

• 论著 •

 α -肾上腺素受体在脊髓损伤大鼠血管高反应性中的作用

邹最 石学银 吕砚 徐振东 时多 王璐 刘刚

【摘要】 目的 研究高位脊髓横切(SCT)慢性期大鼠腹主动脉离体血管环对 α -肾上腺素受体(α -AR)激动剂的反应性及腹主动脉 α_1 -AR、 α_2 -AR各亚型mRNA的表达量,探讨其与腹主动脉高反应性的关系。方法 取SCT 4周后大鼠的腹主动脉,利用离体血管环张力测定技术,以血管环对梯度浓度去氧肾上腺素(Phe)和可乐定的收缩力,反映血管环对 α_1 -AR、 α_2 -AR激动剂的反应性;通过实时定量聚合酶链反应(PCR)测定腹主动脉 α_{1A} -AR、 α_{1B} -AR、 α_{1D} -AR、 α_{2A} -AR、 α_{2B} -AR和 α_{2C} -AR的mRNA表达量改变,并与假手术组比较。结果 与假手术组比较,SCT 4周组大鼠腹主动脉对可乐定反应性上升($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),对Phe反应性无明显改变;SCT组腹主动脉 α_{1A} -AR和 α_{1D} -AR的mRNA表达上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而 α_{1B} -AR mRNA表达未见明显改变($P > 0.05$), α_{2A} -AR、 α_{2B} -AR和 α_{2C} -AR的mRNA表达均上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 在SCT慢性期,腹主动脉高反应性的机制可能为血管对 α_2 -AR激动剂敏感性上升, α_2 -AR mRNA表达上调。虽然 α_1 -AR mRNA表达上调,但离体血管对Phe收缩力无明显改变, α_1 -AR可能并不是引起SCT慢性期血管高反应性的原因。

【关键词】 脊髓横切; 自主神经反射异常; α -肾上腺素受体; 血管反应性

Role of alpha - adrenergic receptors in vascular hyperreactivity in rats with high level spinal injury ZOU Zui*, SHI Xue - yin, LÜ Yan, XU Zhen - dong, SHI Duo, WANG Lu, LIU Gang. * Department of Anaesthesiology, Changzheng Hospital, The Second Military Medical University, Shanghai 200003, China Corresponding author: SHI Xue - yin (Email: shixueyin1128@yahoo.com.cn)

【Abstract】 Objective To explore the vascular reactivity of abdominal aorta to agonists of α -adrenergic receptors in rat with high level transection of the spinal cord, and to quantify the expression of α -AR mRNA subtypes, in order to investigate relationship between α -AR and hyperreactivity of abdominal aorta. **Methods** Four weeks after transection of the spinal cord at the level of 4th thoracic vertebra, the rats were sacrificed, and abdominal aorta rings were adopted to assay sensitivity to phenylephrine and clonidine with isolated organ perfusion system. α_{1A} -AR, α_{1B} -AR, α_{1D} -AR, α_{2A} -AR, α_{2B} -AR, α_{2C} -AR mRNA expressions were quantified by real time polymerase chain reaction (PCR). **Results** Compared with abdominal aorta of rat with sham operation, reactivity of aorta of rat after transection of spinal cord to clonidine was significantly higher ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), but difference of vascular reactivity to phenylephrine between them was not significant ($P > 0.05$). Expressions of α_{1A} -AR mRNA, α_{1D} -AR mRNA, α_{2A} -AR mRNA, α_{2B} -AR mRNA, α_{2C} -AR mRNA were significantly higher ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the expression of α_{1B} -AR mRNA did not vary significantly. **Conclusion** Vascular hyperreactivity to agonist of α_2 -AR may be the mechanism of hyperreactivity of abdominal aorta in rat after transection of spinal cord. Although α_1 -AR mRNA expression is higher in aorta of rat with spinal cord injury, vascular hyperreactivity is not the result of upregulation of α_1 -AR sensitivity.

