

急性一氧化碳中毒对大鼠脑循环的影响

王耀宏¹, 赵金垣^{1*}, 崔书杰², 邓敏¹, 温韬¹, 刘和亮¹

(1. 北京大学第三医院职业病研究中心, 北京 100083; 2. 平顶山市职业病防治所, 河南 平顶山 467000)

摘要: 目的 探讨急性一氧化碳中毒后脑内血液流变学的变化, 以进一步弄清迟发性脑病的发病机制, 为解决其有效防治提供新的线索。方法 体重 240~280 g 雄性 SD 大鼠腹腔间断注射染毒, 分别于染毒后 1、3、7、14、21 d 颈静脉取血监测血液流变学特性, 同时检测血浆 Fib、ET-1、MDA、NO 及 cGMP 含量。结果 染毒后脑循环血液流变学特性发生明显改变, 粘度增加, 且见血管内皮严重受损, 缩血管物质增加, NO-cGMP 系统受到抑制。结论 急性一氧化碳中毒对大鼠脑循环存在持续性影响, 这种影响可能是急性一氧化碳中毒致迟发性脑损伤的病理重要机制之一。

关键词: 急性一氧化碳中毒; 迟发性脑损伤; 血液流变学; 一氧化氮 (NO); 内皮素-1 (ET-1); 纤维蛋白原 (Fib); 环磷酸鸟苷 (cGMP)

中图分类号: R595. 1; R33 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2003)05-0257-04

Effect of acute carbon monoxide poisoning on brain microcirculation of rats

WANG Yao-hong¹, ZHAO Jin-yuan^{1*}, CUI Shu-jie², DENG Min¹, WEN Tao¹, LIU He-liang¹

(1. Research Center of Occupational Medicine, Peking University Third Hospital, Beijing 100083, China; 2. Pingdingshan Municipal Institute for Prevention and Treatment of Occupational Diseases, Pingdingshan 467000, China)

Abstract: **Objective** To study the hemotheological changes occurred during acute CO poisoning, thereby clarify the pathogenesis of the delayed encephalopathy by acute CO poisoning and further find some new clues for effective prevention and treatment of the delayed encephalopathy. **Method** Male SD rats BW 240—280 g were ip injected with CO repeatedly, then dynamically monitored the hemotheological changes with cervical vein blood such as whole blood viscosity, plasma viscosity, RBC hematocrit etc at 1, 3, 7, 14, 21 days after the injection of CO, respectively; while the levels of fibrinogen, endothelin-1, MDA, NO and cGMP in plasma were also measured. **Result** The hemotheological features were obviously changed, such as the increase of viscosity; besides the damage of endothelium, the increase of vasoconstrictive substances and the inhibition of NO-cGMP system were also seen in the study. **Conclusion** The acute CO poisoning has a continuing negative effect on brain microcirculation, which might be an important impact factor in the pathogenesis of the delayed encephalopathy by acute CO poisoning.

Key words: Acute carbon monoxide poisoning; Delayed encephalopathy; Hemorheology; Nitric oxide (NO); Endothelin-1 (ET-1); Fibrinogen (Fib); Cyclic guanosine monophosphate (cGMP)

研究表明, 急性一氧化碳中毒迟发性脑病 (DNS) 有如下发病特点: (1) 病理损伤主要累及白质、海马及苍白球等供血薄弱区域; (2) 其高危因素皆是不利于脑循环的因素, 如高龄、既往心脑血管病史、高血压等; (3) 迟发性, 即从 CO 中毒到出现迟发性脑病, 存在一段特征性的“假愈期”。在前面的研究中, 本课题组已成功建立了一种与 DNS 临床特征十分符合的大鼠模型^[1], 结合 DNS 与脑循环的诸多相关性, 本研究拟通过动态监测一氧化碳中毒恢复期脑循环的血流变学特点, 以及血管活性物质含量等变化情况, 探讨脑循环改变与迟发性脑病的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物处理

雄性 SD 二级大鼠, 中国医学科学院实验动物中心提供, 体重 240~280 g, 于北京大学医学部动物中心饲养, 商品化干块料, 自由食水。实验前一天禁食, 将大鼠随机分为 6 组, 分别为注射 CO 前和注射 CO 后 1、3、7、14、21 d 组 (本实验不设专门的对照组, 均以染毒前的测定结果作自身对照), 每组各 6 只大鼠。

