

大鼠急性颈脊髓损伤后 P 物质与肺水肿的关系

唐 勇, 杨立利, 袁 文, 沈晓龙, 东 人

(第二军医大学附属长征医院骨科 20003 上海市)

【摘要】目的:探讨大鼠急性颈脊髓损伤后 P 物质与肺水肿的关系。**方法:**成年 Wistar 大鼠 40 只, 体重 240~250g, 雌雄不限, 随机分为实验组和对照组, 每组 20 只, 每组又分为造模后 24h、3d、1 周、2 周共 4 个时间点, 每个时间点 5 只大鼠。实验组采用改良 Allen's 打击法制作大鼠 C7 急性脊髓损伤 (SCI) 模型, 打击力度为 $10 \times 2.5 \text{g} \cdot \text{cm}$; 对照组只暴露 C7 段脊髓。在造模后相应时间点处死大鼠, 通过光学显微镜观察肺组织的病理学变化, 并检测各时间点两组大鼠血清和肺泡灌洗液中 P 物质含量和蛋白浓度, 计算肺通透指数 (肺泡灌洗液蛋白浓度/血清蛋白浓度)。**结果:**实验组大鼠急性 SCI 后 24h 肺组织可见肺毛细血管充血, 肺泡内分泌物增多、红细胞增加; 伤后 3d 达到高峰; 伤后 1 周肺泡内水肿、出血较 3d 时减轻; 伤后 2 周明显好转; 对照组肺泡透亮, 无水肿和出血。实验组伤后 24h 血清和肺泡灌洗液中 P 物质升高, 伤后 3d 达高峰, 伤后 1 周开始下降, 伤后 2 周明显下降; 实验组伤后 24h、3d、1 周血清及伤后 24h、3d 肺泡灌洗液中 P 物质含量与对照组比较有显著性差异 ($P < 0.05$), 伤后 2 周两组比较无显著性差异 ($P > 0.05$)。肺通透指数的变化与 P 物质的变化趋势相同。**结论:**大鼠急性颈 SCI 后肺泡灌洗液及血清中 P 物质含量变化与肺水肿程度变化同步, P 物质可能参与了急性颈 SCI 后肺水肿的形成过程。

【关键词】 脊髓损伤; 肺水肿; P 物质; 大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2011.11.09

中图分类号: R683.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2011)-11-0919-04

Role of substance P in developing pulmonary edema after acute cervical spinal cord injury in rats/TANG Yong, YANG Lili, YUAN Wen, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2011, 21(11): 919~922

【Abstract】 Objective: To investigate the relationship between pulmonary edema and substance P in rats suffering from acute cervical spinal cord injury. **Method:** 40 Wistar rats with 240~250g in weight, were randomly divided into two groups: control group ($n=20$) and injury group ($n=20$), and the latter was subdivided into groups of 24h, 3d, 1 week, 2 weeks after injury respectively. The spinal cord injury (SCI) models were induced at the level of C7 vertebra by dropping a weight of 10g from the height of 25mm (Allen's model). While in control group, laminas were removed only, leaving spinal cord at the same level intact. All the animals were sacrificed at each time point ranging from 24h to 2 weeks (24h, 3d, 1 week, 2 weeks). Substance P and protein concentration in serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were measured. The lung permeability index (LPI) and change of the pulmonary pathology were calculated. **Result:** In injury group, lung slices showed pulmonary capillaries congestion at 24h after injury, and the pulmonary alveoli were filled with erythrocytes and serous extravagated, which peaked at 3d, and began ease at 1 week. The content of substance P in serum and BALF began increasing at 24h, reached peak at 3d, declined at 1 week, and declined obviously at 2 weeks. There was statistical significance with respect to the content of substance P in serum between control group and injury group at 24h, 3d and 1 week ($P < 0.05$), and the deviation of LPI was similar to that of substance P. **Conclusion:** The deviation of substance P in serum and BALF is consistent with the degree of pulmonary edema in acute cervical spinal cord injury in rats. Substance P may take part in the development of pulmonary edema in SCI rats.

