

大鼠高位脊髓损伤后 α_1 -肾上腺素受体表达变化

何星颖, 石学银*, 徐振东, 刘 刚

(第二军医大学长征医院麻醉科, 上海 200003)

[摘要] **目的:**观察大鼠高位脊髓损伤后,脊髓损伤段及其邻近上下段 α_1 -肾上腺素受体表达的变化,旨在探讨临床自主高反射下严重高血压发生的可能机制。**方法:**健康雄性 Wistar 大鼠 42 只,随机分为 2 组:假手术组(6 只)和脊髓损伤组(36 只)。采用改良 Allens 打击法,建立脊髓 T₄ 节段重度损伤动物模型。假手术组仅咬除椎板,未打击脊髓。分别于损伤后 1 d、3 d、1 周、2 周、3 周和 4 周各处死脊髓损伤动物 6 只,取损伤段及邻近上下段脊髓,假手术组亦取相应不同节段脊髓组织。采用 RT-PCR 法测定脊髓不同节段 α_1 -肾上腺素受体 mRNA 表达情况。**结果:**与假手术组相比,脊髓损伤段以上节段在损伤后 1 d 受体表达无明显变化,但 3 d 后表达减少($P < 0.05$),1 周时降至最低($P < 0.01$),此后表达开始增加,2 周时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;损伤段在损伤后受体表达持续减少($P < 0.05$),损伤后 1 周达最低($P < 0.01$),此后受体表达开始逐步增加,但至损伤后 4 周仍未超过假手术组($P < 0.05$);损伤段以下节段在损伤后 1 d 受体表达显著减少($P < 0.01$),损伤后 3 d 受体表达接近假手术组,此后受体表达持续增加,至损伤后 4 周受体表达超过假手术组($P < 0.05$)。**结论:**大鼠高位脊髓损伤 4 周后,脊髓损伤段以下节段 α_1 -肾上腺素受体表达增加。 α_1 -肾上腺素受体数目上调可能是引起自主高反射下严重高血压的重要中枢机制之一。

[关键词] 脊髓损伤;受体,肾上腺素能, α_1 ;自主高反射综合征;高血压

[中图分类号] R 651.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)03-0323-04

Changes of α_1 -adrenergic receptors expression after high-level spinal cord injury in Wistar rats

HE Xing-ying, SHI Xue-yin*, XU Zhen-dong, LIU Gang (Department of Anesthesiology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the changes of α_1 -adrenergic receptors expression in a high-level spinal cord injury (SCI) rat model, providing information for studying the mechanisms of severe hypertension of autonomic dysreflexia. **Methods:** Adult male Wistar rats were divided into 2 groups: sham-lesion group ($n=6$) and SCI group ($n=36$). Severe spinal crush injury was induced at T₄ using modified Allens device in SCI group, while sham-lesion group received laminectomy at T₄ only. The expression of α_1 -adrenergic receptors mRNA in different segments of spinal cord: injured segment (I), above (A) and below (B) the injured site, were measured by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 1 d, 3 d, 7 d, 2 weeks, 3 weeks and 4 weeks after SCI. **Results:** Compared with sham-lesion group, the express of α_1 -adrenergic receptors mRNA in group A decreased 3 d after SCI and dropped to the least 1 week later, and restored to the normal level 2 weeks later. The impairment of α_1 -adrenergic receptors mRNA expression in group I occurred immediately after SCI and hit the lowest value 3 d later, and did not recover to the normal 4 weeks later. Decrease of α_1 adrenergic receptors mRNA expression in group B were detected 1 d after SCI, but began to increase on 3 d and exceeded that of group C 4 weeks later. **Conclusion:** In chronic SCI rat models α_1 adrenergic receptors expression increases below the level of SCI, which might be a contributing factor to the severe hypertension of autonomic dysreflexia.

[KEY WORDS] spinal cord injuries; receptors, adrenergic, α_1 ; autonomic dysreflexia; hypertension

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(3): 323-326]

自主高反射是由于机体交感神经系统过度激活乃至失控所引起的一组临床综合征,常见于高位脊髓损伤患者(损伤节段通常位于胸 6 水平以上)^[1],发作时血压可高达 250~300/200~220 mmHg (1 mmHg=0.133 kPa),导致颅内出血、昏迷、癫痫、心肌梗死、肺水肿甚至死亡等严重并发症。现有文献表明,高位脊髓损伤后易出现交感神经过度反应引起自主高反射,可能与突触后 α_1 -肾上腺素受体表达

