维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253 - 3626(2003)06 - 0732 - 03

硫酸镁对大鼠创伤性脑损伤兴奋性氨基酸的影响

石全红，支兴刚，唐文渊，何朝晖

(重庆医科大学临床学院神经外科，重庆 400016)

【摘 要】目的:观察兴奋性氨基酸(EAA)在创伤性颅脑损伤(TBI)后的变化，探讨硫酸镁对 EAA 的调节作用。方法:采用自由落体脑损伤模型，应用氨基酸微量分析仪检测正常组、假损伤组、损伤及损伤给药组脑脊液中谷氨酸(Glu)和天门冬氨酸(Asp)。结果:1. 伤后 2h EAA 升高最明显($P<0.05$)，随后逐渐降低，12h 与正常组、假损伤组比较无显著性差异($P>0.05$)。2. 硫酸镁对伤后 2h EAA 的抑制作用最显著($P<0.05$)，在 12 h、24 h、48 h、72 h 对 EAA 抑制作用无显著性($P>0.05$)。结论:TBI 早期 EAA 大量释放。镁剂可抑制早期 EAA 释放，达到脑保护作用。

【关键词】创伤性脑损伤;硫酸镁;兴奋性氨基酸;谷氨酸;天门冬氨酸

【中国图书分类法分类号】R651.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2003 - 11 - 20

Effect of magnesium sulfate on excitatory amino acids following traumatic brain injury in rats

SHI Quanhong, et al

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

【Abstract】 *Objective*: To investigate the level of excitatory amino acids in the cerebrospinal fluid and the effect of magnesium sulfate on the excitatory amino acids following traumatic brain injury. *Methods*: The Feeney's model of the excitatory amino acids in the cerebrospinal fluid (glutamate and aspartate) were measured by amino acid analysis from rats in different time. *Results*: 1. The glutamate and aspartate in the cerebrospinal fluid increased largely 2 hours after traumatic brain injury($P<0.05$), and then gradually decreased. Compared with sham control group, the concentration of excitatory amino acids at 12h after injury had no significant difference ($P>0.05$). 2. Magnesium inhibited strongly the releasing of the excitatory amino acids at 2h and 8h after the traumatic brain injury($P<0.05$), and it had no effect on the releasing of the excitatory amino acids at 12h, 24h, 48h, 72h after traumatic brain injury($P>0.05$). *Conclusion*: Plenty releasing of excitatory amino acid may play an important role at the phase of posttraumatic neuronal injury. Magnesium sulfate can inhibit early releasing of excitatory amino acids. Administering magnesium sulfate may be the optimal choice for treating traumatic brain injury.

【Key words】 Traumatic brain injury; Magnesium sulfate; Excitatory amino acids; Glutamate; Aspartate

近年研究认为，兴奋性氨基酸 Excite Amino Acid(EAA)在创伤后继发性脑损害中起重要作用。脑、脊髓损伤后急性期，脑、脊髓组织内 EAA 含量明显升高，并与脑损伤的严重程度成正相关。Mg^{2+} 是兴奋性氨基酸 N - 甲基 - D - 天冬氨酸(NMDA)受体的非竞争拮抗剂，是否抑制 EAA 的释放国内外未见报道。本实验通过观察创伤性颅脑损伤 Traumatic BrainInjury(TBI)后大鼠脑脊液(CSF)中谷氨酸 glutamate(Glu)和天门冬氨酸 aspartate (Asp)含量变化规律，以及硫酸镁($MgSO_4$)是否对创伤后 EAA 释放有抑制作用，探讨镁剂治疗 TBI 的作用机理，为临床治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康 Wistar 大鼠，雄性，250～300g，由重庆医科大学动物实验中心提供。随机分为 4 组:正常对照组、假损伤组、损伤组、损伤给药组。损伤组和损伤给药组根据抽取 CSF 的时间(2h、8h、12h、24h、48h、72h)进行分组，每组 8 只大鼠，假损伤组仅作颅骨钻孔而不致伤。

1.2 实验模型制备

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

动物损伤模型采用改进后的 Feeney 自由落体脑损伤装置[1]，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，头皮剪毛后常规消毒铺巾，矢状切开头皮，剥离显露左顶骨，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、呼吸暂停数秒钟，表明致伤成功，随后拆开致伤装置，清创、止血，缝合头皮。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 脑脊液的取样