【Key words】 spinal cord transection; autonomic dysreflexia; alpha adrenergic receptor; vascular reactivity

T6以上平面的脊髓损伤(SCI)患者进入慢性期后,受到膀胱胀满、肠道堵塞等不良刺激时常发生

基金项目:上海市科委基金资助项目(054119522);上海市卫生局科技发展基金资助项目(024097)

作者单位:200003 上海,第二军医大学附属长征医院麻醉科(邹最,石学银,吕砚,刘刚);200040 上海,复旦大学附属华山医院麻醉科(徐振东);200433 上海,第二军医大学生物化学与分子生物学教研室(时多,王璐)

通讯作者:石学银,博士研究生导师,主任医师(Email:shixueyin1128@yahoo.com.cn)

作者简介:邹最(1980-),男(汉族),湖南宁乡人,硕士研究生(Email:zouzui1980@56.com)。

自主神经反射异常(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 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)和200~220 mm Hg,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^[1]。AD的发生可能与损伤节段以下脊髓失去上位神经中枢的抑制作用,失去神经支配后脊髓交感神经中枢产生异常突触连接^[2,3],血管 α -肾上腺素受体(α -AR)反应性增高有关^[1]。但究竟何种 α -AR亚型的敏感性发生变化,其相应基因表达是否改变,目前尚无相关报道。为进一步明确高位SCI后AD的血管机制,我们

采用离体血管环张力测定技术,研究腹主动脉血管环对梯度浓度 α_1 -AR 激动剂去氧肾上腺素(Phe)、 α_2 -AR 激动剂可乐定的反应性,通过实时定量聚合酶链反应(real time PCR)法测定腹主动脉 α_1 -AR 和 α_2 -AR 各亚型 mRNA 的表达量,探讨高位脊髓横切(SCT)慢性期大鼠血管高反应性的机制。

1 材料与方 法

1.1 实验材料: Trizol(Sangon 公司),逆转录(RT)试剂盒(BBI 公司),real time PCR 试剂盒和 DNA I (Takara 公司),DNA Marker BL2000(BioLight Technology 公司),real time PCR 仪(ABI PRISM 7000),TGL-台式高速离心机(HITACHI 公司),微型电泳仪(上海西巴斯生物技术开发有限公司),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),离体组织灌流浴槽(西班牙 Panlab 公司)。

1.2 实验分组和模型建立: 健康雄性 Wistar 大鼠 32 只(购自中科院上海动物中心),雌雄各半,体重 260~300 g,按照随机数字表法分为两组。SCT 组腹腔注射 50 mg/kg 氯胺酮和 5 mg/kg 地西洋注射液,咬除 T4 椎板,暴露脊髓,使用自制超薄刀片横切 T4 脊髓;假手术组只暴露脊髓,不进行横切。术后连续 3 d 给予青霉素 400 kU/d,同时用质量分数为 5%的葡萄糖 10 ml 腹腔补液,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,用导管刺激直肠,观察升压反应。选取 SCT 组平均动脉压(MAP)比基础值升高超过 15 mm Hg 的大鼠活杀,取腹主动脉,清除周围结缔组织,每只大鼠取 5 mm 长的腹主动脉行离体血管环张力实验,剩余腹主动脉进行 mRNA 定量实验。

1.3 离体血管环张力实验^[4]: 将腹主动脉环悬挂于注有 Krebs-Henseleit 液[K-H 液,组成:NaCl 118.0 mmol/L, KCl 4.7 mmol/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.45 mmol/L, NaHCO₃ 25 mmol/L, KH₂PO₄ 1.03 mmol/L, CaCl₂ 2.5 mmol/L, 葡萄糖(glucose) 11.1 mmol/L, pH 7.4]的离体器官灌流槽中,持续充入体积分数为 95%的 O₂ 和 5%的 CO₂ 混合气体,给预初张力 2.0 g, 25 °C 恒温孵育 1 h, 30 min 换 1 次灌流液,待张力曲线平稳后,测定血管环对去甲肾上腺素(NE)、Phe 和可乐定的敏感性。按照浓度累计法向浴槽内依次加入试剂,Phe 的终浓度分别为 3×10⁻⁹、1×10⁻⁸、3×10⁻⁸、1×10⁻⁷、3×10⁻⁷、1×10⁻⁶、3×10⁻⁶ 和 1×10⁻⁵ mol/L;可乐定终浓度分

