠温度1次,共3次,取3次的均值作为基础体温。选取基础体温在38.5~39.5 $^{\circ}\text{C}$ 的兔,第4天开始正式实验。

2.3 给药

48只家兔随机分为6组,每组8只,分别为对照组、模型组、安乃近注射液(0.024 g/kg)组和热毒宁注射液(1.02、2.04、5.08 g/kg)组。对照组、模型组给予等量生理盐水,给药容积5 mL/kg。除对照组耳缘iv生理盐水外,其他各组给药0.5 h后耳缘iv内生致热原(1.5 mL/kg)。

2.4 检测指标

2.4.1 体温测定 测定家兔注射内生致热原后4 h内体温,记录平均体温的变化(ΔT)。

2.4.2 血清中IL-1 β 、TNF- α 水平的检测 另取筛选体温合格家兔48只进行同样造模及给药处理。发热1 h后家兔心脏取血,4 $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 r/min离心分离血清,-70 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。按照试剂盒说明书测定家兔血清中IL-1 β 、TNF- α 水平。

2.4.3 脑脊液及下丘脑中cAMP的检测 第2批实验家兔发热1 h后,在动物无麻醉状态下,用5号针头穿刺小脑延髓池,抽取脑脊液0.6 mL,迅速置于盛有EDTA的预冷小瓶内,60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴蒸干,置于-70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。立即断头处死动物,迅速取出全脑,于视交叉与灰结节间取下丘脑100 mg冻

存。按照试剂盒说明书测定家兔脑脊液中 cAMP 的水平以及下丘脑中 cAMP 的含量。

2.5 统计方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 量反应资料统计方法采用单因素方差分析检验法, 统计软件使用 SPSS 17.0。

3 实验结果

3.1 对内生致热原性发热家兔体温的影响

家兔耳缘静脉注射内生致热原可引起体温升高, 1 h 左右达到高峰, 与对照组比较差异具有显著性 ($P < 0.01$)。热毒宁注射液 5.08、2.04 g/kg 组与

模型组比较, 各时间点的 ΔT 明显降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 0.01)。见表 1。

3.2 对内生致热原性发热家兔血清、脑脊液和下丘脑中因子水平的影响

模型组下丘脑中 cAMP 水平与对照组比较明显增加, 脑脊液中 cAMP 及血清 IL-1 β 、TNF- α 水平与对照组比较也明显增加 ($P < 0.01$)。热毒宁注射液 1.02、2.04、5.08 g/kg 组下丘脑、脑脊液中 cAMP 水平及血清 IL-1 β 、TNF- α 水平与模型组比较明显减少 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 热毒宁注射液对内生致热原致发热家兔体温的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 1 Effect of Reduning Injection on body temperature of rabbit with fever induced by endogenous pyrogen ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	$\Delta T/^\circ\text{C}$			
		0.5 h	1 h	1.5 h	2 h
对照	—	0.04 $\pm$ 0.08	0.06 $\pm$ 0.10	0.05 $\pm$ 0.16	0.04 $\pm$ 0.09
模型	—	0.50 $\pm$ 0.18 $\Delta\Delta$	0.85 $\pm$ 0.30 $\Delta\Delta$	0.78 $\pm$ 0.34 $\Delta\Delta$	0.80 $\pm$ 0.33 $\Delta\Delta$
安乃近注射液	0.024	0.10 $\pm$ 0.31**	0.36 $\pm$ 0.23**	0.35 $\pm$ 0.26*	0.40 $\pm$ 0.37*
热毒宁注射液	1.02	0.51 $\pm$ 0.37	0.44 $\pm$ 0.24**	0.40 $\pm$ 0.38	0.40 $\pm$ 0.67
	2.04	0.43 $\pm$ 0.33	0.36 $\pm$ 0.26**	0.40 $\pm$ 0.33*	0.39 $\pm$ 0.42*
	5.08	0.21 $\pm$ 0.10**	0.36 $\pm$ 0.27**	0.36 $\pm$ 0.38*	0.30 $\pm$ 0.54*

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	$\Delta T/^\circ\text{C}$			
		2.5 h	3 h	3.5 h	4 h
对照	—	0.06 $\pm$ 0.15	0.06 $\pm$ 0.10	0.04 $\pm$ 0.09	0.02 $\pm$ 0.11
模型	—	0.75 $\pm$ 0.36 $\Delta\Delta$	0.67 $\pm$ 0.38 $\Delta\Delta$	0.67 $\pm$ 0.40 $\Delta\Delta$	0.66 $\pm$ 0.49 $\Delta\Delta$
安乃近注射液	0.024	0.35 $\pm$ 0.37*	0.29 $\pm$ 0.27*	0.23 $\pm$ 0.32*	0.19 $\pm$ 0.27*
热毒宁注射液	1.02	0.36 $\pm$ 0.66	0.43 $\pm$ 0.49	0.30 $\pm$ 0.44	0.23 $\pm$ 0.49
	2.04	0.30 $\pm$ 0.44*	0.29 $\pm$ 0.55	0.20 $\pm$ 0.56	0.19 $\pm$ 0.62
	5.08	0.25 $\pm$ 0.47*	0.11 $\pm$ 0.47*	0.13 $\pm$ 0.57*	0.09 $\pm$ 0.64