上调有关^[2]。本实验拟观察高位脊髓损伤大鼠损伤后不同时期,脊髓不同节段 α_1 -肾上腺素受体表达的变化情况,探讨临床自主高反射下严重高血压发生的可能中枢机制,为高位脊髓损伤患者围术期治疗

[基金项目] 上海市卫生局科技发展基金(024097)。

[作者简介] 何星颖(1980-),女(汉族),硕士生。

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

和麻醉管理提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物和分组 健康雄性 Wistar 大鼠(购自中国科学院上海动物中心)42只,质量280~310g,平均(300±10)g,随机分为2组:假手术组(SO组, $n=6$)和脊髓损伤组(SCI组, $n=36$)。

1.2 试剂和仪器 小量柱离心式组织/细胞总RNA抽提试剂盒(上海华舜生物工程有限公司),RT-PCR试剂盒为RNA PCR Kit(AMV)[宝生物(大连)工程有限公司],PCR仪(PE2400,Perkin-Elmer公司),微型电泳仪(DY-A,上海西巴斯生物技术开发有限公司),TGL-台式高速离心机(MIKRO12-24,HETTICH公司),紫外分光光度计(Pharmacia Biotech,ULTRASPEC1000)。

1.3 实验动物模型的建立 2%戊巴比妥钠腹腔麻醉(50 mg/kg)后,咬除T₄椎板,暴露脊髓约1cm长。采用改良Allens打击法^[3],在T₄节段硬膜表面垫一弯曲度与脊髓表面一致的塑料垫片,用10g砝码自50mm高处自由下落打击垫片,致脊髓重度损伤。清醒后大鼠BBB(The Basso, Beattie, Bresnahan locomotor rating scale)^[4]分级评分0分,无下肢运动。假手术组仅咬除椎板,未打击脊髓。

1.4 RNA抽提 分别于损伤后1d、3d、1周、2周、3周和4周各处死脊髓损伤动物6只,取损伤段及邻近上、下段脊髓,假手术组亦于损伤后1d取相应不同节段脊髓组织。以RNA纯化试剂盒提取脊髓不同节段组织总RNA,各节段分别取5μl总RNA进行1%变性凝胶电泳,电泳结果可见28S、18S、5S共3条清晰完整的条带,证实所提取的总RNA完整可靠。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扫描测定,在260nm波长处有吸收峰,其D₂₆₀/D₂₈₀稳定在1.8~2.2之间,表明所提取的总RNA及mRNA质量较高。

1.5 RT-PCR法扩增β-actin和α₁-肾上腺素受体基因片段

1.5.1 引物合成 β-actin引物根据文献^[5]自行设计,上游引物5'-ATC TGG CAC CAC ACC TTC-3',下游引物5'-AGC CAG GTC CAG ACG CA-3'。α₁-肾上腺素受体上游引物5'-CCA TTT CCC TCA GTC GTT-3',下游引物5'-GTA GTC GCC AGT AGG TTC A-3'。β-actin和α₁-肾上腺素受体引物均由上海博亚生物技术有限公司合成,所得扩增产物大小分别为236bp和216bp。

1.5.2 β-actin和α₁-肾上腺素受体基因片段扩增 采用宝生物(大连)工程有限公司RT-PCR试剂盒(RNA PCR Kit)行两步法扩增。第一步:逆转录反应,构建反应体系如下:MgCl₂ 4μl,10×RNA PCR Buffer 2μl,RNase Free dH₂O 8.5μl,dNTP混合物(各10mmol/L)2μl,RNase Inhibitor 0.5μl,AMV逆转录酶1μl,特异性下游引物1μl,实验样品RNA 1μl。用上述逆转录液进行逆转录反应,反应条件如下:42℃ 30min,99℃ 5min,5℃ 5min。第二步:PCR反应,构建反应体系如下:MgCl₂ 6μl,10×RNA PCR Buffer 8μl,灭菌蒸馏水64.5μl,TaKaRa Taq 0.5μl,上游特异性引物1μl。将上述反应液加入第一步反应结束后的PCR反应管中,置于PCR仪中按以下条件进行PCR反应:94℃,3min;进而行PCR扩增:94℃ 30s(变性);50℃ 45s(退火),72℃ 45s(延伸),共30个循环。最后延伸为72℃ 7min。取扩增产物15μl在1%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。以β-actin为内参照,应用pImage-Tool软件对凝胶电泳图像进行表达强度分析。结果判断以同时扩增的内参照β-actin为基准,不同时间点不同节段脊髓α₁-肾上腺素受体mRNA的表达强度以α₁-肾上腺素受体D₂₆₀值与β-actin D₂₆₀值的比值表示^[5]。