别为 3×10⁻⁹、1×10⁻⁸、3×10⁻⁸、1×10⁻⁷、3×10⁻⁷、1×10⁻⁶ 和 3×10⁻⁶ mol/L。记录不同浓度下各血管环产生的最大收缩力(E_{max}),以血管收缩张力(g)为量化标准,制作量-效曲线,曲线拟合法求半数有效浓度(EC₅₀),用 -lg [EC₅₀(pD₂)] 和 E_{max} 及量-效曲线评价血管反应性^[5,6]。

1.4 real time PCR 法检测 α_1 -AR 和 α_2 -AR 各亚型 mRNA 表达量: 以 RNA 纯化试剂盒提取腹主动脉总 RNA,以 DNA I 对所得 RNA 进行处理;每份 RNA 分别取 5 μ l 总 RNA 进行质量分数为 1%的琼脂糖凝胶变性电泳,验证 RNA 完整性。测定 260 nm 处吸光度值(A₂₆₀),计算 mRNA 浓度。

取 RNA 2 μ g 在 20 μ l 体系中按标准程序进行 RT,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。引物通过 Primer 5.0 设计,完成后行 BLAST 比对分析,引物序列见表 1。real time PCR: SYBR Premix Ex TaqTM (2×) 12.5 μ l, PCR 上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ l, ROX Reference Dye II (50×) 0.5 μ l, cDNA 模板 2.0 μ l, 灭菌蒸馏水 9.0 μ l, 总体积为 25 μ l。

反转录产物 cDNA 以 10 倍稀释,成为各条基因标准品,每个标准曲线取 4 个点,分别设为 100、10、1 和 0.1 ng。各产物浓度根据标准曲线求得。

表 1 α -AR mRNA 各亚型及 β -actin mRNA 引物序列

Table 1 Primer of α -AR mRNA Subtype and β -actin mRNA

基因	引物序列	产物长度(bp)	基因编号
α_{1A}	TAGAGCACAAGGGAAGAGG	110	NM_017191
	AAAGGTGATGACTGGGAAAG		
α_{1B}	CGGGTGGTTGATGAAATAGC	164	NM_016991
	TGTGCTGTACGGCCTCCA		
α_{1D}	GGACTTCCCTTCCGATGT	258	NM_024483
	TTGGTGGCGTATGGATGC		
α_{2A}	TCCGTCTGGCGCTCTTT	138	NM_012739
	CCCTACCAGCTCTTCAACTTC		
α_{2B}	AGGGTCGGTGGACATTCG	290	NM_138505
	ACAACAATCCCTACCATACC		
α_{2C}	GCTTGAGCCCATGTATCCC	158	NM_138506
	AGACCCTTTCCTTCCCAT		
β -actin	GCAACTGTAGGCATTTCTG	200	NM_031144
	CCTCACTGTCCACCTTCC		

注: β -actin 为 β -肌动蛋白

为控制样本误差,先根据 β -actin 标准曲线算出各样本的相对 β -actin mRNA 浓度,然后将 6 条被测基因的浓度与 β -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 产物均经过溶解曲线分析(PCR 产物溶解温度设置

为 65~95 °C)和 1%的琼脂糖凝胶电泳,PCR 产物割胶回收、测序,与目的片断比对,验证 PCR 产物。

1.5 统计学处理:计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血管环对 Phe、可乐定的敏感性

2.1.1 腹主动脉对 Phe 的敏感性(图 1):与假手术组比较,SCT 组在相同浓度 Phe 刺激下,腹主动脉收缩力无明显改变,量-效曲线无明显右移或左移。SCT 组 E_{max} 为 $(5.948 \pm 0.244)g$,假手术组 E_{max} 为 $(5.712 \pm 0.112)g$,差异无显著性 ($P > 0.05$);SCT 组 pD_2 为 7.741 ± 0.287 ,假手术组 pD_2 为 7.782 ± 0.391 ,差异无显著性 ($P > 0.05$)。

