

精氨酸加压素翻转脂多糖引起大鼠发热反应及其与棕色脂肪产热变化的关系

刘 欣 杨永录 胥建辉 刘 畅

摘 要 **目的** 研究外周给精氨酸加压素(AVP)对脂多糖(LPS)引起大鼠发热和棕色脂肪产热以及血清中 IL-1 β 和 PGE₂ 水平的变化。**方法** 实验用成年雄性 SD 大鼠,在 23℃ 环境温度下,明暗时间各 12h。用无线遥测系统连续测量大鼠体核温度(T_c)、棕色脂肪温度(T_{BAT})和活动。10:00 时或 11:30 时分别给大鼠腹腔注射 LPS(50 μ g/kg)、AVP(10 μ g/kg)或 V1a 受体阻断剂(30 μ g/kg)。用 ELISA 法测定血清 IL-1 β 和 PGE₂ 的含量。**结果** 腹腔注射 LPS 后 T_{BAT} 升高出现在 T_c 升高之前。腹腔 V1a 受体阻断剂能提高 LPS 引起发热反应。AVP 能抑制 LPS 引起发热大鼠血清中 IL-1 β 和 PGE₂ 水平升高反应。**结论** BAT 产热在 LPS 引起的发热中有重要的作用。外周给 AVP 可通过抑制棕色脂肪产热和降低血液中 IL-1 β 和 PGE₂ 的浓度而翻转 LPS 发热反应。内源性 AVP 也有限制 LPS 发热的作用。

关键词 脂多糖 棕色脂肪 精氨酸加压素 退热

中图分类号 R364.6

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.11.019

Arginine Vasopressin Reverses fever Induced by Lipopolysaccharide in the Rats and Its Relationship with the Change in Brown Adipose Tissue Thermogenesis. Liu Xin, Yang Yonglu, Xu Jianhui, et al. The First Hospital of Lanzhou University, Gansu 730000, China

Abstract Objective To investigate the effect of peripheral administration of arginine vasopressin (AVP) on lipopolysaccharide (LPS) - induced fever in the rats, and its relationship with the change in brown adipose tissue (BAT) thermogenesis and Interleukine - 1 β (IL-1 β) and prostaglandin E₂ (PGE₂). **Methods** The core temperature (T_c), BAT temperature (T_{BAT}) and activity were measured by telemetry in adult male Sprague - Dawley rats at an ambient temperature of 23℃ during a 12h light: 12h dark photoperiod (lights on at 06:00 and lights off at 18:00). The rats were dosed intraperitoneally with LPS (50 μ g/kg), AVP (10 μ g/kg) or V1a vasopressin receptor antagonist (V1a antagonist, 30 μ g/kg) at 10:00 or 10:30. The concentrations of IL-1 β and PGE₂ in serum were tested by ELISA. **Results** (1) The increases in T_{BAT} following LPS preceded the increases in T_c. (2) Peripheral administration of AVP reversed LPS - induced fever and decreased BAT thermogenesis. (3) V1a antagonist enhanced the fever produced by LPS. (4) AVP could significantly attenuate LPS - induced IL-1 β and PGE₂ production. **Conclusion** (1) BAT thermogenesis plays an important role in LPS - induced fever. (2) Peripheral administration of AVP reversed LPS - induced fever by reduction of BAT thermogenesis and inhibition of IL-1 β and PGE₂. (3) Endogenous AVP can attenuate fever induced by LPS.

Key words Lipopolysaccharide; Brown adipose tissue; Arginine vasopressin; Antipyretic effect

脂多糖(LPS)引起发热反应与其引起单核细胞、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,分别与各自的细胞因子受体结合,促进前列腺素 E₂(PGE₂)的合成有关^[1,2]。另外,棕色脂肪(BAT)是哺乳动物代谢产热的主要来源,不仅

在维持能量平衡和体温调节中起重要作用,而且也参与感染性发热反应^[3,4]。

精氨酸加压素(AVP)在正常体温调节和退热中发挥重要的作用^[5~8]。虽然许多学者对 AVP 的退热作用进行了研究,但对 BAT 在 LPS 引起发热中的作用以及 AVP 对 LPS 引起 BAT 产热变化的影响研究不多^[7,9]。故本实验观察了 BAT 在 LPS 性发热中的作用以及 AVP 对 LPS 引起 BAT 产热的抑制作用与血清中 IL-1 β 和 PGE₂ 水平的变化。

