

可乐定对动物烫伤后溶血的抑制作用

王培, 陶静仪, 许顺尧 (第四军医大学药理教研室, 西安 710032, 中国) R 969.4

Inhibitory effect of clonidine on hemolysis after thermal injury in animals

WANG Pei, TAO Jing-Yi, XU Shun-Yao
(Department of Pharmacology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT Clonidine (1 mg · kg⁻¹, ip) inhibited hemolysis in mice and rats after burn. The effects were abolished by pretreatment with yohimbine (5 mg · kg⁻¹, ip) but not by prazosin (10 mg · kg⁻¹, ip). The increased osmotic fragility of erythrocytes and the elevation of plasma NE level in burned animals were markedly lowered by clonidine which also raised the glutathione level of whole blood and enhanced the activity of glutathione peroxidase. These results indicated that the action of clonidine on hemolysis was carried out by means of depression of adrenergic α_2 receptors and reduction of free radicals.

KEY WORDS burns; hemolysis; clonidine; yohimbine; prazosin; erythrocytes; osmotic fragility; glutathione; glutathione peroxidase; norepinephrine

提要 可乐定(1 mg · kg⁻¹, ip)能明显减轻小鼠及大鼠烫伤后溶血的程度。此作用可被育亨宾阻断, 哌唑嗪对其则无明显影响。烫伤动物的红细胞脆性增加, 可乐定对此有明显的抑制作用。可乐定在抗烫伤溶血的同时, 能够降低血浆中去甲肾上腺素水平; 提高烫伤后全血谷胱甘肽水平, 并使烫伤后降低了的谷胱甘肽过氧化物酶活力升高。

关键词 灼伤; 溶血; 红细胞; 渗透脆性; 可乐定; 育亨宾; 哌唑嗪; 谷胱甘肽; 谷胱甘肽过氧化物酶; 去甲肾上腺素 抑制作用, 动物

烧伤休克并发的急性溶血较其他原因引起的休克更为严重。烧伤后红细胞发生一系列变化, 如红细胞凝集, 渗透脆性增加, 变形能力降低, 以及形态学的改变等。产生的原因, 除热力的直接损伤外⁽¹⁾, 就目前所知, 氧

自由基损伤红细胞膜, 是烧伤休克时红细胞发生一系列改变的主要原因之一⁽²⁾。本实验室以往的工作表明, 可乐定通过降低交感神经系统活性, 对烫伤动物有保护作用⁽³⁾, 并能抑制烫伤水肿的形成⁽⁴⁾。本文在以往研究的基础上, 进一步观察可乐定对烧伤休克时急性溶血的影响, 并探讨其抗溶血的作用机制。

MATERIALS AND METHODS

药品 盐酸可乐定(clonidine, Clo, 纯粉剂, 桂林制药厂 1989 年产品), 盐酸育亨宾(yohimbine, Yoh, 粉剂, Sigma, 批号 81F-0464), 盐酸哌唑嗪(prazosin, Pra, 粉剂, 北京制药工业研究所生产), 还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH, 中科院上海生化所), 5-5'-二硫基-2-2'-二硝基苯甲酸(DTNB, 中科院上海生化所), 去甲肾上腺素(norepinephrine, NE, 粉剂, 瑞士 Fluka), α -甲基多巴(α -methyldopa, 日本, 酸性氧化铝(色谱用, 上海五四农场化学试剂厂), IPR-B, 离子对色谱试剂(天津化学试剂厂), 三羟甲基氨基甲烷(Tris, 上海生化试剂商店)。

动物 ♂ SD 大鼠 (196 ± s 21 g), LACA 小鼠(19.8 ± 0.9 g)均由本校实验动物中心提供。

烫伤模型的制作

1 小鼠烫伤模型 清醒小鼠背位固定在铁丝网上, 将剑突平面以下部位浸入 58℃ 热水中烫 30 s 后, 取出擦干。烫伤程度为 50% TBSA, 浅 II°。

2 大鼠烫伤模型 清醒大鼠固定在一特制木板上, 将占总体表面积 40% 的背部置于沸水中烫 10 s 后取出擦干, 烫伤程度为 III°。

Clo 烫伤前 20 min 给药, Yoh, Pra 烫伤

Received 1990 Aug 14

Accepted 1991 Aug 1

前 50 min 给药。

血样品制备与测定 血样均从大鼠腹主动脉采取, 并制备供以下生化测定。

1 血浆游离血红蛋白测定 采用联苯胺法⁽⁵⁾。

2 红细胞渗透脆性 用盐水法测定⁽⁶⁾。

3 全血 GSH 含量及谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活力测定 GSH-Px 用 DTNB 直接法⁽⁷⁾, GSH 含量用 Beutler 法⁽⁸⁾。血红蛋白测定用氰化高铁血红蛋白法⁽⁹⁾。

