

## • 研究论文 •

## YZG-330通过P38 MAPK信号通路调节TRPM8离子通道发挥降温作用

朱子玉<sup>#</sup>, 虞远智<sup>#</sup>, 袁月, 张建军<sup>\*</sup>

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 新药作用机制研究和药效评价北京市重点实验室, 北京 100050)

**摘要:** 实验室前期研究发现化合物YZG-330能够使小鼠降低体温, 该作用可被腺苷A<sub>1</sub>受体(adenosine A<sub>1</sub> receptor, A<sub>1</sub>R)拮抗剂DPCPX拮抗, 本文基于A<sub>1</sub>R下游信号通路对YZG-330的作用机制进行进一步探究。通过测量小鼠肛温进行YZG-330药理学评价; 采用Western blot技术检测小鼠下丘脑组织匀浆中瞬时受体电位(transient receptor potential, TRP)离子通道和P38蛋白及其磷酸化水平; 通过Ca<sup>2+</sup>荧光探针Fluo-3AM负载细胞, 检测YZG-330对小鼠下丘脑细胞内Ca<sup>2+</sup>含量的影响。YZG-330可剂量依赖性地降低小鼠体温, P38选择性抑制剂SB-203580 (20 mg·kg<sup>-1</sup>, i.p.)可显著抑制YZG-330的降温作用。TRPM8拮抗剂(每只小鼠0.1 μg, i.c.v.)可以部分拮抗YZG-330 (0.25 mg·kg<sup>-1</sup>和1 mg·kg<sup>-1</sup>, i.p.)的降温效果。腹腔注射给予小鼠YZG-330 (2 mg·kg<sup>-1</sup>, i.p.)可显著上调小鼠下丘脑组织中P38磷酸化水平, A<sub>1</sub>R拮抗剂DPCPX (5 mg·kg<sup>-1</sup>, i.g.)可有效抑制该变化; YZG-330还可显著上调小鼠下丘脑组织中TRPM8表达量, SB-203580可非常显著地抑制YZG-330引起的TRPM8上调; YZG-330 (0.1~10 μmol·L<sup>-1</sup>)可剂量依赖性地升高小鼠下丘脑细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度, A<sub>1</sub>R抑制剂DPCPX (0.5和1 μmol·L<sup>-1</sup>)与TRPM8拮抗剂(1 μmol·L<sup>-1</sup>)均可抑制YZG-330的升高胞内Ca<sup>2+</sup>浓度的作用。综上所述, YZG-330发挥降温作用的机制之一是通过激活A<sub>1</sub>R, 促进P38蛋白磷酸化, 进而上调TRPM8离子通道表达量并激活该通道开启, 导致胞内Ca<sup>2+</sup>含量上升, 通过负调节下丘脑体温调定点导致体温下降。本文中所有动物实验均获得中国医学科学院药物研究所伦理委员会批准。

**关键词:** 腺苷A<sub>1</sub>受体; 丝裂原活化蛋白激酶P38; 瞬时受体电位离子通道亚家族8; Ca<sup>2+</sup>离子

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2022)05-1336-08

## YZG-330 regulates the TRPM8 ion channel through the P38 MAPK signaling pathway to reduce body temperature in mice

ZHU Zi-yu<sup>#</sup>, YU Yuan-zhi<sup>#</sup>, YUAN Yue, ZHANG Jian-jun<sup>\*</sup>

(Beijing Key Laboratory of New Drug Mechanisms and Pharmacological Evaluation Study, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract:** Preliminary research in our laboratory found that compound YZG-330 can reduce mouse body temperature, which could be blocked by adenosine A<sub>1</sub> receptor (A<sub>1</sub>R) antagonist DPCPX. Based on the downstream signaling pathway of the A<sub>1</sub>R, the mechanism by which YZG-330 lowers body temperature was further studied. The pharmacodynamics of YZG-330 was evaluated by measuring the rectal temperature; expression of the transient receptor potential (TRP) ion channel, the P38 protein and its phosphorylated form in mouse hypothalamic homogenate were detected by Western blotting. A Ca<sup>2+</sup> fluorescent probe, Fluo-3AM, was added to cells to detect the effect of YZG-330 on the Ca<sup>2+</sup> content of mouse hypothalamic cells. YZG-330 dose-dependently reduced the

收稿日期: 2021-10-14; 修回日期: 2022-01-11.

基金项目: 国家自然科学基金项目资助(81773715); 中国医学科学院创新工程项目(2021-I2M-1-028).

<sup>#</sup>共同第一作者.

\*通讯作者 Tel: 13522110127, E-mail: jjzhang@imm.ac.cn

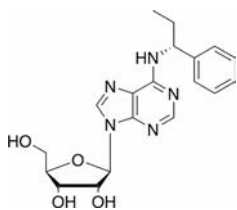
DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0664

body temperature in mice, and the selective P38 inhibitor SB-203580 (20 mg·kg<sup>-1</sup>, i.p.) significantly inhibited the hypothermic effect of YZG-330. A TRPM8 antagonist 2 (0.1 μg per mouse, i. c. v.) markedly attenuated the hypothermic effect of YZG-330 (0.25 or 1 mg·kg<sup>-1</sup>, i. p.). YZG-330 (2 mg·kg<sup>-1</sup>, i. p.) significantly increased the phosphorylation of P38, an effect that could be attenuated by the A<sub>1</sub>R antagonist DPCPX (5 mg·kg<sup>-1</sup>, i.g.) in mouse hypothalamus. In addition, YZG-330 also prominently enhanced the expression of TRPM8, which could be blocked by SB-203580; YZG-330 (0.1–10 μmol·L<sup>-1</sup>) increased intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in mouse hypothalamic cells in a dose-dependent manner, and was inhibited by the A<sub>1</sub>R inhibitor DPCPX (0.5 and 1 μmol·L<sup>-1</sup>) and TRPM8 antagonist 2 (1 μmol·L<sup>-1</sup>). In conclusion, YZG-330 exerts its hypothermic effect by activating the A<sub>1</sub>R to promote the phosphorylation of P38 protein and thereby up-regulating the expression and activity of the TRPM8 ion channel, resulting in increased intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration to stimulate mouse hypothalamus cells to down-regulate body temperature. All animal experiments were approved by the Ethics Committee of the Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences.

