DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.05.016

兴奋性氨基酸受体激动剂对大鼠脊髓损伤后诱发电位和血流量的影响

陈恒胜 刘连生 伍亚民 廖维宏 (第三军医大学野战外科研究所) 630042

提 要 文中报道了观察大鼠脊髓中度损伤(50 g/cm)后脊髓蛛网膜下腔注射兴奋性氨基酸(EAA)受体激动剂N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)对脊髓损伤后脊髓灰质血流量(SCBF)、脊髓诱发电位(SPEP)和运动诱发电位(CMEP)的影响。结果发现NMDA明显加剧脊髓损伤(SCI)后脊髓缺血和脊髓上、下行传导功能障碍。表明在脊髓损伤基础上增加EAA可加剧脊髓组织的损害,进一步证实了EAA通过激活NMDA受体所引起的一系列病理生理效应参与脊髓继发性损伤。

关键词 脊髓损伤;氨基酸类;天冬氨酸
中图法分类号 R651.2

目前,兴奋性氨基酸在脊髓损伤发生发展中的作用已引起国内外学者的重视。其受体亚型之一的N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体被过度激活是导致继发性脊髓损伤的主要原因之一,NMDA受体激动剂或拮抗剂有加重或改善创伤后脊髓神经功能的作用[1,2]。提示兴奋性氨基酸(EAA)可能参与了脊髓损伤(SCI)后的继发性损伤。本实验的目的在于观察EAA受体激动剂NMDA对SCI后脊髓灰质血流量(SCBF)、脊髓诱发电位(SPEP)和运动诱发电位(CMEP)的影响,进一步探讨EAA及其受体在SCI中的作用。

1 材料与方法

1.1 脊髓损伤模型与给药方法

Wistar大鼠48只,体重230~280 g,雌雄不拘随机分为正常脊髓蛛网膜下腔注射NMDA组、单纯损伤组、损伤并蛛网膜下腔注射NMDA组和损伤并蛛网膜下腔注射盐水组(SALINE)。20%氨基甲酸乙酯腹腔麻醉,行气管插管供血流量测定时氢气吸入用。采用Yaksh法[3]将外径0.6 mm的PE_{10}导管由枕骨大孔插入脊髓蛛网膜下腔7 cm,约达T_{12}节段,用于给药。背部暴露T_{13}-L_1段脊髓,按Allen's法致伤脊髓(50 g/cm)。分离T_{10}-T_{11}和L_2-L_3椎板作为SPEP和CMEP记录部位,暴露右侧坐骨神经作为SPEP刺激部位,在皮层运动区用牙科钻开一直径5 mm的圆孔暴露硬脑膜作CMEP刺激部位。

在伤后30 min时经蛛网膜下腔插管注射NMDA(Sigma公司产品),药物容量15 μl(100 μmol,生理盐水配制),并用5ul生理盐水冲洗管道,总容量20 μl,用微量注射机慢速推进,6 min注射完。对照组注射相同容 量的生理盐水。

1.2 观测指标

1.2.1 SCBF测定:动物固定在脊髓固定架上,用末梢微循环测定装置(日本松下公司产品)测定脊髓灰质血流量。参考电极置于T_{13}-L_1椎旁皮下,记录电极插入T_{13}-L_1段中部中线旁开0.5 mm处,插入约2 mm。经气管插管吸入10%的H_2 1 min,记录H_2清除曲线,经半对数转换求出半衰期($T_{1/2}$),依公式SCBF=69.3÷$T_{1/2}$(ml/100 g/min)[4]计算血流量。

1.2.2 SPEP、CMEP测定:动物固定同前,选用Apple Ⅰ诱发电位检测系统测定SPEP和CMEP。参考电极置于椎旁皮下。SPEP刺激强度以引起后肢微动为宜,CMEP刺激强度为30~40 V,刺激和记录部位如前述、电位信号经前置放大器放大20万倍,叠加20~50次平均处理,分析时间40 m/s。

