

氧自由基和谷氨酸在致热原性发热机制中的作用与退热展望

杨永录

〔作者简介〕 杨永录,教授,成都医学院体温与炎症四川省高校重点实验室主任,国务院政府特殊津贴享受者。从事体温调节与退热机制的研究工作,先后在国内外相关期刊发表论文 100 余篇,获得省部级科技进步二等奖 3 项。近 5 年来先后获得国家自然科学基金资助和省级科研基金资助课题 6 项,主编出版《体温生理学——基础与临床》和《体温与体温调节生理学》专著各 1 部,参与编写国家规划生理学教材等 4 部。

中图分类号 R364.6

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.12.001

发热是机体抵抗疾病和外来细菌感染的一种复杂的生理与病理生理反应,革兰阴性细菌感染引起的发热反应主要是由菌壁脂多糖(LPS)所致^[1,2]。LPS引起血液中的单核细胞、淋巴细胞和组织中的巨噬细胞释放白细胞介素-1(IL-1)、白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)经血液循环到紧邻下丘脑视前区(POA)的终板血管器(OVLT),分别与各自的细胞因子受体结合,促进PGE₂的合成;同时LPS也经血液循环直接与OVLT血管内皮细胞的Toll样受体结合,引起PGE₂合成^[2-4]。PGE₂通过促进下丘脑释放环腺苷酸(cAMP)和其他神经递质而改变下丘脑温度敏感神经元的活动导致体温调定点上移,然后POA发出升温信号传出到效应器使机体产热增加,散热减少,引起发热反应^[2,3]。

LPS除了诱发宿主体内产生致热性细胞因子外,还能激活巨噬细胞、单核细胞和下丘脑产生氧自由基、谷氨酸和一氧化氮代谢产物(NO_x⁻),在发热形成中有非常重要的作用^[5]。致热性细胞因子和谷氨酸又能促进细胞释放大量的羟基自由基、超氧阴离子自由基、过氧化氢和NO_x⁻。另外,炎症与组织缺氧也能引起谷氨酸释放增加,而导致细胞兴奋性毒性^[1,5]。当细胞产生大量的氧自由基和谷氨酸兴奋性毒性,可引起膜脂过氧化以及蛋白质和DNA的氧化,而损伤细胞^[5,6]。近年来发现氧自由基、谷氨酸以及NO_x⁻

在致热原性发热中的作用,为人们认识发热机制和退热治疗开辟了新的领域。所以,本文就氧自由基、谷氨酸以及NO_x⁻在LPS或致热性细胞因子引起发热机制中的作用以及退热治疗的新思路做一简要综述。

一、氧自由基在致热原性发热中的作用

氧自由基主要包括超氧阴离子自由基、羟基自由基、过氧化氢以及其他自由基(脂氧自由基和一氧化氮自由基),氧自由基的特点是活性强、易发生反应。机体中存在氧化体系产生氧自由基,也存在着清除氧自由基体系,氧化与抗氧化同时存在,正常情况下二者维持动态平衡。体内的氧自由基具有一定的功能,主要是参与机体的免疫与信号转导过程。但过多的氧自由基就会有破坏作用,导致机体正常细胞和组织损坏,而引起多种疾病,如心脏病、阿尔茨海默病、帕金森病和肿瘤。脓毒症由于组织缺血、缺氧等因素可引起氧自由基清除系统功能下降甚至丧失,出现氧自由基急剧堆积现象,因而认为氧自由基在脓毒症发病机制中有重要作用^[7]。

动物实验发现,静脉注射LPS或脑室内注射谷氨酸引起剂量依赖性体温升高时,OVLT区也出现羟基自由基升高,说明LPS或谷氨酸引起体温升高与OVLT区羟基自由基水平升高有关^[8]。用羟基自由基清除剂 α -硫辛酸(α -lipoic acid)或N-乙酰-L-半胱氨酸(N-acetyl-L-cystein)预处理,能明显抑制LPS引起的发热反应和羟基自由基的产生;用谷氨酸离子型受体N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDA)受体阻断剂MK-801预处理能够明显降低LPS引起的发热反应和OVLT区羟基自由基的水平^[5]。在致热原性发热中,用自由基清除剂亚甲蓝