**Key words:** adenosine A<sub>1</sub> receptor; P38 MAPK; transient receptor potential M8; Ca<sup>2+</sup> ion

体温调节是人体内分泌系统自主神经和行为调节共同作用的结果,调节中枢位于下丘脑视前区 (preoptic area, POA),温度信号经由初级感觉神经元传至脊髓或三叉神经背角 (dorsal horn, DH) 后继续传导至外侧臂旁核 (lateral parabrachial nucleus, LPB),刺激LPB区中分别调节冷热信号的神经元后投射到体温调节中枢 POA,经由下丘脑背内侧核 (dorsomedial hypothalamus, DMH),传至中缝苍白球 (rostral Raphe Pallidus, rRPa),作用于棕色脂肪组织 (brown adipose tissue, BAT),通过促进或抑制BAT产热,进而调节体温<sup>[1-3]</sup>。腺苷作为内源性的神经递质,在调节机体生理状态的过程中扮演了重要的角色。整体水平给予小鼠腺苷可以导致一系列的生理反应,包括自主活动的减少、镇静及体温的降低。有文献表明,激活小鼠下丘脑区域的腺苷A<sub>1</sub>受体 (adenosine A<sub>1</sub> receptor, A<sub>1</sub>R) 可导致体温降低<sup>[4,5]</sup>。本实验室前期针对腺苷母核进行了一系列设计和优化,得到了化合物YZG-330 (化学结构见图1),在整体动物药效学研究过程中,发现YZG-330可以显著降低动物的体温,且实验证明这种降温作用是通过激活中枢A<sub>1</sub>R实现的<sup>[6]</sup>,但其具体作用机制尚未完全明确。

A<sub>1</sub>R可介导丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路激活<sup>[7]</sup>,MAPK是一组能被不同的细胞外刺激激活的丝氨酸-苏氨酸蛋白激



**Figure 1** Chemical structure of YZG-330 [(2*R*, 3*S*, 4*R*, 5*R*)-2-(hydroxymethyl)-5-(6-(((*R*)-1-phenylpropyl) amino)-9*H*-purin-9-yl) tetrahydrofuran-3,4-diol]. Molecular weight: 385.42

酶,是调节正常和病理状态下多种细胞过程(如增殖、分化、凋亡和应激反应)的关键信号通路。MAPK可分为4个亚族:细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinase, ERK)、P38蛋白 (protein 38, P38)、c-Jun氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 和 ERK5<sup>[8]</sup>,其中P38以及ERK信号通路均可介导瞬时受体电位M8 (transient receptor potential M8, TRPM8) 及瞬时受体电位A1 (transient receptor potential A1, TRPA1) 激活<sup>[9]</sup>。TRP通道是瞬时感受器电位离子通道家族中的成员,主要位于细胞膜上,其主要功能是感受温度和其他物理及化学伤害性刺激,可参与机体温度感觉及体温调节等重要生命活动<sup>[10]</sup>。TRP通道共有28个亚基,分为7个亚家族:TRPA、TRPC、TRPM、TRPML、TRPN、TRPP和TRPV<sup>[11]</sup>。这些亚型的离子通道有着不同的温度敏感性,且TRP每一种亚型只针对特定范围的温度变化有反应:TRPV 1/2/3/4和TRPM 2/4/5是热激活通道,而冷刺激主要激活TRPA1和TRPM8亚型<sup>[12]</sup>。TRP离子通道是一种非选择性阳离子通道,可介导阳离子尤其是Ca<sup>2+</sup>的转运<sup>[13]</sup>。细胞膜内外尤其是胞内Ca<sup>2+</sup>浓度的改变可引发许多生理及病理性改变。Ca<sup>2+</sup>是一种重要的体温负调节介质,有实验表明小鼠中枢神经系统胞内Ca<sup>2+</sup>含量上升可刺激下丘脑体温调定点导致体温下降<sup>[14]</sup>。

本文将基于A<sub>1</sub>R下游信号通路对YZG-330的作用机制进行进一步探索。

## 材料与方法

**实验动物** 雄性ICR小鼠SPF级,体重24~26g;购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [许可证编号: SCXK (京) 2016-0006]。动物饲养环境保持12h昼夜节律,室温保持在(24±1)°C,相对湿度为(60±5)%。

