

一种制备急性 CO 中毒迟发性脑病动物模型的新方法

温 韬, 赵金垣

(北京大学第三医院职业病研究中心, 北京 100083)

摘要: 目的 建立一种新方法制备的一氧化碳中毒迟发性脑病的动物模型, 以便深入探索迟发性脑病的发病机制。方法 将家兔随机分成单次染毒组和连续染毒组, 采用腹腔注射 CO 法染毒; 单次染毒组按 200 ml/kg 剂量注射 1 次, 连续染毒组按 6 h 间隔追加注射 3 次, 监测染毒后 24 h 内各组家兔血液 HbCO、SOD 和 MDA 的变化, 并在不同时间处死动物后采用病理学技术鉴定脑组织损伤情况。结果 腹腔 CO 染毒后, 家兔迅速出现明显的中毒症状, 血 HbCO 水平显著增高, 1~2 h 达高峰, 6 h 后呈现下降趋势, 单次染毒组可在 14 h 后将 CO 完全排出体外, 连续染毒组 HbCO 水平则可维持在 45% 以上达 24 h; 染毒家兔 SOD 活力明显下降, MDA 含量显著升高。病理学检查显示, 染毒急性期家兔脑组织损伤严重, 并在随后的 3~21 d 内出现继发性的脑组织坏死, 海马及皮层尤为显著。结论 采用腹腔连续间隔注射 CO 可成功建立急性一氧化碳中毒迟发性脑病动物模型, 从而为进一步探讨其发病机制奠定了工作基础。

关键词: 一氧化碳; 一氧化碳中毒; 迟发性脑病; 腹腔注射

中图分类号: R595.1; R33 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2003)03-0129-04

A new animal model of delayed encephalopathy after acute CO poisoning

WEN Tao, ZHAO Jin-yuan

(Research Center of Occupational Medicine, the Third Hospital of Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract: **Objective** To establish an animal model of delayed encephalopathy after CO poisoning by using a new method, with the aim to investigate its mechanisms. **Method** Rabbits were divided at random into two groups, repeated injection group and single injection one. CO was injected into both groups intra-peritoneally at a dosage of 200 ml/kg, and in repeated injection group CO (100 ml/kg ip) was subsequently provided for three times at 6 h intervals. After CO administration, HbCO levels, SOD activity and MDA concentration in the blood of rabbits were measured repeatedly in a 24 h period. Moreover we adopted pathological technology to confirm whether delayed brain injury occurred at different time point. **Result** A typical poisoning symptom could be observed in CO-treated rabbits immediately after CO ip. Compared with control group, HbCO levels in CO-treated rabbits increased much higher and reached a peak at 1 to 2 hours after CO ip and didn't decline remarkably in the first 6 hours. Generally, CO could be completely cleared at about 14 hours in single injection group while HbCO levels could be kept above 45% for 24 h in repeated injection group. SOD activity decreased significantly while MDA concentration increased remarkably in CO-treated rabbits. The pathological results showed that acute CO poisoning yielded serious cerebral damage in rabbits. In addition, delayed neural injuries were found to have taken place in some CO-treated rabbits. **Conclusion** We established a new and successful animal model of delayed encephalopathy after CO poisoning by employing a repeated administration of CO ip.

Key words: Carbon monoxide; CO poisonings; Delayed neuropsychological sequelae (DNS); Intra-peritoneally (ip)

急性 CO 中毒迟发性脑病 (delayed neuropsychological sequelae after CO poisoning, DNS) 是急性 CO 中毒后最严重的并发症之一, 患者常在经过一段时间表现正常或接近正常的“假愈期”, 突然再次出现一组以痴呆为主的神经精神症状^[1]。该病病程较长, 治疗困难, 可严重威胁患者生存质量并给社会带来巨大负担, 因此一直是医学界关注的焦点之一。多年来, 国

内外从各种角度对 DNS 进行大量的实验和临床研究, 但在其发病机制上始终未能取得突破性进展, 其中一个重要原因就是缺乏可靠且简便的动物模型, 因而研究受到很大限制。本课题组拟深入探讨 DNS 的发病机制, 以为今后临床防治提供线索, 在研究中采用新的染毒方法, 首次成功建立了急性一氧化碳中毒迟发性脑病动物模型。现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 动物分组及染毒方法

普通级健康、雄性北京大耳白兔, 体质量 2.0~2.5 kg (北京大学医学部动物中心提供), 随机分成 3

收稿日期: 2003-02-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070651)

