

新癆片对牛奶致家兔发热模型的解热作用机制研究

刘 静¹, 吕晓静², 刘东博¹, 南淑华³, 关 斌³, 赖志成³, 申秀萍^{1*}

1. 天津药物研究院, 天津 300193

2. 瑞普(天津)生物药业有限公司, 天津 300300

3. 厦门中药厂有限公司, 福建 厦门 361100

摘 要: **目的** 探讨新癆片对牛奶致家兔发热模型的解热作用机制。**方法** 制备牛奶致家兔发热模型, 测定给药后 1、4 h 体温, 并取下丘脑测定与体温相关的白细胞介素 1 α (IL-1 α)、IL-1 β 、IL-6、前列腺素 E₂ (PGE₂)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、精氨酸加压素 (AVP)、环磷酸腺苷 (cAMP)、环磷酸鸟苷 (cGMP)、Na⁺, K⁺-ATP 等指标。**结果** 新癆片给药 1、4 h 后均能显著降低家兔体温, 显著降低家兔下丘脑 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、PGE₂、TNF- α 、cAMP 水平及 cAMP/cGMP 值, 降低 Na⁺, K⁺-ATP 活力; 给药后 4 h 能显著升高 AVP 水平。与吲哚美辛比较, 新癆片给药后 4 h 能进一步降低家兔下丘脑 IL-1 β 、IL-6、cAMP 水平及 cAMP/cGMP 值, 差异显著 ($P < 0.05$), 进一步降低 PGE₂ 水平, 给药后 1 h 能显著降低 IL-1 α 水平。**结论** 新癆片的解热作用机制与调节下丘脑中体温调控相关因子 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、PGE₂、TNF- α 、cAMP、cAMP/cGMP、Na⁺, K⁺-ATP、AVP 有关; 其中中药成分与吲哚美辛发挥协同作用, 从而延长吲哚美辛解热作用时间并且增强吲哚美辛的解热效果。

关键词: 新癆片; 解热机制; 细胞因子; 协同作用; 吲哚美辛; 白细胞介素; 前列腺素 E₂; 肿瘤坏死因子 α ; 精氨酸加压素; 环磷酸腺苷; 环磷酸鸟苷; Na⁺, K⁺-ATP

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)22-4035-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.22.017

Antipyretic mechanism of Xinhuang Tablet on fever rabbits induced by milk

LIU Jing¹, LV Xiao-jing², LIU Dong-bo¹, NAN Shu-hua³, GUAN Bin³, LAI Zhi-cheng³, SHEN Xiu-ping¹

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research Co., Ltd., Tianjin 300193, China

2. Ringpu (Tian Jing) Bio-Technology Co., Ltd, Tianjin 300300, China

3. Xiamen Traditional Chinese Medicine Co., Ltd., Xiamen 361100, China

Abstract: **Objective** To investigate the mechanism of Xinhuang Tablet on fever rabbits induced by milk. **Methods** Using the milk-reduced rabbit fever model to research the antipyretic mechanism of Xinhuang Tablet, blood plasma and hypothalamus were collected to measure the indicators related to body temperature, such as IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , PGE₂, cAMP, cGMP, AVP, and Na⁺, K⁺-ATP ase. **Results** In the model of milk-reduced rabbit fever, Xinhuang Tablet can significantly decline the contents of IL-1 α , IL-1 β , IL-6, PGE₂, and TNF- α in the hypothalamus, decline the content of cAMP and ratio of cAMP/cGMP, decline the energy of Na-K-ATPase, and increase the variety of body temperature regulation related factors, such as content of AVP, in order to play a role of antipyretic. **Conclusion** The antipyretic mechanism and adjustment of Xinhuang Tablet were associated with body temperature regulation related factors in the hypothalamus, such as IL-1 α , IL-1 β , IL-6, PGE₂, TNF- α , cAMP, cAMP/cGMP, Na⁺, K⁺-ATP ase, and AVP; Its indomethacin can decline the contents of IL-1 α , IL-6, PGE₂, and TNF- α , increase the content of AVP, decline the energy of Na⁺, K⁺-ATP ase which plays the antipyretic effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs, and the containing Chinese medicines can further decline the contents of IL-1 β , IL-6, PGE₂, and cAMP as well as the ratio of cAMP/cGMP in the hypothalamus of rabbits, synergy with indomethacin, in order to extend the indomethacin's antipyretic action time and enhance the indomethacin's strength.

