

· 论 著 ·

# 脊髓损伤后自主神经反射异常大鼠心脏和肠系膜前动脉 $\alpha$ -肾上腺素能受体的表达

石学银<sup>1\*</sup>, 邹 最<sup>1</sup>, 李盈科<sup>1</sup>, 徐振东<sup>2</sup>, 周运恒<sup>3</sup>, 于 军<sup>3</sup>, 刘 刚<sup>1</sup>

(1. 第二军医大学长征医院麻醉科, 上海 200003; 2. 复旦大学附属华山医院麻醉科, 上海 200040; 3. 第二军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433)

**[摘要]** **目的:** 观察高位脊髓横切(spinal cord transection, SCT)慢性期自主神经反射异常(autonomic dysreflexia, AD)大鼠心脏和肠系膜前动脉  $\alpha$ -肾上腺素能受体( $\alpha$ -AR)各亚型 mRNA 表达量, 探讨 AD 的可能机制。**方法:** 暴露大鼠脊髓, 横切 T<sub>4</sub> 节段, 术后 4 周用自制导管刺激直肠, 观察升压反应, 挑选发生 AD 的大鼠(AD 组,  $n=16$ ), 取其心脏和肠系膜前动脉及其分支, 实时定量 PCR 测定  $\alpha_{1A}$ -、 $\alpha_{1B}$ -、 $\alpha_{1D}$ -、 $\alpha_{2A}$ -、 $\alpha_{2B}$ -、 $\alpha_{2C}$ -AR mRNA 的表达量, 与只暴露脊髓、不进行横切的大鼠(假手术组,  $n=16$ )进行比较。**结果:** 与假手术组相比, AD 组大鼠心脏  $\alpha_{1A}$ -AR mRNA ( $P<0.05$ )、 $\alpha_{1B}$ -AR mRNA ( $P<0.01$ ) 表达下调, 而  $\alpha_{1D}$ -AR mRNA 表达量未见明显改变; 肠系膜前动脉  $\alpha_{1A}$ -、 $\alpha_{1D}$ -、 $\alpha_{2B}$ -AR mRNA ( $P<0.01$ )、 $\alpha_{2C}$ -AR mRNA ( $P<0.05$ ) 表达上调, 而  $\alpha_{1B}$ -、 $\alpha_{2A}$ -AR mRNA 表达量未见明显改变。**结论:** 大鼠 SCT 慢性期 AD 的发生可能与心脏  $\alpha_{1A}$ -、 $\alpha_{1B}$ -AR, 肠系膜前动脉  $\alpha_{1A}$ -、 $\alpha_{1D}$ -、 $\alpha_{2B}$ -、 $\alpha_{2C}$ -AR 的异常表达有关。

**[关键词]** 脊髓损伤; 自主神经反射异常; 受体, 肾上腺素能  $\alpha$ ; 心脏; 肠系膜动脉**[中图分类号]** R 651.21 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)02-0156-04

## Expression changes of alpha adrenergic receptors in heart and mesenteric artery in autonomic dysreflexia rats after spinal cord transection

