

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2019.08.0866

· 论 著 ·

肾上腺素、瞬时受体电位香草酸 1 通道和 P 物质在急性脊髓损伤大鼠并发肺损伤中的变化及意义

喻 林, 储瑞亮, 毕 杨, 何 波, 南国新*

重庆医科大学附属儿童医院骨二科, 儿童发育疾病研究教育部重点实验室, 儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地, 儿科学重庆市重点实验室, 重庆市干细胞治疗工程技术研究中心, 重庆 400014

[摘要] **目的** 探讨肾上腺素、瞬时受体电位香草酸 1 (TRPV1) 通道和 P 物质在大鼠急性脊髓损伤 (ASCI) 并发肺损伤中的变化及意义。**方法** 将 228 只雌性 SD 大鼠按随机数字表法分为假手术组 (90 只)、ASCI 组 (108 只)、双侧肾上腺切除组 (15 只)、双侧肾上腺切除后 ASCI 组 (15 只)。采用改良 Allen's 打击模型 (打击锤质量为 10 g, 打击高度为 25 mm) 于 T₁₀ 脊髓节段制备 ASCI 模型, 假手术组仅暴露 T₁₀ 节段脊髓, 双侧肾上腺切除后 ASCI 组于肾上腺切除术 5 d 后制作 ASCI 模型。采用高效液相色谱法检查大鼠血清肾上腺素水平。取大鼠肺组织标本, 计算肺湿干质量比以反映肺组织水肿变化, 采用 H-E 染色检测肺组织病理学变化, 采用免疫组织化学染色、蛋白质印迹法检测肺组织中 TRPV1 蛋白表达, 采用酶联免疫吸附试验检测肺组织中 P 物质的含量。**结果** 脊髓损伤后 2、6、12、24、48、72 h, ASCI 组大鼠血清肾上腺素水平均高于假手术组, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01)。脊髓损伤后 24、48、72 h, ASCI 组大鼠肺水肿和肺损伤组织病理学变化逐渐加重, 损伤 1 周时开始恢复。脊髓损伤后 24、48、72 h, ASCI 组大鼠肺组织 TRPV1 蛋白表达量和 P 物质含量均较假手术组升高, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05 , P 均 < 0.01)。脊髓损伤后 72 h, 双侧肾上腺切除后 ASCI 组肺组织水肿和组织病理学变化均较 ASCI 组减轻。**结论** 肾上腺素可能参与大鼠 ASCI 并发的肺水肿和肺损伤进程, 这种效应可能与肺组织中 TRPV1、P 物质的表达上调有关; 双侧肾上腺切除预处理可减轻 ASCI 并发的肺水肿和肺损伤程度。

[关键词] 脊髓损伤; 肺损伤; 肾上腺素; 瞬时受体电位香草酸 1 通道; P 物质**[中图分类号]** R 651.21 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2019)08-0866-07

Adrenaline, transient receptor potential vanilloid 1 channel and substance P in rats with acute spinal cord injury complicated with lung injury

YU Lin, CHU Rui-liang, BI Yang, HE Bo, NAN Guo-xin*

Department of Orthopedics (II), Children's Hospital of Chongqing Medical University, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing Engineering Research Center of Stem Cell Therapy, Chongqing 400014, China

[Abstract] **Objective** To study the changes and significance of adrenaline, transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channel and substance P in rats with acute spinal cord injury (ASCI) complicated with lung injury. **Methods** Two hundred and twenty eight female Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham operation group (sham group, $n=90$), ASCI group ($n=108$), bilateral adrenalectomy group ($n=15$), and ASCI after bilateral adrenalectomy group ($n=15$). The ASCI model was established on the T₁₀ spinal cord segment using a modified Allen's strike model (10 g, 25 mm). The sham group only exposed the T₁₀ spinal cord, and the ASCI after bilateral adrenalectomy group was established 5 days after bilateral adrenalectomy. High-performance liquid chromatography was used to detect the changes of serum adrenaline. The pulmonary tissue specimens were collected from rats. Wet-to-dry lung weight ratio was used to detect the changes of pulmonary edema, and H-E staining was used to detect the pathological changes of lung tissue. The expression of TRPV1 protein in lung tissue was detected by immunohistochemistry and Western blotting. The contents of substance P in the lung tissue were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** Serum adrenaline levels in the ASCI group were significantly higher than those in the sham group at 2, 6, 12, 24, 48, and 72 h after spinal injury (all $P < 0.01$). The pulmonary

[收稿日期] 2019-05-07 **[接受日期]** 2019-07-10**[基金项目]** 国家自然科学基金(81272172). Supported by National Natural Science Foundation of China (81272172).**[作者简介]** 喻 林, 硕士生. E-mail: 286781259@qq.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 023-63633113, E-mail: ngx1215@126.com

edema and lung injury gradually aggravated in the ASCI group at 24, 48 and 72 h after spinal injury, and began to recover at 1 week. The expression levels of TRPV1 protein and substance P contents in ASCI group were significantly upregulated compared with the sham group at 24, 48, and 72 h after spinal injury (all $P < 0.05$, $P < 0.01$). The edema of lung tissue and pathological injury in the ASCI after bilateral adrenalectomy group were alleviated compared with the ASCI group 72 h after spinal injury. **Conclusion** Adrenaline may involve in the pathogenesis of pulmonary edema and lung injury in rats with ASCI, which may be related to the upregulation of TRPV1 and P substance expression. The pulmonary edema and lung injury after ASCI can be alleviated by adrenalectomy.