材料与方法

1. 实验动物和试剂:实验用成年雄性 SD 大鼠(四川医学科学院实验动物研究所购买)87 只,体

基金项目:四川省教育厅科研基金资助项目(15ZA0251)

作者单位:730000 兰州大学第一医院重症医学科(刘欣);
610500 成都医学院体温与炎症四川省高校重点实验室(杨永录、胥建辉、刘畅)

通讯作者:杨永录,教授,电子信箱: ylyang@cmc.edu.cn

重 210 ~ 290 g。LPS、AVP 和 AVP V1a 受体阻断剂 (V1a 受体阻断剂) 均购买于美国 Sigma 公司, 用无菌生理盐水分别稀释 LPS (50 μ g/ml 盐水)、AVP (10 μ g/ml 盐水) 和 V1a 受体阻断剂 (30 μ g/ml 盐水), 分装并储存于 -30℃ 待用。大鼠白介素 1 β (IL-1 β) 和前列腺素 E₂ (PGE₂) ELISA 试剂盒为美国 BD 公司产品。

2. 体温和活动的记录方法: 实验使用美国 DSI 公司生产的无线遥测温度传感器 (model TA10M2 - F40 - TT) 连续测量大鼠体核温度 (T_c)、BAT 温度 (T_{BAT}) 和动物的活动变化。腹腔注射 4% 戊巴比妥钠溶液 (40mg/kg) 麻醉动物, 手术操作同以往的工作^[5,6]。手术后, 肌肉注射青霉素 (2 $\times$ 10⁴ U) 以防感染, 然后让动物恢复 7 天以上再进行实验。

3. 实验分组与步骤: 实验分为 3 部分: ① LPS 引起大鼠发热反应: 以腹腔注射生理盐水 (1ml/kg) 为对正常对照组, 观察腹腔注射 LPS (50 μ g/kg) 引起大鼠的发热反应; ② 腹腔注射 AVP 对 LPS 发热反应的影响: 以给 LPS (50 μ g/kg) + 生理盐水 (1ml/kg, IP) 为发热组, 观察 LPS (50 μ g/kg) 后再给 AVP (10 μ g/kg) 对大鼠发热反应的影响; ③ V1a 受体阻断剂对 LPS 发热反应的影响: 以给 LPS (50 μ g/kg) + 生理盐水 (1ml/kg) 为发热组, 观察 LPS (50 μ g/kg) 后再给 V1a 受体阻断剂 (30 μ g/kg) 对大鼠发热反应的影响。实验前一天下午, 大鼠称重后置于 23℃ 人工气候箱内 (重庆永生实验仪器厂产品) 进行适应性过夜, 动物处于自由活动、进食和进水状态。气候箱内昼光期和暗光期时间各 12h, 即 06:00 ~ 18:00 时开灯, 18:00 ~ 次日 06:00 时关灯。实验当天 06:00 时开始记录大鼠 T_c、T_{BAT} 和活动, 10:00 时分别给动物腹腔注射生理盐水或 LPS, 11:30 时分别给动物注射生理盐水、AVP 或 V1a 受体阻断剂, 然后连续记录到 18:00 时。

4. 判定体温变化的指标: 体温反应指标用平均体温反应曲线和体温反应最大幅度与基线体温之间的差 (ΔT) 表示。

5. 血清 IL-1 β 和 PGE₂ 水平的测量: 用 ELISA 法测定血清 IL-1 β 和 PGE₂ 的含量。实验标本来自于 3 组大鼠, 即对照组 (生理盐水)、LPS + 生理盐水和 LPS + AVP, 大鼠的给药时间和方法同前文所述。用含有促凝剂的一次性真空采血管经心脏穿刺法抽取血液并将其放在冰中, 然后用低温离心机 (3000r/min, 15min) 分离血清, 分装储存于 -30℃ 冰箱中, 以

