

依达拉奉改善急性一氧化碳中毒性脑病大鼠空间记忆及海马神经元凋亡的研究

刘学春, 管叶明, 刘红娟, 王静, 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 观察自由基清除剂依达拉奉对急性一氧化碳中毒性脑病大鼠空间记忆及海马 CA1 区神经元凋亡的影响。方法 雄性 SD 大鼠 40 只, 随机均分为正常组、急性一氧化碳中毒性脑病 (TE-ACMP) 组、生理盐水组、依达拉奉组 4 组。采用 Morris 水迷宫检测 4 组 SD 大鼠的空间记忆, 以平均逃避潜伏期衡量空间记忆能力; TUNEL 法检测神经元海马 CA1 区神经元凋亡情况。结果 ACMP 组较正常组大鼠平均逃避潜伏期明显延长 ($P < 0.05$), 而依达拉奉组大鼠平均逃避潜伏期较 TE-ACMP 组和生理盐水组均显著缩短 ($P < 0.05$)。与正常组相比, TE-ACMP 组海马 CA1 区凋亡指数明显升高 ($P < 0.01$)。与 TE-ACMP 组、生理盐水组相比, 依达拉奉组海马 CA1 区凋亡指数明显降低 ($P < 0.01$)。结论 依达拉奉可改善 TE-ACMP 大鼠受损的空间记忆能力, 抑制 TE-ACMP 大鼠海马 CA1 区神经元凋亡, 可用于临床防治一氧化碳中毒性脑病。

关键词: 依达拉奉; 一氧化碳中毒性脑病; 空间记忆; 海马; 细胞凋亡

中图分类号: R595.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2011)03-0175-04

Effects of edaravone on spatial memory and hippocampus apoptosis of rats with toxic encephalopathy after acute carbon monoxide poisoning

LU Xue-chun, GUAN Ye-ming, LU Hong-juan, WANG Jing, WANG Qing-song

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

Abstract: Objectives To explore the effect of edaravone on the spatial memory and the apoptosis of hippocampal CA1 area in rats with toxic encephalopathy after acute carbon monoxide poisoning (TE-ACMP). Methods Forty male SD rats were randomly divided into four groups, i.e. control group, TE-ACMP group, normal saline group and edaravone group. The spatial memory was examined by Morris water maze test; apoptosis was measured by TUNEL method. Results The average latency of Morris water maze test in TE-ACMP group was significantly longer than that in control group ($P < 0.05$), the average latency in edaravone group was significantly shorter than that both in saline group or in TE-ACMP group ($P < 0.05$). Meanwhile, the apoptosis index in TE-ACMP group was significantly higher than that in control group ($P < 0.01$), whereas the apoptosis index in edaravone group was significantly lower than that in saline group ($P < 0.01$). Conclusions Edaravone might improve the damaged spatial memory and apoptosis in hippocampus area of TE-ACMP rats, suggesting it is helpful for the clinical management of acute CO poisoning.

Key words: edaravone; toxic encephalopathy after acute carbon monoxide poisoning (TE-ACMP); spatial memory; hippocampus; apoptosis

一氧化碳中毒性脑病 (toxic encephalopathy after acute carbon monoxide poisoning, ACMP) 是指急性一氧化碳中毒患者中毒后发生脑缺氧性改变。在人体各器官中, 脑对缺氧最敏感, 会发生一系列病理性损害, 出现以认知、学习和记忆功能障碍等为主的神经精神症状, 目前该病的发生机制尚不完全明了, 一旦发病, 治疗时间长, 预后差, 给患者家庭及社会带来

沉重负担^[1,2]。

依达拉奉是近年用于临床的新型自由基清除剂, 其主要作用靶位是直接清除一氧化氮、羟自由基及抗氧化活性作用。我们前期的研究表明自由基参与了一氧化碳中毒性脑病的发生^[3], 推测依达拉奉可能通过其作用靶位, 具有防治 TE-ACMP 的作用。