标准小鼠饲养盒内喂养动物,自由进食和进水。动物实验均获得中国医学科学院药物研究所伦理委员会批准。

**药品与试剂** 化合物 YZG-330,由中国医学科学院药物研究所石建功教授实验室合成,HPLC检测纯度大于99%。1,3-二丙-8-环戊黄嘌呤(8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine, DPCPX) (9A/70155, Tocris 公司); TRPM8拮抗剂2 (HY-112430)、SB-203580 (HY-10256)、磷酸酶抑制剂 (HY-K0022)、蛋白酶抑制剂 (HY-K0010) (MCE 公司); N6-环戊基腺苷 (N6-cyclopentyladenosine, CPA) (ab120398)、抗 TRPA1 兔多抗 (19124-1-AP)、抗 TRPM8 兔单抗 (ab109308) (Abcam 公司); 抗 phospho-P38 (4511S)、抗 P38 兔单抗 (8690S) (Cell Signaling Technology 公司); 抗  $\beta$ -tubulin 抗体 (ab1017t, 北京博奥锐京公司); 山羊抗兔 IgG (ZB-2301, 中山金桥公司); 山羊抗鼠 IgG (SA00001-1, Proteintech 公司); RIPA 裂解液 (强) (P0013B)、DMSO (ST038) (上海碧云天生物技术研究所); BCA 蛋白浓度检测试剂盒 (CW0014S, 康为世纪生物技术有限公司); D-Hanks 液 (H-1045, 北京 Solarbio 公司); Fluo-3AM ester (50013, 北京博知源公司); Pluronic F-127 增溶剂 (P300MP, 赛默飞公司)。

**仪器** 动物智能数字测温计 (TH212, 恒进达海创高科); DYY-7C 型电泳仪 (北京六一厂); 酶标仪 (MQX200, 美国 Bio-Tek 公司); ECL (Image Quant LAS4000, 美国 GE 公司); 脑立体定位仪 (深圳瑞沃德生命科技有限公司)。

**动物体温测定** 雄性 ICR 小鼠随机分为4组,每组6只,分别为溶剂对照组、YZG-330 (0.25、1和4 mg·kg<sup>-1</sup>, i.p.) 组。实验时,首先抓取小鼠测量两次肛温,取平均值作为基础体温,后腹腔注射给予 YZG-330,每10 min 抓取小鼠记录其肛温。

雄性 ICR 小鼠随机分为8组,每组6只,分别为溶剂对照组、P38磷酸化拮抗剂 SB-203580 组 (20 mg·kg<sup>-1</sup>, i.p.)、YZG-330 组 (2 mg·kg<sup>-1</sup>, i.p.)、阳性对照 CPA 组 (1 mg·kg<sup>-1</sup>, i.p.)、SB-203580 (5和20 mg·kg<sup>-1</sup>, i.p.) + YZG-330 (2 mg·kg<sup>-1</sup>, i.p.) 组、SB-203580 (5和20 mg·kg<sup>-1</sup>, i.p.) + CPA (1 mg·kg<sup>-1</sup>, i.p.) 组。实验时,首先抓取小鼠测量两次肛温,取平均值作为基础体温,后按组别腹腔给予不同剂量拮抗剂,20 min 后按组别给予 YZG-330、CPA 和溶剂,每10 min 抓取小鼠记录其肛温。

雄性 ICR 小鼠随机分为6组,每组6只,分别为溶剂对照组、TRPM8拮抗剂2 (每只小鼠0.1  $\mu$ g, i.c.v.)、YZG-330 组 (1 mg·kg<sup>-1</sup>, i.p.)、YZG-330 组 (0.25 mg·kg<sup>-1</sup>, i.p.)、TRPM8拮抗剂2 (每只0.1  $\mu$ g, i.c.v.) + YZG-330

(1 mg·kg<sup>-1</sup>, i.p.) 组、TRPM8拮抗剂2 (每只0.1  $\mu$ g, i.c.v.) + YZG-330 (0.25 mg·kg<sup>-1</sup>, i.p.) 组。实验时,首先抓取小鼠测量两次肛温,取平均值作为基础体温,后按组别侧脑室注射给予拮抗剂或溶剂,5 min 后按组别给予 YZG-330 或溶剂,每10 min 抓取小鼠记录其肛温。

**下丘脑蛋白匀浆制备** ICR 小鼠随机分组,按组别给予相应化合物,15 min 或1 h 后脱颈处死取脑,置于冰上分离下丘脑,称重。RIPA 裂解液中加入1 $\times$ 蛋白酶抑制剂、1 $\times$ 磷酸酶抑制剂混合物混合置于冰上备用,样品称重后按1:10 (w/v) 比例向组织中加入相应体积的 RIPA 裂解液,在冰浴条件下超声破碎,功率250 W,每次3 s,间隔10 s,反复2~3次,之后置于冰上10 min 使蛋白充分裂解,在4  $^{\circ}$ C 条件下12 000  $\times$ g 离心20 min,离心后取蛋白上清液。

**蛋白质免疫印迹 (Western blot)** Western blot 使用 BCA 法测定待检测蛋白浓度,加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液后37  $^{\circ}$ C 水浴15 min,采用等量上样进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离、转膜,用5%脱脂牛奶在室温下封闭膜70 min 后, TBST 洗涤3次,每次5 min; 将膜放于 TBST 稀释的一抗中,4  $^{\circ}$ C 孵育过夜;回收一抗, TBST 洗涤3次,每次5 min; 将膜放于 TBST 稀释的二抗中 (二抗按1:8 000 稀释),室温震荡孵育1 h, TBST 洗3次,每次5 min; 在 PVDF 膜中滴加配好的 ECL 发光液,利用化学发光成像系统采集化学发光图像。用 Image J 软件处理目的蛋白条带。

