



行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

Swertiamarin 對大鼠體溫調節作用及下視丘 Serotonin 濃度變化之影響

Effects of Swertiamarin on Thermoregulatory Response and Hypothalamic Serotonin Release in Rats

計畫編號：NSC 86-2314-B-039-006 M13

執行期限：85年8月1日至86年7月31日

主持人：闕甫予 執行機構及單位名稱：中國醫藥學院中國藥學研究所

一、中、英文摘要

Swertiamarin 為龍膽科植物龍膽 (*Gentiana scabra*) 的主要成分之一，屬 secoiridoide glycosides；目前研究發現 Swertiamarin 除具鎮靜、鎮痛、抗發炎和抗癲癇等作用外，亦可明顯降低正常大鼠之直腸溫度，但有關 swertiamarin 解熱降溫之作用機轉至今仍並未見有研究報告提出，因此本研究乃針對 swertiamarin 對室溫下正常大鼠或內生性致熱原誘發高溫大鼠肛溫之影響，及其作用與體溫調節相關 serotonergic system 間之關係進行探討。

實驗結果顯示，龍膽甲醇萃取物 (0.5-3.0g/kg, p.o.) 與其活性成分 swertiamarin (10-30 mg/kg, i.p.) 均可明顯降低室溫下正常清醒大鼠之體溫，且具劑量依存性；此外，龍膽甲醇萃取物 (0.5-2.0 g/kg, p.o.) 或 swertiamarin (5.0-20 mg/kg, i.p.) 對致熱原 lipopolysaccharide 及 interleukin-1 β 誘發高溫之大鼠亦具明顯之降溫作用。但 swertiamarin 對大鼠下視丘 serotonin (5-HT) 及其代謝物之濃度並無明顯之影響。又 swertiamarin 對事先以神經毒素 5,7-dihydroxytryptamine 破壞 5-HT 神經之大鼠仍會引起降溫作用，且其降溫作用可為 DOI (5-HT₂ agonist) 所拮抗及 ketanserin (5-HT₂ antagonist) 所加強。綜合以上結果，顯示 swertiamarin 之降溫作用可能藉由抑制突觸後 5-HT 受體而達成。

關鍵詞：當藥苦素、龍膽、降溫作用、下

視丘、五羥色胺酸

Abstract

Swertiamarin is a major bitter constituent of *Gentiana scabra* (Long-dan; LD). Swertiamarin was reported to have sedative, analgesic, anticonvulsive, antiinflammatory and hypothermic effects. However, the hypothermia effect of swertiamarin is not investigated even till now. On this account, the purpose of the present study was intended to investigate the mechanism of swertiamarin on thermoregulatory responses and hypothalamic serotonergic activity.

In unanesthetized rats, both the extractant of *Gentiana Radix* (LD; 0.5-3.0g/kg, p.o.) and swertiamarin (10-30 mg/kg, i.p.) caused a dose-related fall in colonic temperature at room temperature. Swertiamarin did not significantly change the serotonin release on hypothalamic. The fever induced by either lipopolysaccharide or interleukin-1 β was attenuated by treatment with LD (0.5-2.0 g/kg, p.o.) and swertiamarin (5.0-20 mg/kg, i.p.). DOI (a 5-HT₂ agonist) produced hyperthermia, while ketanserin (5-HT₂ antagonist) and 8-OHDPAT (a 5-HT₁ agonist) produced hypothermia. The swertiamarin-induced hypothermia was attenuated by treatment with DOI and potentiated by ketanserin. These results indicate that swertiamarin acts through serotonergic system to induce hypothermia.

Keywords: Swertiamarin, *Gentiana scabra*, Hypothermia, Hypothalamus, Serotonin

二、緣由與目的

龍膽為龍膽科多年生草本植物龍膽 (*Gentiana scabra*)、堅龍膽 (*Gentiana rigescens*)、三花龍膽 (*Gentiana triflora*) 或條葉龍膽 (*Gentiana manshurica*) 等的乾燥根，始載於神農本草經列為上品，「味苦澀...主骨間寒熱，驚癇邪氣」[1]，名醫別錄曰：「除胃中伏熱、時氣溫熱、熱瀉下痢、去腸中小蟲，益肝膽之氣、止驚悸」[2]。中醫臨床上常用來治療肝炎、腦炎與結膜炎等急性炎症[1]；現代研究顯示龍膽具明顯之保肝、利膽、健胃、抗發炎、抗原蟲及骨骼肌鬆弛等作用[3]。

