

可乐定对严重烫伤大鼠心肌 G_{α} mRNA 表达的影响

张海港*, 李晓辉

(第三军医大学药理教研室, 重庆 400038)

摘要: 目的 研究可乐定对严重烫伤大鼠心肌 G_{α} mRNA 表达的影响。方法 将大鼠置于 95 °C 水浴中烫 10 s, 造成背部皮肤 30 % 体表面积 III 度烫伤。分别用 dot blotting 杂交、原位杂交、放射免疫分析及间接方法测定心肌 G_{α} mRNA 表达水平、cAMP 生成量与 adenylyl cyclase (AC) 活性。结果 烫伤后 3 h 心肌 G_{α} mRNA 表达水平明显减少, 0.3, 1.0, 3.0 mg·kg⁻¹ 可乐定(ip)可增加烫伤后心肌 G_{α} mRNA 表达, 表达相对量与可乐定剂量呈正相关。I₁-咪唑啉受体拮抗剂 efaroxan 可部分逆转可乐定增加烫伤后心肌 G_{α} mRNA 表达的作用, 减少量与 efaroxan 剂量呈显著正相关。AC 和 cAMP 的变化与 G_{α} mRNA 类似。结论 可乐定可增加烫伤后早期大鼠心肌 G_{α} mRNA 表达、AC 活性和 cAMP 产生。

关键词: 可乐定; 烧伤; 信使 RNA; 腺苷酸环化酶; 环腺苷一磷酸

中图分类号: R966; R349.64

文献标识码: A

文章编号: 0513 - 4870(2002)01 - 0019 - 04

严重烧伤后常有明显的心功能障碍, 其发生发展与烧伤造成的心脏前负荷下降和心脏舒缩功能降低有关^[1]。本室在既往的研究中发现, 大鼠体表严重烫伤后心肌细胞 β -肾上腺素受体 (β -adrenergic receptors, β -AR) 数目下调和 G_{α} 亚单位含量减少是心功能降低的重要信号转导机制之一; 可乐定可改善烫伤后减退的心功能, 提高心肌 G_{α} 含量, 且呈剂量依赖关系^[2,3]。为进一步探讨烧伤后心功能减退、心肌 G_{α} 减少及可乐定改善烧伤后心功能的分子机理, 本文通过 30 % 体表面积 (total body surface area, TBSA) 皮肤 III 度烫伤大鼠模型, 研究了可乐定对严重体表烫伤后心肌 G_{α} mRNA 表达水平的影响。

材料与 方法

药品与试剂 可乐定 (clonidine, Cl₀)、焦碳酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate, DEPC)、多聚甲醛及蛋白酶 K 购自 Sigma 公司; efaroxan [盐酸 2-(2-乙基-2,3-二氢-2-苯并咪唑基)-4,5-二氢-1H 咪唑, Efa] 为美国 Research Biochemicals 公司产品; 地高辛 (digoxigenin, DIG) 3' 端加尾试剂盒、DIG 标记与检测试剂盒及

Tripure RNA 抽提试剂盒均为 Boehringer Mannheim 公司产品; 大鼠 G_{α} 寡核苷酸探针 (5'-TCC AGA GGT CAG GAC GCG GCA GCG AAG CAG GTC CTG GTC-3') 由中国科学院上海细胞生物学研究所合成, 经 HPLC 反相柱纯化, 与大鼠 G_{α} cDNA 第 580 ~ 618 位核苷酸碱基互补; 环腺苷一磷酸 (cAMP) 测定试剂盒购自上海第二医科大学同位素室。

仪器 GF-1 型控时调速式高速分散器, 江苏麒麟医用仪器厂产品; ZF-90 型多功能暗箱式紫外投射仪, 上海顾村光电仪器厂产品; 台式低温离心机购自德国 Heraeus 公司; UV-26 型紫外分光光度计为日本岛津公司产品; GDS7600S 凝胶成像分析系统为美国 UVP 公司产品; 液体闪烁计数仪, 瑞典 LKB 公司产品。

