

体内自由基与 Graves 病研究新进展

张瑞国 晋建华

【摘要】多种疾病的发生、发展与体内自由基介导的氧化损伤密切相关, Graves 病时体内也常有活性氧和活性氮等自由基的改变, 其氧化应激对甲状腺及人体其他重要脏器都可造成一定的损伤, 抗甲状腺药物和 ^{131}I 治疗 Graves 病后, 机体氧化和抗氧化参数也可发生改变。

【关键词】格雷夫斯病; 自由基; 氧化性应激; 碘放射性同位素

Study progress on free radicals and Graves disease

ZHANG Rui-guo, JIN Jian-hua

(Department of Nuclear Medicine, First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

【Abstract】 Free radical-mediated oxidative injury has been closely implicated in the occurrence and development of many diseases. Graves disease was also accompanied by changes of the free radicals, especially for reactive oxygen species and reactive nitrogen, et al, and the oxidative stress can cause a certain degree of injury on the thyroid and other human important organs. Antithyroid drug and ^{131}I treatment of Graves disease, the oxidative and antioxidative parameters can also be changed.

【Key words】 Graves disease; Free radicals; Oxidative stress; Indine radioisotopers

自由基是指能单独存在的、具有不配对电子的离子、原子及分子基团, 与人体关系密切的主要有活性氧自由基, 如超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)、羟自由基($\cdot\text{OH}$)、过氧化氢(H_2O_2)等; 活性氮自由基, 如一氧化氮(NO)、过氧亚硝酸根(ONOO^-)等。自 1956 年 Harman D 提出自由基与机体衰老及疾病有关的自由基学说以来, 许多研究表明自由基与心脏病、癌症、糖尿病等多种疾病相关, 其中与 Graves 病 (Graves disease, GD) 的关系亦已受到广泛关注。

1 体内自由基及其对机体损伤的分子机制

人体自由基来源于两个方面, 一为内源性自由基, 线粒体“电子漏”及细胞正常代谢过程中等均可产生; 二为外源性自由基, 电离辐射、细菌感染、加热等均可产生。电离辐射可使生物体组织成分的分子激活或离子化, 导致化学键断裂而生成自由基。

生理状态下, 体内自由基具有调节细胞间信息传递、细胞生长和抑制病菌等作用。病理状态下, 自由基对机体的损伤机制不一, 主要包括对生物膜、蛋白质和 DNA 损伤等方面。活性氧主要引起

生物膜的脂质过氧化, 生物膜的主要成分是多聚不饱和脂肪酸, 其中含有多个弱键和不饱和键, 自由基对其有很高的亲和力, 因此易受其攻击而引起一系列脂质过氧化链式反应的发生^[1]。活性氧能使氨基酸残基发生突变, 蛋白多肽链断裂、聚合或交联, 构象和活性位点改变, 导致其功能的损伤^[2]。 $\cdot\text{OH}$ 能与 DNA 碱基发生氢抽提、电子转移和加成反应, 导致 DNA 点突变、缺失和插入突变。近来研究发现, $\cdot\text{OH}$ 可与嘧啶碱基的 C_5 、 C_6 位和嘌呤碱基的 C_4 、 C_5 及 C_8 位上的双键加成而生成相应的 C-OH 加合物自由基, 导致碱基被修饰、DNA 链发生断裂等改变^[3]。

2 自由基与 GD

GD 时主要有活性氧和活性氮两大类自由基的改变, 研究较多的为 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 H_2O_2 、 NO 、 ONOO^- 等, 目前研究中常通过检测体内清除活性氧的酶类如超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GPX)、谷胱甘肽等和反映氧化应激水平的丙二醛等指标来间接反映活性氧和活性氮两类自由基的变化。

2.1 活性氧

活性氧是一类由氧形成、含有不成对电子且化

学性质比氧自身活泼的物质总称,研究表明, GD 患者甲状腺组织氧化应激明显增强^[4]。Duthoit 等^[5]研究发现,高浓度的 H_2O_2 能使甲状腺细胞内合成的甲状腺球蛋白裂解产生一个 40×10^3 的甲状腺球蛋白片段,它可进入到正常甲状腺细胞中,在触发甲状腺自身免疫性疾病反应过程中起重要作用。