SHI Xue-yin<sup>1\*</sup>, ZOU Zui<sup>1</sup>, LI Ying-ke<sup>1</sup>, XU Zhen-dong<sup>2</sup>, ZHOU Yun-heng<sup>3</sup>, YU Jun<sup>3</sup>, LIU Gang<sup>1</sup> (1. Department of Anaesthesiology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Anaesthesiology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040; 3. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the changes of alpha adrenergic receptors ( $\alpha$ -AR) mRNA expression in heart and mesenteric artery in autonomic dysreflexia (AD) rats after spinal cord transection, so as to explore the possible mechanism of AD. **Methods:** The spinal cord of rats was exposed and the fourth thoracic spinal cord was transected; 4 weeks later, rats' rectum was stimulated by self-made catheter and those with a mean arterial blood pressure increased by more than 15 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa) were chosen as AD group ( $n=16$ ). Heart and mesenteric arteries along with their branches were harvested. mRNA expression of  $\alpha_{1A}$ -、 $\alpha_{1B}$ -、 $\alpha_{1D}$ -、 $\alpha_{2A}$ -、 $\alpha_{2B}$ - and  $\alpha_{2C}$ -AR was quantified by real time PCR and the result was compared with that in sham-operated group (the fourth thoracic spinal cord was exposed but not transected). **Results:** Compared with sham-operated group, rats in AD group had a lower expression of  $\alpha_{1A}$ -AR mRNA ( $P<0.05$ ) and  $\alpha_{1B}$ -AR mRNA ( $P<0.01$ ) in their heart, but the expression of  $\alpha_{1D}$ -AR mRNA had no obvious change. Also, rats in AD group had a higher expression of  $\alpha_{1A}$ -、 $\alpha_{1D}$ -、 $\alpha_{2B}$ -AR mRNA (all  $P<0.01$ ) and  $\alpha_{2C}$ -AR mRNA ( $P<0.05$ ) in their mesenteric artery, but  $\alpha_{1B}$ - and  $\alpha_{2A}$ -AR mRNA expression had no obvious change. **Conclusion:** AD may occur in the chronic stage of spinal cord transection in rats. The abnormal expression of  $\alpha_{1A}$ - and  $\alpha_{1B}$ -AR mRNA in the heart and  $\alpha_{1A}$ -、 $\alpha_{1D}$ -、 $\alpha_{2B}$ - and  $\alpha_{2C}$ -AR mRNA in the mesenteric artery may be related to AD.

**[KEY WORDS]** spinal cord injuries; autonomic dysreflexia; receptors, adrenergic, alpha; heart; mesenteric arteries

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(2): 156-159]

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是临床常见创伤, T<sub>6</sub>平面以上的 SCI 患者在进入慢性期后, 患者易受到膀胱胀满、肠道不通等不良刺激, 时常发生自主神经反射异常(autonomic dysreflexia, AD)。AD 发作时, 血管广泛收缩, 出现恶性高血压, 收缩压和舒张压可分别高达 250 ~ 300 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa) 和 200 ~ 220 mmHg, 常伴

**[基金项目]** 上海市科委重点项目(054119522); 上海市卫生局科委基金(024097)。Supported by Fund of Key Program of Science Committee of Shanghai Municipal Government(054119522) and Fund of Science Committee of Health Department of Shanghai Municipal Government(024097)。

**[作者简介]** 石学银, 教授、主任医师, 博士生导师。

\* Corresponding author. E-mail: shixueyin1128@yahoo.com.cn

有反射性心动过缓,心律紊乱,严重时可导致肺水肿、颅内出血,甚至死亡,是SCI后最为严重的并发症之一。目前的研究<sup>[1,2]</sup>认为,SCI患者慢性期出现AD可能与 $\alpha$ -肾上腺素能受体( $\alpha$ -AR)有密切关系,但还缺乏直接的证据。前期的研究工作<sup>[3]</sup>表明,高位SCI大鼠血管对 $\alpha$ -AR激动剂反应性升高,原因可能是受体表达量增加,也可能是敏感性上调,受体后通路改变等。 $\alpha$ -AR各亚型表达量变化与出现AD的关系目前未见相应的报道。为了明确SCI后 $\alpha$ -AR各亚型表达量改变与AD的关系,本研究以高位脊髓横切(spinal cord transection, SCT)大鼠为模型,运用RT-PCR法测定心脏和肠系膜前动脉 $\alpha_1$ -及 $\alpha_2$ -AR各亚型mRNA表达量,探讨高位SCT慢性期心血管系统功能紊乱的可能机制,为SCI患者的康复治疗提供一定的实验依据。

## 1 材料和方法

1.1 试剂和仪器 TRIzol(Sangon公司),RT试剂盒(BBI公司),RT-PCR Kit,DNA I(TaKaRa公司),DNA Marker BL2000(BioLight Technology公司),RT-PCR仪(ABI PRISM 7000),微型电泳仪(上海西巴斯生物技术开发有限公司),TGL-台式高速离心机(HITACHI公司),紫外分光光度计(UV-2401PC),MPA2000多通道生理记录仪(奥尔科特生物科技有限公司)。

