

清热散瘀解毒方对 EP 性发热大鼠血清、下丘脑组织中 cAMP 含量的影响

李祖金¹ 樊 静¹ 陈孟溪² 彭燕芬¹ 徐晓丹¹ 肖光辉¹

(1 湖南中医药大学, 长沙, 410208; 2 湖南中医药大学附属中西医结合医院, 长沙, 410006)

摘要 目的:通过观察清热散瘀解毒方对 EP 性发热大鼠 cAMP 的影响,探讨该方的退热机理。方法:应用随机分组方法将大鼠分为清热散瘀解毒方组(12 只)、萘普生药物组(12 只)、模型组(12 只),每组注射 2,4-二硝基苯酚进行小鼠非感染发热造模,然后分别灌入中药、西药、生理盐水(模型组和空白组)。2 h 后测定体温及血清中 cAMP 的含量,比较分析不同药物对 EP 性发热大鼠体温的影响以及 cAMP 含量的变化。结果:中药组和西药组灌药 2 h 后,体温明显低于模型组($P < 0.05$);中药组、西药组血清和下丘脑 cAMP 含量明显低于模型组($P < 0.05$)。结论:清热散瘀解毒方能降低 EP 性发热大鼠体温,其作用机理可能与下调机体血清和下丘脑组织中 cAMP 含量相关。

关键词 清热散瘀解毒方;EP 性发热;作用机理;环磷酸腺苷

Effect of Qingre Sanyu Jiedu Decoction on cAMP Content in Serum and Hypothalamus of Rats with EP Induced Fever

Li Zujin¹, Fan Jing¹, Chen Mengxi¹, Peng Yanfen², Xu Xiaodan¹, Xiao Guanghui¹

(1 Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2 Affiliated Hospital of traditional Chinese and Western medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410006, China)

Abstract Objective: To investigate the effect of Qingre Sanyu Jiedu decoction on cAMP of rats with EP induced fever. **Methods:** Rats were divided into the model group ($n = 12$), Chinese medicine group ($n = 12$), western medicine group ($n = 12$). Rats in each group were injected with 2, 4-dinitrophenol to establish fever models. A normal group ($n = 6$) was included in study. The normal group and model group were injected with saline, while Chinese medicine group and western medicine group were respectively injected with Qingre Sanyu Jiedu decoction and naproxen. The body temperature and the concentration of cAMP in serum and hypothalamus were measured two hours after injection. **Results:** The temperature of Chinese medicine group and western medicine group were lower than those of the model group. cAMP content in serum and hypothalamus of the Chinese medicine group and western medicine group were lower than vehicle group, which all showed statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion:** Qingre Sanyu Jiedu decoction may have the function of reducing temperature, and its mechanism may be related to the reduction of cAMP content in rat serum and hypothalamus.

Key Words Qingre Sanyu Jiedu decoction; EP induced fever; Effect mechanism; cAMP

中图分类号:R289.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.02.033

癌症发热是指由恶性肿瘤引发的非感染性发热,又称“癌热”“肿瘤热”,为癌症中晚期的常见表现之一,病程一般较长。引发癌热的机理尚不清楚,一般认为可能与肿瘤细胞过度增生、坏死、释放内生性致热源等因素相关^[1-2]。癌性发热目前还不能持续有效控制,一般为对症处理,这也严重影响患者的生存质量^[3]。本实验以 2,4-二硝基苯酚进行 EP 性发热大鼠造模^[4],通过研究清热散瘀解毒方对 EP 性发热大鼠血清、下丘脑组织中 cAMP 含量的变化,进一步探讨该复方治疗癌性发热的可能作用机理。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选取 SPF 级 SD 大鼠 42 只,平均体重(200 ± 20)g,所有 SD 大鼠均来源于福建医科大学附属二院动物实验室(fj150111)。采用随机分组的方法,将大鼠分为四组,其中清热散瘀解毒方组(以下简称中药组)12 只,萘普生药物组(以下简称西药组)12 只,模型组 12 只,空白对照组 6 只。大鼠生存环境达到 SPF 级,按照大鼠生活习性,分昼夜自然照明,室内温度为 22 ~ 25 ℃,环境相对湿度为 50% 左右,所有大鼠均予标准饲料和纯净水喂养。