4 血浆 NE 含量测定 采用双柱双系的高效液相色谱电化学检测法⁽¹⁰⁾。

RESULTS

Clo 对大鼠烫伤后溶血的影响 Clo 组 (1 mg · kg⁻¹, ip) 和生理盐水组各 28 只鼠, 分别于烫后 0.25 h, 0.5 h, 1 h 和 2 h 取血测定血浆游离血红蛋白的含量, Clo 组较生理盐水组烫伤后血浆游离血红蛋白含量明显降低, 两组相比差异非常显著 (Tab 1)。

Tab 1. Effect of ip clonidine 1 mg · kg⁻¹ on postburn hemolysis in rats. $n=7$, $\bar{x} \pm s$, *** $P < 0.01$ vs saline.

Postburn time / min	Plasma free Hb / g · L ⁻¹	
	Saline	Clonidine
15	18.1 ± 28	4.5 ± 1.1***
30	16.8 ± 2.7	3.8 ± 1.4**
60	8.5 ± 1.9	3.1 ± 0.7**
120	8.0 ± 2.2	2.7 ± 0.6***

Yoh 对 Clo 抑制小鼠烫伤后溶血的影响

小鼠 42 只分为生理盐水对照组、Clo 组 (溶解在生理盐水中, 1 mg · kg⁻¹, ip) 及 Clo + Yoh (5 mg · kg⁻¹, ip) 组。烫后 0.5 h 处死动物, 取血测定血浆游离血红蛋白含量。结果表明 Yoh 能够减弱 Clo 对烫伤后溶血的抑制作用。Clo 组为 3.3 ± 0.9 g · L⁻¹, Yoh + Clo 组为 6.2 ± 1.4 g · L⁻¹, 生理盐水对照组为 6.9 ± 1.2 g · L⁻¹。

Pra 对 Clo 抑制小鼠烫伤后溶血的影响

小鼠 43 只分为 5% 葡萄糖溶液组, Clo 组 (溶解在葡萄糖溶液中, 1 mg · kg⁻¹, ip) 及 Clo + Pra (10 mg · kg⁻¹, ip) 组, 烫后 0.5 h 处死动物, 取血测定血浆游离血红蛋白含量。结果表明 Pra 不能取消 Clo 的抗溶血作用, Clo 组为 4.1 ± 1.0 g · L⁻¹, Pra + Clo 组为 3.6 ± 1.2 g · L⁻¹, 葡萄糖组为 7.7 ± 2.0 g · L⁻¹。

Clo 对烫伤大鼠红细胞渗透脆性的影响

大鼠 26 只, 分成正常对照组, 生理盐水对照组及 Clo 组 (1 mg · kg⁻¹, ip), 于烫后 15 min 乙醚麻醉下从腹主动脉取血, 测定红细胞渗透脆性。结果显示 Clo 明显降低大鼠 50% 溶血时的盐水浓度, 表明 Clo 可使烫伤大鼠红细胞渗透脆性降低 (Tab 2)。

Clo 对烫伤大鼠血浆 NE 水平的影响

大鼠 27 只分成正常对照组, 生理盐水对照组及 Clo 组 (1 mg · kg⁻¹, ip), 于烫后 30 min 处死动物, 取血测定血浆 NE 含量。结果表明, 烫伤动物血中 NE 显著升高, Clo 对此有十分明显的抑制作用 (Tab 2)。

Tab 2. Effect of ip clonidine 1 mg · kg⁻¹ on osmotic fragility of RBC and plasma NE levels 15 min after burn in rats. $n=9$, $\bar{x} \pm s$, * $P > 0.05$ vs normal control, ** $P < 0.01$ vs normal control, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs saline.

Group	Saline concentration causing 50% lysis of RBC / g · L ⁻¹	Plasma NE level / pg · ml ⁻¹
Normal	4.47 ± 0.14	638 ± 216
Saline	4.82 ± 0.14***	1298 ± 300***
Clonidine	4.58 ± 0.20**	706 ± 165***

Clo 对烫伤大鼠全血 GSH 含量及 GSH-Px 活力的影响 24 只大鼠分成正常对照组, 生理盐水对照组及 Clo 组 (1 mg · kg⁻¹, ip), 于烫后 30 min 处死动物, 取血测定全血 GSH 含量和 GSH-Px 活力, 结果表明, 烫伤大鼠全血中 GSH 含量减少,

GSH-Px 活力降低。事先给予 Clo 能升高 GSH 含量, 同时提高 GSH-Px 活力(Tab 3)。

Tab 3. Effect of clonidine $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ on glutathione content and glutathione peroxidase activity of whole blood 30 min after burn in rats. $n=8$, $\bar{x} \pm s$, * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$ vs normal control, *** $P < 0.05$ vs saline. EU, enzyme unit.

