

硫酸镁对继发性脊髓损伤保护作用的实验研究

任 亮¹, 申 勇², 张国平¹

(1 石家庄市第三医院脊柱外科 050011 石家庄市; 2 河北医科大学第三医院脊柱外科 050051 石家庄市)

【摘要】目的:探讨硫酸镁对继发性脊髓损伤的保护作用及其作用机制。**方法:**选健康新西兰大白兔 36 只, 随机分为 3 组: A 组为正常组, 仅行 L1~L3 椎板减压; B 组和 C 组分别为对照组和治疗组, 行 L1~L3 椎板减压后采用 Allen's 重物打击法致伤脊髓, 伤后 30min 时 B 组经腹腔注射蒸馏水 600mg/kg, C 组经腹腔注射硫酸镁 600mg/kg。48h 后切取伤段脊髓组织分别测定水、钙、镁含量, 观察局部组织病理学改变、超微结构变化及单位面积凋亡细胞数。**结果:**与 A 组比较, B、C 组伤段脊髓组织水、钙含量增多, 镁含量减少, 组织病理学改变及超微结构破坏严重, 细胞凋亡数上升, 且 C 组较对 B 组轻。**结论:**早期应用硫酸镁治疗可减轻脊髓损伤后的继发性损伤。

【关键词】硫酸镁; 脊髓损伤; 细胞凋亡

中图分类号: R971, R651.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2005)-10-0585-03

Experimental study of protective effect of magnesium sulfate on secondary spinal cord injury/REN Liang, SHEN Yong, ZHANG Guoping/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2005, 15(10): 585~587

【Abstract】Objective: To investigate the possible mechanism of protective effects of magnesium sulfate on the injured spinal cord in rabbit model. **Method:** Thirty-six Newzealand white rabbits were randomly assigned into three groups: Sham (Group A); Spinal cord injury (SCI) (Group B); SCI with magnesium sulfate treatment (Group C). The SCI animal model was made by using an improved Allen's weight-drop device. After thirty minutes the animals of group B were injected with 600mg/kg distilled water through intraperitoneum and group C were injected with 600mg/kg magnesium sulfate. The contents of H_2O , Mg^{2+} , Ca^{2+} in the injured spinal cord tissues were examined. The histopathology and ultrastructure of injured spinal cord tissues were observed through light and electron microscopes. The apoptosis cells were assayed through TUNEL (TdT mediated dUTP-biotin nick end labeling). The positive cells were quantitated by a computer image analysis system. **Result:** The contents of H_2O and Ca^{2+} in injured spinal cord tissues in each SCI group were significantly increased compared to those in the Sham ($P < 0.01$), and those in group C was less than those in group B ($P < 0.05$). The contents of Mg^{2+} significantly decreased ($P < 0.01$) in the injured spinal cord tissues. The damage of structure in group C was less serious than that in group B. The number of apoptosis cell in group B was more than that in group C ($P < 0.01$). **Conclusion:** Early intervention with magnesium sulfate can decrease the secondary spinal cord injury.

【Key words】 Magnesium sulfate; Spinal cord injury (SCI); Apoptosis

【Author's address】 Department of Spinal Orthopaedics, the Third Hospital of Shijiazhuang, Hebei, 050011, China

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)时损伤部位的神经组织除受直接外伤造成原发损伤外, 还因迟发性神经细胞坏死、崩解及凋亡形成继发性损伤, 其程度有时较原发损伤更重。这种继发性损伤涉及多种病理生理过程, 单胺、神经肽、膜脂质

过氧化物等都是继发性损伤的毒性物质, 而兴奋性氨基酸(excitatory amino acid, EAA)的释放及其与相应受体反应是这些继发性损伤因子中最重要的因素之一。研究表明, 硫酸镁是一种兴奋性氨基酸受体拮抗剂, 用于脑损伤的治疗已取得了满意的疗效^[1-3]。本实验拟通过动物脊髓损伤模型, 探讨硫酸镁对 SCI 的保护作用, 为临床应用提供理论依据。

第一作者简介: 男(1973-), 主治医师, 医学硕士, 研究方向: 脊髓损伤

电话: (0311)85990631 E-mail: ren1973@inhe.net

1 材料与方法

1.1 动物分组与模型制备

健康新西兰大白兔 36 只,雌雄不限,体重 2.5~3.0kg,平均 2.7kg,随机分为 3 组,每组 12 只, A 组:正常组, B 组:脊髓损伤组, C 组:脊髓损伤+硫酸镁处理组。3%戊巴比妥钠(1ml/kg)腹腔注射麻醉,常规消毒铺巾,以 L2 为中心行后正中切口,显露 L1~L3 棘突及椎板,切除棘突及椎板,造成一长约 1cm,宽约 0.5cm 骨窗,显露硬膜。A 组在显露硬膜后予以止血、缝合伤口。B、C 组按改良 Allen's 重物打击法制备脊髓损伤模型:将自制的铜制薄垫片(8×4×0.5mm)平放于硬膜上,用自制的 30g 重的钢棒在玻璃管的引导下重力打击,打击强度为 30×9(g·cm),打击完毕后冲洗,逐层缝合伤口。在脊髓损伤后 30min, B 组腹腔注射蒸馏水 600mg/kg, C 组腹腔注射硫酸镁 600mg/kg。

