

硫酸镁对大鼠脑弥漫性轴索损伤海马区 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达影响的研究

邵雪非 陶进 许安定

皖南医学院弋矶山医院神经外科, 安徽 芜湖 241001

摘要:目的 研究脑弥漫性轴索损伤后神经细胞迟发性死亡的机制,探讨镁离子对大鼠脑弥漫性轴索损伤后神经元的保护作用。方法 采用 Marmarou 方法制备大鼠重度脑弥漫性轴索损伤模型,分为创伤组($n=25$)、生理盐水组($n=40$)和硫酸镁组($n=40$)。硫酸镁组伤后半小时内给予 25% 硫酸镁($750 \mu\text{mol/kg}$),生理盐水组在相同时间给予等量的生理盐水腹腔注射,于伤后 6 小时、24 小时、3 天、5 天及 7 天 5 个时相点处死。采用 HE 染色、免疫组织化学技术动态观察大鼠海马区的组织病理改变,Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达情况,以及使用硫酸镁干预后对上述表达的影响。结果 ①Bcl-2 蛋白的表达:假手术组大鼠海马区仅见极少量 Bcl-2 阳性细胞,着色淡。在伤后 6 小时即有大量的 Bcl-2 阳性细胞,随时间渐增,24 小时达到高峰,3~7 天逐渐减少。②Bax 蛋白的表达:在 DAI 后大鼠海马区有大量 Bax 阳性细胞,在伤后 6 小时就有所增加,24 小时显著增加,3 天达到高峰。Bcl-2/Bax 值在损伤后随时间逐渐上升。③硫酸镁组中,海马区的 Bax 表达与对照组相比有所减少,而 Bcl-2 相应增加,Bcl-2/Bax 比值也是上调的,均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 大鼠脑弥漫性轴索损伤后,海马区神经元存在有迟发性细胞死亡即凋亡现象。Bax 与 Bcl-2 参与细胞凋亡过程。硫酸镁可通过抑制 Bax 蛋白,上调 Bcl-2 蛋白,减少神经细胞凋亡,对促进神经细胞修复和功能重塑有益。

关键词:大鼠脑弥漫性轴索损伤 凋亡; Bcl-2; Bax 硫酸镁

The effect of magnesium sulfate on expression of bax and bcl-2 proteins after brain diffuse axonal injury in rats

SHAO Xue-Fei, TAO Jin, XU An-ding. Department of Neurosurgery, Wannan Medical College, Wuhu 241001, China

Abstract: Objective The purpose is to clarify the protection of magnesium ions to rat neurone after diffuse axonal injury (DAI), and explore the mechanism of delayed neurone death after DAI on the level of molecular biology. **Methods** The rat model of severe DAI was prepared according to the method described by Marmarou. All survivors were randomized into 3 groups: control group ($n=25$), normal saline (NS) group ($n=40$), magnesium sulfate (MgSO_4) group ($n=40$). Each group were divided into 5 subgroups according to the time of injury at 6 h, 24 h, 72 h, 120 h and 168 h respectively. The rat in MgSO_4 group and NS group when after injury in 30 minutes were treated with MgSO_4 ($750 \mu\text{mol/kg}$) and NS by intraperitoneal respectively, then were killed by decapitation at above mentioned time. Pathologic changes in hippocampus and the expression of bcl-2 and bax proteins after DAI were determined by HE and immunohistochemistry staining. Analyze the effects after using MgSO_4 . **Results** 1. The expression of bcl-2: bcl-2 nearly expression in hippocampus of non-surgery group, but had higher expression in hippocampus after 6 hours of DAI, reached maximum 24 hours after injury, and declined obviously on days 3-7 after injury. 2. The expression of Bax: Bax had a little expression in non-surgery group, and had higher expression in hippocampus after 24 hours of DAI, reached maximum 3 days after, and restore normal level 7 days after. 3. The ratio of bcl-2/bax was raised gradually after injury. 4. Compared with NS groups, the expression of Bax in hippocampus were lower in MgSO_4 groups, whereas the bcl-2 level and the ratio of bcl-2/bax were raised. There was highly significant difference in the level of bcl-2, Bax, bcl-2/bax in MgSO_4 groups and NS groups ($P < 0.05$). **Conclusions** After DAI in rats the phenomena of delayed cell death existed in the neurons in hippocampus, neuronal apoptosis play an important role in the course of delayed cell death. The rising expressions of bax and bcl-2 proteins may participate in the regulation of the course of apoptosis after DAI. The expressions of bax and

