

• 药理与临床 •

基于 GC-MS 代谢组学技术的狭叶柴胡解热作用研究

王东琴^{1,2}, 李晓伟^{1,2}, 张福生¹, 邢 婕¹, 李震宇¹, 秦雪梅^{1*}

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006

摘要: 目的 采用 GC-MS 代谢组学技术研究狭叶柴胡的解热作用, 并初步探讨其作用机制。方法 SD 大鼠随机分为对照组, 模型组, 狭叶柴胡提取物高、中、低剂量(生药 40、20、10 g/kg)组、阿司匹林(100 mg/kg)阳性对照组, 干酵母诱导 SD 大鼠发热后分 2 次给药。造模后 5~10 h 每隔 1 h 观察大鼠的体温变化; 采集造模后 10 h 大鼠血浆, 进行 GC-MS 代谢组学分析, 并寻找发热的潜在生物标志物。结果 阿司匹林具有很好的解热效果, 在给药 2 h 后体温即与对照组无显著差异($P>0.05$)。不同剂量的狭叶柴胡提取物使发热大鼠的体温有不同程度的降低, 解热作用与剂量相关; 高剂量组起效较快, 在第 1 次给药后 1 h 即与模型组有显著差异($P<0.01$); 中剂量组在第 2 次给药后 1 h 效果最好, 体温与对照组相比无显著差异($P>0.05$); 低剂量组大鼠体温在各个时间点与模型组相比均无显著差异, 体温曲线波动较大, 表明药物在该剂量虽可干预体温的升高, 但未产生明显效果。通过代谢组学技术指认了与发热相关的 17 个潜在生物标志物, 且不同剂量狭叶柴胡提取物均能调节这些标志物的改变。结论 狭叶柴胡具有良好的解热作用且与剂量相关, 其可能从酶抑制、神经递质、糖脂代谢、氨基酸及能量代谢等多层面协同发挥作用, 具有多靶点性。

关键词: 狭叶柴胡; 解热; 发热; 生物标志物; 气相色谱-质谱; 代谢组学

中图分类号: R282.710.5; R971.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2013)05-0574-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.05.015

Antipyretic effect of *Bupleurum scorzonerifolium* based on GC-MS metabonomicsWANG Dong-qin^{1,2}, LI Xiao-wei^{1,2}, ZHANG Fu-sheng¹, XING Jie¹, LI Zhen-yu¹, QIN Xue-mei¹

1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: Objective To evaluate the antipyretic effect of *Bupleurum scorzonerifolium* based on GC-MS metabolomics and explore its mechanism. **Methods** Rats were randomly divided into control, model, high-, mid-, low-dose *B. scorzonerifolium* extract (40, 20, and 10 g/kg), and Aspirin (100 mg/kg) positive control groups. The fever rats induced by yeast were administered twice. The body temperature changes of rats were observed at the 5th, 6th, 7th, 8th, 9th, and 10th hours after modeling; Meanwhile, plasma samples were collected at the 10th hour and subjected to GC-MS analysis to find potential biomarkers of fever. **Results** Aspirin showed antipyretic effect well. The temperature showed no significant difference compared with the control group 2 h after administration ($P>0.05$). Different doses of extract from *B. scorzonerifolium* showed the antipyretic effect at varying degrees, which presented the obvious dose-dependent antipyretic effect. The high-dose group had a faster onset, and there was a significant difference ($P<0.01$) 1 h after the first administration compared with the model group. The mid-dose group achieved the best antipyretic effect 1 h after the second administration, and there was no significant difference compared with the normal group ($P>0.05$). Compared with the model group, low-dose group showed no significant differences at each time point. The body temperature showed a large fluctuation, indicating the drugs could interfere with the increase of body temperature but did not reach a significant antipyretic effect. Seventeen potential biomarkers were identified from the loading plot based on the metabolomics and the different doses of *B. scorzonerifolium* extract

收稿日期: 2012-05-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31070295); 国家科技基础性工作专项(2007FY110600)

作者简介: 王东琴(1987—), 女, 山西晋城人, 硕士, 主要从事代谢组学技术评价不同来源中药在中药复方中的药效差异。

Tel: (0351)7011202 E-mail: wdq546094059@163.com

*通信作者 秦雪梅 Tel: (0351)7011379 E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

could regulate the biomarkers. **Conclusion** *B. scorzonifolium* has the significant antipyretic effect in a dose-dependent manner and the antipyretic role may be related to the synergism of enzyme inhibition, neurotransmitter, glucose and lipid metabolism, amino acid metabolism, energy metabolism with the multi-targets.