麻醉下，俯卧位固定大鼠头部于立体定向仪，从大鼠的枕大池穿刺置管获取 CSF 量 50～80μl，迅速放入 -70℃ 低温冰箱保存备用。

1.4 样品处理

大鼠 CSF 标本按 50μl 样本加 40μl 蛋白沉淀剂的比例加入 10% 磺基水杨酸，混匀，18000rpm 低温高速离心 20min，取上清液，低温冰箱冻存。用 6300 黄金系统高效氨基酸微量分析仪检测。

1.5 统计学处理

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 CSF 中 Glu 和 Asp 在正常组与假损伤组比较无显著性差异，伤后 2 h 升高到峰值，随后 Glu 和 Asp 值逐渐下降，12 h 与假损伤组比较无显著性差异(见表 1)。

2.2 用 $MgSO_4$ 组伤后 2h、8h 升高的 ASP 和 Glu 显著性降低，而 12h、24h、48h、72h 则无显著性改变(见表 2,3)。

表 1 创伤性脑伤后不同时间点 Glu 和 Asp 浓度(μmol/L)($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

	正常组	假损伤组	创伤后					
			2h	8h	12h	24h	48h	72
ASP	4.42±1.42	4.53±1.21	18.79±2.37*	12.30±0.92*	8.93±1.58	8.34±2.66	7.26±2.29	4.72±1.69
Glu	6.47±2.39	6.85±1.97	25.79±3.43*	14.65±2.10*	12.18±1.08	10.99±1.25	8.86±2.30	7.35±1.19

*$P<0.05$ 与假损伤组比较

表 2 创伤后加用 $MgSO_4$ 不同时间点 Asp 浓度(μmol/L)($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

	2h	8h	12h	24h	48h	72h
损伤组	18.79±2.37	12.30±0.92	8.93±1.58	8.34±2.66	7.26±2.29	4.72±1.69
损伤用药组	10.87±1.64△	7.61±1.62△	7.38±1.67	7.31±2.29	6.65±3.22	5.40±2.52

△$P<0.05$ △△$P<0.01$ 与损伤组比较

表 3 创伤后加用 $MgSO_4$ 不同时间点 Glu 浓度(μmol/L)($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

	2h	8h	12h	24h	48h	72h
损伤组	25.79±3.43	14.65±2.10	12.18±1.08	10.99±1.25	8.86±2.30	7.35±1.19
损伤用药组	14.61±2.33△△	9.84±1.23△	10.52±1.36	10.31±1.21	9.28±5.03	7.89±2.38

△$P<0.05$ △△$P<0.01$ 与损伤组比较

3 讨 论

Faden[2]等对实验性中度液压脑外伤采用脑微量透析技术研究发现，动物受伤区 Glu 和 Asp 含量分别升高 282% 和 273%，两种氨基酸升高的峰值在伤后 10min，持续 1h 后逐渐降至正常水平。我们的实验采用检测大鼠 CSF 中 Asp、Glu 含量，发现脑损伤后 Asp、Glu 在 2h 升高最显著，约为假损伤组的 3～5 倍，此后逐渐降低，到 12h 与假损伤组比较无显著性差异，提示 TBI 后早期 EAA 释放最显著。颅脑损伤早期 CSF 中 EAA 含量显著升高是由于：早期细胞膜破坏，细胞胞质中 Glu 流到细胞外；血－脑屏障破坏，血浆中大量 Glu 进入脑组织，继而导致脑组织、CSF 中 EAA 含量显著升高[1]。此外创伤后脑组织缺血、缺氧、ATP 产生不足使氨基酸的释放增加和清除受阻，CSF 中氨基酸的清除主要依赖于脉络丛和蛛网膜以及神经元与胶质细胞的主动转运或摄取，而摄取又是氨基酸类递质作用灭活的主要机制[3]。伤后 12h EAA 与正常对照组和假损伤组比较无显著性差异，我们认为是由于 TBI 后脑细胞功能逐渐恢复。也可能由于某些氨基酸代谢酶活性增