1.2 动物模型制备及生物样品采集

采用腹腔间隔注射 CO (99.95% 纯品, 由北京康福气体公司提供) 制备大鼠染毒模型, 监测尾静脉血中 HbCO 含量^[1,2]。分别于染毒前及末次注射 CO 后 1、3、7、14、21 d, 腹腔注射乌拉坦 (1.0 g/kg) 麻醉, 颈静脉采血。

1.3 指标检测

收稿日期: 2003-07-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (课题编号: 30070651)

作者简介: 王耀宏 (1973—), 博士研究生, 现在美国田纳西州孟菲斯大学。

* 责任作者 (corresponding author)

1.3.1 血液流变学 使用 R80 型自动冲洗血液流变分析仪(北京世帝公司出品)测定 200 S^{-1} 、 30 S^{-1} 、 5 S^{-1} 、 1 S^{-1} 切变率下的全血粘度、血浆粘度及红细胞压积。

1.3.2 血浆纤维蛋白原浓度 取 3.8% 枸橼酸钠抗凝血, $3\ 500\text{ r/min}$ 离心 10 min, 分离血浆, 使用全自动凝血分析仪(ACL-200 型, 德国库尔特公司出品)监测大鼠血浆纤维蛋白原含量。

1.3.3 血浆 ET-1 及 cGMP 测定 取 EDTA 抗凝和抑肽酶抗凝血, 采用放免法测定血浆 ET-1 (由北京东亚放射免疫研究所提供) 及 cGMP 含量 (由上海中医药大学同位素室提供)。

1.3.4 血浆 NO 的测定 一氧化氮代谢产物亚硝酸盐可与 Griess 试剂反应产生粉红色化合物, 可用分光光度计进行比色测定, 藉以反映 NO 浓度。Griess 试剂配制方法如下: 称取 2.0 g 对氨基苯磺酰胺溶于 100 ml 5% 磷酸液中作为 a 液; 称取 0.2 g *N*-(1-萘基)-乙二胺溶于 5% 磷酸液 100 ml 中为 b 液, 临用前取 a 液和 b 液等量混匀即成; 取待测样品 0.1 ml 加等量 Griess 试剂混匀, 在室温下静置 15 min, 于 540 nm 波长下测定样品的吸光度, 代入标准曲线的回归方程, 即可求知样品中的亚硝酸盐含量。

1.3.5 血清丙二醛 (MDA) 浓度测定 荧光分光光度法测定血清丙二醛 (MDA) 浓度。其余试剂均为市售分析纯产品。

1.4 统计学分析

实验数据以均值 $\pm$ 标准差表示, 采用 SPSS 8.0 统计软件进行方差分析, 组间进行 *q* 检验。

2 结果

2.1 大鼠注射 CO 后血液流变学变化

2.1.1 全血粘度变化 在不同的切变率下 (1 S^{-1} 、 5 S^{-1} 、 30 S^{-1} 、 200 S^{-1}), CO 染毒大鼠在注射 CO 后各时间点, 脑循环血液全血粘度均高于染毒前, 见表 1。

2.1.2 血浆粘度变化 大鼠注射 CO 后 1~14 d, 血浆粘度均显著高于注射 CO 前水平 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$), 21 d 方逐渐恢复, 见表 2。

表 3 大鼠染毒后颈静脉血 NO、cGMP、ET-1、MDA 浓度变化

Tab 3. Changes of NO, cGMP, ET-1 and MDA levels in cervical vein of rats after injection of CO

时 间	血浆 NO ($\mu\text{mol/L}$)	血浆 cGMP (pmol/ml)	血浆 ET-1 (pg/ml)	血清 MDA ($\mu\text{mol/L}$)
染毒前	49.16 $\pm$ 4.70	69.86 $\pm$ 7.44	124.62 $\pm$ 16.20	4.52 $\pm$ 1.87
染毒后 1 d	32.04 $\pm$ 6.21**	44.91 $\pm$ 6.18**	146.73 $\pm$ 18.06*	6.96 $\pm$ 2.15*
3 d	35.69 $\pm$ 6.54**	50.67 $\pm$ 6.43**	134.81 $\pm$ 17.67	5.20 $\pm$ 2.03
7 d	36.56 $\pm$ 4.15**	52.35 $\pm$ 9.01**	146.37 $\pm$ 15.35*	7.28 $\pm$ 2.26**
14 d	37.78 $\pm$ 4.88**	58.73 $\pm$ 5.95**	147.99 $\pm$ 16.88*	7.05 $\pm$ 2.89*
21 d	42.80 $\pm$ 6.35*	68.63 $\pm$ 8.47*	128.85 $\pm$ 22.45	5.01 $\pm$ 2.23