作者简介: 温韬 (1975-), 男, 安徽合肥人, 硕士, 现工作单位为北京佑安医院肝炎研究所。

组: 单次染毒组、连续染毒组和对照组, 每组 5 只。实验组动物检查无异常后, 经腹腔注射纯品 CO 气体 (体积分数 99.95%, 由北京燕山石化气体有限公司提供), 首次剂量 200 ml/kg; 单次染毒组注射 1 次即可, 连续染毒组按 6 h 间隔追加注射 3 次, 剂量 100 ml/kg。动态监测染毒家兔 24 h 内血 HbCO 浓度, 并观察染毒动物的症状及体征。对照组按同样剂量腹腔注射空气。

1.2 血 HbCO 测定

采用改良的双波长 HbCO 定量法测定^[3], 连续监测 24 h 内染毒动物血 HbCO 的浓度变化。

1.3 血浆总超氧化物歧化酶 (SOD) 活力和丙二醛 (MDA) 含量测定

取染毒家兔耳缘静脉血测 24 h 内 SOD 和 MDA 变化情况, SOD 和 MDA 试剂盒由南京建成生物工程研究所提供, 具体操作方法按说明进行。

1.4 脑组织病理学检查

按上述方法, 实验组再取 12 只动物进行染毒, 于染毒后 (末次注射 CO) 1 h 内、1 d、3 d、7 d、14 d、21 d 时间点各取 2 只, 用质量分数 20% 乌拉坦溶液腹腔注射麻醉后, 分离一侧颈内动脉和对侧颈内静脉后, 远心端方向插管 (肝素抗凝); 然后自颈内动脉快速灌注 1 000 ml 生理盐水 (内含肝素), 另一侧颈内静脉引流, 以冲洗脑毛细血管血液, 继之用 4% 多聚甲醛 100 ml 进行在体脑组织固定。完整分离脑组织后, 以视交叉为中心, 冠状位断层切片, 行常规 HE 染色, 在光镜下检查海马、皮层及基底神经节等部位脑组织变化。对照组取 2 只家兔进行同样处理。

1.5 统计分析

全部数据输入计算机, 经 SPSS 软件程序处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 实验组与对照组 SOD 和 MDA 检测结果比较用配对 t 检验。

2 结果

2.1 一般状态观察

家兔腹腔注射 CO 后, 10 min 即可出现明显的中毒反应, 表现为拒食少动、浅昏迷、四肢瘫软、抽搐, 嘴唇及颈部皮肤可见明显樱桃红色; 部分动物有角弓反张、震颤、去大脑皮质状态等神经系统损害的表现。死亡动物尸检可见内脏严重充血伴散在出血点, 脑组织明显充血、水肿。空气对照组无异常表现。

2.2 染毒后血 HbCO 浓度的变化

家兔经腹腔注射 CO 后, 血 HbCO 水平于 10 min 后即明显升高, 1~2 h 达到高峰, 6 h 后呈现衰减。

单次注射 CO (200 ml/kg), 体内 HbCO 的半排出期约为 8 h, 14~16 h 能恢复到正常生理水平; 连续间隔注射 CO, 可使家兔血 HbCO 水平长时间维持在 45% 水平以上; 对照组血 HbCO 含量在 2% 左右 (见图 1)。

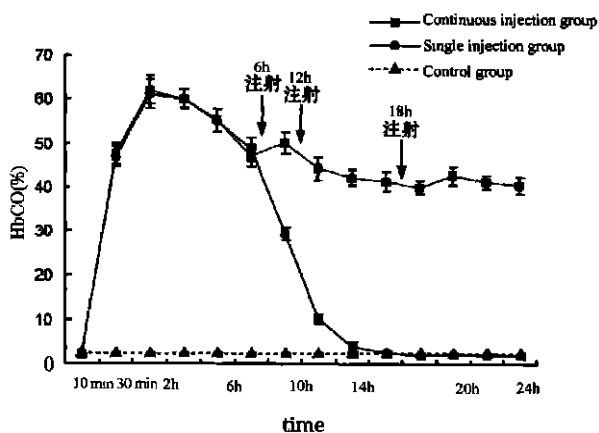


图 1 家兔腹腔注射 CO 后血 HbCO 水平变化

Fig 1 Concentration of HbCO (%) in the blood of CO-treated rabbits after CO ip

2.3 血浆 SOD 活力、MDA 含量变化

家兔染毒后血浆 SOD 含量显著下降, 染毒后 24 h 内各时间点检测结果与对照组比较差异非常显著 ($P < 0.001$); 血浆 MDA 含量显著增加, 与对照相比, 2~24 h 内各时间点检测结果均显著升高 ($P < 0.001$), 见表 1。