Swertiamarin (當藥苦素) 為龍膽的主要成分之一，屬 secoiridoide glycosides [4,5]。實驗證明 swertiamarin 可明顯降低大鼠自發運動量，延長 pentobarbital 誘發之睡眠時間，加強 morphine 鎮痛之時間，抑制 carrageenan 誘發之發炎，以及抗 pentylenetetrazol 誘發之痙攣，具有鎮靜、鎮痛、抗發炎和抗癲癇等作用[6]；1976年，Bhattacharya SK 等教授研究發現 swertiamarin 除具有上述之中樞抑制作用外，亦可明顯降低正常大鼠之直腸溫度[7]；但有關 swertiamarin 解熱降溫之作用機轉至今仍並未見有研究報告提出，因此本研究首先擬就龍膽之主成分之一之 swertiamarin 對室溫下正常大鼠或致熱原 (lipopolysaccharide, interleukin-1 β) 誘發高溫大鼠直腸溫度變化之影響進行評估[8,9]，並以臨床上常用之止痛解熱劑 aspirin 作為正對照組。此外，並進一步測定破壞腦內 serotonergic neuron 藥物 5,7-dihydroxy-tryptamine (5,7-DHT) 對 swertiamarin 體溫調節作用之影響[10]，以探討 swertiamarin 對大鼠體溫調節作用與中樞參與體溫調節作用之神經傳遞系統 serotonergic system 間初步之關連性；再以微透析-高效液相層析法 (Microdialysis-HPLC-ECD) 進一步探討 swertiamarin 對於清醒大鼠下視丘 (體溫調節中樞) 5-HT 及其

代謝物濃度變化之影響[11]；最後再併用 5-HT receptor 致效劑 DOI 或 8-OHDPAT 及 5-HT receptor 拮抗劑 ketanserin 等藥物 [12,13]，探討 swertiamarin 之降溫作用與 5-HT receptor 之關係，期能深入了解 swertiamarin 解熱降溫作用之機轉，俾有助於中醫藥之現代化。

三、結果與討論

1976年，Bhattacharya SK 等人首先報告指出 swertiamarin 對正常大鼠具降溫作用 [7]。本研究實驗結果亦顯示龍膽甲醇萃取物 (0.5-3.0g/kg, p.o.) 與其活性成分 swertiamarin (10-30 mg/kg, i.p.) 均可明顯降低室溫下正常清醒大鼠之體溫，且具劑量依存性 (Table 1)；其降溫作用龍膽甲醇萃取物口服後約120分鐘，swertiamarin 則為腹腔注射後60分鐘時可降至最低，持續時間則會隨劑量增加而延長，龍膽甲醇萃取物 3.0g/kg 約240分鐘，swertiamarin 30 mg/kg 則約為150分鐘。

在解熱作用方面，由於傳統上把能引起人體或動物發熱的物質，通稱為致熱原 (pyrogen)，一般又可分為外生性致熱原 (exogenous pyrogens) 及內生性致熱原 (endogenous pyrogens) [14]。而外生性致熱原 (如：endotoxin) 可促使白血球與巨噬細胞等釋放內生性致熱原 (如：interleukin-1, tumor necrosis factor, interferon 等)，後者再作用於體溫調節中樞而產熱 [15,16,17]。1923年，Seibert 指出引起動物體發燒的物質主要是來自葛蘭氏陰性菌細胞壁受破壞所游離出的毒素，由於毒素是細菌體結構部份，因而稱為細菌內毒素 (bacterial endotoxin)，細菌內毒素會造成動物畏寒、發燒等症狀，甚至導致敗血性休克 (septic shock) 而死亡；1943年 Shear 根據細菌內毒素結構上特性，另命名為 lipopolysaccharide 簡稱為 LPS [8]。Interleukin-1 (IL-1) 源自於巨噬細胞、免疫性 T、B 淋巴細胞和血管內皮細胞等，隨著血液循環分布全身 [18]，亦可由中樞星狀細胞 (astrocyte) 和微小神經膠細胞 (microglia) 合成 [19]。IL-1 直接注射入下視丘或腦室給予低劑量

