文章编号:1000-5404(2005)04-0287-04

论著

M乙酰胆碱受体在缺氧复合梭曼中毒大鼠脑损伤中的作用研究

吴 强[1],杨和平[2],高钰琪[3],袁发焕[4],李云鹏[1],赵吉青[1],董兆君[1] (第三军医大学:[1]预防医学院军事毒理学教研室,[2]西南医院呼吸内科,[3]高原军事医学系,重庆 400038,[4]新桥医院肾内科,全军肾脏病中心,重庆市肾病研究所,重庆 400037)

提 要:目的 探讨毒蕈碱样乙酰胆碱受体(M受体)在缺氧复合梭曼中毒脑损伤中的作用。**方法** 实验大鼠随机分为正常对照组、梭曼中毒组、缺氧组和缺氧复合梭曼中毒组。利用受体放射性配基结合法、Western blot、放射免疫和酶放射化学分析分别检测皮层、海马和纹状体M受体密度和亲和力、Giα蛋白含量、cAMP浓度及PKA活性。**结果** 与平原中毒组相比,缺氧复合梭曼中毒组皮层和纹状体 B_{max} 增加,海马和纹状体Kd值降低;复合致伤组皮层、海马和纹状体Giα蛋白含量分别比单纯梭曼中毒组降低了15.48%、8.56%和28.20%;各脑区cAMP浓度及PKA活性显著升高,分别较梭曼中毒组升高了79.51%、84.75%、52.92%和78.93%、44.32%、39.05%;M受体阻断剂阿托品可部分阻断梭曼中毒和/或缺氧所致的PKA活性的升高。**结论** 复合致伤引起的M受体上调,cAMP-PKA信号系统的异常增强,在缺氧复合梭曼中毒脑损伤中可能是缺氧复合梭曼中毒毒性效应增强的重要原因之一。

关键词: M乙酰胆碱受体;缺氧;脑损伤
中图法分类号: R392.11; R742; R914.4 **文献标识码:** A

Roles of muscarinic acetylcholine receptor in brain injuries induced by soman intoxication combined with hypoxia

WU Qiang[1], YANG He-ping[2], GAO Yu-qi[3], YUAN Fa-huan[4], LI Yun-peng[1], ZHAO Ji-qing[1], DONG Zhao-jun[1] ([1]Department of Military Toxicology, College of Preventive Medicine, [2]Department of Respiratory Diseases, Southwest Hospital, [3]Department of High Altitude Military Medicine, Chongqing 400038, [4]Renal Diseases Research Center, Xiqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To explore the roles of muscarinic acetylcholine receptor (M receptor) in rat brain injuries after soman intoxication combined with hypoxia. **Methods** Experimental Wistar rats were randomly divided into four groups: normal control group, soman intoxication group, and hypoxia combined soman intoxication group. The density and affinity of M receptor in the rat cortex, hippocampus, and striatum were detected by receptor radioligand binding method. The content of Giα and concentration of cAMP were determined by Western blot and radioimmunoassay (RIA), and [γ-^{32}P] ATP was used to determine the activity of PKA. **Results** Compared with those in the soman intoxication group, the M receptor Bmax in the rat cortex and striatum increased and Kd in the hippocampus and striatum decreased markedly. The content of Giα in the cortex, hippocampus, and striatum in the hypoxia combined soman intoxication group decreased by 15.48%, 8.56%, and 28.20% respectively. The contents of Giα and concentrations of cAMP in the three brain regions were increased 79.51%, 84.75%, and 52.92%, and 78.93%, 44.32%, and 39.05%, respectively. The muscarinic receptor antagonists atropine could reduce the increase of PKA activity induced by hypoxia or/and soman intoxication. **Conclusion** Effects of hypoxia combined with soman intoxication on cholinergic signal transduction system are confirmed by the up-regulation of muscarinic acetylcholine receptor, suppression of Giα expression, cAMP formation and increase in PKA activity. This enhancement may play an important role in the mechanism of brain damages induced by hypoxia combined with soman intoxication.