【Key words】 Spinal cord injury; Pulmonary edema; Substance P; Rat

【Author's address】 Orthopedics Department of Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai, 200003, China

基金项目: 上海市科学技术委员会科研计划项目 (编号: 11ZR1448400)

第一作者简介: 男 (1978-), 主治医师, 医学博士, 研究方向: 脊柱外科

电话: (021) 81886906 E-mail: smmushty@sina.com 通讯作者: 袁文, 杨立利

肺水肿是急性脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 后的早期并发症之一。有学者对急性 SCI 后早期死亡的大鼠进行解剖观察, 几乎都有不同程度的肺组织水肿和出血, 认为导致大鼠死亡的直接原因是肺水肿和出血引起的急性肺功能衰竭[1]。P 物质(substance P, SP)是一种神经肽, 广泛分布于神经系统和其他外周组织器官内, 其在外周的突出作用是使血管通透性增加和血浆蛋白外渗。急性 SCI 后机体会不会刺激神经系统释放 P 物质? P 物质和 SCI 后肺水肿的发生是否有关联? 本研究拟通过检测大鼠 SCI 后不同时间点血清和肺泡灌洗液中 SP 的含量并测定肺通透指数, 探讨 P 物质与急性 SCI 后肺水肿的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

成年 Wistar 大鼠 40 只, 体重 240~250g, 雌雄不限。随机分为实验组和对照组, 每组各 20 只大鼠。每组又分为造模后 24h、3d、1 周、2 周共 4 个时间点, 每个时间点 5 只大鼠。

1.2 动物模型的建立

采用改良 Allen's 打击法^[2]制作大鼠 C7 急性 SCI 模型。大鼠经腹腔注射水合氯醛(300mg/kg)麻醉, 固定后备皮, 常规消毒、铺巾。以 C7 为中心, 纵行切口, 长约 2cm, 切开皮肤、肌肉, 分离并显露棘突, 游离附着于棘突两侧的骶棘肌, 将 C7 椎板全部切除, 保留硬脊膜。在暴露的脊髓上面置一薄金属片, 并竖一带有刻度的玻璃管, 将质量为 10g 的金属物自 2.5cm 高度自由落下, 打击金属片, 并立即移开。打击后大鼠尾部出现卷曲、摆动为打击成功标准。对照组只暴露脊髓。术后饲养于配有空调的专用室, 自由饮食。实验组每日膀胱区人工按压排尿 3 次。各组均不使用任何抗生素。

1.3 肺组织学检查

每组每个时间点取 1 只大鼠用 0.01M 磷酸缓冲液及 4%多聚甲醛灌注后, 取左右肺下叶进行石蜡包埋、切片、HE 染色, 光镜下观察肺组织病理变化, 并通过计算机图像分析系统保存图像。

1.4 血清和肺泡灌洗液样本的制备

将每组每个时间点剩余的 4 只大鼠暴露腹腔, 下腔静脉采血置于含抑肽酶 40μl 的清洁试管, 室温下血液自然凝固 15min, 4℃下 2000r/min、离心 15min, 取上清置于-70℃冰箱保存待测。在

颈部正中做一 2cm 长的纵行切口, 分离颈部肌肉, 暴露气管, 小心分离气管, 在环状软骨下方 2 个气管环处用眼科剪做“T”形切口, 插入尾端带有注射器接头的一次性输液管, 用丝线扎紧。用冰生理盐水灌洗双肺, 每次 5ml, 抽吸 3 次, 灌注 3 次, 共 15ml。将灌洗液 4℃下 2000r/min、离心 15min, 取上清液置于-70℃冰箱保存待测。

1.5 肺通透指数和 P 物质的测定

将制备好的血清和肺泡灌洗液上清液按 BCA (Bicinchoninic acid)法测定蛋白浓度, 肺通透指数 (lung permeability index, LPI)=肺泡灌洗液蛋白浓度/血清蛋白浓度。用双抗体夹心 ABC-ELISA 法测定血清和肺泡灌洗液上清液中 P 物质含量。

1.6 统计学分析

对大鼠血清、肺泡灌洗液上清中的 P 物质、肺通透指数等计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 11.0 软件包进行统计学处理, 同一时间点组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

3 只大鼠于造模后即刻~32h 死亡, 即时补充。大鼠急性 SCI 后 24h 肺组织切片可见肺泡壁明显增厚, 有点状出血点, 肺泡内分泌物增多, 红细胞增加(图 1); 伤后 3d 肺泡壁广泛增厚, 毛细血管显著扩张, 扩张的血管腔内有较多红细胞, 部分肺泡腔中充满了红细胞及水肿液, 部分肺泡塌陷合并有肺大泡形成(图 2); 伤后 1 周可见肺泡腔中红细胞明显减少, 肺泡腔比较清亮(图 3); 伤后 2 周可见部分肺间质水肿, 肺泡腔清亮, 偶有红细胞渗出(图 4); 对照组肺泡腔内透亮, 肺间质无水肿, 肺泡周围血管无充血或扩张(图 5)。

