

家兔急性 CO中毒迟发性脑病血清 SOD活性与 MDA含量及质子磁共振波谱分析

管叶明, 刘学春, 汪青松*

(安徽医科大学解放军临床学院 解放军第 105 医院神经内科, 安徽 合肥 230031)

摘要: 目的 观察家兔急性一氧化碳中毒后迟发性脑病 (DNS) 血清超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和丙二醛 (MDA) 水平以及质子磁共振波谱 ($^1\text{H-MRS}$) 各参数的变化, 探讨 DNS 的可能发病机制。方法 通过腹腔注射 CO 制备急性 CO 中毒迟发性脑病动物模型, 对照组和 DNS 组分别进行 $^1\text{H-MRS}$ 检查及血清 SOD 活性和 MDA 水平的检测。结果 与对照组相比, DNS 组额叶及颞叶海马 CA1 区 NAA/Cr 较正常对照组显著下降, Cho/Cr 及 Lac/Cr 显著升高; DNS 组血清 SOD 活性明显降低, MDA 水平明显升高。结论 自由基参与了 DNS 的发病, 可能通过损伤神经元膜结构和功能引起脑内 NAA、Cho、Lac 含量的变化。

关键词: 急性一氧化碳中毒; 迟发性脑病; 磁共振波谱; 超氧化物歧化酶 (SOD); 丙二醛 (MDA)

中图分类号: R135.14 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2010)02-0092-03

Changes of oxidative stress indices and H-magnetic resonance spectroscopy in rabbits with delayed encephalopathy after acute carbon monoxide poisoning

GUAN Yeming, LIU Xuechun, WANG Qingsong*

(Department of Neurology, The 105th Hospital of PLA Clinical College, Anhui Medical University, Hefei 230031, China)

Abstract: Objectives To observe the changes of superoxide dismutase (SOD) activity, malondialdehyde (MDA) level in serum and the coefficients of $^1\text{H-magnetic resonance spectroscopy}$ ($^1\text{H-MRS}$) in rabbits with delayed encephalopathy after acute carbon monoxide (CO) poisoning for exploring the possible pathogenesis of the delayed encephalopathy caused by CO poisoning. Methods The animal model of delayed encephalopathy after carbon monoxide poisoning was established by injection of high-dose CO intraperitoneally in rabbits, then detected the SOD activities and MDA levels in serum of the rabbits, meanwhile the coefficients of $^1\text{H-MRS}$ were also measured. Results The results showed that the ratio of NAA/Cr in frontal lobe and hippocampus CA1 area by $^1\text{H-MRS}$, as well as the serum SOD activity were significantly decreased in the CO injected group, while the ratios of Cho/Cr, Lac/Cr and serum MDA levels were remarkably increased compared with control group. Conclusions The results suggested that free radical could be one of the main causes induced delayed encephalopathy after acute CO poisoning, which might damage the function and membrane structure of neuron.

Key words: acute carbon monoxide poisoning; delayed neuropsychological sequelae (DNS); magnetic resonance spectroscopy; superoxide dismutase (SOD); malondialdehyde (MDA)

急性一氧化碳中毒迟发性脑病 (delayed neuropsychological sequelae after acute carbon monoxide poisoning, DNS) 是患者在急性一氧化碳中毒假愈期后, 突然再次出现以痴呆、精神异常为主的精神症状, 是急性一氧化碳中毒的严重并发症之一。目前 DNS 的发病机制还不完全清楚, 给临床预防和诊治带来很大困难^[1]。质子磁共振波谱 ($^1\text{H-magnetic resonance spectroscopy}$, $^1\text{H-MRS}$) 是一种新的医学影像技术, 利用磁共振现象和化学位移作用, 进行一系列特定原子核及其化合物含量的分析, 是目前唯一无创探

测活体组织化合物特性的方法。本研究利用 $^1\text{H-MRS}$ 检测 DNS 模型家兔脑内代谢物含量以及血清 SOD 活性和 MDA 水平的变化, 探讨自由基与 DNS 的可能关系。

1 材料与方法

1.1 实验试剂及仪器

丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所), 721 型紫外线分光光度计 (上海分析仪器总厂), 西门子 1.5 TMR 扫描仪。

