

• 基础研究 •

硫酸镁联合单唾液酸神经节苷脂对脊髓损伤大鼠运动功能恢复的影响

邱有波,袁梦郎,杨拯,周玉,席丽,张尧,陈洋,龚都,周礼俊,张晓

[摘要] 目的 观察硫酸镁联合单唾液酸神经节苷脂(GM1)对脊髓损伤(SCI)大鼠运动功能恢复的影响。方法 健康成年 SD 大鼠 48 只,采用 Allen 法(10 g×25 mm)在 T₉ 造成急性脊髓损伤动物模型。动物随机分为 4 组:硫酸镁治疗组(A 组)、GM1 治疗组(B 组)、硫酸镁+GM1 治疗组(C 组)和对照组(D 组),每组 12 只。伤后第 1 天、第 3 天和第 7 天分别用 BBB 评分和斜板试验观察大鼠运动功能的恢复情况;用硫代巴比妥酸法检测丙二醛(MDA)浓度,观察自由基变化。结果 大鼠脊髓损伤后 A、B、C 组 BBB 评分和斜板试验优于对照组,第 3 天、第 7 天 BBB 评分和斜板试验 C 组优于 A、B 组($P<0.05$)。大鼠脊髓损伤后 A、B、C 组 MDA 浓度低于对照组($P<0.05$),C 组明显低于 A、B 组($P<0.05$)。结论 大鼠脊髓损伤后早期使用硫酸镁联合 GM1 对其运动功能的恢复有促进作用,效果优于硫酸镁及 GM1 单独用药。

[关键词] 单唾液酸神经节苷脂;硫酸镁;脊髓损伤;运动功能;丙二醛

Magnesium Sulfate Combined with Monosialoganglioside on Recovery of Motor Function after Spinal Cord Injury in Rats QIU You-bo, YUAN Meng-lang, YANG Zheng, et al. Chengdu Medical College, Chengdu 610081, Sichuan, China

Abstract: Objective To investigate the effect of magnesium sulfate combined with monosialoganglioside on the recovery of motor function after spinal cord injury in rats. **Methods** 48 healthy adult rats were randomly divided into groups A, B, C and D, and SCI was made by Allen's mode(10 g×25 mm) on spinal cord T₉ extradurally, 12 rats in each group. On the 1st d, 3rd d and 7th d after SCI, the recovery of motor function after spinal cord injury in rats was assessed with Basso-Beattie-Bresnahan(BBB)scale and slanting board test. Thiobarbituric acid was used to detect the concentration of malondialdehyde, and was observed the change of free radicals. **Results** After spinal cord injury in rats, BBB scores and slanting board test of groups A, B and C were better than group D. BBB scores and slanting board test of group C was better than groups A and B, which had significant difference on the 3rd d and 7th d after injury($P<0.05$). After spinal cord injury in rats, concentration of malondialdehyde of groups A, B and C were lower than group D($P<0.05$). Concentration of malondialdehyde of group C was lower than groups A and B, which had significant difference after injury($P<0.05$). **Conclusion** Magnesium sulfate combined with GM1 can promote the recovery of motor function early after spinal cord injury in rats, and is superior to magnesium sulfate or GM1.

Key words: monosialoganglioside; magnesium sulfate; spinal cord injury; motor function; malondialdehyde

[中图分类号] R744;R493 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1006-9771(2011)02-0137-04

[本文著录格式] 邱有波,袁梦郎,杨拯,等. 硫酸镁联合单唾液酸神经节苷脂对脊髓损伤大鼠运动功能恢复的影响[J]. 中国康复理论与实践,2011,17(2):137—140.

