

0.01), 但肾脏脏重量、脏器系数及肾脏病理组织学检查未见异常改变, 三氟乙酰乙酸乙酯是否对动物肾脏产生病理损害还有待进一步的研究。

高剂量组附加组动物停止染毒 14 d 后, 各项指标与对照组附加组动物比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。提示三氟乙酰乙酸乙酯在停止染毒 14 d 后恢复正常。

综合分析, 三氟乙酰乙酸乙酯具有一定的蓄积毒性作用, 其主要毒作用部位可能是肝脏、免疫器官、造血系统和肾脏,

但对上述器官的损害在停止接触后具有可逆性; 其对雌、雄 SD 大鼠亚急性经口毒性试验的最大无作用剂量 (NOAEL) 为 50.0 mg/kg, 最小有作用剂量 (LOAEL) 为 100.0 mg/kg。

参考文献:

- [1] 张国华, 郑纯智. 三氟乙酰乙酸乙酯的合成 [J]. 农药, 2007, 46 (12): 823-824.
- [2] 王凤鸣, 李慧, 程东, 等. 三氟乙酰乙酸乙酯大鼠急性经口毒性实验研究 [J]. 口岸卫生控制, 2007, 9 (4): 9-10.

战(创)伤失血性休克对氰类化合物毒性效应的影响

Effect of hemorrhagic shock by war wound and trauma on toxicity of cyanides

刘辉, 尹芳秋, 燕颖军, 贾庆军, 王晓红, 边巍

LIU Hui, YIN Fang-qiu, YAN Ying-jun, JIA Qing-jun, WANG Xiao-hong, BIAN Wei

(中国人民解放军白求恩医务士官学校卫勤教研室, 河北 石家庄 050081)

摘要: 建立大鼠失血性休克复合氰化钾急性染毒模型, 观察大鼠一般情况及肝、肾病理学改变, 测定血液氰离子 (CN^-) 含量和肝脏细胞色素氧化酶活性。结果显示, 与单纯中毒比较, 复合损伤大鼠肝、肾出现明显病理学改变; 失血条件下血液氰离子含量升高更为显著, 且细胞色素氧化酶活性抑制程度明显加重。表明失血可明显干扰氰离子的代谢过程, 进一步增强氰类化合物的毒性效应。

关键词: 失血性休克; 氰化钾; 细胞色素氧化酶; 毒性效应

中图分类号: R349.1 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2013)04-0273-02

氰类化合物(如氢氰酸、氰化钾等)是一种典型的双用途毒剂, 平时作为化工原料大量贮存, 战时即可转化成军用毒剂使用。中毒后解离出的氰根离子抑制线粒体呼吸链细胞色素氧化酶活性, 使细胞氧化磷酸化过程受阻^[1]。失血性休克是战(创)伤的主要表现, 若同时发生化学中毒会对机体产生更为严重的损害^[2]。本研究观察失血条件下氰化物毒性效应的变化特点, 以为化学复合伤救治提供毒理学依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

氰化钾 (KCN, 分析纯, 石家庄博海生物公司), 细胞色素 C、盐酸吡哆醛 (美国 Sigma 公司), 其他试剂为国产分析纯; RM6240 多通道生理记录仪 (成都仪表厂), 荧光分光光度计 (上海圣科仪器设备公司), 康维氏微量扩散皿 (武汉华威公司)。

1.2 动物模型的建立

收稿日期: 2012-07-31; 修回日期: 2012-09-27

基金项目: 全军医学科技“十二五”科研基金面上项目 (CWS11J156)

作者简介: 刘辉 (1974—), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 化学毒剂复合伤防治。

健康成年 SD 大鼠, SPF 级, 体重 (220 ± 20) g, 由河北医科大学实验动物中心提供。实验动物分为假手术组 (sham operation, SO)、失血性休克组 (hemorrhagic shock, HS)、KCN 中毒组 (potassium cyanide intoxication, KCN)、失血性休克复合 KCN 中毒组 (hemorrhagic shock combined potassium cyanide intoxication, HS + KCN), 每组设 6 只动物。采用 Wiggers 改良法建立失血性休克模型^[3], 大鼠经 2% 戊巴比妥腹腔注射麻醉后, 固定于手术平台上行左侧颈总动脉插管术, 经三通管分别连接多通道生理监测仪 (监测动脉血压) 和 10 ml 注射器 (内含 125 U/ml 肝素盐水), 反复缓慢放血至平均动脉压 40 mm Hg, 并维持 0.5 h。手术后, SO 组不作处理, HS 组维持平均动脉压 40 mm Hg, KCN 组腹腔注射 KCN (3.0 mg/kg), HS + KCN 组失血休克后腹腔注射 KCN。各组分别于处理后 15、30、60 和 120 min 采样。