基金项目:四川省教育厅科研基金资助项目(12ZB204);成都医学院学科建设项目专项基金资助项目(CYXK2012003)

作者单位:610500 成都医学院体温与炎症四川省高校重点实验室

通讯作者:杨永录,电子信箱: ylyang@cmc.edu.cn

(methylene blue)能抑制血浆中氧自由基的水平,认为谷氨酸能与羟基自由基通路在致热原性发热中有重要作用^[5,9]。

活性氧(ROS)是生物体有氧代谢过程中产生的一类活性含氧化合物,主要包括羟基自由基、超氧阴离子和过氧化氢。LPS能引起OVL区产生过多的ROS,可激活iNOS-依赖 NO_x^- -PGE₂引起发热。ROS可作为第2信使,在细胞内发挥重要的作用,但ROS产生过多会影响细胞内的信号通路,可引起一系列生物学效应。ROS可通过过氧化氢、活性氮、炎性细胞因子等激活核因子 κB (NF- κB)通路,抗氧化剂可以阻断其作用^[5]。在兔和大鼠中NF- κB 抑制剂可以明显阻滞LPS和IL-1 β 引起的发热,说明体内产生过多iNOS和COX-2能够激活NF- κB ^[9,10]。

二、 NO_x^- 在致热原性发热中的作用

一氧化氮(NO)是细胞内一氧化氮合酶(NOS)产生的气体低分子,在舒张血管、抑制血小板凝集、参与免疫系统破坏肿瘤细胞和细胞内病原体(病毒和细菌)、神经突触传递等多种生理和病理生理过程中发挥重要作用。人体内NOS分为内皮型一氧化氮合酶(eNOS)、神经型一氧化氮合酶(nNOS)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)。NO代谢过程中生成的 NO_x^- 主要是硝酸盐和亚硝酸盐。通常机体运动时能提高eNOS的表达和活性,血液中则产生较高水平的硝酸盐;当敲除小鼠NOS基因时,血液中亚硝酸盐水平降低70%^[12]。革兰阴性和革兰阳性细菌引起全身感染时,由于许多器官或组织产生大量iNOS,机体内硝酸盐和亚硝酸盐水平也明显升高,而引起器官功能障碍和宿主防御能力降低^[5,7,11,12]。在感染性休克动物模型中,用iNOS抑制剂地塞米松抑制iNOS活性可改善感染性休克反应^[5,7]。

IL-1、IL-6、TNF- α 和Toll样受体配体能促进下丘脑环氧合酶-2(COX-2)合成PGE₂和激活PGE₂受体,通过提高细胞内的cAMP而引起发热^[2]。另外,致热性细胞因子IL-1、IL-6和TNF- α 能诱导OVL区的iNOS表达增加和 NO_x^- 水平升高,用阻断剂阻断 NO_x^- 的生成,可降低COX-2活性和减少PGE₂的生成。所以有研究认为, NO_x^- 可能是下丘脑致热原性发热的促致热物质(propyretic),iNOS-依赖 NO_x^- 参与下丘脑合成PGE₂,引起机体发热^[5]。

为了探讨下丘脑(或OVL) iNOS-依赖 NO_x^- 参与致热原性发热的机制,Lin等往清醒兔OVL区微量注射LPS、PGE₂或 NO_x^- 供体能引起散热减少