表 1 家兔腹腔注射 CO 后血浆 SOD 活力、MDA 含量检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Activity of SOD and concentration of MDA in the plasma of CO-treated rabbits ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SOD (NU/ml)	MDA (nmol/ml)
对照 (control)	6	467.99±23.11	1.748±0.084
CO 染毒组 (CO treated group)			
30 min	6	241.07±27.24**	1.835±0.134
2 h	6	254.69±23.69**	2.441±0.234**
6 h	6	314.19±20.76**	2.728±0.142**
10 h	6	326.34±24.17**	2.709±0.165**
14 h	6	319.87±18.39**	2.771±0.257**
20 h	6	326.88±18.28**	2.895±0.174**
24 h	6	312.22±20.77**	2.979±0.187**

与对照相比 (versus control), ** $P < 0.001$

2.4 脑组织病理学变化

光镜观察结果: 对照组家兔脑组织切片 HE 染色, 海马及皮层等区细胞及结构未见异常。染毒组染毒后即刻、1~3 d, 可见部分神经细胞出现异常改变, 主要表现为细胞水肿, 核固缩、深染, 血管内皮

细胞间隙增大等; 染毒后 7~14 d, 多数标本无明显异常, 但可见神经细胞数量减少及局灶性组织坏死等; 部分标本显示有缺血性改变, 出现神经细胞坏死及皮层、海马细胞水肿加重。

2.4.1 对照组家兔腹腔注射空气后脑海马及皮层细胞结构正常(见封四图 2-1、图 2-2)。

2.4.2 染毒组在腹腔注射 CO 后 1~3 d, 脑组织有明显水肿, 海马区可出现明显细胞坏死(见封四图 3-1), 皮层细胞也有局灶性坏死(见封四图 3-2)。

2.4.3 染毒后 7~21 d 内部分动物在海马和皮层细胞均见到有一定程度的神经细胞变性坏死(见封四图 4-1、图 4-2)。

3 讨论

3.1 关于腹腔注射 CO 建立中毒模型的可行性

CO 在常温、常压下以气态物质存在, 日常和生产环境中也是从呼吸道进入人体引起中毒, 因此传统的 CO 中毒模型多采用吸入式染毒, 可分为动态法和静式法^[3]。动态吸入法染毒较接近于日常 CO 中毒途径, 所得结果可避免缺氧、CO₂ 蓄积和湿度增加等因素影响, 但其装置费用较高, CO 消耗量大, 染毒过程中对操作要求较高, 因此难以普及推广; 而静式染毒法虽然所需设备相对简单, 操作亦较方便, 但常因不能排除缺氧、CO₂ 蓄积等各种因素干扰等缺点而难以应用, 因而明显限制了急性 CO 中毒及迟发性脑病的深入研究, 当前迫切需要建立一种简便易行而且科学可靠的 CO 中毒迟发性脑病动物模型^[3]。

Fecther 等曾报告用腹腔注射 CO 染毒的方法建立大鼠耳蜗损伤的动物模型获得成功^[4,5]; 本研究进而采用腹腔间隔注射法, 是在原方法基础上的一次创新。相对于吸入染毒法来说, 腹腔注射 CO 优点明显: 操作简单易行, 对仪器设备无特殊要求, 影响因素少, 染毒剂量可准确控制, 注射后血 HbCO 浓度可迅速升高至所需水平, 并引起明显的中毒症状, 神经系统损伤及生化指标改变均与临床所见 CO 中毒表现一致^[3,6]。所用 CO 剂量是以 HbCO 水平为依据, 经反复摸索而得出。预实验以 50 ml/kg 为起始剂量, 按 20 ml 的剂量依次递增, 以血 HbCO 浓度和半排出期为参照, 最后确定最适染毒剂量。现采用的首次剂量为 200 ml/kg, 单次注射可使动物血 HbCO 迅速达到 60% 以上, 并且在 6 h 内稳定在 50% 水平上, 以 6 h 间隔连续注射 CO (剂量 100 ml/kg), 可使 HbCO 水平长时间维持在 45% 以上。但再增加剂量并不能成比例地提高血 HbCO 浓度, 这可能与腹腔染毒的特