Key words: muscarinic acetylcholine receptor; hypoxia; brain injury

梭曼(soman)属于速杀性化学战剂,可以迅速地抑制体内乙酰胆碱酯酶(AChE),导致胆碱能神经末梢释放的乙酰胆碱(ACh)积累,持续作用于乙酰胆碱受体,引发动物出现呼吸困难、肌颤、惊厥,甚至死亡[1]。快速进驻高原地区可造成机体缺氧性损伤,高原缺氧复合梭曼中毒可加大其毒性。这种低氧所致的脑损伤至今对其发病机制尚不十分清楚,因而也缺少有效的防

基金项目:第三军医大学军事医学创新科研基金资助项目(2004)
Supported by the Foundation for Innovation of Military Medical Research of Third Military Medical University (2004)
作者简介:吴 强(1971-),男,四川省成都市人,博士研究生,讲师,主要从事农药神经毒理学方面的研究,发表论文10余篇,现在第三军医大学训练部研究生处。电话:(023)68752356
通讯作者:董兆君,电话:(023)68752285
收稿日期:2004-10-18;修回日期:2005-01-06

治措施。毒蕈碱样乙酰胆碱受体(M受体)是体内分布广泛的受体之一,在机体的病理生理机制中有十分重要得地位。有研究表明,中枢M受体是梭曼中毒和缺氧损伤共同作用的重要位点。本研究以缺氧复合梭曼中毒大鼠为实验模型,探讨了缺氧条件下梭曼中毒对大鼠脑组织M受体及其耦联的信号传导的影响,拟进一步阐明高原环境下梭曼中毒中枢神经功能损害特点和机制,为提高高原环境条件下神经性毒剂中毒的预防和救治水平提供理论依据。

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;[^{3}H]-QNB为Amersham产品,总放射性1 887 kBq/nmol;兔抗鼠Giα抗体为SantaCruz产品;[γ ^{32}P] ATP由北京亚辉生物医学工程公司提供;cAMP试剂盒购自上海中医学院;UV2201紫外分光光度仪为日本岛津公司产品;凝胶图像分析系统为美国UVP产品;小动物低压舱本室自制。

1.2 实验动物模型

Wistar大鼠,雌雄不拘,体质量(250 ± 30)g,由第三军医大学实验动物中心提供。随机分为正常对照组(A)、梭曼中毒组(B)、高原缺氧组(C)和缺氧复合梭曼中毒组(D)。梭曼中毒组动物皮下注射梭曼(72 μg/kg,对照组以生理盐水代替),分别于中毒后24 h断头处死,缺氧复合梭曼中毒组预先于低压舱(相当于高原4 000 m)停留6 h后注射相同剂量的梭曼,继续减压24 h后处死取样;阿托品阻断组于致伤前肌肉注射阿托品生理盐水溶液20 mg/kg,其余操作同前;各组保证存活6只动物。

1.3 脑组织M受体的[^{3}H]-QNB结合分析[2]

分离的脑组织以0.32 mol/L蔗糖溶液匀浆,1 000 × g 离心10 min,取上清用于膜受体分析;反应介质为0.05 mol/L,pH 7.4磷酸盐缓冲液,非特异管中加入1 μmol/L的阿托品。受体分析结果作饱和曲线和Scatchard图,以B_{max}表示受体密度、解离常数Kd表示亲和力(Kd值与亲和力成反比)。

1.4 G蛋白的Western blot杂交分析[3]

低温下分离组织,将其置于含0.4 mmol/L PMSF、1 μmol/L Pepstatin A、1 mmol/L邻菲咯啉、1 mmol/L碘乙酰胺的磷酸盐缓冲液(pH 7.4)中匀浆制备蛋白,制备的蛋白样品经11%的聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转印转移至PVDF上。PVDF膜以5%脱脂奶粉封闭后,与抗Giα抗体4 ℃过夜,以含0.5% Tween-20的PBS充分洗涤,再与辣根过氧化物酶标记的IgG反应,DAB反应液显色并用图像分析系统进行分析。

1.5 cAMP含量测定

采用上海中医学院同位素室提供的[^{125}I]放免试剂盒测定沉淀的γ放射性,具体操作参照^{125}I-cAMP RIA Kit说明进行,单位以pmol/mg表示。