1.6 统计学处理 计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 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。

2 结果

高位脊髓损伤后,RT-PCR结果显示:与假手术组相比,损伤段以上节段α₁-肾上腺素受体mRNA表达在损伤后1d无明显变化,但3d后明显减少($P<0.05$),1周时降至最低($P<0.01$),此后受体表达开始增加,至2周时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(图1A,表1)。

与假手术组相比,损伤段α₁-肾上腺素受体mRNA在损伤后表达持续减少($P<0.05$),至损伤后1周达最低($P<0.01$),此后受体表达开始逐步增加,但截止损伤后4周仍未超过假手术组($P<0.05$)(图1B,表1)。

与假手术组相比,损伤段以下节段α₁-肾上腺素受体mRNA在损伤后1d显著减少($P<0.01$),但至损伤后3d接近假手术组值,此后受体表达持续增加,至损伤后4周受体表达超过假手术组($P<0.05$)(图1C,表1)。

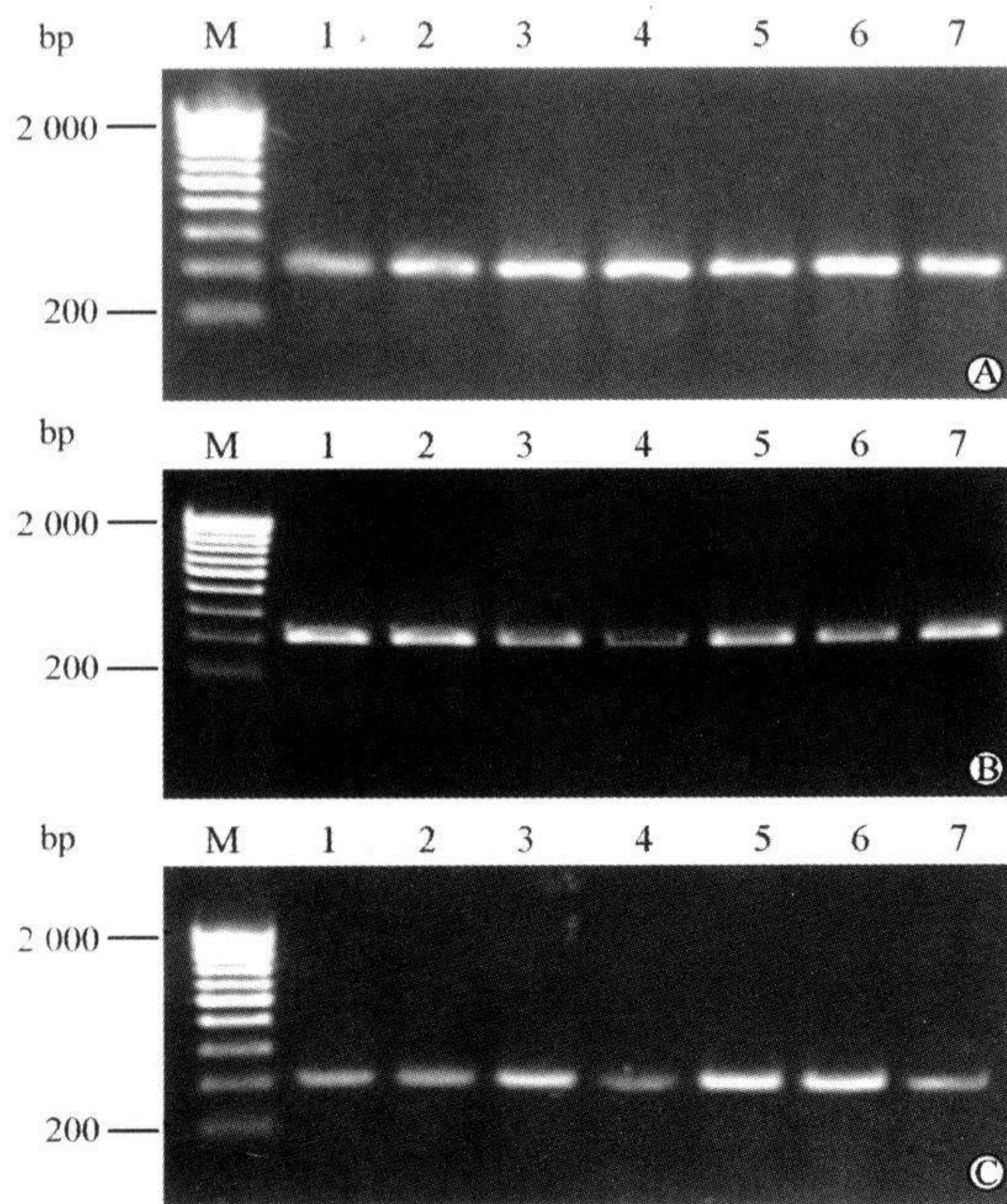


图1 损伤段以上节段(A)、
损伤段(B)和损伤段以下节段(C)脊髓 α_1 -
肾上腺素受体 mRNA 表达 RT-PCR 分析

Fig 1 Expression of α_1 -adrenergic receptors

mRNA above(A), at(B), and below(C) level of SCI

M: Marker; 1: SO group; 2-7: 1 d, 3 d, 1 week, 2 weeks, 3 weeks, 4 weeks after SCI, respectively

3 讨论

自主高反射是脊髓损伤后最严重的并发症之一,是由于机体交感神经系统过度激活乃至失控所引起。引起自主高反射的原因很多,以大小便滞留最为常见。此外,其他一些内脏或体表器官的刺激,亦可引起血压骤升。对于脊髓未受损的正常个体,脑干的中枢下行抑制通路可调控交感激活所引起的血压升高;而对于脊髓受损患者,因其下行通路被阻断,损伤节段以下部位受局部脊髓反射机制调控,外周和内脏血管的广泛收缩导致恶性高血压发生^[7]。自主高反射在胸6或其上节段受损的患者中较为常见,主要表现为血压骤升、心动过缓、抨击样头痛、损伤平面以上区域大量出汗与损伤平面以下区域皮肤冰冷苍白等。

去甲肾上腺素在自主高反射发生的病理生理中起重要作用^[8]。脊髓损伤后患者体内去甲肾上腺素的水平下降,并一直持续。发生自主高反射时,血浆去甲肾上腺素和尿中其代谢产物水平增高,但仍低于非脊髓损伤个体的正常水平,提示脊髓损伤患者肾上腺素受体可能发生了某种变化,促使交感反应增强。这种变化既可能是受体敏感性增加引起^[9],