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)的治疗至今仍是医学界的难题之一。据报道,其年发病率为(20~40)/100 万^[1]。长期以来,国内外学者对脊髓损伤的可能机制做了大量的探索,发现脊髓损伤是兴奋性氨基酸的释放、Ca²⁺聚集、脂质过氧化反应、大量自由基产生、白细胞激活、炎症介质释放等多种病理生理机制综合作用的结果。现代研究认为,治疗 SCI 的关键在于保护受损神经,促进神经再生,恢复运动功能,进而从根本上解决 SCI 造成的伤残和功能障碍^[2]。近几年,有研究者认为,当 SCI 后,任何单独的治疗手段可能不足以修复损伤的脊髓,为能最大限度修复损伤脊

髓,在适当的时间联合使用治疗手段是必要的^[3]。硫酸镁是一种天然的 N-甲基-D 天门冬氨酸(NMDA)受体拮抗药,可有效减少 Ca²⁺内流,防止因大量的 Ca²⁺涌入细胞内而引发的一系列生化反应;能有效清除自由基,从而阻滞脂质过氧化物形成。单唾液酸神经节苷脂(Monosialoganglioside, GM1)作为一种安全的神经保护剂^[4],具有阻断神经细胞凋亡、减少自由基产生、拮抗脂质过氧化反应、降低兴奋性氨基酸毒性和调节神经生长因子等作用。因此,硫酸镁与 GM1 可能有联合治疗作用。本实验建立大鼠急性 SCI 模型,观察硫酸镁联合 GM1 对大鼠 SCI 后运动功能恢复的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 清洁级健康成年 SD 大鼠 60 只,雌雄不拘,体重(200±20) g,由四川大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(川)-10-2006;单唾液酸四己糖神经节苷脂钠注射液:齐鲁制药有限公司产品,批号:

基金项目:成都医学院创新性实验项目资助(CX2010019, CX2010036)。

作者单位:成都医学院,四川成都市 610081。作者简介:邱有波(1989-),男,四川泸州市人,成都医学院医学生。通讯作者:杨拯。

9060261EN;硫酸镁注射液:天津药业焦作有限公司产品,批号:10020142;注射用青霉素钠:石药集团中诺药业(石家庄)有限公司产品,批号:09119209;戊巴比妥钠(德国进口分装):北京化学试剂公司,批号:090205;氯化钠注射液:安徽双鹤药业有限责任公司,批号:100102 1E;丙二醛(MDA)试剂盒:南京建成生物工程研究所,批号:20100719。自制数字式脊髓损伤动物模型制备仪;TGL-16G 台式离心机:上海安亭科学仪器厂;721E 型可见分光光度计:上海光谱仪器有限公司。

1.2 模型制备方法 大鼠术前按常规进行行为测试,确认其运动功能无异常后,用 1.5%戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉,然后将大鼠俯卧固定于手术台上,背部去毛,碘伏常规消毒。无菌条件下,沿正中线切开大鼠背部皮肤,显露椎板及棘突,根据大鼠解剖图谱,明确 T₉ 后咬除棘突及其椎板,暴露脊髓,用自制数字式脊髓损伤动物模型制备仪打击器并制成脊髓损伤模型(Allen 法),打击强度为 10 g×25 mm,打击后以大鼠身体抖动、摆尾及后肢抽动表明模型制备成功。造模成功后,用医用明胶海绵填塞椎骨孔,逐层缝合切口。由于过程中有一定出血而使大鼠血容量减少,术后立即腹腔 0.9%注射氯化钠注射液 9 ml/kg 补液。腹腔注射青霉素以防感染,待动物清醒后放回饲养笼中饲养。术后大鼠自由进食、饮水,定时清洁笼具,保持适宜室温,每天挤压膀胱排尿 3 次,直至膀胱功能恢复;术后连续 3 d 每天腹腔注射 8×10⁴ U 青霉素。

