维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2004)01-0048-03

硫酸镁对大鼠创伤性脑损伤后神经细胞凋亡的影响

石全红 , 支兴刚 , 何朝晖

(重庆医科大学临床学院神经外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察创伤性颅脑损伤(TBI)后大鼠神经细胞凋亡现象。应用硫酸镁观察其对损伤后大鼠神经细胞凋亡的影响。方法:采用 Feeney 损伤模型,运用原位末端标记(Tunel)技术,观察中度脑损伤后 2h~5d 伤侧大脑皮层、海马神经细胞凋亡情况,结果:1. Tunel 染色:伤侧大脑半球广泛存在细胞凋亡,以受伤区周缘为甚,伤后 2h 即可见凋亡细胞,2~3d 达高峰,5d 时减少。2. 硫酸镁治疗后 8h~3d,伤侧皮层、海马区细胞凋亡数与损伤组比较明显减少($P<0.05$)。结论:TBI 后,神经元发生变性、坏死的同时,存在凋亡现象。硫酸镁能阻滞 TBI 后神经细胞的凋亡,具有脑保护作用。

【关键词】创伤性脑损伤;硫酸镁;凋亡

【中国图书分类法分类号】R651.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2003-05-13

The effect of magnesium sulfate on apoptosis following traumatic brain injury (TBI) in rats

SHI Quanhong , et al

(*Department of Neurosurgery , College of Clinical Medicine , Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate apoptosis of neurone in rats following traumatic brain injury and the effects of magnesium sulfate on apoptosis of neurone after brain injury. *Methods*: Based upon the Feeney's model the cellular apoptosis was observed in injuried cortex and hippocampus at the 2nd hour to the 5th day after medium traumatic brain injury by TUNEL technique. *Results*: 1. The cellular apoptosis was observed in the injuried cerebral hemisphere at the 2nd hour after traumatic brain injury. The number of apoptotic cells reached its peak at the 2nd to the 3rd day after traumatic brain injury, then gradually reduced at the 5th day after traumatic brain injury. 2. At the 8th hour to the 3rd day after treatment with magnesium sulfate, the number of the cellular apoptosis in the injuried cortex and hippocampus reduced significantly compared with the controls ($P<0.05$). *Conclusion*: The neuronal apoptosis exists in combination with neuronal necrosis after brain injury. Magnesium sulfate can prevent the neurone from apoptosis following TBI, therefore it is of importance in protecting brain.

【Key words】Traumatic brain injury; Magnesium sulfate; Apoptosis

Rink 等[1]首次证明了神经细胞凋亡在创伤性脑伤(TBI)后神经细胞损伤死亡中的地位和作用,观察 TBI 后 12~72h 神经细胞凋亡发生情况,但未作更长时间的观察。TBI 后神经细胞凋亡的机理目前未完全阐明。本研究拟通过 TBI 进一步研究神经细胞凋亡发生的规律和意义;硫酸镁对 TBI 后细胞凋亡的影响,探讨其脑保护机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 Wistar 大鼠,雄性,体重 250~300g,由重庆医科大学实验动物中心提供。实验分组:损伤及损伤给药组根据处死时间分为 2h、8h、12h、24h、48h、72h、120h 等 7 个时相点组以及正常对照组、假手术组,每组 6 只大鼠。假手术组仅作颅骨钻孔而不致伤。

1.2 实验模型制备

动物损伤模型采用改进后的 Feeney 自由落体脑损伤装置。造成中度脑损伤。具体方法和步骤:2% 戊巴比妥钠按 50mg/kg 剂量行大鼠腹腔内注射。固定于立体定向仪上,头皮剪毛,矢状切开头皮,剥离显露左顶颅骨,于中线左侧旁开约 2.5mm,前囟后约 2.5mm 处用大鼠颅骨钻小心钻开颅骨,保护硬膜完整,扩大骨窗至直径约 5mm。将聚乙烯撞击头置于骨窗,垂直固定导杆,用 20g 击锤从 30cm 高处撞击聚

作者介绍:石全红(1969-),男,主治医师,硕士,主要研究方向:颅脑外伤。

维普资讯 http://www.cqvip.com

乙烯撞击头，造成左侧大脑半球中度脑损伤。撞击后，大鼠出现短暂的四肢抽搐、呼吸暂停数秒，表明致伤成功，动物清醒后分笼喂养。

损伤给药组大鼠在致伤后 5min 内给予 25% $MgSO_4$ 750μmol/kg，臀肌注射。

1.3 标本取材和制备

将麻醉动物仰卧，固定在手术台上，打开胸腔暴露心脏，经右心室插管至升主动脉，剪开右心耳，用蠕动泵行左心室—升主动脉灌注动物。首先用 4℃ 肝素的生理盐水 200ml 快速冲洗血液，再用 4℃ 4% 的多聚甲醛(用含 0.9% NaCl 和 0.01MPBS，pH 为 7.4 配制)300ml 作恒速灌流。灌流固定毕，断头取出完整脑组织，可见脑挫裂伤区，以该区为中心冠状切取约 0.5cm 厚脑组织块放入 4% 多聚甲醛中 24h 后作石蜡包埋。后固定脑片，乙醇梯度脱水、二甲苯透明后，常规石蜡包埋。蜡块从损伤最明显处作连续切片，厚度 5μm。

