

L-苏糖酸镁对慢性脑低灌注脑白质损伤的影响^①

骆珺婕^{1ab,2②}, 蓝浩文^{1ab}, 蒋继军³, 孙立元^{1ab③}

(1. 桂林医学院 a. 广西脑与认知神经科学重点实验室; b. 广西高校生物化学与分子生物学重点实验室, 广西 桂林 541199; 2. 浙江省立同德医院病理科, 浙江 杭州 310012; 3. 桂林优利特医疗电子有限公司, 广西 桂林 541004)

摘要 目的: 探讨 L-苏糖酸镁(L-MgT)对慢性脑低灌注(CCH)脑白质损伤的影响, 为 CCH 的防治提供新思路。方法: 利用 C57BL/6J 小鼠建立双侧颈总动脉狭窄(BCAS)模型, 实验设对照组、模型组、硫酸镁(MgSO₄)组和 L-MgT 组(有低、中、高 3 个浓度组)。3 个月后, 取脑组织进行组织病理学(KB 染色)和免疫组织化学检测, 观察并分析脑白质损伤及相关蛋白因子 GFAP 和 Iba-1 表达情况。结果: 组织病理学 KB 染色显示, 模型组脑白质组织疏松, 纤维排列紊乱, 出现空泡化等损伤, L-MgT 中、高浓度组脑组织损伤减轻, MgSO₄ 组无明显变化; L-MgT 中浓度组脑组织 GFAP 和 Iba-1 表达阳性细胞数低于模型组和 MgSO₄ 组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: L-MgT 减轻 CCH 所致的脑白质损伤, 可能与其抑制胶质细胞活化蛋白因子 GFAP、神经炎症相关因子 Iba-1 的表达有关。

关键词: L-苏糖酸镁; 慢性脑低灌注; 脑白质; 胶质细胞

中图分类号: R742

文献标志码: A

文章编号: 1008-2409(2022)05-0008-05

Effect of magnesium L-threonate on chronic cerebral hypoperfusion-induced cerebral white matter injury in patients^①

LUO Junjie^{1ab,2②}, LAN Haowen^{1ab}, JIANG Jijun³, SUN Liyuan^{1ab③}. (1. a. Guangxi Key Laboratory of Brain & Cognitive Neuroscience; b. Key Laboratory of Biochemistry & Molecular Biology of Guangxi Institutions of Higher Learning, Guilin Medical University, Guilin 541199; 2. Dept. of Pathology, Zhejiang Provincial Tongde Hospital, Hangzhou 310012; 3. URIT Medical Electronic Co., Ltd. Guilin 541004, China)

Abstract Objective: To investigate the effect of magnesium L-threonate (L-MgT) on the white matter injury caused by chronic cerebral hypoperfusion (CCH) in patients and provide new ideas for the prevention and treatment of patients with CCH. Methods: A bilateral common carotid artery stenosis (BCAS) model was established by using C57BL/6J mice and divided into the control group, model group,

① 基金项目: 广西研究生教育创新计划项目(YCSW2021243); 广西大学生创新创业训练计划项目(202110601032); 广西脑与认知神经科学重点实验室自主课题(GKLBCN-20200104)。

② 作者简介: 骆珺婕(1994—), 女, 浙江杭州人, 2022 年桂林医学院病理学与病理生理学硕士毕业, 现任浙江省立同德医院病理医师。研究方向: 神经病理学。

③ 通信作者: 孙立元, E-mail: sunly@glmc.edu.com。

magnesium sulfate (MgSO_4) group and L-MgT group (of low, medium and high concentration gradients). After three months, paraffin sections of brain tissues were made, and histopathology (KB staining) and immunohistochemistry were used to observe and analyze white matter injury and the expression of related protein factors GFAP and Iba-1. Results: Histopathological KB staining showed that white matter tissues in the model group was lax with disorganized fiber arrangement and vacuolation, while the brain tissue injury in L-MgT medium and high concentration groups was alleviated and MgSO_4 group showed no significant change. The number of GFAP and Iba-1 positive cells in the L-MgT medium concentration group was lower than that in the model and MgSO_4 groups, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Conclusion: The attenuation of CCH-induced white matter injury by L-MgT may probably related to the inhibition of expressions of glial cell activation protein GFAP and the neuroinflammation-related factor Iba-1.

