

腹腔注射法制备一氧化碳中毒迟发性脑病大鼠模型

廖秋菊 王晶[△] 秦俭 王长远 田欣

(首都医科大学宣武医院急诊科 北京 100053)

摘要 目的:建立可靠的急性一氧化碳(CO)中毒迟发性脑病的动物模型。方法:雄性SD大鼠,分次腹腔注射CO染毒制备模型,动态监测尾血碳氧血红蛋白(HbCO)浓度;Morris水迷宫检测大鼠1-5w逃避潜伏期;尼氏染色及TUNEL原位末端凋亡染色检测大脑皮质及海马细胞损伤及凋亡。结果:染毒后,大鼠出现典型的CO重度中毒症状,体内血液HbCO浓度迅速升高,使用分次腹腔注射法,大鼠可维持长时间(>12h)高HbCO状态(HbCO>48%),中毒组大鼠水迷宫检测认知功能较对照组下降,病理学检查显示大鼠出现脑细胞损伤、凋亡明显。结论:本研究建立了一种较为符合迟发性脑病临床特征的动物模型,具有简单、可靠、重复性好的特点,为深入研究急性CO中毒致迟发性脑损伤的机制提供可靠基础。

关键词 急性一氧化碳中毒 迟发性脑病 动物模型 大鼠

中图分类号:Q95-3 R595.1 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)06-1033-04

Preparation of carbon monoxide poisoning delayed encephalopathy rat model by intraperitoneal injection

LIAO Qiu-ju, WANG Jing[△], QIN Jian, WANG Chang-yuan, TIAN Xin

(Department of Emergency, Xuanwu Hospital, Beijing, 100053, China)

ABSTRACT Objective: To establish a convenient and reliable delayed neuropsychologic sequelae rat model with acute carbon monoxide (CO) poisoning. **Methods:** Male SD rats were injected CO repeatedly, then dynamically monitored the carboxyhemoglobin (HbCO) level in blood for ascertaining the administration dose and process; Cognitive ability was measured by the escape latency of searching the objective in the Morris watermaze; Neuronal injury were detected by Nissl stain, TUNEL stain was used to assess apoptosis. **Results:** The HbCO levels rised rapidly, and kept at higher level (>48%) for long time (>12h) by the method of repeated injection of CO ip; The cognitive ability in CO group was lower than that of the control group; The pathological examination revealed apparent neuronal degeneration and necrosis in the cerebral in CO poisoned rats. **Conclusion:** CO peritoneum injection was a effective, convenient, and reliable, which offered reliable scientific basis for further exploring the pathogenesis of DNS by CO.

Key words: Acute carbon monoxide poisoning; Delayed neuropsychologic sequelae; Animal model; Rat

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R595.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)06-1033-04

前言

急性一氧化碳(carbon monoxide, CO)中毒患者治疗后意识障碍恢复,经过2~60d“假愈期”,出现以精神意识障碍、大脑皮层局灶性功能障碍、脑神经损害及周围神经炎为主要表现的神经系统损害称为迟发性脑病(Delayed neuropsychologic sequelae, DNS)^[1]。其发病率国内为10%~30%,国外为0.8%~43%^[2-4]。目前其发病机制仍未完全阐明,缺少可靠的动物模型是阻碍其深入研究的重要原因之一^[5-6],主要问题在于中毒浓度的掌握和动物行为学评价方法的缺陷上。目前,CO中毒模型多采用吸入气体法染毒,但其实验设备昂贵,操作要求高,难以普及;且易

受到缺氧因素干扰,影响实验结果^[7]。因此,我们尝试建立与临床特点相符的且较为可靠的、易操作的动物模型,为进一步研究DNS的发病机制提供客观有效的手段。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年SD大鼠,SPF级(Specific Pathogen Free),体重290~330g,雄性(由首都医科大学宣武医院动物实验室提供)。

1.2 仪器设备

Morris水迷宫及分析软件(中国医学科学院药物研究所);WFZ800-3型紫外可见单光束分光光度计(北京瑞利光学仪器厂);Image-pro Plus图象分析系统(Version 4.0)。