收稿日期:2011-08-22;修回日期:2011-10-08

作者简介:邵雪非(1975-),男,硕士,主治医师,主要从事颅脑损伤基础和临床研究。

bcl-2 proteins related with the time after DAI. 4. The up-regulation of bcl-2 and down-regulation of bax expression maybe contribute to neuro-protective effect of magnesium sulfate. Magnesium sulfate may have a potential as therapeutic agent for the treatment of DAI. Magnesium sulfate may suppress apoptosis of neural cells and can stimulate cell rehabilitation.

Key words: diffuse axonal injury; apoptosis; bcl-2 bax; Magnesium sulfate rat

脑弥漫性轴索损伤(Diffuse axonal injury DAI)是创伤性颅脑损伤的一种类型,具有很高的致残率和致死率,是临床治疗的主要难点之一。原发性损伤的程度在瞬间已决定,难以逆转,继发性脑损伤的发生与发展不仅增加DAI早期的死亡率而且增加晚期的神经功能损害,即决定了绝大多数患者最后转归。但其发生机制尚未明确。

本研究利用Marmarou^[1]重型脑弥漫性轴索损伤模型,以凋亡相关基因(Bcl-2和Bax)的表达为切入点,在损伤后的大鼠海马区对上述因子不同时相的表达差异进行研究。同时使用硫酸镁(Mgso4)为干预手段,观察硫酸镁对Bcl-2和Bax表达的影响。现报道如下:

1 材料与方法

将雄性健康Sprague-Dawley大鼠226只,体重350~400g。分为假手术组(n=5,只作手术准备不打击致伤),大鼠致伤后存活者再分为创伤组(n=25,只作打击)、生理盐水组(n=40)和硫酸镁组(n=40)。每组又分别分成伤后6小时、24小时、3天、5天及7天5个时相组,创伤组每时相n=5,生理盐水组和硫酸镁组n=8。采用1994年Marmarou创建的方法制造大鼠重度脑弥漫性轴索损伤模型。以乙醚吸入方式麻醉动物;麻醉后大鼠,头皮剪毛,2%碘酊和75%酒精消毒术区后,沿大鼠头部正中矢状位切开头皮,长约15mm,剥离骨膜,显露冠状缝及人字缝,用气流使其保持干燥,将一不锈钢片构成的直径10mm,厚度3mm用牙胶固定在大鼠冠状缝与人字缝之间;将大鼠头部固定于打击架下,俯卧位固定于海绵床垫(12×12×43cm)上,其下为木制底座,高2.5cm;当麻醉停止后动物开始出现夹足反应时,将重450g直径为18mm的铜柱沿垂直打击管自2m高度自由落下打击大鼠头部的钢片处;大鼠头皮伤口常规消毒缝合。硫酸镁治疗组,在伤后半小时内给予腹腔注射25%硫酸镁(750μmol/kg),治疗对照组在相同

时间内给予相同剂量的生理盐水腹腔注射。于上述伤后各时点,对动物进行乙醚麻醉、开胸,用10%甲醛经心灌注固定10分钟后,断头取出脑组织,快速、仔细分离大鼠海马,用10%甲醛分别固定。选取脑组织石蜡切片。按Bax及Bcl-2免疫组织化学染色试剂盒(Boster生物工程公司提供)说明书进行操作。

2 统计学处理

Bcl-2和Bax蛋白主要位于核膜上,在内质网、线粒体外膜上也有分布,因此表达阳性的细胞主要在胞质上着色,胞核仅见少量染色,呈弥漫性或散在分布的棕黄色颗粒。凋亡细胞计数方法为400倍光镜下,在海马区各随机选取5个视野,计数每个视野范围内的阳性细胞数,以平均值代表各区阳性细胞数。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,多均数间两两比较用 q 检验。

3 结果

3.1 大鼠DAI后脑组织大体病理观察

早期DAI大鼠脑组织大体可见表面肿胀、血管模糊、组织颜色不均匀、光泽暗淡、有点状或斑片状出血、部分脑组织局部呈现污秽色或紫红色,大多有蛛网膜下腔出血,无明显局灶伤。脑组织水肿于伤后逐渐加重,在3~5天达到高峰。上述表现随着时间的延长逐渐改善。