IL-1 均可誘發燒反應[20,21]；而給予對抗 IL-1 抗體或 interleukin-1 receptor antagonist, 可抑制內生性 IL-1 致熱作用[22]；有報告指出 IL-1 之致熱作用可能是經由增加腦內 PGE₂ 之合成所致[23]。IL-1 β 由側腦室給予大鼠可誘發一劑量依存性、明顯持久之高溫 (大於6小時)[9]。Aspirin 可抑制 cyclooxygenase, 進而減少 prostaglandins 之合成, 是臨床上常用之止痛解熱劑[24]。故本研究利用腹腔給予 LPS (100 μ g/kg) 或側腦室給予 IL-1 β (10ng/rat) 誘發一較符合實際引發疾病發熱之動物模式, 並以 aspirin 作為正對照組。實驗結果顯示龍膽甲醇萃取物 (0.5-2.0 g/kg, p.o.) 或 swertiamarin (5.0-20 mg/kg, i.p.) 對 LPS 及內生性致熱原 IL-1 β 誘發高溫之大鼠亦具明顯之解熱效果 (Table 2)。由此可知龍膽確具解熱降溫之作用, 而 swertiamarin 則為其解熱降溫作用之主要活性成分之一。

此外, 有關單胺類神經傳遞物質對體溫調節影響之研究從 1957 年 Brodie 和 Shore 提出單胺在下視丘可能作為神經傳導物質[25] 及 1961 年 Von Euler 指出下視丘單胺可能在體溫調節中扮演某種角色之後[11], 有關下視丘單胺與體溫調節作用關係之研究極多, 但由於使用動物品種不同, 以及給藥方式與部位等之不同, 獲致之結果亦頗多爭議; 近年來由於儀器精密度的提升與實驗方法的精進, 目前已有較肯定之結果可循, 尤其在體溫調節中樞(下視丘)之 serotonergic pathway 上, 1978 年 Myers 及 Waller 指出 serotonergic system 在體溫調節系統中扮演一重要角色[26], 1980 年 Myerse 提出下視丘 5-HT 之含量與熱的產生有關[27], 降低腦中 5-HT 之含量會引起尾巴皮膚溫度上升以增加散熱作用[28,29]。因此本計畫擬先就 swertiamarin 降溫作用與下視丘 serotonergic system 之關係進行探討。首先利用側腦室給予 5,7-DHT (5-HT neurotoxin) 破壞腦中 serotonin neuron [10], 探討二者間初步之關連性。且利用微透析-高效液相層析法 (Microdialysis-HPLC-ECD) 測定 swertiamarin 對於清醒正常大鼠下視丘 5-HT 及其代謝物濃度變化

之影響, 以了解 swertiamarin 之體溫調節作用與下視丘 5-HT 釋放二者之關係。實驗結果如 Table 3 所示 swertiamarin 誘發之降溫作用並不因 5,7-DHT 破壞腦中 serotonin neuron 而消失, 且微透析實驗結果亦顯示 swertiamarin 對大鼠下視丘 5-HT 及其代謝物之濃度雖有減低之現象, 但未達有意義差 (Table 1), 可推知 swertiamarin 之降溫作用與突處前 5-HT 之釋放無觀, 可能主要是藉由作用於 5-HT neuron 突處觸後之 5-HT 受體而達成。

中樞神經系統中存在有多種 5-HT 受體 [30], 其與體溫調節作用之關係亦會因藥物劑量大小、給藥途徑及部位之不同等而有所差異。如腹腔給予低劑量之 5-OMeDMT (0.5-1.0 mg/kg; 5-HT receptor agonist) 及 8-OH-DPAT (5-HT_{1A} receptor agonist) 會引起劑量依存性之降溫作用, 且同時降低下視丘 5-HT 之釋放 [31]; 而 (-)-pindolol (5-HT_{1A}/5-HT_{1B} receptor antagonist) 或高劑量之 5-OMeDMT (3-10 mg/kg) 等腹腔或下視丘給予大鼠則可明顯增加實驗動物之體溫, 並同步增加下視丘 5-HT 之釋放[32]。但最近之研究顯示 5-HT₂ 受體在體溫調節作用上扮演一升溫的角色, 因給予 5-HT₂ 受體之致效劑 quipazine 或 DOI 等均會引起升溫作用, 且此升溫作用亦可為事先給予之 5-HT₂ 受體之選擇性拮抗劑 (如: ketanserin) 所阻斷; 而 5-HT₂ 受體之拮抗劑 ketanserin 或 pirenperone 單獨給藥時則具降溫之作用[33]; swertiamarin 之降溫作用則可被腹腔給予 DOI 所拮抗及腹腔給予 ketanserin 所加強。此外, 8-OH-DPAT 之降溫作用可被非選擇性之 5-HT_{1A} 或 5-HT₂ 受體拮抗劑如: (-)-pindolol 或 methiothepin (5-HT₁ receptor antagonist) 所拮抗, 但無法為 ketanserin (5-HT₂ receptor antagonist) 所阻斷[34,35], 8-OHDPAT 與 swertiamarin 併用時, 對 swertiamarin 之降溫作用並無明顯之影響 (Table 4)。

