DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.06.019

论著

文章编号:1000-5404(2003)06-0508-03

缺氧条件下梭曼中毒对大鼠心肌 M_2 受体 mRNA 表达的影响

刘 辉,刘 勇,王仕丽,赵吉清,吴 强 (第三军医大学预防医学系毒理学教研室,重庆,400038)

提 要:目的 探讨缺氧条件下梭曼中毒大鼠心肌 M_2 胆碱能受体表达的变化。方法 采用半定量 RT-PCR 法分别检测缺氧、梭曼中毒以及缺氧条件下梭曼中毒大鼠心肌 M_2 受体 mRNA 的表达。结果 与正常对照组比较,缺氧组大鼠心肌 M_2 受体 mRNA 表达增强,但相差并不显著;单纯梭曼中毒组和缺氧中毒组大鼠 M_2 受体在致伤后各时间点表达明显减弱,但与单纯梭曼中毒组比较,缺氧中毒组大鼠心肌 M_2 受体 mRNA 的表达在致伤后 12 h 和 24 h 明显增强($P<0.05$)。结论 M_2 受体对有机磷毒剂非常敏感,缺氧条件下大鼠心肌 M_2 受体的表达相对于平原中毒组有所增强,可能是高原战区神经性毒剂加重心脏功能损害的一个重要原因。

关键词:缺氧;梭曼中毒;RT-PCR;M_2 受体
中图法分类号:R392.13;R595.9;R845.22 文献标识码:A

Effect of soman intoxication under hypoxia on the expression of M_2R mRNA of rat myocardium

LIU Hui, LIU Yong, WANG Shi-li, ZHAO Ji-qing, WU Qiang (Department of Toxicology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of the expression of M_2 receptor mRNA of rat myocardium intoxicated by soman under high altitude hypoxia. Methods The expressions of M_2 receptor mRNA under hypoxia, soman intoxication and soman intoxication under hypoxia were detected by semi-quantitative RT-PCR, respectively. Results The expression of M_2 receptor mRNA increased in the high altitude hypoxia group. Both simple soman intoxication and combined soman intoxication and hypoxia decreased the expression of M_2 receptor rapidly. But under hypoxia, the expression increased significantly at 12 h and 24 h. Conclusion M_2 receptor was sensitive to nerve agents. Compared to simple soman intoxication group, the expression of M_2 receptor increased in combined soman intoxication and hypoxia group. This may be one of the major factors leading to aggravation of the injury of heart function by nerve agents in high altitude area.

Key words: hypoxia; soman intoxication; RT-PCR; muscarinic receptor

神经性毒剂梭曼(Soman)属有机磷化合物,是一种强烈的不可逆性胆碱酯酶抑制剂,因毒性强、中毒难防难治而引起了广泛的重视。梭曼等神经性毒剂中毒可导致心动过缓、心收缩力减弱和心律失常,进而心输出量减少,诱发血压下降,终致循环衰竭[1]。Grange 等[2]研究发现有机磷化合物对心肌 M_2 受体有高度亲和性,提示毒剂可以直接和受体结合并诱发毒害作用。缺氧是高原环境的重要特征,缺氧条件下梭曼中毒是可能发生在高原地区的一种特殊的化学毒剂伤。本实验通过研究高原缺氧条件下梭曼中毒大鼠心肌 M_2 受体表达的变化,探讨缺氧复合梭曼中毒大鼠心肌损伤机制。

作者简介:刘 辉(1974—),男,吉林省通化市人,硕士,助教,主要从事高原神经毒毒理作用方面的研究,现在白求恩军医学院军事医学教研室。电话:(023)68752356

收稿日期:2001-11-10;修回日期:2002-04-20

1 材料和方法

1.1 实验动物和分组

Wistar 大鼠,雄性,体重(200±25)g,由本校实验动物中心提供。随机分为正常对照组、高原缺氧组、平原中毒组和缺氧中毒组,设置缺氧、中毒后 2、6、12、24 h 各 4 个时相点,每时相点 6 只动物。

1.2 试剂和仪器

梭曼,纯度 94.6%(军事医学科学院提供);Tripure(Roche 公司);Oligo(dT)15、Taq DNA 聚合酶、AMV 逆转录酶(Promega 公司);PCR Marker(华美公司)