Key words: Xinhuang Tablets; antipyretic mechanism; cytokine; synergistic effect; indomethacin; interleukins; prostaglandin E₂; tumor necrosis factor- α ; arginine vasopressin; cyclic adenosine monophosphate; cyclic guanosine monophosphate; Na⁺, K⁺-ATP

新癆片是由肿节风、三七、人工牛黄、肖梵天 其中部分中药如肿节风、牛黄、珍珠层粉等具有清
花、珍珠层粉等中药及吲哚美辛组成的复方制剂, 热解毒作用, 同时在一定程度上发挥抗炎作用, 减

收稿日期: 2016-04-24

作者简介: 刘 静 (1980—), 女, 副研究员, 研究方向为药理毒理研究。E-mail: liuj@tjpr.com

*通信作者 申秀萍 E-mail: shenxp@tjpr.com

弱炎症因子的致炎致热作用,从而有助于发挥解热功效^[1]。本实验以牛奶致家兔发热为动物模型,从炎症因子角度进一步研究新癍片的解热作用及其机制,为临床应用提供参考。

1 材料

1.1 药品及试剂

新癍片,淡棕灰色片剂,气香、微腥,味苦,含吲哚美辛 2.111%,批号 120704,厦门中药厂有限责任公司提供;吲哚美辛,白色粉末,批号 101206,厦门中药厂有限责任公司提供;脱脂牛奶,批号 20120924,北京三元食品股份有限公司;兔白细胞介素 1 α (IL-1 α)、兔白细胞介素 1 β (IL-1 β)、兔白细胞介素 6 (IL-6)、兔前列腺素 E₂ (PGE₂)、兔肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、兔精氨酸加压素 (AVP)、兔环磷酸腺苷 (cAMP)、兔环磷酸鸟苷 (cGMP) 酶联免疫试剂盒,武汉华美生物工程有限公司;超微量 ATP 酶 (Na⁺, K⁺-ATP) 测试盒,南京建成生物科技有限公司。

1.2 仪器

MC-246 欧姆龙电子体温计,欧姆龙工贸(大连)有限公司;LXJ-IIB 低速多管离心机,上海安亭科学仪器厂;Imark 680 型酶标仪,Bio-Rad;COLUMBVS 洗板机,天津开元生物技术有限公司。

1.3 动物

大耳白家兔,普通级,雄性,66 只,体质量 2.0~2.2 kg,由北京隆安实验动物养殖中心提供,许可证号 SCXK(京)2009-0005,动物合格证号 0181704。动物饲养在天津市新药安全评价研究中心实验动物屏障系统小动物家兔(豚鼠)饲养区[合格证 SYXK(津)2011-0005],自由摄食和饮水,温度、湿度、换气次数由中央系统自动控制,设施内温度维持在 18~26 °C,相对湿度维持在 40%~70%,通风次数不小于 8 次/h 全新风,光照为 12 h 明、12 h 暗。

2 方法

选用雄性大耳白家兔,家兔适应 1 周,于适应期第 5、6 天测量每只家兔肛温,使家兔适应测量体温操作,适应期第 7 天测量家兔基础体温及体质量,剔除体温过高、过低的家兔。选取家兔 60 只按照基础体温随机分为 10 组,其中的 5 组为给药后 1 h 取材,另外 5 组为给药后 4 h 取材,5 组分别为对照组,模型组,新癍片高、低剂量(47.5、23.5 mg/kg,对应吲哚美辛剂量为 1.0、0.5 mg/kg)组,吲哚美辛(1 mg/kg)组,每组 6 只家兔。于实验当天各组家兔测量给药前基础体温后,除对照组外,其余各组家兔 sc 脱脂牛奶 5 mL/kg^[2],造模 5 h 后(体温明显升高)各组立即 ig 给予相应药液,对照组及模型组 ig 给予同体积去离子水。分别与给药后 1、4 h 测量家兔体温后,用 20%乌拉坦麻醉,腹主动脉放血处死,开颅取下丘脑,于-80 °C 冷冻保存备用。分别测量家兔下丘脑中与体温相关的 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、PGE₂、cAMP、cGMP、AVP、Na⁺, K⁺-ATP 等指标,操作均按照试剂盒说明书进行。