[Key words] spinal cord injuries; lung injuries; adrenaline; transient receptor potential vanilloid 1 channel; substance P
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2019, 40(8): 866-872]

呼吸系统并发症是急性脊髓损伤 (acute spinal cord injury, ASCI) 后最常见的并发症及引起死亡的主要原因^[1-2]。本课题组前期研究发现大鼠发生 ASCI 后会继发肺损伤、肺水肿等病理变化, 但具体机制尚不明确^[3]。肺 C 类神经纤维 (pulmonary C-fiber, PCF) 约占肺迷走神经的 75%^[4], PCF 上的瞬时受体电位香草酸 1 (transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1) 可被某些介质激活并释放下游神经肽 P 物质等发挥生物效应^[5-7]。肾上腺素是肾上腺分泌的主要激素, 成年大鼠吸入肾上腺素后, 通过激活肺部 TRPV1, 可使 PCF 活动明显升高^[8]。TRPV1 是几乎所有神经元炎症信号通路的枢纽^[9], 在不同原因引起的肺损伤中, TRPV1 发挥了重要作用^[10-11]。P 物质是存在于中枢神经系统和周围神经系统中的十一肽, 可通过促进血管的舒张, 导致血浆外渗等加重组织损伤^[12]。本研究旨在观察 ASCI 后肾上腺素、肺组织中 TRPV1 和 P 物质的变化, 初步探讨其对 ASCI 继发肺损伤的意义。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器 TRPV1 抗体购自美国 Santa Cruz 公司, β -actin 抗体购自英国 Abcam 公司, 蛋白质印迹分析仪购自美国 Bio-Rad 公司, P 物质酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自美国 Cayman Chemical 公司, 高效液相色谱仪电化学检测器购自日本 Shimadzu 公司。

1.2 动物与分组 SPF 级健康雌性 SD 大鼠 228 只, 7~8 周龄, 体质量为 220~240 g, 由重庆医科大学实验动物中心提供 [动物使用许可证号: SYXK (渝) 2017-0012]。采用随机数字表法将实验动物分为假手术组 (90 只)、双侧肾上腺切除组 (15 只)、ASCI 组 (108 只)、双侧肾上腺切除

后 ASCI 组 (15 只)。

1.3 ASCI 模型制备 用 40 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠, 将大鼠以俯卧位固定于操作台, 常规备皮消毒。以 T₁₀ 为中心, 沿脊柱方向做一长约 2 cm 的纵向切口, 依次切开皮肤、肌肉后, 暴露椎板。完全去除 T₁₀ 椎板, 保留硬脊膜。采用改良 Allen's 法, 将一个带有刻度的玻璃管置于暴露段脊髓作为引导, 以设定强度 (打击锤质量为 10 g, 打击高度为 25 mm) 打击脊髓后, 立即移除打击装置。观察到大鼠脊髓迅速充血, 双后肢回缩扑动, 尾部卷曲、摆动, 提示造模成功。将切口逐层缝合后置于加热垫上复温, 待大鼠麻醉清醒后饲养于独立通风笼具内, 自由饮食。ASCI 组大鼠行人工按压辅助排尿, 每日 3 次, 直至恢复自主排尿。ASCI 组大鼠造模过程中有 4 只于术后 2~24 h 死亡, 予以及时补充。

1.4 双侧肾上腺切除模型制备 术前准备同前。以肋脊角为中心, 沿脊柱方向做一长约 2 cm 的纵向切口, 依次切开皮肤、肌肉后, 游离肾脏, 暴露肾上腺, 完全去除肾上腺。逐层缝合后置于加热垫上复温, 待大鼠麻醉清醒后饲养于独立通风笼具内自由饮食。双侧肾上腺切除后 ASCI 组于双侧肾上腺切除 5 d 后制作 ASCI 模型。双侧肾上腺切除后 ASCI 组大鼠造模过程中有 8 只于术后 2~24 h 死亡, 予以及时补充。