点有关: 早期 CO 进入腹腔后, 可通过腹内大小网膜血管迅速吸收入血, 生成 HbCO 并导致机体中毒, 但亦使机体产生一系列应激反应, 如呼吸加快, 以促使 CO 直接从肺排出; 全身周围小血管收缩, 以保证足够血液流向心、脑等重要脏器等, 这可能是后期虽增加剂量, 但 HbCO 水平没有相应升高的原因。CO 中毒所致的缺氧程度与血液中 HbCO 水平呈比例关系, 因此血 HbCO 水平可作为监测 CO 中毒程度的一个重要指标^[7]。一般而论, 血 HbCO 水平在 10% 以上即可引起中毒反应, 30% 以上可引起中度中毒, 50% 左右则能引起重度中毒^[7]。实验结果显示, 单次 CO 染毒, 动物 HbCO 浓度在 45% 以上可持续 6 h 左右, 而连续间隔注射 CO 则能使血 HbCO 水平维持在重度中毒状态达 24 h 以上, 动物可有长时间瘫软、浅昏迷等, 部分动物甚至会出现阵发性去大脑强直、抽搐、震颤等神经系统严重损伤的表现; 病理学检查显示染毒动物有严重脑损伤, 死亡动物尸检亦见到内脏重度充血伴散在出血点, 脑组织充血水肿明显。以上结果表明, 连续间隔注射 CO 可使动物成功达到重度中毒状态, 神经系统明显受损, 从而为模拟临床 CO 中毒迟发性脑病奠定了病理学基础。

综上所述, 腹腔注射 CO 的染毒方式完全可达到类似于动态吸入法的中毒程度, 血 HbCO 水平与首次注射剂量成正相关, CO 半排出期与呼吸频率和追加剂量有关; 采用腹腔注射 CO 的方式完全可替代吸入染毒的途径, 并且因其诸多显而易见的优点而具有应用及推广价值。

3.2 急性 CO 中毒迟发性脑损伤动物模型的可靠性

急性 CO 中毒迟发性脑病的发病机制一直是困扰医学领域多年的难题, 缺乏可靠的动物模型是限制其深入研究的主要障碍之一^[1]。DNS 的发病主要有两个特点: 一是表现为迟发, 患者总是经历一段时间表现正常的“假愈期”后才会出现新的神经精神症状, 一般来说, “假愈期”越短, 预后越差; 二是存在高龄、心脑血管疾患史、激动易怒等高危因素, 且发病与中毒程度、昏迷时间和初次治疗效果等密切相关^[8]。本实验采用的连续间隔染毒法使动物处于重度中毒状态, 染毒家兔出现长时间浅昏迷, 十分接近临床上重症 CO 中毒病例, 从而可大大提高迟发性脑损伤模型研究的成功率。

一般认为, 急性 CO 中毒迟发性神经精神症状最常见于急性 CO 中毒后出现严重脑损伤的患者。如前所述, CO 经腹腔注射后可通过腹内大小网膜血管吸

收入血,形成大量 HbCO 引起急性 CO 中毒;高浓度 HbCO 降低血液携氧能力,造成组织缺氧,并导致脂质过氧化反应增强,使血液中 SOD 活力迅速下降和 MDA 含量迅速升高^[9~12],部分游离的 CO 还可通过与含铁色素蛋白如肌红蛋白、细胞色素、过氧化物酶的高亲和力而产生细胞毒性损伤,并引起线粒体功能障碍等^[13]。神经系统对上述的损伤机制最为敏感,也最易出现脑血循环障碍和脑功能衰竭等严重后果,从而构成诱发迟发性神经损伤的病理基础。

本模型病理学检查显示,CO 染毒家兔 1~3 d 内即见有明显脑损伤,主要表现为神经细胞发生缺血性改变,胞体轻度缩小,胞浆尼氏体消失等,典型损伤可有明显的细胞水肿,血管内皮细胞肿胀等,损伤的部位主要位于海马及皮层等区,但染毒后期多数病理标本已无明显异常;部分动物染毒后 7~14 d 出现海马区锥体细胞数量显著减少或明显坏死,皮层区亦发生局灶性变性坏死等,此种迟发性损伤极可能是 CO 中毒迟发性脑病的特征性病理表现。海马区与大脑学习记忆功能密切相关,其损伤会对这一功能产生重要影响;迟发性脑病最突出的临床表现是常出现以急性痴呆为主的神经精神功能紊乱,提示海马区神经细胞的迟发性坏死可能是 DNS 发病的病理基础。临床上 DNS 患者的影像学表现亦与本研究结果相符,如 DNS 病例的 CT 表现常以皮层下广泛的白质低密度改变及基底神经节的局灶性低密度为特征;MRI 上亦可显示皮层和海马区出现异常高信号等^[14,15]。