备测定血清 IL-1 β 和 PGE₂ 含量。具体操作严格按照试剂说明进行。

6. 统计学方法: 采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析。实验数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。各组间采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. LPS 引起 T_c 和 T_{BAT} 的变化: 对照组和 LPS 组动物给药前 T_c 基线水平分别为 36.97 ~ 37.17℃ 和 36.99 ~ 37.19℃, 两组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 分别注射生理盐水和 LPS 后, 均出现短暂轻度 T_c 升高反应。腹腔注射 LPS 1.5h 后, T_c 开始出现升高反应, 2.5h 后出现 1 热相, T_c 为 37.92 $\pm$ 0.16℃; 5.5h 后出现 2 热相, T_c 为 38.11 $\pm$ 0.18℃。对照组注射盐水后, T_c 无明显变化 (图 1A)。用双探头温度遥测传感器在相同大鼠同步记录 T_{BAT}, 给药前为 36.38 ~ 36.51℃, 较 T_c 平均低 0.61℃; 腹腔注射 LPS 后不仅 T_{BAT} 升高时间较 T_c 提前 25min 和上升速率快, 而 1 热相峰值出现的时间较 T_c 提前约

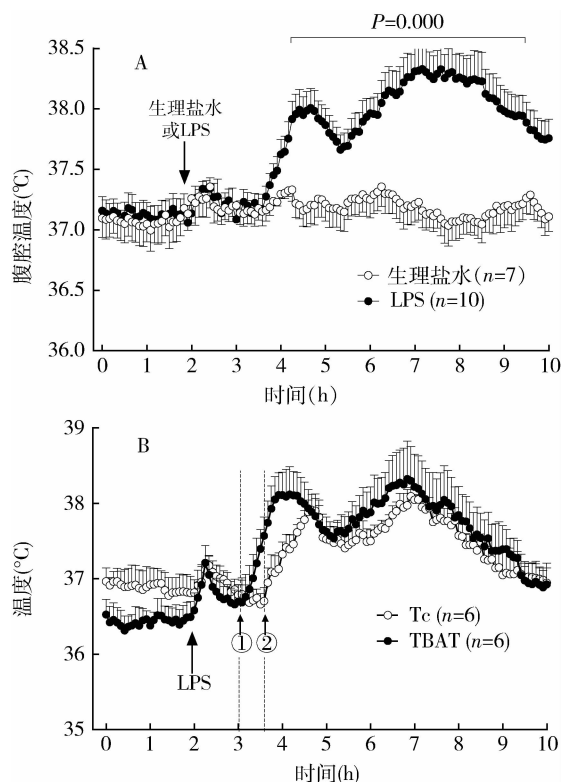


图1 腹腔注射 LPS 或生理盐水后 T_c 与 T_{BAT} 变化的时间曲线

A. 注射 LPS 和生理盐水引起 T_c 变化的时间曲线; B. 注射 LPS 引起 T_c 和 T_{BAT} 变化的时间曲线; ① T_{BAT} 开始升高; ② T_c 开始升高

50min, 两个热相的峰值分别为 $38.11 \pm 0.29^{\circ}\text{C}$ 和 $38.33 \pm 0.46^{\circ}\text{C}$, 分别较 T_c 的 1 热相和 2 热相峰值高 0.20°C 和 0.23°C (图 1B)。

2. 腹腔注射 AVP 翻转 LPS 引起发热反应: 10:00 时腹腔注射 LPS 90min 后, 给 AVP 则能完全翻转 LPS 引起 T_c 的升温反应, 给 AVP 后 30min T_c 由给药前 $36.93 \pm 0.25^{\circ}\text{C}$ 降低到 $35.11 \pm 0.21^{\circ}\text{C}$, 即降低 1.82°C , 而较 LPS 组 (对照组) 同时的温度降低 2.46°C (图 2A)。给 AVP 80min 后, T_c 恢复到接近给药前水平, 但随后又出现短暂的下降反应, 大约 300min 后 T_c 接近 LPS 大鼠组的 T_c (图 2A)。但腹腔注射 $V1a$ 受体阻断剂则能提高 LPS 发热幅度, 1 热相和 2 热相的峰值较 LPS 组均出现升高现象, 但与 LPS 组动物比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 2B)。