1.5 组织及标本采集 在脊髓损伤后 2 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、1 周, 分别取假手术组和 ASCI 组大鼠各 6 只, 采集血液标本, 离心后保存于 -80 °C 冰箱, 用于血清肾上腺素水平检测; 取上述脊髓损伤后 6 h、24 h、48 h、72 h、1 周的假手术组和 ASCI 组大鼠, 用于检测肺湿干质量比。在脊髓损伤后 24 h、48 h、72 h、1 周分别取 ASCI 组大鼠各 3 只, 以及假手术组大鼠 3 只, 用于肺组

织中 TRPV1 蛋白检测。在脊髓损伤后 6 h、24 h、48 h、72 h、1 周,分别取假手术组和 ASCI 组大鼠各 6 只,用于肺组织中 P 物质检测。在脊髓损伤后 6 h、72 h,分别取假手术组、ASCI 组、双侧肾上腺切除组、双侧肾上腺切除后 ASCI 组大鼠各 6 只,用于检测肺湿干质量比。在脊髓损伤后 24 h、48 h、72 h、1 周分别取 ASCI 组大鼠各 3 只,在脊髓损伤后 72 h 分别取假手术组、双侧肾上腺切除组、双侧肾上腺切除后 ASCI 组大鼠各 3 只,用于肺组织 H-E 染色;取上述假手术组和脊髓损伤后 24 h、48 h、72 h、1 周的 ASCI 组大鼠,用于肺组织免疫组织化学染色。

1.6 各指标检测

1.6.1 高效液相色谱法^[13]检测肾上腺素水平 取大鼠腹主动脉血液 2 mL 于 EDTA 抗凝管中,离心取血清。按照高效液相色谱仪操作流程,分别检测假手术组和 ASCI 组大鼠脊髓损伤后 2 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 和 1 周时血清肾上腺素水平。

1.6.2 肺组织湿干质量法评估肺水肿 将各组大鼠在手术后的不同时间点处死,用 40 g/L 多聚甲醛溶液灌注后,立即取出肺并剔除结缔组织,称量以获得肺湿质量。将肺在 70 °C 烘箱中烘烤 3 d 后,再次称量以获得肺干质量。计算肺湿干质量比,评估肺水肿程度。

1.6.3 H-E 染色观察肺组织损伤情况 将各组大鼠用体积分数为 0.9% 的等渗生理盐水 40 mL 及 40 g/L 多聚甲醛溶液 40 mL 经心脏灌注后取出肺组织,经乙醇梯度脱水后用石蜡包埋,制备 4 μm 厚的组织切片,行 H-E 染色,在普通光学显微镜下观察肺组织病理学变化。

1.6.4 免疫组织化学法检测肺组织中 TRPV1 表达 将制备好的石蜡切片常规脱蜡水化,用 Triton X-100 破膜,枸橼酸钠缓冲液修复抗原,用牛血清白蛋白封闭非特异性抗原,加入一抗 4 °C 孵育过夜,加入二抗室温孵育 1 h,二氨基联苯胺染色,苏木精复染,脱水,封片,拍照。实验重复 3 次。用 ImageJ 软件对 TRPV1 蛋白表达水平进行半定量分析。

1.6.5 蛋白质印迹法检测肺组织中 TRPV1 的表达 将大鼠处死后取肺组织,保存于液氮中备

用。取出大鼠肺组织,匀浆破碎,加入裂解液提取蛋白。将高温变性后的蛋白样本加入十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳,然后经湿转法电转至聚偏二氟乙烯膜上,加入 50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 1 h 后,加 TRPV1 抗体(稀释比例为 1:200)4 °C 孵育过夜。用吐温 20-Tris 盐缓冲液洗膜后,加入二抗室温孵育 1 h,再次用吐温 20-Tris 盐缓冲液清洗后,加显影剂拍照。实验重复 3 次。用 ImageJ 软件分析蛋白条带的灰度值,计算目的蛋白的相对表达量。

1.6.6 ELISA 法检测肺组织中 P 物质含量 将大鼠处死后取肺组织,放入冰盐水中漂洗,剔除附属的结缔组织,称取适量组织块。按体积比 1:10 加入磷酸盐缓冲液,用眼科剪剪碎组织,匀浆器匀浆。以上操作均在冰上进行。将组织匀浆在 4 °C 下以 1 690×g 离心 15 min,取上清分装冻存备用。按照 ELISA 试剂盒说明书步骤严格操作,检测 P 物质含量。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析。满足正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组数据比较采用独立样本 *t* 检验;多组数据比较采用方差分析,两两比较采用 LSD 检验(方差齐)、Dunnett's T3 检验(方差不齐)或 Dunnett's C 检验(方差不齐)。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 ASCI 大鼠血清肾上腺素水平变化 ASCI 组大鼠脊髓损伤后 2、6、12、24、48、72 h 血清肾上腺素水平分别为(585.72±14.56)、(1 862.15±134.96)、(2 441.96±151.27)、(2 878.41±218.23)、(455.72±75.59)、(320.56±31.03) pg/mL,均高于相应时间点的假手术组,差异均有统计学意义(*P*均<0.01);脊髓损伤后 1 周 ASCI 组大鼠血清肾上腺素水平为(202.17±15.87) pg/mL,与同时时间点的假手术组相比差异无统计学意义(*P*>0.05)。脊髓损伤后不同时间点 ASCI 组大鼠血清肾上腺素水平差异有统计学意义(*F*=741.87, *P*<0.01);血清肾上腺素在脊髓损伤后 12 h 和 24 h 时达到较高水平,2 个时间点之间差异无统计学意义(*P*>0.05),48 h 和 72 h 时急剧下降,1 周时接近假手术组水平。见图 1。