1.2 动物分组及中毒模型制备

15 只普通级健康雄性新西兰大白兔, 体重为 1.5~2.0 kg, 染毒前为自身对照组, 染毒后为 DNS 组。商品化干块状饲料, 均由安徽医科大学实验动物中心提供, 自由饮水, 实验前一天禁食。动物检查无异常后, 经腹腔注射纯品 CO 气体 (体积分数为 99.9%,

收稿日期: 2009-11-10 修回日期: 2010-01-15

基金项目: 全军十一五医药卫生科研基金 (06H009), 南京军区医药卫生科研基金 (06MA51)

作者简介: 管叶明 (1980-), 硕士在读, 研究方向: 神经病学。

* 通讯作者, E-mail: wangqingsong@yahoo.com

南京特种气体有限公司提供, 首次注射剂量为 200 ml/kg 后每 6 h 间隔追加注射 3 次, 剂量为 100 ml/kg 动态监测染毒家兔 24 h 内血 HbCO 水平, 以染毒家兔血 HbCO 水平维持在 45% 以上为中毒指标, 并观察其症状及体征^[2]。

1.3 方法

所有兔子在染毒前及染毒后第 14 天均进行 SOD、MDA 测定及 ¹H-MRS 检测, 最后行脑组织海马区病理学检查。

1.3.1 SOD、MDA 测定 取兔耳缘静脉前采血 4 ml 静置 30 min 后, 以 3 000 r/min 速度离心 15 min 分离出血清, 置于 -20 °C 冰箱内保存, 待测。SOD、MDA 采用化学比色法测定, 严格按说明书操作。

1.3.2 ¹H-MRS 检测 使用西门子 1.5T Novus MR 扫描仪, 小柔体正交线圈, 常规扫描获取横断面 T₁WI 为 TR=400 ms, TE=18 ms; T₂WI 为 TR=4 000 ms, TE=114 ms; 层厚为 3 mm; 层间距为 0.5 mm; 冠状面、矢状面 T₂WI。¹H-MRS 检测技术: 多体素定点分辨波谱序列进行数据采集, 感兴趣区选择分别位于额叶和颞叶海马, 体积为 5 mm×5 mm×5 mm; 分别检测额叶及颞叶海马代谢产物, 包括 N-乙酰天门冬氨酸 (NAA)、胆碱复合物 (Cho)、乳酸 (Lac) 和肌酐 (Cr) 各代谢产物波峰的峰高, 并以 Cr 峰高作为标准, 计算各代谢产物与其比值。检测过程中避免邻近组织、脑脊液、头皮脂肪、颅骨等容积效应的干扰。匀场、水抑制和信息采集均为自动完成; 用 Spectroscopy 软件对所得谱线进行相同的基线校正、相位调整及化学位移确定, 自动获取谱线各代谢产物以 Cr 为参照的代谢产物比值进行比较^[3,4]。

1.3.3 病理学检查 待 SOD 与 MDA 测定、¹H-MRS 检测完成后, 以 20% 乌拉坦麻醉家兔, 用冰生理盐水 (4 °C) 1 000 ml 快速灌注左心室, 以驱除脑血管内血液, 随后再灌注冰 4% 多聚甲醛直至家兔完全僵硬, 取出脑组织分离海马, 常规制备石蜡切片, 采用苏木素-伊红 (HE) 染色观察海马结构及其神经细胞形态^[5]。

1.3.4 统计方法 使用 SPSS 11.5 统计学软件对对照组与 DNS 组脑内化合物含量以及 SOD、MDA 的检测结果进行方差分析, 并进行 t 检验。

2 结果

2.1 ¹H-MRS 检测

DNS 组脑内额叶和颞叶海马区域 NAA/C 较对照组显著下降, Cho/C 和 Lac/C 与对照组相比显著升高 (见表 1、图 1、图 2), 差异均具有统计学意义。

2.2 SOD、MDA 测定

与对照组相比, DNS 组血清中 SOD 活性明显降

低, MDA 含量明显增加, 差异有统计学意义 (表 2)。

表 1 两组额叶和海马区各代谢产物峰高与 Cr 峰高比值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	部位	NAA/Cr	Cho/Cr	Lac/Cr
DNS 组	额叶	0.67 ± 0.24*	1.89 ± 0.21*	0.65 ± 0.19*
	海马区	0.45 ± 0.17*	0.88 ± 0.23*	0.21 ± 0.07*
对照组	额叶	2.48 ± 0.31	1.02 ± 0.10	0.12 ± 0.11
	海马区	1.97 ± 0.27	0.13 ± 0.08	0.04 ± 0.02