**下丘脑细胞 Ca<sup>2+</sup> 含量测定** 将取出的新鲜下丘脑组织迅速置于4  $^{\circ}$ C D-Hanks 液中,研磨成匀浆,过200 目网筛滤至培养皿中,滤液在4  $^{\circ}$ C 下1 000 r·min<sup>-1</sup> 离心10 min,弃上清,在沉淀物中加入 Krebs-Ringer-HEPES-glucose buffer (KRH-glc) 400  $\mu$ L,吹打均匀后,取20  $\mu$ L 细胞悬液加入20  $\mu$ L 0.04% 台盼蓝,混匀后进行细胞计数检测活细胞浓度。

将细胞稀释至每毫升 $2 \times 10^6$ 个,分为空白组、对照组、YZG-330 组 (0.1、0.3、1、3、6.5 和10  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>) 和 CaCl<sub>2</sub> 阳性对照组 (2 mol·L<sup>-1</sup>)。除空白组外每100  $\mu$ L 细胞液中加入25  $\mu$ L Fluo-3AM 稀释液及25  $\mu$ L CaCl<sub>2</sub> (1.2 mol·L<sup>-1</sup>),使探针终浓度为5  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>,CaCl<sub>2</sub> 终浓度为0.2 mol·L<sup>-1</sup>;空白组每100  $\mu$ L 细胞液中加入25  $\mu$ L Fluo-3AM 稀释液及25  $\mu$ L KRH-glc,使探针终浓度为5  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>。避光震荡孵育20 min,按组别分别加入50  $\mu$ L KRH-glc、各浓度 YZG-330 及 CaCl<sub>2</sub> 溶液。采用荧光分光光度计测定,激发波长为488 nm,发射波长为526 nm。根据公式可计算 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>。[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> =  $K_d [(F - F_{\min}) / (F_{\max} - F)]$ 。K<sub>d</sub> 值为450 nmol·L<sup>-1</sup>,F<sub>min</sub> 为空白组荧光强度,F<sub>max</sub> 为加入2 mol·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> 后测得的荧光强度。

细胞提取步骤同上,将细胞稀释至每毫升 $2 \times 10^6$ 个,共分为对照组、YZG-330组( $6.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、DPCPX组( $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )和DPCPX( $0.5$ 和 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) + YZG-330( $6.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )联合给药组。每100  $\mu\text{L}$ 细胞液中加入25  $\mu\text{L}$  Fluo-3AM稀释液及25  $\mu\text{L}$ 各浓度DPCPX或KRH-glc,使探针终浓度为 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。避光震荡孵育20 min,分别加入YZG-330或KRH-glc。采用荧光分光光度计测定,激发波长为488 nm,发射波长为526 nm。计算DPCPX抑制率Ri。 $R_i = [F_{\text{YZG-330}} - F_{\text{YZG-330+DPCPX}}] / [F_{\text{YZG-330}} - F_{\text{Con}}]$ 。F为各组荧光强度值。

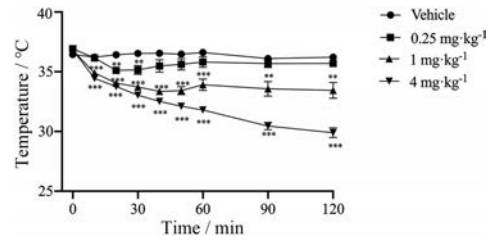
细胞提取步骤同上,将细胞稀释至每毫升 $2 \times 10^6$ 个,共分为对照组、YZG-330组( $6.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、TRPM8拮抗剂2组( $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、TRPM8拮抗剂2组( $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )和TRPM8拮抗剂2( $0.1$ 和 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) + YZG-330( $6.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )联合给药组。每100  $\mu\text{L}$ 细胞液中加入25  $\mu\text{L}$  Fluo-3AM稀释液及25  $\mu\text{L}$ 不同浓度的TRPM8拮抗剂2或KRH-glc,使探针终浓度为 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。避光震荡孵育20 min,分别加入YZG-330或KRH-glc。采用荧光分光光度计测定,激发波长为488 nm,发射波长为526 nm。计算TRPM8拮抗剂2抑制率Ri。 $R_i = [F_{\text{YZG-330}} - F_{\text{YZG-330+TRPM8 antagonist 2}}] / (F_{\text{YZG-330}} - F_{\text{Con}})$ 。F为各组荧光强度值。

**统计与分析** 动物行为学实验数据以均数 $\pm$ 标准误差表示,其余实验结果数据以均数 $\pm$ 标准差表示,应用GraphPad Prism 5.0软件进行统计学分析。使用软件中Student's *t*-test方法进行统计处理,显著性结果分别以 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$ 表示有差异、显著性差异和极显著性差异。

## 结果

### 1 YZG-330可剂量依赖性地降低小鼠体温

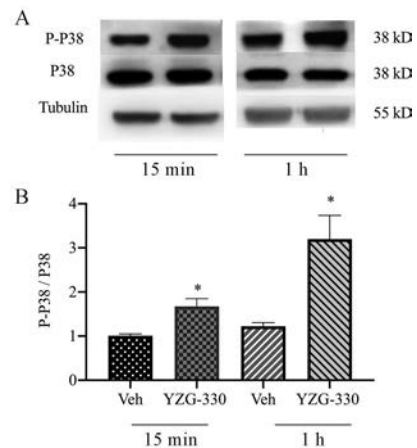
腹腔注射给予小鼠YZG-330( $0.25$ 、 $1$ 和 $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )，与对照组相比，YZG-330可以显著降低小鼠体温(图2)。YZG-330在 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量下，20 min后小鼠体温表现出显著性降低，降温幅度最大达 $1.8 \pm 1.1 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $P < 0.01$ )，40 min后小鼠体温与对照组无差异。YZG-330在 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量下，小鼠体温在整个检测过程中与对照组小鼠相比均具有显著性差异，给药50 min后小鼠体温降至最低点，降温幅度达 $3.4 \pm 1.9 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $P < 0.001$ )。YZG-330在 $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量下，10 min后小鼠体温显著降低，在整个检测过程中体温持续降低，90 min后，降温速率减缓，体温趋于稳定。YZG-330( $1$ 和 $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )各剂量组间具有显著性差异(图2)。以上结果提示，YZG-330可剂量依赖性地降低小鼠体温。