綜合以上結果, 顯示 swertiamarin 具明顯之解熱降溫作用, 其降溫之作用機轉主要是經由作用於 serotonergic system

- prostaglandin E₁ hyperthermia by sodium salicylate given into the ventral septal area of the rat brain. *J Physiol (London)*, 1987; 384: 223-31.
- [25] Brodie B.B., and P. A.A. : Shore concept for a role of serotonin and norepinephrine as chemical mediators in the brain. *Ann N Y Acad Sci*, 1957; 66 : 631-42.
- [26] Myers RD and Waller MB: Thermoregulation and serotonin, Health and Disease (Essman W ed.). *Spectrum, New York*, 1978; 1-67.
- [27] Myers R. D. : Hypothalamic control of thermoregulation. Neurochemical mechanisms. In Morgane PJ, Panksepp J (eds) . *Handbook of the Hypothalamus. Vol 3. New York : Dekker*, 1980; 83-212.
- [28] Myers R.D. : Impairment of thermoregulation, food and water intake in rat after hypothalamic injections of 5,6-dihydroxytryptamine. *Brain Res*, 1975; 94 : 491-506.
- [29] Myers R.D. : Serotonin and thermoregulation : old and new views. *J Physio (Paris)* , 1981; 77 : 505-13.
- [30] Hensler JG, Kovanchich GB and Frazer A : A quantitative autoradiographic study of serotonin 1A receptor regulation: Effect of 5,7-dihydroxytryptamine and antidepressant treatments. *Neuropharmacol*, 1991; 4: 131-44.
- [31].Gudelsky GA, Koenig JI and Meltzer HY: Thermoregulatory response to serotonin receptor stimulation in the rat: Evidence for opposing roles of 5-HT₂ and 5-HT_{1A} receptors. *Neuropharmacol*, 1986;25:1307-13.
- [32] Lin MT and Liu HJ: Effect of 5-HT receptor agonists or antagonists on hypothalamic 5-HT release or colonic temperature in rats. In: Milton AS, ed. "*Temperature regulation*", *Birkhauser Verlag, Berlin* 1994; 103-8.
- [33] Charanjit SA, Pascale MP, Krystyna MW, James LH and Dennis LM: Evidence that 1-(2,5-dimethoxy-4-methylphenyl)-2-amino-propane-induced hypophagia and hyperthermia in rats is mediated by serotonin-2A receptors. *J Pharmacol Exper Ther*, 1994; 270: 127-32.
- [34] Goodwin GM, Sourza RJ, Green AR and Heal DJ: The pharmacology of the behavioural and hypothermic response of rats to 8-hydroxy- 2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OHDPAT). *Psychopharmacol*, 1987; 91: 506-11.
- [35] Gudelsky GA, Koenig JI and Meltzer HY: Thermoregulatory response to serotonin receptor stimulation in the rat: Evidence for opposing roles of 5-HT₂ and 5-HT_{1A} receptors. *Neuropharmacol*, 1986;25:1307-13.

Table 1. The temperature effects of methanol extracts *Gentiana Radix* (Long-dan; LD) and swertiamarin in rats.

Treatment	Change in colonic temperature ($\Delta^{\circ}\text{C}$)	Change in hypothalamic 5-HT release (ΔnM)
Saline 0.9% (i.p.)	0.17 \pm 0.10	-4.88 \pm 1.52
LD		
0.1 g/kg (p.o.)	-0.28 \pm 0.10	-
0.5 g/kg (p.o.)	-0.69 \pm 0.17*	-
1.0 g/kg (p.o.)	-0.97 \pm 0.11*	-
2.0 g/kg (p.o.)	-1.31 \pm 0.29*	-
3.0 g/kg (p.o.)	-1.56 \pm 0.24**	-
Swertiamarin		
5.0 mg/kg (i.p.)	-0.42 \pm 0.09	-4.15 \pm 1.73
10.0 mg/kg (i.p.)	-0.71 \pm 0.14*	-5.53 \pm 2.06
20.0 mg/kg (i.p.)	-1.13 \pm 0.24*	-6.78 \pm 2.11
30.0 mg/kg (i.p.)	-1.41 \pm 0.20**	-6.81 \pm 2.17

The value are mean \pm SEM of 6-8 rats per group. Δ , different between the control values before oral administrated or injected and maxium exchange after oral administrated or injected. *P<0.05, **P<0.01, significantly different from the corresponding control values (saline group), ANOVA.