1.2.3 统计处理:数据以平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,均值间差异采用Newman-Keul's法进行统计分析。

2 结果

2.1 SCBF变化

正常脊髓蛛网膜下腔注射NMDA后SCBF无明显变化。SCI后各组均有下降。50 g/cm NMDA组伤后1、2、4、24 h较伤前分别下降了22.42%、19.08%、15%和24.08%,与50g/cm组和50 g/cm SALINE组同一时间点比较有显著差异($P<0.01$)。50 g/cm SALINE组与50 g/cm组同一时间点比较无明显差异($P>0.05$),(图1)。

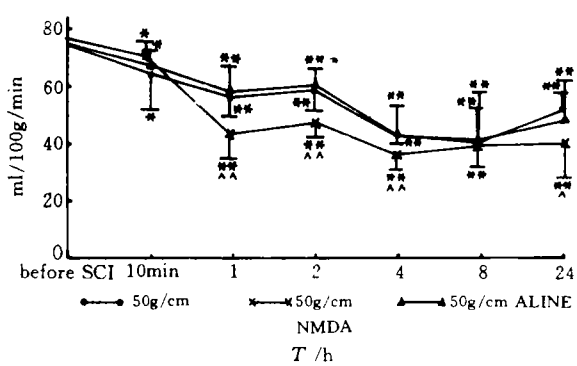


图1 大鼠脊髓损伤后脊髓血流量的变化

Fig 1 SCBF changes after SCI

*: $P<0.05$, **: $P<0.001$, compared with before SCI; ^ $P<0.05$, ^^: $P<0.01$, compared with the 50 g/cm group (the same for the following figures and table)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2 SPEP、CMEP 变化

正常情况下刺激坐骨神经记录的SPEP呈现一潜伏时3.02±0.64 m/s 为主的负峰反应；刺激皮层在L_2～L_3节段记录的 CMEP 呈现一潜伏时3.12±0.70 m/s 为主的负峰反应。将伤前6次记录的 SPEP 和 CMEP 幅值平均数作为100%。正常脊髓蛛网膜下腔注射 NMDA 对 SPEP，CMEP 无明显影响。SCI后各组SPEP，CMEP波幅均有下降。50 g/cm NMDA组伤后4 h(注射NMDA后3.5 h)SPEP波幅较伤前降低了33.58%，24 h 进一步下降36.05%，与50 g/cm 组和50 g/cm SALINE 组同一时间点比较相差显著($P<0.05$)，见图2。CMEP 波幅在注射NMDA后7.5 h较伤前下降41.68%，24 h时进一步下降50.40%，与另外两组比较相差显著($P<0.05$，$P<0.01$)，见图3。与50 g/cm 组比较，50 g/cm NMDA 组伤后 SPEP 峰潜伏时在24 h 时出现明显延长($P<0.05$)；CMEP 峰潜伏时较50 g/cm 组略有延长。50 g/cm SALINE 组与50 g/cm 组同一时间点电位波幅及峰潜伏时比较均无明显差异($P>0.05$)，见附表。