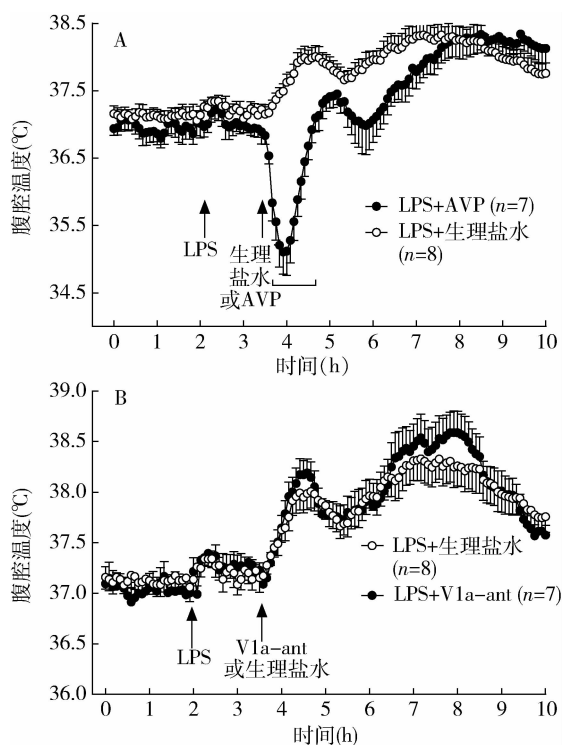


图 2 腹腔注射 AVP (A) 和 $V1a$ 受体阻断剂 ($V1a$ -ant, B) 对 LPS 引起发热反应的影响

用双探头温度遥测传感器同步记录 AVP 对 LPS 引起 BAT 产热影响, 给 AVP 30min 后, T_{BAT} 由给药前 $36.48 \pm 0.21^{\circ}\text{C}$ 降低到 $35.52 \pm 0.26^{\circ}\text{C}$, 即较给药前降低 0.96°C , 与同时时间 T_c 比较降低幅度小和恢复速度快 (图 3A 和图 4)。但 AVP 对 LPS 引起发热大鼠的活动无明显影响 (图 1B)。