1.6 PKA活性测定

参照文献[4]进行,酶反应总体积为25 μl,含Tris 20 mmol/L pH 7.4, HistoneBA 0.8 μg/μl, $MgCl_2$ 5 mmol/L, ATP 0.1 mmol/L, [γ-^{32}P]ATP 0.014 8 Bq, cAMP 2 μmol/L或0.5 mmol/L Tris(pH 7.4)及5 μl酶液,于25 ℃反应30 min,取反应液加在滤膜上晾干后,用75 mmol/L磷酸缓冲液洗2 × 15 min。取出烤干,于液闪仪上测其放射性强度。酶活性以每mg蛋白每分钟转移^{32}P的pmol数表示。

1.7 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS10.0统计软件行双因素方差。

2 结果

2.1 缺氧复合梭曼中毒大鼠脑组织M受体密度和亲和力的变化

M受体[^{3}H]-QNB结合分析结果显示(表1),梭曼中毒和缺氧致伤组各脑区M受体B_{max}和Kd值出现不同程度的变化。梭曼中毒组脑组织B_{max}降低、Kd值升高,且与正常对照相比均具有显著性差异($P < 0.05$);缺氧致伤组B_{max}仅纹状体出现显著性升高($P < 0.01$),海马和纹状体Kd值出现显著性降低($P < 0.01$)。复合致伤组仅海马脑区B_{max}与正常对照相比有显著性差异($P < 0.05$),皮层和纹状体B_{max}与正常对照相比无显著性差异,但明显高于单纯梭曼中毒组($P < 0.05$);皮层和海马复合致伤组Kd值显著高于正常对照阻,且海马Kd值与梭曼中毒组比较有非常显著的差异($P < 0.01$),纹状体Kd值有升高趋势,但与正常对照和梭曼中毒组比较均无显著性差异。

表1 缺氧复合梭曼中毒大鼠脑组织M受体密度和亲和力的变化 ($n = 4, \bar{x} \pm s$)

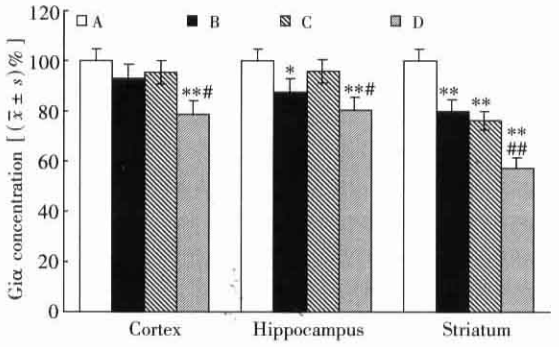
Tab 1 Density and affinity of muscarinic receptor in the rat brain at 24 h after injuries induced by soman intoxication and hypoxia ($n = 4, \bar{x} \pm s$)

Group		Brain regions		
		Cortex	Hippocampus	Striatum
B_{max} (fmol/mg)	A	17 280.03 ± 203.12	1 338.29 ± 107.64	2 141.38 ± 93.24
	B	1 582.17 ± 128.56*	1 100.17 ± 53.77*	1 524.91 ± 69.81**
	C	1 828.27 ± 157.38	1 477.52 ± 72.92	2 683.73 ± 133.01**
	D	1 741.68 ± 134.34#	1 074.61 ± 126.26*	2 109.21 ± 106.52##
Kd (nmol/L)	A	0.086 ± 0.006	0.133 ± 0.008	0.109 ± 0.020
	B	0.112 ± 0.007*	0.169 ± 0.008**	0.155 ± 0.018*
	C	0.085 ± 0.006	0.059 ± 0.009**	0.076 ± 0.009**
	D	0.123 ± 0.018**	0.084 ± 0.008**##	0.125 ± 0.028

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, *vs* A; #: $P < 0.05$, ##: $P < 0.01$, *vs* B