3.2 大鼠DAI后海马组织Bcl-2和Bax蛋白表达检测结果

3.2.1 大鼠DAI后海马组织Bcl-2蛋白表达检测结果 在假手术组大鼠海马区仅见极少量Bcl-2阳性细胞,约每高倍镜(400倍)下只有0~1个,着色淡。在伤后6小时海马即有大量的阳性细胞。24小时,阳性细胞数量达到高峰,3天Bcl-2阳性细胞数减少,伤后7天进一步减少。在硫酸镁组中阳性细胞表达相对增多,与各组之间比较有统计学差异($P < 0.05$)。见表1,图1-6

表1 大鼠 DAI 后不同时间海马 Bcl-2 表达的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	6 h	24 h	3 d	5 d	7 d
假手术组	5	0	1	0	1	1
创伤组	5	21.28 ± 1.92	37.56 ± 0.86	35.24 ± 2.00	34.32 ± 1.85	24.08 ± 1.81
生理盐水组	8	21.4 ± 1.82	37.97 ± 1.67	35.66 ± 2.75	35.45 ± 1.99	24.40 ± 1.72
硫酸镁组	8	24.45 ± 2.89 [*]	40.82 ± 2.33 [*]	39.84 ± 2.99 [*]	38.57 ± 2.35 [*]	29.20 ± 3.86 [*]

* 表示与各组比较均有统计学差异 ($P < 0.05$)

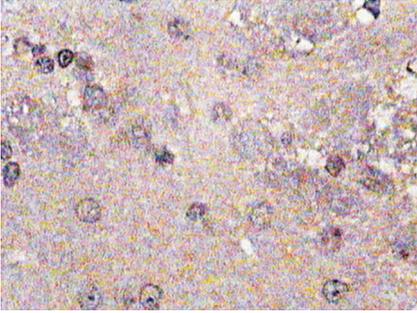


图1 NS组大鼠脑 DAI 后 6 小时

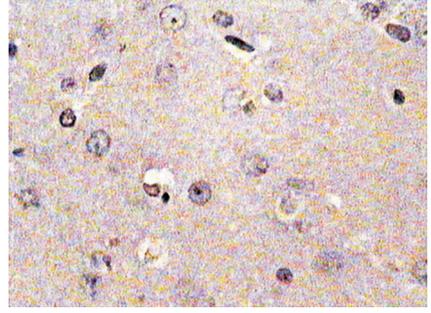


图2 Mgso4 组大鼠脑 DAI 后 6 小时

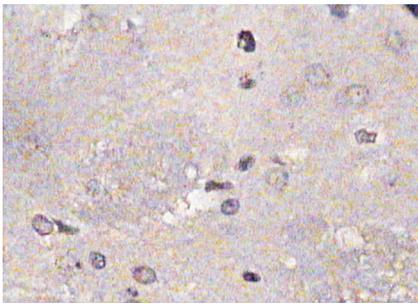


图3 NS组大鼠脑 DAI 后 3 天

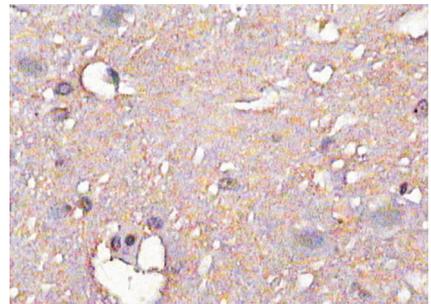


图4 Mgso4 组大鼠脑 DAI 后 3 天

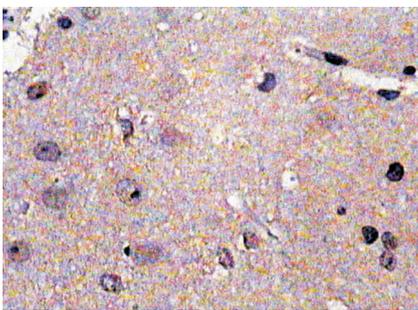


图5 NS组大鼠脑 DAI 后 7 天

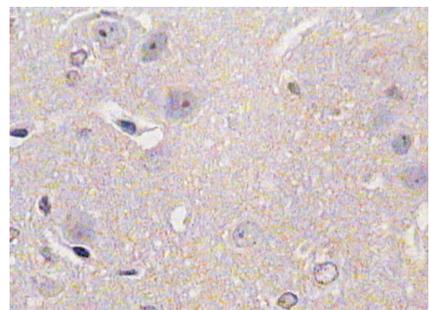


图6 Mgso4 组大鼠脑 DAI 后 7 天

海马 Bcl-2 染色结果

3.2.2 大鼠 DAI 后海马组织 Bax 蛋白表达检测结果 在假手术组大鼠海马区可见少量 Bax 阳性细胞,着色淡。而在伤后大鼠海马区有大量阳性细胞。Bax 阳性细胞 6 小时就有所增加,24 小时显著增加,于 3 天达高峰,7 天恢复到正常组水平。统