目前有关依达拉奉治疗 TE-ACMP 未见系统报道, 本研究采用 Morris 水迷宫观察 TE-ACMP 大鼠空间记忆能力改变, 并且采用组织病理了解海马 CA1 区神经元凋亡情况, 评价依达拉奉对上述指标的治疗效果, 进一步阐述自由基在 TE-ACMP 可能机制, 为临床防治 TE-ACMP 进行有益的探索。

1 材料与方法

收稿日期: 2010-11-26 修回日期: 2011-03-20

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

作者简介: 刘学春 (1983-), 男, 硕士在读。

通讯作者: 汪青松, 男, 主任医师, 教授, 博士生导师, 研究方向: 老年性痴呆与脑血管病。E-mail: wangqs65@yahoo.com

1.1 实验仪器与试剂

Morris水迷宫视频分析系统(中国医学科学院药物研究所研制), 纯品CO气体〔(体积分数为99.9%)南京特种气体有限公司〕依达拉奉注射液(昆明积大制药有限公司), TUNEL细胞凋亡原位检测试剂盒(德国Roche公司), 80正置显微镜(日本Nikon), 捷达801D形态学图像分析系统软件(江苏捷达科技发展公司)

1.2 动物饲养与筛选分组

实验动物采用健康雄性SD大鼠, 3月龄, 体重350~400 g, 均由安徽医科大学实验动物中心提供并饲养, 商品化干块状饲料饲养, 室内温度保持在22~24℃, 自由饮水。适应性饲养1周后, 借助于Morris水迷宫设备对SD大鼠进行淘汰筛选(淘汰不能胜任水迷宫实验的大鼠, 以免造成假阳性结果), 试验前3 d将入选实验动物用苦味酸染色, 进行随机分组, 分为正常组(不染毒也不接受治疗, 10只)、TE-ACMP组(染毒制备TE-ACMP动物模型, 但不接受治疗, 10只)、生理盐水组(染毒制备TE-ACMP动物模型, 接受生理盐水治疗, 10只)、依达拉奉组(染毒制备TE-ACMP动物模型, 接受依达拉奉治疗, 10只)。

1.3 CO中毒模型制备

除正常组外, 其余各组SD大鼠通过腹腔注射(peritoneal injection, P)纯品CO气体制备急性CO中毒性脑病动物模型。本实验于首次注射CO 100 ml/kg后, 连续3次按首次剂量的半量(50 ml/kg)作追加注射, 间隔为4 h。尾尖静脉采血动态监测染毒大鼠血碳氧血红蛋白(carboxyhemoglobin, HbCO), 以血中HbCO浓度维持在50%以上为中毒指标, 并观察其症状及体征变化, 并且选取的每组大鼠模型均行脑病理切片, 病理学结果显示, 大鼠除急性CO中毒造成的直接脑损害外, 尚可见继发性脑损伤改变^[4,5]。

1.4 方法

ACMP模型制备2周, 给予依达拉奉(3 mg/kg)治疗14 d, 然后对各组SD大鼠利用Morris水迷宫设备进行学习记忆的行为学检测, 最后对实验大鼠麻醉后经灌注固定, 断头取脑后, 行HE染色及TUNEL法检测凋亡细胞。

1.4.1 大鼠空间记忆能力的测定 大鼠空间学习记忆能力测试采用中国医学科学院药物研究所研制的大鼠Morris水迷宫装置。该装置由圆形水池、自动摄像机及电脑分析系统组成。内壁黑色的不锈钢圆柱形储

