

急性一氧化碳中毒家兔红细胞微观血流变学变化及其意义的探讨

王喜福¹, 贾彬彬², 关里¹, 张雁林¹, 朱明霞¹, 赵金垣^{1*}

(1 北京大学第三医院职业病研究中心, 北京 100191; 2 北京大学医学部血液流变学中心, 北京 100191)

摘要: 目的 探讨急性一氧化碳 (CO) 中毒家兔红细胞微观血流变学变化及其在急性 CO中毒迟发性脑病 (DEACMP) 发病中的作用。方法 通过腹腔注射 CO方法制备急性 CO中毒模型, 使血中 HbCO浓度达到 50%以上持续 30~36 h 动态检测初次染毒后 6 h及末次染毒后 30 min 24 h 3 d 5 d 7 d 14 d时颈静脉血红细胞变形性、红细胞渗透脆性、红细胞膜流动性、红细胞电泳率、红细胞脂质过氧化产物丙二醛 (MDA) 等指标的变化并进行分析。结果 与正常对照组相比, 家兔末次染毒后 30 min红细胞变形性、红细胞渗透脆性、膜流动性显著下降, 逐渐恢复后, 于第 3天再次降低, 持续约 14 d 末次染毒后 30 min 红细胞电泳率增快, 而后逐渐恢复正常, 但 3 d后其值逐渐减慢, 持续约 14 d 红细胞脂质过氧化产物 MDA含量于末次染毒后 30 min明显升高, 而后虽然出现下降趋势, 但中毒 3 d后再次升高, 14 d时仍高于正常。结论 急性 CO中毒早期和后期均出现了红细胞变形性、膜流动性、渗透脆性、电泳率等流变学指标的异常变化; 红细胞微观血流变学的此种异常变化不仅加速了急性 CO中毒早期脑组织缺血缺氧性病变的发生, 而且很有可能在急性 CO中毒迟发性脑病的发病中发挥至关重要的作用; 而红细胞脂质过氧化损伤则可能是造成红细胞上述流变学异常变化的病因学基础。

关键词: 急性一氧化碳中毒; 迟发性脑病; 红细胞微观血流变学

中图分类号: R595.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2010)05-0323-04

Microheological changes of erythrocyte in cerebral circulation of rabbits with acute carbon monoxide poisoning and their significance

WANG Xi-fu, JIA Bin-bin, GUAN Li, ZHANG Yan-lin, ZHU Ming-xia, ZHAO Jin-yuan*

(1 Research Center of Occupational Medicine, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China; 2 Research Center of Hemorheology, Medical College, Peking University, Beijing 100191, China)

Abstract Objective To investigate the microheological changes of erythrocytes in cerebral circulation of rabbits after acute carbon monoxide (CO) poisoning and their possible roles in etiology of acute CO poisoning and delayed encephalopathy. Methods The animal model was prepared by intraperitoneal injection of CO at regular interval and the level of HbCO in blood reached above 50% for 30~36 h. Then RBCs' deformability, osmotic fragility, membrane fluidity, viscoelasticity and MDA were measured at 6 h after the first exposure, 30 min, 1 d, 3 d, 5 d, 7 d, and 14 d after the last exposure. Results Compared with control, the parameters including RBCs' deformability, osmotic fragility, membrane fluidity decreased significantly at 30 min after the last exposure and dropped again from 3 d and recovered to normal levels till 14 d. The RBC electrophoresis rate increased at 30 min and then recovered. The content of RBC lipid peroxidation product MDA augmented remarkably at 30 min and then dropped. But the high level of MDA was kept till 14 d. Conclusion We observed the abnormalities in hemorheological parameters in the early and late stages of acute CO poisoning. These hemorheological changes may not only accelerate the happening of ischemia in brain tissues at the early stage of acute CO poisoning but also play an important role in the etiology of DEACMP. The RBC lipid peroxidation may be the pathological basis for the abnormalities of hemorheology.

