大鼠乌头碱中毒心肌细胞凋亡的研究

雷怀成[1]，宋道江[2]，易建华[3]，朱方成[1]，顾玉林[4]

（1. 郧阳医学院法医学教研室，湖北 十堰 442000；2. 十堰市公安局法医室，442000；3. 郧阳医学院附属太和医院病理科，442000；4. 十堰市中级人民法院法医室，442000）

摘要：通过HE染色及凋亡细胞检测技术对大鼠乌头碱中毒后心肌病理变化进行系统研究，对研究结果进行计算机病理学图像分析。结果可见，大鼠在中毒后的不同时间段，心肌细胞凋亡数均高于正常对照组，且同一器官的凋亡细胞数在不同时间段差异有显著性（$P<0.01$）。提示在乌头碱中毒临床症状不明显及毒物分析难以检测的情况下，应用凋亡细胞检测技术可成功检测出心肌细胞的病理学变化。

关键词：乌头碱；中毒；凋亡；免疫组织化学；图像分析

中图分类号：R329.25 文献标识码：A 文章编号：1002－221X(2004)06－0373－02

Studies on apoptosis in myocardial cells after aconitine poisoning in mice

LEI Huai-cheng[1], SONG Dao-jiang[2], YI Jian-hua[3], ZHU Fang-cheng[1], GU Yu-lin[4]

(1. *The Teaching and Research Section of Forensic Medicine, Yunyang Medical College, Shiyan* 442000, *China*; 2. *Department of Forensic Medicine, Shiyan Police Bureau, Shiyan* 442000, *China*; 3. *Department of Pathology of Taihe Hospital Affiliated to Yunyang Medical College, Shiyan* 442000; 4. *Department of Forensic Medicine, The Intermediate People's Court of Shiyan, Shiyan* 442000, *China*)

Abstract: An experimental model of aconitine poisoning was established in Wistar rats, and pathological changes in their myocardial cells and apoptotic cells were examined by hematoxylin-eosin and immunohistochemical staining techniques, and analyzed by computer pathological image competitive system. Results showed that quantities of apoptosis in myocardial cells of poisoning rats were much more than those in control ones at different stages ($P<0.01$). It is suggested that when clinical symptoms of aconitine poisoning were not so apparent or poison could not be detected, pathological changes of important organs could be successfully detected through apoptosis examination.

Key words: Aconitine; Poisoning; Apoptosis; Immunohistochemistry; Image analysis

乌头碱在中医上广泛用于治疗多种疾病，常因炮制不当或服用过量发生中毒死亡。乌头碱中毒后，能导致心率减慢、心律不齐、血压下降、心力衰竭等[1]。由于乌头碱最易于组织腐败和碱性环境下被破坏，因而尸检时难以检测。

关于乌头碱中毒的实验病理形态学研究，国内外报道较少。本研究用乌头碱中毒诱导心肌细胞凋亡，并探讨其发生机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物分组

1.1.1 Wistar大鼠35只，体重（200±10）g，雄性18只，雌性17只，日龄：70 d，由医学院动物房提供。随机分为染毒1 d、2 d、3 d、5 d组和对照组，每组7只。大鼠适应性喂养2周后，染毒组按乌头碱1.46 mg/kg（1/6 LD_{50}，梁氏法[7,8]）一次性灌胃染毒，对照组则灌用等体积无离子水。

1.1.2 标本处理 染毒组和对照组分别在1 d、2 d、3 d、5 d用颈椎脱臼法处死动物，迅速取出完整心脏，用10%的甲醛固定。

1.2 主要试剂

胰蛋白酶（迈新公司），原位细胞凋亡检测试剂盒（In Situ Cell Death Detection Kit，POD）北京中山生物技术有限公司提供，乌头碱（中国药品生物制品检定所提供）。