注: 与对照组相比, * P < 0.05

表 2 两组血清 SOD 活性和 MDA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	SOD (U/ml)	MDA (nmol/ml)
DNS 组	68.62 ± 7.24*	4.89 ± 1.02*
对照组	93.45 ± 8.17	2.34 ± 0.62

注: 与对照组相比, * P < 0.05

2.3 病理学 HE 染色结果

对照组海马 CA1 区细胞数及细胞形态正常; DNS 组海马 CA1 区细胞出现变性、坏死, 细胞数明显减少 (图 3、图 4)。

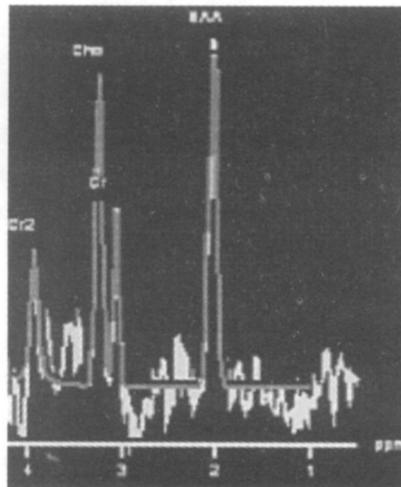


图 1 对照组兔海马区 ¹H-MRS 检测图像

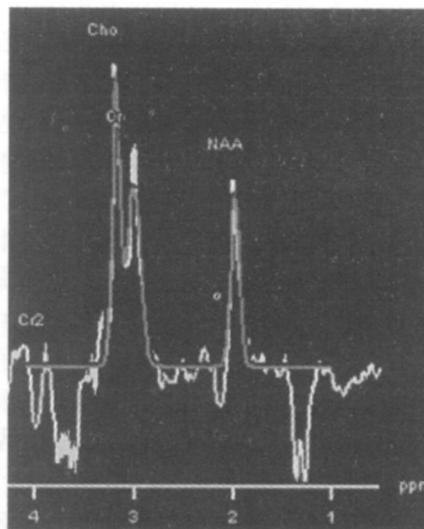


图 2 染毒后 14 d 海马区 ¹H-MRS 检测图像

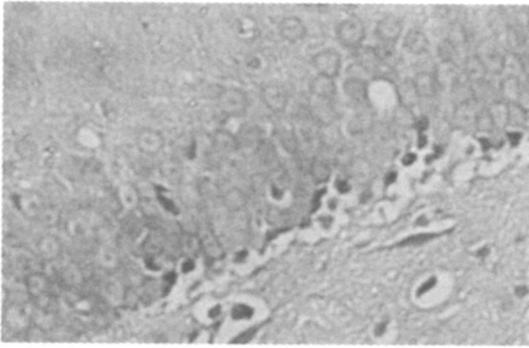


图3 对照组兔海马 CA1 区组织结构 (HE, 200 ×)

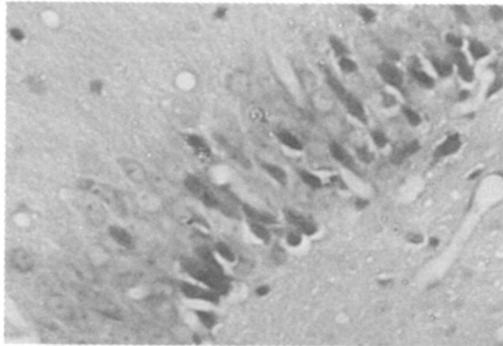


图4 染毒后 14 d 海马 CA1 区组织结构 (HE, 200 ×)