与对照组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

表 2 热毒宁注射液对内生致热原致发热家兔 IL-1 β 、TNF- α 、cAMP 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 2 Effect of Reduning Injection on IL-1 β , TNF- α , and cAMP of rabbit with fever induced by endogenous pyrogen ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	脑脊液 cAMP/ (pmol·L ⁻¹)	下丘脑 cAMP/ (pmol·mg ⁻¹)
对照	—	24.07 $\pm$ 5.42	32.74 $\pm$ 13.47	4.83 $\pm$ 1.19	0.71 $\pm$ 0.18
模型	—	43.62 $\pm$ 16.29 $\Delta\Delta$	61.93 $\pm$ 10.78 $\Delta\Delta$	8.08 $\pm$ 1.76 $\Delta\Delta$	1.14 $\pm$ 0.21 $\Delta\Delta$
安乃近注射液	0.024	27.65 $\pm$ 7.33*	49.18 $\pm$ 10.95*	5.67 $\pm$ 1.02**	0.83 $\pm$ 0.20**
热毒宁注射液	1.02	29.03 $\pm$ 8.80*	54.99 $\pm$ 7.61	5.75 $\pm$ 1.40*	0.91 $\pm$ 0.16*
	2.04	28.49 $\pm$ 5.08*	46.65 $\pm$ 16.37*	5.72 $\pm$ 1.34**	0.86 $\pm$ 0.20*
	5.08	28.09 $\pm$ 5.13*	46.30 $\pm$ 14.61*	5.59 $\pm$ 0.79**	0.84 $\pm$ 0.19**

与对照组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

4 讨论

许多学者认为内生致热原是人体和多种动物发热的共同信息物质,内毒素能刺激产致热原细胞产生和释放内生致热原,多项研究表明注射内生致热原后家兔体温明显升高,同时脑脊液中 cAMP 水平升高,表明 cAMP 是内生致热源内生致热原性发热的重要中枢介质^[6]。当内生致热原通过血脑屏障进入中枢到达视前区-下丘脑前部,使该部位细胞内 cAMP 代谢抑制,下丘脑 cAMP 含量增加, cAMP 作用于 PO/AH 区的热敏神经元,改变其放电频率,提高体温调定点,使体温升高^[7]。IL-1 β 是一种参与多种致热原性发热的重要致热性细胞因子,有促进下丘脑组织释放 cAMP 的作用,给新西兰兔静脉注射 IL-1 β 100 ng/只后,体温逐渐上升,约 60 min 到达发热高峰,最高可达 1.1 $^{\circ}\text{C}$ ^[8-9]; TNF- α 是内毒素等早期诱导的细胞因子,并受其他细胞因子直接或间接调控,研究表明 IL-1 β 和 TNF- α 均可诱导大鼠发热^[2, 10-12]。

本实验结果表明热毒宁注射液干预内生致热原导致的家兔发热反应,其作用呈剂量相关性,通过脑脊液及下丘脑中枢性发热介质的检测,证实了热毒宁注射液可以通过降低脑脊液及下丘脑中 cAMP 含量,减少血清中 IL-1 β 、TNF- α 含量来发挥解热作用。

参考文献

- [1] 刘智勤,蒋玉凤,岳晓莉,等.脑热清对 EP 性发热家兔下丘脑、脑脊液 cAMP 及腹中隔区 AVP 含量的影响[J].北京中医药大学学报,2004,27(2): 30-32.
- [2] 刘聪,杨林,方芳,等.柴黄颗粒对内毒素致热

新西兰兔脑脊液中发热介质的影响[J].儿科药理学杂志,2012,18(5): 13-16.

- [3] 李海波,于洋,王振中,等.热毒宁注射液抗病毒活性成分研究(I)[J].中草药,2014,45(12): 1682-1688.
- [4] 常秀娟,张帅,江益平,等.从细胞因子风暴探讨热毒宁注射液抗大鼠急性肺损伤作用机制[J].中草药,2015,46(2): 236-239.
- [5] 岳晓莉,蒋玉凤,刘智勤,等.脑热清对 EP 性发热家兔下丘脑及脑脊液 cAMP 含量的影响[J].中国病理生理杂志,2005,21(1): 172-174.
- [6] 祝世功,李楚杰,虞学军,等.不同浓度内生致热原的发热效应脑脊液中 cAMP 的反应及“热限”的研究[J].病理生理学杂志,1985,1(1): 35-41.
- [7] 白宁,金莲锦,曹宇.家兔发热诱导热休克转录因子 1 聚合对体温及下丘脑 cAMP 含量的影响[J].第二军医大学学报,2008,29(7): 773-777.
- [8] 董军,裘晟,谢新华,等.大青叶对 IL-1 β 作用下兔下丘脑 EP3 mRNA 表达的影响[J].细胞与分子免疫学杂志,2007,23(1): 42-45.
- [9] Kozak W, Kluger M J, Soszynski D, et al. IL-6 and IL-1 beta in fever. Studies using cytokine-deficient (knockout) mice[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1998, 856: 33-47.
- [10] 佟雷,张量,吴晓岚,等. BN 对 IL-1 β 致热的抑制作用及 POA 和血中 cAMP 的影响[J].中国药理学通报,2004,20(11): 1239-1241.
- [11] Netea M G, Kullberg B J, Van der Meer J W. Circulating cytokines as mediators of fever[J]. *Clin Infect Dis*, 2000, 31(Suppl 5): S178-S184.
- [12] Long N C, Otterness I, Kunkel S L, et al. Roles of interleukin-1 β and tumor necrosis factor in lipopolysaccharide fever in rats[J]. *Am J Physiol*, 1990, 259: 724-728.