Keywords: magnesium L-threonate (L-MgT); chronic cerebral hypoperfusion (CCH); white matter; glial cells

慢性脑低灌注 (chronic cerebral hypoperfusion, CCH), 又称为慢性脑缺血, 指整体脑组织血液供应持续低于生理需求, 出现脑组织区域性病理改变的一种状态^[1]。研究表明, CCH 可导致能量代谢紊乱、血管内皮细胞损伤、血脑屏障破坏、胶质细胞激活、神经元丢失和脑白质病变等病理表现。CCH 造成大脑持续缺血缺氧, 引发神经炎症, 最终导致神经退行性病变以及血管性认知功能障碍 (vascular cognitive impairment, VCI)^[2-4]。目前, 在 CCH 的临床治疗中尚未发现效果明显的预防或治疗药物, 结合我国人口预期寿命延长以及老龄化社会现状, 亟需有效药物实施早期干预, 以减轻患者家庭及社会负担。

Mg^{2+} 是细胞内的必需阳离子, 不仅参与基本生理活动, 还在免疫系统和神经系统中发挥重要功能, Mg^{2+} 具有抗炎、抗氧化和清除自由基等作用^[5-6]。 Mg^{2+} 的神经保护作用研究目前主要集中于急性脑缺血疾病和神经退行性疾病, 而硫酸镁 (MgSO_4) 作为常用研究药物, 发现其治疗效果欠佳^[7-8], 是由于其对血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 的通透能力较低^[9]。故笔者探讨有更高通透 BBB 能力的镁化合物 L-苏糖酸镁 (L-MgT) 对 CCH 所致脑白质损伤的保护作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

C57BL/6J 雄性小鼠 30 只 (SPF 级), 10~12 周

龄, 体重 24~28 g, 购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 许可证书编号: SCXK(湘)2019-0004。实验前, 动物适应性饲养 7 d。实验室饲养条件: 光照 12 h 与黑暗 12 h 循环, 相对湿度 55%~65%, 室内温度 22~26 °C, 小鼠自由饮食。本实验经桂林医学院实验动物伦理委员会批准。

1.2 实验材料及仪器设备

内径 0.18 mm 显微弹簧线圈 (北京西浓科技); L-MgT (美国 Magceutices 公司); 硫酸镁 (石家庄市藁城区四海药业); Luxol Fast Blue (LFB) 髓鞘染色液 (Solarbio 产品); GFAP、Iba-1 抗体 (Millipore 产品); 0.9% NaCl 溶液 (浙江都邦药业); 二甲苯、过氧化氢 (H_2O_2)、多聚甲醛 (西陇科学); 无水乙醇 (成都市科隆化学品); 新生牛血清 (浙江天杭生物科技公司); DAB 显色试剂 (北京中杉金桥公司); 脱水机 (派斯杰精美机械科技); 包埋机、冷冻台 (湖北康强医疗器械公司); 切片机 (Leica); 显微镜 (Olympus)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型建立及处理 小鼠麻醉后置于体视显微镜下, 分离颈总动脉和迷走神经。先在一侧颈总动脉的近、远端各放置 1 条 4-0 丝线, 将弹簧线圈缠绕在颈总动脉上; 用 0.9% NaCl 溶液浸湿纱布覆盖颈部切口 30 min, 再用相同的方法将弹簧线圈缠绕在另一侧颈总动脉上, 缝合消毒。