(皮肤血管收缩)和(或)战栗性产热增加使机体出现发热,用iNOS抑制剂地塞米松则能明显阻断LPS的发热效应,提前用iNOS抑制剂地塞米松预处理,不仅能减弱LPS的发热反应,而且还能够降低iNOS-依赖 NO_x^- 的水平,表明下丘脑iNOS-依赖 NO_x^- 参与兔的致热原性发热^[9]。在大鼠中也证明,iNOS抑制剂不仅能够抑制LPS和IL-1 β 引起的发热反应,而且也能抑制心理应激性发热反应^[13,14]。这些研究表明,LPS或致热性细胞因子可能通过下丘脑COX-2-依赖PGE₂-cAMP通路和诱导OVL区的iNOS-依赖 NO_x^- 的生成而引起发热^[2,15]。

三、谷氨酸在致热原性发热中的作用

谷氨酸是中枢神经系统突触兴奋的重要神经递质,在突触快速传递、学习与记忆以及神经系统发育过程中起着十分重要的作用。此外,谷氨酸NMDA受体在热损伤、脑卒中、癫痫、阿尔茨海默病、亨廷顿舞蹈症和帕金森病等方面的作用已经成为人们关注的焦点^[5]。大鼠局灶性脑缺血证明,阿司匹林抑制谷氨酸释放可以达到保护神经的作用^[12]。

POA分布的谷氨酸能神经和谷氨酸离子型受体NMDA在体温调节和发热中有重要的作用^[16,17]。往大鼠POA微量注射L-谷氨酸可引起体温和脑温升高,持续时间长达8 h^[16]。谷氨酸通过NMDA使机体产热增多和散热减少,引起发热效应^[5,16]。给兔静脉注射葡萄球菌肠毒素A引起发热时,伴有下丘脑谷氨酸释放增多反应,NMDA受体阻断剂能明显阻断葡萄球菌肠毒素A引起下丘脑谷氨酸的释放,预先给NMDA受体阻断剂可以明显降低谷氨酸引起的发热^[5]。静脉注射阿司匹林、对乙酰氨基酚、双氯芬酸等环氧合酶抑制剂,可以明显阻断静脉注射葡萄球菌肠毒素A引起的发热反应和下丘脑谷氨酸的释放。下丘脑注射阿司匹林或水杨酸钠也能明显抑制谷氨酸引起的发热反应^[18]。静脉注射LPS后80~200 min出现双向发热最高值,每次出现体温高峰时,都伴有POA区2,3-二羟基苯甲酸(2,3-DHBA)升高反应(2,3-DHBA是反映体内羟基自由基水平变化的重要指标);侧脑室注入谷氨酸引起的体温升高期也伴有POA区2,3-DHBA水平升高现象。注射LPS或谷氨酸1 h前,静脉注射自由基清除剂 α -硫辛酸和N-乙酰基-L-半胱氨酸能明显阻断其发热反应和下丘脑2,3-DHBA升高反应^[8]。自由基清除剂和IL-1受体阻断剂也能明显阻断LPS引起下

丘脑 PGE_2 升高反应^[8,19]。这些研究证明,下丘脑 NMDA 受体-依赖羟基自由基- PGE_2 途径介导 LPS 的发热过程^[8]。

神经细胞兴奋性毒性死亡与 COX-2 有关。细胞受到炎症刺激时 COX-2 表达增加是炎症介导细胞毒性的重要因素之一。在体激活大鼠海马 NMDA 受体可提高细胞外的 PGE_2 水平,用 NMDA 阻断剂 MK801 及选择性/非选择性 COX-2 抑制剂的类似物可以阻断其引起的 PGE_2 升高反应,表明 NMDA 诱发的 PGE_2 合成增加很大程度上取决于 COX-2 的活性^[5]。所以认为 COX-2 可能是一个潜在的神经保护治疗靶点^[20,21]。另外,NMDA 受体阻断剂 MK-801 和 LY235959 能阻断脂多糖和谷氨酸引起的发热和下丘脑羟基自由基升高反应^[17]。LPS 激活下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴,可影响去甲肾上腺素、多巴胺、5-羟色胺和谷氨酸活性,这可能是 LPS 通过兴奋下丘脑 NMDA-依赖羟基自由基- PGE_2 通路而引起发热的重要原因^[21,22]。