表 1 大鼠染毒后颈静脉血在不同切变率下全血粘度的变化

Tab 1. Changes of whole blood viscosity in cervical vein of rats after injection of CO

时 间	1 S^{-1}	5 S^{-1}	30 S^{-1}	200 S^{-1}
染毒前	32.43 $\pm$ 2.05	11.88 $\pm$ 0.59	5.92 $\pm$ 0.20	3.77 $\pm$ 0.38
染毒后 1 d	37.37 $\pm$ 1.92**	13.16 $\pm$ 0.43**	6.97 $\pm$ 0.51**	4.53 $\pm$ 0.40**
3 d	38.39 $\pm$ 1.88**	13.95 $\pm$ 0.66**	6.89 $\pm$ 0.24**	4.75 $\pm$ 0.14**
7 d	40.97 $\pm$ 1.61**	14.73 $\pm$ 0.62**	7.25 $\pm$ 0.43**	4.73 $\pm$ 0.30**
14 d	38.50 $\pm$ 2.97**	14.52 $\pm$ 0.87**	7.29 $\pm$ 0.46**	4.81 $\pm$ 0.18**
21 d	37.71 $\pm$ 3.07*	13.60 $\pm$ 1.09*	6.49 $\pm$ 0.36*	4.48 $\pm$ 0.39*

*与注射 CO 前相比 $P<0.05$ **与注射 CO 前相比 $P<0.01$, $n=6$; 表 2, 3 同。

* $P<0.05$ comparing with that of pre-injection of CO; ** $P<0.01$, comparing with that of pre-injection of CO, $n=6$. The same in table 2, 3.

2.1.3 红细胞压积变化 大鼠注射 CO 后 7 d, 可见红细胞压积有所升高 ($P<0.05$), 其余时间组与注射 CO 前无明显差别, 见表 2。

2.2 大鼠注射 CO 后颈静脉血纤维蛋白原测定结果 大鼠注射 CO 后颈静脉血浆纤维蛋白原浓度急剧升高, 至 21 d 方渐恢复正常, 见表 2。

表 2 大鼠染毒后颈静脉血血浆粘度、纤维蛋白原及红细胞压积的变化

Tab 2. Changes of plasma viscosity, fibrinogen and hematocrit in cervical vein plasmas of rats after injection of CO

时 间	血浆粘度 (mPa·s)	血浆纤维蛋白原 (mg/dL)	红细胞压积 (%)
染毒前	1.233 $\pm$ 0.026	165.0 $\pm$ 16.9	0.448 $\pm$ 0.018
染毒后 1 d	1.338 $\pm$ 0.029**	251.8 $\pm$ 27.7**	0.445 $\pm$ 0.020
3 d	1.296 $\pm$ 0.038*	260.2 $\pm$ 28.7**	0.452 $\pm$ 0.019
7 d	1.368 $\pm$ 0.039**	223.8 $\pm$ 22.0*	0.482 $\pm$ 0.026*
14 d	1.308 $\pm$ 0.023**	173.8 $\pm$ 11.7	0.445 $\pm$ 0.026
21 d	1.267 $\pm$ 0.029	154.6 $\pm$ 12.9	0.447 $\pm$ 0.029

2.3 大鼠注射 CO 后血浆 NO-cGMP 含量变化

由表 3 可见, 大鼠注射 CO 后血浆 NO 浓度显著下降, 与注射 CO 前相比差异有非常显著性 ($P<0.01$), 至 21 d 时仍未恢复。大鼠注射 CO 后 1~14 d 血浆 cGMP 浓度急剧下降, 与注射 CO 前相比差异有显著性 ($P<0.01$), 至 21 d 方逐渐恢复。