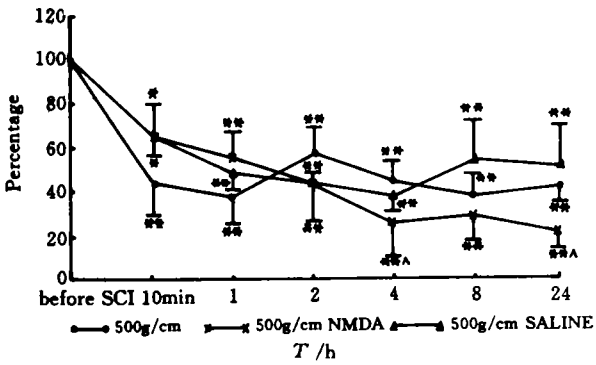


图2 大鼠脊髓损伤后 SPEP 波幅的变化

Fig 2 SPEP amplitude changes after SCI

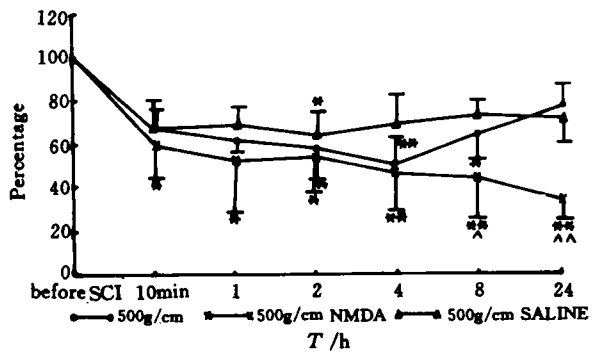


图3 大鼠脊髓损伤后 CMEP 波幅的变化

Fig 3 CMEP amplitude changes after SCI

附表 大鼠脊髓损伤后 SPEP 和 CMEP 峰潜伏时的变化

Table SPEP and CMEP latency changes after SCI (ms)

		Before SCI	After SCI					
			10 min	1 h	2 h	4 h	8 h	24 h
SPEP	50 g/cm	3.18±0.77	4.42±0.50	4.55±0.55	4.80±0.37*	4.72±0.62**	5.02±0.52**	4.55±0.86
	50 g/cm NMDA	2.99±0.53	3.44±0.65	4.30±0.50**	4.01±0.51**	4.20±0.63**	4.59±0.77**	5.90±1.67**
	50 g/cm SALINE	2.62±0.49	3.46±0.98	3.55±0.83	3.75±0.68	4.24±0.83	4.09±0.75	3.38±0.77
CMEP	50 g/cm	3.11±0.55	3.70±0.28	4.06±0.42	3.97±0.44	4.19±0.66	4.21±0.16	4.40±1.06*
	50 g/cm NMDA	3.09±0.83	3.80±0.33	3.53±0.37	3.73±0.16	3.95±0.17*	4.23±0.42**	4.5±0.85**
	50 g/cm SALINE	3.66±0.67	3.99±0.35	3.95±0.39	4.18±0.77	3.39±0.62	3.85±0.50	3.80±0.64

3 讨论

NMDA 受体是一种兴奋性氨基酸受体，业已证实脊髓中存在此类受体[5]。该受体除能被 NMDA 激活外，还能被谷氨酸，天冬氨酸等 EAA 激活。在 SCI 时，创伤等因素刺激突触末梢大量释放 EAA，持久地刺激 NMDA 受体，引起突触后膜持续去极化，进而引起神经细胞损伤或死亡，最终导致脊髓功能障碍[1]。本实验对损伤的大鼠脊髓蛛网膜下腔注射 NMDA 后 SCBF 下降，SPEP、CMEP 波幅降低，峰潜伏时延长的结果表明 EAA 对 SCI 后脊髓血流量及上、下行传导功能均有影响，提示在 SCI 基础上增加 EAA 可加剧脊髓组织的进一步损害，亦进一步证实了 EAA 的兴奋毒性作用是通过 NMDA 受体介导。另外，从时相点来看，伤后蛛网膜下腔注射 NMDA 后0.5 h SCBF 即有明显下降，而SPEP在注射后3.5 h，CMEP在注射后7.5 h 才有明显改变，表明 EAA 增加早期即对组织血流量有明显影响，但此时尚不足以导致神经细胞的更进一步损伤，功能上仅为暂时性抑制，随着血流量的进一步降低以及缺血时间的延长，逐渐波及白质最终导

