

氰化钠急性染毒对大鼠大脑皮层损伤的作用机制

吴波拉, 陈醒言, 朱桐君, 林丹, 虞希冲

(温州医学院茶山校区药学院药理教研室, 浙江 温州 325035)

摘要: 目的 研究氰化钠(NaCN)急性染毒对大鼠大脑皮层及皮层线粒体损伤作用及其机制。方法 腹腔注射NaCN亚致死剂量(3.2 mg/kg)染毒5、15、30、60、90 min后采用比色法测定大鼠大脑皮层和皮层线粒体相关氧化和抗氧化酶系活性;用透射电镜观察各时相点染毒大鼠脑组织超微结构变化;按Veitch和Dunkley等方法测定不同浓度氰化钠体外孵育大鼠大脑皮层线粒体呼吸链复合酶的活性。结果 (1) NaCN染毒5 min后大脑皮层和皮层线粒体过氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、钠钾腺苷三磷酸酶($\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$)、钙镁腺苷三磷酸酶($\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$)的活性明显下降,黄嘌呤氧化酶(XOD)活性明显增高,以皮层线粒体各指标改变最为显著(均 $P < 0.001$)。(2) 染毒大鼠神经细胞严重受损,神经元、神经胶质细胞、线粒体等出现严重水肿、空泡化伴有溶解现象。(3) 经NaCN损伤后,离体皮层线粒体呼吸链复合酶IV的活性显著下降($P < 0.001$),同时引发复合酶I活性的剧增($P < 0.001$)和复合酶II活性的下降($P < 0.01$)。结论 NaCN急性中毒可导致大脑皮层及皮层线粒体氧化-抗氧化系统平衡失调,抗氧化能力下降,自由基生成增多,ATPase活性下降,并增加了线粒体呼吸链的电子漏,提示皮层线粒体损伤在氰化物中枢毒作用中可能起重要作用。

关键词: 氰化钠; 大鼠; 大脑皮层; 线粒体; 氧化; 抗氧化

中图分类号: O623.76; R338 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2006)02-0074-04

Acute toxic effect of sodium cyanide on cerebral cortex of rats and its mechanism

WU Bo-la, CHEN Xing-yan, ZHU Tong-jun, LIN Dan, YU Xi-chong

(Department of Pharmacology, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

Abstract: **Objective** To study the injury effect and its mechanism of sodium cyanide (NaCN) by acute exposure on cerebral cortex, especially on the mitochondria of cerebral cortex cells in rats. **Method** According to study design, 5、15、30、60 and 90min after injection i p with sub-lethal dose (3.2mg/kg) of NaCN, the interrelated indices of oxidative-antioxidative system in cerebral cortex and the mitochondria of the cortex in rats were measured by colorimetric techniques. Meanwhile, the ultrastructural changes of cerebral cortex of the rats were examined by electron transmission microscopy. Additionally, the activities of the respiratory enzymes in mitochondria of cerebral cortex cells cultured with different concentrations of NaCN in vitro were also measured by Veitch and Dunkley's method. **Result** (1) In NaCN group, the activities of SOD, GPX, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ in the cortex and in the mitochondria were all decreased distinctly compared with the controls even 5min after injection of NaCN, while the activity of XOD showed definite increase in mitochondria seemed more significant ($P < 0.001$). (2) The damages in cortex of NaCN exposed rats showed more severe; edema, vacuolation and lysis could be seen clearly in neurons, neuroglial cells, especially their mitochondria by the electron transmission microscopy. (3) The activities of complex IV and II in respiratory chain of cortex exposed to NaCN in vitro was obviously decreased ($P < 0.001$), while the activity of complex I in the respiratory chain was increased dramatically ($P < 0.001$). **Conclusion** NaCN has the effect that may lead to dysequilibrium of oxidation/antioxidation of cerebral cortex, especially the mitochondria, decline of the antioxidative ability, increase of the production of free radicals, decrease of activity of ATPase, and increase of electron-leaking in respiratory chain of mitochondria, which suggested that the injury in mitochondria of cerebral cortex might play an important role in cyanide-induced neurotoxicity.