计比较显示创伤组与假手术组之间均有统计学差异 ($P < 0.01$)。硫酸镁组与创伤组,生理盐水组比较 Bax 阳性细胞数是减少的,有统计学差异 ($P < 0.05$)。见表 2,图 7-12

表2 大鼠 DAI 后不同时间海马 Bax 表达的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	6 h	24 h	3 d	5 d	7 d
假手术组	5	0	1	0	1	1
创伤组	5	20.12 ± 1.10	25.56 ± 2.81	28.40 ± 1.88	24.04 ± 1.51	21.44 ± 1.73
生理盐水组	8	20.52 ± 1.59	25.98 ± 3.74	27.75 ± 1.30	24.42 ± 3.69	21.18 ± 4.01
硫酸镁组	8	18.12 ± 1.57 [*]	21.38 ± 2.55 [*]	25.62 ± 2.25 [*]	19.60 ± 0.65 [*]	17.51 ± 2.21 [*]

* 表示与各组比较均有统计学差异 ($P < 0.05$)

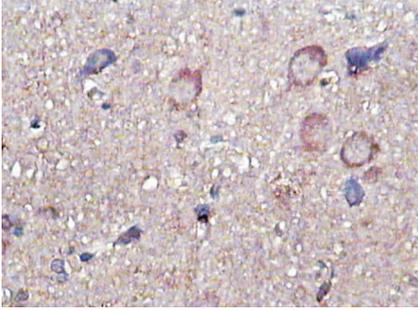


图7 NS组大鼠脑DAI后6小时

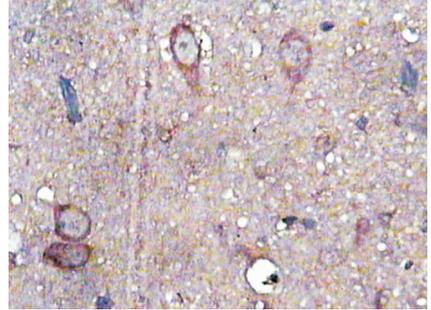


图8 Mgso4组大鼠脑DAI后6小时

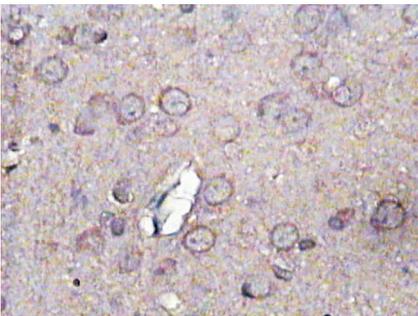


图9 NS组大鼠脑DAI后3天

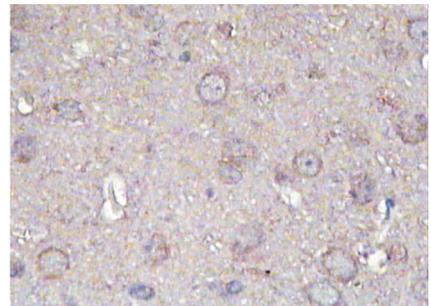


图10 Mgso4组大鼠脑DAI后3天

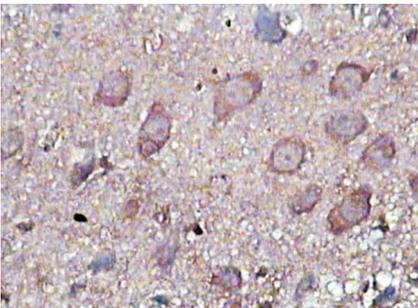


图11 NS组大鼠脑DAI后7天

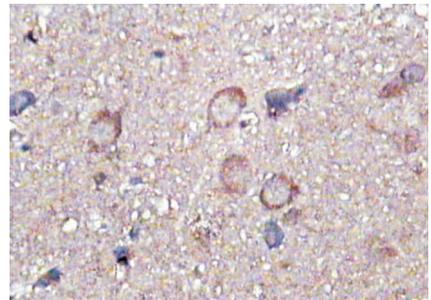


图12 Mgso4组大鼠脑DAI后7天

海马 Bax 染色结果

3.2.3 大鼠 DAI 后脑海马组织 Bcl-2/Bax 比值改变 Bcl-2/Bax 的比值,在大鼠 DAI 后比值是上升的,创伤组与生理盐水组相比无统计学意义,而硫