2.4 大鼠注射 CO 后颈静脉血浆 ET-1 及血清 MDA 含量变化

大鼠注射 CO 后 1 d, 血浆 ET-1 及血清 MDA 浓度即见升高 ($P<0.05$), 并持续于较高水平, 至 21 d 逐渐恢复正常, 见表 3。

3 讨论

如前所述, 急性 CO 中毒迟发性脑病的特点与循环障碍有诸多相关性, 而血液流变学改变、血管内皮损伤、血管舒缩异常是循环障碍发生的重要原因。本研究结果显示, 急性 CO 中毒后, 大鼠脑循环在上述 3 个方面均发生不利于脑循环的变化。

3.1 大鼠急性一氧化碳中毒后血液流变学改变的特点及意义

血液流变学特性对于血液循环动力有重要的影响。有关缺血缺氧性脑损伤的研究表明, 血液流变学的各种特性, 如全血粘度、血浆粘度、纤维蛋白原等均见升高, 且与脑损伤的发生发展有密切关系^[3]。

本研究显示, 急性一氧化碳中毒后, 全血粘度持续升高, 低切变率下的变化更为显著。不少因素可影响全血粘度, 如红细胞压积、血浆粘度、红细胞变形性等。红细胞压积是影响全血粘度最重要的因素, 本研究发现, 在染毒后第 7 d, 脑循环(颈静脉血)中红细胞压积显著升高, 全血粘度此时亦出现峰值。血浆粘度是影响全血粘度的另一重要因素, 血浆粘度升高, 亦必然导致全血粘度增高。本实验结果显示, 大鼠染毒后血浆粘度很快升高, 并持续 14 d 之久, 这可能是急性 CO 中毒后全血粘度持续升高的主要原因, 而红细胞压积则可能是导致染毒后第 7 天全血粘度出现峰值的重要原因。上述血液流变学的变化将会导致脑循环流速降低、血流淤滞, 从而成为诱导脑循环灌注不良的重要病理生理基础。

血浆粘度的大小则主要取决于血浆蛋白含量及其分子形状、大小, 蛋白相对分子质量越大、含量越高, 血浆粘度也越大, 故血浆纤维蛋白原(Fib)是决定血浆粘度的最重要因素。它是由 3 个独立基因表达的 3 对多肽链组成的大分子血浆黏附蛋白, 其分子结构呈纤维状, 很容易弯曲变形, 并引起分子间的牵连, 形成网状结构, 故其浓度升高将会使血浆粘度明显增高^[2]。本研究结果显示, 急性一氧化碳中毒后 1~7 d, 脑血循环中纤维蛋白原浓度急剧升高, 推测这也是引起血浆粘度升高的重要原因。

3.2 ET-1 升高的意义

ET-1 是迄今所知作用最强、持续时间最长的缩血管活性多肽, 1988 年由 Yanagisawa 从培养的猪主动脉内皮细胞分离纯化出该活性多肽。ET-1 主要由血管内皮细胞合成, 以旁分泌、自分泌方式起局部调节作用; 脑循环中 ET-1 含量的升高, 将会使脑血管收缩, 从而明显减少脑组织供血。ET-1 同时也是血管

内皮损伤的标志物, 内皮细胞受损后坏死崩解, 会将 ET-1 释放入血, 故脑循环血液中 ET-1 的升高亦标志脑血管内皮严重受损; 结合以往实验发现的脑深部白质区域小血管在急性一氧化碳中毒后明显损伤现象, 推测急性一氧化碳中毒后脑组织血管内皮持续性损伤、破坏, 可能是导致脑循环 ET-1 升高的重要原因。

3.3 NO-cGMP 系统的改变及意义

一氧化碳(nitric oxide, NO)是生物体内重要的信使分子和效应分子。近年来, NO 作为氧自由基、非经典神经递质、细胞功能调节因子和信使, 在神经系统正常功能和疾病中的作用日益受到重视^[4,5]; 仅就脑循环而言, NO-cGMP 通路是重要的血管舒张因素。有研究表明, CO 中毒大鼠脑内 NO 含量有显著的变化^[6], 但这些研究多围绕 NO 在急性 CO 中毒中所起的作用, 尚无长时程 CO 中毒研究观察的报道, 更缺乏其与 DNS 发病机制的研究。