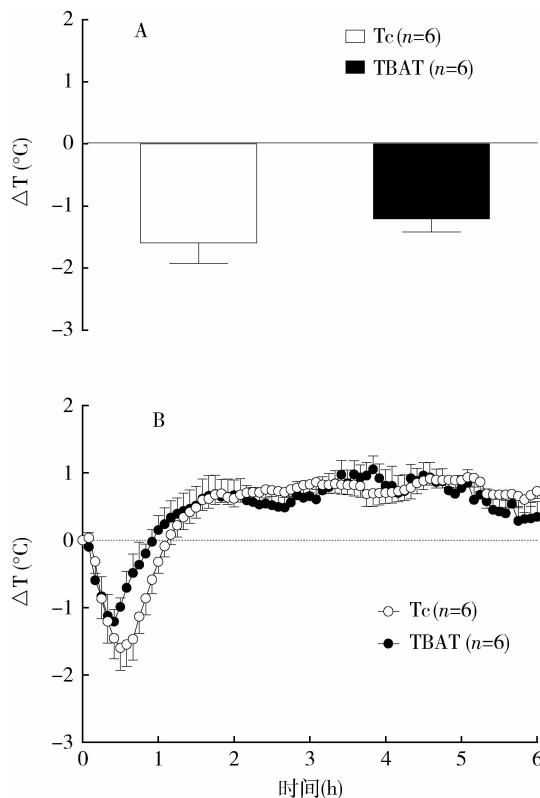


图 3 腹腔注射 AVP 对 LPS 引起 T_c 和 T_{BAT} 变化的比较

A. 腹腔注射 AVP 对 LPS 发热的翻转作用; B. 腹腔注射 AVP 引起 T_c 和 T_{BAT} 变化的时间曲线

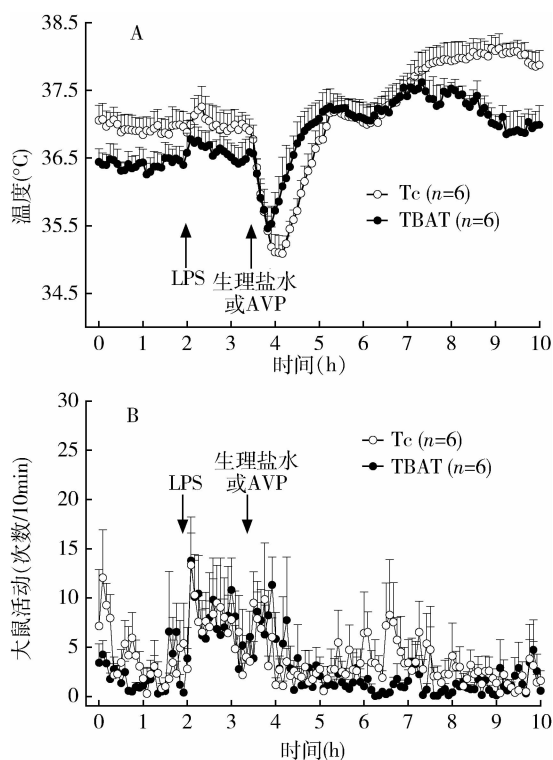


图 4 腹腔注射 AVP 翻转 LPS 引起的 T_c 和 T_{BAT} 升高反应以及大鼠活动的变化

3. AVP 对 LPS 引起发热大鼠血清 IL - 1 β 和 PGE₂ 水平的影响: 给大鼠腹腔注射 LPS 120min 后, 血清中 IL - 1 β 和 PGE₂ 浓度明显高于生理盐水组; 注射 AVP 能明显抑制 IL - 1 β 和 PGE₂ 浓度的升高反应(表 1)。

表 1 AVP 对 LPS 引起发热大鼠血清 IL - 1 β 和 PGE₂ 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL - 1 β (pg/ml)	PGE ₂ (ng/ml)
生理盐水 + 生理盐水组	8	24.51 $\pm$ 4.54	7.45 $\pm$ 1.83
LPS + 生理盐水组	8	73.50 $\pm$ 9.96 **	14.63 $\pm$ 2.70 *
LPS + AVP 组	8	53.43 $\pm$ 8.40 #	8.04 $\pm$ 1.66 #

与生理盐水 + 生理盐水组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 LPS + 生理盐水组比较, # $P < 0.05$

讨 论

往大鼠腹腔注射 LPS 90min 后大鼠 T_c 开始升高, 然后出现双相发热反应(图 1A), 实验结果与文献报道相似^[1,2]。但笔者的实验用无线遥测技术连续同步记录 T_c 和 T_{BAT} 发现, LPS 引起大鼠发热反应时, 不仅 T_{BAT} 上升速率快和幅度大, 而且 T_{BAT} 开始上升的时间较同步记录 T_c 上升时间提前 25min。实验证明, BAT 产热在 LPS 引起发热中有重要的作用, 因为 T_{BAT} 变化能够反应 BAT 产热变化^[3-5]。BAT 产热受交感神经支配, 是哺乳动物非战栗性产热的主要来源。交感神经末梢释放去甲肾上腺素是促进 BAT 产热的主要介质, 通过激活棕色脂肪细胞内的肾上腺素能受体使其产热增加^[3,4]。所以, 笔者分析 LPS 能提前快速升高 T_{BAT} 可能与其引起下丘脑产生的炎症因子 PGE₂ 与 EP3 受体结合, 然后通过传出神经兴奋支配 BAT 交感神经使产热量增加^[2,10]。

AVP 在维持正常体温恒定及昼夜节律节律中有紧张性温调节作用^[5,6,8]。另外, AVP 也有限制发热和促进退热以及抑制应激性体温过高的作用, 但只能部分阻断或降低 LPS 引起的发热反应^[7,9]。以往研究是用热电偶温度计或电子温度计间断测量直肠温度, 并未连续测量 AVP 退热作用的体温变化时间曲线。因而, 本实验用无线遥控测温技术连续测量 AVP 对 LPS 引起大鼠发热效应的影响。令人感兴趣的是外周给 AVP 不仅能够明显阻止 LPS 发热反应, 而且能够完全翻转 LPS 发热反应(图 2A 和图 4A)。AVP 能够翻转 LPS 发热反应与文献报道 AVP 只能部分阻断 LPS 发热和退热作用的实验结果明显不一致, 但与 AVP 引起正常大鼠低温反应相似^[6,8]。解释