酸镁组与上述两组相比均有统计学差异 ($P < 0.05$)。假手术组比值为零较多,不列入下表。见表 3

表3 大鼠 DAI 后不同时间海马 Bcl-2/Bax 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	6 h	24 h	3 d	5 d	7 d
创伤组	5	0.82 ± 0.10	1.17 ± 0.11	0.94 ± 0.07	1.08 ± 0.10	0.89 ± 0.14
生理盐水组	8	0.80 ± 0.10	1.17 ± 0.16	0.98 ± 0.90	1.12 ± 0.24	0.95 ± 0.27
硫酸镁组	8	1.08 ± 0.21 *	1.55 ± 0.16 *	1.22 ± 0.20 *	1.52 ± 0.12 *	1.67 ± 0.1927 *

* 表示与各组比较均有统计学差异 ($P < 0.05$)

4 讨论

全世界颅脑损伤 (Traumatic brain injury, TBI) 发生率约 10 亿人/年。当前人群中约有 11.5 亿人因此丧失劳动能力, 40% ~ 50% 存在认知功能障碍。其中 DAI 是较为严重类型^[2]。众所周知, TBI 后神经细胞损伤可分为两种形式, 一种称为原发性神经细胞损伤, 不可逆转; 另一种称为迟发性或继发性神经细胞损伤是一种复杂的病理反应, 主要发生在损伤区的周围^[3]。继发性脑损伤不仅增加 TBI 早期的死亡率且晚期可造成神经功能的缺损和后遗症^[4]。

大量研究发现, DAI 将引发一系列超微结构和生化的改变是一复杂迟发性病理反应, 正是这些在细胞分子水平的继发性改变, 构成了伤后持久的神经功能障碍的病理生理基础^[5]。虽然对继发性脑损伤的分子机制仍未完全阐明, 但近年研究认为神经细胞凋亡是造成继发性脑损害的主要原因^[6]。

4.1 脑弥漫性轴索损伤后 Bcl-2 蛋白表达与凋亡

大量研究认为 Bcl-2 蛋白抗凋亡作用的机制是: ① Bcl-2 蛋白是通过抑制氧自由基的产生或起一种抗氧化剂的作用, 而产生抗凋亡作用。② 通过阻断 Ca^{2+} 从内质网释放而实现 ③ 通过影响线粒体释放细胞色素 C 的过程来调节凋亡。

Clark 等的研究认为在的大鼠 TBI 脑组织中有 Bcl-2 蛋白总量的增加, 许多缺乏 Bcl-2 表达的神经元具有凋亡的特征表现, 而那些表达 Bcl-2 的神经元则不显示凋亡细胞的特征。Raghupathi 等^[7] 在 TBI 早期也观察到 Bcl-2 的表达。应用过表达的 Bcl-2 蛋白的转基因小鼠进行研究发现, TBI 后过表达的 Bcl-2 的动物在皮层损伤程度及部分神经功能缺失上都明显减少。由于 Bcl-2 蛋白具有特殊的神经保护作用, 在本组实验中也观察到 Bcl-2 表达在脑损伤后即有所增加。表明 Bcl-2 参与了 DAI 后神经细胞的凋亡过程。同时说明, 这是机体在 DAI 后通过 Bcl-2 蛋白表达的增加来抑制病理性细胞凋亡的发生, 保护神经细胞。

4.2 脑弥漫性轴索损伤后 Bax 蛋白表达与凋亡

本研究显示: Bax 蛋白阳性细胞主要在胞质上着色, 大鼠 DAI 后 6 小时 Bax 蛋白阳性细胞就有所增加, 24 小时显著增加, 于 72 小时达高峰, 7 天恢