Key words: CO poisoning; delayed encephalopathy; microheological change of erythrocyte

急性一氧化碳 (carbon monoxide, CO) 中毒是中毒性死亡的主要原因^[1], 尽管病人得到了积极救治, 但仍有 10%~30%患者经过数日或数周表现为

正常或基本正常的“假愈期”后, 再次出现以“痴呆”为主要临床表现的“急性 CO中毒迟发性脑病 (delayed encephalopathy after acute CO poisoning, DEACMP)”。其特点是: (1) 发病部位——主要集中在白质、海马、苍白球等脑组织供血比较薄弱的部位; (2) 高危因素——本病好发于老年, 常合并有高血压、冠心病及脑梗塞等心脑血管病史; (3) 迟

收稿日期: 2010-05-26

基金项目: 国家自然科学基金项目资助 (编号: 30471439)

作者简介: 王喜福 (1974-), 男, 主治医师, 现工作单位为北京大学首钢医院心内科。

* 通讯作者, E-mail: zhaojinyuan@sina.com

发性——急性 CO中毒后需经数日或数周的“假愈期”后出现迟发性脑病。本课题组通过动物实验率先证实，CO中毒后，全血黏度在短暂减低后呈现持续升高趋势^[2,3]，并推断此种宏观血液流变学变化引起的脑循环灌注减低很有可能参与了 DEACMP 的发病过程。为了进一步观察急性 CO中毒后微观血流变学的变化及其在 DEACMP 发生发展中的可能作用，本文拟对急性 CO中毒家兔的红细胞微观血流变学特性做进一步研究，以为彻底澄清 DEACMP 的具体机制提供更确切的依据。

1 材料和方法

1.1 动物及模型制备

参照文献[4]略加改动，普通健康、雄性新西兰大耳白兔体重 2.0~2.5 kg (北京大学医学部动物中心提供)。实验前一天禁食，将动物随机分为对照组和 CO染毒组，后者又分为初次染毒后 6 h 及末次染毒后 30 min、1 d、3 d、5 d、7 d、14 d 共 7 个亚组，每组 8 只动物。染毒组家兔采用腹腔间隔注射 CO 法 (由北京燕山石化气体公司提供，99.9%) 进行染毒，首次剂量 200 ml/kg，以后按 6 h 间隔共追加注射 5 次，剂量改为 100 ml/kg，使血浆 HbCO 水平维持在 50% 以上持续 30~36 h。对照组按同样方法注射空气。分别取对照组、初次染毒后 6 h 及末次染毒后 30 min、1 d、3 d、5 d、7 d、14 d 颈静脉血 10 ml 待测。

1.2 检测指标

1.2.1 红细胞变形指数 (deformation index, DI) 取全血 20 μ l 加入 2.5 ml 15% 的 PVP 溶液中，配成浓度为 21×10^7 个 /ml 的红细胞悬液，用传统激光衍射法测定红细胞剪切率在 50~1 000 /s 的变形指数。

1.2.2 红细胞膜流动性 取肝素抗凝血 2 ml，3 000 r/min 离心去血浆及白细胞，取红细胞 20 μ l 加入 1 ml pH 7.9 的低渗 Tris 溶液中，静止 1 h 以上，然后 12 000 r/min 下离心，弃上清，加入等渗的 PBS 洗 2 次，然后将细胞膜悬浮在 0.5 ml 等渗的 PBS 溶液和 0.5 ml 的四氢呋喃混合液中，再加入 0.5 μ l 浓度为 2×10^{-6} mol/L DPH 溶液，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min，用 Hitachi 850 型荧光分光光度计测量红细胞在偏振片不同角度时的荧光强度 I，激发波长 (λ_{ex}) 为 362 nm，发射波长 (λ_{em}) 为 432 nm，狭缝宽度 5 nm。根据公式计算荧光偏振度 (P)：