1.3 试剂

一氧化碳气体(99.9%)(北京市气体站);TUNEL凋亡检测试剂盒(德国罗氏公司);其余试剂均为国产分析纯,购自北京化学试剂公司。

1.4 Morris水迷宫训练

作者简介 廖秋菊(1981-),女,硕士,医师,研究方向:危重症及多脏器衰竭。E-mail: liaoqiuju@163.com

△通讯作者 王晶(1962-),女,硕士,教授,主任医师, E-mail: wj2102@sohu.com

(收稿日期:2010-12-06 接受日期:2010-12-30)

实验大鼠购入后,经适应性饲养和编号后进行 5d 水迷宫训练。电脑记录大鼠巡游轨迹、从入水至登上安全岛的时间(逃避潜伏期)等数据。逃避潜伏期超过 2min 者记为失败。每日训练 2-3 次,5d 后以巡游轨迹为直线式,逃避潜伏期小于 1min 的大鼠为合格,大于 1min 的被淘汰。

1.5 CO 中毒方法

采用改良腹腔间隔注射 CO 气体方法建立模型。将 150ml/kg CO 气体快速注入大鼠腹腔,每间隔 4h 腹腔注射一次,从第 2 次开始气体量减半,共注入气体 3 次。动态监测大鼠尾静脉血碳氧血红蛋白(HbCO)水平,观察染毒后大鼠的症状及体征。对照组注射等剂量空气。

1.6 血 HbCO 浓度测定

分别于大鼠中毒后 0.5h、4h 及 4.5h 测定 HbCO 浓度。采用改良双波长定量法检测各组大鼠血 HbCO 浓度^[8],取大鼠尾血 0.1ml 加 0.4mol/L 氢氧化铵 20ml,混匀,加 20mg 低亚硫酸钠混匀,10min 内于 535nm 及 578nm 波长下测定其吸光度,按照下列公式计算 HbCO 含量(%):

$$\text{HbCO}(\%) = (2144 \times A_{535} / A_{578} - 2168) \times 100\%^{[8]}$$

1.7 Morris 水迷宫检测

大鼠中毒后 1-5 周重复进行水迷宫检测,每周测试 1 次。每次将大鼠放入安全岛对侧的象限,记录其逃避潜伏期。

1.8 组织学及细胞凋亡检测

取大鼠中毒后 5 周时脑组织,分离皮层及海马组织,制成石蜡切片,部分切片进行尼氏染色,观察脑神经细胞损伤情况;部分切片进行 TUNEL 原位末端凋亡染色,观察脑细胞凋亡情况,严格按照 TUNEL 试剂盒上要求步骤操作。

1.9 统计学方法

统计结果由计算机统计包 spss13.0 进行统计分析,计量资料采用均数±标准差,组间比较采用单因素方差分析(ANO-

VA) $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠 CO 中毒后行为表现

大鼠腹腔注射 CO 气体后 5-10min 出现多动、烦躁,染毒 20min 后陆续出现少动、四肢瘫软、抽搐、昏迷,黏膜及肢端皮肤呈樱桃红色,部分发生角弓反张。约 40% 大鼠在中毒 24h 内死亡。中毒后 8h 左右大鼠恢复正常。大鼠中毒后符合急性 CO 中毒表现。

2.2 大鼠不同时间点血 HbCO 水平结果

大鼠中毒后 0.5h 血 HbCO 浓度明显升高,波动于 48-67% 之间,达到中、重度中毒标准。中毒后 4h 大鼠 COHb 浓度下降约 25%;再次染毒后 0.5h 血中 HbCO 浓度再次达到高水平,3 次染毒使得大鼠血 HbCO 浓度达到 48% 以上并能保持 12h。结果见图 1。