Key words: *Bupleurum scorzonifolium* Willd.; antipyretic; fever; biomarkers; GC-MS; metabolomics

柴胡是我国常用的大宗中药材之一,具有疏散退热、疏肝解郁、升举阳气等功效。关于柴胡的解热作用已经有大量研究。柴胡注射液因具有良好的解热效果,在临床上已使用多年,但迄今为止,有关柴胡解热的物质基础仍未完全阐明。李廷利等^[1]研究表明,挥发油是柴胡解热的主要活性物质;薛燕等^[2]的研究却发现柴胡皂苷及皂苷元的解热作用要优于挥发油;还有研究显示,柴胡剂量与药效相关^[3]。此外,有关柴胡解热作用机制的研究大多从对体温变化、致热细胞因子(IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IFN等)、中枢发热介质(cAMP、PGE₂等)的调节作用方面展开^[4-5],不能全面反映药物从整体上对机体的调节过程。柴胡为柴胡 *Bupleurum chinense* DC. (习称北柴胡)或狭叶柴胡 *B. scorzonifolium* Willd. (习称南柴胡)的干燥根,前期实验显示狭叶柴胡的解热作用优于柴胡,且有文献报道^[1]狭叶柴胡中所含的挥发油多于柴胡。为了进一步阐明狭叶柴胡的解热作用及药效物质基础,本实验采用 GC-MS 代谢组学技术^[6-11],综合评价狭叶柴胡提取物(水煎液与挥发油的混合物)对干酵母致大鼠发热模型的解热作用,以期从整体、多靶点等层面,深入阐释柴胡的解热作用机制。

1 材料

1.1 药物与试剂

狭叶柴胡,产地内蒙古,购自河北光明饮片有限公司汉草饮片厂,批号 090208,经山西大学中医药现代研究中心秦雪梅教授鉴定为狭叶柴胡 *Bupleurum scorzonifolium* Willd. 的干燥根。阿司匹林泡腾片(巴米尔),0.5 g/片,批号 1010075,阿斯利康制药有限公司。干酵母,(安琪酵母)伊犁股份有限公司,批号 101002。*N*-甲基-*N*-(三甲基硅烷)-三氟乙酰胺 [MSTFA, 含 1%三甲基氯硅烷(TMCS)],美国 Thermo scientific 公司;二十四烷,Alfa-Aesar 公司;正庚烷,天津市光复精细化工研究所;甲氧胺,上海晶纯试剂有限公司。

1.2 仪器

DT-11D 型电子体温计,山东潍坊晨东医疗器械有限公司;TGL-6 高速台式冷冻离心机,长沙

湘仪离心机有限公司;旋转蒸发仪,上海申生科技有限公司;Trace GC—PolarisQ Mass GC-MS 联用仪,Thermo Finnigan 公司。

1.3 动物

成年 SD 大鼠,雄性,清洁级,体质量(200 $\pm$ 20) g,北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2006-0008。

2 方法

2.1 药液的制备

2.1.1 狭叶柴胡提取物的制备 取狭叶柴胡药材 3 份,每份 200 g,加 8 倍量的水浸泡 30~40 min,煎煮 30 min,倒出滤液,再加 5 倍量的水煎煮 30 min,合并两次滤液,浓缩至不同质量浓度(2.0、1.0、0.5 g/mL)得狭叶柴胡水提物(含柴胡皂苷 a 0.15%、柴胡皂苷 d 0.19%)。制备水提物的同时收集挥发油,临用前将含挥发油的芳香水倒入浓缩液中,搅匀即得(总提物中含水提液 92.5%、挥发油 7.5%)。

2.1.2 20%酵母混悬液的制备 干酵母 2 g 置干净烧杯中,用无热原生理盐水溶解,定容于 10 mL 量瓶中,配成 20%混悬液(临用前现配)。

2.1.3 阳性对照液的制备 取阿司匹林泡腾片 1 片,溶于 50 mL 蒸馏水中即得。

2.2 模型制备及分组与给药^[12-13]

雄性 SD 大鼠 40 只实验前置于实验架上适应模拟实验条件 2 d,6 h/d。正式实验前一天禁食 12 h,自由饮水。选取肛温相对稳定(36.6~38.3 $^{\circ}$ C)的大鼠,剔除单次体温超过 38.3 $^{\circ}$ C 或 2 次体温差超过 0.5 $^{\circ}$ C 的大鼠。选取的大鼠随机分为 6 组:对照组,模型组,阿司匹林(100 mg/kg)组,狭叶柴胡提取物高、中、低剂量(生药 40、20、10 g/kg)组,每组 6 只。除对照组外,其他各组于大鼠背部 sc 20%的酵母混悬液 10 mL/kg(相当于给药量 100 mg/kg)诱导发热,对照组 sc 等体积生理盐水。造模后 4、6 h,狭叶柴胡提取物各剂量组每次 ig 相应剂量 1/2 的药液,每次 ig 10 mL/kg,阿司匹林组于造模后 6 h ig 给药,对照组、模型组 ig 等体积蒸馏水。