表1 脊髓损伤后 α_1 -肾上腺素受体 mRNA 的表达强度

Tab 1 Expression intensity of α_1 -adrenergic receptors mRNA after SCI

(n=6, $\bar{x} \pm s$)

| Group | Time after SCI | | | | | |
|-------------------|----------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|
| | 1 d | 3 d | 1 week | 2 weeks | 3 weeks | 4 weeks |
| SO | 1.45 ± 0.10 | - | - | - | - | - |
| SCI | | | | | | |
| Segment above SCI | 1.38 ± 0.09 | 1.18 ± 0.09* | 1.08 ± 0.07** | 1.49 ± 0.15 | 1.48 ± 0.16 | 1.47 ± 0.10 |
| SCI segment | 1.28 ± 0.06* | 1.30 ± 0.07* | 0.98 ± 0.09** | 1.31 ± 0.14* | 1.30 ± 0.11* | 1.29 ± 0.09* |
| Segment below SCI | 1.15 ± 0.07** | 1.47 ± 0.08 | 1.40 ± 0.14 | 1.34 ± 0.10 | 1.42 ± 0.10 | 1.59 ± 0.13* |

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs SO group

亦可能是受体数目上调所致。本实验通过研究高位脊髓损伤大鼠脊髓不同节段 α_1 -肾上腺素受体 mRNA 表达的动态变化,探讨中枢 α_1 -肾上腺素受体数量变化在自主高反射下发生严重高血压中的可能机制。

临床上自主高反射的发生因人而异。但总的来说,高位截瘫及四肢瘫患者发生率较高,且多于脊髓休克期结束后出现。有报道在高位截瘫患者实施麻醉和手术过程中,出现致命性的血压升高,临床处置相当棘手。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^[10],这种改

变可能引起交感神经系统过度反应。因此我们选择高位脊髓损伤后不同时期的大鼠进行研究。正常大鼠中枢 α_1 -肾上腺素受体 mRNA 主要表达于脊髓与运动功能密切相关区域的神经元^[11]。本研究发现:高位脊髓损伤大鼠进入慢性期(4周)后,就脊髓 α_1 -肾上腺素受体数目而言,损伤段以上节段受体表达无明显变化,损伤段受体表达减少,而损伤段以下节段受体表达增加。神经解剖学和生理学大量研究揭示,神经系统结构(神经元、突触和神经通路)和电生理活动均表现可塑性。脊髓损伤后损伤段以下节段受体表达增加,是机体适应性反应的结果,是神经系