1.3 血液氰离子含量的测定

各实验组大鼠于不同时间点采集血液标本, 以微量扩散法测定氰离子含量^[4]。首先取 0.0、0.1、0.5、1.0、5.0、10.0 和 20.0 $\mu\text{g/ml}$ 共 7 个浓度 KCN 标准液制定标准曲线。康维氏微量扩散皿中央池加入 2.0 ml 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液, 外池加入 1.0 ml 氰化钾标准液, 再加入 4.0 ml 50% 硫酸溶液, 室温扩散 3 h。从中央池吸取 1.0 ml 加入到测试管中, 测试管中包含 3.5 ml 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液, 振荡混匀, 加入 0.5 ml 6×10^{-3} mol/L 盐酸吡哆醛。50 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1 h, 加入 Na_2CO_3 终止反应。最后用荧光分光光度计于激发波长 365 nm、发射波长 432 nm 进行检测。

1.4 细胞色素氧化酶活力的测定

实验步骤参照文献^[5]。冰浴条件下分离肝组织, 按 5% (m/V) 加入 10 mmol/L 预冷的 PBS 匀浆备用。在 1 cm 光径比色皿中加入 10 mmol/L PBS 2.4 ml (45 $^{\circ}\text{C}$), 并加入还原纯化好的 0.15 mmol/L 细胞色素 C 0.5 ml, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、550 nm 波长下测 A 值, 再加入之前制备的 0.1 ml 肝组织匀浆液, 摇匀, 立即开始计时, 随后每隔 10 s 测定一次 A 值, 共测定 3 min。

以最小二乘法经原点求其斜率 k 值,除以组织蛋白含量 (g/L),即为细胞色素 C 氧化速率常数,代表细胞色素氧化酶活性。采用 Lorry 法进行肝组织蛋白定量。

1.5 统计学分析

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 软件进行单因素方差分析,两组间均数比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况及肝、肾病理学变化

与单纯中毒比较,失血复合 KCN 中毒大鼠症状出现的早且严重,主要表现为呼吸困难、抽搐、惊厥等症状提前并恢复较慢。KCN 中毒大鼠肝细胞以充血、淤血、颗粒样变为主要病理改变,而在失血性休克条件下,中毒大鼠肝脏病理损伤更为严重,表现为肝间质淤血、肝细胞肿胀及嗜酸性变等;肾脏病变以肾小球充血、水肿及肾小管胞浆嗜酸性变为主,复合损伤重于单纯中毒,且病变持续加重,不易恢复。

表 1 失血性休克复合 KCN 中毒大鼠血液 CN^- 含量及细胞色素氧化酶活性的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CN^- ($\mu\text{g/ml}$)				细胞色素氧化酶活性 [$\text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$]			
		15 min	30 min	60 min	120 min	15 min	30 min	60 min	120 min
SO 组	6	0.108 ± 0.016	0.111 ± 0.025	0.107 ± 0.020	0.105 ± 0.019	0.417 ± 0.026	0.403 ± 0.035	0.421 ± 0.038	0.411 ± 0.039
HS 组	6	0.124 ± 0.036	0.122 ± 0.017	0.135 ± 0.026	0.137 ± 0.027	0.398 ± 0.031	0.387 ± 0.047	0.401 ± 0.046	0.404 ± 0.027
KCN 组	6	$1.507 \pm 0.144^{**}$	$1.985 \pm 0.187^{**}$	$0.998 \pm 0.216^{**}$	$0.509 \pm 0.120^*$	$0.308 \pm 0.044^{**}$	$0.337 \pm 0.034^*$	$0.358 \pm 0.030^*$	0.389 ± 0.028
HS + KCN 组	6	$2.682 \pm 0.479^{##}$	$2.884 \pm 0.539^{##}$	$1.687 \pm 0.577^{\#}$	$1.207 \pm 0.320^{\#}$	$0.202 \pm 0.029^{##}$	$0.244 \pm 0.020^{\#}$	$0.287 \pm 0.037^{\#}$	$0.320 \pm 0.032^{\#}$

注:与 SO 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 KCN 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