2.3 观察指标

造模后 5~10 h 每隔 1 h 测体温 1 次,观察体温

变化; 计算 10 h 体温反应指数 (TRI_{10} , 平均体温反应曲线与基线之间的面积)^[14], 数值越低, 表明解热效果越好。

2.4 血样采集与处理

造模后 10 h 测完体温, 迅速麻醉大鼠, 股动脉取血于肝素钠管中, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液并分装 1.0 mL 离心管内, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待测。

2.5 血浆样品的 GC-MS 分析^[9]

2.5.1 样品溶液的制备 冰水混合物上解冻血浆样品, 取上清液 100 μL 加入 250 μL 乙腈, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 150 μL , $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 真空干燥 12 h, 加入 30 μL 甲氧胺 (15 mg/mL)-吡啶溶液, $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h。加入 MSTFA 50 μL , $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 90 min, 加入 700 μL 正庚烷 (含二十四烷 0.1 mg/mL), 涡旋, 作为 GC-MS 分析样品。

2.5.2 GC-MS 条件 DB-5MS 色谱柱 (5%二苯基-95%二甲基聚硅氧烷, 30 000 mm $\times$ 0.25 mm, 0.25 μm); 进样口温度 $260\text{ }^{\circ}\text{C}$; 分流进样, 分流比为 10:1; 进样量 1 μL ; 载气为氦气; 载气体积流量 1.0 mL/min。程序升温: $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、3 min; $7\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $140\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、4 min; $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、6 min; $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $280\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、2 min。EI 离子源: 温度 $200\text{ }^{\circ}\text{C}$, 电子能量 70 eV, 全扫描模式, 扫描范围 m/z 50~650, 传输线温度 $280\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

2.6 数据处理与统计学分析

2.6.1 体温反应曲线的绘制 以时间为横坐标、各个时间点体温与基础体温间的差值为纵坐标, 绘制体温反应曲线。

2.6.2 TRI_{10} 计算^[14] 体温反应曲线下面积计算, 即纵坐标: 按 $0.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 对应 1 cm, 横坐标: 0~5 h 对应 1 cm, 以后按每 1 h 对应 1 cm 的比例, 计算曲线下面积, 共计 1 个三角形和 5 个梯形的面积。

2.6.3 代谢组学数据处理^[15] 所有的 GC-MS 原始数据通过 GC-MS 仪器工作站 Xcalibur 软件由 RAW 格式转化为 netCDF 格式。GC-MS 图谱经 XCMS 软件预处理后 [XCMS 参数: fwhm=4, snthresh=8, max=20, group (bw=10)], 导入 Excel 中对数据进行面积归一化, 并采用代谢组学 SIMCA P11.0 软件包 (瑞典 Umetrics AB, Umea) 进行主成分分析 (PCA) 和最小二乘法判别分析 (PLS-DA), 通过载荷图中的 VIP 值 (每个主成分变量对各组的贡献大小) 寻找生物标志物。最后通过标准质谱数据库 (NIST05) 检索匹配结合对照品对部分代谢物进行

指认, 并通过计算各个标志物的归一化后的相对峰面积进行定量分析。

2.6.4 统计学分析 数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 16.0 软件进行数据统计分析。两组间差异比较采用独立样本 t 检验, 多组间差异比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 对发热模型大鼠的影响

与对照组相比, 模型组大鼠在造模后 5、6、7、8、9、10 h 体温差均有显著差异, 表明造模成功。阿司匹林组大鼠在造模后 6 h 尚未给药时虽体温反应曲线在模型组之下, 但数值与模型组无显著差异, 可能是动物个体间的体温差异所导致, 表明实验操作成功。狭叶柴胡提取物低剂量组在各测试点的大鼠体温差有降低趋势, 但与模型组相比无显著差异 ($P>0.05$), 只是在造模后 8 h 时突然下降, 曲线波动较大, 表明该剂量不足以产生显著效果; 与模型组相比, 狭叶柴胡提取物高剂量组在第 1 次给药 1 h 后的大鼠体温差即显著降低 ($P<0.05$), 给药 2 h 后大鼠体温虽然还在上升, 但与模型组相比差异显著 ($P<0.05$), 第 2 次给药后 1、2 h 大鼠体温变化比较平稳, 3 h 体温急剧下降, 解热作用平稳且持久; 狭叶柴胡提取物中剂量组在第 1 次给药 1、2 h 后大鼠体温差与模型组相比差异显著 ($P<0.05$ 、0.01), 第 2 次给药后 1 h 时体温差与对照组无显著差异 ($P>0.05$), 解热效果与阿司匹林相当, 在以后的 3 h 内均显示显著的解热作用且作用持久。与模型组相比, 阿司匹林组大鼠在给药后 1 h 体温差显著增大, 表明其起效快; 在给药 2 h 后与对照组无显著差异, 且在以后的 2 h 内与模型组相比有显著差异 ($P<0.05$ 、0.01、0.001), 表明阿司匹林解热效果显著持久。结果见表 1 和图 1。