四、退热的思路与展望

致热原能引起吞噬细胞、单核细胞和下丘脑产生氧自由基、谷氨酸以及 NO_x^- ,在发热形成中发挥非常重要的作用^[15,16,19,21]。这些新发现,为退热治疗拓宽了新的思路,只要采用不同的方法阻断或清除机体内谷氨酸、氧自由基以及 NO_x^- 在发热通路中的作用,就可达到退热的目的。

1. IL-1 受体阻断剂的退热作用:IL-1 尤其 IL-1 β 是参与多种致热原性发热的重要细胞因子。在体和离体实验证明,IL-1 β 能使 POA 热敏神经元放电减少和冷敏神经元放电增加,这一作用与 IL-1 β 引起发热的发展是一致的^[23]。IL-1 β 抗血清和 IL-1 受体阻断剂能明显阻断致热原性发热反应。进一步研究发现,IL-1 受体阻断剂在阻断 LPS 引起发热时,同时能明显降低下丘脑谷氨酸、羟基自由基和 PGE_2 的水平,说明 IL-1 受体阻断剂的退热作用与抑制下丘脑谷氨酸-羟基自由基- PGE_2 的水平有关^[19]。

2. 白细胞介素-10 的退热作用:白细胞介素-10(IL-10)是单核-吞噬细胞、树突细胞、T 和 B 淋巴细胞分泌,能抑制活化的单核-吞噬细胞产生 IL-1、IL-6 和 TNF,下调脂多糖信号转导受体 Toll 样受体 4(TLR4)的表达以及抑制 PGE_2 的产生。中枢给 IL-10 能明显降低 LPS 引起大鼠发热反应,IL-10 基因敲除小鼠不仅对感染性炎症的病死率增加,

而且能提高和延长 LPS 引起的发热反应^[5,24]。在兔中发现,静脉注射 LPS 1h 前,侧脑室注射 IL-10 预处理能明显减弱 LPS 的发热反应和降低下丘脑的谷氨酸、羟基自由基和 PGE_2 的水平,证明 IL-10 通过降低谷氨酸、羟基自由基和 PGE_2 水平,而引起退热作用^[25]。

3. 高压氧的退热作用:高压氧治疗能明显降低 LPS 引起的发热,伴有 TNF- α 与 IL-1 β 降低,或者用高压氧预处理能明显阻止 LPS 引起的 TNF- α 和 IL-1 β 的变化,而降低 LPS 的发热效应^[26]。另外,高压氧通过抑制单核-吞噬细胞释放 IL-1、IL-6 和 TNF- α ,而降低脂多糖引起的病死率。这种治疗能抑制 LPS 或 IL-6 引起 OVLT 区谷氨酸、羟基自由基和 PGE_2 的升高反应。由此可见,高压氧通过抑制 OVLT 内的谷氨酸-羟基自由基- PGE_2 通路以达到退热作用。

4. 黄芩苷的退热作用:黄芩苷是从黄芩的干燥根中提取的一种黄酮类化合物,具有抗炎、抗变态反应、抗肿瘤等多种药理作用。黄芩苷退热作用显著,其复方制剂在临床上也有较好的退热效果。实验发现,黄芩苷能抑制 LPS 诱导 RAW 364.7 小鼠巨噬细胞 iNOS 和 COX-2 的表达,阻止角叉菜胶引起 NO、 PGE_2 和炎性细胞因子的产生。给兔静脉注射黄芩苷能明显降低 LPS 引起血液中 TNF- α 、谷氨酸和羟基自由基的水平。所以,认为黄芩苷对热原性发热的退热作用是通过抑制 OVLT 区 NMDA-依赖羟基自由基- PGE_2 通路有关。