3 讨论

自由基广泛存在于生物体内, 主要有羟自由基 (OH^\cdot)、过氧化氢 (H_2O_2)、氧化自由基 (超氧阴离子, O_2^\cdot) 等。自由基具有很高的化学活性, 可快速攻击其它化合物的分子并产生新的自由基, 新的自由基又可进一步攻击另外的化合物, 产生更多的自由基。这种反应称为自由基连锁反应^[6]。正常状态下机体自由基产生与消除处于动态平衡。SOD是一种金属蛋白酶, 带负电荷, 可以催化超氧化物自由基歧化, 有效地清除氧自由基, 发挥抗氧化作用, 保护细胞免受损伤, 对机体的氧化与抗氧化平衡起重要作用, 其活性高低可部分反映机体清除自由基的能力。MDA是自由基引发的生物膜不饱和脂肪酸过氧化反应的最终产物, MDA含量的变化间接反映组织细胞受氧自由基损伤的严重程度^[7], 是目前公认的能够反映氧自由基造成组织损伤程度的指标^[8]。中枢神经系统易受氧自由基损伤, 其主要原因为神经元和神经胶质细胞膜脂质中含有丰富的易受氧自由基攻击的胆固醇和多聚不饱和脂肪酸, 而且神经元内含有大量溶酶体, 其脂性膜也易受氧自由基损害。本研究提示 DNS 组的脑组织中 SOD 活性明显下降, MDA 含量显著增加, 可能与急性 CO 中毒时, 氧自由基大量增加, 抗氧化系统负荷过重, SOD 被过度消耗, 超氧自由基消除剂 SOD 活力迅速下降等因素有关。

NAA 是正常神经元的标志, 仅见于神经组织, 存在于神经元胞体及其轴索中, 它的高低反映了神经元数量和活性的变化^[9]。Ch₀ 主要为自由胆碱, 是细胞膜反转的标志物, 反映细胞膜的稳定性, 其峰值的高低是由膜磷脂中的胆碱浓度决定的, 通常与细胞膜的合成和分解代谢有关, Ch₀ 升高是神经细胞膜损伤、脱髓鞘的标志^[10]。本研究中 DNS 家兔脑内额叶、颞叶海马区域 NAA/C 较正常对照组显著下降, Ch₀/Cr 及 Lac/C 显著升高。说明急性 CO 中毒时, 脑组织缺氧, 以无氧酵解为主, 产生大量乳酸; 同时由于缺氧使氧自由基的产生增加, 广泛攻击易损区的富含不饱和脂肪酸双链的生物膜结构, 引发脂质过氧化“瀑布状”连锁反应, 导致膜结构和功能的破坏, 诱导神经元凋亡, 神经元数量减少及活性降低, 脑组织中残存的神经元合成胆碱的功能代偿性增加^[11], 进而导致 Ch₀ 升高。

研究表明, 自由基参与了 DNS 的发病过程, 可能通过损伤膜结构和功能等引起脑内 NAA、Ch₀、Lac 的含量变化。因此, 临床上如能早期应用 ¹H-MRS 和检测血清中 SOD、MDA 水平, 将有助于早期诊断 DNS, 对指导治疗和判断预后有重要意义。

参考文献:

- [1] Piantadosi C A. Carbon monoxide poisoning [J]. Undersea Hyperb Med 2004; 31: 167-177.
- [2] 温韬, 赵金恒. 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 (3): 129-132.
- [3] Djilali Annane SY, Jie Chyret Patrick, Chillet et al. Prognostic factors in unintentional mild carbon monoxide [J]. Intensive Care Med 2001; 27: 1776-1781.
- [4] 樊中营, 罗福成, 汪青松, 等. 急性一氧化碳中毒后迟发性脑病氢质子波谱学研究 [J]. 中国医学影像技术, 2008; 24 (11): 1708-1710.
- [5] 王伯泳, 李玉松, 黄高升, 等. 病理学技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 128-130.
- [6] 凌峰. 脑血管病理论与实践 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 77-80.
- [7] Akao M, Ohler A, O'Rourke B, et al. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels inhibit apoptosis induced by oxidative stress in cardiac cells [J]. Circ Res 2001; 88 (12): 1267-1275.
- [8] Urin R, Drogys A, Kaplan P, et al. Ischemia/reperfusion induced oxidative stress causes structural changes of brain membrane proteins and lipids [J]. Gen Physiol Biophys 2001; 20 (4): 431.
- [9] 倪俊, 王建明, 李舜伟. 质子磁共振波谱在神经系统疾病中的应用 [J]. 北京医学, 2004; 26 (2): 134-136.
- [10] Daniel Kondziella, Ele R Danielsen, Klaus Hansen, et al. ¹H-MRS spectroscopy of gray and white matter in carbon monoxide poisoning [J]. J Neurol 2009; 256: 970-979.
- [11] 贾和平, 郑荣珍, 崔现. 急性 CO 中毒后迟发性脑病的相关因素及 P300 的研究 [J]. 临床神经病学杂志, 2002; 15: 277.