2.2 缺氧复合梭曼中毒大鼠脑组织抑制性G蛋白α亚单位含量的变化

免疫印迹结果显示(图1),梭曼中毒、高原缺氧单一或复合致伤均可导致脑组织Giα蛋白含量出现不同程度的降低,不同脑区Giα的变化对梭曼和缺氧的敏感程度不完全相同,与对照组相比较,皮层仅复合致伤组出现显著性差异($P < 0.01$),海马脑区梭曼中毒组和复合致伤组出现显著性差异($P < 0.05$),纹状体变化最为显著,3个实验组均出现显著性差异($P < 0.01$);3个脑区复合致伤组Giα蛋白含量降低程度均明显大于单纯梭曼中毒组,分别比单纯梭曼中毒组降低了15.48%、8.56%和28.20%。



*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* A；#：$P<0.05$，##：$P<0.01$，*vs* B

图 1　缺氧复合梭曼中毒大鼠脑组织 G 蛋白 α 亚单位含量的变化（$n=4$）

Fig 1　Changes of Giα subunit concentration in the rat brain at 2 h after injuries induced by soman intoxication and hypoxia（$n=4$）

2.3　缺氧复合梭曼中毒大鼠脑组织 cAMP 含量的变化

放免测定结果显示（表 2），正常大鼠皮层、海马和纹状体 cAMP 的含量分别为 33.65、63.47、45.53 pmol/mg。梭曼中毒和缺氧致伤均可导致上述 3 个脑区 cAMP 含量增加，缺氧损伤升高幅度更为明显，复合致伤大鼠各脑区 cAMP 含量较正常对照显著升高（$P<0.01$），且远远高于单纯梭曼中毒组（$P<0.01$），分别较单纯梭曼中毒组升高了 79.51%、84.75% 和 52.92%。

表 2　缺氧复合梭曼大鼠脑组织 cAMP 含量的变化（$n=4$，$\bar{x}\pm s$，pmol/mg）

Tab 2　cAMP concentration in the rat brain at 24 h after injuries induced by soman intoxication and hypoxia（$n=4$，$\bar{x}\pm s$，pmol/mg）

Group	Brain regions		
	Cortex	Hippocampus	Striatum
A	33.65 ± 3.03	63.47 ± 5.71	45.53 ± 7.51
B	37.48 ± 3.62	73.65 ± 6.05*	63.78 ± 4.88**
C	56.73 ± 8.20**	103.85 ± 16.18**	76.58 ± 7.78**
D	67.28 ± 5.55**##	136.07 ± 14.82**##	97.53 ± 10.40**##

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* A；#：$P<0.05$，##：$P<0.01$，*vs* B

2.4　缺氧复合梭曼中毒大鼠脑组织 PKA 活性的变化及阿托品的阻断作用

酶放射分析结果显示（表 3），所观察的 3 个脑区中，以海马 PKA 活性最高，纹状体其次，皮层最低，与 cAMP 的分布一致。单纯梭曼中毒或缺氧致伤都可导致各脑区 PKA 活性增加，缺氧致伤增加幅度更大，3 个脑区中纹状体变化最为显著。复合致伤各脑区 PKA 活性持续升高，且远高于单纯中毒组（$P<0.01$），分别较单纯梭曼中毒组升高了 78.93%、44.32% 和 39.05%。阿托品阻断各实验组与非阿托品组相比，PKA 活性呈明显下降趋势，但仍不同程度地高于的正常对照组。阿托品 + 梭曼中毒组 PKA 活性基本下降到正常对照水平，显著低于梭曼中毒组（$P<0.05$）；阿托品 + 高原缺氧组仍高于正常对照组（$P<0.05$），显著低于高原缺氧组（$P<0.05$）；阿托品 + 复合致伤组变化趋势与阿托品 + 高原缺氧组基本一致。

表 3　缺氧条件下梭曼中毒大鼠脑组织 PKA 活性的变化（$n=4$，$\bar{x}\pm s$，$pmol\cdot mg^{-1}\cdot min^{-1}$）

Tab 3　PKA activity in rats brain 24 h after soman intoxication and hypoxia combined injuries（$n=4$，$\bar{x}\pm s$，$pmol\cdot mg^{-1}\cdot min^{-1}$）

