

梭曼中毒对大鼠心脏胆碱能信号系统作用的实验研究

刘 辉¹, 刘 勇², 吴 强², 郭魁亮¹

(1. 白求恩医学院卫勤教研室, 河北 石家庄 050081; 2. 第三军医大学毒理学教研室, 重庆 400038)

摘要: 目的 探讨梭曼中毒对心脏胆碱能信号通路的影响。方法 利用 RT-PCR 技术检测心肌乙酰胆碱能受体 (M_2 受体) mRNA 的表达, 以蛋白印迹法 (Western blot technique) 检测抑制性鸟苷酸结合蛋白 ($G_{i\alpha}$) 含量, 放射免疫法测定环磷腺苷 (cAMP) 浓度及酶放射化学分析测定腺苷酸环化酶 (AC)、蛋白激酶 A (PKA) 活性。结果 与正常对照组相比, 梭曼中毒大鼠心肌 M_2 受体 mRNA 的表达和 $G_{i\alpha}$ 含量均明显降低, cAMP 浓度及 AC、PKA 活性显著升高。结论 胆碱能信号的异常增强可能是梭曼中毒引起心功能损伤的重要原因之一。

关键词: 梭曼; 中毒; 心脏; 胆碱能信号; 实验研究

中图分类号: O623.627 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2003)04-0209-03

Experimental studies on the effects of soman intoxication on cholinergic signal transducing system in rat heart

LIU Hui¹, LIU Yong², WU Qiang², GUO Kui-liang¹

(1. Department of Health Service, Norman Bethune Military Medical College, Shijiazhuang 050081, China; 2. Department of Toxicology, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of soman intoxication on cholinergic signal transducing system in rat heart. **Method** The expression of acetylcholinergic receptor M_2 mRNA was detected by RT-PCR technique and concentration of inhibitory guanylic acid integrated protein ($G_{i\alpha}$) in the rat myocardium was measured with Western blot technique. Concentration of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) was measured with radioimmunoassay (RIA), activities of adenosine cyclase (AC) and protein kinase A (PKA) were measured by enzymic radiochemical methods with $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$. **Result** The expression of M_2 receptor mRNA in the rat hearts was down-regulated significantly by soman intoxication, as compared with the controls ($P < 0.01$), and dropped to the lowest six hours after intoxication. $G_{i\alpha}$ concentration decreased by 12.2% ($P < 0.05$), 15.6% ($P < 0.01$), and 20.6% ($P < 0.01$) at the time of 6 hours, 12 hours and 24 hours after intoxication, respectively, while concentration of cAMP and activities of AC and PKA increased markedly in the rats with soman intoxication. **Conclusion** Abnormal enhancement of cholinergic signal transducing system could play an important role in heart injury induced by soman intoxication in rats.

Key words: Soman; Intoxication; Heart; Cholinergic signal transducing system; Experimental study

梭曼 (soman) 属有机磷酸酯类化合物, 急性梭曼中毒主要表现为心脏功能抑制^[1]。本研究采用梭曼中毒大鼠为模型, 观察梭曼对心脏胆碱能信号系统的作用, 进而揭示梭曼中毒心脏功能损伤机制, 为有机磷中毒的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

梭曼, 纯度 94.6%, 军事医学科学院提供, 临用前用 1, 3-丙二醇配制成母液; Tripure (Roche 公司); Oligo (dT)₁₅、Taq DNA 聚合酶、AMV 逆转录酶 (Promega 公司); 兔抗鼠 $G_{i\alpha}$ 抗体为 Santa Cruz 产品;

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ 北京亚辉生物医学工程公司提供; cAMP 试剂盒购自上海中医药大学。紫外分光光度仪; 低温高速离心机; PCR 扩增仪; 全自动凝胶图象分析系统; 低压舱 (本室自制); 液闪记数仪 KB-21。

1.2 实验动物分组

Wistar 大鼠 94 只, 雌雄各半, 体质量 180 ~ 220 g, 由第三军医大学动物所提供。随机分为正常对照组 (14 只) 和梭曼中毒组 (80 只)。梭曼中毒组动物皮下注射 $72\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (0.8 LD₅₀) 梭曼, 中毒后约 10 min 开始出现中毒症状, 如呼吸减慢、流泪、流涎、抽搐、强直、惊厥等, 共计死亡 24 只。取出现明显神经中毒症状且存活动物 56 只, 分别于中毒后 2、6、12、24 h 断头处死并取心脏置液氮中保存备用, 各时间点动物均为 14 只。其中, 各组取 4 只动物用于 RT-PCR 检测, 4 只动