1.3 动物分组及治疗方法 从造模成功的实验动物中随机挑选 48 只大鼠,按照随机数字表法随机分为 4 组:硫酸镁治疗组(A 组)、GM1 治疗组(B 组)、硫酸镁+GM1 治疗组(C 组)和对照组(D 组),每组 12 只。A 组:损伤后 60 min 一次性腹腔注射 600 mg/kg 硫酸镁;B 组:损伤后 15、90、180 min 时分别注射 10 mg/kg GM1,第 2 个 24 h 及第 3 个 24 h 再次注射 10 mg/kg GM1;C 组:损伤后 15、90、180 min 时分别注射 10 mg/kg GM1,第 2 个 24 h 及第 3 个 24 h 再次注射 10 mg/kg GM1,术后 60 min 一次性腹腔注射 600 mg/kg 硫酸镁;D 组:腹腔注射等量的 0.9%氯化钠注射液。

1.4 观察指标及检测方法

1.4.1 MDA 测定 4 组动物均于术后第 1 天、第 3 天和第 7 天取 4 只,经右心室取血 3 ml,立即 3000 r/min 离心 15 min,取上清液,存于-20℃冰箱,7 d 内分析完毕。用 MDA 测定试剂盒测定血清中 MDA 浓度,操作方法按试剂盒说明进行。

1.4.2 BBB 评分 4 组动物均于术后第 1 天、第 3 天和第 7 天进行 BBB 评分。按照 Basso^[5] 等报道的 BBB 评分方法,将动物置于宽大活动场地,采用双人双盲法观察其后肢运动情况,联合考察大鼠后肢的运动,躯干

的位置及稳定性、步态、协调性、爪的置放、足趾间隙及尾的位置。左右两侧肢体取平均值,作为每只大鼠每次功能的得分。

1.4.3 斜板试验 4 组动物均于术后第 1 天、第 3 天和第 7 天进行斜板试验。采用 Rivlin 法^[6],将大鼠放置于自制斜板上,上面垫一橡胶垫,将大鼠身体纵轴与斜板纵轴平行放置,大鼠头朝斜板抬高侧,斜板倾斜角度从 0°开始缓慢上升。判断标准为大鼠停留在斜板上维持至少 5 s 时的最大角度,每次测试 3 遍,取其平均值。

1.5 统计学分析 数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 17.0 软件处理。两组间均数比较方差齐时采用 *t* 检验,方差不齐时以近似 *t* 检验。检验水准取 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

实验期间 A 组大鼠死亡 1 只,B 组死亡 2 只,C 组死亡 2 只,D 组无死亡,及时补充同批次动物完成实验,使每组实验动物保持一致。

2.1 运动功能评价 ①BBB 评分:术前所有动物评分均为正常 21 分,术后第 1 天对照组和治疗组均较低;治疗组 BBB 评分恢复较对照组快,治疗组间差异无显著性意义。术后第 3 天和第 7 天,治疗组 BBB 评分高于对照组($P<0.05$),C 组高于其他治疗组($P<0.05$)。②斜板试验:术后第 1 天治疗组与对照组之间及治疗组间斜板试验临界角度差异无显著性意义。术后第 3 天和第 7 天,治疗组斜板试验临界角度高于对照组($P<0.05$),C 组高于其他治疗组($P<0.05$)。表明 4 组大鼠的运动功能均得到不同程度的恢复,且硫酸镁联合 GM1 治疗组大鼠的运动功能恢复好于其他三组。见表 1 和表 2。

表 1 脊髓损伤大鼠 BBB 评分结果

组别	第 1 天	第 3 天	第 7 天
A 组	0.56±0.89	1.06±0.62 ^{a,c}	5.69±1.84 ^{a,c}
B 组	0.65±0.81	1.09±0.68 ^a	6.06±1.16 ^{b,c}
C 组	0.96±1.02 ^a	2.13±1.13 ^{b,c}	9.06±1.39 ^b
D 组	0.15±0.20	0.44±0.51	3.00±0.79

注:与对照组比较,a: $P<0.05$,b: $P<0.01$;与 C 组比较,c: $P<0.05$ 。

表 2 脊髓损伤大鼠斜板试验结果(°)