1.4 Tunel 染色

石蜡切片常规作二甲苯脱蜡，乙醇梯度脱水，蛋白酶 K 消化 30min，0.1% TritronX－100 透化处理 4min，0.3% H_2O_2 灭活内源性过氧化物酶 5min，50μl Tunel 反应液温孵 70min，50μl 抗荧光抗体—POD 温孵 40min，DAB 显色，苏木精复染，烤干，封片，显微镜观察(阳性反应细胞核呈棕色)10×40 倍显微镜下在切片伤侧皮层和海马分别选择凋亡细胞最多的八个视野计数，最后取平均值。

1.5 统计分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，结果运用 SAS 数理统计软件进行方差分析，组间均数比较用 q 检验。

2 结 果

2.1 正常和假手术组

镜下观察结果无显著性差异，未见有凋亡细胞，偶可见非特异性淡染细胞散在分布。

2.2 损伤组

Tunel 染色显示，TBI 后 2h 在伤侧皮层和海马区即可见有少量凋亡细胞，12～24h 凋亡细胞增多，48～72h 达到凋亡高峰，5 天时减少(见表 1)。

2.3 损伤给药组

伤侧大脑皮层、海马，在 8h、12h、24h、48h、72h 凋亡细胞与损伤组比较各组均有显著性降低，而在 2h、5d 无显著性改变(见表 2)。

表 1 创伤性脑伤后不同时间点伤侧皮层、海马凋亡细胞数($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

	2h	8h	12h	24h	48h	72h	5d
皮层	7.33±1.12*	14.79±1.19*	24.83±4.01*	39.54±1.99*	45.92±1.50*	47.75±2.89*	19.46±1.56*
海马	4.42±0.70*	9.76±0.31*	14.38±0.71*	22.0±2.42*	31.46±1.54*	33.84±1.63*	12.42±3.08*

*$P<0.01$ 与假手术组比较

表 2 创伤性脑伤后 $MgSO_4$ 对不同时间点伤侧皮层和海马细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

		2h	8h	12h	24h	48h	72h	5d
皮层	TBI	7.33±1.12	14.79±1.19	24.83±4.01	39.54±1.99	45.92±1.50	47.75±2.89	19.46±1.56
	TBI+$MgSO_4$	7.25±0.91	10.71±1.52△△	22.17±2.20△	30.79±3.09△△	36.87±4.48△△	36.67±3.37△△	20.38±2.08
海马	TBI	4.42±0.70	9.76±0.31	14.38±0.71	22.0±2.42	31.46±1.54	33.84±1.63	12.42±3.08
	TBI+$MgSO_4$	4.17±0.65	7.08±1.32△△	10.92±1.00△△	14.92±0.88△△	26.75±1.32△△	29.46±2.78△	12.67±2.44

△$P<0.05$ △△$P<0.01$ 与 TBI 组比较

3 讨 论

本实验采用 Feeney 改进型脑损伤模型，造成大鼠左侧半球中度脑损伤，对伤后 2h～5d 进行了较长时间观察，检测脑伤后伤侧大脑皮层和海马神经细胞凋亡发生的消长过程，发现正常和假手术组在各时相均未见有凋亡细胞。创伤组中，伤后 2h 伤侧大脑半球可见有少量凋亡细胞，8～12h 凋亡细胞逐渐增多，2～3d 达高峰，5d 时，仍有一定量的维持。Rink[1]观察中度 TBI 6～72h 后的神经元凋亡发生情况，发现细胞凋亡可见于伤后 6h，24～72h 达高峰，且 72h 后仍维持一定数量。张亚卓[2]通过球囊加压中脑造成脑伤实验中也发现，不同容积的中脑受压可诱导神经元及胶质细胞发生凋亡，凋亡的数量与加压的时间有关，一般在 24～72h 达高峰。本实验和上述作者的研究结果均说明细胞凋亡出现的高峰时期是在损伤 24h 以后。

通过某种途径减轻或逆转病理状态下神经细胞凋亡过程，目前报道较少。崔建忠报道[3]在实验性脑损伤后用碱性纤维母细胞生长因子(bFGF)治疗，发现伤后 4h、1d、3d 额顶区、海马 $CA_{2\sim3}$ 区神经细胞凋亡数明显少于损伤组。本实验在伤后 5min 内给予 25% $MgSO_4$ 750μmol/Kg，8h、12h、24h、48h、72h 伤侧脑组织皮层、海马凋亡细胞数明显少于损伤组，而在 2h、120h 凋亡细胞数则与损伤组无显著性差