1.2 动物分组及处理 健康雄性Wistar大鼠32只(购自中科院实验动物中心),体质量260~300 g。SCT模型制作参考文献<sup>[4]</sup>并作改进,50 mg/kg 氯胺酮复合5 mg/kg 地西洋注射液腹腔注射后,咬除T<sub>4</sub>椎板,暴露脊髓。用自制超薄刀片横切T<sub>4</sub>脊髓,术后连续3 d每天给予青霉素40万U,腹腔输注5%葡萄糖液10 ml;术后1周挤压膀胱人工排尿。术后4周,股动脉插管,接换能器和多通道生理记录仪,3 h后大鼠血压平稳时,用自制导管刺激直肠,观察升压反应,挑选平均动脉压比基础值升高超过15 mmHg的SCT组大鼠(AD组,  $n=16$ ),处死大鼠,取心脏和肠系膜前动脉及其分支。取肠系膜前动脉时,小心分离肠系膜前动脉及其分支,尽可能取至空肠和回肠(抽提动脉RNA时,每2只大鼠的肠系膜前动脉及其分支为1份)<sup>[5]</sup>。测定大鼠各组织 $\alpha$ -AR的表达,与只暴露脊髓,不进行横切(假手术组,  $n=16$ )大鼠进行比较。

### 1.3 RT-PCR法检测 $\alpha$ -AR的表达

1.3.1 RNA抽提及cDNA合成 RNA纯化试剂盒提取心脏和肠系膜前动脉总RNA,以DNA I对

所得RNA进行处理;每份RNA分别取5  $\mu$ l总RNA进行1%变性凝胶电泳,验证RNA完整性;测D<sub>260</sub>值计算mRNA浓度。2  $\mu$ g RNA在20  $\mu$ l体系中按标准程序进行反转录;每个RNA样品取2  $\mu$ g RNA,RT时不加反转录酶处理,作为阴性对照,进一步排除基因组DNA污染。cDNA合成按RT试剂盒进行。

1.3.2 引物设计 引物经Primer 5.0设计,设计完成后进行BLAST比对分析。 $\alpha_{1A}$ :正义5'-TAG AGC ACA AGG GAA GAG G-3',反义5'-AAA GGT GAT GAC TGG GAA AG-3',产物大小110 bp; $\alpha_{1B}$ :正义5'-CGG GTG GTT GAT GAA ATA GC-3',反义5'-TGT GCT GTA CGG CCT CCA-3',产物大小164 bp; $\alpha_{1D}$ :正义5'-GGA CTT TCC CTT TCC GAT GT-3',反义5'-TTT GGT GGC GTA TTG GAT GC-3',产物大小258 bp; $\alpha_{2A}$ :正义5'-TCC GTC TTG GCG CTC TTT-3',反义5'-CCC TAC CAG CTC TTC AAC TTC-3',产物大小138 bp; $\alpha_{2B}$ :正义5'-AGG GTC GGT GGA CAT TCG-3',反义5'-ACA ACA ATC CCT ACC ATA CC-3',产物大小290 bp; $\alpha_{2C}$ :正义5'-GCT TGA GCC CAT GTA TCC C-3',反义5'-AGA CCC TTT GCC TTC CCA T-3',产物大小158 bp; $\beta$ -actin:正义5'-GCA ACT GTA GGC ATT TCT G-3',反义5'-CCT CAC TGT CCA CCT TCC-3',产物大小200 bp。

1.3.3 RT-PCR反应 SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (2 $\times$ ) 12.5  $\mu$ l,PCR上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各0.5  $\mu$ l,ROX Reference Dye II (50 $\times$ ) 0.5  $\mu$ l,cDNA模板2.0  $\mu$ l,dH<sub>2</sub>O(灭菌蒸馏水)9.0  $\mu$ l,总体积为25  $\mu$ l。

逆转录产物cDNA以10倍稀释,成为各条基因的标准品,每个标准曲线取4个点,分别为100、10、1、0.1 ng。各产物浓度根据标准曲线求得。为了控制样本误差,先根据 $\beta$ -actin的标准曲线算出各样本的相对 $\beta$ -actin mRNA浓度,然后将6条待测基因的浓度与 $\beta$ -actin浓度比对,得出各份样品标准化处理以后的相对mRNA浓度。所有PCR产物均经过熔解曲线分析(PCR产物熔解温度设置为65~95 $^{\circ}$ C)和1%琼脂糖凝胶电泳,PCR产物割胶回收、测序,与目的片段比对,验证PCR产物。