1.2 实验药物与试剂 cAMP 酶联免疫试剂盒(美

国 RD 分装), 2,4-二硝基苯酚(江苏瑞恒医药股份有限公司), 萘普生片(上海惠仁药业有限公司)。

1) 2,4-二硝基苯酚-氢氧化钠溶液配制: 精密称取 2,4-二硝基苯酚 200 mg, 置于 60 mL 0.9% 氯化钠注射液中, 逐滴加入 5 mol/L 的氢氧化钠溶液, 持续搅拌, 直至溶液由澄明变为亮黄色, 再加入 0.9% 氯化钠注射液至 80 mL, 配置成浓度为 25 mg/mL 的 2,4-二硝基苯酚-氢氧化钠溶液, 待用。

2) 清热散瘀解毒液熬制: 按照清热散瘀解毒处方剂量分别取黄芩、淮牛膝、水牛角、知母、生地黄、桃仁、赤芍、牡丹皮、西洋参、甘草等中草药(安徽盛海堂中药饮片有限公司), 所有中草药剂量均按人与大鼠间剂量关系换算。具体熬制过程如下: 首先将水牛角与其他中草药分开浸泡 2 h, 然后将水牛角加纯净水煮沸 30 min, 待冷却后, 再将浸泡过的药材和浸泡液一同倒入容器内, 加适量纯净水, 加盖文火煮沸 30 min, 冷却后, 取出药渣倒入锅内, 继续加水进行第二次熬制, 最后将两次所得药液合并在一起, 待用。

3) 萘普生溶液配制: 取两片萘普生片(0.1 g/片)溶于 8 mL 生理盐水中, 配制为 25 mg/mL 的萘普生溶液, 保存待用。

1.3 实验仪器 恒温水域箱(GG112-10B, 上海医疗器械厂)、台式离心机(TDZ5-40, 长沙天创仪器公司)、自动酶标仪(352 型, Labsystems Multiskan MS)、肛温温度计(SW-MT02, SUNNYWORL)、移液枪(大龙医疗设备有限公司)、-20℃电冰箱(美的电器有限公司)等, 均为福建医科大学附属二院动物实验室常规设备。

1.4 试验方法 给药: 给药前 3 d 分别于每天早晚测量两次体温, 并详细记录, 其每组体温平均值作为该组基础体温。每组实验前 10 h 均禁食喂养。对大鼠皮下注射相同剂量 2,4-二硝基苯酚, 进行 EP 发热性造模。待大鼠发热后立即给药: 西药组采取萘普生溶液灌胃, 中药组采取清热散瘀解毒方煎液灌胃, 空白组、模型组采取生理盐水灌胃。样品及数据收集: 注射 2,4-二硝基苯酚后 2 h 测量记录每组 SD 大鼠体温。体温记录完全之后, 处死大鼠并采血。然后取各组大鼠下丘脑组织于液氮中保存, 待测。

1.5 评价指标 用高速离心机将采取的血液离心 1 min, 取上清液。然后采用酶联免疫吸附法, 按说明书操作检测血清中 cAMP 含量; 取预存的大鼠下丘脑组织 50 mg, 加 2 mL 冰醋酸, 匀浆, 3 000 r/min 离心, 取上清液, 置于 60℃水浴中用氮气将上清液吹干, 然后按照 cAMP 酶联免疫试剂盒说明书进行