3 讨论

失血性休克复合化学中毒是平战时可能发生的一种特殊复合伤,两种因素作用于机体将产生联合损伤效应。本研究结果显示,与单纯 KCN 中毒比较,失血条件下大鼠中毒症状提前且更为严重,提示失血性休克引发的组织缺血、缺氧可能会导致大鼠对氰化物敏感性增强。病理学观察发现,复合损伤大鼠肝、肾出现的充血、水肿、嗜酸性变等病理改变明显加重,从而进一步干扰了氰离子体内代谢,加大了现场急救和临床救治的难度。

血液氰离子含量是氰类化合物的主要毒性指标之一^[6]。本实验中大鼠在失血性休克后给予亚致死剂量氰化钾 (3.0 mg/kg) 腹腔注射,血液中氰离子浓度呈现先上升后下降的趋势,在中毒 30 min 时达峰值,且各时间点均明显高于单纯 KCN 中毒组,提示失血进一步促进了血液氰离子浓度的升高,两种损伤因素在机体内发挥了协同效应。在生理条件下,进入体内的氰离子在肝脏硫氰酸生成酶的作用下生成硫氰酸盐,通过肾脏随尿液排出而解毒^[7]。实验结果显示,在 KCN 中毒 120 min 时血液氰离子含量呈下降趋势,但复合损伤组在该时间点氰离子浓度仍明显高于单纯中毒组,表明失血性休克可能通过加重肝、肾损伤,进一步影响了氰离子在体内的正常代谢。

氰类化合物进入机体后解离出 CN^- ,通过抑制线粒体呼吸链细胞色素氧化酶的活性,阻断氧化磷酸化过程,导致 ATP 合成不足。本研究发现,在 KCN 中毒 15 min 时细胞色素

2.2 失血性休克复合 KCN 中毒大鼠血液 CN^- 含量变化

失血性休克组血液 CN^- 含量较假手术组略有升高,但差异无统计学意义; KCN 中毒组血液 CN^- 含量逐渐上升,并于中毒后 30 min 达峰值,至 120 min 时呈下降趋势;与单纯中毒组比较,失血性休克复合 KCN 中毒大鼠血液 CN^- 含量在各时间点升高趋势更为明显,差异有统计学意义,且 CN^- 含量恢复速度明显减缓,见表 1。

2.3 失血性休克复合 KCN 中毒对大鼠细胞色素氧化酶活性的影响

失血性休克组肝脏细胞色素氧化酶活性较假手术组略有降低,但差异无统计学意义;在 KCN 中毒后 15 min 细胞色素氧化酶活性即显著下降,在中毒 60 min 后呈缓慢恢复趋势。失血性休克复合 KCN 中毒大鼠细胞色素氧化酶活性变化趋势与单纯中毒组一致,但各时间点均显著低于单纯中毒组,见表 1。

氧化酶活性显著降低,随后出现了缓慢上升的趋势。与单纯中毒比较,失血性休克进一步加重了氰化物对该酶活性的抑制,且活性恢复速率减慢,提示失血和化学中毒两种损伤因素在细胞色素氧化酶活性抑制中可能有叠加效应。

参考文献:

- [1] Manar R, Bonnard M, Rast C, et al. Ecotoxicity of cyanide complexes in industrially contaminated soils [J]. J Hazard Mater, 2011, 197 (2): 369-377.
- [2] 朱乐明,董兆君. 失血性休克复合氰化钠中毒对兔心功能的影响 [J]. 医学研究生学报, 2010, 23 (5): 460-464.
- [3] 胡同增,张白云. 实验外科学 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2000, 287-289.
- [4] Morgan R L, Way J L. Fluorometric determination of cyanide in biological fluids with pyridoxal [J]. J Anal Toxicol, 1980, 4 (2): 78-84.
- [5] Ostermeier C, Iwata S, Michel H. Cytochrome oxidase [J]. Curr Opin Struct Biol, 1996, 6 (4): 460-467.
- [6] 李云鹏,赵远鹏,赛燕,等. 高原缺氧对氰离子代谢的影响及其中毒机制研究 [J]. 解放军医学杂志, 2008, 33 (2): 132-135.
- [7] Mathangi D C, Shyamala R, Vijayashree R, et al. Effect of alpha-ketoglutarate on neurobehavioral, neurochemical and oxidative changes caused by sub-chronic cyanide poisoning in rats [J]. Neurochem Res, 2011, 36 (3): 540-548.