水池(d=100 cm, h=50 cm), 内置一个高度可调节位置可移动的黑色圆台, 圆台顶部直径为10 cm, 在水池上缘等距离设置东南西北4个标记点, 依据4个入水点在水面和水桶底部的投影点, 将水面和水池均分为4个象限, 站台设置于第IV象限中间。实验时, 使水深淹没圆台顶部2 cm, 调节水温至24~26℃之间, 保持水温基本恒定。整个实验周期中室内物品摆设和实验人员站立位置相对固定, 并严格控制噪声干扰, 调节光线。测试包括可见平台试验、定位导航试验和空间探索试验。实验时从除站台外的3个象限随机选择一个入水点, 将大鼠面向池壁放入水中, 每一次入水位置是假性随机的。可见平台试验, 要求平台高出水面大约1.0 cm, 贴附于平台顶的是一黑白条纹相间的小旗。用于确定急性一氧化碳中毒引起的大鼠定位航行损害不是由动机和感觉运动受累造成, 同时检测大鼠的视敏度及游泳能力, 在定位航行试验之前进行可以提供动物水中有供逃生平台的信息, 加快定位导航任务的进度, 并且用于动物的筛选。定位导航试验测量学习和记忆能力, 共进行5 d, 主要检测指标为平均逃避潜伏期(大鼠由入水至爬上平台所需时间)。空间探索试验检测空间位置记忆能力, 在定位航行试验结束后进行, 主要检测指标为穿越平台次数等。数据采集及图像分析均由图像自动监视和处理系统完成^[6]。

1.4.2 标本的制作(取材、切片) 大鼠10%水合氯醛(350 mg/kg)腹腔麻醉, 经心脏灌注生理盐水50 ml, 再用含2%多聚甲醛、1%戊二醛的混合液100~250 ml灌注固定, 时间不超过6 min, 1 h后取脑, 每个标本放入4%多聚甲醛PBS溶液中固定4~6 h, 沿矢状位切成小块, 在30%蔗糖溶液中脱水12 h后包埋于石蜡中。

1.4.3 大鼠海马细胞凋亡 在细胞凋亡过程中, 染色体DNA双链断裂或单链断裂而产生大量的粘性3'-OH末端, 可在脱氧核糖核苷酸末端转移酶(TdT)的作用下, 将脱氧核糖核苷酸和荧光素、过氧化物酶、碱性磷酸酶或生物素形成的衍生物标记到DNA的3'末端, 从而可进行凋亡细胞的检测, 这类方法称为TdT介导的dUTP缺口末端标记技术(terminal deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling, TUNEL)。对常规石蜡包埋组织样本使用TUNEL细胞凋亡原位检测试剂盒来检测细胞在凋亡过程中细胞核DNA的断裂情况, 在光学显微镜下观察、拍照。高倍视野下(400×)每张TUNEL阳性切片选取5个阳性细胞数(细胞核中有棕黄色颗粒者)最多的

计算凋亡指数。海马神经元细胞凋亡指数 = 凋亡细胞核数 / 总细胞核数。

1.5 统计学处理

应用 SPSS 3.0 统计软件进行统计分析，实验结果均采用单因素方差分析，数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示，结果以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 自由基清除剂对大鼠空间记忆能力的影响

由表 1 可知，与正常组相比，TE-ACMP 组大鼠平均逃避潜伏期明显延长，提示大鼠空间记忆能力受损 ($P < 0.05$)。与 TE-ACMP 组、生理盐水组相比，依达拉奉组大鼠平均逃避潜伏期明显缩短 ($P < 0.05$)，依达拉奉治疗可以改善 TE-ACMP 大鼠空间记忆能力。