动物 健康成年 ♂ Wistar 大鼠, 体重 (163 ~ 197) g, 由第三军医大学实验动物中心提供。

分组与给药 随机分为以下各组: 正常对照组以 37 °C 温水代替热水进行假烫伤; 烫伤组于 95 °C 水浴中烫 10 s; 可乐定对照组 ip 可乐定 1.0 mg·kg⁻¹, 假烫伤; 给药组分为 5 组, 其中 4 组分别于烫伤前 30 min ip 可乐定 0.1, 0.3, 1.0 和 3.0 mg·kg⁻¹, 一组于烫伤后立即给予可乐定 1.0 mg·kg⁻¹; Efa 作用组分别 ip Efa 10, 5.0 及 2.5 mg·kg⁻¹, 30 min 后 ip 可乐定 1.0 mg·kg⁻¹, 60 min 后进行烫伤; Efa 对照组 ip Efa 5.0 mg·kg⁻¹, 进行假烫伤。各组注射量均为 8.0 mL·kg⁻¹。

收稿日期: 2001-04-12。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39370791)。

作者简介: 张海港 (1970 -), 男, 讲师, 硕士。

* Tel: (023) 68752265, Fax: (023) 68753397,

E-mail: hg2@mail.tmmu.com.cn

烫伤模型制作 于致伤前一天,剪短大鼠背部占 30%体表面积毛,用 1.2 mol·L⁻¹ Na₂S 脱净,以温水冲洗后擦干。24 h 后用乙醚麻醉,将背部置 95℃水浴中烫 10 s,造成 30%体表面积皮肤 III 度烫伤(经病理检查证实)。致伤后 ip 生理盐水约 5 mL 预防休克,分笼喂养,自由进食。实验时处死大鼠并取心脏置液氮中保存备用。

G α mRNA 表达量的测定^[4] 按说明书提取心肌总 RNA,紫外分光光度法定量,1%琼脂糖电泳确定其完整性。将各组总 RNA 样品用 DEPC 稀释到同一浓度,按说明书及文献进行 dot blotting 杂交,结果照片,用凝胶成像分析系统扫描各点,测定各时间点杂交信号的积分吸光度。以对照组斑点吸光度为 100,求出各组杂交信号的相对吸光度(relative absorbance, RA)。同时用 DIG 标记探针 300 ng·mL⁻¹ 进行心肌组织 G α mRNA 原位杂交。

心肌 cAMP 产生量和 AC 活性测定 取冷冻心肌组织 30~50 mg,加入 1 mol·L⁻¹ 高氯酸 1.5 mL,冰浴下用高速分散器制匀浆,4℃,500×g 离心 5 min。取上清液 1 mL,加入 2 mol·L⁻¹ KOH 1 mL 中和,再次离心后取全部上清液于 75℃真空干燥箱中蒸干。将干渣溶于 50 mmol·L⁻¹ 醋酸缓冲液 1 mL 中,取 0.1 mL 按照试剂盒说明书测定 cAMP 含量。AC 活性测定采用间接方法:取心肌组织 50~70 mg,加入预冷的 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液 0.6 mL,冰浴中制匀浆,4℃,500×g 离心 5 min。将沉淀溶于 0.1 mL 匀浆缓冲液中,用 Lowry 法测定蛋白含量后将膜蛋白统一稀释到 2 mg·mL⁻¹。吸取膜蛋白 0.05 mL,加入到 0.45 mL 反应缓冲液(Tris-HCl 50 mmol·L⁻¹,茶碱 8 mmol·L⁻¹,二巯基苏糖醇 4 mmol·L⁻¹,EGTA 1 mmol·L⁻¹,ATP 1 mmol·L⁻¹)中,30℃水浴中保温 15 min,于沸水中加热 3 min 终止反应,冷却后 1000×g 离心 10 min,取上清液按前述步骤测定 cAMP 含量,以单位时间内催化产生 cAMP 的量表示酶活性。

结 果

1 可乐定对烫伤大鼠心肌 G α mRNA 表达的影响

大鼠烫伤后 3 h 心肌组织 G α mRNA 表达明显减少。如图 1 和表 1 所示,烫伤前给予 3.0,1.0,0.3 mg·kg⁻¹ 可乐定及烫伤后给予 1.0 mg·kg⁻¹ 可乐定可使烫伤大鼠心肌 G α mRNA 表达显著增加(与烫伤组相比, $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);烫伤前给予 0.1 mg·kg⁻¹ 可乐定使心肌 G α mRNA 表达量有增加趋