组别	第 1 天	第 3 天	第 7 天
A 组	30.83±2.43 ^c	34.67±1.82 ^{a,c}	36.44±1.39 ^{a,c}
B 组	32.92±2.91	35.09±2.00 ^{a,c}	36.27±1.59 ^{a,c}
C 组	34.04±3.44	37.08±1.59 ^b	39.47±1.58 ^b
D 组	31.75±2.02	32.30±2.67	33.86±0.96

注:与对照组比较,a: $P<0.05$,b: $P<0.01$;与 C 组比较,c: $P<0.05$ 。

2.2 MDA 测定 损伤后第 1 天、第 3 天和第 7 天的 MDA 测定值治疗组低于对照组($P<0.05$),治疗组间相比,C 组低于其他治疗组($P<0.05$)。说明硫酸镁和

GM1 对损伤的脊髓组织有保护作用,且硫酸镁和 GM1 联合使用效果更加显著。见表 3。

表 3 脊髓损伤大鼠 MDA 测定结果 (nmol/ml)

组别	第 1 天	第 3 天	第 7 天
A 组	4.61±0.81 ^{a,c}	3.68±0.32 ^{a,d}	3.35±0.37 ^{a,d}
B 组	4.66±0.83 ^{a,c}	3.66±0.33 ^{a,c}	3.27±0.44 ^{a,c}
C 组	3.58±0.17 ^a	2.99±0.15 ^a	2.39±0.35 ^b
D 组	6.22±0.85	5.40±1.36	4.30±0.67

注:与对照组比较,a: $P<0.05$,b: $P<0.01$;与 C 组比较,c: $P<0.05$,d: $P<0.01$ 。

3 讨论

脊髓损伤后,组织细胞出血、水肿、微循环障碍。从分子水平上,可见钙通道改变、兴奋性氨基酸增加及细胞凋亡加快等。组织的这些变化,加重了脊髓损伤。有研究证实, Ca^{2+} 在脊髓损伤中发挥着重要的作用^[7]。SCI 后脊髓血流量进行性下降,脊髓缺血缺氧加重,神经细胞膜上的 Ca^{2+} 通道异常开放, Ca^{2+} 大量内流(包括钙漏、NADH 通道和特异性 Ca^{2+} 通道的开放等),并导致 Ca^{2+} 清除障碍,如 Na^{+} - Ca^{2+} 交换减少、钙泵失活等,使细胞内 Ca^{2+} 超载,激活多种蛋白酶及磷脂酶 A_2 ,通过一系列生化途径导致细胞自溶,微循环障碍。Hall 发现,SCI 后 5 min 内脊髓中 MDA 的含量即有明显增加,30 min 时可增加 70%^[8]。SCI 导致的自由基大量产生及其后续连锁反应,进一步引起细胞骨架破坏、细胞膜酶系统失活,使 SCI 不断加重。

硫酸镁是一种天然的 NMDA 受体拮抗药,可有效减少钙内流,防止因大量的钙涌入细胞内而引发的一系列生化反应。 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^[9];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。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^[10] 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。此外,硫酸镁是 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶的辅酶,因此硫酸镁对 SCI 组织的保护作用还可以通过 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶,调节细胞内外钠钾的平衡,防止细胞水肿,维持细胞膜的完整性和通透性来实现。脊髓损伤后 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶受到抑制,再加上脂质过氧反应对细胞膜的损害,使细胞膜通透性增加,细胞严重水肿。细胞 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶受到抑制和严重水肿必然导致能量代谢障碍,氧化还原不足,产生大量的自由基,大量的自由基又可进一步促进脂质过氧化。硫酸镁可促进线粒体内氧化磷酸化的进行,使电解质钠、钾、钙的转运恢复正常^[9]。