Komosinska-Vashev 等^[6]对 GD 研究发现,反映红细胞内抗氧化的 SOD、CAT、GPX 活性较正常对照组分别增高了 84%、30%、54%,反映细胞外氧化应激的硫代巴比妥酸反应物(thiobarbituric acid-reacting substance, TBARS)增高了 187%,血浆巯基和红细胞溶解产物巯基水平分别降低了 20%和 24%,细胞外总抗氧化水平明显减低。研究认为红细胞抗氧化的增强主要是由于活性氧过度产生而继发合成增多所致。Bednarek 等^[7]检测了 47 例 GD 患者血浆抗氧化参数及细胞外氧化应激参数的变化,结果显示 GD 时患者 H_2O_2 、脂质过氧化氢、TBARS 水平明显升高, SOD、CAT 活性、血浆铜蓝蛋白水平明显增加。Ademoğlu 等^[4]研究发现, GD 患者血浆 TBARS 水平明显增高,总巯基水平明显减低,细胞外抗氧化防御系统代偿性增强。上述研究均认为, GD 时细胞外氧化应激加重,同时细胞外抗氧化防御也代偿性增强。但也有研究得出不同结果, Mayer 等^[8]测定了 14 例 GD 患者血浆 GPX 及红细胞内 SOD 活性,发现两者均较正常组减低。Abalovich 等^[9]报道, GD 患者红细胞内 SOD 和 CAT 的活性均明显减弱、谷胱甘肽水平明显减少,而血浆总抗氧化水平无明显改变,认为 GD 时发生的自由基改变首先出现在细胞水平,是机体细胞内抗氧化防御系统的减弱导致了甲亢患者的氧化应激损伤。

2.2 活性氮

活性氮是 NO 及其生物体内继发产物的统称, $O_2^{\cdot-}$ 可与 NO 迅速反应生成 ONOO-, 而 NO 与 ONOO-是生物体系中重要的活性氮。

2.2.1 NO

NO 由一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化 L-精氨酸与 O_2 反应而生成,生物体内 NO 水平主要受 NOS 活性的调节,而 NOS 的三种亚型,包括神经元型(neuronal NOS, nNOS),内皮型(endothelial NOS, eNOS)及诱导型(inducible NOS, iNOS)对 NO 的产生均存在一定的影响。

GD 患者血浆 NO 活性增高。Fernández 等^[10]研究发现, GD 可导致大鼠肝脏 NOS 活性的增强,且高代谢状态与 NO 的产生速率呈正相关,当甲状腺激素恢复正常水平时, NO 的量也恢复正常。Colin 等^[11]用反转录-PCR 和免疫组化方法检测了 GD 患者 eNOS 的基因表达,结果显示 GD 患者 eNOS 的 mRNA 水平明显增高,细胞免疫染色明显增强。López-Moratalla 等^[12]的研究发现, GD 患者单核细胞中没有 iNOS 表达,加入 Th1 后 iNOS 则出现表达,认为 Th1 及甲状腺自身抗原可诱导 iNOS 的表达,并可激活单核细胞,最终导致 GD 自身免疫反应的发生。Gerard 等^[13]的研究发现, GD 辅白白细胞介素 1α 和干扰素 γ 两种 Th1 细胞因子治疗时,甲状腺过氧化物酶和甲状腺氧化酶的蛋白表达降低,这种变化在加入 NOS 抑制剂 L-硝基精氨酸甲酯时受到抑制,表明 Th1 细胞因子对甲状腺过氧化物酶和甲状腺氧化酶的调节作用主要由 NO 介导。

2.2.2 ONOO-

ONOO-在体内由 NO 与 $O_2^{\cdot-}$ 快速反应而生成, ONOO-及其降解物 $\cdot OH$ 均可使脂质过氧化、DNA 链断裂,而其使酪氨酸硝化后的产物 3-硝基酪氨酸被认为是体内 ONOO-形成的生物标志。ONOO-可氧化蛋白质半胱氨酸残基,改变细胞的氧化还原状态,从而调节细胞氧化还原信号转导通路中不同水平多种信号分子的活性^[14]。有研究表明,氧化应激状态下产生的 ONOO-能够激活受体酪氨酸激酶依赖的信号转导通路(如生长因子受体)和非受体酪氨酸激酶依赖的信号转导通路(如 Src 家族),调节酪氨酸磷酸化^[14]。Alturfan 等^[15]检测了他巴唑致甲减 Wistar 大鼠动物模型的血浆 3-硝基酪氨酸水平,发现血浆 3-硝基酪氨酸较正常对照组明显减低,认为这种改变可因甲减时氧消耗及 $O_2^{\cdot-}$ 产生减少而出现,其详细机制有待进一步研究。