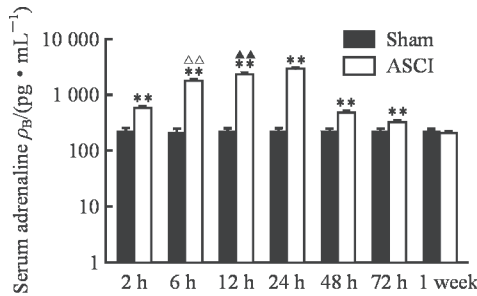


图 1 ASCI 大鼠血清肾上腺素水平的变化

Fig 1 Change of serum adrenaline levels in rats with ASCI
 ASCI: Acute spinal cord injury. ** $P < 0.01$ vs sham group at same time point; ^{△△} $P < 0.01$ vs ASCI 2 h group; ^{▲▲} $P < 0.01$ vs ASCI 6 h group. $n = 6, \bar{x} \pm s$

2.2 ASCI 大鼠肺湿干质量比变化 假手术组大鼠各时间点肺湿干质量比稳定在 4.00 左右。脊髓损伤后 6 h, ASCI 组大鼠肺湿干质量比与同时点假手术组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 脊髓损伤后 24、48、72 h, ASCI 组大鼠肺湿干质量比分别为 6.50 ± 0.34 、 7.52 ± 0.31 、 8.36 ± 0.39 , 与同时点假手术组比较差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01); 脊髓损伤后 1 周, ASCI 组大鼠肺湿干质量比与同时点假手术组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。脊髓损伤后不同时间点 ASCI 组大鼠肺湿干质量比差异有统计学意义 ($F = 207.06, P < 0.01$), 肺湿干质量比在脊髓损伤后 24~72 h 逐渐增高, 脊髓损伤后 1 周接近假手术组水平。见图 2。

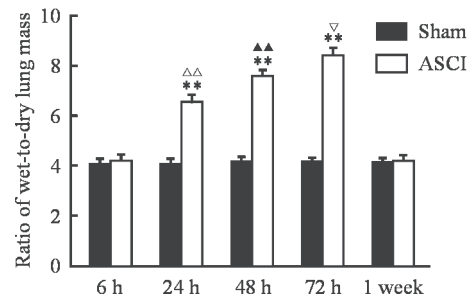


图 2 ASCI 大鼠肺湿干质量比的变化

Fig 2 Change of wet-to-dry lung mass ratio in rats with ASCI

ASCI: Acute spinal cord injury. ** $P < 0.01$ vs sham group at same time point; ^{△△} $P < 0.01$ vs ASCI 6 h group; ^{▲▲} $P < 0.01$ vs ASCI 24 h group; [▽] $P < 0.05$ vs ASCI 48 h group. $n = 6, \bar{x} \pm s$

2.3 ASCI 大鼠肺组织病理学变化 大鼠肺组织 H-E 染色结果显示, 假手术组大鼠肺泡结构正常, 无淤血及出血, 无炎性细胞浸润。脊髓损伤后 24 h, ASCI 组大鼠肺泡间质有一定增宽, 有出血等表现; 脊髓损伤后 48 h, ASCI 组大鼠肺损伤进一步加重, 出血增多, 肺泡发生一定的融合, 可见炎性细胞浸润; 脊髓损伤后 72 h, ASCI 组大鼠肺损伤最为严重, 肺泡结构紊乱、严重塌陷、融合, 可见大量出血和炎性细胞浸润; 脊髓损伤后 1 周, ASCI 组大鼠肺损伤开始恢复, 可见出血、炎性细胞浸润, 肺泡结构基本清晰可见。见图 3。