Group	Atropine	Brain Regions		
		Cortex	Hippocampus	Striatum
A	−	5.66 ± 0.58	16.92 ± 2.16	8.61 ± 0.78
	+	5.25 ± 0.85	16.19 ± 3.24	9.02 ± 0.86
B	−	7.31 ± 1.94*	24.91 ± 3.69**	13.29 ± 1.61**
	+	6.38 ± 1.04△	18.58 ± 2.64△	9.11 ± 1.59△△
C	−	8.41 ± 1.63*	26.37 ± 2.29**	14.98 ± 2.56**
	+	7.26 ± 0.95*△	19.96 ± 3.06*△	11.67 ± 1.76*△
D	−	13.08 ± 1.55**##	35.95 ± 3.20**##	18.48 ± 2.79**##
	+	9.21 ± 1.87*△	21.47 ± 2.42*△△	12.48 ± 2.45*△△

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* A；#：$P<0.05$，##：$P<0.01$，*vs* B；△：$P<0.05$，△△：$P<0.01$，*vs* atropine（−）

3　讨论

高原环境中氧分压和氧含量均明显低于平原，是一种缺氧状态，特别对在紧急情况下进驻高原的人员来说，缺氧可能诱发体内各系统功能改变，引起多种高山病症。梭曼是一种毒性很强的有机磷酸酯类化合物，在高原缺氧环境中，梭曼等有机磷化合物毒性效应明显增强[5]，但机制尚未完全阐明。

毒蕈碱样胆碱能受体（muscarine cholinergic receptor，M 受体）是胆碱能系统的重要组成部分，广泛分布于中枢及外周神经组织、心脏、平滑肌及各种腺体。在配体的作用下，M 受体通过不同的鸟苷酸调节蛋白（guanine nucleotide binding protein，G 蛋白）耦联引起一系列生理生化效应，如血管平滑肌舒张、心率减慢、心肌收缩力减弱、胃肠道和膀胱平滑肌收缩加强、腺苷酸环化酶（AC）活性改变、肌醇磷脂系统激活及离子通道的开放或关闭等[6]。G 蛋白由 α、β、γ 3 种亚基组成，与受体接触的是 α 亚基，目前发现的 α 亚基已有 20 余种，其中 M 受体与 Gi、Gs、Gq、Gk 等关系密切。M2 受体主要与 Gi 蛋白发生耦联，其作用是抑制 AC，使细胞内 cAMP 含量下降，导致 PKA 活性下降，从而使细胞膜 Ca^{2+} 传导下降，K^+ 通道活化等[7]。皮层、海马及纹状体是中枢神经系统中重要的功能核团，富含胆碱能纤维和 M 受体，是神经性毒剂和缺氧损伤的重要靶器官[8]。Chunchill 等[9] 观察到，梭曼中毒大鼠的脑组织与[^{3}H]-QNB 的结合降低，表现为受体数目的下降，其中梨状体皮质最明显，惊厥停止后，M 受体数目开始增加，10 d 后受体数目恢复到正常对照的水平，认为该部位[^{3}H]-QNB 结合位点的减少可能与惊厥扩散有关。Yang 等[10] 在实验中发现，沙林、梭曼及 VX 中毒后猪气管上皮与[^{3}H]-QNB 和[^{3}H]-NMS 的结合分别下降了 60% ~ 65%、65% ~ 73%，而 Kd 值无明显变化。本实

验研究表明，与平原中毒组相比，缺氧中毒组大鼠脑组织M受体密度和亲和力增加，抑制性G蛋白含量降低，第二信使cAMP含量明显升高。可见高原缺氧引起的中枢胆碱能受体上调、Giα降低，使胆碱能受体与G蛋白耦联加强，激活或抑制相关的酶及离子通道，导致细胞内信号传导的异常增强，表现为下游效应分子AC活性增强，细胞内信使cAMP含量显著增加，靶分子PKA活性异常升高，引起脑组织蛋白酶、离子通道和某些转录因子磷酸化并改变其活性状态，从而导致中枢神经功能损害加重。阿托品是M受体的特异性阻断剂，我们发现，经阿托品阻断后，梭曼中毒和/或缺氧损伤各组PKA活性出现不同程度的下降，但并未完全恢复至正常水平，由此我们推测，复合致伤导致的PKA活性的上升仅部分来源于M受体上调及其介导的cAMP-PKA信号通路的改变，即除M受体外，非胆碱能机制也参与了高原缺氧环境下梭曼的中枢毒性效应[5]。高原缺氧引起的中枢神经肾上腺素能信号传导功能障碍、兴奋性氨基酸、钙信号通路改变、自由基产生以及细胞微环境的改变等，也可能是梭曼毒性升高的重要原因，其机制还有待于进一步研究加以证实。