收稿日期: 2003-01-20; 修回日期: 2003-04-24

作者简介: 刘辉 (1974-), 吉林通化人, 硕士, 讲师, 研究方向: 高原有机磷中毒机制。

物用于 Western blot 杂交分析, 余 6 只动物用于 AC、PKA 活性和 cAMP 含量测定。

1. 3 RT-PCR 检测心肌 M₂ 受体 mRNA 的表达

PCR 引物由上海生工生物工程公司合成, 设 G₃PDH 阳性产物作为 PCR 内参照。M₂ 受体和 G₃PDH 扩增片段长度分别为 790 bp 和 983 bp, 引物序列 M₂ 受体: 5'-TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG GT-3', 5'-CGG AGC ATG GGC GCA ATG ATG G-3'; G₃PDH: 5'-GAA CAC AAC AAG ATC CAG AAT GGC AAG-3', 5'-CGG AGC ATG GGC GCA GTC CAC CAC-3'。

逆转录反应体系包括 4 μg RNA、oligo (dT)₁₅、RNA 酶抑制剂、dNTPs、5× RT 缓冲液和 AMV 逆转录酶, 反应体积为 20 μl。采取 M₂ 受体和 G₃PDH 同管扩增的方法, PCR 循环参数为: 95 ℃预变性 5 min 后进入循环, 95 ℃变性 30 s, 60 ℃复性 30 s, 72 ℃延伸 45 s, 循环 30 次, 最后 72 ℃额外延伸 10 min。每一个样品采用 3 管平行扩增, 并且重复 1 次。

1. 4 G 蛋白的 Western blot 杂交分析

参照文献 [2, 3] 操作, 心肌膜蛋白经 11% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后用电转移法转移蛋白至 PVDF 膜上, 1% BSA 封闭 4 ℃过夜, 加入 1:1 000 稀释的兔抗鼠 G_{iα} 抗体孵育 1 h, 再用 1:1 500 稀释的辣根过氧化物酶标记的 IgG 孵育 3 h, 最后用 DAB 溶液显色并用图象分析系统进行分析。

1. 5 腺苷酸环化酶 (AC) 活性测定

AC 活性采用非标记 ATP 为底物的方法^[4]测定, 酶的活性以 AC 催化净生成的 cAMP 量表示, 即 pmol·(min·mg protein)⁻¹。

1. 6 环磷腺苷 (cAMP) 含量测定

采用上海中医药大学同位素室提供的 [¹²⁵I] 放免试剂盒测定沉淀的 γ 放射性, 具体操作参照 [¹²⁵I]-cAMP RIA Kit 说明进行, 单位以 pmol·mg protein⁻¹ 表示。

1. 7 蛋白激酶 A (PKA) 活性测定

具体操作参照文献 [5]。

1. 8 统计学分析

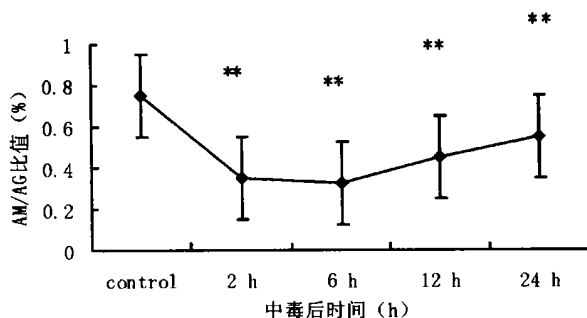
实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Excel 5.0 版专用统计分析程序包对各组数据进行单因素方差分析。

2 结果

2. 1 梭曼中毒大鼠心肌 M₂ 受体 mRNA 表达的变化

利用全自动凝胶成像系统对 M₂ 受体和 G₃PDH 扩增产物带进行图像分析, 测出各扩增带曲线下面积的光密度值 (A), 实验结果以同一样品 M₂ 受体扩增带的光密度 (AM) 与 G₃PDH 扩增带的光密度 (AG) 的