综上所述,本实验通过腹腔连续间隔注射 CO,造成动物重度中毒状态,可诱发产生迟发性脑损伤,提示 CO 中毒迟发性脑损伤动物模型是成功的,从而为进一步深入探索 DNS 的发病机制提供了研究基础。

参考文献:

- [1] Raub JA, Mathieu NF, Hampson NB, et al. Carbon monoxide poisoning: a public health perspective [J]. *Toxicology*, 2000, 145 (1): 1-14.
- [2] 冯仁丰. 实用医学检验学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1996. 72.
- [3] Penney DJ. Acute carbon monoxide poisoning: animal models: A review [J]. *Toxicology*, 1990, 62: 123-160.
- [4] Fechter LD, Thorne PR, Nuttall AL. Effects of carbon monoxide on cochlear electrophysiology and blood flow [J]. *Hear Res*, 1987, 27: 37-45.
- [5] Fechter LD, Liu Y. MK-801 protects against carbon monoxide-induced hearing loss [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1995, 132: 196-202.
- [6] Goldbaum LR, Ramirez RG, Absalon KB. What is the mechanism of carbon monoxide toxicity? [J]. *Aviat Space Environ Med*, 1975, 46: 1289-1294.
- [7] Goldbaum LR, Orellano T, Dergal E. Studies on the relation between carboxyhemoglobin concentration and toxicity [J]. *Aviat Space Environ Med*, 1977, 48: 969-972.
- [8] 王忱, 王娟, 邵丽春, 等. 急性一氧化碳中毒迟发脑病发病相关因素分析 [J]. *中华流行病学杂志*, 2000, 21 (3): 21-24.
- [9] Kinouchi H, Kamii H, Mikawa S, et al. Role of superoxide dismutase in ischemic brain injury: a study using SOD transgenic mice [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 1998, 18 (6): 609-620.
- [10] Carnier P, Demougeot C, Bertrand N, et al. Stress response to hypoxia in gerbil brain: HO-1 and Mn SOD expression and glial activation [J]. *Brain Research*, 2001, 893: 301-309.
- [11] Mirò ò, Casademont J, Bamièntos A, et al. Mitochondrial cytochrome c oxidase inhibition during acute carbon monoxide poisoning [J]. *Pharmacology & Toxicology*, 1998, 82: 199-202.
- [12] Thom SR. Carbon monoxide-mediated brain lipid peroxidation in the rat [J]. *J Appl Physiol*, 1990, 68: 997-999.
- [13] Zhang J, Piantadosi CA. Mitochondrial oxidative stress after carbon monoxide hypoxia in the rat brain [J]. *J Clin Invest*, 1992, 90: 1193.
- [14] Chang KH, Han MH, Kim HS, et al. Delayed encephalopathy after carbon monoxide intoxication: MR imaging features and distribution of cerebral white matter lesions [J]. *Radiology*, 1992, 184: 117-122.
- [15] Inagaki T, Ishino H, Seno H, et al. A long-term follow-up study of serial magnetic resonance images in patients with delayed encephalopathy after acute carbon monoxide poisoning [J]. *Psychiatry Clin Neurosci*, 1997, 51 (6): 421-423.

中华预防医学会劳动卫生与职业病分会关于召开第一次健康监护学术研讨会议征文通知

中华预防医学会劳动卫生与职业病分会决定成立职业病与健康监护学组,并定于2003年10月在山东省泰安市召开学组成立暨第一次健康监护学术研讨会。研讨会将邀请国内有关专家作与健康监护相关的学术报告和讲座。现将会议征文的有关事项通知如下。

1. 征文内容: (1) 健康监理论、技术及伦理道德问题探讨; (2) 不同有害作业健康监护技术规范; (3) 各系统健康损害早期监护指标的探讨和实践; (4) 健康监护管理、实践及经验介绍; (5) 健康监护档案及资料的应用与研究; (6) 其它职业卫生方面的科研论文和经验总结。征文为未公开发表的有关上述内容的实践和科研论文。