所有计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 11.5 软件进行统计分析,组间比较采用 *t* 检验和方差分析。

3 结果

3.1 对牛奶所致发热模型家兔体温的影响

与对照组比较,模型组家兔体温显著升高($P < 0.001$)。与模型组比较,吲哚美辛组给药 1 h 后能显著降低家兔体温($P < 0.05$),给药 4 h 后对家兔体温无显著性影响;新癍片各剂量组给药 1 h 和 4 h 后均能显著降低家兔体温($P < 0.05$ 、0.01)。见表 1 和 2。

3.2 对牛奶所致发热模型家兔下丘脑中 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、PGE₂、cAMP、cGMP、AVP、Na⁺, K⁺-ATP 水平的影响

结果见表 3~5。与对照组比较,模型组家兔下丘脑 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、PGE₂、TNF- α 等致热因子水平显著升高($P < 0.05$ 、0.01),内源性解热物

表 1 新癍片给药 1 h 对牛奶所致发热模型家兔体温的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 Effects of Xinhuang Tablet on body temperature of milk-induced fever rabbits after 1 h administration ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	基础体温/°C	造模 5 h 后体温变化值/°C	给药后 1 h 体温变化值/°C
对照	—	39.50 ± 0.38	0.02 ± 0.23	0.02 ± 0.33
模型	—	39.38 ± 0.38	0.85 ± 0.26 ^{###}	1.28 ± 0.35 ^{###}
吲哚美辛	1.0	39.48 ± 0.23	0.88 ± 0.47 ^{##}	0.82 ± 0.27 [*]
新癍片	47.5 (吲哚美辛 1.0)	39.43 ± 0.22	0.78 ± 0.37 ^{##}	0.73 ± 0.16 ^{**}
	23.5 (吲哚美辛 0.5)	39.33 ± 0.33	0.87 ± 0.34 ^{###}	0.60 ± 0.41 [*]

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

^{###} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

表 2 新癪片给药 4 h 对牛奶所致发热模型家兔体温的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 2 Effects of Xinhuang Tablet on body temperature of milk-induced fever rabbits after 4 h administration ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	基础体温/℃	造模 5 h 后体温变化值/℃	给药后 4 h 体温变化值/℃
对照	—	39.52±0.16	0.00±0.26	0.00±0.21
模型	—	39.62±0.23	1.27±0.22 ^{###}	0.83±0.27 ^{###}
吲哚美辛	1.0	39.42±0.17	1.22±0.40 ^{###}	0.70±0.17
新癪片	47.5 (吲哚美辛 1.0)	39.47±0.12	1.30±0.32 ^{###}	0.28±0.41 [*]
	23.5 (吲哚美辛 0.5)	39.60±0.36	1.10±0.52 ^{##}	0.40±0.30 [*]

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group表 3 新癪片对牛奶所致发热模型家兔下丘脑中 IL-1 β 、IL-1 α 和 IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 3 Effects of Xinhuang Tablet on levels of IL-1 β , IL-1 α , and IL-6 in hypothalamus of milk-induced fever rabbits ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)		IL-1 α /(pg·mL ⁻¹)		IL-6/(pg·mL ⁻¹)	
		给药后 1 h	给药后 4 h	给药后 1 h	给药后 4 h	给药后 1 h	给药后 4 h
对照	—	162.455±25.240	167.880±39.001	203.782±59.319	121.997±60.701	18.388±7.940	14.132±10.157
模型	—	235.622±56.341 [#]	217.056±25.602 [#]	287.930±28.253 [#]	248.887±92.035 [#]	29.233±2.956 [#]	36.101±4.173 ^{###}
吲哚美辛	1.0	171.849±64.157	177.046±43.142	126.654±12.341 ^{***}	84.368±28.688 ^{**}	17.371±8.671 [*]	23.711±5.880 ^{**}
新癪片	47.5 (吲哚美辛 1.0)	137.920±30.267 ^{**}	123.029±18.787 ^{***△}	57.267±30.058 ^{***△}	60.992±17.589 ^{**}	9.192±3.148 ^{***}	15.568±4.785 ^{***△}
	23.5 (吲哚美辛 0.5)	148.810±32.134 [*]	134.214±34.109 ^{***}	130.464±63.848 ^{***}	131.899±23.753 ^{*△}	20.222±5.186 ^{**}	20.116±9.768 [*]