复到对照组水平。

Odell 等研究发现, 大脑皮层 TBI 后 24 小时 bax mRNA 表达增加。Lu 等在对大鼠闭合性脑创伤后中枢神经系统神经元凋亡的时程进行研究时发现, 在伤后 4 小时 Bax 蛋白表达增高。

结合本实验结果认为 Bax 同样也参与了脑弥漫性轴索损伤后神经细胞的凋亡过程。也可认为是脑创伤诱导了 Bax 蛋白表达的增加。其作用可能是通过改变线粒体膜的通透性, 导致细胞色素 C 的释放, 激活 caspases-9, 促使细胞死亡^[8]。Bax 的高表达是脑创伤后细胞凋亡增加的主要原因。可见 Bax 在 DAI 神经细胞凋亡中扮演着重要的角色。Teles 等^[9] 认为细胞中 Bcl-2/Bax 蛋白表达之比决定着细胞的命运。Bcl-2 与 Bax 的比例调节了凋亡的发生。本实验中发现, DAI 后海马组织中 Bax 与 Bcl-2 之间的平衡发生了显著的变化, 从而启动了神经细胞的凋亡程序。可见, 减少 Bcl-2 蛋白表达增加 Bax 的表达在 TBI 继发性损伤中有着重要意义^[10]。

4.3 硫酸镁对脑弥漫性轴索损伤的保护作用及相关机制

近年来大量研究表明镁剂在脑缺血性损伤中可增加脑缺血的血流量, 抑制钙内流, 非竞争的阻断 N-甲基-D-天冬氨酸受体 (N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDA 受体), 有效的恢复细胞能量代谢^[11]。

Muroi^[12] 将镁剂用于治疗血管性水肿, 已取得了良好效果。国内张赛等^[13] 的研究表明大剂量镁剂的应用可以提高颅内动脉破裂所致蛛网膜下腔出血患者的治愈率。

虽然至今还没有一种药物通过临床对照研究被证实对 TBI 具有确切的疗效。但通过动物实验和临床研究发现脑组织中镁含量的变化直接影响神经细胞生理、生化状态并参与调节多种神经递质的释放, 对继发性脑损害的发生、发展过程起着较重要作用。Heath 等^[14] 首先检测发现脑损伤动物神经细胞内 Mg^{2+} 含量明显下降, 受伤脑区细胞内 Mg^{2+} 含量下降显著, 与脑损伤程度相关。张赛等研究表明外源性镁离子能降低重型颅脑创伤患者血清丙二醛含量改善其预后。

Mg^{2+} 在 TBI 中的治疗作用得到肯定, Heath

等^[15]研究比较了 $MgCl_2$ 与 $MgSO_4$ 之间无显著差异,表明治疗作用与阴离子无关。但对于最佳给药时间和剂量仍有争议。Heath 认为最佳给药时间为伤后 24 小时内,剂量是 $750 \mu mol/kg$ 。2007 年 Temkin^[16]通过双盲随机实验表明早期给药无利。原因在于 TBI 后 NMDA 受体于一个小时候后开始启动,NMDA 受体的早期调节对神经功能恢复有利而 Mg^{2+} 是其抑制剂,研究同时表明在 TBI 后 8 小时内给予镁剂治疗有害无益。虽然一般治疗剂量不会使血清 Mg^{2+} 浓度过高。但硫酸镁的治疗浓度和中毒浓度接近,用药剂量过大或单位时间内输注过快,可引起血压下降、呼吸抑制等不良反应。在血清 Mg^{2+} 浓度超标后可能会出现反射减弱甚至神经肌肉传导阻滞。何百祥^[17]主张常量治疗重度颅脑损伤。本实验采用了早期给药方法虽然可以明显地抑制 Bax 蛋白和促进 Bcl-2 蛋白的表达。但对于镁剂治疗 TBI 的时间、剂量和时程在临床中的应用仍待进一步研究。

本实验虽然证明 Mg^{2+} 可以减少脑损伤后的神经细胞凋亡的发生。但镁的明确作用机制尚不详尽,其机制可以有:①维持伤后神经细胞内外离子稳态,促进高能物质的合成,维持 $Na^+ - K^+ - ATP$ 酶的活性,抑制 $Ca^{2+} - Na^+$ 交换,进而阻止钙内流以及保持细胞膜结构和功能的完整。 Mg^{2+} 是 NMDA 受体的非竞争性拮抗剂,可以抑制谷氨酸受体的活化,维持神经细胞正常 $Na^+、K^+$ 浓度梯度,减少伤后神经细胞自由基的生成。②抑制了颅脑创伤后凋亡基因,减少伤后神经细胞的延迟性死亡;③抑制 5-HT 的缩血管效应,另外, Mg^{2+} 还能通过抑制血小板的聚集而降低血小板活性,从而改善脑部血供,达到脑保护功能。