势,但无统计学差异($P > 0.05$)。原位杂交可见 G α mRNA 阳性显色为蓝紫色,可乐定 3.0,1.0 mg·kg⁻¹ 可使烫伤大鼠心肌 G α mRNA 表达信号明显增强。3.0,1.0 mg·kg⁻¹ 的可乐定伤前 30 min ip 可增加烫伤后 3 h 大鼠心肌 cAMP 含量及 AC 活性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),0.3,0.1 mg·kg⁻¹ 的可乐定以及烫伤后给予 1.0 mg·kg⁻¹ 可乐定对此无显著影响。

Table 1 Effects of clonidine (Clo, ip) on myocardial G α mRNA expression, cAMP content and AC basal activity after scalds in rats

Group and dose/ mg·kg ⁻¹	G α mRNA/ RA	cAMP content/ pmol·g ⁻¹	AC activity/ pmol·g ⁻¹ ·s ⁻¹
Normal control	100	744 ± 72	49 ± 13
Clo control	128 ± 68	756 ± 91	47 ± 14
Scald control	61 ± 20 ^{**}	604 ± 52 [*]	31 ± 8 [*]
Clo 3.0	139 ± 48 ^{△△}	698 ± 49 ^{△△}	42 ± 9 ^{△△}
Clo 1.0	142 ± 51 ^{△△}	658 ± 45 [△]	40 ± 9 [△]
Clo 0.3	131 ± 28 [△]	611 ± 66	34 ± 11
Clo 0.1	106 ± 56	596 ± 70	31 ± 9
Clo 1.0 [#]	133 ± 64 [△]	618 ± 81	33 ± 12

$n = 8 \sim 10$, $\bar{x} \pm s$, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs normal control group; [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ vs scald group. [#] ip after scalds. RA: relative absorbance; AC: adenylyl cyclase



Figure 1 Effects of clonidine (Clo, ip) on myocardial G α mRNA expression after scalds in rats (dot blotting hybridization, 2 μ g total RNA per dot)

1. Normal control; 2. Scald; 3. Clo 1.0 mg·kg⁻¹, after scald; 4. Clo 0.1 mg·kg⁻¹; 5. Clo 0.3 mg·kg⁻¹; 6. Clo 1.0 mg·kg⁻¹; 7. Clo 3.0 mg·kg⁻¹

2 Efa 对可乐定增加烫伤大鼠心肌 G α mRNA 表达作用的影响

如图 2 所示,预先给予 10 mg·kg⁻¹ 或 5 mg·kg⁻¹ 的 Efa 可使应用 1 mg·kg⁻¹ 的可乐定后烫伤大鼠心肌 G α mRNA 表达量减少,表达相对量分别减少 50%和 31%(表 2)。同时 AC 活性下降,cAMP 含量减少,而 2.5 mg·kg⁻¹ 的 Efa 对之则无明显影响($P > 0.05$)。Efa 剂量与 G α mRNA 减少量呈显著正相关($\gamma = 0.900$, $P < 0.05$)。结果表明,Efa 可部分拮抗可乐定的增加烫伤大鼠心肌 G α mRNA 表达、增强 AC 活性和增加 cAMP 含量的作用。

Table 2 Effects of efroxan (Efa, ip) on the action of Clonidine (1.0 mg·kg⁻¹, ip) on myocardial G α mRNA, cAMP content and AC basal activity after scalds in rats

Group and dose/ mg·kg ⁻¹	G α mRNA/ RA	cAMP content/ pmol·g ⁻¹	AC activity/ pmol·g ⁻¹ ·s ⁻¹
Normal control	100	744 ± 72	49 ± 13
Scald	61 ± 20 ^{**} △△	604 ± 52 [*] △△	31 ± 8 [*] △△
Efa control	68 ± 13 ^{**} △△	578 ± 93 [*] △△	31 ± 12 [*] △△
Clo 1.0	125 ± 44	658 ± 45	40 ± 9
Efa 10 + Clo 1.0	62 ± 19 ^{**} △△	580 ± 75 ^{**} △△	32 ± 7 ^{**} △△
Efa 5.0 + Clo 1.0	86 ± 22 [*] △△	606 ± 41 [*] △△	36 ± 5 [*] △△
Efa 2.5 + Clo 1.0	107 ± 16	683 ± 76	39 ± 9