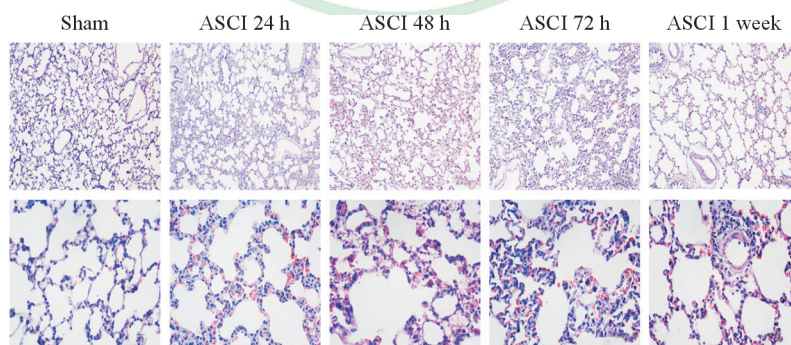


图 3 ASCI 大鼠肺组织病理学改变

Fig 3 Pathological changes of lung tissues in rats with ASCI

ASCI: Acute spinal cord injury. H-E staining. Original magnification: $\times 100$ (upper row), $\times 400$ (lower row)

2.4 ASCI 大鼠肺组织中 TRPV1 蛋白表达变化 免疫组织化学染色结果 (图 4) 显示, 假手术组大鼠肺组织中 TRPV1 表达量较低, 阳性表达主要定位于肺泡上。脊髓损伤后 24~72 h, ASCI 组大鼠肺组织中 TRPV1 蛋白

表达较假手术组明显升高, 表达水平分别为 1.46 ± 0.46 、 1.80 ± 0.46 、 1.52 ± 0.35 , 与假手术组 (0.78 ± 0.35) 比较差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05); 脊髓损伤后 1 周, ASCI 组大鼠肺组织中 TRPV1 蛋白表达 (0.89 ± 0.52) 较 72 h 时下

降,接近假手术组水平 ($P>0.05$)。脊髓损伤后不同时间点 ASCI 组大鼠肺组织中 TRPV1 蛋白表达水平差异有统计学意义 ($F=102.09, P<$

0.01), 48 h 的蛋白表达量最高。蛋白质印迹分析结果 (图 5) 与免疫组织化学染色结果一致。

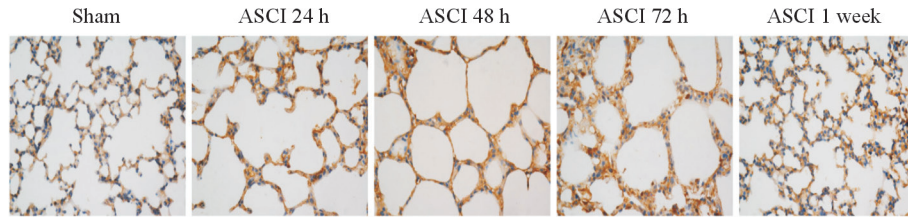


图 4 免疫组织化学染色检测 ASCI 大鼠肺组织中 TRPV1 蛋白的表达

Fig 4 TRPV1 protein expression in lung tissues in rats with ASCI by immunohistochemistry

ASCI: Acute spinal cord injury; TRPV1: Transient receptor potential vanilloid 1. Original magnification: $\times 400$

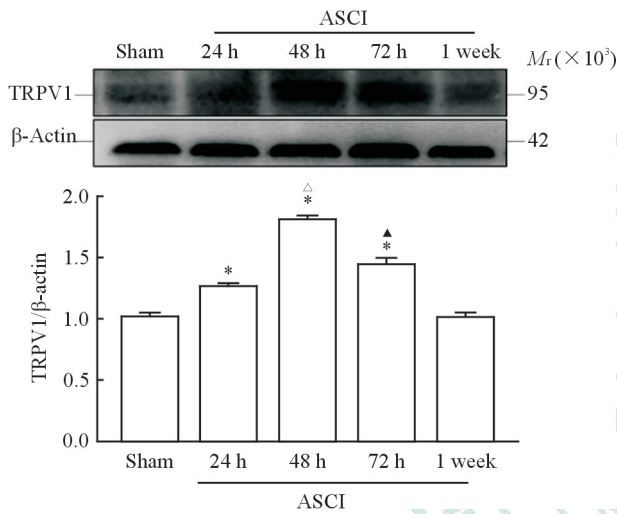


图 5 蛋白质印迹法检测 ASCI 大鼠肺组织中 TRPV1 蛋白的表达

Fig 5 TRPV1 protein expression in lung tissues in rats with ASCI by Western blotting

ASCI: Acute spinal cord injury; TRPV1: Transient receptor potential vanilloid 1. $*P<0.05$ vs sham group; $\Delta P<0.05$ vs ASCI 24 h group; $\blacktriangle P<0.05$ vs ASCI 48 h group. $n=3, \bar{x} \pm s$