本研究发现血浆 NO 及 cGMP 含量在注射 CO 后始终低于注射前, 从时间上看, 以注射 CO 后第 1 天 NO 含量为最低, 此后呈缓慢恢复趋势。NO 的合成酶——NOS 则是一种 P450 类血红素蛋白, 激活位点有 2 个血红素分子, CO 可与之结合, 并可抑制该酶的活性^[7]。虽然血液中的 CO 水平在注射 CO 后 1 d 已恢复正常, 但组织因中毒后缺氧导致的水肿及其后的灌注不良, 可使局部气体交换不能充分进行, 因此组织中可能残余较多的 CO 而继续发挥抑制血管平滑肌及内皮中 NOS 的作用, 造成脑循环的持续低 NO 状态。脑血管内皮持续性损伤可能是 NO 持续徘徊于低水平的另一原因, 因内皮源性 NO 是血浆 NO 的主要来源, 故内皮损伤会导致 NO 合成明显下降, 从而影响血浆 NO 浓度。作为 NO-cGMP 通路下调的结果, 脑血管收缩性将明显增强, 并使脑组织灌注量明显下降。

综上所述, 本研究结果证实: 在急性一氧化碳中毒后的恢复期内, 脑组织仍持续存在灌注不良状态。造成这种灌注不良后果的原因, 是脑循环血液流变学特性发生改变——血液高粘滞状态、血管内皮受损, 以及脑循环血液中扩血管物质减少伴缩血管物质升高导致的血管收缩; 由于这三种变化几乎同步发生, 使三者间似存在引起脑组织缺血缺氧“恶性循环”的交互影响环节, 但其具体细节尚有待进一步澄清。可以认为, 这些分子层面的改变可能是脑组织, 尤其是脑组织中供血薄弱区发生继发性缺血缺氧性病变, 最终成为导致迟发性损伤最重要的生化、病理基础, 是急性 CO 中毒后迟发性脑病的关键环节。

上述研究还提示, 从急性 CO 中毒到 DNS 发病间存在着可供早期采取防治措施利用的“时间窗”, 如抓紧此一时机采取针对性治疗措施, 及时纠正脑内灌注不良现象, 将可能对彻底改善 CO 中毒迟发性脑病的预后产生重大影响, 值得今后进一步探索。

参考文献:

- [1] 王耀宏, 赵金垣, 崔书杰, 等. 急性 CO 中毒迟发性脑病的动物模型制备研究 [J]. 中国职业医学, 2003, 发表中.
- [2] 冯仁丰. 实用医学检验学 [M]. 上海: 科学技术出版社, 1996. 72

- [3] 王怡, 王仰宗. 实用临床血液流变学 [M]. 北京: 学苑出版社, 1994. 101-123.
- [4] Rao AM, Dogan A, Hatder JF et al. Fluorimetric assay of nitrite and nitrate in brain tissue after traumatic brain injury and cerebral ischemia [J]. Brain Res. 1998, 793: 265-270.
- [5] Hirabayashi H, Takizawa S, Fukuyama N, et al. Nitrotyrosine generation via inducible nitric oxide synthase in vascular wall in focal ischemia reperfusion [J]. Brain Res. 2000 852: 319-325.
- [6] Thom SR, Fisher D, Xu Ya et al. Role of nitric oxide-derived oxidants in vascular injury from carbon monoxide in the rat [J]. Am J Physiol. 1999, 276 (3): 984-992

· 事故报道 ·

一起急性煤焦油中毒事故报告

Report on an accidental acute poisoning by coal tar

朱建全

(常州市疾病预防控制中心, 江苏 常州 213003)

1 中毒经过

某树脂制品厂为个体企业, 主要将废煤焦油进行分馏, 生成苯、甲苯等产品。事故发生在 3 号槽罐, 容量为 40 t, 现内存约 7 t 从焦化厂运来的废煤焦油, 存放已有半月余, 因质量问题需抽出退回焦化厂。2002 年 12 月 17 日上午 8 时许, 开始将废油抽进汽车油罐, 因油太稠, 油管堵塞, 工人王某进入油罐搅拌, 5 min 后被发现已昏倒在罐中, 工人蒋某立即下罐拉王某, 随即也昏倒, 第三人见状后大声呼救, 同时携带绳子下罐救人, 待其他救援人员赶到将 3 人从罐内拉出时, 发现第一、三入罐的工人已死亡, 蒋某尚有呼吸, 立即送就近医院抢救。

