

高位脊髓损伤大鼠 α_2 -肾上腺素受体基因的变化

何星颖 石学银 袁红斌 徐海涛 王亚华

【摘要】 目的 研究大鼠高位脊髓损伤后脊髓 α_2 -肾上腺素受体(α_2 -ARs)基因的变化特点,为临床围手术期麻醉管理提供实验依据。**方法** 采用改良 Allens 打击法建立脊髓胸 4 节段重度损伤动物模型;分别于损伤后 1、3 d 及 1、2、3、4 周处死动物,取损伤段及邻近上下段脊髓组织,采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定脊髓不同节段 α_2 -ARs mRNA 表达。**结果** 与不损伤脊髓假手术组比较,损伤段以上节段在损伤后受体表达持续减少,2 周达最低($P < 0.01$),此后受体表达开始逐步增加,4 周受体表达增加至正常水平;损伤段在损伤后受体表达持续减少,1 周达最低($P < 0.01$),此后受体表达开始逐步增加,但至 4 周时仍未恢复至正常水平($P < 0.05$);损伤段以下节段在损伤后 1 d 受体表达减少($P < 0.05$),但 1 周后增加至正常水平,4 周时仍未见明显变化。**结论** 大鼠高位脊髓损伤 4 周后,损伤段脊髓 α_2 -ARs 表达下调,而邻近上下节段脊髓 α_2 -ARs 表达恢复至正常水平。 α_2 -ARs 数目表达变化可能是引起高位脊髓损伤后“脊髓休克”及自主反射异常的中枢机制之一。

【关键词】 脊髓损伤; 肾上腺素受体; 基因表达; 聚合酶链反应

Changes in α_2 -adrenergic receptors gene expression after high-level spinal cord injury in Wistar rats HE Xing-ying, SHI Xue-yin, YUAN Hong-bin, XU Hai-tao, WANG Ya-hua. Department of Anesthesiology, Changzheng Hospital, The Second Military Medical University, Shanghai 200003, China
Corresponding author: SHI Xue-yin (Email: shixueyin1128@yahoo.com.cn)

【Abstract】 Objective To evaluate the change in α_2 -adrenergic receptors (α_2 -ARs) gene expression after high-level injury of the spinal cord (SCI), aiming at developing a more effective perioperative anesthetic management for high-level SCI patients. **Methods** Adult male Wistar rats were anesthetized and severe spinal crush injury at T4 was produced using modified Allens device. The expression of α_2 -ARs mRNA at different levels of spinal cord in normal control rats (C), injured segment (I), above (A) and below (B) the site of injured segment, were measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 1 day, 3 days, 1 week, 2 weeks, 3 weeks and 4 weeks, respectively after SCI. **Results** Compared with group C (sham group), in group A the expression of α_2 -ARs mRNA decreased 1 day after SCI ($P < 0.05$) and dropped to the nadir 2 weeks later ($P < 0.01$), but the expression was restored to the normal level 4 weeks later. In group I the lowering of α_2 -ARs mRNA expression occurred immediately after SCI and down to the lowest value 1 week later ($P < 0.01$), and did not recover to normal level 4 weeks later ($P < 0.05$). In group B downregulation of α_2 -ARs mRNA expression was detected 1 day after SCI ($P < 0.05$), but it was upregulated 1 week later reaching the normal level, which was maintained for 4 weeks. **Conclusion** In a chronic SCI rat model, α_2 -ARs gene expression is downregulated in the injured segment, but returns to the normal level above and below the injured segment. The changes in α_2 -ARs may be a pivotal factor contributing to a series of abnormal responses after high-level SCI.

【Key words】 spinal cord injury; adrenergic receptor; gene expression; polymerase chain reaction

高位脊髓损伤早期临床往往表现为“脊髓休克”,在这一时期,交感神经功能受抑,而迷走副交感神经功能相对亢进,可出现低血压、心动过缓。同时,随着损伤平面以下交感神经功能逐渐恢复,由于失去了高位中枢的调节作用,新形成的脊髓交感反射