$n = 8 \sim 10$, $\bar{x} \pm s$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs normal control group; Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ vs Clo (1.0 mg·kg⁻¹, ip) group. AC: adeny cyclase

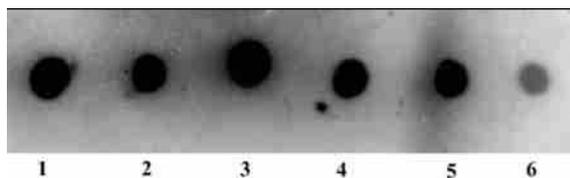


Figure 2 Effects of efroxan (Efa, ip) on the action of clonidine (Clo, 1.0 mg·kg⁻¹, ip) on myocardial G α mRNA expression after scalds in rats (dot blotting hybridization, 8 μ g total RNA per dot)

1. Normal control; 2. Scald; 3. Scald + Clo 1.0 mg·kg⁻¹; 4. Efa 2.5 mg·kg⁻¹ + Clo 1.0 mg·kg⁻¹; 5. Efa 5.0 mg·kg⁻¹ + Clo 1.0 mg·kg⁻¹; 6. Efa 10 mg·kg⁻¹ + Clo 1.0 mg·kg⁻¹

讨 论

可乐定作为抗高血压药已在临床应用多年,疗效可靠。后来人们在进一步的研究中发现可乐定有广泛的药理作用^[5,6],可抑制严重烧伤后毛细血管通透性增加,减轻水肿形成,降低烧伤后的全血粘度及纤维蛋白原浓度,红细胞聚集指数,增强红细胞表面谷胱甘肽还原酶活性,改善微循环,对于烧伤后休克、溶血有保护作用^[7-9]。本室既往研究曾发现可乐定可显著增加烫伤大鼠心肌 β 肾上腺素受体密度,提高 G α 蛋白含量,使 cAMP 生成增多,改善心功能^[3,10]。本实验观察到大鼠烫伤后心肌 G α mRNA 表达减少,而可乐定可明显改善烫伤后心肌 G α mRNA 的表达,并与其增加 AC 活性和 cAMP 含量的作用正相关,说明在可乐定改善烫伤后心功能的过程中 G α 亚单位及其 mRNA 起着重要的作用,

可乐定通过促进 G α 基因的转录而增加 G α 量,通过级联反应增加 cAMP 的生成,加强心肌收缩力,改善心功能。可乐定 0.3 mg·kg⁻¹ 可增加大鼠烫伤后 3 h 心肌 G α mRNA 表达以及烫伤后 12 h 心肌 AC 活性和 cAMP 含量^[10],但对烫伤后 3 h AC 活性和 cAMP 含量无明显影响。因此,可乐定增加 G α mRNA 表达在时间上早于 cAMP 的生成增加。

Efroxan 是近年来应用广泛的 I₁-咪唑啉受体特异性拮抗剂^[11-13]。本实验观察到 efroxan 可部分逆转可乐定增加 G α mRNA 表达,增强 AC 活性和增加 cAMP 产生的作用,提示可乐定发挥上述作用可能与 I₁ 受体有一定的关系。有报道^[9,10] α_2 受体拮抗剂育亨宾也可部分逆转可乐定改善烧伤后水肿、溶血、增加 cAMP 产生等作用,提示可乐定改善烧伤后循环功能可能不是通过单一途径,而可能是通过 I₁R 和 α_2 -AR 等两种或多种受体介导的几条信号转导通路共同发挥作用的,确切机制尚需进一步的深入研究。

REFERENCES:

- [1] Horton JW, Garcia NM, White DJ, *et al.* Postburn cardiac contractile function and biochemical markers of postburn cardiac injury. *J Am Coll Surg* [J], 1995, **181**(4): 289 - 298.
- [2] Sun JW, Song YN, Li FT, *et al.* Effect of clonidine on the changes of cardiac function and myocardial β -adrenergic receptor in rats in the early stage of burn injury. *Chin J Traumatol* (中华创伤杂志) [J], 1997, **13**(4): 235 - 236.
- [3] Li XH, He BB, Li SH, *et al.* Changes of G α expression in myocardium after severe scalds in rats. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志) [J], 1998, **14**(suppl): 846 - 847.
- [4] Yang QF, Chen B, Yang H, *et al.* Expression of CNTFR α mRNA in rat spinal cord and its changes following crush of sciatic nerve. *Bull Acad Mil Med Sci* (军事医学科学院院刊) [J], 1998, **22**(2): 84 - 87.
- [5] Kariya N, Shindoh M, Nishi S, *et al.* Oral clonidine for sedation and analgesia in a burn patient. *J Clin Anesth* [J], 1998, **10**(6): 514 - 517.
- [6] Tryba M, Kulka PJ. Critical care pharmacotherapy. A review. *Drugs* [J], 1993, **45**(3): 338 - 352.
- [7] Song XD, Qin WJ, Li J, *et al.* Changes of postburn hemorheology in rats and effect of clonidine. *Chin J Hemorheol* (中国血液流变学杂志) [J], 1995, **5**(2): 11 - 13.
- [8] Wang P, Tao JY, Xu SY. Inhibitory effect of clonidine on hemolysis after thermal injury in animals. *Acta Pharmacol Sin* [J], 1992, **13**(1): 45 - 47.
- [9] Jiang DJ, Tao JY, Xu SY. Inhibitory effects of clonidine on edema formation after thermal injury in mice and rats. *Acta Pharmacol Sin* [J], 1989, **10**(6): 540 - 542.
- [10] He HM, Sun JW, Xiao CR, *et al.* Effects of clonidine on

myocardial β -adrenergic receptor-adenyl cyclase-cAMP system after scalds in rats. *Acta Pharmacol Sin* [J], 1997, **18**(2): 146 - 149 .

[11] Mukaddam-Daher S, Gutkowska J. Atrial natriuretic peptide is involved in renal actions of moxonidine. *Hypertension* [J], 2000, **35**(6): 1215 - 1220 .

[12] Separovic D, Kester M, Ernsberger P. Coupling of I₁-

imidazoline receptors to diacylglyceride accumulation in PCI 2 rat pheochromocytoma cells. *Mol Pharmacol* [J], 1996, **49**(4): 668 - 675 .

[13] Ernsberger P. Arachidonic acid release from PCI 2 pheochromocytoma cells is regulated by I₁-imidazoline receptors. *J Auton Nerv Syst* [J], 1998, **72**(2 - 3): 147 - 154 .

EFFECTS OF CLONIDINE ON MYOCARDIAL G α mRNA EXPRESSION AFTER SCALDS IN RATS

ZHANG Hai-gang, LI Xiao-hui

(Department of Pharmacology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

ABSTRACT: **AIM** To explore the role of clonidine (Clo) on myocardial G α mRNA expression after scalds in rats. **METHODS** A 30 % skin-full-thickness scald was produced by immersing rats in 95 °C water for 10 s. The myocardial G α mRNA expression level, cyclic AMP content and adenylyl cyclase (AC) activity were determined with dot blotting hybridization, *in situ* hybridization, radioimmunoassay and indirect method. **RESULTS** Three hours after scalds, the myocardial G α mRNA was significantly decreased to (61 \pm 20) % of the control group ($P < 0.01$). AC activity and cAMP content were also decreased. Clo (0.3, 1.0 and 3.0 mg \cdot kg⁻¹, ip) was shown to increase myocardial G α mRNA expression level ($P < 0.01$ or $P < 0.05$) after scalds to (131 \pm 28) %, (142 \pm 51) % and (139 \pm 48) % of the scald group, respectively, which were correlated with the Clo dose ($\gamma = 0.597$, $P < 0.05$). Clo 1.0 mg \cdot kg⁻¹ and 3.0 mg \cdot kg⁻¹ (ip) promoted AC activity and increased cAMP content, but Clo 0.3 and 0.1 mg \cdot kg⁻¹ showed no significant effect ($P > 0.05$). Selective I₁-imidazoline receptor antagonist efaroxan (Efa) (10, 5 mg \cdot kg⁻¹, ip) was found to partially reverse the effect of Clo, while Efa 2.5 mg \cdot kg⁻¹ showed no significantly influence. The reduced quantity of G α mRNA expression level correlated well with the Efa dose ($\gamma = 0.900$, $P < 0.05$). The change of AC and cAMP was similar to G α mRNA. **CONCLUSION** Clo increased the myocardial G α mRNA expression, AC activity and cAMP content after scalds in rats.

KEY WORDS: clonidine; burns; messenger RNA; adenylyl cyclase; cyclic AMP