参考文献：

[1] Williams A J, Berti R, Yao C, *et al*. Central neuro-inflammatory gene response following soman exposure in the rat[J]. Neurosci Lett, 2003, 349(3): 147-150.

[2] Lyeth B G, Jiang J Y, Delahunty T M, *et al*. Muscarinic cholinergic receptor binding in rat brain following traumatic brain injury[J]. Brain Res, 1994, 640(1): 240-245.

[3] 熊正平，周元国. 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)：145-148.

[4] 方 芳，陈轶琨，王小明. 吗啡长时程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)：115-120.

[5] 董兆君，赵吉青，吴 强，等. 模拟高原缺氧复合梭曼中毒脑损伤特点及其救治[J]. 卫生毒理学杂志，1999，13(3)：185-186.

[6] Yue C, Ku C Y, Liu M, *et al*. Molecular mechanism of the inhibition of phospholipase C beta 3 by protein kinase C[J]. J Biol Chem, 2000, 275(39): 30220-30225.

[7] Bernardin G, Kisoka R L, Delporte C, *et al*. Impairment of beta-adrenergic signaling in healthy peripheral blood mononuclear cells exposed to serum from patients with septic shock: involvement of the inhibitory pathway of adenylyl cyclase stimulation[J]. Shock, 2003, 19(2): 108-112.

[8] Porter A C, Bymaster F P, DeLapp N W, *et al*, M1 muscarinic receptor signaling in mouse hippocampus and cortex[J]. Brain Res, 2002, 944(1-2): 82-89.

[9] Chunchill L, Pazdernik T L, Cross R S, *et al*. Soman- or kainic acid-induced convulsions decrease muscariinc receptors but not benzodiazepine receptors[J]. Neurotoxicology, 1990, 11(1): 57-71.

[10] Yang C M, Dwyer T M, Farley J M. Muscarinic receptors and mucus secretion in swine tracheal epithelium: Effects of subacute organophosphate treatment[J]. Fundam Appl Toxicol, 1991, 17(1): 34-42.

（编辑 陈聪连）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2005)04-0290-01

高血压脑出血颅内血肿微创清除术后再出血的观察与护理

Observation and nursing of postsurgerical recurrent hemorrhage of minimal invasive surgery on haematoma after hypertensive intracerebral

周宇燕 （深圳市铁路医院神经内科，深圳 518001）

我院于1998年5月至2004年4月共行高血压脑出血颅内血肿微创清除术69例，并发再出血11例，再出血发生率为15.9%。现将临床观察及护理体会报告如下。

1 临床资料

11例再出血病人均经头颅CT扫描证实，其中男性7例，女性4例，年龄56~83岁，高血压病史5~20年。主要表现为意识障碍进行性加重，出现新的神经系统阳性体征。术后清醒转为昏迷，血压持续性升高，瞳孔一侧或两侧散大、对光反射迟钝或消失。再出血发生于术后5~61 h。再出血病人中6例好转，2例行开颅手术，3例死亡。

2 观察与护理

2.1 动脉血压的监护

血压平稳是治疗成功的关键因素之一，控制收缩压在20~25 kPa，舒张压在11~14 kPa，有利于减少再出血的发生[1]。于术后12 h内每15~30 min监测1次血压，12~72 h内每小时监测1次血压并详细记录。

当血压升高时，首先要排除尿潴留、大便秘结、气道痰堵、情绪激动等诱因，如消除诱因后血压仍明显升高，则立即报告医生。

（下转301页）

作者简介：周宇燕（1976-），女，广东省蕉岭县人，护师，主要从事脑血管病临床护理方面的研究。电话：(0755)61385432

收稿日期：2004-09-22；修回日期：2005-01-24