弧在结构和功能上发生了一些改变,造成这些患者心血管功能异常,其中最主要的是反射异常,这一现象可能会因为内脏和躯体的刺激(如尿潴留、粪便潴留、尿路梗阻、急腹症等)而诱发,表现为高血压、反射性心动过缓、头痛、损伤平面以上皮肤大量出汗等。其中,高血压呈发作性,严重时可导致颅内出血、肾脏出血、癫痫发作、昏迷、心肌出血、肺水肿,甚至死亡。目前关于脊髓损伤患者心血管功能低下和发作性高血压的确切机制尚不清楚,但有文献提示:高位脊髓损伤后出现的一系列生理功能异常,可能与突触部位 α_1 及 α_2 -肾上腺素受体(ARs)表达变化有关^[1]。既往已有关于高位脊髓损伤动物模型脊髓不

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30772092);上海市医药卫生科技发展基金项目(024097)

作者单位:200003 上海,第二军医大学附属长征医院麻醉科

通信作者:石学银,教授,博士生导师,Email: shixueyin1128@yahoo.com.cn

作者简介:何星颖(1980-),女(汉族),四川省人,医学硕士,主治医师。

同节段 α_1 -ARs 受体表达变化的研究^[2],故本实验中侧重研究高位脊髓损伤大鼠脊髓不同节段 α_2 -ARs 基因表达的动态变化,探讨中枢 α_2 -ARs 数量变化在“脊髓休克”和自主反射异常发生中的可能机制,为高位脊髓损伤患者围手术期治疗和麻醉管理提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组及脊髓损伤模型建立:健康雄性 Wistar 大鼠(购自中科院上海动物中心)42 只,体重 280~310 g,按随机数字表法分为 7 组:假手术组、脊髓损伤后 1、3 d 及 1、2、3、4 周组,每组 6 只。腹腔注射戊巴比妥(50 mg/kg)麻醉大鼠后,咬除胸 4 椎板,暴露脊髓约 1 cm 长,采用改良 Allens 打击法,在胸 4 节段硬膜表面垫一块弯曲度与脊髓表面一致的塑料垫片,用 10 g 砝码自 50 mm 高处自由下落打击垫片,致脊髓重度损伤,清醒后大鼠的 BBB 分级(The Basso, Beattie, Bresnahan locomotor rating scale)^[3]评分为 0 分,无下肢运动,表明制模成功。假手术组仅咬除椎板,未打击脊髓。

1.2 脊髓 α_2 -ARs mRNA 表达测定:用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)。

1.2.1 RNA 抽提:于脊髓损伤后相应时间点处死动物,取损伤段及邻近上下段脊髓组织,假手术组亦取相应不同节段脊髓组织。以 RNA 纯化试剂盒提取组织总 RNA,将总 RNA 及进一步获得的 mRNA 分别用适量 dH₂O 稀释后,于紫外分光光度计中进行扫描测定,在波长 260 nm 处测其吸光度(A)值,以 β -肌动蛋白(β -actin)作为扩增的内参照,并计算 α_2 -ARs mRNA 浓度(以比值表示)。

1.2.2 RT-PCR 法扩增 β -actin 和 α_2 -ARs 基因片段: β -actin 和 α_2 -ARs 引物均由上海博亚生物技术有限公司合成;采用宝生物(大连)工程有限公司 RT-PCR 试剂盒进行两步法扩增。 β -actin 引物根据文献^[4]自行设计,上游引物 5'-GTCCCTGTATG CCTCTGGTC-3',下游引物 5'-GGTCTTTACGG ATGTCAACG-3'。 α_2 -ARs 上游引物 5'-TCTTCT GGATCGGCTACTGC-3',下游引物 5'-TGGGAA GGCAAAGGGTCT-3';所得扩增产物大小分别为 458 bp 和 237 bp。扩增完成后取 15 μ l 扩增产物在琼脂糖凝胶中进行电泳检测,凝胶扫描成像系统记录电泳结果。

1.3 统计学处理:计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS 8.0 统计软件行单因素方差分析(ANOVA),组间比较用 Dunnett-*t* 检验, $P<0.05$