紫外分光光度仪(日本岛津);低温高速离心机(上海);PCR 扩增仪;电泳仪、电泳槽;全自动凝胶图像分析系统;低压舱(本室自制)

1.3 方法

1.3.1 动物模型 平原中毒组动物皮下注射 72 μg/kg 的梭曼(对照组以生理盐水代替),分别于中毒后 2、6、12、24 h 断头处死取样;高原中毒组预先于低压舱(相当于海拔 4000m 高

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

原)停留 6 h 后注射相同剂量的梭曼, 继续减压 2、6、12、24 h 后处死取样。

1.3.2　心肌组织总 RNA 的提取　　按照 Tripure Isolation Reagent 说明提取心肌总 RNA。RNA 样品以紫外分光光度计测定 A_{260}/A_{280} 值, 并以变性琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 分子是否降解。

1.3.3　RT-PCR

1.3.3.1　引物设计　　PCR 引物由上海生工生物技术公司合成。M_2 受体引物序列为 5′-GAACACAACAAGATCCAGAATGGC AAG-3′和 5′-CGGAGCATGGGCGCAATGATAG -3′, 内参照 G3PDH 引物序列为 5′-TAAGGTCGGAGTCAACGATTTGGT-3′ 和 5′-CATGTGGGCCATGAGGTCC -ACCAC-3′, 扩增片段长度分别为 793 bp 和 980 bp[3]。

1.3.3.2　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。RNA 样品和 oligo(dT)$_{15}$ 于 70 ℃变性 10 min 后, 立即置于冰浴中 1～2 min, 加入其他试剂后于 37 ℃反应 1 h, 70 ℃加热 10 min 结束。此反转录产物作为 PCR 反应的 cDNA 模板。

1.3.3.3　PCR 扩增　　本实验采取 M_2 受体和 G_3PDH 同管扩增的方法。反应体系为 25 μl 管, 含有 cDNA 模板、$MgCL_2$、dNTPs、TaqDNA 聚合酶等。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, 共循环 30 次, 最后 72 ℃额外延伸 10 min。每一个样品采用 3 管平行扩增, 并且重复一次。

1.4　统计学分析

实验数据使用本校数学教研室设计的 SPMR 医用统计程序包进行多因素及双因素方差分析和 t 检验。

2　结果

2.1　心肌总 RNA 提取结果

心肌总 RNA 提取样品的 A_{260}/A_{280} 值均大于 1.8, 并于变性琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 分子未降解。

2.2　PCR 产物凝胶电泳分析

PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析, 除出现 M_2 受体特异性片段和内参照 G_3PDH 外, 未见其它扩增产物, 见图 1。与 Marker 对照判定扩增产物片段分别为 793 bp 和 980 bp。与正常对照组相比, 高原缺氧组大鼠心肌 M_2 受体 mRNA 表达增强; 平原中毒组和缺氧中毒组大鼠心肌 M_2 受体 mRNA 在中毒后 2 h 即出现表达明显减弱, 12 h 后逐渐增强, 见图 2、3。



M: λDNA *Eco*RⅠ + *Hind*Ⅲ Marker; 1: M_2 receptor; 2: G3PDH; 3: M_2 receptor+G3PDH

图 1　RT-PCR 扩增产物凝胶电泳分析

Fig 1　Agarose gel analysis of RT-PCR production



A: Control; B, C, D, E: High altitude hypoxia group at 2, 6, 12, 24 h; F, G, H, I: Combined soman intoxication and hypoxia group at 2, 6, 12, 24 h

图 2　高原缺氧及缺氧中毒组大鼠心肌 M_2 受体 mRNA RT-PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig 2　Agarose gel electrophoresis of M_2 receptor mRNA RT-PCR production of rat heart in hypoxia group and combined soman intoxication with hypoxia group