1.3 方法

1.3.1 HE染色 石蜡切片，常规HE染色。

1.3.2 原位细胞凋亡检测 （1）石蜡切片脱水；（2）胰蛋白酶消化（0.1%）20 min，PBS洗3 min×3；（3）内源性过氧化物酶的阻断，0.6% H_2O_2 甲醇溶液室温放置10 min；（4）血清封闭10 min；（5）标记：10 μl（试剂1）＋90 μl（试剂2），PBS洗3 min×3；（6）（POD）100 μl＋100 μl，37 ℃孵育30 min；（7）DAB显色；（8）苏木素复染。

2 结果

2.1 HE染色形态学观察

心肌间质淤血，部分心肌嗜酸性变、核浓缩（见图1）。

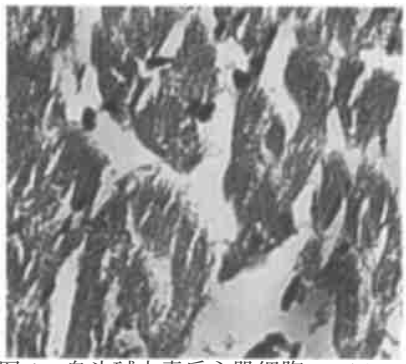

图1 乌头碱中毒后心肌细胞 ×400

收稿日期：2004－03－22；修回日期：2004－05－08

基金项目：湖北省教育厅指导性项目（No. 2001C66）

作者简介：雷怀成（1954－），男，教授，主要从事法医病理学及毒物学研究。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2 免疫组化染色结果

2.2.1 对照组仅见1只大鼠心肌有少量凋亡细胞（图2），其余均为阴性。凋亡细胞核中见明显棕黑色颗粒，背景染色淡。在染毒后的不同时间段内，心肌凋亡细胞数均高于正常对照组，且凋亡细胞数在不同时间段内差异有显著性（$P<0.01$）。尤其是染毒2 d的心肌凋亡细胞数明显多于其他组（图3），而染毒后3 d、5 d呈下降趋势，染毒5 d后有4个心肌标本中未见凋亡细胞（图4）。

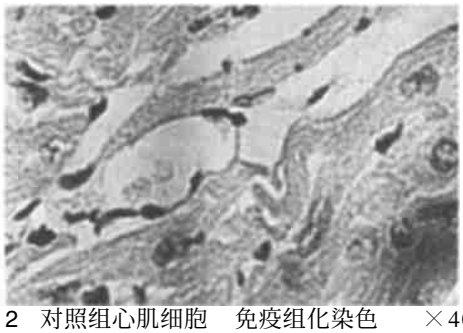

图2 对照组心肌细胞 免疫组化染色 ×400

图3 中毒2 d后心肌中的凋亡细胞 ×400

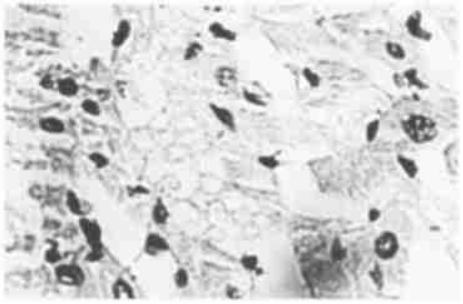

图4 中毒5 d后心肌中的凋亡细胞 ×400

2.2.2 各组均采用Leica-Q500IW病理图像分析仪，镜下测量单位面积凋亡细胞数，并将所测数据输入SPSS7.0进行方差分析。结果显示，心肌细胞凋亡数对照组为（4.6±1.8）个/mm^2；染毒1 d时（19.1±2.3）个/mm^2，2 d时（28.7±3.9）个/mm^2，3 d时（18.4±1.9）个/mm^2，5 d时（5.4±1.9）个/mm^2。染毒1 d、3 d时细胞凋亡数与对照组比较，差异有显著性（$P<0.05$），染毒2 d时与对照组比差异有非常显著性（$P<0.01$）。