**Figure 2** The effect of YZG-330 (i.p.) on body temperature in mice. The mouse basal body temperature was measured before the administration of YZG-330, and then mice were administered YZG-330 ( $0.25$ ,  $1$  and  $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , i.p.), respectively, and the body temperature was measured every 10 minutes.  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ . \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs vehicle group

### 2 YZG-330可显著上调小鼠下丘脑P38磷酸化水平

如图3所示,给予小鼠YZG-330( $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , i.p.) 15 min和1 h后,Western blot法检测小鼠下丘脑组织匀浆中P38蛋白表达及其磷酸化水平。与对照组相比,给药15 min和1 h后小鼠下丘脑中总P38表达量均无明显变化,P38磷酸化水平以及P-P38/P38比值显著升高,相对于给药后15 min,给药1 h后P38磷酸化水平增幅较大,且与对照组相比均具有显著性差异。

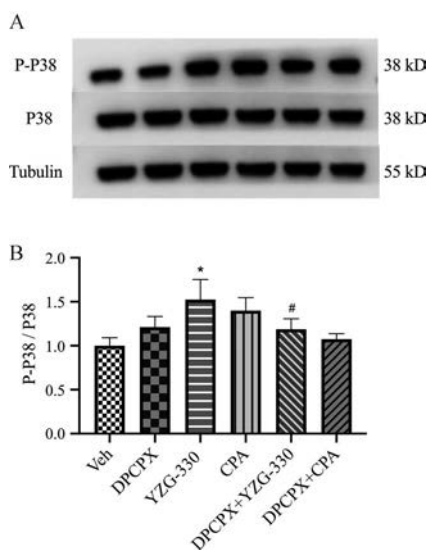


**Figure 3** Effect of YZG-330 ( $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , i.p.) on the expression of P38 and its phosphorylated level in mouse hypothalamic. A: Expression of P38 and P-P38; B: Quantification of P-P38/P38 expression.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$  vs vehicle group

### 3 A<sub>1</sub>R拮抗剂DPCPX可抑制YZG-330引起的P38磷酸化水平上调

灌胃给予A<sub>1</sub>R拮抗剂DPCPX( $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , i.g.), 20 min后给予YZG-330( $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , i.p.)或CPA, Western blot检测小鼠下丘脑匀浆中P38表达及其磷酸化情况。如图4所示,DPCPX可显著抑制YZG-330促进小鼠下丘脑P38磷酸化的作用,同时降低了P-P38/P38比值,

与 YZG-330 组相比具有显著性差异。提示  $A_1R$  参与了 YZG-330 调控小鼠下丘脑组织中 P38 磷酸化的作用, 确定  $A_1R$  激活后下游信号为 P38 蛋白的磷酸化。



**Figure 4** Effect of DPCPX (5 mg·kg<sup>-1</sup>, i.g) on YZG-330-induced change of expression of P38 and its phosphorylation in mouse hypothalamus. A: Expression of P38 and P-P38; B: Quantification of P-P38/P38 expression. *n* = 3,  $\bar{x} \pm s$ . \**P* < 0.05 vs vehicle group; #*P* < 0.05 vs YZG-330 only group

#### 4 YZG-330 可上调 TRPM8 和 TRPA1 表达

腹腔注射给予小鼠 YZG-330 (0.25、2 和 4 mg·kg<sup>-1</sup>), 1 h 后检测小鼠下丘脑组织中 TRPM8 和 TRPA1 的表达量, 如图 5 所示, 在 0.25、2 和 4 mg·kg<sup>-1</sup> 三个剂量下 YZG-330 均上调了 TRPA1 和 TRPM8 的表达量, 且与溶剂对照组相比均具有显著性差异。

#### 5 选择性 P-P38 抑制剂 SB-203580 仅可抑制 YZG-330 上调 TRPM8 表达的作用

腹腔注射给予选择性 P-P38 抑制剂 SB-203580 (5 和 20 mg·kg<sup>-1</sup>), 20 min 后腹腔注射给予 YZG-330 (2 mg·kg<sup>-1</sup>).

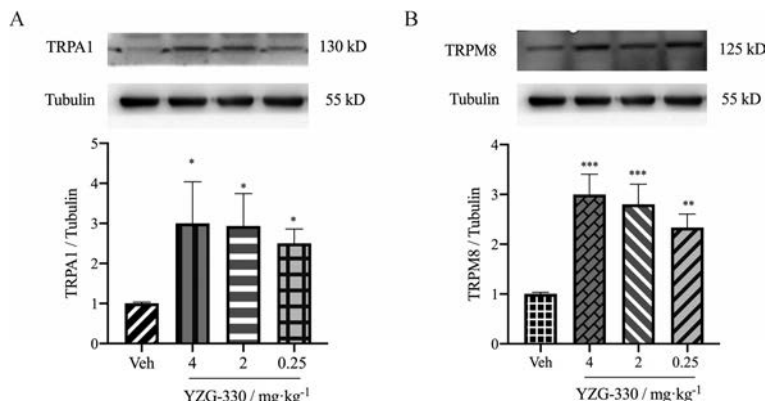
如图 6 所示, 在 20 mg·kg<sup>-1</sup> 剂量下 SB-203580 可有效抑制 YZG-330 上调 TRPM8 的表达, 与单独给予 YZG-330 组相比具有显著性差异; SB-203580 (5 mg·kg<sup>-1</sup>) 对 YZG-330 上调 TRPM8 表达的抑制作用无统计学意义。但是 SB-203580 (5 和 20 mg·kg<sup>-1</sup>) 对 YZG-330 上调 TRPA1 表达无显著抑制作用。结果提示, P38 MAPK 信号通路介导了 YZG-330 上调 TRPM8 表达的作用, 即 P38 蛋白磷酸化后可以上调 TRPM8 离子通道的表达。