两组大鼠血清和肺泡灌洗液 P 物质浓度及肺通透指数见表 1。实验组大鼠急性 SCI 后 24h 血清和肺泡灌洗液中 P 物质含量均升高, 伤后 3d 达高峰, 伤后 1 周开始下降, 伤后 2 周明显下降。伤后 24h、3d、1 周实验组血清及伤后 24h、3d 肺泡灌洗液中 P 物质含量与对照组比较均有显著性差异($P < 0.05$)。伤后 2 周实验组血清及伤后 3d、2 周肺泡灌洗液中 P 物质含量两组比较无显著性差异($P > 0.05$)。伤后 24h 肺通透指数开始升高, 伤后 3d 达最高值, 伤后 1 周开始下降, 伤后 2 周 LPI 进一步下降, 但仍高于正常值。伤后 24h、3d

及 1 周实验组 LPI 的变化与对照组比较均有显著差异性 ($P<0.05$); 伤后 2 周两组比较无显著性差异 ($P>0.05$)。LPI 的变化与 P 物质的变化同步。

3 讨论

临床上, 急性 SCI 后肺部并发症是造成患者早期死亡的主要原因^[3]。Jackson 等^[4]报道, SCI 患者呼吸系统并发症的发生率在 67% 左右, 最常见的并发症为呼吸功能障碍、肺炎等, 是导致患者死亡的首要原因。一般认为, 急性 SCI 后肺部感染和呼吸功能衰竭的主要原因是呼吸机能减退, 咳嗽和清除分泌物的能力下降, 体位导致的排痰不畅、肺栓塞等诱发。对于高位截瘫用这一观点来解释早期发生呼吸衰竭和肺部感染的原因无可非议, 但是对于较低位置的 SCI, 显然是不充分的。南国

新等^[5]报道, 大鼠急性 SCI 后 6h 出现散在肺泡毛细血管充血, 伤后 3d 出血、水肿达最高峰。根据该研究推断, 人类急性 SCI 早期, 肺部可能也存在上述病理学变化, 这种变化是急性 SCI 后早期发生呼吸功能衰竭和感染的病理基础; 呼吸机能减退和清除分泌物功能下降只是引起肺部早期感染的一个诱发因素。

P 物质在外周的一个突出作用是使血管通透性增加和血浆蛋白外渗, 这是 P 物质参与炎症反应的理论依据, 也是神经源性炎症的特点^[6]。机体受到伤害性刺激后释放到局部组织的 P 物质可促进肥大细胞脱颗粒, 释放组胺、激肽等大量炎症介质, 促进单核细胞分泌白介素 1 (IL-1)、IL-6、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 等炎症因子, 并延缓中性粒细胞凋亡, 促进中性粒细胞粘附和移行, 促进