5. 阿司匹林退热作用的新机制:众所周知,阿司匹林主要是通过抑制细胞 COX-2,减少下丘脑前列腺素的合成以发挥退热与镇痛作用。但 Huang 等^[18]发现,阿司匹林降低致热原性发热时,同时伴有下丘脑谷氨酸水平降低反应。兔下丘脑注射谷氨酸前 1h,静脉注射阿司匹林能明显阻止谷氨酸引起的发热反应。阿司匹林也通过抑制血浆中氧自由基的水平,而降低 LPS 引起的发热。分析近年来的研究结果可以看出,阿司匹林对致热原性发热的退热作用除了抑制 PGE_2 合成外,还通过阻断 OVLT 区 NMDA 受体-依赖性羟基自由基- PGE_2 通路而引起退热作用^[17,18]。

综上所述,致热原除了引起机体产生致热性细胞因子在发热形成中发挥重要作用外,还能引起体内巨噬细胞、单核细胞和下丘脑产生氧自由基、谷氨酸以及 NO_x^- 在发热形成中也发挥非常重要的作

用^[15,16,19,21]。这些新发现,不仅为人们认识发热机制提供了新的理论基础,同时也为退热治疗开辟了新的思路。值得关注的是抗炎性细胞因子、NMDA 受体阻断剂、iNOS 抑制剂、氧自由基清除剂以及高压氧可能为退热治疗开了辟新的方法,特别是下丘脑谷氨酸 - 羟基自由基 - 前列腺素 E₂ 通路可能成为研究发热与退热机制的新目标。