总之,镁剂早期使用在 DAI 的发生、发展中具有重要作用。可以减轻神经元的凋亡,降低继发性损害,改善脑损伤后的神经功能障碍。

参 考 文 献

- [1] Marmarou A, Foda MA, van den Brink W, et al. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg*, 1994, 80(2): 291-300.
- [2] Immonen RJ, Kharatishvili I, Niskansen JP, et al. Distinct MRI pattern in lesional and perilesional area after traumatic brain injury in rat-11 months follow-up. *Exp Neurol*, 2009, 215(1): 29-40.
- [3] Jiang Y, Sun XC, Gui L, et al. Lack of association between apolipoprotein E promoters in epsilon 4 carries and worsening on computed tomography in early stage of traumatic injury. *Acta Neurochir Suppl*, 2008, 105: 233-236.
- [4] Yu S, Kaneko Y, Bae E, et al. Severity of controlled cortical impact traumatic brain injury in rats and dictates degree of behavioral deficits. *Brain Res*, 2009; 1287: 157-163.
- [5] Fleminger S, Oliver DL, Lovestone S, et al. Head injury as a risk factor for Alzheimer's disease: the evidence 10 years on; a partial replication. *Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2003, 74(7): 857-862.
- [6] Tehranian R, Rose ME, Vaqni V, et al. Disruption of Bax protein prevents neuronal cell death but produces cognitive impairment in mice following traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 2008, 25(7): 755-767.
- [7] Raghupathi R, Conti AC, Graham DI, et al. Mild traumatic brain injury induces apoptotic cell death in the cortex that is preceded by decreases in cellular Bcl-2 immunoreactivity. *Neuroscience*, 2002, 110(4): 605-616.
- [8] O'Dell DM, Raghupathi R, Crino PB, et al. Traumatic brain injury alters the molecular fingerprint of TUNEL-positive cortical neurons In vivo: A single-cell analysis. *J Neurosci*, 2000; 20(13): 4821-4828.
- [9] Teles AV, Rosenstock TR, Okuno CS, et al. Increase in bax expression and apoptosis are associated in Huntington's disease progression. *Neurosci Lett*, 2008, 438(1): 59-63.
- [10] Kang SW, Choi SK, Park E, et al. Neuroprotective effects of magnesium-sulfate on ischemic injury mediated by modulating the release of glutamate and reduced of hyperreperfusion. *Brain Res*. 2011; 1371: 121-128.
- [11] Turkoglu OF, Eroglu H, Okutan O, et al. A comparative study of treatment for brain edema; magnesium sulphate versus dexamethasone sodium phosphate. *J Clin Neurosci*, 2008; 15(1): 60-65.
- [12] Muroi C, Terzic A, Fortunati M, et al. Magnesium sulfate in the management of patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a randomized, placebo-controlled, dose-adapted trial. *Surg Neurol*, 2008, 69(1): 33-39.
- [13] 张赛, 李建伟, 只达石等. 外源性镁离子对重型颅脑创伤患者的治疗作用. *中华神经外科学杂志*, 2006, 22(2): 76-78.
- [14] Heath DL, Vink R. Magnesium sulphate improves neurologic outcome following severe closed head injury in rats. *Neurosci Lett*, 1997, 228(3): 175-178.
- [15] Heath DL, Vink R. Neuroprotective effects of $MgSO_4$ and $MgCl_2$ in closed head injury: a comparative phosphorus NMR study. *J Neurotrauma*, 1998, 15(3): 183-189.
- [16] Temkin NR, Anderson GD, Winn HR, et al. Magnesium sulfate for neuroprotection after traumatic brain injury: a randomized controlled trial. *Lancet Neurol*, 2007, 6(1): 29-38.
- [17] 何百祥, 丁丽, 张志峰等. 常量硫酸镁治疗重型颅脑损伤的临床研究. *西安交通大学学报(医学版)*, 2011, 32(2): 226-229.