#### 6 YZG-330 促进下丘脑细胞 Ca<sup>2+</sup> 内流, 既可是被 $A_1R$ 拮抗剂阻断, 又可以被 TRPM8 拮抗剂阻断

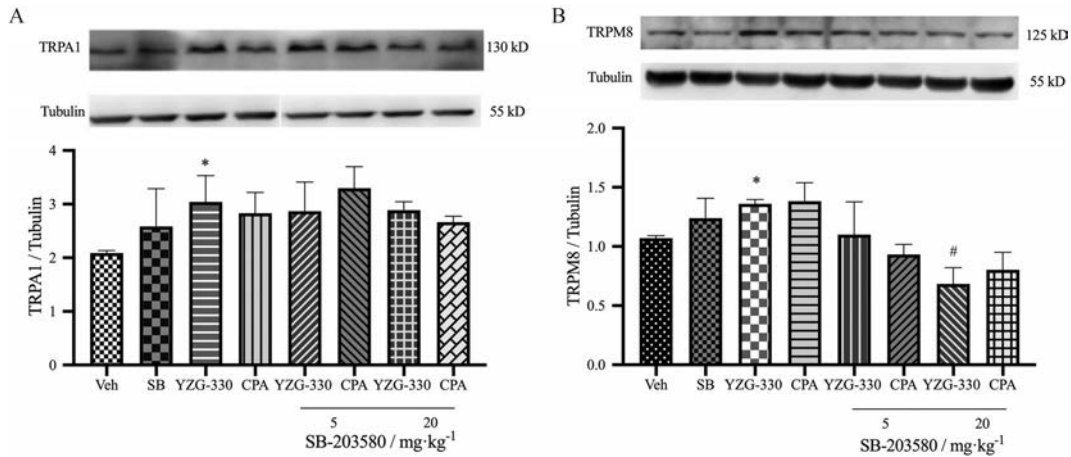
如图 7 所示, 小鼠下丘脑细胞与 YZG-330 共孵育 10 min 后, 在 0.1~10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  剂量区间内, YZG-330 组细胞内荧光强度的增加呈剂量依赖性, 与溶剂对照组相比均具有显著性差异。先加入 DPCPX (0.5 和 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 或者 TRPM8 拮抗剂 2 (0.1 和 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 20 min 后再加入 YZG-330 (6.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 10 min 后检测荧光强度, 如表 1 所示, 与 YZG-330 组相比, DPCPX+YZG-330 细胞内荧光强度显著降低, 且具有量效关系; TRPM8 拮抗剂 2 (1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) + YZG-330 细胞内荧光强度显著降低。

#### 7 选择性 P38 抑制剂 SB-203580 可抑制 YZG-330 的降温作用

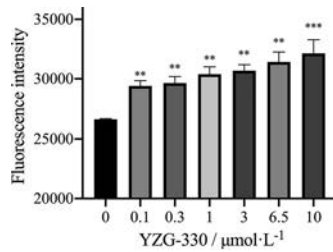
如图 8 所示, 给药 10 min 后, 单独给予 SB-203580 (20 mg·kg<sup>-1</sup>) 对小鼠体温无明显影响, YZG-330 (2 mg·kg<sup>-1</sup>) 组和 SB-203580 (5 和 20 mg·kg<sup>-1</sup>, i.p.) + YZG-330 组小鼠体温均明显下降。与 YZG-330 组相比, SB-203580 (20 mg·kg<sup>-1</sup>) + YZG-330 组小鼠在给予 YZG-330 30 min 后降温速率开始明显减缓, 在 50 min 时体温降至最低, 降幅达 4.90  $\pm$  0.55  $^{\circ}\text{C}$ , 随后体温回升。SB-203580 (5 mg·kg<sup>-1</sup>) + YZG-330 组小鼠体温与 YZG-330 组相比无显著性差异。结果提示, YZG-330 的降温作用可部



**Figure 5** Effect of YZG-330 on the expression of transient receptor potential A1 (TRPA1, A) and transient receptor potential M8 (TRPM8, B) in mouse hypothalamus. *n* = 3,  $\bar{x} \pm s$ . \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001 vs vehicle group



**Figure 6** The effect of SB-203580 (5, 20 mg·kg<sup>-1</sup>, i.p.) on YZG-330-induced change of expression of TRPA1 (A) and TRPM8 (B) in mouse hypothalamus. *n* = 3,  $\bar{x} \pm s$ . \**P* < 0.05 vs vehicle group; #*P* < 0.05 vs YZG-330 only group



**Figure 7** The effect of YZG-330 on Ca<sup>2+</sup> level in mouse hypothalamic cells. *n* = 3,  $\bar{x} \pm SEM$ . \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001 vs vehicle group