1.4 统计学处理 计量资料均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用SPSS 12.0统计软件行配对 $t$ 检验。

## 2 结果

2.1 标准曲线、熔解曲线分析  $\alpha$ -AR各亚型mR-

NA 表达量通过标准曲线求得。标准曲线分别为  $\alpha_{1A}$ :  $y = -3.33x + 32.96, R^2 = 0.996$  (图 1);  $\alpha_{1B}$ :  $y = -2.86x + 28.98, R^2 = 0.987$ ;  $\alpha_{1D}$ :  $y = -3.38x + 21.89, R^2 = 0.967$ ;  $\alpha_{2A}$ :  $y = -3.63x + 18.96, R^2 = 0.956$ ;  $\alpha_{2B}$ :  $y = -2.91x + 29.63, R^2 = 0.989$ ;  $\alpha_{2C}$ :  $y = -3.12x + 27.69, R^2 = 0.913$ ;  $\beta$ -actin:  $y = -3.01x + 34.12, R^2 = 0.915$ 。各样品通过  $\beta$ -actin 进行标准化处理。RT-PCR 的熔解曲线分析只显示单峰(图 2),表明 PCR 非特异性扩增产物较少,PCR 产物经电泳后割胶回收、测序,分析表明 7 条基因均为目的产物。

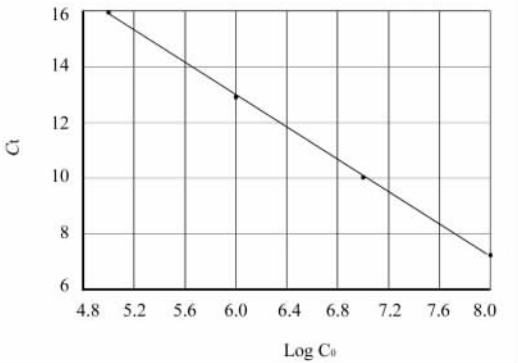


图 1  $\alpha_{1A}$ -AR mRNA 的标准曲线  
Fig 1 Standard curve of  $\alpha_{1A}$ -AR mRNA

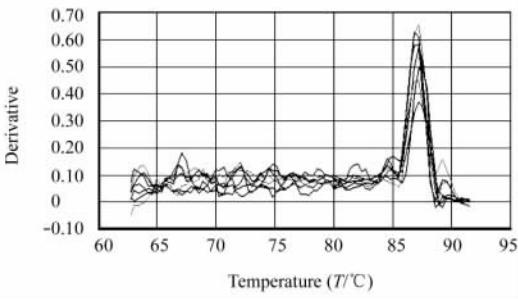


图 2 PCR 产物的熔解曲线  
Fig 2 Dissociation curve of PCR products

2.2 心脏组织的  $\alpha$ -AR mRNA 表达 与假手术组比较,AD 组  $\alpha_{1A}$ -AR mRNA 由  $1.003 \pm 0.029$  降至  $0.873 \pm 0.045$  ( $t = 2.236, P < 0.05$ )、 $\alpha_{1B}$ -AR mRNA 由  $0.686 \pm 0.079$  降至  $1.009 \pm 0.056$  ( $t = 6.965, P < 0.01$ ),而  $\alpha_{1D}$ -AR mRNA 表达量无明显差异(图 3)。

2.3 肠系膜前动脉  $\alpha$ -AR mRNA 表达 与假手术组比较,AD 组肠系膜前动脉  $\alpha_{1A}$ -AR mRNA 由  $1.303 \pm 0.074$  上调至  $1.856 \pm 0.079$  ( $t = 7.620, P < 0.01$ )、 $\alpha_{1D}$ -AR mRNA 由  $0.230 \pm 0.035$  上调至

$0.383 \pm 0.037$  ( $t = 10.683, P < 0.01$ ),而  $\alpha_{1B}$ -AR mRNA 表达量无明显差异; $\alpha_{2B}$ -AR mRNA 由  $1.219 \pm 0.061$  上调至  $1.859 \pm 0.108$  ( $t = 16.303, P < 0.01$ )、 $\alpha_{2C}$ -AR mRNA 由  $0.339 \pm 0.047$  上调至  $0.438 \pm 0.015$  ( $t = 2.483, P < 0.05$ ),而  $\alpha_{2A}$ -AR mRNA 表达量无明显改变(图 4)。