维普资讯 http://www.cqvip.com

异。说明 $MgSO_4$ 可减少脑损伤后细胞凋亡,而不影响凋亡出现和持续时间。已有大量实验证明,在急性脑损伤后脑组织内 Mg^{2+} 浓度显著下降。这一现象与细胞凋亡之间的关系如何?值得进一步探讨。我们认为 Mg^{2+} 影响细胞凋亡的因素可能有以下几个方面:①对脑血流量调节,Altuna BT[4]发现 Mg^{2+} 具有调节脑血管和外周血管功能,减轻脑伤后伤区缺血、缺氧改变;②Mg^{2+} 是 Ca^{2+} 细胞内流天然的拮抗剂,可以阻断神经元细胞膜上的电压调节钙通道、受体阀门通道以及 $Na^+ - Ca^{2+}$ 交换通道,另外,细胞内 Mg^{2+} 可以防止细胞内 Ca^{2+} 被线粒体摄取,阻滞线粒体内 Ca^{2+} 超载所致的线粒体损伤[5];③对创伤后自由基的清除。冯东福[6]认为早期 $MgSO_4$ 治疗可以减轻大鼠脑伤后线粒体自由基损害;④Mg^{2+} 是 EAA 的 NMDA 受体通道的非竞争性拮抗剂[7],采用嵌制技术研究发现,Mg^{2+} 能阻断与脑伤发病过程有关的电压依赖 NMDA 受体钙离子通道[8],同时在硫酸镁对大鼠创伤性脑损伤兴奋性氨基酸的影响的实验中发现 $MgSO_4$ 对 EAA 的释放有抑制作用;⑤对于调节细胞凋亡的基因 c-fos 以及 p53 的表达具有抑制作用[9,10]。因此我们认为,TBI 后早期镁剂使用可以减轻神经元的凋亡。对创伤脑组织有一定保护作用。

参 考 文 献

[1] Rink A, Fung KM, Trojanowski JQ, et al. Evidence of apoptotic cell death after expeimental traumatic brain injury in the rat[J]. Am J Pathl, 1995;147(6):1575-1583.

[2] 张亚卓,王忠诚,郑毓书,等.猫中脑损伤后细胞凋亡及相关基因表达的意义[J].中华神经外科杂志,1999;15(4):233-236.

[3] 崔建忠,高俊玲,周云涛,等.外源性 bFGF 对大鼠创伤性海马神经元坏死凋亡的治疗作用[J].中华神经外科杂志,2000;16(1):45-47.

[4] Altua BT, Altara BM. The role of magnesium in etiology of strokes and cerebrovasospasm[J]. Magnesium, 1982;1:277.

[5] 冯东福,朱志安,张 红,等.硫酸镁对大鼠脑损伤后钙超载的抑制作用[J].上海第二军医科大学学报,1999;19(5):398-400.

[6] 冯东福,朱志安,张 红,等.硫酸镁对大鼠脑损伤后线粒体的影响[J].上海医学,2000;23(7):408-410.

[7] Bareyre FM, Saatman KE, Helfaer MA, et al. Alterations in ionized and total blood magnesium after experimental traumatic brain injury: Relationship to neurobehavioral outcome and neuroprotective efficacy of magnesium chlorid[J]. J Neurochem, 1999;73(1):271-280.

[8] Zhang L, RzigaLinski BA, Ellis EF, et al. Reduction of voltage-dependent Mg^{2+} blockade of NMDA current in mechanically injuried neurons[J]. Science, 1996;274(5294):1921-1923.

[9] Muir JK, Raghupathi R, Emery DL, et al. Postinjury magnesium treatment attenuates traumatic brain injury-induced cortical induction of p53 mRNA in rats[J]. Exp Neurol, 1999;159(2):584-593.

[10] 樊永中,朱凤清,周幽心.大鼠脑挫裂伤后 Fos 蛋白表达及硫酸镁的作用[J].苏州医学院学报,2000;20(7):607-610.

(上接第 44 页)

[6] Swana HS, Grossman D, Anthony JN, et al. Tumor content of the antiapoptosismolecule Survivin and recurrence of bladder cancer[J]. N Engl J Med, 1999;341:452-453.

[7] Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas[J]. Cancer Res, 1998;58:1808-1812.

[8] 王 梅,王 冰,王晓丽,等。凋亡相关基因 Survivin 在子宫颈癌组织中的表达及其与 bcl-2 和 p53 表达相关性的初步研究[J].中华妇产科杂志,2001;36(9),546-548.

[9] Lydia N, Christina V, Anastasios Z, et al. The prevalence of bcl-2, p53, and ki67 immunoreactivity in transitional cell bladder carcinomas and their clinicopathologic correlates[J]. Hum Pathol, 1996;29:146-149.

[10] Robin T, Peter A, Paul E, et al. Invasion of bladder by tramsitional cell carcinoma[J]. Cancer, 1998;82:715-718.

[11] Kawasaki H, Toyoda M, Shinohara H, et al. Expression of survivin correlates with apoptosis, proliferation, and angiogenesis during human colorectal tumorigenesis[J]. Cancer, 2001;71:2026-2032.