Key words: Sodium cyanide; Rat; Cerebral cortex; Mitochondria; Oxidation; Antioxidation

氰化钠是一种快速杀伤毒物,属高毒类。一般认为氰化钠毒作用是其解离出的氰根(CN^-)对线粒体呼吸链的终末酶-细胞色素氧化酶 aa_3 的抑制,使细胞生物氧化过程受阻,中枢神经系统是其主要靶器

官。Pettersen发现致死量和非致死量氰化物中毒,对脑细胞色素氧化酶活性的抑制无显著差异。急性氰化物中毒时,毒剂的吸收量往往大于选择性抑制细胞色素氧化酶活性所需的最小量,提示氰化物中毒还可能影响其他酶和生物系统活性^[1]。为此,我们对氰化物中枢毒作用作进一步的研究,以期开发新的抗氰药物提供毒理学依据。

收稿日期: 2005-05-04; 修回日期: 2005-07-04

作者简介: 吴波拉(1976-),女,讲师,硕士研究生,研究方向: 神经药理学,药理毒理学。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

氰化钠 (NaCN)，上海化学试剂采购供应站提供，分析纯；SOD 测试盒、GSH-Px 活力试剂盒、XOD 测定试剂盒、ATP 酶测定试剂盒，均由南京建成生物工程研究所提供。722 分光光度计 (上海分析仪器二厂)，PolarStar/Fluostar 高通量药物筛选多用仪 (德国产)，CR-21G 高速冷冻离心机 (HITACHI)，CR22E 高速冷冻离心机 (HITACHI)，台式高速冷冻离心机 TGLL-18G (上海安亭科学仪器厂)，透射电镜 (HITACHI-600)。

1.2 实验动物

SD 大鼠，由温州医学院实验动物中心和中国医学科学院协和医科大学药物研究所动物中心提供，体重 (200±20)g，雌雄各半。实验前动物禁食 12 h，饮水不限。

1.3 大鼠皮层、皮层线粒体 SOD、GSH-Px、XOD、ATPase 的测定

SD 大鼠 36 只，随机分成 6 组，每组 6 只，生理盐水 (NS) 组腹腔注射 NS 10 ml/kg，30 min 后断头处死；其余各组注射 NaCN 3.2 mg/kg (亚致死剂量)，分别于染毒后 5、15、30、60、90 min 断头，在冰浴中迅速分离大鼠皮层。

1.3.1 取大鼠皮层冰浴中制成 10% 匀浆，3 000 r/min 离心 4 min，取上清液测定 SOD、GSH-Px、XOD、

Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase、Na⁺-K⁺-ATPase 的活性。

1.3.2 取大鼠皮层按文献 [2] 方法略改，提取皮层线粒体，-20℃分装保存。临用前将分离纯化的线粒体于 20℃/-20℃反复冻融 3 次，用 Lowry 法测定蛋白含量，测定线粒体内 SOD、GSH-Px、XOD、Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase、Na⁺-K⁺-ATPase 的活性。

1.4 脑组织超微结构透射电镜观察

SD 大鼠 3.2 mg/kg 染毒后不同时间，取大鼠大脑皮层常规电镜制样，作超微结构观察。

1.5 离体大鼠大脑皮层线粒体呼吸链复合酶 I ~ IV 活性测定

SD 大鼠 8 只断头，取大鼠皮层组织，制备线粒体。最后将沉淀悬于 SET 缓冲液中，以 Lowey 法测定蛋白含量，调整蛋白浓度约 1 mg/ml，4℃保存备用。用 PBS 缓冲液配制不同浓度的 NaCN 组，即 PBS 组、0.1 mmol/L 组，1 mmol/L 组，按 Veitch 和 Dunkley 等方法测定体外孵育大鼠皮层线粒体呼吸链复合酶 I ~ IV 活性^[3,4]。