$$P = \frac{I_V - I_H}{I_V + I_H}$$

式中： I_V 为起偏器和检偏器光轴均在垂直方向时的荧光度， I_H 为起偏器光轴在垂直方向、检偏器

光轴在水平方向时的荧光度，G 为校正因子。

1.2.3 红细胞渗透脆性 取全血 20 μ l 分别加入到不同浓度的 PBS 溶液中 (用等渗 PBS 和蒸馏水按照不同比例混合配置而成的 11 种渗透压在 0~295 mOsm/kg 的 PBS 溶液)，混匀后静止 30 min，2 000 r/min 离心 20 min，取上清在 UNICO UV-2000 型紫外分光光度计上测定波长 $\lambda = 540$ nm 的透光率 (T_n)，以蒸馏水为空白对照，以加 100% 蒸馏水的上清液为全溶对照，然后根据公式计算出不同渗透压下的红细胞溶血率 (H_n)，做出渗透压曲线。

$$H_n = \frac{T_{300} - T_n}{T_{300} - T_{40}} \times 100\%$$

式中： T_{300} 、 T_{40} 分别表示渗透压为 300、40 mOsm/kg 时的透光率。

1.2.4 红细胞电泳率的测定 用 9% 的蔗糖溶液将细胞配制成 2×10^6 /ml 的悬液，用 LANC2100 型细胞电泳仪 (复旦大学医学院出品) 测量红细胞电泳率 (电压 40 V，30 $^{\circ}$ C)，每个样品测量 10 个细胞，求其平均值。

1.2.5 红细胞 MDA 测定 按南京建成生物工程研究所生产的 MDA 检测试剂盒进行操作。

1.3 统计分析

实验数据以均数 $\pm$ 标准差表示，采用 SPSS11.0 统计软件进行单因素方差分析 (LSD)。

2 结果

2.1 染毒后血 HbCO 含量的变化

如图 1 所示，经腹腔注射 CO 后，血 HbCO 水平于 10 min 后即明显升高，30 min 达高峰，2~4 h 内趋于稳定，6 h 后呈现逐渐衰减状态。一般单次注射 CO 后 (200 ml/kg)，体内 HbCO 的半排出期为 6~8 h，14 h 能恢复到正常生理水平；连续间隔腹腔注射 CO 可使血 HbCO 浓度在 50% 水平上维持 30 h 以上。对照组血中 HbCO 水平始终在 3% 以下。

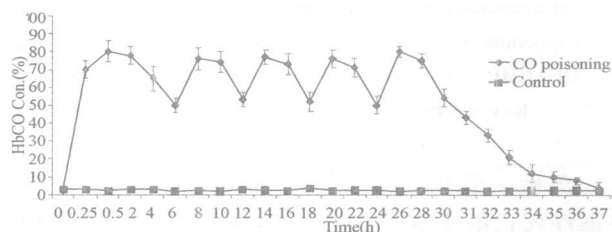
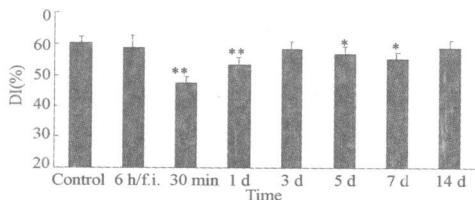


图 1 急性 CO 中毒家兔血 HbCO 含量的变化

2.2 红细胞变形性变化

与对照组比较，初次染毒后 6 h 红细胞变形性无明显变化，而末次染毒后 30 min 红细胞变形性明显低于正常，而后呈现逐渐恢复趋势，3 d 后再次降低，7 d

左右达峰值,第 14 d时已基本恢复正常。见图 2



注:与对照组比较, * P<0.05 ** P<0.01.