2.5 ASCI 大鼠肺组织中 P 物质含量的变化 脊髓损伤后 6 h、24 h、48 h、72 h、1 周, ASCI 组大鼠肺组织中 P 物质含量分别为 (36.02 ± 2.99)、(51.81 ± 3.30)、(70.43 ± 5.42)、(84.03 ± 4.43)、(37.57 ± 3.56) pg/mL, 其中 24、48、72 h 均较同时时间点的假手术组升高 (P 均 <0.01), 6 h、1 周与同时时间假手术组相比差异均无统计学意义 (P 均 >0.05)。不同时间点 ASCI 组大鼠肺组织中 P 物质含量差异有统计学意义 ($F=160.78, P<0.05$), 脊髓损伤后 24~72 h ASCI 组大鼠肺组织中 P 物质含量逐渐升高, 1 周时接近假手术组水平。见图 6。

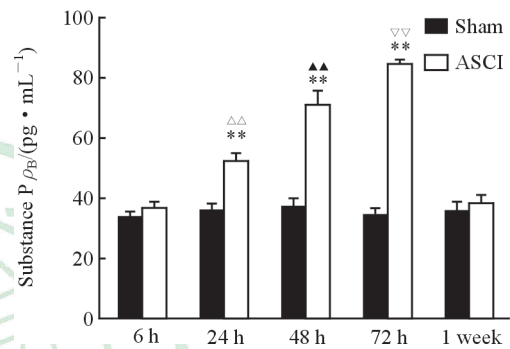


图 6 ASCI 大鼠肺组织中 P 物质含量的变化

Fig 6 Change of substance P contents in lung tissues in rats with ASCI

ASCI: Acute spinal cord injury. $**P<0.01$ vs sham group at same time point; $\Delta\Delta P<0.01$ vs ASCI 6 h group; $\blacktriangle\blacktriangle P<0.01$ vs ASCI 24 h group; $\nabla\nabla P<0.01$ vs ASCI 48 h group. $n=6, \bar{x} \pm s$

2.6 双侧肾上腺切除对 ASCI 大鼠肺损伤的影响 脊髓损伤后 6 h, 假手术组、ASCI 组、双侧肾上腺切除组、双侧肾上腺切除后 ASCI 组大鼠肺湿干质量比差异均无统计学意义 (P 均 >0.05)。脊髓损伤后 72 h, ASCI 组和双侧肾上腺切除后 ASCI 组大鼠肺湿干质量比均明显升高, 与各组 6 h 时相比差异均有统计学意义 (8.49 ± 0.49 vs $4.15 \pm 0.31, P<0.01$; 6.23 ± 0.32 vs $4.29 \pm 0.22, P<0.01$); 脊髓损伤后 72 h, 双侧肾上腺切除后 ASCI 组大鼠肺湿干质量比低于 ASCI 组, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。H-E 染色结果 (图 7) 显示, 双侧肾上腺切除组大鼠肺泡结构正常, 间质无明显增宽; 脊髓损伤后 72 h, ASCI 组大鼠肺泡结构被破坏, 肺泡塌陷融合; 脊髓损伤后 72 h, 双侧肾上腺切除后 ASCI 组大鼠肺泡融合、间质增宽等病理表现较 ASCI 组明显减轻, 但仍有一定出血和炎性细胞浸润。

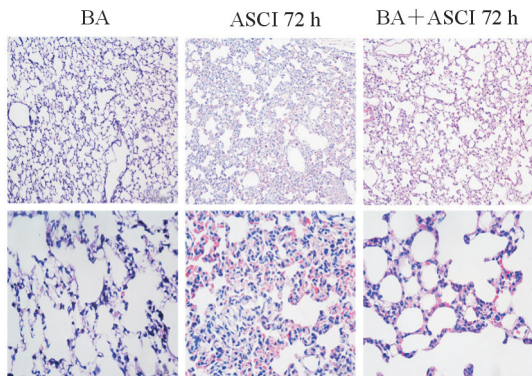


图 7 双侧肾上腺切除后 ASCI 大鼠肺组织的病理学变化

Fig 7 Pathological changes of lung tissues in rats with ASCI after bilateral adrenalectomy (BA)

ASCI: Acute spinal cord injury. H-E staining. Original magnification: $\times 100$ (upper row), $\times 400$ (lower row)

3 讨论

颈段脊髓损伤后发生呼吸系统并发症的可能原因是膈肌及辅助呼吸肌瘫痪, 导致呼吸受限、咳嗽无效、气道内分泌物滞留, 但对于低胸段脊髓 (T_{10}) 损伤, 这些机制显然是不充分的^[3]。肾上腺素是肾上腺分泌的主要激素, 是产生应激反应的重要激素, 研究发现肾上腺素可能通过增加肺泡肿瘤坏死因子 α 加重大鼠肝脏缺血再灌注引起的肺部损伤^[14]。本研究发现, 大鼠 ASCI 后肺水肿与肺损伤组织病理学变化趋势一致, 血清肾上腺素水平的变化趋势较肺水肿、肺损伤病理进程有所提前。肾上腺素的分泌可在短时间内增加心输出量, 使脉压增大^[15], 瞬间增高的血压可能造成毛细血管内皮细胞损伤, 导致红细胞外漏, 但如果完全用血压瞬间升高来解释出血和损伤理由显然不够充分。我们推测在大鼠 ASCI 后的肺水肿、肺损伤病理进程中, 肾上腺素可能作为一个上游始动因素, 通过激活下游通路发挥主要作用。