比值表示。与正常对照组相比, 梭曼中毒组各时间点心肌 M₂ 受体 mRNA 表达均明显降低 ($P < 0.01$), 在染毒 6 h 时降至最低, 如图 1。

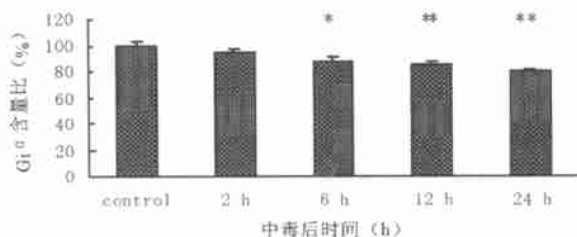


与正常对照组比较 ** $P < 0.01$

图 1 急性梭曼中毒大鼠心肌 M₂ 受体 mRNA 表达的变化

2. 2 心肌抑制性 G 蛋白 α 亚单位含量的变化

实验结果显示, 与正常对照比较, 梭曼中毒 2 h 时心肌 G_{iα} 含量降低并不明显, 在染毒后 6、12、24 h 分别降低 12.2% ($P < 0.05$)、15.6% ($P < 0.01$)、20.6% ($P < 0.01$), 如图 2。



与正常对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 2 急性梭曼中毒大鼠心肌 G_{iα} 含量的变化

2. 3 AC、PKA 活性和 cAMP 含量的变化

与正常对照组相比, 梭曼中毒组大鼠心肌 AC 活性呈升高趋势, 在染毒后 12、24 h AC 活性显著升高; 梭曼中毒组大鼠心肌 PKA 活性呈升高趋势, 在染毒后 12、24 h 活性显著增强 ($P < 0.01$); 见表 1。

3 讨论

以往研究发现, 急性梭曼中毒可对心脏功能产生直接影响^[1], 表现为心功能由早期暂时性兴奋转入进行性抑制, 大鼠心脏收缩性能指标如左心室压力 (LVP)、左室压最大上升速率 ($+dp/dt_{max}$)、左心室收缩成分的缩短速率 (V_{ce-50}) 等明显降低。Worek 等研究发现, 动物梭曼中毒后, 心脏功能会受到严重抑制, 其机制可能与梭曼的胆碱能作用有关^[9]。本实验对梭曼中毒心脏功能损伤的胆碱能机制进行了深入研究。

表 1 梭曼中毒大鼠心肌 AC、PKA 活性及 cAMP 含量的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	动物数 (只)	AC[pmol·(min·mg prot) ⁻¹]	cAMP[pmol·(mg prot) ⁻¹]	PKA[pmol·(min·mg prot) ⁻¹]
正常对照组	6	5.65±1.21	11.23±1.07	110.15±22.71
中毒组 2 h	6	5.81±1.08	12.73±2.35	131.33±19.46
6 h	6	5.95±1.34	13.98±1.77 **	138.00±23.96
12 h	6	6.20±1.27 *	15.51±1.35 **	155.67±20.76 **
24 h	6	7.65±1.34 **	17.10±1.68 **	177.82±27.01 **