图 2 急性 CO中毒家兔红细胞变形性的变化

2.3 红细胞膜流动性的变化

末次染毒后 30 min 红细胞膜荧光偏振度明显升高, 尽管 24 h 后呈现恢复趋势, 但 3 d 后仍再次升高, 至 14 d 时方大致恢复正常, 见表 1。红细胞膜的偏振度升高说明其膜流动性降低, 提示红细胞膜流动性在中毒即刻和后期均出现不利脑组织灌注的表现。

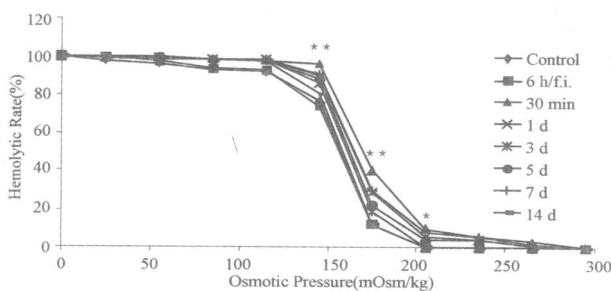
表 1 急性 CO中毒家兔红细胞膜荧光偏振度和红细胞 MDA 的变化 (x±s)

组别	动物数 (n)	荧光偏振度 (P)	红细胞 MDA (μmol/L)
对照组	8	0.162±0.014	7.12±0.45
初次染毒后 6 h 组	8	0.175±0.012	7.48±0.55
末次染毒后 30 min 组	8	0.332±0.021**	16.30±0.65**
末次染毒后 1 d 组	8	0.251±0.016**	13.70±0.81**
末次染毒后 3 d 组	8	0.176±0.011	10.43±0.73*
末次染毒后 5 d 组	8	0.244±0.009*	12.41±0.51**
末次染毒后 7 d 组	8	0.285±0.013**	15.12±0.54*
末次染毒后 14 d 组	8	0.178±0.015	11.12±0.61*

注:与对照组比较, * P<0.05 ** P<0.01.

2.4 红细胞渗透脆性的变化

如图 3 所示, 在渗透压为 145 mOsm/kg 的溶液中, 末次染毒后 30 min 红细胞的破碎率即较正常的对照组明显升高, 然后逐渐恢复, 3 d 后呈现再次升高的趋势, 7 d 时仍高于正常。提示急性 CO 中毒即刻和后期均出现了红细胞抗渗透能力的降低。



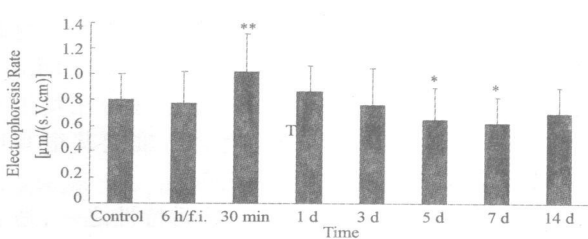
注:与对照组比较, * P<0.05 ** P<0.01

图 3 急性 CO中毒家兔红细胞渗透脆性的变化

2.5 红细胞电泳率的变化

急性 CO中毒后红细胞电泳率的检测发现, 末次染毒后 30 min 红细胞电泳率即明显增快, 而后逐渐恢复, 3 d 后再次增快, 直至 14 d 才基本恢复正常。

见图 4



注:与对照组比较, * P<0.05 ** P<0.01

图 4 急性 CO中毒家兔红细胞电泳率的变化

2.6 红细胞丙二醛 (MDA) 含量的变化

末次染毒后 30 min 红细胞 MDA 含量已明显升高, 而后出现逐渐恢复趋势, 3 d 后再次升高, 14 d 时仍高于正常, 见表 1。提示脂质过氧化损伤参与本病的整个发展过程, 并很可能是 DEACMP 发病机制的重要环节。

3 讨论

血液流变学是研究血液成分的变形和流动特性的一门学科, 分为宏观血液流变学和微观血液流变学两类。宏观血液流变学探讨全血、血浆与血管的宏观流变学特性; 微观血液流变学则是从细胞和分子水平来阐述影响宏观血液流变学的各个重要因素, 它是推动血液流变学深入发展的桥梁^[5]。