此外, 各组的 TRI_{10} 大小依次为对照组<狭叶柴胡提取物中剂量组<阿司匹林组<狭叶柴胡提取物高剂量组<狭叶柴胡提取物低剂量组<模型组, 进一步表明狭叶柴胡有解热作用且与剂量有关。结果见表 2。

3.2 多元统计分析

3.2.1 与发热相关的生物标志物指认 通过标准质谱数据库 (NIST05) 检索匹配结合对照品, 对部分代谢物进行指认, 共指认了 17 种代谢物。结果见图 2。

表 1 狭叶柴胡提取物对酵母致发热大鼠体温变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of extract from *B. scorzonifolium* on body temperature of fever rats induced by yeast ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	$\Delta T / ^\circ\text{C}$					
		造模后 5 h	造模后 6 h	造模后 7 h	造模后 8 h	造模后 9 h	造模后 10 h
对照	—	0.08±0.10**	0.17±0.10**	0.03±0.11**	0.07±0.10*	0.08±0.12***	0.10±0.11**
模型	—	0.76±0.08	1.34±0.12	1.40±0.12	1.60±0.21	1.51±0.10	1.36±0.17
狭叶柴胡	40	0.13±0.18**	0.82±0.13*	0.83±0.26*	0.88±0.15*	0.72±0.21*	0.05±0.29**
提取物	20	0.08±0.28*	0.37±0.39**	0.07±0.34**	0.28±0.50*	0.27±0.52**	0.40±0.50*
	10	0.38±0.26	0.77±0.35	1.33±0.35	0.60±0.52	1.05±0.28	1.48±0.52
阿司匹林	0.1	0.57±0.19	0.98±0.22	0.42±0.10*	0.07±0.16**	0.08±0.11***	0.23±0.08**

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group

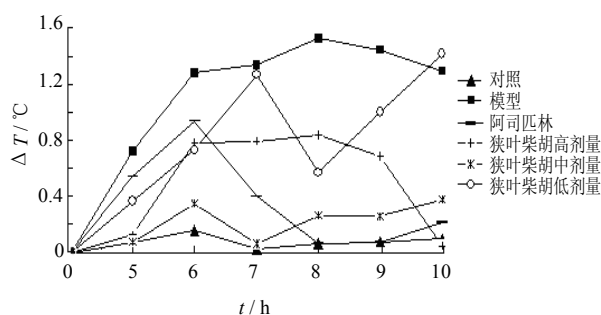


图 1 各组大鼠的体温反应曲线 ($n=6$)

Fig. 1 Body temperature curves of rats in each group ($n=6$)

表 2 体温反应指数 TRI_{10}

Table 2 Body temperature response index TRI_{10}

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	TRI_{10}
对照	—	1.21
模型	—	18.23
狭叶柴胡提取物	40	8.52
	20	3.17
	10	12.19
阿司匹林	0.1	5.58