测定。

1.6 统计分析 本文中所有数据采用 SPSS 17.0 处理, 本实验数据为单因素多组比较, 采用的统计学方法为方差分析, 各组间的数据用均数加减标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 并用软件进行统计分析数据符合正态性与方差齐性。数据检验标准取 $\alpha = 0.05$, 若 $P < 0.05$, 则具有统计学意义。

2 研究结果

2.1 各组间造模前后大鼠体温比较分析 在注射 2,4-二硝基苯酚后 2 h 后, 中药组体温为 $(39.15 \pm 0.30)^{\circ}\text{C}$, 西药组为 $(39.50 \pm 0.37)^{\circ}\text{C}$, 模型组为 $(39.80 \pm 0.33)^{\circ}\text{C}$, 空白组为 $(37.12 \pm 0.32)^{\circ}\text{C}$ 。四组经方差分析可知, 中药组、西药组体温低于模型组($P < 0.05$), 有统计学意义。

2.2 用药后血清及下丘脑组织中 cAMP 含量分析

3 组间 cAMP 含量经统计学分析得 $P < 0.05$, 每 2 组间具有统计学意义, 且中药组血清 cAMP 含量明显低于西药组, 中药组和西药组低于模型组。3 组间下丘脑 cAMP 含量经统计学分析得 $P < 0.05$, 每 2 组间具有统计学意义, 且中药组下丘脑 cAMP 含量低于西药组, 中药组、西药组低于模型组。说明中药疗效优于西药, 且中药和西药均具有疗效作用。

表 1 3 组造模后 2 h 温度、血清及下丘脑组织中 cAMP 含量比较($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	造模后 2 h 温度	血清 cAMP 含量	下丘脑 cAMP 含量	例数
中药组	$39.15 \pm 0.30^{*\Delta\blacktriangle}$	$0.20 \pm 0.21^{*\Delta\blacktriangle}$	$0.35 \pm 0.16^{*\Delta\blacktriangle}$	12
西药组	$39.50 \pm 0.37^{*\Delta\blacktriangle}$	$0.40 \pm 0.20^{*\Delta\blacktriangle}$	$0.54 \pm 0.19^{*\Delta\blacktriangle}$	12
模型组	$39.80 \pm 0.33^{\Delta}$	$0.60 \pm 0.22^{\Delta}$	$0.77 \pm 0.20^{\Delta}$	12
空白组	37.12 ± 0.32	0.63 ± 0.41	0.97 ± 0.11	6

注: 与空白组比较, $*P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与中药组比较, $\blacktriangle P < 0.05$ 。

3 讨论与分析

恶性肿瘤进展期的常见症状之一就是癌性发热, 在临床特征上, 癌性发热一般表现为中度发热, 病程较长。如果伴有多种恶性肿瘤, 可反复发热和持续热^[3]。有研究表明, 当肿瘤完全或部分得到控制时, 癌性发热仍持续数月之久。然而, 目前医学研究尚未阐明癌性发热的发病机理。相关研究报道可能与以下因素有关^[5-7]: 1) 肿瘤细胞大量破坏坏死, 释放大 量肿瘤坏死因子可引起发热; 2) 肿瘤本身可能是致热源之一; 3) 肿瘤可浸入下丘脑体温调节中枢, 引起体温调节失衡; 4) 脑部肿瘤组织生长引起占位现象, 严重影响中枢神经系统, 易引起癌性发热; 5) 其他内生性致热原交织所致, 如 TNF- α 、IL-1 β 、COX-2 等。

对于癌性发热的治疗,西医常用的处理方法为对症处理,包括物理降温和药物治疗。其中药物治疗常用的有非甾体类、激素类等,但这两种药物治疗方法长期使用引发的不良反应往往较大,可导致恶心、呕吐、出汗、头晕、胃溃疡及胃出血等并发症^[8],给患者健康带来极大损害,直接降低了患者生存率,具有很大局限性。