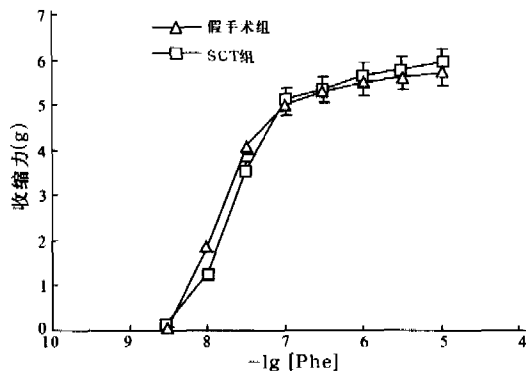
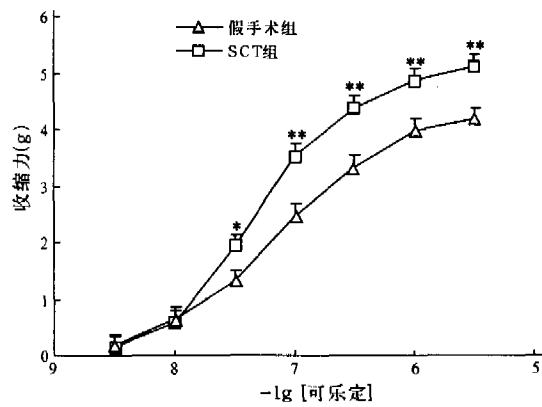


图 1 SCT 慢性期腹主动脉对 Phe 的敏感性
Figure 1 Abdominal aorta sensitivity to Phe in the chronic stage of SCT rats

2.1.2 腹主动脉对可乐定的敏感性(图 2):与假手术组比较,SCT 组的量-效曲线明显左移,在可乐定终浓度为 3×10^{-8} 、 1×10^{-7} 、 3×10^{-7} 、 1×10^{-6} 患者 3×10^{-6} mol/L 时差异均有显著性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);在可乐定终浓度为 3×10^{-6} mol/L 时, E_{max} 由假手术组的 $(4.170 \pm 0.372)g$ 上升至 $(5.108 \pm 0.326)g$ ($P < 0.01$); pD_2 由假手术组的 7.102 ± 0.212 上升至 7.402 ± 0.301 ($P < 0.05$)。

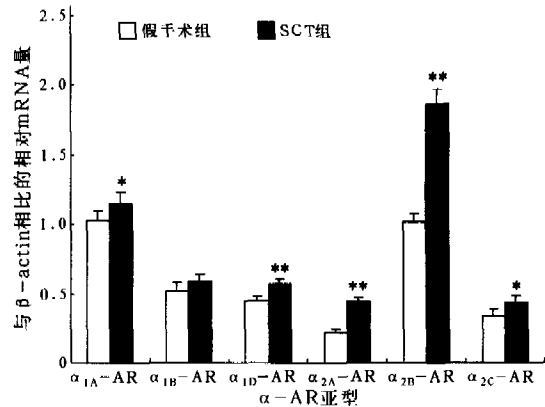
2.2 腹主动脉 α -AR mRNA 的表达(图 3):real time PCR 的溶解曲线分析只显示单峰,表明 PCR 非特异性扩增产物较少,测序分析 PCR 产物,7 条基因均为目的产物。SCT 4 周以后,腹主动脉总 α_1 -AR 和 α_2 -AR 的 mRNA 表达量均上调。与假手术组比较,SCT 组 α_{1A} -AR mRNA ($t = 2.386$, $P < 0.05$)、 α_{1D} -AR mRNA ($t = 2.572$, $P < 0.01$)、 α_{2A} -AR mRNA ($t = 10.235$, $P < 0.01$)、 α_{2B} -AR mRNA ($t = 18.452$, $P < 0.01$)及 α_{2C} -AR mRNA ($t = 2.483$, $P < 0.05$)表达均上调, α_{1B} -AR mRNA 表达量则未见明显改变。