表 1 各组 SD 大鼠水迷宫定位导航监测指标 (平均逃避潜伏期) s

| 天数 | 正常组 | TE-ACMP 组 | 生理盐水组 | 依达拉奉组 |
|-------|-----------------------------|-----------------|-----------------|---------------|
| 第 2 天 | 23.37 ± 11.08 ^{△△} | 41.95 ± 15.27 | 43.74 ± 16.79* | 28.71 ± 13.70 |
| 第 3 天 | 19.43 ± 9.71 [△] | 37.63 ± 17.16* | 38.36 ± 17.69* | 23.06 ± 12.31 |
| 第 4 天 | 15.43 ± 7.20 ^{△△} | 38.70 ± 20.77* | 35.89 ± 15.37* | 19.95 ± 9.19 |
| 第 5 天 | 12.59 ± 5.82 ^{△△} | 33.81 ± 15.58** | 36.29 ± 13.74** | 16.81 ± 8.50 |
| 第 6 天 | 13.16 ± 6.13 ^{△△} | 34.40 ± 14.36** | 32.79 ± 15.95* | 15.21 ± 7.49 |

注：与 TE-ACMP 组比较 $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ ；与依达拉奉组比较 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

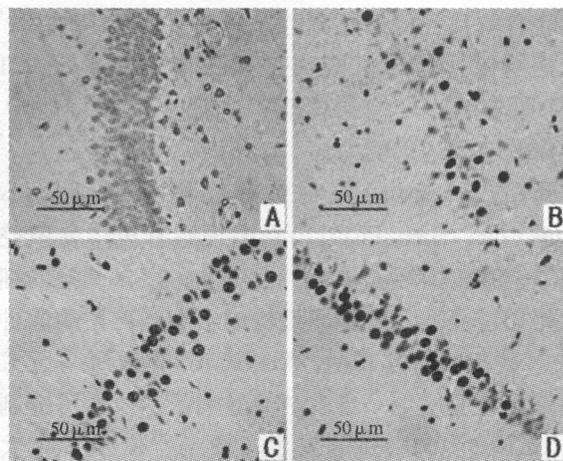
2.2 自由基清除剂对大鼠海马 CA1 区细胞凋亡的影响

TUNEL 染色阳性物质定位于细胞核，强阳性染色被认为是凋亡。胞核呈蓝黑色且体积小，核膜下染色质聚集，细胞核固缩有的呈碎片状，不规则，大小不一致，呈棕黄色颗粒者为阳性细胞 (见图 1)。由于正常的或在增殖的细胞几乎没有 DNA 的断裂，因而没有 3'-OH 形成，很少能够被染色，所以正常组细胞凋亡不明显，而依达拉奉组可见少量凋亡细胞，TE-ACMP 组、生理盐水组可见明显细胞凋亡。由表 2 可知，与正常组相比，TE-ACMP 组海马 CA1 区凋亡指数明显升高 ($P < 0.01$)。与 TE-ACMP 组、生理盐水组相比，依达拉奉组海马 CA1 区凋亡指数明显降低 ($P < 0.01$)。

表 2 各组 SD 大鼠海马 CA1 区凋亡指数 %

| 组别 | 例数 | 凋亡指数 |
|-----------|----|----------------------------|
| 正常组 | 10 | 1.75 ± 0.89 |
| TE-ACMP 组 | 10 | 27.58 ± 7.51 ^{△△} |
| 生理盐水组 | 10 | 25.96 ± 8.51 |
| 依达拉奉组 | 10 | 11.38 ± 4.19** |

注：与正常组比较， $\Delta\Delta P < 0.01$ ；与 TE-ACMP 组、生理盐水组比较，* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$



A 正常组 B 依达拉奉组 C TE-ACMP 组 D 生理盐水组
图 1 光学显微镜下各组大鼠海马 CA1 区凋亡染色 (400×)

3 讨论

经典的 Morris 水迷宫所检测的是大鼠在多次的训练中，学会寻找固定位置的隐蔽平台，形成稳定的空间位置认知能力^[9]。与过去的跳台、避暗等检测工具相比，Morris 水迷宫主要优点在于能够系统全面地考察实验动物空间认知加工的过程，客观反映其认知水平；同时能够将实验动物的学习记忆障碍和感觉、运动缺陷等分离开来，并且对动物的伤害性刺激作用较小，减少了对学习记忆过程检测的干扰^[7]。所以，我们选取 Morris 水迷宫对实验大鼠进行淘汰筛选，并在建模前及治疗后进行实验大鼠学习记忆检测。