30 只小鼠随机分为 6 组, 每组 5 只。设对照组、模型组、 MgSO_4 组、低浓度 L-MgT 组、中浓度 L-MgT 组和高

浓度 L-MgT 组。对照组和模型组不给予药物干预,每天自由饮用蒸馏水,持续 3 个月。MgSO₄组和 L-MgT 组将日常饮用蒸馏水换成不同的含镁溶液,MgSO₄组术后每天饮用配制好的 MgSO₄溶液(1.2 mmol/L),低、中、高浓度 L-MgT 组术后每天饮用,配制好的 L-MgT 溶液分别为 0.8 mmol/L、1.2 mmol/L、1.6 mmol/L,持续 3 个月。

1.3.2 KB 染色 KB 染色用于观察病理损伤情况下髓鞘是否完整、坏死及修复情况,例如神经纤维受损时,髓鞘会出现变形、断裂或脱鞘消失等病理改变,该染色对神经组织的病理诊断有一定意义。LFB 染液在乙醇中与髓鞘磷脂结合,显示出髓鞘结构^[10]。小鼠经心脏灌注 0.9% NaCl 溶液和 4% 多聚甲醛溶液后,取脑组织制作 4 μm 石蜡切片,切片脱蜡至 95%乙醇后浸入 LFB 染液过夜。次日用 95%乙醇洗去多余染液,蒸馏水冲洗后,用 Luxol 分化液和 70%乙醇依次分色,可重复操作直到灰质和白质轮廓分明。焦油紫染液复染后水洗,95%乙醇快速抽拉数次,二甲苯透明后封片。

1.3.3 免疫组织化学 石蜡切片脱蜡水化,3% H₂O₂ 孵育 10 min。PBS 冲洗后甩干,10% BSA 封闭 30 min;去封闭液,滴加一抗(GFAP 稀释比例为 1 : 500、Iba-1 稀释比例为 1 : 500),4 °C 孵育过夜;次日滴加对应二抗,孵育 60 min;DAB 显色后脱水封片。每张切片随机选取 5 个高倍视野,分析细胞 GFAP、Iba-1 的表达情况。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 25 统计软件进行数据分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 脑白质损伤

与对照组小鼠相比,模型组小鼠白质区域组织疏松,神经纤维结构排列紊乱,伴随有空泡化等损伤情况。与模型组比较,L-MgT 中、高浓度组髓鞘紊乱结构有明显改善,脑白质损伤减轻,MgSO₄组未见明显改变,见图 1。

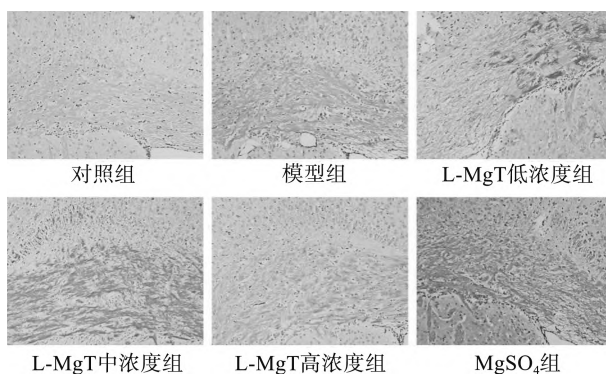


图 1 显微镜下小鼠脑白质组织病理形态(KB 染色,200×)

2.2 神经炎症反应

GFAP 是星形胶质细胞活化的特异性标志物,高倍镜视野下观察,对照组 GFAP 阳性细胞数少于模型组,各 L-MgT 浓度组少于模型组,L-MgT 中浓度组少于 MgSO₄组($P < 0.05$),见图 2。

Iba-1 是小胶质细胞活化的特异性标志物,高倍镜视野下观察,对照组 Iba-1 阳性细胞数少于模型组。L-MgT 中浓度组少于模型组和 MgSO₄组($P < 0.05$),见图 3。

