DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.08.001

文章编号:1000-5404(2001)08-0879-03

论著

缺氧条件下梭曼中毒大鼠脑G蛋白及cAMP-PKA信号系统的变化

王仕丽,吴 强,赵吉清,刘 勇,董兆君 (第三军医大学预防医学系毒理学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探索G蛋白及cAMP-PKA信号系统在缺氧条件下梭曼毒性升高机制中的作用。**方法** Western blot检测Giα、Gqα含量,放射免疫测定cAMP浓度及酶放射化学分析测定PKA活性。**结果** 梭曼中毒、单一缺氧损伤和缺氧复合梭曼中毒大鼠脑组织Gqα含量、cAMP浓度及PKA活性升高,Giα下降,缺氧条件下梭曼中毒与单纯梭曼中毒组有显著差别;阿托品可对抗PKA活性的升高。在所观察的三个脑区中,以纹状体变化最为明显。**结论** G蛋白及其介导的cAMP-PKA信号系统参与了缺氧条件下梭曼毒性升高的形成机制。

关键词: 缺氧;梭曼中毒;G蛋白;cAMP;PKA
中图法分类号: R322.81;R595;R845.22 **文献标识码:** A

Changes of G proteins and cAMP-PKA signal transducting system after soman intoxication in rats brain under hypoxia

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

Abstract: Objective To study the action of G proteins and cAMP-PKA signal transducting system on the mechanism of soman intoxication under the condition of hypoxia. **Methods** The concentration of Giα, Gqα and cAMP were measured by Western blot technique and RIA, [γ-^{32}P]-ATP was used to determine the activity of PKA and protein content was assayed by Folin's phenol method. **Results** The concentration of Gqα, cAMP and PKA activity increased markedly while Giα dereased after soman intoxication or/and hypoxia injury. All the items of soman intoxication under the condition of hypoxia were significantly different from that of simple soman intoxication. Atropine could block the increase of PKA after soman intoxication under the condition of hypoxia. Striatum was the region most sensitive to injury amoug the regions observed in the brain. **Conclusion** G proteins and cAMP-PKA signal transducting system play important roles in the mechanism of increasing toxicity of soman under the condition of hypoxia.

Key words: hypoxia; soman intoxication; G proteins; cAMP; PKA

神经性毒剂梭曼(Soman),属有机磷酸酯类化合物,抑制体内乙酰胆碱酯酶(AChE),造成ACh的蓄积,持续作用于受体或下一级神经元导致一系列病理生理反应是其主要的中毒机制,因其具有毒性大、作用快、难防难治等特点,是目前外军装备的主要化学战剂之一[1]。在高原缺氧条件下梭曼的毒性较平原显著升高,且海拔高度越高,毒性升高越明显,认为缺氧加重了梭曼的毒性效应,至于其毒性增加的原因,目前初步认为与中枢毒蕈碱样乙酰胆碱受体(M受体)敏感性有关[2],而G蛋白及cAMP-PKA信号系统是M受体信号传导的重要组成部分。本研究拟通过观察缺氧条件下梭曼中毒大鼠皮层、海马和纹状体G蛋白含量及cAMP-PKA信号系统的变化,进一步探讨缺氧条件下梭曼毒性升高的机制,为提高高原环境下神经性毒剂中毒的预防和救治提供更为翔实的理论支持。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

梭曼,纯度94.6%,军事医学科学院提供;抗Giα、Gqα抗体为Santa Cruz产品;PMSF、Pepstatin A、Histone Ⅱ A、cAMP、$ATPNa_2$购至Sigma公司;[γ-^{32}P]ATP北京亚辉生物医学工程公司提供,cAMP试剂盒购至上海中医学院;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 动物及分组

Wistar大鼠,体重(250±30)g,雌雄不拘,由本校动物所提供。平原梭曼中毒(以重庆地区作为近似平原,海拔300 m)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;单一缺氧组:将大鼠置于低压舱中持续24 h后处死取样;对照组、梭曼中毒组、单一缺氧组及缺氧复合梭曼中毒组分设阿托品阻断对照组,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 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,经电转印转移至PVDF上。PVDF膜用5%脱脂奶粉封闭后,与抗Giα、Gqα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。对目标条带进行扫描,以对照组的光密度值(D_λ)为100%,计算各样品的D_λ值。

1.4 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

基金项目:全军"九五"攻关项目(96L063)
作者简介:王仕丽(1962-),女,四川省绵阳市人,实验师,主要从事神经性毒剂的急性毒性方面的研究。电话:(023)68752356
收稿日期:2001-01-10;修回日期:2001-04-27

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

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。

1.5 PKA活性测定

参照文献[4]进行，酶反应总体积为25 μl，含Tris·HCl 20 mmol/L pH 7.4，Histone Ⅱ A 0.8 μg/μl、$MgCl_2$ 5 mmol/L、ATP 0.1 mmol/L，[γ-^{32}P]ATP 0.4 μCi(1Ci=37 GBq)，cAMP 2 μmol/L或0.5 mmol/L Tris·HCl(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。