1.6 统计

实验数据按 SPSS 10.0 统计软件处理。

2 结果

2.1 NaCN 染毒对大鼠大脑皮层组织、线粒体 SOD、GSH-Px、XOD、Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase、Na⁺-K⁺-ATPase 的影响 (见表 1、2)

表 1 NaCN 染毒对大鼠大脑皮层组织各酶活性的影响 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

测定指标	NS 组	NaCN 染毒组				
		5min	15 min	30 min	60 min	90 min
SOD (U/mg pro)	487.3±30.59	424.6±35.6 **	399.2±22.5 ***	405.4±20.6 ***	409.5±30.2 ***	413.0±14.4 ***
GSH-Px (U)	6.03±0.13	5.94±0.15	4.83±0.35 ***	5.11±0.18 ***	5.34±0.19 **	5.40±0.13 **
XOD (U/g)	20.64±0.87	20.46±1.27	28.37±1.81 ***	28.48±1.78 **	27.82±0.54 **	26.99±1.22 **
Ca ²⁺ -Mg ²⁺ -ATPase [μmol(pi)·mg pro ⁻¹ ·h ⁻¹]	2.86±0.36	1.22±0.30 ***	1.28±0.36 ***	2.23±0.30 *	2.30±0.28 *	2.41±0.29
Na ⁺ -K ⁺ -ATPase [μmol(pi)·mg pro ⁻¹ ·h ⁻¹]	3.17±0.26	1.36±0.44 ***	1.33±0.28 ***	2.47±0.35 ***	2.51±0.26 **	2.52±0.29 **

与 NS 组比较，经 Dunnet T 检验，* P<0.05，** P<0.01，*** P<0.001。下表同。

表 2 NaCN 染毒对大鼠大脑皮层线粒体各酶活性的影响 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

测定指标	NS 组	NaCN 染毒组				
		5min	15 min	30 min	60 min	90 min
SOD (U/mg pro)	430.4±23.4	359.0±22.7 **	347.2±35.7 **	336.1±45.2 ***	311.3±26.4 ***	339.5±34.5 ***
GSH-Px (U)	3.24±0.40	3.20±0.51	1.65±0.31 ***	1.43±0.15 ***	2.25±0.32 **	3.00±0.26
XOD (U/g)	50.65±2.05	50.73±2.52	57.72±1.61	56.85±2.60 ***	58.83±2.25 ***	63.54±2.95 ***
Ca ²⁺ -Mg ²⁺ -ATPase [μmol(pi)·mg pro ⁻¹ ·h ⁻¹]	10.31±1.11	5.24±0.60 ***	5.55±0.32 ***	5.76±0.30 ***	7.07±0.57 ***	7.38±0.62 ***
Na ⁺ -K ⁺ -ATPase [μmol(pi)·mg pro ⁻¹ ·h ⁻¹]	10.61±0.94	5.52±0.84 ***	5.77±0.40 ***	6.13±0.37 ***	6.42±0.34 ***	6.54±0.38 ***

2 2 NaCN 染毒大鼠脑组织超微结构观察

电镜观察所见, NaCN 染毒 5 min, 大脑皮层未见明显变化, 偶见个别线粒体和神经胶质细胞胞浆轻微水肿。15 min 时部分神经胶质细胞出现轻度肿胀, 血管周围间隙 (VR 间隙) 轻度扩张, 线粒体出现轻度肿胀。30 min 时上述各种病变进一步加重, 神经元细胞突起出现不同程度肿胀, 空泡化伴有溶解性改变, 少数线粒体出现空泡现象。60 min 时神经胶质细胞肿