3 GD 时机体氧化应激对其他组织器官的影响

GD 时氧化应激也可导致机体其他组织器官的损伤。Hondur 等^[16]研究发现, GD 伴浸润性突眼患者眼眶纤维脂肪组织的脂质过氧化水平及 SOD、谷胱甘肽还原酶、GPX 活性明显增强,而谷胱甘肽水平则与眼病程度呈负相关。Mogulkoc 等^[17]观察了实验性甲亢 SD 大鼠心脏、肝脏和脑组织的部

分氧化及抗氧化防御参数的改变,发现实验性甲亢大鼠的上述三种组织中的丙二醛及谷胱甘肽水平均增加。Moreno等^[10]用不同剂量(10 $\mu\text{g/d}$ 、50 $\mu\text{g/d}$ 、75 $\mu\text{g/d}$)的L-甲状腺素喂饲48只Wistar大鼠致其甲亢后,发现大鼠肾脏皮质谷胱甘肽还原酶、GPX活性下降,下降程度与L-甲状腺素剂量呈正相关,而SOD下降仅出现在大剂量组,左心在50 $\mu\text{g/d}$ 和75 $\mu\text{g/d}$ 组CAT、SOD、谷胱甘肽还原酶、GPX活性下降,下降程度与剂量也呈正相关。

4 GD治疗后体内自由基的变化

4.1 抗甲状腺药物

GD患者经抗甲状腺药物治疗后反映体内氧化及抗氧化防御的参数均可发生改变。Ademoğlu等^[4]对比研究了GD患者经丙基硫氧嘧啶和他巴唑治疗后血浆及甲状腺组织中TBARS及总巯基水平的改变,发现丙基硫氧嘧啶治疗组TBARS水平较他巴唑治疗组明显减低,同时发现GD复发组TBARS水平较首次治疗组明显增高、总巯基水平明显减低,结果表明GD患者使用不同治疗药物、不同治疗结果对体内自由基有不同的影响。Bednarek等^[7]发现,治愈后的GD患者血浆 H_2O_2 、脂质过氧化氢、血浆铜蓝蛋白、TBARS水平以及SOD、CAT活性明显降低,而血浆GPX、谷胱甘肽还原酶活性增高。Komosinska-Vassev等^[6]的研究也得到了相似的结果。但Abalovich等^[9]的研究则显示,GD治愈后,红细胞内抗氧化体系CAT、SOD和谷胱甘肽的活性较治疗前分别增加了75%、87.5%和69.4%。上述研究表明,GD患者经抗甲状腺药物治疗后机体氧化应激损伤减轻,但酶抗氧化防御体系的活性变化不一,其详细机制仍不清楚。

4.2 ^{131}I

GD患者经 ^{131}I 治疗后,机体氧化和抗氧化参数也可发生改变。Abalovich等^[9]研究发现,GD患者 ^{131}I 治疗后红细胞内CAT和谷胱甘肽活性较 ^{131}I 治疗前分别增加了71.4%和81.2%,而红细胞内SOD活性及血浆总抗氧化水平的增加不具有统计学意义。Dani等^[19]报道,给予成年雌性Wistar大鼠3.7 MBq ^{131}I 一周后,大鼠红细胞裂解液中丙二醛、SOD及谷胱甘肽水平明显增高,CAT明显降低,而谷胱甘肽还原酶未发生明显变化;红细胞由盘状变成了棘形、球形等异常形状;当加入锌后,

可以明显减轻由照射所致的不良反应,表明锌具有辐射保护作用。Agote等^[20]为研究 ^{131}I 对大鼠氧化和抗氧化的影响,检测了三种NOS亚型及SOD、GPX、CAT的改变,他们将Wistar大鼠分为三组:尼克酰胺治疗组、 ^{131}I 治疗组及尼克酰胺+ ^{131}I 治疗组,发现尼克酰胺组和 ^{131}I 组均可使甲状腺组织eNOS表达增强及过氧化物产生增多,认为尼克酰胺可通过增加甲状腺组织血流,刺激NO的生成,导致甲状腺组织的氧化损伤;但未发现另外两种NOS亚型及SOD、GPX和CAT活性的改变。