在特发性鼻炎患者中, 抑制鼻黏膜中 TRPV1 的过度表达和鼻腔分泌物中 P 物质水平, 可明显降低炎症浸润, 改善症状^[16]。罗伊氏乳杆菌 DSM 17938 通过抑制 TRPV1 表达, 导致下游 P 物质水平降低, 减轻小鼠胃部损伤^[17]。上述研究提示 TRPV1-P 物质信号轴与组织的损伤密切相关。本研究发现 ASCI 后大鼠肺组织 TRPV1 蛋白动态变化的峰值 (48 h) 较 ASCI 继发肺水肿、肺损伤病理变化的峰值 (72 h) 提前, 但较肾上腺素水平变化的峰值 (24 h) 有所延迟。肾上腺素可通过作用

于 TRPV1 活化 PCF, 释放神经肽 P 物质和降钙素基因相关肽发挥生物学效应^[18-19]。我们推测肾上腺素可能作为 TRPV1 的上游介质调控 TRPV1-P 物质轴发挥作用。P 物质通过增加血管通透性、蛋白外渗、肥大细胞脱颗粒等参与组织损伤进程^[20]。P 物质在缺血再灌注诱导的肺部损伤^[21]、烧伤引起的肺损伤^[22]中均起到加重损伤的作用。Jacob 等^[23]研究发现, P 物质受体拮抗剂可有效抑制肥大细胞活化, 减少炎性细胞因子和趋化因子表达, 从而减轻肺损伤、肺水肿。本研究发现 ASCI 后肺组织 P 物质的表达变化与 ASCI 继发的肺水肿、肺损伤病理变化趋势基本一致, 说明 P 物质可能参与了大鼠 ASCI 后肺水肿、肺损伤的进程。

Miller 等^[24]研究发现, 双侧肾上腺切除后, 臭氧诱导的大鼠肺部损伤明显减轻。吕向鹏等^[25]研究发现, $\alpha 2A$ -肾上腺素能受体阻断剂可明显抑制脂多糖诱导的急性肺损伤。本研究初步探索发现, 在 ASCI 并发肺损伤、肺水肿最严重的 72 h 时间点, 切除双侧肾上腺可减轻 ASCI 并发的肺损伤和肺水肿程度, 进一步提示肾上腺素可能参与了大鼠 ASCI 后的肺水肿、肺损伤进程。

综上所述, 在大鼠 ASCI 模型中, 肾上腺素、TRPV1、P 物质依次在脊髓损伤后 24、48、72 h 达到峰值, 并且与脊髓损伤后肺损伤、肺水肿进程关系密切。我们认为肾上腺素可能参与了大鼠 ASCI 并发的肺水肿、肺损伤病理进程, 这种效应可能与 TRPV1、P 物质的上调有关; 双侧肾上腺切除预处理可减轻肺水肿和肺损伤病理变化。但肾上腺素是否通过直接活化 TRPV1-P 物质轴起作用有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] ROGERS W K, TODD M. Acute spinal cord injury[J]. Best Pract Res Clin Anaesthesiol, 2016, 30: 27-39.
- [2] TOLLEFSEN E, FONDENES O. Respiratory complications associated with spinal cord injury[J]. Tidsskr Nor Laegeforen, 2012, 132: 1111-1114.
- [3] HE B, NAN G. Pulmonary edema and hemorrhage after acute spinal cord injury in rats[J]. Spine J, 2016, 16: 547-551.
- [4] AGOSTONI E, CHINNOCK J E, DE DALY M B, MURRAY J G. Functional and histological studies of the vagus nerve and its branches to the heart, lungs and abdominal viscera in the cat[J]. J Physiol, 1957, 135: 182-205.