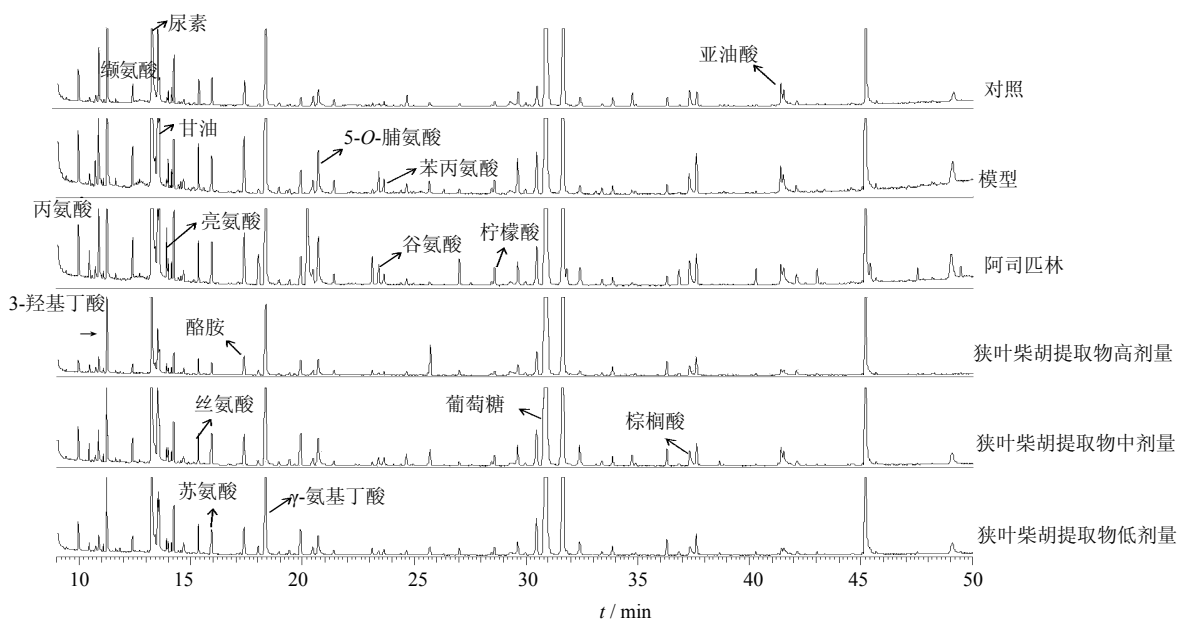


图 2 各组大鼠血浆 GC-MS 总离子流色谱图及主要代谢物

Fig. 2 GC-MS total ion current chromatograms and main metabolites in plasma of rats in each group

由图 3 可见, 模型组和对照组 PCA 散点可以明显分开。根据 VIP 值确定其中贡献较大的组分, 与对照组相比, 模型组中量升高或降低组分的色谱峰

对应的保留时间和可能的生物标志物见表 3, 可见在引起对照组与模型组差异的 17 个代谢物中, 除葡萄糖在模型组中下调外, 其余在模型组中均上调。

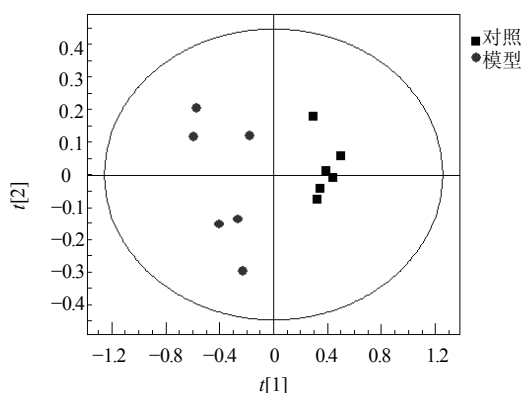


图 3 模型组和对照组大鼠血浆 GC-MS PCA 散点图
Fig. 3 PCA plot in GC-MS spectra in plasma of rats in model and control groups

表 3 模型组与对照组大鼠血浆中差异代谢物
Table 3 Different metabolites in plasma of rats in model and control groups

编号	<i>t</i> / min	代谢物	VIP 值	变化趋势
1	9.96	丙氨酸 ^{a,b}	1.04	+
2	11.24	3-羟基丁酸 ^b	5.25	+
3	12.39	缬氨酸 ^{a,b}	1.85	+
4	13.28	尿素 ^b	5.85	+
5	13.54	甘油 ^b	2.30	+
6	13.99	亮氨酸 ^{a,b}	1.71	+
7	15.34	丝氨酸 ^{a,b}	1.53	+
8	15.94	苏氨酸 ^{a,b}	1.03	+
9	17.39	酪胺 ^{a,b}	2.08	+
10	18.35	γ-氨基丁酸 ^b	3.93	+
11	20.71	5- <i>O</i> -脯氨酸 ^b	2.08	+
12	23.41	谷氨酸 ^{a,b}	1.05	+
13	23.65	苯丙氨酸 ^{a,b}	1.02	+
14	28.60	柠檬酸 ^{a,b}	1.05	+
15	30.91	葡萄糖 ^{a,b}	10.03	-
16	37.31	棕榈酸 ^{a,b}	1.53	+
17	41.40	亚油酸 ^b	1.56	+

“+”-模型组中的量相对较高;“-”-模型组中的量相对较低

a-与对照品比较; b-NIST05 质谱库检索

“+”-relatively higher levels in model group;“-”-relatively lower levels in model group; a-vs reference substances; b-NIST05 database