综上所述,自由基氧化应激损伤与GD的发生和发展关系密切,随着对自由基研究的不断深入,寻找相关的高活性、多功能抗氧化剂,对阻止或减少自由基所致的甲状腺组织与人体其他重要器官损伤的发生、减轻 ^{131}I 治疗GD时照射所致的不良反应具有重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Sargis RM, Subbaiah PV. Protection of membrane cholesterol by sphingomyelin against free radical-mediated oxidation. *Free Radic Biol Med*, 2006, 40(12): 2092-2102.
- [2] Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 2003, 25(3-4): 207-218.
- [3] Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, et al. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med*, 2002, 32(11): 1102-1115.
- [4] Ademoğlu E, Ozbey N, Erbil Y, et al. Determination of oxidative stress in thyroid tissue and plasma of patients with Graves' disease. *Eur J Intern Med*, 2006, 17(8): 545-550.
- [5] Duthoit C, Estienne V, Giraud A, et al. Hydrogen peroxide-induced production of a 40 kDa immunoreactive thyroglobulin fragment in human thyroid cells: the onset of thyroid autoimmunity?. *Biochem J*, 2001, 360(pt 3): 557-562.
- [6] Komosinska-Vassev K, Olczyk K, Kucharz EJ, et al. Free radical activity and antioxidant defense mechanisms in patients with hyperthyroidism due to Graves' disease during therapy. *Clin Chim Acta*, 2000, 300(1-2): 107-117.
- [7] Bednarek J, Wysocki H, Sowiński J. Oxidative stress peripheral parameters in Graves' disease: the effect of methimazole treatment in patients with and without infiltrative ophthalmopathy. *Clin Biochem*, 2005, 38(1): 13-18.
- [8] Mayer L, Romić Z, Skreb F, et al. Antioxidants in patients with hyperthyroidism. *Clin Chem Lab Med*, 2004, 42(2): 154-158.
- [9] Abalovich M, Llesuy S, Gutierrez S, et al. Peripheral parameters of oxidative stress in Graves' disease: the effects of methimazole and ^{131}I treatments. *Clin Endocrinol*, 2003, 59(3): 321-327.

(下转第248页)

有学者检测了 3 Gy 照射后 GPR77⁺ (一种与过敏毒素 Csa 和 C3a 相关的 GPCR) 鼠的造血干细胞的再生能力, 发现与正常鼠比较, GPR77⁺ 鼠外周血白细胞的恢复有轻度的延缓^[9]。G 蛋白信号转导调控因子 1 也属于 GPCR。有学者调查了 γ 射线照射后一些基因在不同种类细胞表达的异同情况, 发现 Jurkat 细胞在 γ 射线照射后 G 蛋白信号转导调控因子 1 的表达下调, 但 TK6 细胞和 HFL1 细胞在照射后, G 蛋白信号转导调控因子 1 的表达则上调^[10]。