与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$, 与吲哚美辛组比较: [△] $P < 0.05$, 下表同[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group; [△] $P < 0.05$ vs indomethacin group, following tables are same表 4 新癪片对牛奶所致发热模型家兔下丘脑中 PGE₂、TNF- α 和 AVP 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 4 Effects of Xinhuang Tablet on levels of PGE₂, TNF- α , and AVP in hypothalamus of milk-induced fever rabbits ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	PGE ₂ /(pg·mL ⁻¹)		TNF- α /(pg·mL ⁻¹)		AVP/(pg·mL ⁻¹)	
		给药后 1 h	给药后 4 h	给药后 1 h	给药后 4 h	给药后 1 h	给药后 4 h
对照	—	39.789±9.620	49.515±7.403	442.913±65.806	465.817±91.774	2.520±1.784	2.887±0.521
模型	—	62.897±8.746 ^{###}	77.362±14.758 ^{###}	685.305±192.333 [#]	617.506±111.650 [#]	5.410±2.370 [#]	4.963±0.973 ^{###}
吲哚美辛	1.0	34.908±19.813 [*]	42.044±12.207 ^{**}	414.360±45.796 [*]	420.111±41.684 ^{**}	5.258±1.145	9.586±2.467 ^{**}
新癪片	47.5 (吲哚美辛 1.0)	39.468±13.475 ^{**}	20.733±14.023 ^{***}	399.800±27.560 [*]	448.111±40.569 [*]	5.614±0.470	9.229±3.470 [*]
	23.5 (吲哚美辛 0.5)	38.796±5.121 ^{***}	42.104±22.506 [*]	416.347±83.120 [*]	429.706±45.718 ^{**}	7.309±2.998	8.681±3.002 [*]

表 5 新癪片对牛奶所致发热模型家兔下丘脑中 cAMP、cAMP/cGMP 和 Na⁺、K⁺-ATP 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 5 Effects of Xinhuang Tablet on levels of cAMP, cAMP/cGMP, and Na⁺, K⁺-ATP in hypothalamus of milk-induced fever rabbits ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	cAMP/(pmol·mL ⁻¹)		cAMP/cGMP		Na ⁺ , K ⁺ -ATP/(μ mol·mL ⁻¹)	
		给药后 1 h	给药后 4 h	给药后 1 h	给药后 4 h	给药后 1 h	给药后 4 h
对照	—	7.644±3.309	7.446±7.224	26.359±11.399	25.620±25.710	0.107±0.135	0.300±0.027
模型	—	20.530±7.765 ^{###}	22.848±8.840 ^{###}	68.273±23.635 ^{###}	77.300±28.202 [#]	0.339±0.149 [#]	0.634±0.207 [#]
吲哚美辛	1.0	17.752±10.206	21.844±8.840	62.136±37.478	82.900±53.804	0.215±0.068	0.381±0.116 [*]
新癪片	47.5 (吲哚美辛 1.0)	8.324±6.429 [*]	6.791±2.397 ^{*△}	27.777±22.498 [*]	22.431±7.899 ^{**△}	0.134±0.061 [*]	0.320±0.105 [*]
	23.5 (吲哚美辛 0.5)	6.873±5.436 ^{**}	14.241±4.650	22.583±19.111 ^{**}	48.172±16.609	0.300±0.074	0.330±0.151 [*]

质 AVP 的水平显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01), 发热介质 cAMP 水平显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01), cAMP/cGMP 值显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01), 机体产热相关功能蛋白 Na^+ , K^+ -ATP 活力显著升高 ($P<0.05$)。

与模型组比较, 吲哚美辛给药 1、4 h 均能显著降低 IL-1 α 、IL-6、PGE₂、TNF- α 水平 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), 给药后 4 h 能显著升高 AVP 水平 ($P<0.01$), 降低 Na^+ , K^+ -ATP 活力 ($P<0.05$), 具有降低 IL-1 β 、cAMP 水平的趋势, 但差异不显著, 对 cGMP、cAMP/cGMP 无显著性影响。

与模型组比较, 新癆片高剂量组给药 1、4 h 能显著降低家兔下丘脑 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、PGE₂、TNF- α 、cAMP 水平及 cAMP/cGMP 值 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), 降低 Na^+ , K^+ -ATP 活力 ($P<0.05$); 新癆片低剂量组给药 1、4 h 也能显著降低家兔下丘脑 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、PGE₂、TNF- α 水平 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001); 给药 4 h 能显著降低 Na^+ , K^+ -ATP 活力 ($P<0.05$); 新癆片各组在给药后 4 h 均能显著升高 AVP 水平 ($P<0.05$)。