3.2.2 对潜在生物标志物的回调作用 从各给药组的 PLS-DA 散点图(图 4)可见,模型组与对照组在 *t*[1] 轴上能显著分开;狭叶柴胡提取物高、中、低给药组在散点图上均能与模型组、对照组分开,但在 *t*[1] 轴上更靠近对照组。阿司匹林组更靠近

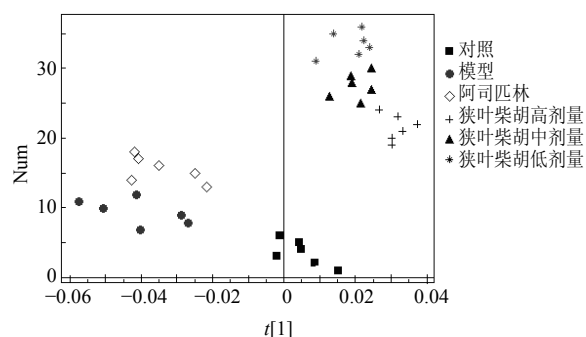


图 4 各组大鼠血浆 GC-MS PLS-DA 散点图
Fig. 4 PLS-DA scatter plot in GC-MS spectra in plasma of rats in each group

模型组,表明阿司匹林虽有解热作用,但在内源性代谢物的变化上距对照组较远;狭叶柴胡提取物高剂量组距对照组最近,其次是中剂量、低剂量。随狭叶柴胡提取物剂量的升高,血浆代谢物的水平与对照组越接近。

由图 5 可见,与对照组相比,除模型组葡萄糖显著下降外,其余代谢物在模型组均上升($P < 0.05$);而阿司匹林与狭叶柴胡提取物对上述 17 种潜在生物标志物的调节作用却各有不同。

与模型组相比,阿司匹林可显著下调 3-羟基丁酸、γ-氨基丁酸、谷氨酸($P < 0.01$),亚油酸、甘油($P < 0.05$);狭叶柴胡提取物高剂量能显著下调丙氨酸、丝氨酸($P < 0.05$),甘油($P < 0.01$),苏氨酸、缬氨酸、亮氨酸、酪胺、苯丙氨酸、谷氨酸、3-羟基丁酸、尿素、γ-氨基丁酸、棕榈酸、亚油酸($P < 0.001$) 14 个标志物,显著上调葡萄糖($P < 0.001$);狭叶柴胡提取物中剂量能显著下调亮氨酸、酪胺、棕榈酸、尿素、甘油、γ-氨基丁酸、棕榈酸、亚油酸($P < 0.01$),谷氨酸、3-羟基丁酸、γ-氨基丁酸、亚油酸($P < 0.001$) 9 个标志物,显著上调葡萄糖($P < 0.001$);狭叶柴胡提取物低剂量能显著下调苯丙氨酸、柠檬酸($P < 0.05$),酪胺($P < 0.01$),谷氨酸、3-羟基丁酸、尿素、甘油、γ-氨基丁酸、棕榈酸、亚油酸($P < 0.001$),显著上调葡萄糖($P < 0.001$);在 4 个给药组中 5-*O*-脯氨酸均无显著差异($P > 0.05$)。