为差异有统计学意义。

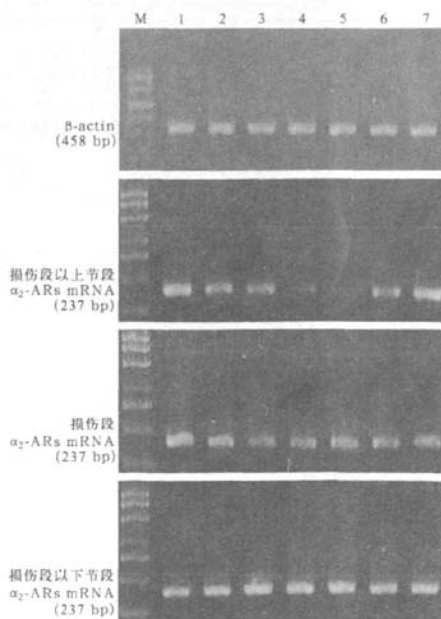
2 结果

RT-PCR 结果显示(表 1;图 1):与假手术组比较,高位脊髓损伤后,损伤段以上节段在损伤后受体表达持续减少,至损伤后 2 周达最低($P<0.01$),此后受体表达开始逐步增加,至损伤后 4 周受体表达与假手术组无明显差异;损伤段在损伤后受体表达持续减少,至损伤后 1 周达最低($P<0.01$),此后受体表达开始逐步增加,但截至损伤后 4 周受体表达仍未恢复至假手术组水平($P<0.05$);损伤段以下节段在损伤后 1 d 受体表达减少($P<0.05$),但 1 周后受体表达与假手术组无明显差异,至损伤后 4 周受体表达未见明显变化。

表 1 各组大鼠脊髓损伤后各节段 α_2 -ARs mRNA 表达强度比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	损伤段以上节段	损伤段	损伤段以下节段
假手术组	6	1.00 $\pm$ 0.07	0.96 $\pm$ 0.06	1.14 $\pm$ 0.08
伤后 1 d 组	6	0.81 $\pm$ 0.03 ^a	0.82 $\pm$ 0.02 ^a	0.94 $\pm$ 0.07 ^a
伤后 3 d 组	6	0.63 $\pm$ 0.02 ^a	0.79 $\pm$ 0.01 ^a	0.97 $\pm$ 0.08 ^a
伤后 1 周组	6	0.45 $\pm$ 0.01 ^a	0.73 $\pm$ 0.02 ^b	1.07 $\pm$ 0.14
伤后 2 周组	6	0.35 $\pm$ 0.02 ^b	0.79 $\pm$ 0.03 ^a	1.06 $\pm$ 0.10
伤后 3 周组	6	0.78 $\pm$ 0.03 ^a	0.76 $\pm$ 0.03 ^a	1.07 $\pm$ 0.17
伤后 4 周组	6	1.01 $\pm$ 0.07	0.78 $\pm$ 0.02 ^a	1.06 $\pm$ 0.13

注:与假手术组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$



M:Markers;1~7 依次为:假手术、伤后 1、3 d 及 1、2、3、4 周组

图 1 RT-PCR 检测各组大鼠脊髓损伤后各节段 α_2 -ARs mRNA 表达

3 讨论

α_2 -ARs 属于 G 蛋白耦联的 7 次跨膜受体超家族成员,介导低血压、镇静-催眠、镇痛、麻醉等多种生理效应。中枢神经系统 α_2 -ARs 广泛分布于人和动物大脑和脊髓后角去甲肾上腺素能细胞体的突触前和突触后。位于突触前的 α_2 -ARs 主要抑制中枢去甲肾上腺素合成及通过负反馈作用自动调节去甲肾上腺素释放,降低中枢神经去甲肾上腺素水平;而位于突触后的 α_2 -ARs 主要抑制交感神经活性^[5]。

高位脊髓损伤患者早期往往表现为“脊髓休克”。近年有研究发现脊髓损伤的慢性动物模型中,神经系统发生了显著的可塑性变化^[6],这种改变可能引起交感神经系统过度反应。本研究中发现:高位脊髓损伤后,损伤段以上节段在损伤后受体表达持续减少,2 周达最低,此后受体表达开始逐步增加,4 周达正常水平;损伤段在损伤后受体表达持续减少,1 周达最低,此后受体表达开始逐步增加,但 4 周时仍未恢复至正常水平;损伤段以下节段在损伤后 1 d 受体表达减少,但 1 周时已达正常水平,至 4 周仍未见明显变化。提示高位脊髓损伤早期损伤段以下节段 α_2 -ARs 表达略有减少,而进入慢性期(4 周)后受体表达接近正常。由此推测临床“脊髓休克”及随后自主反射异常的发生可能与损伤段以下节段 α_1 与 α_2 -ARs 表达差异有关,这种差异使两种受体比例失调。神经解剖学和生理学研究揭示,神经系统结构(神经元、突触的超微结构、神经递质和神经通路)和电生理活动均表现出可塑性。可以认为脊髓损伤后损伤段以下节段受体表达的变化,是机体适应性反应的结果,是神经系统可塑性的表现。还有研究表明,高位脊髓损伤后外周 α_1 -ARs 敏感性增加^[7]。那