3 结语

虽然目前有关 GPCR 与辐射之间关系的研究还不够丰富, 但上述研究均显示, 多种 G 蛋白、GPCR 的功能和表达异常与辐射的病理生理过程密切相关。有理由相信, 加强辐射敏感靶点 GPCR 的筛选, 并深入探讨其分子机制, 对于充分认识辐射损伤机制及防治措施具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] 刘永学, 余少平. 孤儿 G 蛋白偶联受体及其作为新药靶点的重要意义. 中国药理学通报, 2003, 19(6): 601-604.
 - [2] Takóts A, Horváth G, Fülöp N, et al. Effect of irradiation on the GTP binding kinetics of chicken embryo brain plasma membranes. Acta Physiol Hung, 1995, 83(4): 343-353.
 - [3] Seo M, Lee YI, Cho CH, et al. Bi-directional regulation of UV-induced activation of P38 kinase and C-Jun N-terminal kinase by G protein beta gamma-subunits. J Biol Chem, 2002, 277 (27): 24197-24203.
 - [4] Seo M, Lee MJ, Heo JH, et al. G Protein betagamma subunits augment UVB-induced apoptosis by stimulating the release of soluble heparin-binding epidermal growth factor from human keratinocytes. J Biol Chem, 2007, 282(34): 24720-24730.
 - [5] Griffiths NM, Francois A, Dublineau I, et al. Exposure to either gamma or a mixed neutron/gamma field irradiation modifies vasoactive intestinal peptide receptor characteristics in membranes isolated from pig jejunum. Int J Radiat Biol, 1996, 70(3): 361-370.
 - [6] Kim SY, Seo M, Oh JM, et al. Inhibition of gamma ray-induced apoptosis by stimulatory heterotrimeric GTP binding protein involves Bcl-xL down-regulation in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. Exp Mol Med, 2007, 39(5): 583-593.
 - [7] Houchen CW, Sturmoski MA, Anant S, et al. Prosurvival and antiapoptotic effects of PGE₂ in radiation injury are mediated by EP₂ receptor in intestine. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003, 284(3): G490-G498.
 - [8] Tokuda N, Hamasaki K, Mizutani N, et al. Expression of PAC1 receptor in rat thymus after irradiation. Regul Pept, 2004, 123 (1-3): 167-172.
 - [9] Chen NJ, Mirtsos C, Suh D. C5L2 is critical for the biological activities of the anaphylatoxins C5a and C3a. Nature, 2007, 446 (7132): 203-207.
 - [10] Chaudhry MA. Analysis of gene expression in normal and cancer cells exposed to gamma-radiation. J Biomed Biotechnol, 2008, 2008: 541678.
- (收稿日期: 2009-03-27)
-
- (上接第 242 页)
- [10] Fernández V, Cornejo P, Tapia G, et al. Influence of hyperthyroidism on the activity of liver nitric oxide synthase in the rat. Nitric Oxide, 1997, 1(6): 463-468.
 - [11] Colin IM, Kopp P, Zbären J, et al. Expression of nitric oxide synthase III in human thyroid follicular cells: evidence for increased expression in hyperthyroidism. Eur J Endocrinol, 1997, 136(6): 649-655.
 - [12] López-Moratalla N, Calleja A, González A, et al. Inducible nitric oxide synthase in monocytes from patients with Graves' disease. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 226(3): 723-729.
 - [13] Gérard AC, Boucquoy M, van den Hove MF, et al. Expression of TPO and ThOXs in human thyrocytes is downregulated by IL-1alpha/IFN-gamma, an effect partially mediated by nitric oxide. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006, 291(2): 242-253.
 - [14] Klotz LO, Schroeder P, Sies H. Peroxynitrite signaling: receptor tyrosine kinases and activation of stress-responsive pathways. Free Radic Biol Med, 2002, 33(6): 737-743.
 - [15] Alturfan AA, Zengin E, Dariyerli N, et al. Investigation of zinc and copper levels in methimazole-induced hypothyroidism: relation with the oxidant-antioxidant status. Folia Biol (Praha), 2007, 53(5): 183-188.
 - [16] Hondur A, Konuk O, Dincel AS, et al. Oxidative stress and antioxidant activity in orbital fibroadipose tissue in Graves' ophthalmopathy. Curr Eye Res, 2008, 33(5): 421-427.
 - [17] Mogulkoc R, Baltaci AK, Oztekin E, et al. Melatonin prevents oxidant damage in various tissues of rats with hyperthyroidism. Life Sci, 2006, 79(3): 311-315.
 - [18] Moreno JM, Rodríguez Gómez I, Wangenstein R, et al. Cardiac and renal antioxidant enzymes and effects of tempol in hyperthyroid rats. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005, 289(5): E776-E783.
 - [19] Dani V, Dhawan D. Zinc as an antiperoxidative agent following iodine-131 induced changes on the antioxidant system and on the morphology of red blood cells in rats. Hell J Nucl Med, 2006, 9 (1): 22-26.
 - [20] Agote Robertson M, Finochietto P, Gamba CA, et al. Nicotinamide increases thyroid radiosensitivity by stimulating nitric oxide synthase expression and the generation of organic peroxides. Horm Metab Res, 2006, 38(1): 12-15.
- (收稿日期: 2009-04-20)