与吲哚美辛组比较, 新癆片给药后 4 h 能进一步降低家兔下丘脑 IL-1 β 、IL-6、cAMP 水平及 cAMP/cGMP 值, 差异显著 ($P<0.05$), 进一步降低 PGE₂ 水平, 给药后 1 h 能显著降低 IL-1 α 水平 ($P<0.05$)。

4 讨论

结果表明, 新癆片的解热作用机制与其所含吲哚美辛发挥非甾体抗炎药物的解热作用有关, 降低 IL-1 α 、IL-6、PGE₂、TNF- α 水平, 升高 AVP 水平, 降低 Na^+ , K^+ -ATP 活力有关, 同时其中所含中药成分降低家兔下丘脑 IL-1 β 、IL-6、IL-1 α 、PGE₂、cAMP 水平及 cAMP/cGMP 值, 与吲哚美辛发挥协同作用, 从而增强吲哚美辛解热作用强度及延长解热作用时间。

文献表明^[3-8], 外周致热信号进入中枢后, 一方面通过以下丘脑视前区 (POAH) 为代表的正调节介质 PGE₂、cAMP、促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH)、 Na^+ /Ca²⁺、单胺类等使体温升高, 另一方面通过以 AVP 为代表的负调节介质黑素细胞刺激素 (α -MSH)、脂皮质蛋白-1 (lipocortin-1) 等限制体温上升, 正负调节相互作用来决定体温调定点上

移水平和发热的幅度。新癆片中的吲哚美辛是典型的非甾体抗炎药, 抑制前列腺素所需的环氧酶的合成, 进而阻止了 PGE₂ 的合成, 发挥解热镇痛及抗炎作用。新癆片中的部分中药如肿节风、牛黄、珍珠粉等都具有一定的清热解毒作用, 同时在一定程度上发挥抗炎作用, 减弱炎症因子的致炎致热作用, 从而有助于发挥解热功效。本实验结果显示, 吲哚美辛能够通过降低 IL-1 α 、IL-6、PGE₂、TNF- α 、 Na^+ , K^+ -ATP, 升高 AVP 水平来发挥解热作用, 而新癆片在此基础上还能进一步降低 IL-1 β 、cAMP 水平及 cAMP/cGMP 值, 发挥解热作用机制更广泛, 这可能是新癆片中的中药成分对吲哚美辛起到了一定减毒增效作用^[9]。

参考文献

- [1] 刘 静, 吕晓静, 田兴美, 等. 新癆片对动物发热模型的解热作用研究 [J]. 现代药物与临床, 2015, 30(4): 375-379.
- [2] 魏 伟, 吴希美, 李元建, 等. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [3] 周晓阳. 蛙皮素对大鼠 INF 性发热反应及脑内 AVP 含量的影响 [J]. 中国应用生理学杂志, 2004, 20(3): 300-303.
- [4] Jefferies C, Bowie A, Brady G, *et al.* Transactivation by the p65 subunit of NF-kappaB in response to interleukin-1 (IL-1) involves MyD88, IL-1 receptor-associated kinase 1, TRAF-6, and Racl [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(14): 4544-4552.
- [5] 王华东, 李楚杰, 屈 洋, 等. 下丘脑 [Ca²⁺], cAMP 在家兔 EGTA 性发热机制中的作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2006, 12(4): 402-405.
- [6] 李 东, 杨芳炬, 黄继华, 等. 注射用清开灵冻干粉解热镇痛作用及解热机制的试验研究 [J]. 中药材, 2005, 28(9): 796-798.
- [7] 李沧海, 霍海如, 姜廷良. 利用基因敲除小鼠研究发热机制的进展 [J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(9): 1151-1156.
- [8] 华 东, 屈 洋, 王彦平, 等. 中枢 CRH 在大鼠应激性体温升高和 LPS 性发热机制中的作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2001, 17(2): 124-127.
- [9] 刘 静, 邸志权, 王晶晶, 等. 新癆片中药成分对吲哚美辛胃肠毒性的减毒作用机制研究 [J]. 中草药, 2014, 45(8): 1115-1120.