以往研究者给大鼠中枢和外周注射 AVP 只能部分阻断 LPS 发热的实验结果是困难的。笔者分析可能是由于以往研究者使用人工测温法反复测量直肠温度, 这样的操作可引起动物应激性 T_c 升高反应干扰了实验结果的准确性, 而出现虚假的实验现象有关^[5,6]。

笔者以往的研究证明, 内源性 AVP 通过 V1a 受体参与昼光期正常大鼠的紧张性体温调节过程^[5,8]。外周给 AVP 能抑制 BAT 产热作用和提高大鼠唾液理毛活动以增加体表蒸发散热^[6]。本实验给大鼠腹腔注射 V1a 受体阻断剂能提高 LPS 发热反应, T_c 的 1 热相和 2 热相峰值高于 LPS 组(对照组), 表明内源性 AVP 不仅通过 V1a 受体参与昼光期正常大鼠的紧张性体温调节过程, 而且也通过 V1a 受体参与限制 LPS 的发热反应^[5,6]。实验同步观察到 AVP 也能翻转 LPS 引起 T_{BAT} 升高反应, 其恢复时间较 T_c 快, 提示 BAT 产热增加使体内的热量增多, 有利于 T_c 的恢复, 而大鼠的活动无明显变化(图 3B 和图 4A)。虽然活动能促进机体产热, 但 AVP 在降温中不影响大鼠的活动。这一结果证明, AVP 对 LPS 发热反应的翻转作用主要其能快速降低 BAT 产热有关。

LPS 通过激活单核和巨噬细胞产生 IL - 1 β 、IL - 6、TNF - α 和 PGE₂ 等致炎介质, 而引起发热反^[1,2]。AVP 能抑制内毒素诱导血细胞内生致热原生成和抑制 LPS 诱导 IL - 1 β 与 PGE₂ 生成^[11,12]。为了研究外周给 AVP 的退热是否与其抑制致炎性因子有关, 我们给大鼠腹腔注射 AVP 引起 LPS 发热大鼠 T_c 降低到最低值时, 血清中 IL - 1 β 和 PGE₂ 的水明显低于 LPS 发热组(对照组)的浓度, 表明 AVP 的退热作用与其能降低血液中 IL - 1 β 和 PGE₂ 的浓度有关。

综上所述, 本实验结果表明: ①BAT 产热在 LPS 引起发热中有重要的作用, LPS 不仅能使 T_{BAT} 升高的时间先于 T_c, 而且 T_{BAT} 上升速率快和幅度大; ②AVP 能够完全翻转 LPS 发热反应与其抑制 BAT 产热有关; ③内源性 AVP 有限制 LPS 的发热反应, 因为 V1a 受体阻断剂能提高 LPS 发热反应; ④AVP 降低发热大鼠血液中 IL - 1 β 和 PGE₂ 水平可是其能翻转 LPS 发热现象的因素之一, 因为 IL - 1 β 和 PGE₂ 在 LPS 引起发热中有重要作用^[1,2]。

参考文献

1 Ogoina D. Fever, fever patterns and diseases called 'fever'—a review [J]. J Infect Public Health, 2011, 4(3): 108 - 124