维普资讯 http://www.cqvip.com

强，并可由受损的脑细胞逸出，使 Glu 等 EAA 破坏及转化增加[3]。

Glu、Asp 虽然是脑中重要的兴奋性神经递质，过多释放将产生兴奋毒性作用。近年研究结果表明，脑损伤后 Glu 异常释放并作用于受体，导致大量 Ca^{2+} 内流可能是引起神经细胞损害的主要机制：EAA 递质持续强烈作用于神经细胞膜上的 NMDA 受体，致使神经细胞膜通透性改变，Na^+，K^+，Ca^{2+} 等通道开放，引起 Na^+、Ca^{2+}、CI^- 内流，K^+ 外流，造成细胞内 Na^+，Ca^{2+} 浓度增加，Na^+，CI^- 大量内流导致神经细胞急性肿胀，而 Ca^{2+} 内流导致神经细胞迟发性损害[4]。细胞内 Ca^{2+} 持续增高，又引起 Ca^{2+} 控制的 EAA 释放增加形成恶性循环[5]。本实验发现在大鼠致伤后 5min 内给予 25% $MgSO_4$ 750μmol/kg 后，其 CSF 中 EAA 含量在 2h、8h 均显著低于损伤组，而 12h、24h、48h 和 72h 无显著改变。大量实验证明急性脑伤后，脑组织内 Mg^{2+} 浓度和血清中 Mg^{2+} 浓度均降低，外伤后低镁是导致继发性脑损害原因之一[6]。Mg^{2+} 是 NMDA 受体通道的非竞争性拮抗剂。本实验发现伤后 2h、8h 外源性镁可抑制 EAA 的释放，其机制可能是：①Mg^{2+} 是 Ca^{2+} 内流的天然拮抗剂，可以阻断神经元细胞膜上的电压调节钙通道、受体闸门通道以及 $Na^+ - Ca^{2+}$ 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，阻止线粒体内 Ca^{2+} 超载所致线粒体损伤[6]，从而阻断了因大量 Ca^{2+} 细胞内流进一步刺激 EAA 的释放，使 EAA 释放减少。②在脑损伤早期应用 $MgSO_4$ 可以有效地减轻血—脑屏障破坏程度[7]。可以使血浆中 EAA 进入 CSF 量减少。③Mg^{2+} 参与糖、脂肪、蛋白质的代谢，参与氧化磷酸化反应，$Na^+/K^+ - ATP$ 酶的激活，DNA、RNA 复制，保持膜结构稳定性和维持其通透性[8]。补充 $MgSO_4$ 后可以减少因脑损伤引起细胞膜破坏，使细胞质中 Glu 流入细胞外减少。同时，因能量改善后可以改善 CSF 中 EAA 的主动转运或摄取，增加其灭活作用。TBI 使用镁剂后 12h、24h、48h 和 72h CSF 中 EAA 与损伤组比较无显著性差异，表明 $MgSO_4$ 对正常范围的 EAA 释放无干预作用，而对早期过多释放有抑制作用。

参 考 文 献

[1] 江基尧，朱 诚，主编. 现代颅脑损伤学[M]. 第 1 版，上海：第二军医大学出版社，1999；124－131，509－511.

[2] Faden AI, Demediuk H, Panter SS, et al. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury [J]. Science, 1989；244(4906)：798.

[3] 于明琨，朱 诚，张光霁. 急性颅脑损伤患者脑脊液中兴奋性和抑制性氨基酸含量改变及其临床意义[J]. 第二军医大学学报，1995；16(2)：165－168.

[4] 陈恒胜，伍亚民，廖维宏. 大鼠脑损伤后脑组织递质性氨基酸变化及意义[J]. 中华创伤杂志，1996；12(2)：79－81.

[5] Benveniste H. Calcium accumulation by glutamate receptor activation is involved in hippocampal cell damage after ischemia [J]. Acta Neurol Scand, 1988；78(6)：529.

[6] Heath DL, Vink R. Brain free magnesium concentration is predictive of moton outcome following traumatic axonal brain injury in rats[J]. Mgnes Res, 1999；12(4)：269－277.

[7] 朱志安，冯东福，张 红，等. 硫酸镁对大鼠脑损伤后血脑屏障通透性影响[J]. 急诊医学，2000；9(1)：11－13.

[8] Heath DL, Vink R. Traumatic brain axonal injury produces sustained decline in intracellular free magnesium concentration[J]. Brain Res, 1996；738(1)：150－153.

(上接第 703 页)hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators[J]. Nature, 1990；347：645－65.

[2] Torra IP, Gervois P, Staels B. Peroxisome proliferator－activated receptor alpha in metabolic disease, inflammation, atherosclerosis and aging[J]. Curt Opin Lipidol, 1999；10：151－159.

[3] Ricote M, Li AC, Willsson TM, et al. The peroxisome proliferator－activated receptor－γ is a negative regulator of macrophage activation[J]. Nature, 1998；391：82－86.

[4] 魏 泓，主编. 医学试验动物学[M]. 第 1 版，成都：科学技术出版社，1998；86.

[5] Fruchart JC, Duriez P, Staels B. Peroxisome proliferator－activated receptor alpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis[J]. Curr Opin Lipidol, 1999；10：245－257.

[6] Martin RD, Hoeth M, Warbinek RH, et al. The Transcription factor NF－κB and the regulation of vascular cell function[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000；20：e83－e88.