红细胞的变形性、膜流动性、渗透脆性和电泳率是红细胞最重要的流变学参数, 任何一项发生变化均会改变红细胞流变学特性, 干扰红细胞的变形、携氧和微循环灌注能力。许多心脑血管疾病如急性心肌梗塞、脑血栓等在发病的早期即出现红细胞变形性、膜流动性等参数的异常变化, 而给予改善微循环、降低血黏度等治疗不仅可以改善红细胞微观流变学特性, 而且能延缓病情的发展, 可见红细胞微观流变学特性的变化不仅是疾病发展过程的病理特征, 而且很可能是反映疾病发展进程的重要指标^[6,7]。因此, 研究急性 CO 中毒后红细胞微观流变学变化不仅有助于探讨急性 CO 中毒及其迟发性脑病的发病机制, 且为有效预防和治疗急性 CO 中毒和 DEACMP 提供重要的理论依据。

红细胞变形性通常用来表示血流中红细胞改变自身形状通过毛细血管的能力, 良好的变形性是红细胞运输 O₂ 和保持微循环灌注的必要条件。红细胞变形性下降不仅会造成红细胞通过微小血管的能力下降, 而且还能通过升高高切变率下的全血黏度来增加血流阻力, 造成血流速度减慢, 组织灌注不足, 从而导致微循环灌注障碍^[8]。本实验结果发现, CO 末次染毒后 30 min 红细胞变形性即明显降低, 虽 24 h 后有所恢复, 但中毒后期再次呈现降低趋势 (3~14 d)。提

示急性 CO中毒早期即存在脑组织灌注不足这一病理生理基础,它可能是造成急性中毒性脑损伤的重要因素之一;而后期红细胞变形性的持续降低为 DEACMP提供了必要条件,此种脑循环灌注障碍在发生时间上与 DEACMP的迟发性十分吻合,推测其很有可能是导致 DEACMP发生的重要环节。

红细胞膜流动性是生物膜的重要特性之一,适合的膜流动性是细胞维持正常功能的前提条件。膜流动性降低会引起红细胞变形性下降、聚集性增强、全血黏度升高,并引发血小板聚集^[9]。本研究发现,急性 CO中毒家兔在中毒即刻(30 min)和后期均出现红细胞膜流动性降低,提示红细胞膜流动性的异常变化也可能是 DEACMP发病机制中的重要因素。研究显示,红细胞膜流动性下降可以引起红细胞膜 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶等多种离子 ATP 酶的活性降低,从而使红细胞膜转运多种离子的功能紊乱,造成红细胞内 Na^+ 等离子浓度的增高和渗透压的异常变化,导致渗透脆性下降^[10]。红细胞渗透脆性是红细胞的重要生理特征之一,它是反映红细胞在低渗溶液中抵抗能力的重要指标;红细胞渗透脆性降低提示红细胞脆性升高,容易在低渗溶液或在外力作用下发生破裂。本实验结果表明,作为红细胞微观流变学的重要指标之一的红细胞渗透脆性也参与了急性 CO中毒和 DEACMP的发病过程。

电泳率是红细胞的又一生理特性,它反映了红细胞表面负电荷数量的多少;红细胞表面电荷越少,红细胞与血管内皮细胞以及红细胞间的排斥力越小,红细胞越易聚集并与血管内皮细胞粘附,造成血流速度减慢、血流阻力增加,不利于微循环灌注^[11]。本实验的研究结果显示,急性 CO中毒即刻,红细胞电泳率加快,出现了有利于微循环灌注的变化,其可能是导致急性 CO中毒即刻全血黏度下降的原因之一;而中毒后期红细胞电泳率持续减慢所致的微循环灌注减低,则可能为 DEACMP发生、发展提供了病理生理基础。