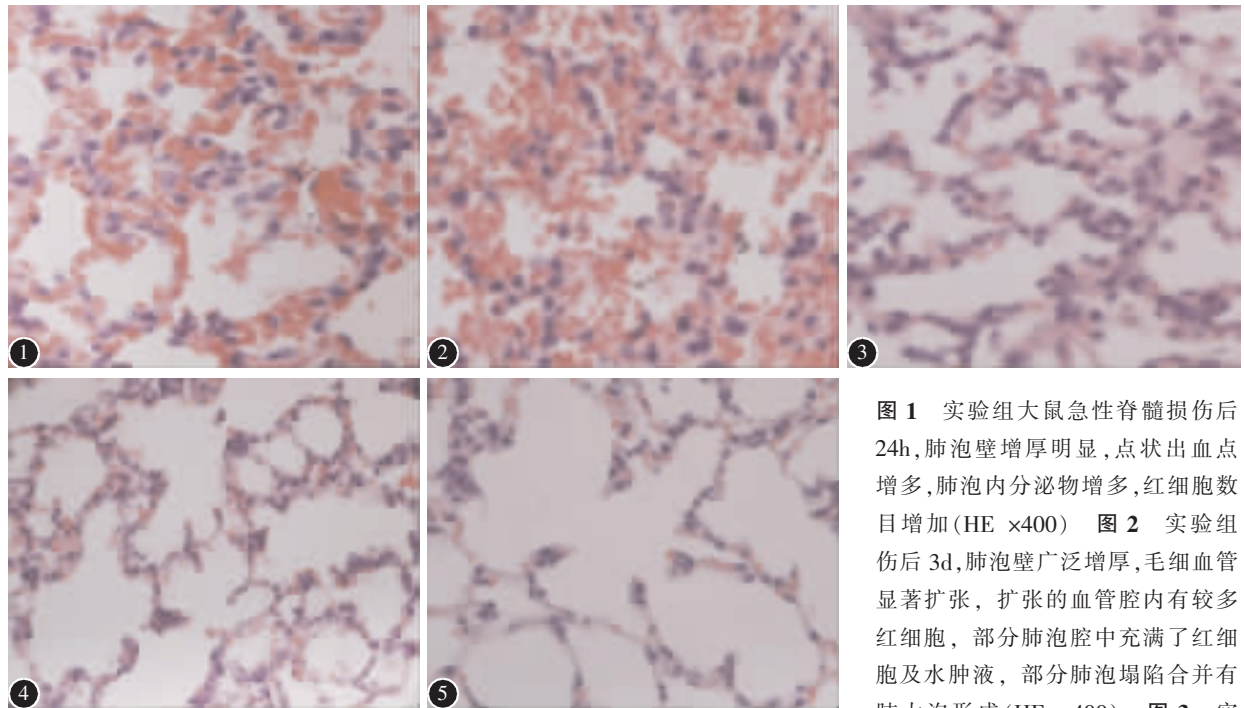


图 1 实验组大鼠急性脊髓损伤后 24h, 肺泡壁增厚明显, 点状出血点增多, 肺泡内分泌物增多, 红细胞数目增加 (HE $\times 400$) 图 2 实验组伤后 3d, 肺泡壁广泛增厚, 毛细血管显著扩张, 扩张的血管腔内有较多红细胞, 部分肺泡腔中充满了红细胞及水肿液, 部分肺泡塌陷合并有肺大泡形成 (HE $\times 400$) 图 3 实

验组伤后 1 周, 肺泡腔中红细胞明显减少, 肺泡腔比较清亮 (HE $\times 400$) 图 4 实验组伤后 2 周, 可见部分肺间质水肿, 肺泡腔清亮, 偶有红细胞渗出 (HE $\times 400$) 图 5 对照组肺泡腔内透亮, 肺间质无水肿, 肺泡周围血管无充血或扩张 (HE $\times 400$)

表 1 两组大鼠造模后不同时间点血清和肺泡灌洗液 P 物质含量及肺通透指数

造模后时间	血清 P 物质 (pg/ml)		肺泡灌洗液 P 物质 (pg/ml)		肺通透指数	
	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组
24h	306.1 $\pm$ 70.2	675.8 $\pm$ 101.1 ^①	23.8 $\pm$ 5.2	34.9 $\pm$ 8.7 ^①	1.71 $\pm$ 0.25	2.55 $\pm$ 0.23 ^①
3d	308.6 $\pm$ 65.5	805.3 $\pm$ 91.2 ^①	25.8 $\pm$ 3.6	48.4 $\pm$ 7.9 ^①	1.71 $\pm$ 0.32	3.13 $\pm$ 0.29 ^①
1w	303.1 $\pm$ 45.4	538.3 $\pm$ 72.6 ^①	25.3 $\pm$ 4.9	26.7 $\pm$ 4.3 ^②	1.63 $\pm$ 0.28	2.71 $\pm$ 0.26 ^①
2w	290.9 $\pm$ 32.7	399.3 $\pm$ 31.4 ^②	25.9 $\pm$ 4.5	22.2 $\pm$ 3.2 ^②	1.70 $\pm$ 0.19	2.25 $\pm$ 0.22 ^②

注: 与同时点对对照组比较^① $P<0.05$, ^② $P>0.05$

内皮细胞产生粘附分子,从而进一步加重组织炎症反应^[6]。有学者证明 P 物质通过作用于其相应的受体在急性胰腺炎及其相关肺损伤^[7-8]、脓毒血症引起的多器官损伤^[9]以及严重烧伤导致的急性肺损伤^[10]中都起到了重要的促炎作用。但是 P 物质是否参与脊髓损伤后肺损伤过程,国内外报道较少。有研究^[11]表明,交感神经的过度兴奋、血流冲击对肺组织的影响是一过性的,而 P 物质启动炎症反应才可能是 SCI 后成人呼吸窘迫综合征形成的主要原因。P 物质特异性结合受体-神经激肽 1 受体(NK1R)拮抗剂 SR14033 可以有效阻滞 P 物质与 NK1R 结合,减少中性粒细胞粘附移行和细胞因子、趋化因子产生,减轻肺部炎症反应^[6]。

在本研究中,实验组大鼠急性 SCI 后 24h 血清 P 物质含量明显高于对照组,并于伤后 3d 达最高峰,随后开始逐渐下降,但直到伤后 2 周仍高于对照组。实验组肺泡灌洗液中 P 物质含量的变化趋势与血清中 P 物质含量变化趋势相同。实验组大鼠伤后 24h、3d、1 周血清及伤后 24h、3d 肺泡灌洗液的 P 物质含量与对照组相比均有显著性差异。P 物质含量变化周期与 SCI 后肺水肿转归周期同步。说明 P 物质可能参与了大鼠急性 SCI 后肺水肿的形成过程。