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

致脊髓进一步损害，加重功能障碍。

近年的研究发现 NMDA 受体是一复杂的受体复合体，当 NMDA 或谷氨酸等激动剂与受体结合后[6]，NMDA 受体复合体离子通道开放，Na^+，Ca^{2+} 等离子进入细胞内，引起神经细胞的反应。实验表明[7]，SCI 后谷氨酸，天冬氨酸等兴奋性氨基酸浓度明显升高，且随损伤程度的加重升高越明显。其短期内 EAA 的瀑布性释放无疑会引起 NMDA 受体的过度活动，导致细胞内 Na^+，Ca^{2+} 蓄积进而引起组织细胞水肿，阻塞毛细血管导致缺血，缺氧。SCI 后脊髓蛛网膜下腔注入 NMDA，短期内 EAA 急骤增加，无疑会加强谷氨酸，天冬氨酸等内源性 EAA 释放所引起的毒性作用，导致更加广泛的 Na^+，Ca^{2+} 内流，从而使组织水肿以及 Ca^{2+} 内流导致的一系列病理损害进一步加剧，最终加重 SCI 后脊髓组织缺血，导致脊髓功能的进一步损害。Faden[1,2] 等发现 NMDA 受体拮抗剂可显著改善 SCI 后的神经功能，表明 NMDA 受体拮抗剂有缓解脊髓损伤时兴奋性氨基酸引起的神经毒性作用。相信随着研究的不断深入，NMDA 受体拮抗剂将为临床 SCI 的治疗提供新的途径。

参考文献

1 Faden AI. A potential role for excitotoxins in the pathophysiology of spinal cord injury. Ann Neurol, 1988, 23: 623～626

2 Faden AI, Lemke M, Simon RP. N-methyl-D-aspartate antagnoist MK-801 improves outcome following traumatic spinal cord injury in rats: Behavioral, anatomical and neurochemical studies. J Neurotrauma, 1988, 5: 33

3 Yaksh TL, Ruda TA. Chronic catheterization of the spinal subarachnoid. Physiol Behav, 1976, 17: 1031

4 何鸣谦. 测定局部血流量的氢气清除法. 中华物理医学杂志, 1989, 11: 176

5 Ganong AH, Lanthorn TH, Cotman CW. Kynurenic acid inhibits synaptic and acidic amino acid-induced responses in the cat. Brain Res, 1983, 273: 170～174

6 Watkins JC. The NMDA receptor concept: origins and development. In: Watkin JC and Collinggridge GL. eds, The NMDA receptor. Oxford: Oxford University Press, 1989: 1～8

7 刘连生. 脊髓损伤及其继发损伤时的兴奋性氨基酸含量变化. 中华神经外科杂志, 1994, 10(2): 70～72

（收稿：1994-02-19；修回：1994-07-24）

Effects of infusing NMDA on SCBF, SPEP and CMEP after SCI

Chen Hengsheng, Liu Liansheng, Wu Yamin, Liao Weihong (Research Institute Field Surgery, Third Military Medical College, Chongqing, 630042)

Abstract In order to document the contribution of excitatory amino acids (EAA) to the secondary damage following spinal cord injury (SCI), the rat spinal cord was injured at $T_{13}-L_1$ using a modification of the weight drop (Allen method, 50 g/cm). After SCI, the spinal cord blood flow (SCBF) and spinal cord evoked potentials (SPEP), cortical motor evoked potentials (CMEP) was measured when 100 μmol of N-methyl-aspartate (NMDA) were infused to the spinal subarachoid space at the level of T_{12}. The results showed that after SCI, the SCBFF of 50 g/cm NMDA group were significantly decreased and the SPEP's and CMEP's peaks latencies tended to be delayed as compared with 50 g/cm group. There were no significant changes of SCBF, SPEP and CMEP between 50 g/cm SALINE group and 50 g/cm group. The results suggest that after SCI, the tissue damage were more serious following infusing NMDA into spinal subarachnoid space and support the hypothesis that EAA through the NMDA receptor contribute to the secondary pathophsiological effects after SCI.

Key words spinal cord injury; amino acids; aspartic acid

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net