胀出现空泡, 其突起肿胀明显, 线粒体嵴突消失或破坏, 内质网扩张或消失, 有髓神经髓鞘板层均质化和局限性溶解, 血管 VR 间隙中度扩张。90 min 时除上述各种病变外, 神经元细胞核周间隙扩张, 空泡化加重。2 h 时神经元细胞突起和线粒体严重水肿, 神经元细胞胞浆内线粒体水肿空泡化, 血管 VR 间隙重度扩张及有髓神经鞘明显水肿。见图 1。

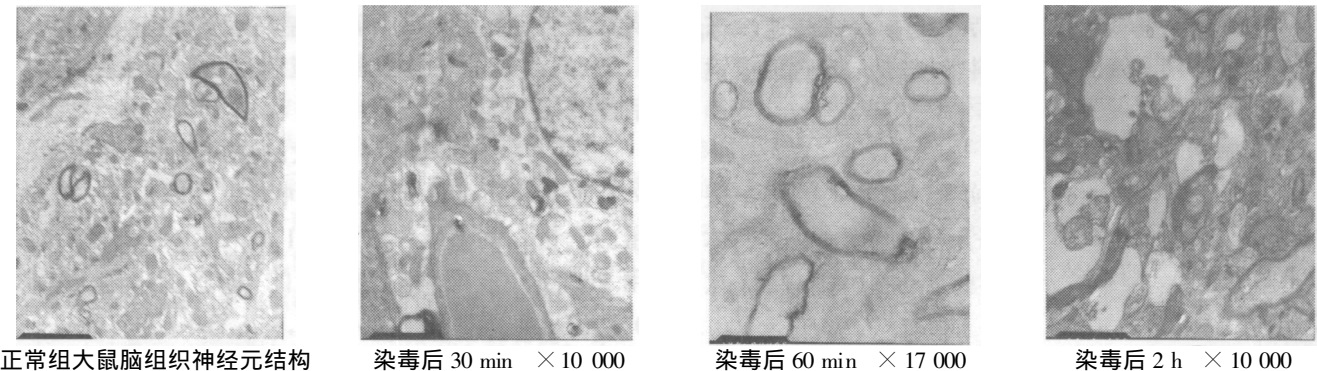


图 1 NaCN 染毒大鼠脑组织超微结构变化

2 3 NaCN 染毒对离体大鼠皮层线粒体呼吸链复合酶活性的影响 (见表 3)

表 3 体外 NaCN 孵育大鼠大脑皮层线粒体对呼吸链复合酶 I ~ IV 活性的影响 (n=7, $\bar{x} \pm s$) $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

组 别	呼吸链复合酶 I	呼吸链复合酶 II	呼吸链复合酶 III	呼吸链复合酶 IV
对照组	1.034 ± 0.156	0.160 ± 0.021	0.256 ± 0.027	0.058 ± 0.004
0.1 mmol/L NaCN 组	1.946 ± 0.126 ***	0.139 ± 0.019 **	0.270 ± 0.029	0.036 ± 0.003 ***
1 mmol/L NaCN 组	2.092 ± 0.136 ***	0.128 ± 0.018 **	0.286 ± 0.046	0.033 ± 0.003 ***

3 讨论

氰化物最基本的生化效应是抑制细胞色素氧化酶 aa₃, 阻断呼吸链电子传递和细胞生物磷酸化过程, 使 ATP 合成下降, 能量供应障碍, 从而导致神经元的损伤。Ardelt^[3] 发现给小鼠皮下注射氰化钾 7 mg/kg 染毒后 30 min, 脑组织脂质过氧化作用明显加强, 同时脑内抗氧化体系过氧化氢酶、GSH-Px 等活性受到明显抑制, 提示氰化物中毒可影响机体氧化和抗氧化系统。

SOD 和 GSH-Px 两者协同发挥抗氧化作用, 为机体抗氧化防御体系两大重要的酶类, XOD 为需氧脱氢酶, 是体内氧自由基的重要来源。本实验结果显示, 亚致死剂量氰化钠染毒大鼠大脑皮层 SOD、GSH-Px 活性明显下降, XOD 活性明显升高, ATPase 活性显著受抑, 提示氰化钠中毒在抑制中枢抗氧化体系酶活性的同时激活氧化体系酶活性, 并影响细胞膜 ATPase, 使细胞内氧自由基急剧增高。已知正常生理条件下, 线粒体