2. 征文要求: (1) 全文不超过4 000字,并附400~600字摘要(内容包括目的、方法、结果和结论); (2) 稿件传递方式: 有条件者应以电子邮件传递,如不能发送电子邮件者,文稿用计算机打印或400字稿纸抄清,标题下注明作者的单位、地址及邮编并附软盘一张; (3) 来稿同时交稿件处理费20元; (4) 截稿日期: 2003年8月31日; (5) 稿件及稿件处理费请寄至: 山东省劳动卫生职业病防治研究所(山东省济南市经十路89号,邮编250062)徐孝华院长收,电话: (0531) 2919719, 6821668, 传真: (0531) 2954079, E-mail: xxh6868@163.com; (6) 论文录用通知日期: 2003年9月10日。

凡被会议录用的论文并参加会议者将给予国家继续教育学分。

中华预防医学会劳动卫生与职业病分会

一种制备急性 CO 中毒迟发性脑病动物模型的新方法 (正文见第 129 ~ 132 页)



图 2-1 对照组家兔海马组织结构 HE×100

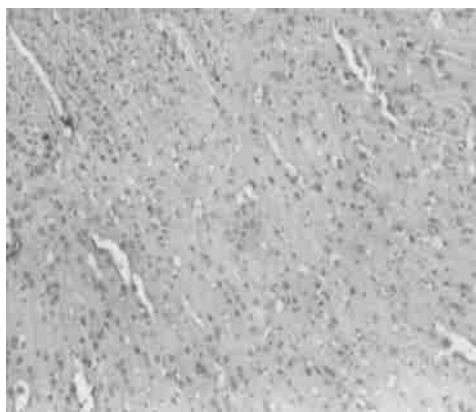


图 2-2 对照组家兔皮层组织结构 HE×100

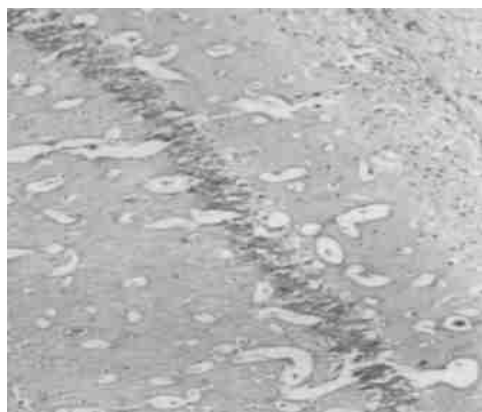


图 3-1 家兔 CO 染毒后 1 d 脑部水肿坏死
HE×100

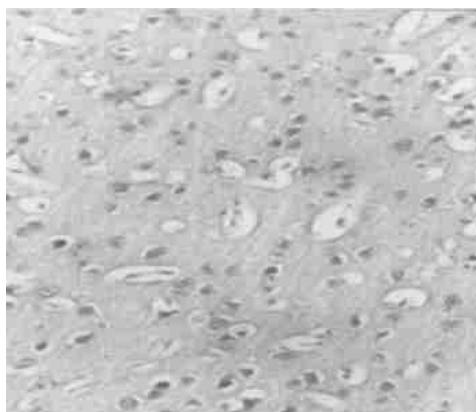


图 3-2 家兔 CO 染毒后 3 d 皮层局灶性坏死
HE×200

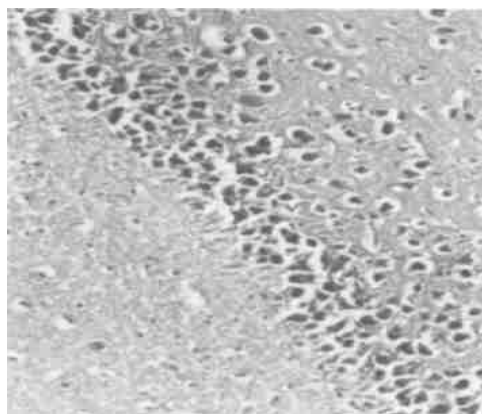


图 4-1 家兔 CO 染毒后 7 d 海马变性坏死
HE×200

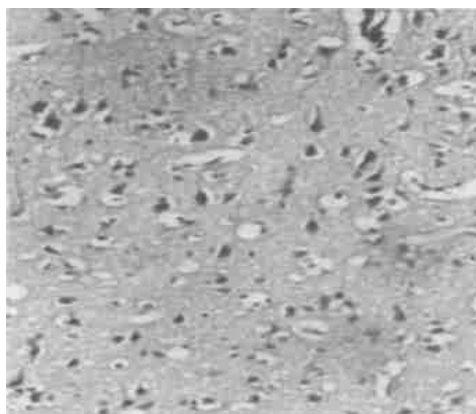


图 4-2 家兔染毒后 14 d 皮层神经变性坏死
HE×200