中医学认为癌性发热属于“内伤发热”范畴,常因气血不足,阴阳失调,蕴久化火所引起,是正虚邪实的病理表现^[9]。有研究表明^[3],癌性发热为人体阴阳失衡,脏腑功能失调,以及“虚”“瘀”“毒”,不同阶段会表现为实证、虚证、虚实证。陈孟溪教授按照“虚、瘀、毒”致癌热的理论,宗活血化瘀、凉血解毒治法,以《千金要方》之犀角地黄汤为基础方,加桃仁、淮牛膝、西洋参、知母、黄芩等组成验方主治,古方新用,意在共奏活血散瘀、清热解毒、养阴生津以退癌热,临床应用经对照研究证实效果良好^[10]。初步实验研究说明其作用机理可能与 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 COX-2 等内生性致热源相关^[3]。

为进一步阐明该方作用机制,本实验拟从 cAMP 含量变化角度进一步探讨,进行深入的多角度研究。环磷酸腺苷(cAMP)属于核苷酸衍生物,广泛存在于机体内,是一种常见的蛋白酶激活剂,因其在细胞间充当中介递质,所以常被称作“第二信使”^[11]。近年来,有大量研究表明机体体温和 cAMP 的含量变化呈正相关,同时 cAMP 与癌性发热有密切关联。且 cAMP 细胞信号系统对癌性细胞增殖起重要调节作用,癌性细胞的非正常生长可能与细胞 cAMP 含量相关^[12]。因此课题组选择 cAMP 为癌热机理研究观察指标。本实验结果说明清热散瘀解毒方对 EP 性发热大鼠模型退热效果确切,其作用机理可能是

降低机体内 cAMP 的含量,进而降低机体体温。

参考文献

- [1]贾英杰,孙一予,章伟,等. 癌热宁栓剂直肠给药对癌性发热内源性致热源影响的研究[J]. 天津中医药,2009,26(3):211-212.
- [2]楚红枝,崔二峰. 消炎痛栓治疗癌性发热的临床观察及研究[J]. 中国社区医师,2010,29(12):86-87.
- [3]陈孟溪,廖敏,宋琳,等. 清热散瘀解毒方对发热大鼠血清 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-}\beta$ 、 COX-2 含量的影响. [J]. 中国中医急症,2013,22(7):1108-1110.
- [4]卢芳,董培良,陈平平,等. 三种热病证候模型最佳造模方法的探索与评价[J]. 山东中医杂志,2009,28(2):116.
- [5]黄蕾. 疏解退热汤对酵母致热大鼠下丘脑中前列腺素 E_2 、白介素- 1β 含量的影响[D]. 石家庄:河北医科大学,2010.
- [6]杨金荣,宋军,胡蓉,等. 川芎挥发油对发热大鼠下丘脑环氧合酶-2 表达的影响[J]. 时珍国医国药,2009,20(2):316.
- [7]唐晓峰,薛漫清,王晖. 大鼠发热模型及发热机制的研究进展[J],广东药学院学报,2009,25(3):329.
- [8]叶得河,于远光,李剑勇,等. 阿司匹林丁香酚醋的高效解热作用及作用机制[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2011,25(2):151-154.
- [9]周仲瑛. 中医内科学[M]. 2 版. 北京:中国中医药出版社,2007:421-424.
- [10]陈孟溪,宋琳,吴侠,等. 清热散瘀解毒方治疗癌性发热(血瘀证)的临床观察[J]. 中国中医急症,2014,23(9):1705-1707.
- [11]秦丽娜,徐峰,时素华. 电针对慢性应激模型大鼠下丘脑及胃肠道 cAMP、PKA 和 PKC 的调控作用[J]. 世界中西医结合杂志,2014,9(6):656-658.
- [12]赵红艳,秦鑫,曹宇,等. 纳洛酮对发热大鼠下丘脑中 cAMP 和腹中隔区 AVP 含量的影响[J]. 中国应用生理学杂志,2009,25(3):408-410.

(2015-03-30 收稿 责任编辑:洪志强)