Group	GSH, nmol / (g Hb)	GSH-Px, $10^3 \times \text{EU} / (\text{g Hb})$
Normal	8.6 ± 1.5	297 ± 35
Saline	$6.8 \pm 0.9^*$	262 ± 19
Clonidine	$8.0 \pm 0.9^{**}$	$291 \pm 26^{***}$

DISCUSSION

交感神经系统强烈兴奋, 大量儿茶酚胺释放是导致烧伤溶血的重要原因^(11,12)。本实验观察到 Clo 在抑制烫伤动物血浆 NE 升高的同时, 产生十分明显的抗溶血作用, 并降低红细胞渗透脆性。其抗溶血作用可被事先应用的 Yoh 取消, 却不受 Pra 影响。提示 Clo 的抗溶血作用可能与其激动中枢 α_2 肾上腺素受体, 抑制交感神经活性, 减少儿茶酚胺释放有关。

氧自由基对红细胞膜的破坏也是烧伤后溶血的重要机制。烧伤时交感神经过度兴奋, 可导致氧自由基生成增多。GSH 除了作为 GSH-Px 的底物对过氧化氢和脂肪酸过氧化物起作用外, 其本身还具有阻止过氧化物形成的作用⁽¹³⁾。本研究发现 Clo 使烫后降低了的全血 GSH 有所恢复, 该作用可能与其降低交感神经兴奋性, 使脂质过氧化反应受抑制, 从而减少 GSH 消耗有关。

GSH-Px 并不直接清除自由基, 但它可以清除过氧化氢和脂质过氧化物, 抑制自由基生成反应。本实验观察到 Clo 可使烫伤动物降低了的 GSH-Px 活力恢复正常, 提示 Clo 的抗溶血作用亦与减少氧自由基的生成和释放, 提高 GSH 含量, 增高 GSH-Px 活力, 从而降低红细胞渗透脆性有关。

REFERENCES

- 1 Baar S, Arrowsmith DJ. Thermal damage to red cells. *J Clin Pathol* 1970; 23 : 572-6.
- 2 Hatherill JR, Till GO, Bruner LH, Ward PA. Thermal injury, intravascular hemolysis, and toxic oxygen products. *J Clin Invest* 1986; 78 : 629-36.
- 3 Shi J, Tao JY, Xu SY. Protective effects of clonidine on burn shock in mice and rats. *Acta Pharmacol Sin* 1987; 8 : 138-42.
- 4 Jiang DJ, Tao JY, Xu SY. Inhibitory effects of clonidine on edema formation after thermal injury in mice and rats. *Acta Pharmacol Sin* 1989; 10 : 540-2.
- 5 赵善政. 血红蛋白测定. 见: 上海市医学化学所, 主编. 临床生化检验 (上册). 第 1 版. 上海: 上海科学技术出版社, 1979 : 123-4.
- 6 宁嗣宗. 红细胞膜缺陷检验. 见: 李影林, 主编. 临床医学检验手册. 第 1 版. 吉林: 吉林科学技术出版社, 1987 : 79-80.
- 7 Hafeman DG, Sunde RA, Hoekstra WG. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. *J Nutr* 1974; 104 : 580-7.
- 8 Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963; 61 : 882-8.
- 9 Tentori L, Salvati AM. Hemoglobinometry in human blood. In: Antonini E, Rossi-Bernardi L, Chiancone E, eds. *Methods in enzymology*; vol 76. NY: Academic Press, 1981 : 707-14.
- 10 Zheo FL, Shen M, Yang XJ, Wu GL. The assay of human plasma adrenaline and noradrenaline by HPLC with electrochemical detector. *Chin J Endocrinol Metab* 1989; 5 : 43-4.
- 11 原世麟. 微循环中血液的变化. 见: 原世麟, 主编. 烧伤. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社 1984 : 56-8.
- 12 Baar S. The influence of catecholamines and prostaglandins on calcium efflux and filtrability of thermally damaged erythrocytes: an *in vitro* study. *Br J Exp Pathol* 1982; 63 : 644-50.
- 13 Valenzuela A, Fernandez V, Videla LA. Hepatic and biliary levels of glutathione and lipid peroxides following iron overload in the rat: effect of simultaneous ethanol administration. *Toxicol Appl Pharmacol* 1983; 70 : 87-95.