1.6 蛋白含量测定

改良Lowry法，牛血清白蛋白作标准。

1.7 统计学分析

实验数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用单因素或双因素方差分析。

2 结果

2.1 G蛋白α亚单位含量的变化见表1

表1 缺氧条件下梭曼中毒大鼠脑组织G蛋白α亚单位含量的变化(%)

Tab 1 Changes of concentration of G protein α subunit after soman intoxication under the condition of hypoxia for 24 h in rats brain(%)

Group		Region of brain		
		Cortex	Hippocamous	Striatum
Giα	Control	100.0	100.0	100.0
	Soman	93.0±6.53	87.6±7.35*	79.8±6.05**
	Hypoxia	95.6±5.21	96.1±5.69	76.1±7.89**
	Soman+Hypoxia	78.6±4.39**#	80.1±7.16**#	57.3±5.16**##
Gqα	Control	100.0	100.0	100.0
	Soman	122±9.37*	121.7±7.94*	135±9.24*
	Hypoxia	137±8.28*	132.6±9.21*	114±4.67*
	Soman+Hypoxia	148±11.34**#	154.5±12.74**#	163±10.30**#

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control；#：$P<0.05$，##：$P<0.01$ *vs* soman group

免疫印迹结果显示，皮层、海马和纹状体Giα、Gqα均表现为单一条带，分子量分别40、42 kb，梭曼中毒、高原缺氧单一或复合致伤均可影响脑组织Giα和Gqα的蛋白含量，总的变化趋势为Giα含量降低Gqα升高。不同脑区、不同G蛋白亚型，对于梭曼和缺氧的敏感程度不完全相同，各脑区复合致伤组G蛋白的变化幅度显著大于单纯梭曼中毒组。复合致伤纹状体Giα和Gqα含量相当于正常对照的57.3%和163%，分别比单纯梭曼中毒组降低或升高了28.2%和20.7%。

2.2 cAMP含量的变化见表2

表2 缺氧条件下梭曼大鼠脑组织cAMP含量的变化(pmol/mg)

Tab 2 Changes of cAMP concentrations after soman intoxication under the condition of hypoxia for 24 h in rats brain(pmol/mg)

Group	Region of brain		
	Cortex	Hippocampus	Striatum
Control	33.65±3.03	63.47±5.71	45.53±7.51
Soman	37.48±3.62	73.65±6.05*	63.78±4.88**
Hypoxia	56.73±8.20**	103.85±16.18**	76.58±7.78**
Soman+Hypoxia	67.28±5.55**##	136.07±14.82**##	97.53±10.40**##

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control；#：$P<0.05$，##：$P<0.01$ *vs* soman group

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。梭曼中毒和高原缺氧致伤均可导致上述三个脑区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($P<0.01$)，分别相当于单纯梭曼中毒cAMP含量的179.5%、184.8%和152.9%。

2.3 PKA活性的变化见表3

表3 缺氧条件下梭曼中毒大鼠脑组织PKA活性的变化(pmol·min^{-1}·mg^{-1})

Tab 3 Changes of PKA activity after soman intoxication under the condition of hypoxia 24 h in rats brain(pmol·min^{-1}·mg^{-1})

Group	Atropine	Regions of brain		
		Cortex	Hippocampus	Striatum
Control	−	5.66±0.58	16.92±2.16	8.61±0.78
	+	5.25±0.85	16.19±3.24	9.02±0.86
Soman	−	7.31±1.94*	24.91±3.69**	13.29±1.61**
	+	6.38±1.04△	18.58±2.64△	9.11±1.59△△
Hypoxia	−	8.41±1.63*	26.37±2.29**	14.98±2.56**
	+	7.26±0.95*△	19.96±3.06*△	11.67±1.76*△
Soman+Hypoxia	−	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* control；#：$P<0.05$，##：$P<0.01$ *vs* soman group；△：$P<0.05$，△△：$P<0.01$ *vs* no atropine group

实验结果显示，所观察的三个脑区中，以海马PKA活性最高，纹状体其次，皮层最低，与cAMP的分布一致。单纯梭曼中毒或模拟高原缺氧致伤都可导致各脑区PKA活性增加，且高原致伤增加幅度更大，三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，且远远高于单纯中毒组($P<0.01$)。

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。上述各实验组中，变化的显著程度依次为：纹状体>海马>皮层。

3 讨论

本室已有研究发现，缺氧条件下梭曼毒性升高与中枢胆碱能系统有密切关系，表现为M受体上调(主要为受体亲和力增加)[2]。M受体功能的发挥，很大程度上受G蛋白的制约和调控，配体与M受体结合后引起受体结构发生改变，与相应的G蛋白作用而影响细胞内第二信使的生成，通过级联放大效应引发特定的生理生化反应[5]。关于梭曼中毒后G蛋白变化情况目前仅有间接报道[6,7]，动物在梭曼中毒后，除出现AChE抑制外，IP3、cAMP含量及Ca^{2+}依赖性动作电位的也有相应改变，且M受体阻滞剂阿托品可对抗上述变化。认为是梭曼抑制AChE，ACh蓄积致使胆碱能系统兴奋性增加，通过M受体与G蛋白偶联，激活或抑制相应的酶或离子通道引起cAMP、IP3、Ca^{2+}的改变。