4 讨论

本实验结果表明,狭叶柴胡和阿司匹林的解热作用在起效时间、达到最佳效果时间、持续时间等方面均无差别,提示柴胡在临床治疗发热时需及时给药,首次用药剂量应较大。

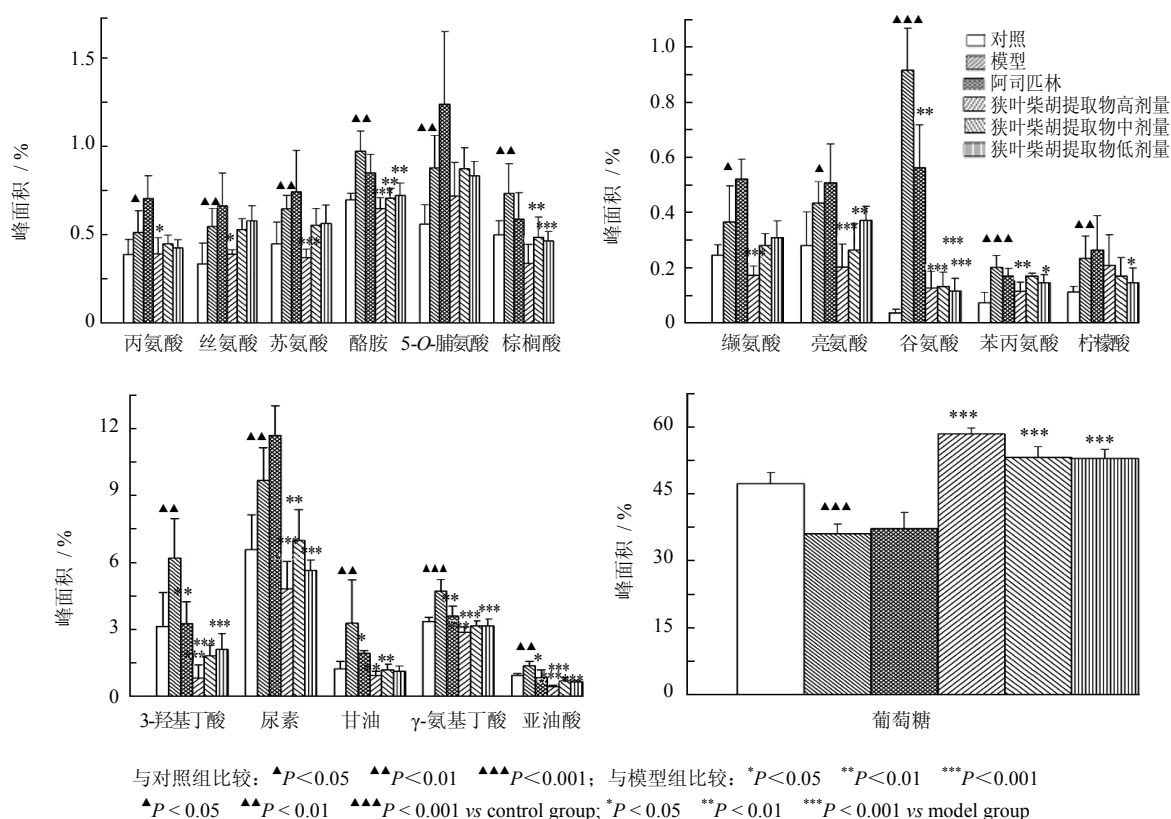


图5 狭叶柴胡提取物对大鼠血浆中发热生物标志物的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Fig. 5 Effect of *B. scorzonrifolium* extract on biomarkers in plasma of rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

传统作用机制认为柴胡通过作用于下丘脑体温调节中枢,降低该部位cAMP的浓度,从而抑制体温调定点的上移,使体温下降^[16]。本实验则从血浆代谢物的角度来阐释柴胡的解热机制。结果显示,模型组与对照组之间有17个血浆代谢物(包括氨基酸、有机酸、脂肪酸、葡萄糖)发生显著变化。谷氨酸和 γ -氨基丁酸在发热模型大鼠血浆中显著升高,这与文献报道一致^[17-18]。下丘脑和棕色脂肪组织之间不仅存在神经联系,而且下丘脑对棕色脂肪组织具有抑制作用^[19]。当致热原作用于下丘脑前部体温调节中枢神经元时,抑制被解除,随后脂肪分解增加、产热增多而导致发热^[20]。在本实验中甘油、棕榈酸、油酸、亚油酸等在发热大鼠血浆中水平均升高,符合上述推测。酪胺和苯丙氨酸是酪氨酸的前体物质,而酪氨酸能合成去甲肾上腺素(NE)^[21],因此发热动物血浆中酪胺和苯丙氨酸的量升高,提示NE可能与发热有关。

阿司匹林下调 γ -氨基丁酸、谷氨酸、亚油酸、甘油,可能与其是环氧合酶-2(COX-2)抑制剂有关。狭叶柴胡与阿司匹林相同的下调成分是3-羟基

丁酸、 γ -氨基丁酸、亚油酸、谷氨酸、甘油,但其还可调节其他与发热相关的代谢产物,提示狭叶柴胡不仅可通过抑制环氧合酶,而且还可通过其他途径发挥解热作用,具有多靶点性。狭叶柴胡还可显著上调血浆中葡萄糖水平,而阿司匹林和狭叶柴胡均能显著降低血浆中3-羟基丁酸水平,提示其可通过影响脂肪酸分解供能,即可能通过调节能量供应来发挥解热作用,这与柴胡的传统调节机制一致。

在本实验操作过程中需特别注意:(1)大鼠的体温稳定对实验至关重要,在实验前需提前剔除体温不稳定的动物;(2)室温应保持在21~23℃;(3)在大鼠背部sc酵母混悬液后,背部会起很大的包,所以应在注射后按摩注射部位,使酵母液扩散、快速发挥致热作用;(4)在测量大鼠体温时应尽量减少其活动,且应在体温计上涂抹凡士林、甘油等润滑剂,切忌暴力;(5)由于中药提取物的黏度较大,所以需多次给药,有发热迹象时即应及时给药。