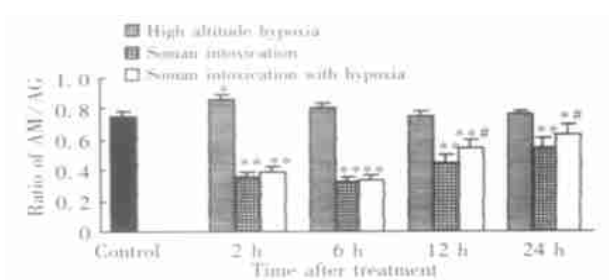
A: Control; B, C, D, E: Soman intoxication group at 2, 6, 12, 24 h; F, G, H, I: Combined soman intoxication and hypoxia group at 2, 6, 12, 24 h

图 3　平原中毒及缺氧中毒组大鼠心肌 M_2 受体 mRNA RT-PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig 3　Agarose gel electrophoresis of M_2receptor mRNA RT-PCR production of rat heart in soman intoxication group and combined soman intoxication with hypoxia group

2.3　缺氧条件下梭曼中毒大鼠心肌 M_2 受体 mRNA 表达的变化

利用全自动凝胶成像分析系统对 M_2 受体和 G_3PDH 扩增产物带进行图像分析, 测出各扩增带曲线下面积的吸光度(A)值, 实验结果以同一样品 M_2 受体扩增带的吸光度(AM)与 G_3PDH 扩增带的吸光度(AG)的比值表示。高原缺氧组大鼠心肌 M_2 受体 mRNA 表达增强, 但在 6、12、24 h 时相点与对照组相差并不显著; 平原中毒组和缺氧中毒组大鼠心肌 M_2 受体 mRNA 在中毒后 2 h 即出现表达明显减弱($P<0.01$), 12 h 后逐渐增强, 但仍然低于正常水平。与平原中毒组相比, 缺氧条件下梭曼中毒大鼠心肌 M_2 受体 mRNA 表达增强($P<0.05$), 见图 4。



*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* Control group; #: $P<0.05$ *vs* plain intoxication group, $n=6$

图 4　大鼠心肌 M_2 受体和 G3PDHmRNA 扩增产物的灰度值比在中毒后各时间点的变化

Fig 4　The time course of the ratio of M_2R mRNA to G3PDH mRNA RT-PCR production (AM/AG) in rat myocardium

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 讨论

M_2 受体是毒蕈碱样胆碱能受体的一种亚型，主要分布于心脏、血管和平滑肌。该受体在配体的作用下，通过与不同的鸟苷酸结合蛋白(guanine nucleotide binding protein，G 蛋白)偶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、腺苷酸环化酶(AC)活性改变及离子通道的开放和关闭等等[4,5]。缺氧是高原环境的主要特征，其对心脏功能的影响国内外研究报道较多。缺氧可直接引发心肌血氧含量下降，导致心脏功能异常。Kacimi 等[6]研究发现：大鼠暴露于低氧环境中，心肌细胞膜上肾上腺素能受体密度下降，而 M_2 胆碱能受体密度增加，G 蛋白相对含量变化不大。本实验结果显示：单纯缺氧组大鼠心肌 M_2 受体在各时相点表达增强，但与平原对照组比较相差并不显著。目前对缺氧导致心肌 M_2 受体表达上调的原因尚不明了，可能与机体的应激反应有关。此外，梭曼等神经性毒剂均可直接作用于胆碱能受体而发挥其毒性作用。正如研究发现有机磷化合物对心肌 M_2 毒蕈碱受体有高度亲合性，提示梭曼可以直接和心肌 M_2 受体结合而诱发毒性作用。本研究显示：梭曼染毒大鼠(72 μg/kg)心肌 M_2 受体从中毒后 2 h 即出现表达减弱，6 h 降至最低，在中毒后 24 h 受体表达逐渐增强，但仍然低于正常水平。实验结果与 Yang 等[7]研究报道基本一致。可见，急性梭曼中毒早期对大鼠心肌胆碱能受体影响更大。