脂质过氧化损伤是导致多种疾病发生的关键环节,MDA作为脂质过氧化反应的产物,不仅反映脂质过氧化的程度,也间接反映氧自由基的生成量。红细胞膜的特异结构——膜脂质双分子和膜骨架蛋白分子按三维结构排列成流态,是红细胞极易受自由基氧化损伤的重要结构基础。红细胞氧化损伤不仅可以造成红细胞 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶结构的直接破坏,而且能导致膜磷脂降解及不饱和脂肪酸的过氧化,最终引起红细胞流变学出现异常变化^[12]。本研究显示,急性 CO中毒即刻和后期均出现红细胞 MDA含量的明显升高,可见,红细胞氧化损伤可能参与了急性 CO中毒

和 DEACMP的整个发病过程,推测红细胞脂质过氧化损伤可能是 CO中毒后红细胞微观流变学异常的启动环节,但具体机制尚需进一步探索。

总之,急性 CO中毒早期及后期均出现了红细胞微观流变学的异常变化。尽管 CO中毒早期宏观血流变学(包括 PT、APTT明显延长)出现了有利于微循环灌注的表现^[13],但红细胞微观流变学本身并无助于脑组织灌注的改变,相反,其可能作为一重要的影响因素参与了急性脑组织缺血、缺氧的病理过程;而中毒后期,红细胞微观流变学的异常变化所致的全血黏度升高、血流阻力增加、血流淤滞的现象很可能是导致脑组织灌注减低、诱发急性 CO中毒迟发性脑病的重要病理基础。

参考文献:

- [1] Akiko K, Yoshiaki S, Ayumi S, et al. Delayed neuropsychiatric syndrome in a child following carbon monoxide poisoning [J]. *Brain Dev* 2007; 29: 174-177.
- [2] Kao L W, Nanagas K A. Carbon monoxide poisoning [J]. *Emerg Med Clin North Am* 2004; 22: 985-1018.
- [3] Theodore V, Vassiliki A B, Antigoni M. Fatal poisoning in the region of Epirus, Greece during the period 1988-2004 [J]. *J Clin Forensic Med* 2006; 13: 321-325.
- [4] 温韬, 赵金垣. 一种制备急性 CO中毒迟发性脑病动物模型的新方法 [J]. *中国工业医学杂志*, 2003; 16: 129-132.
- [5] Athanassiou G, Moutzouri A, Kouraki A, et al. Effect of hydroxyurea on the deformability of the red blood cell membrane in patients with sickle cell anemia [J]. *Clin Hematol* 2007; 36: 195-202.
- [6] Tine LM De Backer, Marc De Buyze, Patrick Segers, et al. The role of whole blood viscosity in premature coronary artery disease in women [J]. *Atherosclerosis* 2002; 165: 367-373.
- [7] 曹素贞, 黄文堂, 乔玉荷, 等. 脉络宁对短暂性脑缺血发作的预后及血流变学的影响 [J]. *中西医结合实用临床急救*, 1995; 2(5): 208-209.
- [8] Rickard R S, Wang L, Jelenc H. Erythrocyte oxidative damage in chronic fatigue syndrome [J]. *Arch Med Res* 2007; 38: 94-98.
- [9] Tozzi C M G. Erythrocyte membrane fluidity in subjects affected with reversible attacks [J]. *Riv Eur Sci Med Farmacol* 1991; 13(122): 43-49.
- [10] Lopez-Pedrosa JM, Torres M, I Fernandez M, I, et al. Severe malnutrition alters lipid composition and fatty acid profile of small intestine in newborn piglets [J]. *J Nutr* 1988; 128(2): 224-226.
- [11] Williams J G D M A F. The dimensions of the T lymphocyte glycoprotein in leukosia and identification of linear protein epitopes that can be modified by glycosylation [J]. *EMBO J* 1991; 10: 893-902.
- [12] Baskurt O K, Meiselman H J. Susceptibility of equine erythrocytes to oxidant induced rheologic alterations [J]. *Am J Vet Res* 1999; 60: 1301-1306.
- [13] 王喜福, 王现伟, 关里, 等. 急性一氧化碳中毒家兔脑血流变学和凝血功能的变化 [J]. *中国工业医学杂志*, 2008; 21(6): 347-350.