实验组大鼠急性 SCI 后 LPI 也逐渐升高,伤后 3d 达最高峰,随后逐渐下降,但伤后 2 周时仍高于对照组。伤后 24h、3d 及 1 周时实验组大鼠 LPI 与对照组相比有显著性差异。肺组织病理切片证实,实验组大鼠急性 SCI 后 24h 肺泡壁明显增厚,点状出血,肺泡内分泌物增多,红细胞增加;伤后 3d 肺泡壁广泛增厚,毛细血管显著扩张,扩张的血管腔内有较多红细胞,部分肺泡腔中充满了红细胞及水肿液,部分肺泡塌陷合并有肺大泡形成;伤后 1 周肺泡中红细胞明显减少,肺泡腔比较清亮;伤后 2 周肺水肿、出血情况进一步好转。说明大鼠急性 SCI 后早期红细胞及水肿液渗出到肺泡内,形成肺水肿。随着病情的发展,水肿程度逐渐加重,于伤后 3d 达高峰。LPI 变化周期与 SCI 后肺水肿转归周期一致。

由此可以推论,大鼠急性 SCI 后早期,P 物质释放逐渐增多,血管通透性增大,血浆蛋白外渗也逐渐增加,水肿程度加重。随着机体自身免疫能力的增强,P 物质释放减少,同时吸收代谢增加,血

中 P 物质含量逐渐下降,血管通透性逐渐减小,血浆蛋白外渗减少,肺水肿也逐渐开始好转。

临床上,急性 SCI 后肺部并发症出现于伤后 1~3d,伤后 3~7d 达高峰,伤后 1 周逐渐好转。本研究结果为 SCI 后肺部并发症转归过程的特点提供了新的证据。

本研究初步证实 P 物质含量变化周期与大鼠急性 SCI 后肺水肿转归周期相关,但是 P 物质是否是急性 SCI 后引发肺水肿的关键因子,是否还有其他血管活性介质或因子介入其中目前尚不清楚,需要进一步研究来证实。

4 参考文献

1. 南国新,廖维宏,伍亚民,等.大鼠急性脊髓损伤后肺组织的病理改变及其意义[J].中国脊柱脊髓杂志,2007,17(3):214-217.
2. Wrathall JR, Pettegrew RK, Harvey F. Spinal cord contusion in the rat: production of graded, reproducible, injury groups[J]. Exp Neurol, 1985, 88(1): 108-122.
3. DeVivo MJ, Black KJ, Stover SL. Causes of death during the first 12 years after spinal cord injury [J]. Arch Phys Med Rehabil, 1993, 74(3): 248-254.
4. Jackson AB, Grooms TE. Incidence of respiratory complications following spinal cord injury [J]. Arch Phys Med Rehabil, 1994, 75(3): 270-275.
5. 田莉莉,才丽平,康健,等.慢性阻塞性肺疾病患者血浆及痰中 P 物质变化及其与肺功能关系的研究 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2000, 23(3): 138-140.
6. Hegde A, Zhang H, Mochhala SM, et al. Neurokinin-1 receptor antagonist treatment protects mice against lung injury in polymicrobial sepsis[J]. J Leukoc Biol, 2007, 82(3): 678-685.
7. Bhatia M, Slavin J, Cao Y, et al. Preprotachykinin-A gene deletion protects mice against acute pancreatitis and associated lung injury[J]. Am J Physiol, 2003, 284: G830-G836.
8. Lau HY, Wong FL, Bhatia M. A key role of neurokinin 1 receptors in acute pancreatitis and associated lung injury [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 327(2): 509-515.
9. Ng SW, Zhang H, Hegde A, et al. Role of preprotachykinin-A gene products on multiple organ injury in LPS-induced endotoxemia[J]. J Leukoc Biol, 2008, 83(2): 288-295.
10. Sio SW, Mochhala S, Lu J, et al. Early protection from burn-induced acute lung injury by deletion of preprotachykinin-A gene[J]. Am J Respir Care Med, 2010, 181(1): 36-46.
11. 张劭博,邹最,石学银. P 物质在异氟烷诱发脊髓损伤大鼠神经源性肺水肿中的作用[J]. 中国矫形外科杂志, 2009, 17(10): 751-753.

(收稿日期:2011-05-31 修回日期:2011-08-19)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 卢庆霞)