与正常对照组比较 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

胆碱能受体是机体胆碱能系统的重要组成部分, 心肌中分布最多的胆碱能受体是 M₂ 受体亚型。配体与 M₂ 受体结合后引起受体结构发生改变, 与心肌抑制性 G 蛋白偶联介导环磷腺苷-蛋白激酶 A (cAMP-PKA) 信号系统, 影响细胞内第二信使 (cAMP) 的生成, 第二信使作用于相应的靶分子 (PKA) 并使之构象改变, 从而影响细胞的代谢过程和基因表达等功能^[7]。本研究发现, 梭曼中毒大鼠心肌 M₂ 受体显著下调, 在中毒后 6 h 降至最低 ($P < 0.01$), 心肌 G α 含量在中毒后呈下降趋势, 至 24 h 降至正常对照的 79.4% ($P < 0.01$), AC 活性、cAMP 含量和 PKA 活性均出现了显著升高。我们认为 M₂ 胆碱能受体下调是由于梭曼抑制 AChE 活性, 导致神经递质 ACh 在突触间隙大量蓄积, 刺激胆碱能受体的一种适应性调节, 是毒剂对 AChE 抑制后的继发效应, 同时也是机体对毒剂中毒产生耐受性的原因之一。G 蛋白是细胞内信息传递过程中一种重要的生物大分子^[8], 已有研究证实, 机体胆碱能系统功能的发挥, 受到 G 蛋白的制约和调控^[9]。急性梭曼中毒引起的 G α 含量降低可能是由于干扰了 G 蛋白的正常代谢 (基因转录、翻译或蛋白降解) 过程, 其分子机制有待于进一步深入研究。cAMP-PKA 信号传导系统是体内重要的第二信使系统, 外界刺激信号作用于受体时, 受体活化, 与 G 蛋白偶联并使之激活, 活化的 G 蛋白即可通过激活其下游效应分子 AC, 促使细胞质产生 cAMP, 胞内信使 cAMP 产生以后, 主要通过依赖 cAMP 的蛋白激酶 A 参与的蛋白磷酸化作用引起一系列的生理生化效应。本实验发现, 急性梭曼中毒可导致 cAMP-PKA 信号系统过度激活, cAMP 含量和 PKA 活性出现非常显著的升高, 可能是引起心脏功能损害的重要原因之一。如心肌细胞 cAMP 含量增加, 可通过 PKA 导致心肌慢钙通道蛋白磷酸化, 从而使慢钙通道开放数目和时间增加, Ca²⁺ 内流增加, 引起心肌迟后除极化, 细胞脱偶联, 传导减慢, 心律失常 (心动过速、室颤) 的发生率也随之上升^[10]。

综上所述, 梭曼中毒引起心肌 M₂ 受体下调以及 G α 含量的变化改变了两者之间偶联的有效性, 异常激活或抑制相应的酶 (AC、蛋白激酶 C 等), 改变第二信使在细胞内的含量或分布, 引起心肌细胞和心脏功能损害。值得提出的是, 细胞信号传导是一个十分复杂的系统, 不但受各种外界因素的调控, 同时细胞内各信号系统间也存在相互协调作用, 这就要求我们在分析梭曼中毒心脏毒性效应的时候, 要充分注意到各信号系统间的相互作用和相互联系。

参考文献:

[1] 刘勇, 程天民, 王仕丽. 梭曼中毒对大鼠心功能的影响 [J]. 第三军医大学学报, 1998, 20 (6): 13-15.

[2] 周元国, 王正国. 蛋白免疫印迹法在 G 蛋白检测中的应用 [J]. 第三军医大学学报, 1998, 20 (2): 145-147.

[3] Lombardi MS, Kavalars A, Combelens PM, et al. Adjuvant arthritis induces down-regulation of G protein-coupled receptor kinases in the immune system [J]. J Immunol, 2001, 166 (3): 1635-1640.

[4] 杨玉梅, 许翠英, 徐继辉, 等. 广枣总黄酮对离体大鼠心脏 cAMP 含量和腺苷酸环化酶活性的影响 [J]. 中国民族医药杂志, 2001, 7 (1): 34-35.

[5] 方芳, 陈轶琨, 王小明. 吗啡长期作用对小鼠脑组织蛋白激酶 A 及 C 活性的影响 [J]. 基础医学与临床, 1997, 17 (2): 116-120.

[6] Worek F, Kleine A, Falke K, et al. Arrhythmias in organophosphate poisoning: effects of atropine and bispyridinium oximes [J]. Arch Int pharmacodyn Ther, 1995, 329 (3): 418.

[7] Kostic TS, Tomic M, Antric SA, et al. Calcium-independent and cAMP-dependent modulation of soluble guanylyl cyclase activity by G protein-coupled receptors in pituitary cells [J]. J Biol Chem, 2002, 277 (19): 16412-16418.

[8] Nishida M, Takagahara S, Manyama Y, et al. G beta gamma counteracts G alpha (q) signaling upon alpha (1)-adrenergic receptor stimulation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 291 (4): 995-1000.

[9] 高占国, 刘传饒. 毒蕈碱样乙酰胆碱受体功能的分子基础 [J]. 中国药理学通报, 1997, 13 (4): 292-294.

[10] Lubbe WF, Podzuweit T, Opej LH. Potential arrhythmogenic role of cyclic adenosine monophosphate and cytosolic calcium overload: implications for prophylactic effects of beta-blockers in myocardium infarction and prearrhythmic effects of phosphodiesterase inhibitors [J]. J AM Coll Cardiol, 1992, 19 (7): 1622-1633.