神经节苷脂类物质位于脊椎动物细胞膜外脂层,其与磷酸胆碱脂类似物鞘磷脂是构成神经细胞膜双脂层的最主要脂质成分。GM1 又称单唾液酸四己糖神

经节苷脂,其分子主要由亲脂的神经酰胺和亲水的含唾液酸的寡糖链组成^[11]。神经节苷脂治疗 SCI 的机制包括:①神经节苷脂能有效阻止运动神经元损伤,促进 bcl-2 mRNA 合成,提高 bcl-2,从而减少或抑制脊髓神经元细胞凋亡^[12-13]。研究表明,bcl-2 是诱导基因,可抑制脊髓神经元细胞凋亡^[14]。神经组织损伤后,GM1 通过诱导作用可增加 bcl-2 在神经损伤中的表达,从而提高组织对抗损伤的功能,促进轴索向外生长及损伤的中枢神经系统组织修复。②GM1 可拮抗脊髓损伤后的脂质过氧化反应,减少自由基的产生,降低兴奋性氨基酸毒性,防止神经元坏死并促进脊髓损伤后的功能恢复。③GM1 通过对兴奋性氨基酸毒性作用的拮抗,调控细胞质膜中蛋白质功能,如表皮生长因子受体、离子通道、 Na^{+} / K^{+} -ATP 酶等功能^[15-16],参与突触传递等机制来保护神经组织。④GM1 能减轻脊髓水肿,增加脊髓血流,改善脊髓组织微循环灌注;减轻神经细胞缺血、缺氧,抑制继发性病理损害;可保护细胞膜、维持细胞内外离子平衡、防止细胞内钙离子聚积作用,使损伤部位的脊髓细胞内外离子维持良好的状态;调节神经纤维间突触信息传导,改善神经传导速度,促进神经细胞轴突生长。

本实验结果显示,损伤后第 3 天和第 7 天 BBB 评分及斜板试验 C 组高于 A 和 B 组($P<0.05$),表明硫酸镁联合 GM1 对 SCI 有较好的治疗作用;损伤后第 1 天、第 3 天和第 7 天 MDA 浓度 C 组低于 A 和 B 组($P<0.05$),表明脊髓损伤后硫酸镁和 GM1 联合使用更能减少自由基的产生。而自由基的减少与神经功能恢复呈正相关^[17],直接影响运动功能的恢复。进一步表明,硫酸镁联合 GM1 对运动功能恢复有良好的促进作用,且效果优于硫酸镁及 GM1 单独使用。SCI 后破裂、出血,数分钟后发生水肿,此过程 1~6 h 最明显^[18]; Ca^{2+} 内流大量内流,并且 SCI 后 5~30 min 自由基即有明显升高。硫酸镁的主要作用为减轻脊髓水肿、抑制 Ca^{2+} 内流、清除氧自由基等。由此推测硫酸镁联合 GM1 在 SCI 早期主要通过减轻组织水肿、清除氧自由基和抑制 Ca^{2+} 内流等发挥治疗作用。但其具体机制仍需更深入更严格的研究。

大量临床研究提示,GM1 的大剂量、长疗程的治疗方案是应用 GM1 治疗 SCI 的正确方案^[19]。但是由于 GM1 价格较为昂贵,无疑给 SCI 患者带来沉重的经济负担,因而在一定程度上限制了 GM1 的临床应用。另外,目前临床上已有硫酸镁的使用,主要用于脑缺血的治疗。硫酸镁目前只局限在实验室证明有治疗 SCI 的作用,还未查见广泛用于临床。而本实验结果表明,硫酸镁联合 GM1 使用对大鼠运动功能恢复具有更好的促进作用,其实际应用价值在于硫酸镁价格便宜,其

与 GM1 联合在很大程度上可以缩短 GM1 的治疗疗程,降低治疗费用,从而将会促使 GM1 在临床上得到广泛应用。至于硫酸镁与 GM1 以何种剂量搭配效果最佳及疗程长短尚不清楚,有待进一步的研究。