注:与假手术组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 2 SCT 慢性期腹主动脉对可乐定的敏感性

Figure 2 Abdominal aorta sensitivity to clonidine in the chronic stage of SCT rats



注:与假手术组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 3 腹主动脉 α -AR mRNA 表达量

Figure 3 α -AR mRNA expression of abdominal aorta

3 讨论

AD 是 SCI 后最严重的并发症之一,在 T6 或 T6 以上节段受损患者中较常见,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,损伤平面以下区域皮肤冰冷、苍白等。引起 AD 的原因很多,以大小便潴留最为常见。正常情况下,所有内脏血管反射均在脊髓上水平进行整合,维持血压相对稳定。SCI 后,损伤平面以下的刺激经腹下神经(交感)和盆神经(副交感),从脊髓背外侧向上传入,但在 SCI 处被阻断,兴奋中间神经元,继之与交感神经节前神经元发生突触联系,引起交感神经传出纤维反射性兴奋,激发损伤平面以下的内脏和肢体血管收缩,导致血压上升。因此,SCI 的平面将直接影响交感神经兴奋的范围和程度。

目前对 AD 发生机制的研究主要集中在脊髓神经通路改变和血管对激动剂反应性改变两个方面。SCI 慢性期,脊髓交感环路发生明显的可塑性变化,包括传入、传出和中间神经元的改变^[1,2];AD 的发

生率与脊髓背角传入神经元面积增大有关,抑制初级神经纤维的生长可减少 AD 的发生。痛觉传入纤维与 AD 的关系并不密切^[7],膀胱辣椒素敏感性传入神经元参与了 AD 的发生过程。传出神经纤维中,肾上腺交感节前神经元增生,可能介导了 AD 的发生过程^[8]。我们的研究也表明,交感神经节前神经元在 1 周后萎缩,2 周时再生,再生过程与 AD 的发生过程一致^[2]。

AD 患者血管反应性升高。SCI 慢性期患者静脉注射 NE 升压反应较正常人明显;局部注射 NE,四肢瘫患者足静脉收缩性明显增强;肾脏血管收缩,肾脏对氨基马尿酸(PAH)清除率降低,而动脉压力感受性反射保持不变^[9]。尾动脉离体血管收缩功能研究也表明,SCT 引起血管平滑肌对血管收缩剂反应性上升,可能是引发 AD 的原因^[10]。本研究中发现,与假手术组比较,SCT 4 周大鼠腹主动脉对可乐定反应性上升,而对 Phe 反应性无明显改变。表明 SCT 慢性期血管对 α_2 -AR 激动剂的反应性上升可能为腹主动脉高反应性的机制之一。

发生 AD 时血浆 NE 浓度为其安静时的 1.50~4.32 倍^[9,11],但仍低于正常水平;而血浆 NE 浓度升高 5 倍时才能产生明显的生物学效应^[12]。如果给正常人输入 NE,使 NE 浓度为正常人的 21 倍时,可引起与 AD 同样的血压变化^[13]。SCI 患者 AD 时血浆 NE 浓度尚不足以引起患者血压明显升高,推测可能是血管高反应性导致的血压升高。离体血管研究表明,血管对 α_2 -AR 激动剂反应性升高。