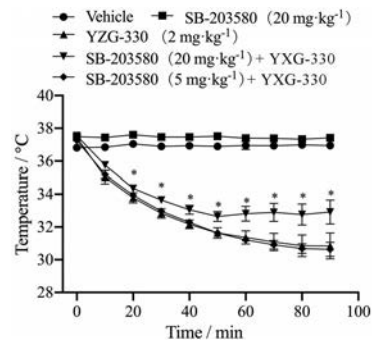
**Table 1** The inhibition of DPCPX or TRPM8 antagonist 2 on YZG-330-induced influx of Ca<sup>2+</sup> in mouse hypothalamic cells. Incubate A<sub>1</sub>R inhibitor DPCPX (0.5 and 1 μmol·L<sup>-1</sup>) or TRPM8 antagonist 2 (0.1 and 1 μmol·L<sup>-1</sup>) in advance, add YZG-330 (6.5 μmol·L<sup>-1</sup>) 20 minutes later to detect the fluorescence intensity in mouse hypothalamus cells. *n* = 3,  $\bar{x} \pm s$ . \**P* < 0.05, \*\*\**P* < 0.001 vs vehicle group

Antagonist	Dose/μmol·L <sup>-1</sup>	Inhibition rate/%
DPCPX	0	0
	0.5	51.0 ± 12.0*
	1	102.1 ± 17.9***
TRPM8 antagonist 2	0	0
	0.1	5.0 ± 4.3
	1	46.9 ± 18.9*

分被P38抑制剂拮抗, P38蛋白的磷酸化在YZG-330致小鼠体温降低过程中发挥了重要作用。

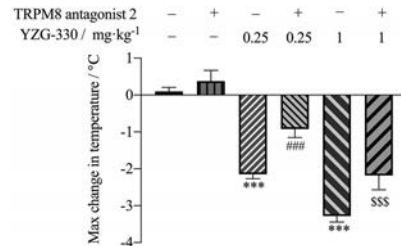
### 8 TRPM8拮抗剂2可拮抗YZG-330的降温作用

如图9所示, 给药30 min后, 单独给予选择性TRPM8离子通道拮抗剂2(每只小鼠0.1 μg, i.c.v.)对小鼠体温无明显影响, 而YZG-330组(0.25和1 mg·kg<sup>-1</sup>)小鼠体温均明显下降, 与溶剂对照组相比有显著性差异。TRPM8拮抗剂2 + YZG-330(0.25或1 mg·kg<sup>-1</sup>)组



**Figure 8** The effect of SB-203580 on YZG-330-induced increase of mouse body temperature. The mouse basal body temperature was measured in advance, and then the selective P38 inhibitor SB-203580 (5, 20 mg·kg<sup>-1</sup>, i.p.) was given, followed by YZG-330 (2 mg·kg<sup>-1</sup>, i.p.) 20 min later, and body temperature was measured every 10 minutes. *n* = 6,  $\bar{x} \pm SEM$ . \**P* < 0.05 vs YZG-330 only group

小鼠体温与对应的YZG-330组(0.25或1 mg·kg<sup>-1</sup>)均有显著性差异。结果表明, YZG-330的降温作用可部分被TRPM8拮抗剂2拮抗, TRPM8离子通道在YZG-330致小鼠体温降低过程中发挥了重要作用。



**Figure 9** Effect of YZG-330 and TRPM8 ion channel on the maximum change of mouse body temperature. Antagonist was intracerebroventricularly given to mice for each group 10 min before intraperitoneal administration of YZG-330. *n* = 6,  $\bar{x} \pm SEM$ . \*\*\**P* < 0.001 vs vehicle; ####*P* < 0.001 vs YZG-330 (0.25 mg·kg<sup>-1</sup>) group; sss*P* < 0.001 vs YZG-330 (1 mg·kg<sup>-1</sup>) group

## 讨论

本文首先验证了 YZG-330 在  $A_1R$  介导下的降温作用。通过整体药效学评价, 本研究发现 YZG-330 可剂量依赖性地降低小鼠体温, 且 P38 受体拮抗剂 SB-203580 和 TRPM8 拮抗剂 2 均可拮抗 YZG-330 的降温作用。Western blot 结果显示, 在给药 15 min 和 1 h 后, YZG-330 可显著上调小鼠下丘脑中 P38 磷酸化表达, 并且可以被  $A_1R$  抑制剂 DPCPX 拮抗。给药 1 h 后 YZG-330 可显著上调小鼠下丘脑组织中 TRPM8 的表达量, 且上调作用可被 DPCPX 和 SB-203580 拮抗, 说明 YZG-330 对 TRPM8 表达的调控受  $A_1R$  和 P38 MAPK 信号通路的介导。YZG-330 同样可在  $A_1R$  介导下上调 TRPA1 的表达, 但 SB-203580 无法拮抗 YZG-330 对 TRPA1 的调控, 说明 YZG-330 对 TRPA1 的上调作用是通过  $A_1R$  介导的, 但不受 P38 MAPK 信号通路的调控。荧光探针检测小鼠下丘脑细胞内  $Ca^{2+}$  实验结果显示, YZG-330 可剂量依赖性地促进小鼠下丘脑细胞中  $Ca^{2+}$  内流, 且 DPCPX 或 TRPM8 拮抗剂均可抑制 YZG-330 引起的胞内  $Ca^{2+}$  升高的作用。

实验发现, YZG-330 致 TRPM8 和 TRPA1 表达上调没有量效关系, 可能是由于 TRP 离子通道的激活具有“Flip-flop”开关效应, 温度达到激活范围内即可激活, 不存在剂量依赖性。