2 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]. Mediat

- Inflamm, 2015, 2015;329405
- 3 Morrison SF. Central neural control of thermoregulation and brown adipose tissue [J]. *Auton Neurosci*, 2016, 196: 14–24
 - 4 Morrison SF, Madden CJ. Central nervous system regulation of brown adipose tissue [J]. *Compr, Physiol*, 2014, 4(4): 1677–1713
 - 5 Yang YL, Wang N, Shen ZL, *et al.* Simultaneous telemetric monitoring of the circadian changes in core and BAT temperature in rats; endogenous vasopressin may contribute to reduced BAT thermogenesis and body temperature in the light phase of the circadian cycle [J]. *J Therm Biol*, 2012, 37(4): 316–332
 - 6 Yang YL, Hu XS, Zan W, *et al.* Arginine vasopressin does not mediate heat loss in the tail of the rat [J]. *J Therm Biol*, 2013, 38(5), 247–254
 - 7 杨永录, 沈字玲, 黄涛. 精氨酸加压素在调节性低温中的作用及其机制的研究进展 [J]. *成都医学院学报*, 2009, 4(1): 61–65
 - 8 杨永录, 卜舒, 杨春涛, 等. 不同环境温度对精氨酸加压素引起的大鼠低温的影响及其与尾部散热变化的关系 [J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(9): 1672–1678
 - 9 Roth J, Zeisberger E, Vybrál S, *et al.* Endogenous antipyretics: neuropeptides and glucocorticoids [J]. *Front Biosci*, 2004, 9: 816–26
 - 10 Nakamura K. Central circuitries for body temperature regulation and fever [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2011, 301(5): 1207–1228
 - 11 胡巢凤, 李楚杰, 张穗梅. 精氨酸加压素对家兔血细胞生成内生致热源的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 1994, 10(4): 358–361
 - 12 Fleisher–Berkovich S, Kagan E, Grossman N, *et al.* Multiple effects of arginine vasopressin on prostaglandin E₂ synthesis in fibroblasts [J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 485(1–3): 53–59

(收稿日期: 2017–02–22)

(修回日期: 2017–03–15)

绝经期和生育期雌激素缺乏小鼠细胞因子模式的研究

邵明君 胡 旻 何云芹 朱以军 唐 飞

摘 要 **目的** 观察雌激素(E₂)缺乏状态下年轻与老龄化 C57BL/6N 小鼠脾脏 IL–2、6、10 和 TNF–α 水平的变化。**方法** 清洁级健康雌性 C57BL/6 小鼠 80 只, 分为手术去卵巢组、药物去卵巢组、自然绝经组及发情间期组(对照组), 经 Con–A 刺激后 RT–PCR 技术检测 4 组小鼠脾脏 IL–2、6、10 和 TNF–α 水平, ELISA 检测血清 E₂ 水平证实分组可靠性。**结果** 3 组实验组血清 E₂ 水平均明显低于对照组($P < 0.01$), 而 E₂ 水平在 3 组实验组内比较差异无统计学意义。小鼠脾脏表达 IL–2、IL–6 和 TNF–α 水平在自然绝经组升高, 与其他 3 组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$); 而 3 组实验组 IL–10 水平略低于对照组, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 然而, 年轻组别中(发情间期组、手术去卵巢组、药物去卵巢组)未发现有 IL–2、IL–6、IL–10 和 TNF–α mRNA 表达的差异。**结论** Con–A 刺激后 E₂ 缺乏状态下年轻与老龄化 C57BL/6N 小鼠之间细胞因子模式是不同的, E₂ 缺乏对 IL–6、IL–2 和 TNF–α 水平影响作用有限。

关键词 手术去卵巢 药物去卵巢 绝经 细胞因子

中图分类号 R71 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.11.020

Different Cytokines Patten in Young and Aged Mice with Estradiol Deficiency. Shao Mingjun, Hu Min, He Yunqin, *et al.* Department of Gynecology, Jinhua Municipal Central Hospital of Chinese, Zhejiang 321000, China

Abstract Objective To compare the levels of IL–2, IL–6, IL–10 and TNF–α between young and aged C57BL/6N mice with the common feature of low E₂ status. **Methods** Twenty natural aged, 20 surgical varietectomy and 20 medical varietectomy of C57BL/6N mice were chosen in our studies. 20 stage of diestrus served as controls. Blood and spleens were collected 4 hours after injection of con–A. Reverse transcription–polymerase chain reaction (RT–PCR) was used to determine the mRNA levels of IL–2, IL–6, IL–10 and TNF–α in spleen cells. Serum E₂ levels were assessed using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The serum E₂ level of three experiment groups was significantly lower than that of control group ($P < 0.01$), while the difference was not significant when compared it within experiment groups. The levels of IL–2, IL–6 and TNF–α were increased in aged group, and the difference reached statistically significant when compared them with any other groups($P < 0.05$). While the IL–10 level was slight decreased in three exper-

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(Y13H040019)

作者单位: 321000 金华市中心医院

通讯作者: 邵明君, 电子信箱: smjun@126.com