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

cAMP-PKA 系统是体内重要的第二信使系统，且与梭曼毒性作用关系密切，本研究通过对缺氧条件下梭曼中毒大鼠皮层、海马和纹状体 G 蛋白及 cAMP-PKA 系统的观察，以进一步探索缺氧条件下梭曼毒性升高的机制。

研究中发现，大鼠皮层、海马和纹状体 Giα、Gqα 均为一条带，Giα 的蛋白分子量约 40×10^3，Gqα 分子量约 42×10^3，与文献[8]报道结果一致，证实检测目标带的是可靠的。梭曼中毒、高原缺氧单一或复合致伤均可引起皮层、海马和纹状体 Giα、Gqα 蛋白含量的改变，且不同脑区、不同时相点变化的程度不完全相同，总的变化趋势是 Giα 含量下降、Gqα 含量升高，复合致伤上述两种 G 蛋白的变化幅度显著高于单纯梭曼中毒组，可能是中毒或缺氧损伤干扰了 G 蛋白的正常代谢（基因转录、翻译或蛋白降解）过程。梭曼中毒、缺氧单一或两因素复合致伤均可导致 cAMP-PKA 信号系统的变化，cAMP 含量和 PKA 活性均出现了显著或非常显著的升高，且复合致伤的变化则显著大于单纯梭曼中毒组。M 受体阻滞剂阿托品可部分对抗 PKA 活性的升高，但缺氧损伤组和复合致伤组仍显著高于正常对照。可见，阿托品并不能完全拮抗缺氧或复合致伤所致的中枢 cAMP-PKA 信号系统的过度激活。由此我们认为，缺氧条件下梭曼中毒所导致的 cAMP-PKA 信号系统的激活，是胆碱能系统和非胆碱能系统的共同参与的结果。缺氧条件下梭曼中毒脑损伤的机制是复杂的，除了上述 cAMP-PKA 信号系统的作用外，肌醇磷脂信号系统、PLC 信号系统可能共同参与了高原神经性毒剂中毒脑损伤及毒性升高的形成过程。在所观察的三个脑区中，纹状体对梭曼中毒、高原缺氧单一或复合致伤的敏感程度高于其它脑区，推测这可能与中枢胆碱能神经元的分布有一定的关系[9]。

综上所述，缺氧条件下梭曼毒性的升高，不但与 M 受体上调有关，与 G 蛋白及其耦联受体的信号传导的异常增强有重要关系，缺氧因素致使脑组织 M 受体上调，对 ACh 的敏感性增加，通过与 G 蛋白受体的偶联，异常激活或抑制相应的酶，改变第二信使在细胞内的含量或分布，发挥其毒性作用。值得提出的是，细胞内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（Cross talk）[7]，这就要求我们在分析梭曼在缺氧条件下毒性升高的形成机制时，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] 董兆君，赵吉清，吴　强，等.模拟高原缺氧复合梭曼中毒脑损伤特点及救治[J].卫生毒理学杂志，1999，13(3)：185－186.

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

[3] 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.

[4] 孙亚锋，唐放鸣，王　然，等.左旋千金藤啶碱对缺氧纹状体和海马脑片 Ca^{2+}/CaM PK Ⅱ 和 PKA 活性的影响[J].徐州医学院学报，1999，19(2)：89－92.

[5] Onali P, Olianas M C. Bimodal regulation of cyclic AMP by muscarinic receptors. Involvement of multiple G protein and different forms of adenylyl cyclase activity[J]. Life Sci, 1995, 56(11-12): 973－980.

[6] Savolainen K M, Nelson S R, Samson F E, *et al*. Soman induced convulsions affect the inositol lipid signaling system: potentiation by lithum; attenuation by atorpine and diazepam[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1988, 96(2): 304－315.

[7] Wanke E, Bianchi L, Mantegazza M, *et al*. Muscarinic regulation of Ca^{2+} currents in rat sensory neurons: channel and receptor types, dose-response relationships and cross-talk pathways[J]. Eur J Neurosci, 1994, 6(3): 381－391.

[8] Dwivedi Y, Pandey G N. Effects of subchronic administration of antidepressants and anxiolytics on levels of the alpha subunits of G proteins in the rat brain[J]. J Neural Transm, 1997, 104(6-7): 747－760.

[9] Ogawa N, Asanuma M, Tanaka K, *et al*. Long-term time course of regional changes in cholinergic indices following transient ischemia in the spontaneously hypertensive rat brain[J]. Brain Res, 1996, 712(1): 60－68.

（编辑　谢义霞）

书讯

《医学实验动物学》——教育部推荐的研究生教学用书

由第三军医大学魏泓教授主编、四川科技出版社出版的《医学实验动物学》一书，由教育部组织专家评审，审定为全国生物医学研究生教学用书。现已出版，每册 42.00 元。邮购 50 册以上有折扣。凡需要此书作为研究生、本科生教材者，请与第三军医大学学报编辑部联系。

联系电话：(023)68752187　　E-mail：Leng@mail.tmmu.com.cn

联 系 人：冷怀明　　**邮政编码**：400038

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