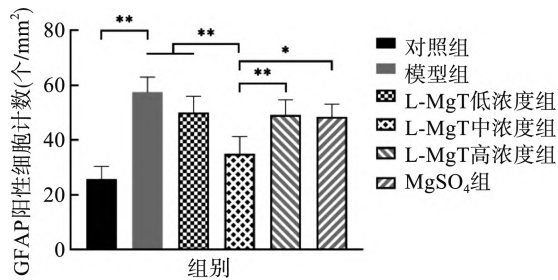
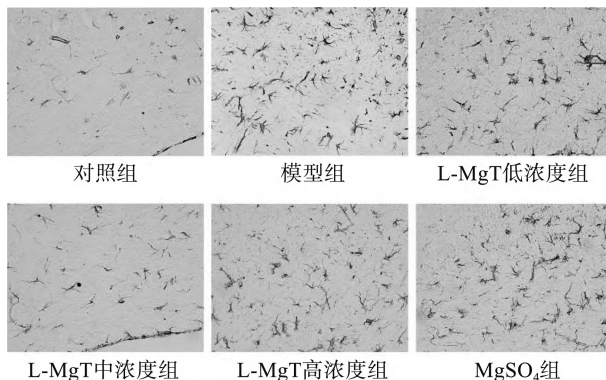


图 2 免疫组织化学检测 GFAP 的表达(400×,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$)

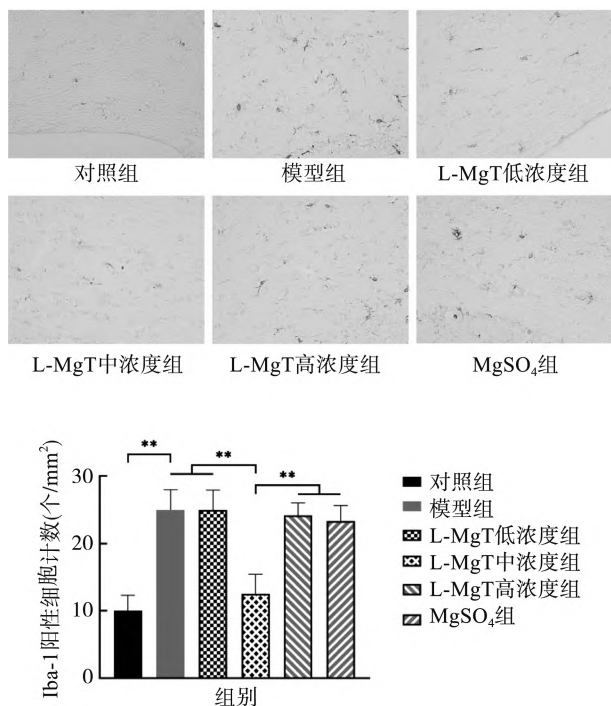


图 3 免疫组织化学检测 Iba-1 的表达 (400×, ** $P < 0.01$)

3 讨论

本研究利用小鼠双侧颈总动脉闭塞模型模拟人脑 CCH 病理状态,持续补镁 3 个月后观察脑白质损伤情况。比较 CCH 的各类动物模型发现,大鼠双侧颈总动脉闭塞模型在术后短期内会发生脑血流量骤降,并伴随大鼠视神经损伤,长期监测大鼠脑血流量后发现,60 d 后脑血流量恢复到闭塞前水平。因此,该模型无法准确模拟人类 CCH 的持续病理状态。而 BCAS 模型采用 C57BL/6J 小鼠,该品系小鼠血供代偿机制受限,可以保持低灌注状态,是目前最适用于研究 CCH 的模型之一^[11]。脑白质是缺血性损伤的敏感部位,BCAS 术后 7 d 脑白质区开始出现小胶质细胞激活,14 d 开始出现星形胶质细胞激活和组织疏松^[12-13]。笔者的实验结果也表明这两种胶质细胞出现激活。