自由基是具有未配对电子的原子、原子团或分子，由氧分子衍生的自由基称氧自由基。在人体中氧自由基是最多的，正常人体内存在清除氧自由基的防御系统，使体内自由基的产生和消除处于动态平衡状态，故不会发生自由基连锁反应和组织损伤。然而机体清除氧自由基的能力是有限的，当氧自由基产生过多而超过人体清除能力时，就会造成组织损伤。缺血缺氧时机体通过酶系统与非酶系统产生氧自由基并使氧自由基的生成增加。SOD 作为清除超氧阴离子的重要的抗氧化酶，体内变化间接反映了清除自由基的能力变化，MDA 是脂质过氧化损伤的代谢产物，可间接反映体内自由基堆积过多引起的脂质过氧化反应的强弱^[8]，超氧化物歧化酶 (SOD) 和丙二醛 (MDA) 是反映自由基代谢的重要指标。我们前期的相关研究已表明急性一氧化碳中毒性脑病组血清中 SOD 活性明显下降，MDA 含量显著增加，自由基可能通过损伤膜结构和功能等引起脑内 NAA、Cho、Lac 的含量变化^[3]。本研究表明依达拉奉能改善 TE-ACMP 大鼠受损的空间记忆能力，可能与依达拉奉具

有清除自由基、抗细胞凋亡和神经保护作用有关^[9]。我们推测依达拉奉可能通过清除自由基,改善 TE-ACMP损伤的膜结构和功能,从而改善 TE-ACMP大鼠受损的空间记忆能力。

凋亡 (apoptosis) 又称为程序性细胞死亡 (Programmed cell death PCD), 是多细胞有机体为调控机体发育, 维护内环境稳定, 由基因程序化调控的细胞主动死亡过程, 与细胞坏死构成了细胞死亡的两种形式^[10]。我们的研究表明, TE-ACMP导致海马区 CA1 细胞凋亡过度发生, 自由基清除剂依达拉奉可抑制海马区 CA1 细胞凋亡过度发生。TE-ACMP后发生大量细胞凋亡的机制尚不清楚, 根据我们的研究推测, CO中毒后自由基大量生成, 作用于神经细胞, 启动了凋亡调控基因, 从而引起了额叶皮质、海马、基底节等部位神经细胞凋亡, 导致了 TE-ACMP发生。

本研究表明, TE-ACMP导致海马区 CA1 细胞凋亡过度发生, TE-ACMP大鼠的空间记忆能力受损, 依达拉奉抑制海马区 CA1 细胞凋亡过度发生, 改善 TE-ACMP大鼠受损的空间记忆能力。因此临床上自由基清除剂可作为防治 TE-ACMP的手段之一。

· 短篇报道 ·

急性百草枯中毒并发横纹肌溶解症 1例报告

高琳

(沈阳市第九人民医院, 辽宁 沈阳 110024)