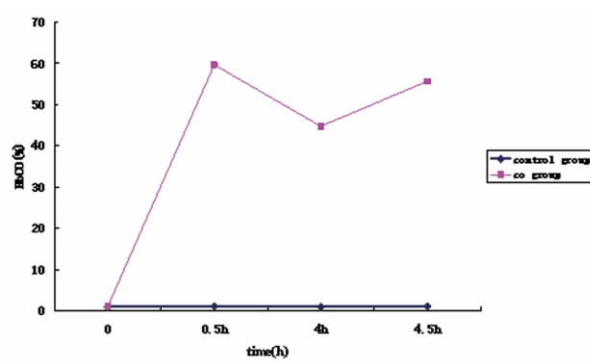


图 1 不同时间点大鼠血 HbCO 浓度结果(%)

Fig1 Different time points results in blood HbCO concentration (%)

2.3 Morris 水迷宫检测结果

大鼠中毒后逃避潜伏期较对照组明显增加,巡游轨迹以圆周式和随机式为主,结果见表 1。

表 1 不同时间大鼠水迷宫潜伏期时间结果(均数±标准差,单位:秒)

Table 1 Different time of the results of water maze in rats ($\bar{x} \pm s$, s)

Time	Control group(n=8)	CO group(n=10)
Before poisoning	4.88± 0.59	4.99± 0.75
1w	15.88± 4.08	74.77± 7.72*
2w	13.26± 3.40	65.6± 22.52*
3w	8.43± 2.71	50.03± 33.52*
4w	5.91± 0.61	39.31± 35.4*
5w	5.23± 0.60	29.54± 37.14*

注:与对照组比较 * $P < 0.05$

Note: compared with control group * $P < 0.05$

2.4 尼氏染色及细胞凋亡结果

尼氏染色结果显示对照组神经元形态饱满、核周苍白圈明显、细胞排列整齐、细胞层变薄、细胞结构紊乱、核周苍白圈消

失,细胞皱缩明显,细胞严重变形,呈梭形或三角形,见图 2。TUNEL 法检测凋亡发现,模型组大鼠海马 CA1 区及皮层细胞形态紊乱,并可观察到较多颜色棕染的凋亡细胞,见图 3 表 2。

表2 中毒5w后大鼠海马CA1区及皮层区TUNEL染色阳性数(均数±标准差,单位:个)

Table 2 Poisoning 5w CA1 in rat hippocampus and cortex areas the number of TUNEL staining ($\bar{x} \pm s$, a)

Group	Hippocampus CA1	cortex areas
Control group(n=8)	2.1± 0.55	8.1± 1.27
CO group(n=10)	59.77± 4.17*	248.55± 15.04*

注:与对照组比较 *P<0.05

Note: compared with control group * P <0.05

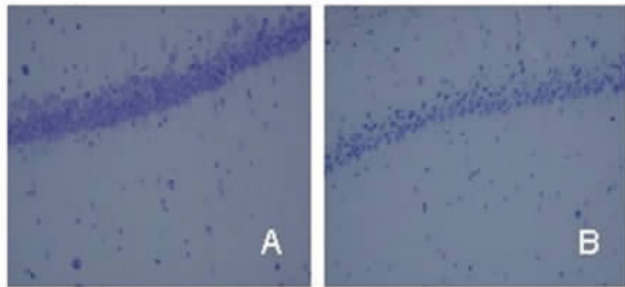


图2 尼氏染色结果(× 400):A 对照组海马CA1区 B 模型组海马CA1区

Figure 2 Nissl stain (× 400):A Control group Hippocampus CA1; B CO group Hippocampus CA1

3 讨论

CO在常温、常压下以气态形式存在,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^[8]。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。静式吸入染毒法使用的CO量虽不多,但不适合较长时间的染毒,因在长时间染毒过程中,会使氧分压降低,二氧化碳分压上升,温度和湿度也会发生变化,因而可能影响实验结果^[8]。

本实验采用腹腔注射CO染毒的方法建立大鼠中毒模型,染毒后5min大鼠出现中毒症状,随后出现少动、四肢瘫软、抽搐、昏迷,黏膜及肢端皮肤呈樱桃红色,部分发生角弓反张,中毒症状明显。染毒后30minHbCO浓度升高至重度中毒水平。相对于吸入染毒法来说,采用腹腔注射途径染毒虽与临床所见急性CO中毒的CO侵入途径不同,但可引起明显的中毒症状,且中毒机制相同,神经系统损伤及HbCO浓度变化均与临床所见CO中毒表现一致^[9]。腹腔注射CO优点明显,操作简便,所需CO量明显减少,费用低廉,对设备仪器条件亦无特殊要求,染毒剂量容易控制,影响因素少,便于及时监控染毒动物血中HbCO水平,并可避免吸入染毒可能出现的缺氧因素对实验结果的影响。