统可塑性的表现。由此联系临床,推测自主高反射发生时的血压骤升,可能与损伤段以下节段 α_1 -肾上腺素受体数量增加有关。与此同时,有研究表明:高位脊髓损伤后外周 α_1 -肾上腺素受体敏感性增加^[12],提示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自主高反射发生的病理生理过程。

本研究提示大鼠高位脊髓损伤后,损伤段以下节段脊髓 α_1 -肾上腺素受体表达增加。据此推测,脊髓 α_1 -肾上腺素受体数目上调可能是引起自主高反射下严重高血压的中枢重要机制之一。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高反射,麻醉过深极易引起低血压。同时由于患者脊髓 α_1 -肾上腺素受体表达的改变,应用心血管药物时应综合考虑患者的交感神经系统和心血管功能状况,权衡利弊,谨慎对待。

[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] Allen AR. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal cord column[J]. *JAMA*, 1911, 57:878-880.
 [4] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC, et al. MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability. Multicenter animal spinal cord injury

study[J]. *J Neurotrauma*, 1996, 13(7):343-359.
 [5] 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.
 [6] Harada K, Shiota G, Kawasaki H. Transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma [J]. *Liver*, 1999, 19(4):318-325.
 [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] Leman S, Bernet F, Sequeira H. Autonomic dysreflexia increases plasma adrenaline level in the chronic spinal cord-injured rat[J]. *Neurosci Lett*, 2000, 286(3):159-162.
 [9] Landrum LM, Thompson GM, Blair RW. Does postsynaptic alpha 1- adrenergic receptor supersensitivity contribute to autonomic dysreflexia [J]? *Am J Physiol*, 1998, 274(4 Pt 2):H1090-H1098.
 [10] Krassioukov AV, Weaver LC. Morphological changes in sympathetic preganglionic neurons after spinal cord injury in rats [J]. *Neuroscience*, 1996, 70(1):211-225.
 [11] Day HE, Campeau S, Watson SJ Jr, et al. Distribution of alpha 1a-, alpha 1b- and alpha 1d-adrenergic receptor mRNA in the rat brain and spinal cord[J]. *J Chem Neuroanat*, 1997, 13(2):115-139.
 [12] Leman S, Sequeira H. Activation of adrenal preganglionic neurons during autonomic dysreflexia in the chronic spinal cord-injured rat [J]. *Auton Neurosci*, 2002, 98(1-2):94-98.
 [收稿日期] 2004-10-08 [修回日期] 2004-12-27
 [本文编辑] 曹 静

Study of stereoselective pharmacokinetics of anisodamine enantiomers in rabbits by capillary electrophoresis

Fan GR, Hong ZY, Lin M, Yin XP, Wu YT (Shanghai Key Laboratory for Pharmaceutical Metabolites Research, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] The purpose of this study was to determine the pharmacokinetics of anisodamine enantiomers in plasma after oral and intravenous administration of racemic anisodamine in rabbits. A capillary electrophoresis method for the simultaneous separation of two pairs of enantiomers in plasma has been firstly developed and validated. Using a 75 mM phosphate buffer containing 25 mM carboxymethylated-gamma-cyclodextrin at pH 2.5, good resolution was achieved on a 45-cm uncoated fused-silica capillary at the voltage of 20 kV and 25 degrees C. The pharmacokinetics of individual anisodamine enantiomers were characterized using the CE assay, the sole method of enantiomeric separation for anisodamine. Pharmacokinetic analysis of results indicated that anisodamine enantiomers showed non-stereoselective disposition or stereoselective disposition in different rabbits. For the rabbits with non-stereoselective disposition, similar pharmacokinetic characteristics were observed between (6S, 2'S)- and (6R, 2'R)-, or (6S, 2'R)- and (6R, 2'S)-anisodamine. For the rabbits with stereoselective disposition, (6S, 2'S)- and (6R, 2'S)-anisodamine were below the established LOD, while the two remaining enantiomers also had similar pharmacokinetic profiles. Further investigations remain necessary to find out the underlying mechanism about the stereoselective disposition of (6S, 2'S)- and (6R, 2'S)-anisodamine.