百草枯现被广泛用作除草剂, 属高毒类, 具有多系统毒性^[1]。我院近期收治 1例口服百草枯中毒并发横纹肌溶解症患者, 病例少见, 现报告如下。

1 病历资料

患者, 女, 41岁, 既往健康。2010年 11月 28日 4时许自服 20%百草枯约 10 ml 之后反复恶心、呕吐、腹泻, 并自行催吐, 反复蹲位呕吐的时间 1~2 h 因呕吐不缓解, 周身乏力于 18时来我院就诊, 急诊予洗胃、导泻、利尿、保护胃肠黏膜, 应用大剂量糖皮质激素后收入病房。入院时自诉乏力、双下肢疼痛, 无尿, 无呼吸困难。查体: T 36.5℃, P 88次/分, R 26次/分, BP 148/90 mm Hg 意识清, 精神不振, 咽充血, 双肺未闻及啰音, 心率 88次/分, 律齐, 腹平软, 无压痛, 双小腿肿胀, 压痛阳性, 触诊质韧, 局部皮温、颜色正常, 无肢体畸形及活动度异常。辅助检查: 肺 CT示右肺中叶见淡片影, 纵隔未见异常; 心电图示窦律, 心率 88次/分, 无明显 ST-T改变。实验室检查: 血白细胞 $21.9 \times 10^9/L$, 血肌酸激酶 1 699 U/L, 肌酸激酶同工酶 50 U/L, 肌钙蛋白阴性; 血尿素氮 9.82 mmol/L, 肌酐 $199 \mu\text{mol/L}$, 尿肌

参考文献:

- [1] Prockop LD, Chichkova R I. Carbon monoxide intoxication: an updated review [J]. *J Neurol Sci* 2007; 262 (1-2): 122-130.
- [2] Pianadosi CA. Carbon monoxide poisoning [J]. *Undersea Hyperb Med* 2004; 31: 167-177.
- [3] 管叶明, 刘学春, 汪青松. 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 [J]. *中国工业医学杂志*, 2010; 23 (2): 92-94.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] Schenk F, Morris R G. Dissociation between components of spatial memory in rats after recovery from the effects of retrohippocampal lesions [J]. *Exp Brain Res* 1985; 58 (1): 11-28.
- [7] 胡镜清, 温泽淮, 赖世隆. Morris水迷宫检测的记忆属性与方法学初探 [J]. *广州中医药大学学报*, 2000; 17 (2): 117-119.
- [8] Rudnicki M, Silveira J, Pereira M, et al. Protective effects of Passiflora alata extract pretreatment on carbon tetrachloride induced oxidative damage in rats [J]. *Food Chem Toxicol* 2007; 45: 656-661.
- [9] Shimon A, Tatsushi K, Chika KON, et al. Anti-apoptotic and neuroprotective effects of edaravone following transient focal ischemia in rats [J]. *Eur J Pharmacol* 2005; 516 (2): 125-130.
- [10] 陈杰, 李甘地. 病理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 35-38.

红蛋白阳性; 动脉血气分析 pH 7.31, PO_2 109 mm Hg, HCO_3^- 10.1 mmol/L。

初步诊断: 急性百草枯中毒、急性肾功能衰竭、代谢性酸中毒、横纹肌溶解症, 给予反复血液灌流联合血液透析, 大剂量糖皮质激素, 抗氧化自由基, 利尿, 保护胃肠黏膜, 保护肝肾功能, 防治感染等治疗。

患者持续无尿, 双小腿后肌群肿胀逐渐加剧, 但足背动脉搏动尚存在。第 2天实验室检查, 血丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶、尿素氮、肌酐、肌酸激酶进一步明显增高; 第 3天, 患者开始出现呼吸困难, 动脉血气提示低氧血症, 并进行性加重, 经抢救无效于 30日下午临床死亡。

2 讨论

20%百草枯对成人的致死量是 10~20 ml, 在胃肠道吸收迅速, 并分布于肺、肾、肝、肌肉, 通过产生自由基等形成多机制的细胞损害^[2], 可出现 ARDS 肺纤维化、中毒性肝炎、急性肾功能衰竭、中毒性心肌炎等, 但合并横纹肌溶解症者未见报道。本例患者较长时间蹲位呕吐应该是一定的影响因素, 但分析患者小腿肿胀非常严重, 百草枯应起到决定性作用。希望通过此例报告, 医务人员在以后的临床工作中能给予百草枯中毒患者更全面的临床观察和相应的积极治疗。

参考文献:

- [1] 朱子江, 龚兆庆, 汪国良. 中毒急救手册 [M]. 3版. 上海: 上海科学技术出版社, 2007: 1017.
- [2] 唐小江, 李来玉, 夏昭林. 临床毒理学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 321.