3 讨论

3.1 乌头碱中毒导致细胞凋亡的发生机制

细胞凋亡不同于细胞坏死的生理性死亡。研究表明其发生过程中受基因编码的细胞主动“自杀”，存在新的大分子蛋白质的合成[2,3]，具有特殊的形态学变化。其形态学特征主要是核和细胞器固缩，细胞体积缩小，凋亡小体形成[4]。能够诱导细胞发生凋亡的因素主要有激素和生长因子失衡、理化因素、免疫性因素、微生物因素[5]。

乌头碱的主要毒理作用是抑制心肌线粒体中4种呼吸酶[琥珀酸脱氢酶（SDH）、细胞色素氧化酶（CCO）、还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶（NADHD）及乳酸脱氢酶（LDH）]的活性。其损害心肌的机制可能是抑制心肌三羧酸循环和呼吸链的氧化磷酸化作用，使心肌有氧代谢障碍，供能不足，导致心功能紊乱[5~7]。心肌缺氧时间的长短是心肌损害可逆与否的决定因素，也是凋亡刺激系统和抑制系统维持动态平衡的关键。组织缺氧可导致机体处于严重的氧化应激状态，从而激活促凋亡基因，引起细胞凋亡[8,9]。

3.2 凋亡细胞数在乌头碱中毒的不同时间段内差别明显

有研究证明，乌头碱在体内代谢迅速、分布较快，这可能是其体内毒理作用发生迅速的因素之一。机体中毒后凋亡细胞数在达到峰值或维持一相对平台值时，体内的巨噬细胞已经开始了清除工作。由于乌头碱在体内消除迅速，以尿排泄为主，所以对机体的组织器官毒性作用时间短，心肌凋亡细胞逐渐被巨噬细胞吞噬，导致平台下降的速度有所不同。

3.3 乌头碱中毒与凋亡细胞检测技术

乌头碱易被水解破坏，中毒后在临床症状不明显或死因不明的情况下，往往难以检测出来。但是，毒物对机体产生的损害激活了细胞的促凋亡基因，引起组织器官细胞凋亡[10,11]。通过凋亡细胞检测技术可成功地检测出机体主要器官的病理学改变，为毒理学、法医毒理病理学判定中毒及其效应提供了新方法[10]。但该技术仍需在实践中进一步研究探讨。

参考文献：

[1] 黄光照. 法医毒理学[M]. 第2版. 北京：人民卫生出版社，1998. 154-156.

[2] Keer JFR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue Kinetics[J]. Br J Cancer, 1972, 26: 239.

[3] Wyllie AH. Chromatin cleavage in apoptosis: association with Condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis[J]. J Pathol, 1984, 142: 67.

[4] Cohen JJ. Apoptosis: Physiology cell death[J]. J Lab Clin Med, 1994, 124: 761.

[5] 陈忆九，乌仁，黄晓华. 心脏性猝死心肌细胞凋亡研究[J]. 法医学杂志，1999, 15（3）：133-134.

[6] 李宏，刘明俊，陈念祖. 大鼠乌头碱中毒心肌酶的细胞化学研究（Ⅰ）[J]. 中国法医学杂志，1988, 3（3）：199-201.

[7] 梁强荣，刘明俊，胡炳蔚. 大鼠乌头碱中毒心肌酶的研究（Ⅲ）[J]. 中国法医学杂志，1991, 6（2）：8-86.

[8] 梁强荣，刘明俊，胡炳蔚. 大鼠乌头碱中毒心肌酶的研究（Ⅳ）[J]. 中国法医学杂志，1991, 6（3）：140-141.

[9] Narula J, Haider N, Virmani R, et al. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure[J]. N Engl J med, 1996, 335（16）：1224.

[10] 程亦斌，刘宁国，张建华，等. 毒鼠强中毒的凋亡细胞研究[J]. 法医学杂志，2002, 18（3）：137-139.

[11] 陈忆九，黄晓华，陈龙. 心力衰竭心肌凋亡基因蛋白的研究[J]. 法医学杂志，2000, 16（1）：10-11.

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net