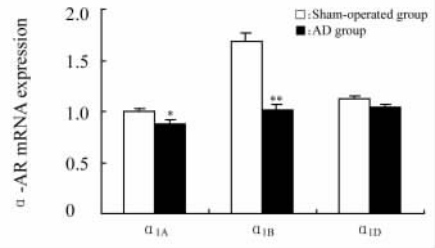


图 3 心脏  $\alpha_1$ -AR mRNA 表达量  
Fig 3  $\alpha_1$ -AR mRNA expression in the heart

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs sham-operated group;  $n = 8, \bar{x} \pm s$

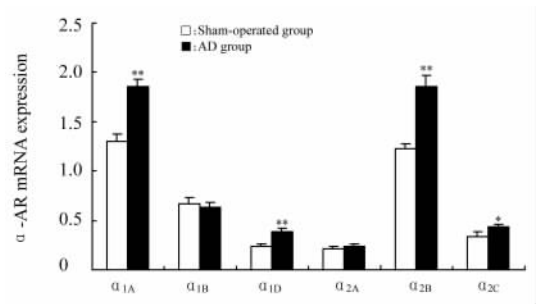


图 4 肠系膜前动脉  $\alpha_1$ -AR、 $\alpha_2$ -AR mRNA 各亚型表达量  
Fig 4  $\alpha_1$ -AR,  $\alpha_2$ -AR mRNA expression in the mesenteric artery

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs sham-operated group;  $n = 8, \bar{x} \pm s$

### 3 讨论

正常情况下,所有的内脏血管反射均在脊髓水平进行整合,维持血压的相对稳定。SCT 后,损伤平面以下的刺激,从脊髓背外侧向上传入,但在 SCI 处被阻断,兴奋中间神经元,引起交感神经传出纤维的反射性兴奋,激发损伤平面以下的内脏和肢体血管广泛收缩,导致血压上升。由于压力感受性反射所引起的脑干下行抑制性冲动不能传至 SCT 平面以下的区域,血管的广泛收缩常导致恶性高血压。AD 在 T<sub>6</sub>或以上节段受损的患者中较常见。发作时,外周和内脏血管的广泛收缩导致恶性高血压<sup>[7]</sup>。发生 AD 的患者,神经系统发生可塑性变化的同

时<sup>[8]</sup>,血管对 $\alpha$ -AR激动剂的反应性也上升,原因可能是受体数目表达量增加,也可能是敏感性上调,受体后通路改变等。

$\alpha$ -AR属于交感-儿茶酚胺系统的一部分,是一种儿茶酚胺细胞膜表面受体, $\alpha$ -AR内源性配基是去甲肾上腺素与肾上腺素。 $\alpha$ -AR在介导心血管收缩反应中起着重要的作用。 $\alpha_1$ -AR通过 $G_{q/11}$ -PLC信号转导通路引起血管收缩,可以分为 $\alpha_{1A}$ -AR、 $\alpha_{1B}$ -AR、 $\alpha_{1D}$ -AR 3种; $\alpha_2$ -AR通过 $G_i$ -AC-cAMP通路引起血管收缩,可以分为 $\alpha_{2A}$ -AR、 $\alpha_{2B}$ -AR、 $\alpha_{2C}$ -AR 3种。大鼠的功能性 $\alpha_1$ -AR在肠系膜动脉主要为 $\alpha_{1D}$ 亚型,而肠系膜阻力血管床的 $\alpha_1$ -AR属于 $\alpha_{1A}$ -AR亚型; $\alpha_{2B}$ -AR在血管平滑肌表达十分广泛,参与调节血液动力学反应,本研究结果表明肠系膜前动脉 $\alpha_{1A}$ -AR、 $\alpha_{1D}$ -AR、 $\alpha_{2B}$ -AR、 $\alpha_{2C}$ -AR mRNA表达上调( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),可能是患者受到不良刺激时全身血管广泛收缩、出现AD的原因之一。