2 现场调查

当日下午 3 时许到现场进行调查采样, 首先使用 PGM76 型手持式有机蒸气检测仪作定性检测, 结果显示罐内空气中主要含苯、甲苯、二甲苯及苯乙烯等有机蒸气组成的混合气体, 随即针对这些有机气体及部分其他气体进行监测, 结果显示: 3 号油罐内苯浓度为 $1\,493.6\text{ mg/m}^3$ 、 $1\,630.1\text{ mg/m}^3$; 甲苯 521.9 mg/m^3 、 602.1 mg/m^3 ; 二甲苯 51.1 mg/m^3 、 106.3 mg/m^3 ; 苯乙烯 320.7 mg/m^3 、 159.6 mg/m^3 ; 苯酚 1.46 mg/m^3 、 2.03 mg/m^3 ; 苯胺 0.26 mg/m^3 、 0.31 mg/m^3 ; 硫化氢 0.18 mg/m^3 、 0.18 mg/m^3 。其中苯、甲苯、苯乙烯浓度严重超标, 分别超出国家卫生标准 39.8、5.0、7.0 倍。

3 临床资料

患者, 男, 45 岁, 因在中毒现场施救时坠入废焦油贮罐内, 被拉出时昏迷。医院抢救时查体: R 36 次/分, P 104 次/分, 意识已转清醒, 全身皮肤粘满黑褐色油状物。立即予吸氧, 脱去污染衣物, 剪去污染头发, 清除口腔及鼻内的污物, 先用干棉花擦拭皮肤后, 用温水加洗洁精给予彻底清洗, 最

后用温水全身冲洗、擦干、保温。用胃管抽出胃内油状物约 60 ml 后, 用温牛奶反复洗胃, 后用 50% MgSO_4 溶液导泻, 然后进入 ICU 室监护治疗。入院第二天查体: T 38°C , P 88 次/分, R 24 次/分, BP 16/10.5 kPa。听诊两肺呼吸音低, 右侧可闻及湿啰音。实验室检查 Hb 128 g/L , WBC $22.4 \times 10^9/\text{L}$, PLT $135 \times 10^9/\text{L}$; EKG 示窦性心律; 肝功能正常; 床边胸片示右上肺炎。入院诊断: 煤焦油挥发气体中毒。经吸氧及积极抗感染等对症治疗 10 d 后复查: Hb 120 g/L , WBC $7.2 \times 10^9/\text{L}$, PLT $140 \times 10^9/\text{L}$; 胸片示心肺正常。准予出院, 并嘱定期复查血常规。

4 讨论

按目前所知, 煤焦油中有数百种化合物, 其中重要的有苯、甲苯、二甲苯、苯胺、酚类、萘、蒽、菲、吡啶等。文献中报道煤焦油、沥青对人体的影响主要有光敏性皮炎、接触性皮炎, 而很少有煤焦油引起中毒死亡的报道。从现场调查分析, 中毒事故发生后, 罐盖已打开 7 h 检测的苯、甲苯、苯乙烯浓度仍超出国家标准多倍, 说明当时浓度极高。急性苯、二甲苯中毒时可出现神经系统麻醉作用, 吸入高浓度苯乙烯也可出现神经系统改变, 死亡原因可能是吸入苯、甲苯、苯乙烯混合气体中毒后跌入油罐窒息致死。病人蒋某, 因吸入较高浓度气体中毒后昏倒在废油中, 但没有造成窒息, 入院时主要表现为意识改变及吸入性肺炎, 因吸入了高浓度苯, 且全身皮肤大面积吸收, 因此必须长期随访, 继续观察造血功能的变化。

从这次重大事故中, 必须吸取教训, 责成工厂依法进行化学危险品登记, 强化职业卫生管理, 加强职业卫生知识培训, 使工人在劳动过程中加强自我保护意识, 定期对作业场所的职业病危害因素进行检测, 并在醒目位置张贴警示标志, 如确需进入罐内作业, 必须先强制通风, 穿戴防毒面具, 在有人监护的情况下方可进入, 杜绝类似情况的发生。