【参考文献】

- [1] Albert T, Ravaud JF. Tetrafigap group. Rehabilitation of spinal cord injury in France: a nationwide multicentre study of incidence and regional disparities[J]. Spinal Cord, 2005, 43: 357—365.
- [2] 黄洁萍, 翁金森, 王锋, 等. 骨髓间充质干细胞移植对急性脊髓损伤大鼠神经功能恢复及 Nogo-A 表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2009, 24(7): 582—586.
- [3] 王振宇, 孙忠人, 刘督姝. 电针夹脊穴对脊髓损伤大鼠皮层体感诱发电位的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2009, 15(10): 938—941.
- [4] 杨拯, 何秋兰, 唐伟, 等. 维生素 E 联合单唾液酸神经节苷脂对脊髓损伤大鼠运动功能恢复的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2010(6): 536—539.
- [5] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC, et al. MASCIS evaluation of open field locomotor scores; effete of experience and teamwork on reliability multicenter animal spinal cord injury study[J]. J Neurotrauma, 1996, 13(7): 343—359.
- [6] Rivlin AS, Tator CH. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in rat[J]. J Neurosurg, 1977, 47: 577—581.
- [7] Sekhon LH, Fehlings MG. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury[J]. Spine, 2001, 26(supply): S2—S12.
- [8] Hall ED. Inhibition of lipid peroxidation in CNS trauma[J]. Neurotrauma, 1991, 8(1): 31—40.
- [9] Golding EM, Vink R. Inhibition of phospholipase C with neomycin improves metabolic and neurological outcome following traumatic brain injury[J]. Brain Res, 1999, 668(1—2): 46.
- [10] Solaroglu I, Kaptanoglu E, Okutan O, et al. Magnesium sulfate treatment decreases caspase-3 activity after experimental spinal cord injury in rats[J]. Surg Neurol, 2005, 64(S2): S17—S21.
- [11] Ichikawa N, Iwabuchi K, Kurihara H, et al. Binding of laminin-1 to monosialoganglioside GM1 in lipid rafts is crucial for neurite outgrowth[J]. J Cell Sci, 2009, 122(2): 289—299.
- [12] 王丽娜, 刘芳, 张伟玲, 等. 神经节苷脂对大鼠急性脊髓损伤后 bcl-2 mRNA 表达的影响[J]. 中国急救医学, 2006, 26(9): 680—681.
- [13] Gorria M, Huc L, Sergent O, et al. Protective effect of monosialoganglioside GM1 against chemically induced apoptosis through targeting of mitochondrial function and iron transport[J]. Biochem Pharmacol, 2006, 72(10): 1343—1353.
- [14] 张国庆, 燕景锋, 刘世勤. BDNF 基因修饰神经干细胞移植对大鼠脊髓损伤后神经细胞凋亡的影响[J]. 山东医药, 2006, 46(14): 22—23.
- [15] Hakonori SI. Bifunctional role of glycosphingolipids: modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions[J]. J Bio Chem, 1990, 265(31): 18713—18716.
- [16] Geisler FH, Dorsay FC, Coleman WP. GM1 ganglioside in human spinal cord injury[J]. J Neurotrauma, 1992, 9: 407.
- [17] 郑望苟, 潘卫红, 陈家禄. 脊髓损伤后脊髓内丙二醛含量变化及其与神经功能损害的关系[J]. 中国康复医学杂志, 2004, 19(2): 103—104.
- [18] Kinoshita H. Pathology of spinal cord injuries due to fracture-dislocation of the thoracic and lumbar spine[J]. Paraplegia, 1996, 34: 1—7.
- [19] 何秋兰, 谢光科, 杨拯, 等. 单唾液酸神经节苷脂治疗脊髓损伤的研究进展[J]. 实用医学杂志, 2010, 26(2): 176—178.

(收稿日期: 2010-11-29)