Table 2. The effect of methanol extracts *Gentiana Radix* (Long-dan; LD), swertiamarin and aspirin on the colonic temperature in the hyperthermia rats induced by lipopolysaccharide (LPS) and interleukin-1 β (IL-1 β).

Treatment	Change in colonic temperature ($\Delta^{\circ}\text{C}$)		
	Normal	LPS	IL-1 β
Saline 0.9% (i.p.)	0.15 \pm 0.05	1.51 \pm 0.10	2.36 \pm 0.32
LD			
0.5 g/kg (p.o.)	-0.69 \pm 0.17*	0.60 \pm 0.24*	1.61 \pm 0.17*
1.0 g/kg (p.o.)	-0.97 \pm 0.11*	0.48 \pm 0.19*	1.36 \pm 0.20*
2.0 g/kg (p.o.)	-1.31 \pm 0.29*	0.28 \pm 0.22**	0.95 \pm 0.19**
Swertiamarin			
5.0 mg/kg (i.p.)	-0.42 \pm 0.09	0.68 \pm 0.10*	1.59 \pm 0.14*
10.0 mg/kg (i.p.)	-0.71 \pm 0.14*	0.50 \pm 0.21*	1.37 \pm 0.23*
20.0 mg/kg (i.p.)	-1.13 \pm 0.24*	0.33 \pm 0.17**	1.01 \pm 0.21**
Aspirin			
75 mg/kg (i.p.)	-0.12 \pm 0.13	0.42 \pm 0.17*	1.02 \pm 0.12*
150 mg/kg (i.p.)	-0.21 \pm 0.21	0.14 \pm 0.09**	0.72 \pm 0.21**

LD was oral administrated 30 min before LPS (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$; i.p.) or 120 min after IL-1 β (10 ng/rat; i.c.v.) injected. Swertiamarin and aspirin was injected 30 min after LPS or 180 min after IL-1 β injected. The value are mean \pm SEM of 8 rats per group. Δ , different between the control values before oral administrated or injected and maxium exchange after oral administrated or injected. *P<0.05, **P<0.01, significantly different from the corresponding control values (saline group), ANOVA.

Table 3. The effects of swertiamarin on the colonic temperature in rats treated by the 5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT).

Treatment	Change in colonic temperature ($\Delta^{\circ}\text{C}$)	
	Normal	5,7-DHT
Saline 0.9% (i.p.)	0.11 \pm 0.08	0.13 \pm 0.10
Swertiamarin		
10.0 mg/kg (i.p.)	-0.75 \pm 0.12*	-0.69 \pm 0.14*
20.0 mg/kg (i.p.)	-1.27 \pm 0.26*	-1.04 \pm 0.11*
30.0 mg/kg (i.p.)	-1.48 \pm 0.20**	-1.32 \pm 0.21**

The value are mean \pm SEM of 8 rats per group. Δ , different between the control values before injected and maximum exchange after injected. *P<0.05, **P<0.01, significantly different from the corresponding control values (vehicle group), ANOVA.

Table 4. The effects of swertiamarin on the colonic temperature in rats treated by the serotonergic system drugs.

Treatment	Change in colonic temperature ($\Delta^{\circ}\text{C}$)		
	Saline 0.9% (i.p.)	Swertiamarin	
		10.0 mg/kg (i.p.)	30.0 mg/kg (i.p.)
Vehicle	-0.21 \pm 0.15	-0.77 \pm 0.17 [#]	-1.40 \pm 0.20 ^{##}
DOI 1mg/kg (i.p.)	1.88 \pm 0.26**	1.15 \pm 0.20 ^{**#}	0.53 \pm 0.17 ^{**##}
Ketanserin 0.5mg/kg (i.p.)	-0.77 \pm 0.10*	-1.56 \pm 0.24 ^{*#}	-1.99 \pm 0.22 ^{**##}
8-OHDPAT 0.05mg/kg (s.c.)	-1.10 \pm 0.23*	-0.89 \pm 0.21	-1.55 \pm 0.19

The value are mean \pm SEM. of 8 rats per group. Δ , different between the control values before injected and maximum exchange after injected. All drugs and swertiamarin are injected simultaneously. *P<0.05, **P<0.01, significantly different from the corresponding control values (vehicle group), ANOVA. [#]P<0.05, ^{##}P<0.01, significantly different from the corresponding control values (saline group), ANOVA.