神经炎性反应是一种由中枢神经系统的神经胶质细胞所介导的免疫级联反应,在多种神经系统疾病中起关键作用,也是 CCH 的重要损伤机制之一^[14]。CCH 缺血缺氧诱发免疫炎症级联反应,其中小胶质细胞作为免疫系统的主要效应细胞发挥关键作用。小胶质细胞在病理刺激下可分化为促炎型 (M1 型) 和抗炎型 (M2 型)。M1 型主要分泌促炎因

子,加重组织损伤,M2 型则相反,为保护性表型,分泌抗炎因子,修复组织损伤^[15]。小胶质细胞在 CCH 早期时激活,主要表现为 M1 型,增加促炎因子释放,产生大量炎症介质,同时与星形胶质细胞相互激活,加重神经炎症^[14]。在 CCH 的基础研究中发现,抑制神经胶质细胞或小胶质细胞的激活可减轻脑白质损伤,并改善其功能^[16]。Mg²⁺ 能抑制脑组织损伤区域炎症因子的生成及表达,减轻脑缺血损伤后继发炎症反应^[17]。研究结果显示,低镁导致炎症因子表达升高,最终导致神经元变性,L-MgT 能够抑制神经炎症,减少炎症因子产生^[18]。笔者的实验结果显示 L-MgT 对于 CCH 时胶质细胞活化产生的炎性反应具有一定的抑制作用,但仅体现在胶质细胞的表达水平,未能深入到分子水平,具体的作用机制或相应的信号通路还有待进一步研究。

研究发现,小鼠行腹腔注射 MgSO₄,血清 Mg²⁺ 浓度增加 8~10 倍,但脑脊液 (cerebrospinal fluid, CSF) 中 Mg²⁺ 浓度没有明显升高^[9]。口服 L-MgT 可使大鼠脑脊液 Mg²⁺ 浓度升高,而口服其他镁化合物后却没有明显升高,说明 L-MgT 拥有更高的 BBB 通透力^[19-20]。笔者所在课题组前期的研究表明,小鼠持续饮含 MgSO₄ 的水 28 d 后,CSF 中 Mg²⁺ 含量无明显变化,而改用 L-MgT,CSF 中 Mg²⁺ 含量增加 21.6%^[21]。本研究分析这两种不同的镁化合物,发现 MgSO₄ 在 CCH 导致的脑白质损伤中没有表现出明显的改善效果,而 L-MgT 显著减轻脑白质损伤。笔者认为 L-MgT 的 BBB 通透能力更高,可以提高 CSF 中 Mg²⁺ 浓度,达到抑制神经胶质细胞活化所产生神经炎症反应的效果,从而起保护脑白质作用。

脑长期缺血、缺氧引起的神经炎性反应,不仅造成缺血性脑白质损伤,还会导致神经元丢失,继而影响学习记忆能力,产生焦虑、抑郁等情绪,或引起认知功能障碍^[14]。笔者的研究表明,L-MgT 对 CCH 导致的脑白质损伤具有一定的保护作用,值得深入研究。

参考文献:

- [1] 王薇薇,盛琳琳,宋爽.不同焦虑程度慢性脑血流灌注不足患者的全脑血流量和脑白质损害差异分析[J].当代

- 医学,2022,28(9):25-27.
- [2] 陆俊玲,薛晓,段瑞,等. Diminazene 对慢性脑低灌注大鼠脑内炎症反应影响及机制研究[J]. 临床神经病学杂志, 2020,33(4):300-304.
- [3] DUNCOMBE J, KITAMURA A, HASE Y, et al. Chronic cerebral hypoperfusion; a key mechanism leading to vascular cognitive impairment and dementia. Closing the translational gap between rodent models and human vascular cognitive impairment and dementia[J]. Clin Sci (Lond), 2017, 131(19):2451-2468.
- [4] NIU H M, MA D L, WANG M Y, et al. Epimedium flavonoids protect neurons and synapses in the brain via activating NRG1/ErbB4 and BDNF/Fyn signaling pathways in a chronic cerebral hypoperfusion rat model [J]. Brain Res Bull, 2020, 162:132-140.
- [5] MATHEW A A, PANONNUMMAL R. 'Magnesium'-the master cation-as a drug-possibilities and evidences[J]. Bio-metals, 2021, 34(5):955-986.
- [6] KIRKLAND A E, SARLO G L, HOLTON K F. The role of magnesium in neurological disorders[J]. Nutrients, 2018, 10(6):730.
- [7] ZHU H D, MARTIN R, MELONI B, et al. Magnesium sulfate fails to reduce infarct volume following transient focal cerebral ischemia in rats[J]. Neurosci Res, 2004, 49(3):347-353.
- [8] SAVER J L, STARKMAN S, ECKSTEIN M, et al. Prehospital use of magnesium sulfate as neuroprotection in acute stroke[J]. N Engl J Med, 2015, 372(6):528-536.
- [9] SUN L, KOSUGI Y, KAWAKAMI E, et al. Magnesium concentration in the cerebrospinal fluid of mice and its response to changes in serum magnesium concentration [J]. Magnes Res, 2009, 22(4):266-272.
- [10] 张丽,王明洋,牛红妹,等. 淫羊藿黄酮对慢性脑缺血低灌注致大鼠脑白质病变的影响[J]. 首都医科大学学报, 2021, 42(5):768-775.
- [11] 郭文娟,张荟慧. 啮齿类慢性脑低灌注动物模型的研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2022, 20(6):1032-1035.
- [12] WASHIDA K, HATTORI Y, IHARA M. Animal models of chronic cerebral hypoperfusion: from mouse to primate[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(24):6176.
- [13] SHIBATA M, OHTANI R, IHARA M, et al. White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion [J]. Stroke, 2004, 35(11):2598-2603.
- [14] TIAN Z, JI X, LIU J. Neuroinflammation in vascular cognitive impairment and dementia: current evidence, advances, and prospects[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(11):6224.
- [15] 杨程显,包新杰,王任直. 小胶质细胞极化在脑缺血中的研究进展[J]. 中国医药导报, 2019, 16(30):34-37.
- [16] YU M, ZHENG X, CHENG F, et al. Metformin, rapamycin, or nicotinamide mononucleotide pretreatment attenuate cognitive impairment after cerebral hypoperfusion by inhibiting microglial phagocytosis[J]. Front Neurol, 2022, 13:903565.
- [17] SHADMAN J, SADEGHIAN N, MORADI A, et al. Magnesium sulfate protects blood-brain barrier integrity and reduces brain edema after acute ischemic stroke in rats[J]. Metab Brain Dis, 2019, 34(4):1221-1229.
- [18] WANG P, YU X, GUAN P P, et al. Magnesium ion influx reduces neuroinflammation in A β precursor protein/Presenilin 1 transgenic mice by suppressing the expression of interleukin-1 β [J]. Cell Mol Immunol, 2017, 14(5):451-464.
- [19] SLUTSKY I, ABUMARIA N, WU L J, et al. Enhancement of learning and memory by elevating brain magnesium[J]. Neuron, 2010, 65(2):165-177.
- [20] LI W, YU J, LIU Y, et al. Elevation of brain magnesium prevents synaptic loss and reverses cognitive deficits in Alzheimer's disease mouse model[J]. Mol Brain, 2014, 7:65.
- [21] SHEN Y, DAI L, TIAN H, et al. Treatment of magnesium-l-threonate elevates the magnesium level in the cerebrospinal fluid and attenuates motor deficits and dopamine neuron loss in a mouse model of Parkinson's disease[J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2019, 15:3143-3153.

[收稿日期:2022-07-04]

[责任编辑:向秋 英文编辑:阳雨君]