高原缺氧和梭曼中毒两因素作用下心脏胆碱能系统的变化如何，国内外未见报道。既往研究证实，高原缺氧条件下梭曼的毒性明显增强，原因尚不清楚，其中胆碱能机制可能起重要作用[8]。在本实验中，缺氧条件下梭曼中毒大鼠心肌 M_2 受体与单纯梭曼中毒相比较，在各时相点的表达均出现一定程度的增强，且在 12 h 和 24 h 时表达明显增强。已证实，受体表达的增强和减弱与其介导的生物效应有直接关系。因此，在复合损伤过程中，高原缺氧条件下 M_2 受体表达的增强，可能导致梭曼中毒后心脏胆碱能效应的进一步增强，引起其介导的信号效应异常升高，从而表现出梭曼毒性的增强，心脏中毒损伤提前和加重。本室在以往的研究过程中也发现，与单纯梭曼中毒比较，高原缺氧条件下梭曼中毒脑 M_2 受体密度和亲和力出现明显的增强[9]。但是由于心脏功能及神经性毒剂损伤机制的复杂性，缺氧导致 M_2 受体特性的改变是否为缺氧条件下梭曼毒性变化的直接原因尚待深入研究证实。

参考文献：

[1] 刘 勇. 神经性毒剂心脏抽伤机制研究[J]. 第三军医大学学报，2001，23(3)：228－231.

[2] Grange-Messent V，Raison D，Bouchaud C. Compared effects of extracellular K^+ ions and soman，a neurotoxic，on cerebral astrocyte morphology. An *in vitro* study[J]. J Submicrosc Cytol Pathol，1996，28(2)：151－159.

[3] Lin W D，Chaoshu T. Biphasic redistribution of muscarinic receptor and the altered receptor phosphorylation and gene transcription are underlying mechanisms in the rat heart during sepsis[J]. Cardiovasc Res，2000，45(2)：925－933.

[4] Neer E J. Heterotrimeric G proteins：organizers of transmembrance signals[J]. Cell，1995，80(2)：249－257.

[5] Armstead W M. Role of impaired cAMP and calcium-sensitive k channel function in altered cerebral hemodynamics following brain injury[J]. Brain Res，1997，768(1-2)：177－184.

[6] Kacimi R，Richalet J，Perozatier B. Hypoxia－induced differential modulation of adenosinergic and muscarinic receptors in rat heart[J]. J Appl Physiol，1993，75(3)：1123－1128.

[7] Yang X H，Li W，Erwin L. Regulation of central muscarinic receptors after cholinesterase inhibition：effect of clonidine[J]. Brain Res Bull. 1993，32(6)：681-684.

[8] 吴 强，董兆君，魏相德. 梭曼中毒复合缺氧损伤对 PC12 细胞游离钙的影响[J]. 第三军医大学学报，1997，19(4)：346－348.

[9] 吴 强，林 海，董兆君. 缺氧条件下梭曼中毒对大鼠脑 M 受体的影响[J]. 第三军医大学学报，2000，22(7)：631－634.

(编辑 陈聪连)

关于医学符号的使用

统计学符号不论用哪种字母，也不论大写或小写一律都用斜体。要注意区分拉丁字母和希腊字母。例如均数的符号是字母 $\bar{x}$，卡方的符号是希腊字母 χ^2，自由度的符号是希腊文“υ”，不是拉丁文“V”。样本的相关系数是英文“*r*”，不能误为希腊文“γ”。

化学元素及核素在医学写作时一般多采用符号，都是拉丁字母正体大写。离子态是在右上角用数字加“－”或“＋”表示。例如“Na^+、Ca^{2+}、P^{3-}等等，不采用 Ca^{++}、P^{---}、Al^{+3}、O^{-2}表示。核素的核子素(质量数)应写在元素符号的左上角，例如：^{131}I、^{32}P。表示激发状态的 m 写在右上角，例如：$^{99}Tc^m$、$^{133}In^m$。在科技论文和专著中不应写核素的中文名称，即不能写成^{131}碘、铟^{133m}、P^{32}、Tc^{99m}。

近几年分子生物学发展很快，并已渗透到许多学科，大多数分子生物学名词术语的符号已有统一的确定形式，要对符号的来源及其内涵有深刻的了解，使用时不致发生错误，例如：RNA 有 rRNA(ribosomal RNA)、tRNA(transfer RNA)、mRNA(messenger RNA)3 类。r、t、m 是表示类型的符号应小写，RNA 应大写。

本刊编辑部

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net