1.2 取材

48h 后每组随机抽取 10 只动物用耳缘静脉栓塞法处死,于原切口显露脊髓,以打击处为中心切取伤段脊髓 0.8cm 长,将标本从中间分两半,一半用 10%中性福尔马林固定;另一半作水、钙、镁含量测定,先用生理盐水将其表面血液冲净,再用显微器械轻柔去除硬膜,滤纸吸干水份后装于瓶中称重,置于-20℃冰箱备用。

1.3 组织水、钙、镁含量测定

将冻存标本于电烤箱(100℃)放置 24h 烤干称干重,按 Elliot 公式计算含水量:组织含水量=(湿重-干重)/湿重×100%。干燥标本中加入浓硝酸 1ml 和高氯酸 0.25ml 硝化 1~2h,用去离子水稀释后在美国 P-E 公司生产的 4100 型原子吸收分光光度计上测定钙、镁含量(μg/ml)。

Ca^{2+} 含量[μg/g(干重)]=测定液 Ca^{2+} 浓度/样本干重×稀释倍数

Mg^{2+} 含量[μg/g(干重)]=测定液 Mg^{2+} 浓度/样本干重×稀释倍数

1.4 组织病理学检查

将标本用 10%中性福尔马林固定 24h 后取出,石蜡包埋,切取 6μm 厚切片,常规 HE 染色,光镜下观察其组织学形态改变。

1.5 细胞凋亡的原位检测

从每只兔的切片中随机抽取一张,参考相关实验技术作 TUNEL 染色。TUNEL 试剂盒为德国宝灵曼公司提供。在 TdT 介导下,使生物素化的

dUTP 标记至 DNA 断裂后形成的 3-OH 末端,借助生物素与亲合素的特异结合,使辣根过氧化物酶连接至 DNA 断点,最后加入底物。二氨基联苯胺(DAB)显色,显微镜下观察细胞核呈深棕褐色的凋亡细胞。每组选 5 张切片,每张切片背角区任选 5 个视野,用北航产 CMIAS-200IB 多功能真彩色病理图像分析系统处理,测定单位面积(1mm²)内的阳性颗粒数。

1.6 电镜观察

每组剩余 2 只兔经灌流固定后,取损伤段脊髓(A 组切取减压处脊髓)常规制作透射电镜标本, LKB-1 型超薄切片机切片,片厚 50~60μm,在日立 H-7500 透射电镜下观察。

1.7 统计分析

数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SAS 6.12 统计软件进行结果分析,水、钙、镁含量比较用单因素方差分析和 q 检验进行统计学处理;凋亡细胞数比较用两样本均数比较的 t 检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 脊髓组织含水量及钙、镁含量

见表 1。损伤组伤段脊髓含水量均高于正常对照组($P<0.01$), B 组伤段脊髓含水量高于 C 组($P<0.05$)。B、C 组伤段脊髓组织钙含量均高于 A 组($P<0.01$), B 组钙含量高于 C 组($P<0.05$); B、C 组伤段脊髓组织镁含量均低于 A 组($P<0.01$), B 组镁含量低于 C 组($P<0.05$)。

2.2 HE 染色结果

正常组脊髓灰白质界限清,神经元及髓鞘结构正常。损伤组灰白质边界不清,可见大片状出血、水肿、坏死区,灰质中神经元减少,部分尼氏小体及细胞核消失,白质呈网状脱髓鞘。治疗组脊髓组织出血、水肿、脱髓鞘明显轻于损伤组(图 1~3,后插图 II)。

表 1 伤段脊髓组织中 H_2O 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 含量

	A 组	B 组	C 组
含水量(%)	63.72±1.03	72.41±1.20 ^①	67.87±0.81 ^{①②}
Mg^{2+} 含量 (μg/g 干重)	441.12±0.79	392.55±0.60 ^①	418.66±2.23 ^{①②}
Ca^{2+} 含量 (μg/g 干重)	385.29±0.18	807.40±0.32 ^①	660.80±0.16 ^{①②}

注:①与 A 组比较 $P<0.01$;②与 B 组比较 $P<0.05$

2.3 TUNEL 法测定细胞凋亡结果

A 组未见明显的凋亡细胞, B 组可见大量的凋亡细胞, 22.21 ± 0.50 个/ mm^2 , C 组可见凋亡细胞, 但明显少于 B 组, 为 13.28 ± 0.48 个/ mm^2 ($P < 0.01$) (图 4~6, 后插页 II)。