么中枢部位发生的可塑性变化与外周部位神经功能的改变可能共同参与了高位脊髓损伤后“脊髓休克”及自主反射异常等病理生理过程的发生。

综上所述,脊髓 α_2 -ARs 数目表达变化可能是引起“脊髓休克”时低血压及自主反射异常时严重高血压的中枢主要机制之一。在临床上,高位脊髓损伤患者的麻醉管理应维持适当的麻醉深度,麻醉过浅易诱发自主反射异常,麻醉过深极易引起低血压;脊髓损伤患者应用心血管药物时应综合考虑交感神经系统和心血管功能状况,权衡利弊,谨慎对待^[8]。

参考文献

- [1] Blackmer J. Rehabilitation medicine; 1. Autonomic dysreflexia [J]. CMAJ, 2003, 169(9): 931-935.
- [2] Weaver LC. What causes autonomic dysreflexia after spinal cord injury[J]? Clin Auton Res, 2002, 12(6): 424-426.
- [3] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC, et al. MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability[J]. J Neurotrauma, 1996, 13(7): 343-359.
- [4] Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH, et al. Generation and initial analysis of more than 15 000 full-length human and mouse cDNA sequences[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(26): 16899-16903.
- [5] Civantos CB, Alexandre de Artigiane A. Alpha-adrenoceptor subtype[J]. Pharmacol Res, 2001, 44(3): 195-208.
- [6] Krassioukov AV, Weaver LC. Morphological changes in sympathetic preganglionic neurons after spinal cord injury in rats[J]. Neuroscience, 1996, 70(1): 211-225.
- [7] Landrum LM, Thompson GM, Blair RW. Does postsynaptic alpha1-adrenergic receptor supersensitivity contribute to autonomic dysreflexia[J]? Am J Physiol, 1998, 274(4 Pt 2): H1090-1098.
- [8] 徐振东, 石学银, 何星颖, 等. 高位脊髓损伤对大鼠心肌功能的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(1): 57-59.

(收稿日期: 2008-01-30 修回日期: 2008-10-17)

(本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

失血性休克并发脓毒症对胃肠运动的影响

理解“二次打击”学说对失血性休克(HS)的合理治疗至关重要。德国研究人员通过盲肠结扎穿孔术(CLP)模拟 HS 并发脓毒症对胃肠道分子和功能的影响。SD 大鼠被分为假手术组、HS 组、CLP 组、HS+CLP 组。HS+24 h 后 CLP 组(HS+延迟 CLP),用以研究对肠道运动及结肠平滑肌收缩性的影响。用逆转录-聚合酶链反应测定术后 6 h 分离结肠部白细胞介素-6(IL-6)、IL-10、血红素加氧酶 1 mRNA 的表达。结肠全部可见中性粒细胞数量增加。HS+CLP 组 24 h 死亡率(88%)远高于其他组。与假手术组、HS 组比较,CLP 组胃肠运动大大减弱;HS+延迟 CLP 组胃肠运动正常。与假手术组、HS 组比较,CLP 组结肠收缩下降 50%,相反,由于胆碱作用 HS+延迟 CLP 组胃肠收缩轻度抑制。与假手术组、HS 组比较,CLP 组、HS+CLP 组 IL-6、IL-10、血红素加氧酶 1 等炎症分子信使 RNA 的表达显著增强;而 HS+延迟 CLP 组炎症分子信使 RNA 的表达抑制。与假手术组、HS 组比较,CLP 组术后 24 h 中性粒细胞大量趋化聚集到盲肠肌层以下;而 HS+延迟 CLP 组中性粒细胞趋化作用显著减弱。这些数据说明,HS 动物应尽量避免同时损伤,发生严重并发症。

白慧颖,编译自《Shock》,2008-09-11(电子版);胡森,审核