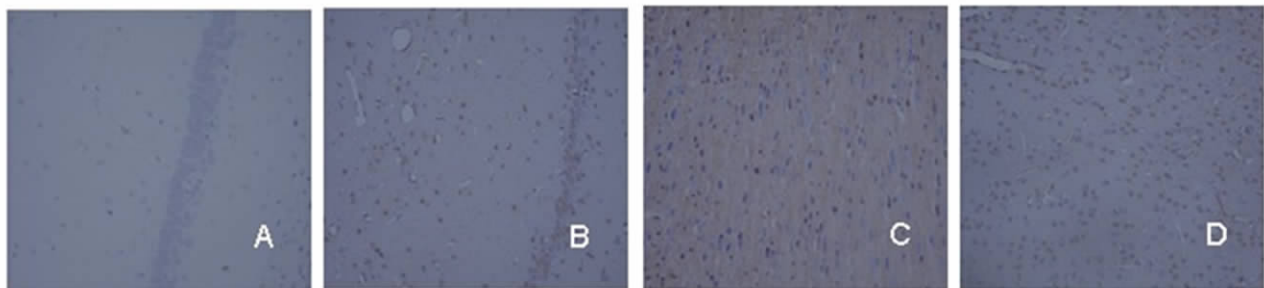


图3 TUNEL染色检测的脑组织细胞凋亡(× 400) A 对照组海马CA1区 B 模型组海马CA1区 C 对照组皮层区 D 模型组皮层区

Figure 3 TUNEL staining of brain tissue cells (× 400)A Control group Hippocampus CA1; B CO group Hippocampus CA1; C Control group cortex areas; D CO group cortex areas

流行病学调查曾显示DNS的发病与中毒程度、昏迷时间和初次治疗效果等密切相关^[10]。分次注射法更有利于维持较长时间重度CO中毒状态,从而为研究DNS创造了有利条件。本实验以4h为间隔,用腹腔注射法进行CO染毒,可使大鼠血中HbCO浓度长时间(>12h)维持在高水平(>48%)状态,染毒大鼠昏迷时间亦较长,十分类似临床上重症CO中毒病情经过,故此模型可望为DNS的研究提供最接近真实的条件。

Morris水迷宫实验是判断大鼠学习和记忆能力的重要指

标,能敏感的反映出脑认知功能区损害后的认知功能变化^[11]。本实验采用的方法使中毒后大鼠水迷宫成绩明显下降,说明其认知功能受到损害,是迟发性脑病的检测指标之一。

目前对于CO中毒致迟发性脑损伤的机制仍不十分清楚,许多研究表明,CO中毒后大脑神经元的凋亡可能是造成脑损伤的重要机制之一。缺血、缺氧机制,氧自由基损伤机制,细胞毒性机制,兴奋性氨基酸释放机制^[5-6],Ca²⁺超载等均可导致脑神经细胞凋亡,导致神经元损伤,从而导致迟发性脑病^[12]。皮层

与海马在解剖学上有密切的联系,海马神经元细胞,尤其是 CA1 区对缺血缺氧十分敏感^[13-14],海马及皮层的损伤会导致学习记忆的障碍^[15],因此我们选用海马及皮层神经元凋亡作为迟发性脑病的辅助检测指标。我们发现,大鼠 CO 中毒后 5w,脑皮层及海马区均见大量凋亡细胞,说明脑组织受到损伤。

综上所述,本研究建立的腹腔间隔注射 CO 法模型是成功的,基本可以模拟临床重度 CO 中毒情况,且通过大鼠行为学及病理学检测出符合 DNS 的脑损伤,具有操作简单、可重复、可靠性等优点,是一种理想模型。

参考文献(Refereces)