2.4 透射电镜观察结果

B 组脊髓灰质内神经细胞核不完整, 核膜模糊, 变形, 核仁消失, 胞浆内有空泡形成, 线粒体肿胀, 嵴消失, 内质网扩张, 核糖体减少, 后索髓鞘板层结构排列紊乱, 扭曲变形, 轴索内结构不清晰。C 组结构破坏明显轻于 B 组, 细胞核尚完整, 细胞器变性改变轻, 后索髓鞘板层结构尚存, 轴索内可见肿胀的线粒体及微丝、微管 (图 7~9, 后插页 II)。

3 讨论

脊髓继发性损伤是 SCI 中一个重要的环节, 过去人们一直认为脊髓损伤后继发性神经损害主要是神经细胞的坏死, 然而越来越多的证据表明凋亡也是神经细胞丢失的一种形式^[4]。

兴奋性氨基酸 (EAA) 在 SCI 细胞坏死和凋亡过程中起着重要作用。EAA 受体拮抗剂, 如氯胺酮、苯环己胍啶及 MK-801 在神经外科治疗脑损伤中已得到了应用, 但尚未应用到脊髓损伤的治疗中。硫酸镁也是一种 EAA 受体拮抗剂, 镁离子是一种非竞争性的 N-甲基-D-天门冬氨酸受体拮抗剂, 它可阻滞 NMDA 受体上的离子通道, 并调节 EAA 释放^[5], 从而拮抗由 EAA 所致的损伤。

体外研究表明, Ca^{2+} 、氧自由基均可导致神经细胞凋亡^[6]。损伤所致的 Ca^{2+} 大量内流导致细胞内 Ca^{2+} 浓度升高^[1]。 Mg^{2+} 可通过与 Ca^{2+} 竞争细胞膜上的结合位点从而抑制 Ca^{2+} 内流; 通过 Mg^{2+} - Na^{+} 交换从而抑制 Ca^{2+} - Na^{+} 交换, 阻止 Ca^{2+} 内流; 细胞外 Mg^{2+} 还可通过 Mg^{2+} - Ca^{2+} 交换促进 Ca^{2+} 外流^[2]。硫酸镁通过抑制 Ca^{2+} 内流, 降低细胞内 Ca^{2+} 浓度可抑制 Caspase-3 和 bax 基因的激活, 而 Caspase-3 和 bax 已经被证实是细胞凋亡的启动基因, 这些已经在相关研究中得到证实^[7]。代文光等^[3]发现硫酸

镁腹腔注射可减少颅脑损伤后线粒体氧自由基的产生, 改善线粒体清除氧自由基的能力。Suzer 等^[8]也观察到硫酸镁对 SCI 后的运动诱发电位和脂质过氧化反应有剂量依赖性保护作用。

本实验通过向 SCI 的兔腹腔注射硫酸镁, 发现用药后 48h 损伤区水、钙含量较单纯 SCI 组有所降低, 镁含量有所上升; 病理组织学及超微结构破坏减轻; 凋亡细胞数减少。表明硫酸镁不仅可以减轻脊髓水肿, 改善局部组织破坏, 减轻 EAA 毒性作用, 并且可以通过抑制脊髓神经细胞凋亡起到治疗作用, 为临床缓解 SCI 后继发性损伤提供了一种新途径, 但还有待于进一步作分子水平的研究。

4 参考文献

1. Ram Z, Sden M, Shacked I, et al. Magnesium sulfate reverses experimental delayed cerebral vasospasm after subarachnoid Hemorrhage in rats[J]. Stroke, 1991, 22(7): 922-927.
2. 汤亚南, 赵凤临, 叶鸿瑁. 新生大鼠缺氧缺血后海马 caspase-3 mRNA 的表达及硫酸镁的神经保护机制研究[J]. 中华儿科杂志. 2003, 41(3): 212-214.
3. 代文光, 许民辉, 邓洵鼎, 等. 硫酸镁对改善实验性创伤性脑损伤后脑组织线粒体呼吸功能作用的研究 [J]. 创伤外科杂志, 2001, 3(1): 29-31.
4. Beattie MS, Farooqui AA, Bresnahan JC. Apoptosis and secondary damage after experimental spinal cord injury [J]. Top Spinal Cord Inj Rehabil, 2000, 6(2): 14-26.
5. Johnson JW, Ascher P. Voltage-dependent block by intracellular Mg^{2+} of N-methyl-D-aspartate-Activated channels[J]. Biophys J, 1990, 57(5): 1085-1090.
6. Young W. Role of calcium in spinal cord injury[J]. Cent Nerv Syst Trauma, 1985, 2(2): 109-114.
7. Zhong LT, Sarafian T, Kane DJ, et al. Bcl-2 inhabits death of central neural cell induced by multiply agents[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(4): 4533-4541.
8. Suzer T, Coskun E, Islekel H, et al. Neuroprotective effect of magnesium on lipid peroxidation and axonal function after experimental spinal cord injury[J]. Spinal Cord, 1999, 37(7): 480-484.

(收稿日期: 2005-05-16)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 卢庆霞)