总之,狭叶柴胡可能是从酶抑制作用、神经递质、糖脂代谢、氨基酸及能量代谢等多途径协同发挥解热作用,具有多靶点性。此外,缬氨酸、亮氨酸

酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸等氨基酸可能与发热机制和狭叶柴胡的解热机制相关,但它们之间的联系尚不清楚,有待进一步研究。

参考文献

- [1] 李廷利, 都晓伟, 赵景和, 等. 南北柴胡药理作用的比较研究 [J]. 中医学报, 1992(3): 34-37.
- [2] 薛燕, 白金叶. 柴胡解热成分的比较研究 [J]. 中药药理与临床, 2003, 19(1): 11-12.
- [3] 孙秀萍, 张宁. 柴胡解热的物质基础、机制及影响因素探讨 [J]. 山东中医药大学学报, 2009, 33(4): 345-346.
- [4] 王琳, 焦红军. 发热机制的研究进展 [J]. 中医研究, 2000, 13(2): 57-61.
- [5] 欧阳娟, 吴小云, 谢新华. 前列腺素 E₂ 及其受体与发热机制的研究进展 [J]. 广东医学, 2008, 29(8): 1420-1421.
- [6] Liu S M, Lu F, Wang X J, *et al.* Metabolomic study of a rat fever model induced with 2, 4-dinitrophenol and the therapeutic effects of a crude drug derived from *Coptis chinensis* [J]. *Am J Chin Med*, 2011, 39(1): 95-109.
- [7] Liu X J, Zhou Y Z, Li Z F, *et al.* Anti-depressant effects of Xiaoyaosan on rat model of chronic unpredictable mild stress: a plasma metabolomics study based on NMR spectroscopy [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2012, 64(4): 578-588.
- [8] Wu Z M, Huang Z Q, Lehmann R, *et al.* The application of chromatography-mass spectrometry: methods to metabolomics [J]. *Chromatographia*, 2009, 69(Suppl 1): S23-S32.
- [9] Li Z Y, Zheng X Y, Gao X X, *et al.* Study of plasma metabolic profiling and biomarkers of chronic unpredictable mild stress rats based on gas chromatography/mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2010, 24(24): 3539-3546.
- [10] Gao X X, Zheng X Y, Li Z Y, *et al.* Metabonomic study on chronic unpredictable mild stress and intervention effects of Xiaoyaosan in rats using gas chromatography coupled with mass spectrometry [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137(1): 690-699.
- [11] 李春雨, 王平, 王涨, 等. 基于代谢组学技术的大黄治疗慢性肾功能衰竭的作用机制研究 [J]. 中草药, 2012, 43(2): 312-315.
- [12] 陈奇. 中药药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011.
- [13] 李沧海, 霍海如, 周军, 等. 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 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(1): 27-30.
- [14] Milton A S, Wendlandt S. Effect on body temperature of prostaglandins of the A, E, and F series on injection into the third ventricle of unanaesthetized cats and rabbits [J]. *J Physiol*, 1971, 218(2): 325-336.
- [15] 薛水玉, 郑兴宇, 窦春艳, 等. 文拉法辛和氟西汀抗抑郁作用机制和药效特点的代谢组学研究 [J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(1): 29-33.
- [16] 陈长勋. 中药药理学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006.
- [17] Ni Y, Su M M, Li J C, *et al.* Metabolic profiling reveals disorder of amino acid metabolism in four brain regions from a rat model of chronic unpredictable mild stress [J]. *FEBS Lett*, 2008, 582(17): 2627-2636.
- [18] Nikolov R. Influence of GABA-acting drugs on morphine-induced hyperthermia in rats [J]. *Methods Find Exp Clin*, 2010, 2(6): 401-406.
- [19] Cerri M, Morrison S F. Corticotropin releasing factor increases in brown adipose tissue thermogenesis and heart rate through dorsomedial hypothalamus and medullary raphe pallidus [J]. *Neuroscience*, 2006, 140(2): 711-721.
- [20] Nakamura Y, Nakamura K, Morrison S F. Different populations of prostaglandin EP3 receptor expressing preoptic neurons project to two fever-mediating sympathoexcitatory brain regions [J]. *Neuroscience*, 2009, 20(2): 614-620.
- [21] Naqatsu T. Tyrosine hydroxylase: human isoforms, structure and regulation in physiology and pathology [J]. *Essays Biochem*, 1995(30): 15-35.