本研究结果还发现心脏 $\alpha_{1A}$ -AR、 $\alpha_{1B}$ -AR mRNA表达量较假手术组降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。AD组大鼠可出现体位性低血压,与以往报道<sup>[6]</sup>一致。心脏 $\alpha_{1A}$ -AR、 $\alpha_{1B}$ -AR介导大鼠心肌正性变力效应的作用相类似,而 $\alpha_{1D}$ 几乎不发生作用。心脏 $\alpha_1$ -AR表达量发生改变,可能是在SCT以上节段,交感神经与副交感神经在一种较低的稳态下达到平衡的结果<sup>[9,10]</sup>。 $\alpha_1$ -AR作为交感系统的一部分,表达下调,心脏 $\alpha_1$ -AR mRNA表达量下降可能是SCT慢性期患者出现体位性低血压的原因。而大鼠心脏 $\alpha_2$ -AR的表达量很弱,且与心脏收缩力关系不大,所以本实验未对其进行研究。

综上所述,大鼠SCT慢性期AD大鼠心脏和肠系膜前动脉 $\alpha$ -AR mRNA亚型表达量发生了变化,可能是AD大鼠慢性期心血管功能紊乱的原因,但

具体机制尚待进一步研究。

## [参考文献]

- [1] Teasell RW, Arnold JM, Krassioukov A, et al. Cardiovascular consequences of loss of supraspinal control of the sympathetic nervous system after spinal cord injury[J]. Arch Phys Med Rehabil, 2000, 81: 506-516.
- [2] Weaver LC. What causes autonomic dysreflexia after spinal cord injury[J]. Clin Auton Res, 2002, 12: 424-426.
- [3] 何星颖,石学银,徐振东,等. 大鼠高位脊髓损伤后 $\alpha_1$ -肾上腺素受体表达变化的研究[J]. 第二军医大学学报, 2005, 26: 323-326.
- [4] Jacob JE, Pniak A, Weaver LC, et al. Autonomic dysreflexia in a mouse model of spinal cord injury[J]. Neuroscience, 2001, 108: 687-693.
- [5] Phillips JK, Vidovic M, Hill CE. Alpha-adrenergic, neurokinin and muscarinic receptors in rat mesenteric artery: an mRNA study during postnatal development[J]. Mech Ageing Dev, 1996, 92: 235-246.
- [6] Cariga P, Ahmed S, Mathias CJ, et al. The prevalence and association of neck (coat-hanger) pain and orthostatic (postural) hypotension in human spinal cord injury[J]. Spinal Cord, 2002, 40: 77-82.
- [7] Weaver LC, Marsh DR, Gris D, et al. Central mechanisms for autonomic dysreflexia after spinal cord injury[J]. Prog Brain Res, 2002, 137: 83-95.
- [8] Grimm DR, De Meersman RE, Almenoff PL, et al. Sympathovagal balance of the heart in subjects with spinal cord injury[J]. Am J Physiol, 1997, 272: H835-H842.
- [9] Krassioukov AV, Johns DG, Schramm LP. Sensitivity of sympathetically correlated spinal interneurons, renal sympathetic nerve activity, and arterial pressure to somatic and visceral stimuli after chronic spinal injury[J]. J Neurotrauma, 2002, 19: 1521-1529.
- [10] Gao SA, Ambring A, Lambert G, et al. Autonomic control of the heart and renal vascular bed during autonomic dysreflexia in high spinal cord injury[J]. Clin Auton Res, 2002, 12: 457-464.

[收稿日期] 2005-09-28

[修回日期] 2005-12-30

[本文编辑] 贾泽军

## 我校王林辉等获得上海市卫生系统第十届“银蛇奖”

上海市卫生系统第十届“银蛇奖”评选活动已揭晓,全市共15位医务青年获本届“银蛇奖”,其中一等奖2人、二等奖5人、三等奖8人。本届15位“银蛇奖”得主是从全市76位候选人中遴选而出。我校长海医院泌尿外科王林辉荣获本届“银蛇奖”一等奖,长征医院泌尿外科郑军华获得二等奖,科技部郑兴东获得三等奖;长海医院泌尿外科主任孙颖浩教授获得特别荣誉奖。

“银蛇奖”是上海市卫生系统为青年医务工作者设立的特殊荣誉奖项,自1989年设立以来共组织了10届评选活动,共有145位青年人才先后荣获“银蛇奖”,14位“银蛇奖”一等奖的培养导师荣获“特别荣誉奖”,另有175位优秀医务青年荣获提名奖。