- [5] TAYLOR-CLARK T E, UNDEM B J. Sensing pulmonary oxidative stress by lung vagal afferents[J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2011, 178: 406-413.
- [6] ZHUANG J, ZHAO L, ZANG N, XU F. Prenatal nicotinic exposure augments cardiorespiratory responses to activation of bronchopulmonary C-fibers[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015, 308: L922-L930.
- [7] ZHAO L, ZHUANG J, ZANG N, LIN Y, LEE L Y, XU F. Prenatal nicotinic exposure upregulates pulmonary C-fiber NK1R expression to prolong pulmonary C-fiber-mediated apneic response[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2016, 290: 107-115.
- [8] GU Q, LIN Y S, LEE L Y. Epinephrine enhances the sensitivity of rat vagal chemosensitive neurons: role of β_3 -adrenoceptor[J]. *J Appl Physiol (1985)*, 2007, 102: 1545-1555.
- [9] LIAO M, CAO E, JULIUS D, CHENG Y. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy[J]. *Nature*, 2013, 504: 107-112.
- [10] WANG M, JI P, WANG R, ZHAO L, XIA Z. TRPV1 agonist capsaicin attenuates lung ischemia-reperfusion injury in rabbits[J]. *J Surg Res*, 2012, 173: 153-160.
- [11] LI C, BO L, LIU Q, LIU W, CHEN X, XU D, et al. Activation of TRPV1-dependent calcium oscillation exacerbates seawater inhalation-induced acute lung injury[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13: 1989-1998.
- [12] SUVAS S. Role of substance P neuropeptide in inflammation, wound healing, and tissue homeostasis[J]. *J Immunol*, 2017, 199: 1543-1552.
- [13] BERGH M S, BOGEN I L, ANDERSEN J M, ØIESTAD Å M L, BERG T. Determination of adrenaline, noradrenaline and corticosterone in rodent blood by ion pair reversed phase UHPLC-MS/MS[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018, 1072: 161-172.
- [14] OTA S, YAZAWA T, TOJO K, BABA Y, UCHIYAMA M, GOTO T, et al. Adrenaline aggravates lung injury caused by liver ischemia-reperfusion and high-tidal-volume ventilation in rats[J/OL]. *J Intensive Care*, 2016, 4: 8. doi: 10.1186/s40560-016-0130-y.
- [15] BRANT J M. Breathlessness with pulmonary metastases: a multimodal approach[J]. *J Adv Pract Oncol*, 2013, 4: 415-422.
- [16] VAN GERVEN L, ALPIZAR Y A, WOUTERS M M, HOX V, HAUBEN E, JORISSEN M, et al. Capsaicin treatment reduces nasal hyperreactivity and transient receptor potential cation channel subfamily V, receptor 1 (TRPV1) overexpression in patients with idiopathic rhinitis[J/OL]. *J Allergy Clin Immunol*, 2014, 133: 1332-1339, 1339.e1-3. doi: 10.1016/j.jaci.2013.08.026.
- [17] OLIVEIRA A P, SOUZA L K M, ARAÚJO T S L, ARAÚJO S, NOGUEIRA K M, SOUSA F B M, et al. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 protects against gastric damage induced by ethanol administration in mice: role of TRPV1/substance P axis[J/OL]. *Nutrients*, 2019, 11. pii: E208. doi: 10.3390/nu11010208.
- [18] LEE L Y, SHUEI LIN Y, GU Q, CHUNG E, HO C Y. Functional morphology and physiological properties of bronchopulmonary C-fiber afferents[J]. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 2003, 270: 17-24.
- [19] CHEN X, LEVINE J D. Epinephrine-induced excitation and sensitization of rat C-fiber nociceptors[J]. *J Pain*, 2005, 6: 439-446.
- [20] VINK R, GABRIELIAN L, THORNTON E. The role of substance P in secondary pathophysiology after traumatic brain injury[J/OL]. *Front Neurol*, 2017, 8: 304. doi: 10.3389/fneur.2017.00304.
- [21] OKAYA T, HOLTHAUS R, KATO A, LENTSCH A B. Involvement of the neuropeptide substance P in lung inflammation induced by hepatic ischemia/reperfusion[J]. *Inflamm Res*, 2004, 53: 257-261.
- [22] SIO S W, PUTHIA M K, LU J, MOOCHHALA S, BHATIA M. The neuropeptide substance P is a critical mediator of burn-induced acute lung injury[J]. *J Immunol*, 2008, 180: 8333-8341.
- [23] JACOB S, DEYO D J, COX R A, JACOB R K, HERNDON D N, TRABER D L, et al. Substance P antagonist CP-96345 blocks lung vascular leakage and inflammation more effectively than its stereoisomer CP-96344 in a mouse model of smoke inhalation and burn injury[J]. *Toxicol Mech Methods*, 2010, 20: 197-203.
- [24] MILLER D B, SNOW S J, SCHLADWEILER M C, RICHARDS J E, GHIO A J, LEDBETTER A D, et al. Acute ozone-induced pulmonary and systemic metabolic effects are diminished in adrenalectomized rats[J]. *Toxicol Sci*, 2016, 150: 312-322.
- [25] 吕向鹏,丛竹凯,陶一凡,李丹,朱曦. α_2A -肾上腺素能受体阻断剂 BRL-44408 maleate 通过抑制 MEK/ERK 信号通路改善 LPS 诱导的小鼠内源性 ALI[J]. *中华危重病急救医学*, 2018, 30: 101-106.

[本文编辑] 孙岩