参考文献

- Wu JY, Tsou MY, Chen TH, *et al.* Therapeutic effects of melatonin on peritonitis - induced septic shock with multiple organ dysfunction syndrome in rats[J]. J Pineal Res, 2008, 45(1): 106 - 116
- Dinarello CA. Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed[J]. J Endotoxin Res, 2004, 10(4): 201 - 222
- Ogoina D. Fever, fever patterns and diseases called ‘fever’ - a review[J]. J Infect Public Health, 2011, 4(3): 108 - 124
- Lin X, Kong J, Wu Q, *et al.* Effect of TLR4/MyD88 signaling pathway on expression of IL - 1 β and TNF - α in synovial fibroblasts from temporomandibular joint exposed to lipopolysaccharide[J]. Mediators Inflamm, 2015, 2015:329405
- Hou CC, Lin H, Chang CP, *et al.* Oxidative stress and pyrogenic fever pathogenesis[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 667(1 - 3): 6 - 12
- Cassina P, Peluffo H, Pehar M, *et al.* Peroxynitrite triggers a phenotypic transformation in spinal cord astrocytes that induces motor neuron apoptosis[J]. J Neurosci Res, 2002, 67(1): 21 - 29
- Bhattacharyya J, Biswas S, Datta AG. Mode of action of endotoxin: role of free radicals and antioxidants[J]. Curr Med Chem, 2004, 11(3): 359 - 368
- Huang WT, Lin MT, Chang CP. A NMDA receptor - dependent hydroxyl radical pathway in the rabbit hypothalamus may mediate lipopolysaccharide fever[J]. Neuropharmacology, 2006, 50(4): 504 - 511
- Lin MT, Lin JH, Yang YL. Dexamethasone administered into organum vasculosum laminae terminalis of rabbits induced antipyresis via inhibiting nitric oxide pathway in situ[J]. Neurosci Lett, 1997, 230(1): 53 - 56
- Ashnune K, Strassheim D, Mitra S, *et al.* Involvement of reactive oxygen species in Toll - like receptor 4 - dependent activation of NF - κ B[J]. J Immunol, 2004, 172(4): 2522 - 2529
- Oh GS, Pae HO, Choi BM, *et al.* 20(S) - Protopanaxatriol, one of ginsenoside metabolites, inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase - 2 expressions through inactivation of nuclear factor - κ B in RAW 264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide[J]. Cancer Lett, 2004, 205(1): 23 - 29
- De Cristóbal J, Cárdenas A, Lizasoain I, *et al.* Inhibition of glutamate release via recovery of ATP levels accounts for a neuroprotective effect of aspirin in rat cortical neurons exposed to oxygen - glucose deprivation[J]. Stroke, 2002, 33(1): 261 - 267
- Roth J, Störr B, Voigt K, *et al.* Inhibition of nitric oxide synthase results in a suppression of interleukin - 1 β - induced fever in rats[J]. Life Sci, 1998, 22(20): 345 - 350
- Soszynski D. Molecular mechanism of emotional fever - the role of nitric oxide[J]. J Physiol Pharmacol, 2006, 57(Suppl 8): 51 - 59
- Piotrowska - Tomala KK, Siemieniuch MJ, Szóstek. Lipopolysaccharides, cytokines, and nitric oxide affect secretion of prostaglandins and leukotrienes by bovine mammary gland epithelial cells[J]. Domest Anim Endocrinol, 2012, 43(4): 278 - 288
- Sengupta T, Jaryal AK, Kumar VM, *et al.* L - glutamate microinjection in the preoptic area increases brain and body temperature in freely moving rats[J]. Neuroreport, 2014, 25(1): 28 - 33
- Kao CH, Kao TY, Huang WT, *et al.* Lipopolysaccharide and glutamate - induced hypothalamic hydroxyl radical elevation and fever can be suppressed by n - methyl - d - aspartate - receptor antagonists[J]. J Pharmacol Sci, 2007, 104(2): 130 - 136
- Huang WT, Wang JJ, Lin MT. Cyclooxygenase inhibitors attenuate augmented glutamate release in organum vasculosum laminae terminalis and fever induced by staphylococcal enterotoxin A [J]. J Pharmacol Sci, 2004, 94(2): 192 - 196
- Huang KF, Huang WT, Lin KC, *et al.* Interleukin - 1 receptor antagonist inhibits the release of glutamate, hydroxyl radicals, and prostaglandin E₂ in the hypothalamus during pyrogen - induced fever in rabbits[J]. Eur J Pharmacol, 2010, 629(1 - 3): 125 - 131
- Pepicelli O, Fedele E, Berardi M, *et al.* Cyclo - oxygenase - 1 and - 2 differently contribute to prostaglandin E₂ synthesis and lipid peroxidation after in vivo activation of N - methyl - D - aspartate receptors in rat hippocampus[J]. J Neurochem, 2005, 93(6): 1561 - 1567
- Chang CH, Huang WT, Kao CH, *et al.* Tetramethylpyrazine decreases hypothalamic glutamate, hydroxyl radicals and prostaglandin - E₂ and has antipyretic effects[J]. Inflamm Res, 2013, 62(5): 527 - 535
- Osaka T. Thermoregulatory responses elicited by microinjection of L - glutamate and its interaction with thermogenic effects of GABA and prostaglandin E₂ in the preoptic area[J]. Neuroscience, 2012, 226: 156 - 164
- Vasilenko VY, Petruchuk TA, Gourine VN, *et al.* Interleukin - 1 β reduces temperature sensitivity but elevates thermal thresholds in different populations of warm - sensitive hypothalamic neurons in rat brain slices[J]. Neurosci Lett, 2000, 292(3): 207 - 210
- Ledeboer A, Binnekade R, Brevé JJ, *et al.* Sitespecific modulation of LPS - induced fever and interleukin - 1 β expression in rats by interleukin - 10[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002, 282(6): R1762 - R1772
- Kao CH, Huang WT, Lin MT, *et al.* Central interleukin - 10 attenuated lipopolysaccharide - induced changes in core temperature and hypothalamic glutamate, hydroxyl radicals and prostaglandin - E₂ [J]. Europ J Pharmacol, 2011, 654(2): 187 - 193
- Niu KC, Huang WT, Lin MT, *et al.* Hyperbaric oxygen causes both antiinflammation and antipyresis in rabbits[J]. Fur J Pharmacol, 2009, 606(1 - 3): 240 - 245

(收稿日期:2015 - 06 - 17)

(修回日期:2015 - 06 - 19)