$A_1R$  是一种 G 蛋白耦联型受体, 后续反应均通过 cAMP-PKA 或 PI3K-AKT 信号通路完成<sup>[15]</sup>, 研究表明,  $A_1R$  介导体温调节时, 是通过 PKA-cAMP 信号通路发挥作用的<sup>[16]</sup>, 其下游是 P38 MAPK 通路<sup>[17]</sup>。基于以上实验结果得出结论: YZG-330 激动  $A_1R$ , 通过 PKA-cAMP 信号通路上调 P38 磷酸化水平, 上调 TRPM8 表达量, 激活离子通道, 促进  $Ca^{2+}$  内流, 从而导致小鼠体温降低。最终确定的信号通路如图 10 所示。由于  $A_1R$  抑制剂 DPCPX 只能部分拮抗 YZG-330 的降温作用, 故 YZG-330 可能存在其他的作用靶点, 其具体机制还有待进一步探索。

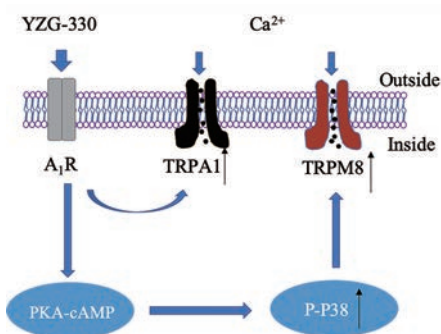


Figure 10 YZG-330 cooling pathway in mouse hypothalamic cells

**作者贡献:** 朱子玉主要负责部分动物行为学以及分子水平实验、文章撰写; 虞远智主要负责部分动物行为学、细胞水平实验以及文章整体修改; 袁月负责部分分子水平实验以及数据分析整理; 张建军主要负责指导整个实验的完成和投稿。

**利益冲突:** 所有作者均声明无利益冲突。

## References

- [1] Swoap SJ, Bingaman MJ, Hult EM, et al. Alternate-day feeding leads to improved glucose regulation on fasting days without significant weight loss in genetically obese mice [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2019, 317: R461-R469.
- [2] Gavrilova O, Leon LR, Marcus-Samuels B, et al. Torpor in mice is induced by both leptin-dependent and -independent mechanisms [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96: 14623-14628.
- [3] Bolze F, Morath V, Bast A, et al. Long-acting PAsylated leptin ameliorates obesity by promoting satiety and preventing hypometabolism in leptin-deficient *Lep (ob/ob)* mice [J]. *Endocrinology*, 2016, 157: 233-244.
- [4] Province HS, Xiao C, Mogul AS, et al. Activation of neuronal adenosine A1 receptors causes hypothermia through central and peripheral mechanisms [J]. *PLoS One*, 2020, 15: e0243986.
- [5] Kan HW, Chang CH, Lin CL, et al. Downregulation of adenosine and adenosine A1 receptor contributes to neuropathic pain in resiniferatoxin neuropathy [J]. *Pain*, 2018, 159: 1580-1591.
- [6] Jia SB, Zhang Y, Shi JG, et al. Central-adenosine A1 receptor involved in the thermal regulation effect of YZG-330, a N6-substituted adenosine derivative, in mice [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2015, 50: 690-696.
- [7] Zong KQ, Ma ZC, Gao Y. Progress in research on effects of adenosine A1 receptors [J]. *Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报)*, 2008, 24: 573-576.
- [8] Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs [J]. *Oncogene*, 2007, 26: 3100-3112.
- [9] Mizushima T, Obata K, Katsura H, et al. Noxious cold stimulation induces mitogen-activated protein kinase activation in transient receptor potential (TRP) channels TRPA1- and TRPM8-containing small sensory neurons [J]. *Neuroscience*, 2006, 140: 1337-1348.
- [10] Cheng W, Liu J, Sun CS, et al. Research progress of temperature-sensitive TRP channels as drug targets for neuropathic pain [J]. *Prog Physiol Sci (生理科学进展)*, 2012, 43: 125-130.
- [11] Ramsey IS, Delling M, Clapham DE. An introduction to TRP channels [J]. *Annu Rev Physiol*, 2006, 68: 619-647.
- [12] Almeida MC, Vizin RCL, Carrettiro DC. Current understanding on the neurophysiology of behavioral thermoregulation [J]. *Temperature*, 2015, 2: 483-490.
- [13] Liu CL, Su HC, Wan HY, et al. Forsythoside A exerts antipyretic effect on yeast-induced pyrexia mice *via* inhibiting transient re-

- ceptor potential vanilloid 1 function [J]. *Int J Biol Sci*, 2017, 13: 65-75.
- [14] Xue XL, Xing FY, Wang SQ, et al. The effect of hypothermia on the content of neuropeptides and other active substances in rat plasma and different brain regions [J]. *Chin J Pathophysiol (中国病理生理杂志)*, 2002, 18: 100-103.
- [15] Merighi S, Benini A, Mirandola P, et al. A3 adenosine receptor activation inhibits cell proliferation *via* phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent inhibition of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation in A375 human melanoma cells [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 19516-19526.
- [16] Haas HL, Selbach O. Functions of neuronal adenosine receptors [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2000, 362: 375-381.
- [17] Asada R, Kanemoto S, Matsuhisa K, et al. IRE1 $\alpha$ -XBP1 is a novel branch in the transcriptional regulation of UCP1 in brown adipocytes [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 16580.