内细胞色素氧化酶传递的电子还原成水, 仅有 1% ~ 2% 的氧接受一个电子, 而成为氧自由基后逸出。因此线粒体既是合成抗氧化酶体系的场所, 同时也是自由基产生的场所。本实验结果显示, 线粒体各项指标的变化比大脑皮层更为显著。为明确线粒体在此损伤中的作用, 测定了离体皮层线粒体呼吸链复合酶活性, 结果显示, 不同浓度的氰化钠在显著抑制复合酶 IV 活性的同时可激发复合酶 I 的剧增, 复合酶 I 能产生氧自由基, 其活性易受氧自由基的影响^[6], 从而使线粒体呼吸链脱耦联, 电子漏增多, 继而自由基产生增多。

分析氰化钠中毒自由基产生增多的主要原因: 一是线粒体呼吸链脱耦联, 线粒体内单价氧自由基泄漏增多; 二是抗氧化体系特别是线粒体内 SOD 和 GSH-Px 消耗增多, 合成减少、活性的下降, 使清除氧自由基能力下降; 三是黄嘌呤氧化酶途径的激活, 氰化物抑制 ATP 的生成, 使依靠 ATP 转运的离子泵活性受到抑制, 钠泵和钙泵活性降低, 导致胞内 Na⁺ 和 Ca²⁺ 超载, 从而激活蛋白水解酶, 促使黄嘌呤脱氢酶转为黄嘌呤氧化酶, 自由基生成增多。

综上所述, 氰化物中毒, 可导致大脑皮层和皮层线粒体氧化-抗氧化系统平衡失调, 抗氧化能力的下降, 活性氧的增多, 引起脂质过氧化, 损伤线粒体和神经细胞的脂膜、蛋白质、DNA, 使神经细胞内环境紊乱、能量代谢障碍及细胞膜功能丧失, 造成神经细胞死亡及组织溶解。

参考文献:

- [1] Pettersen JC, Cohen SD. Antagonism of cyanide poisoning by chlorpromazine and sodium thiosulfate [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1985, 81 (2): 265-273.
- [2] 杜冠华. 脑能量代谢与相关疾病 [A]. 见: 张均田. 神经药理学研究进展 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 53-56.
- [3] Veith K, Hombroeck A, Caucheteux D, et al. Global ischemia induces a biphasic response of the mitochondrial respiratory chain. Anoxic pre-perfusion protects against ischemic damage [J]. Biochem J, 1992, 281 (Pt 3): 709-715.
- [4] Dunkley PR, Jarvie P, Heath JM. A rapid method for isolation of synaptosomes on percoll gradients [J]. Brain Res, 1986 372(1): 115-129.
- [5] Ardeli BK, Borowitz JL, Isom GE. Brain lipid peroxidation and antioxidant protectant mechanisms following acute cyanide intoxication [J]. Toxicology, 1989, 56 (2): 147-154.
- [6] Ide T, Tsutsui H, Kinugasa et al. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium [J]. Circ Res, 1999, 85 (4): 357-363.

普兰店市乡镇卫生院医用诊断 X 线机防护状况调查

朱令兴, 牟义龙, 马鹏飞, 赵成举

(普兰店市卫生防疫站, 辽宁 普兰店 116200)

为了全面了解我市乡镇卫生院医用诊断 X 线机防护状况, 进一步贯彻落实国家放射防护法律法规, 我们于 2003 年对全市乡镇卫生院医用诊断 X 线机防护状况进行了调查, 并与市属医院做了相同内容的对照。现报告如下。