α -AR 是一种儿茶酚胺细胞膜表面受体,其内源性配基是 NE 与肾上腺素。 α -AR 在介导心血管收缩反应中起重要作用。 α_1 -AR 通过 Gq/11-磷脂酶 C(PLC)信号转导通路引起血管收缩,可分为 α_{1A} -AR、 α_{1B} -AR、 α_{1D} -AR 3 种; α_2 -AR 通过 G 抑制蛋白(Gi)-腺苷酸环化酶(AC-cAMP)通路引起血管收缩,可分为 α_{2A} -AR、 α_{2B} -AR、 α_{2C} -AR 3 种。大鼠的功能性 α_1 -AR 在腹主动脉主要为 α_{1D} 亚型, α_{2B} -AR 在血管平滑肌表达十分广泛,参与调节血流动力学。本研究中通过 Real time PCR 法测定腹主动脉 6 种 α -AR 亚型 mRNA 表达量,发现 SCT 组腹主动脉 α_{1A} -AR、 α_{1D} -AR、 α_{2A} -AR、 α_{2B} -AR 和 α_{2C} -AR 的 mRNA 表达均上调,而 α_{1B} -AR mRNA 表达量未见明显改变。

腹主动脉 α_2 -AR mRNA 表达上调可能是腹主动脉对可乐定反应性上升的原因。 α_1 -AR mRNA

表达上调,但离体血管对 Phe 收缩力未见明显改变, α_1 -AR mRNA 表达上调可能并不是引起 SCT 慢性期血管高反应性的原因。两者不一致的原因可能是 α_1 -AR 蛋白表达差异,也可能是受体亲和力、受体后通道改变等原因,具体机制尚待深入研究。

综上所述,腹主动脉 α_2 -AR mRNA 表达上调,腹主动脉对 α_2 -AR 激动剂的反应性上升,可能是高位 SCT 慢性期大鼠血管反应性升高、发生 AD 的原因之一; α_1 -AR 可能未参与 SCT 大鼠腹主动脉血管反应性升高的过程。

参考文献:

- Weaver L C. What causes autonomic dysreflexia after spinal cord injury[J]? Clin Auton Res, 2002, 12: 424-426.
- Krassioukov A V, Johns D G, Schramm L P. 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.
- 何星颖,石学银,徐振东,等.大鼠高位脊髓损伤后 α_1 -肾上腺素受体基因变化的研究[J].第二军医大学学报, 2005, 26: 206-208.
- 徐竟,刘良明.钙敏感在大鼠失血性休克血管低反应性中的作用[J].中国危重病急救医学, 2005, 17: 20-23.
- 刘良明,李萍,刁有芳,等.ICI174,864 对失血性休克大鼠全身及局部血管反应性变化的作用[J].中国危重病急救医学, 2005, 17: 16-19.
- Phillips J K, Vidovic M, Hill C E. Alpha-adrenergic, neurokinin and muscarinic receptors in rat mesenteric artery; an mRNA study during postnatal development[J]. Mech Ageing Dev, 1996, 92: 235-246.
- Marsh D R, Weaver L C. Autonomic dysreflexia, induced by noxious or innocuous stimulation, does not depend on changes in dorsal horn substance P[J]. J Neurotrauma, 2004, 21: 817-828.
- Igawa Y, Satoh T, Mizusawa H, et al. The role of capsaicin-sensitive afferents in autonomic dysreflexia in patients with spinal cord injury[J]. BJU Int, 2003, 91: 637-641.
- Gao S A, 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.
- Yeoh M, McLachlan E M, Brock J A. Tail arteries from chronically spinalized rats have potentiated responses to nerve stimulation in vitro[J]. J Physiol, 2004, 556: 545-555.
- Leman S, Bernet F, Sequeira H. Autonomic dysreflexia increases plasma adrenaline level in the chronic spinal cord-injured rat[J]. Neurosci Lett, 2000, 286: 159-162.
- 周国昌,田汨,唐和虎,等.自主神经过度反射血浆 NE 的改变[J].中华创伤杂志, 1995, 11: 28-30.
- Mathias C J, Christensen N J, Corbett J L, et al. Plasma catecholamines during paroxysmal neurogenic hypertension in quadriplegic man[J]. Circ Res, 1976, 39: 204-208.

(收稿日期:2005-12-15 修回日期:2006-01-22)

(本文编辑:李银平)