- [1] 罗学红.急诊医学[M].北京:高等教育出版社,2008 285-287
Luo Xue-hong. Emergency Medicine [M]. Beijing: Higher Education Press, 2008:285-287
- [2] Walker E, Hay A. Carbon monoxide poisoning [J]. British Medical Journal, 2000, 320(7237): 804
- [3] Varon J, Marik PE, Fromm Jr RE, et al. Carbon monoxide poisoning: a review for clinicians[J]. Journal of Emergency Medicine, 1999, 17(1): 87-93
- [4] Piantadosi CA. Carbon monoxide poisoning [J]. The New England Journal of Medicine, 2002, 347(14): 1054-1055
- [5] 冯云,臧贺川.急性一氧化碳中毒迟发性脑病发病机制的研究进展[J].中国煤炭工业医学杂志,2009,12(1):152-154
Feng Yun, Zang He-chuan. Delayed encephalopathy of acute carbon monoxide poisoning in the pathogenesis of progress [J]. Chinese Journal of Coal Industry Medicine, 2009,12(1):152-154
- [6] 关里,赵金垣.急性一氧化碳中毒迟发性脑病发病机制的研究进展[J].中华内科杂志,2007,46(6):521-522
Guan Li, Zhao Jin-heng. Delayed encephalopathy of acute carbon monoxide poisoning in the pathogenesis of progress [J]. Chinese Journal Of Internal Medicine, 2007, 46(6):521-522
- [7] Jia X, Koenig MA, Shin HC, et al. Improving neurological outcomes post-cardiac arrest in a rat model: Immediate hypothermia and quantitative EEG monitoring[J]. Resuscitation, 2008, 76(3): 431-442
- [8] 王耀宏,赵金垣,崔书杰,等.急性一氧化碳中毒迟发性脑病的动物模型制备研究[J].中国职业医学,2004, 31(1): 5-10
Wang Yao-hong, Zhao Jin-yuan, Cui Shu-jie, et al. Study on preparation of animal model for delayed neuropsychologic sequelae by acute carbon monoxide poisoning[J]. Chin Occup Med, 2004,31(1):5-10
- [9] 付守芝,刘勇,王家良,等.氙气防治一氧化碳中毒迟发性脑病的实验研究[J].中华急诊医学杂志,2008,17(5):487-490
Fu Shou-zhi, Liu Yong, Wang Jia-liang, et al. Effect of xenon intervention on delayed neuropsychologic sequelae in acute carbon monoxide poisoning [J]. Chinese Journal Of Internal Medicine, 2008,17(5): 487-490
- [10] 彭黎明,王曾礼.细胞凋亡的基础与临床[M].北京:人民卫生出版社,2000 22-24
Peng Li-ming, Wang Zeng-li. Apoptosis in basic and clinical[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000:22-24
- [11] 程明,朱熊兆.学习记忆的行为学研究方法[J].中国行为医学科学,2005,14(1):65-66
Cheng Ming, Zhu Xiong-zhao. Behavioral studies of learning and memory methods[J]. Chinese Journal of Behavioral Medical Science, 2005,14(1):65-66
- [12] Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, et al. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis[J]. Journal of Neurochemistry, 1984, 43(5): 1369-1374
- [13] 寇小格,梁东良,石金河,等.激素和鞘内给药治疗急性一氧化碳中毒迟发性脑病的临床研究 [J]. 中国工业医学杂志,2007,20(1): 30-31
Kou Xiao-ge, Liang Dong-liang, Shi Jin-he, et al. Clinical study on hormone and subarachnoid administration in treatment of delayed encephalopathy caused by acute carbon monoxide poisoning[J]. Chinese Journal of Industrial Medicine, 2007,20(1): 30-31
- [14] Thom SR, Bhopale VM, Fisher D, et al. Delayed neuropathology after carbon monoxide poisoning is immune-mediated [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004, 101(37): 136-140
- [15] Hirsch E, Costa C, Ciralo E. Phosphoinositide 3-kinases as a common platform for multi-hormone signaling [J]. Journal of Endocrinology, 2007, 194(2): 243-256