1 对象与方法

1.1 对象

22 个乡镇卫生院使用医用诊断 X 线机 22 台; 以市属医疗单位 8 家作为对照调查, 共有医用诊断 X 线机 15 台。

1.2 内容与方法

X 线机使用情况: 台数、型号、出厂日期、容量、防护情况等; 测量机房的面积; X 线机防护性能: 采用 WF-912 型 X 线巡测仪, 在 70 kV、3 mA 的测试条件下, 监测立位透视防护区照射量率 (立位 13 点); 机房外环境 (门窗) 辐射水平; 按《医用 X 线诊断放射卫生防护监测方法》进行监测。按《医用 X 射线诊断卫生防护标准》(GBZ130-2002) 进行评价。

2 结果

2.1 基本情况

我市乡镇卫生院共有 26 家, 其中 22 家使用 X 线机, 共有 X 线机 22 台, 其中 18 台为 80 年代以前的产品, 占 81.8%。市属 8 家医院共有 X 线机 15 台, 其中 80 年代以前的产品只有 5 台, 占 33.3%。可见, 乡镇卫生院的 X 线机多为旧型产品, 其防护性能很差, 因此, 放射防护存在的问题也比较多。

2.2 机房面积

市属卫生院的 15 间机房面积合格者 13 间, 合格率为 86.7%; 乡镇卫生院机房面积合格者仅有 8 间, 合格率为 36.4%, 乡镇卫生院机房面积达标率, 远不如市属医院。两组比较, 差异有显著性 ($\chi^2=6.83$ $P<0.01$)。

2.3 环境辐射水平

机房门窗外辐射水平监测结果, 市属医院有 12 间合格, 合格率为 80%; 乡镇卫生院有 6 间合格, 合格率 27.3%, 乡镇卫生院的外防护情况明显不如市属医院。两组比较差异有

显著性 ($\chi^2=11.88$ $P<0.01$)。

2.4 X 线机防护性能

立体透视防护区测试平面照射量率, 按国家规定进行测试, 市属医院监测 14 台合格 (占 93.3%), 乡镇卫生院 14 台合格 (占 63.6%), 市属医院 X 线机防护性能合格率高于乡镇卫生院。两组比较差异有显著性 ($\chi^2=4.28$ $P<0.05$)。

3 讨论

本次调查显示, 我市乡镇卫生院医用诊断 X 线机的防护存在很多问题, 与市属医院比较有很大差距, 主要表现在以下几方面。

3.1 机房面积不符合国家标准

本次调查看到, 乡镇卫生院机房面积的合格率仅为 36.4%, 与卫生标准相差甚远。其中多数机房是旧房改建的, 结构简陋, 有的机房面积还不足 10 m²。有的机房虽几经改建, 但由于事先未经放射防护部门进行预防性监督和审查验收, 故仍不符合卫生标准。

3.2 环境防护情况

本次调查乡镇卫生院 X 线机房的门窗外的照射量合格率仅为 27.3%, 存在的隐患较大。机房的防护墙多半是砖砌结构, 没有附加其他防护材料。门窗的铅屏蔽多数不完备, 防护的铅当量不够。为保障放射工作人员的健康, 避免公众受到不必要的照射, 要在开展放射防护科普健康教育, 增强人们自我防护意识的同时, 加强监督, 发现问题及时解决。

3.3 X 线机的防护性能

总体上看, 两组的机器本身防护性能合格率都在 50% 以上, 但乡镇卫生院的 X 线机防护性能不如市属医院。其原因一是机器陈旧老化, 防护板铅当量不足, 铅帘宽度不够, 漏线量过多; 二是管理制度不健全, 有些机器只使用, 长久不维修。

本次调查提示, 卫生监管部门要严格执行国家有关的法律法规, 对乡镇卫生院的放射防护工作进行定期监督与监测, 发现问题, 督促使用单位立即改进。要坚决贯彻防护工作的“正当化、最优化和个人剂量限值”三项基本原则, 促进乡镇医疗卫生事业的发展。