

# 脑纹状体多巴胺系统在急性 CO中毒后的变化研究

李宗洋, 雨华, 陈明, 关里, 赵金垣, 张雁林, 朱明霞, 李树强

(北京大学第三医院职业病研究中心, 北京 100191)

**摘要:** 目的 观察急性一氧化碳 (CO) 中毒后纹状体多巴胺 (DA) 及其代谢产物含量的动态变化, 探讨单胺氧化酶 B (MAO-B) 及 DA系统变化在急性 CO中毒迟发性脑病 (delayed neuropsychologic sequelae, DNS) 发病中的意义。方法 采用腹腔注射 CO法制备急性 CO中毒大鼠模型, 利用阿朴吗啡诱导旋转实验鉴定 DNS模型, 分析不同模型脑组织纹状体 DA系统、MAO-B活性变化。结果 急性 CO中毒后纹状体 MAO-B活性即明显降低, 仅为对照组水平的 43%; 同时用清醒动物脑微透析实验观察纹状体 DA及其代谢产物浓度变化发现, CO中毒后 1 h DA浓度即增加, 其代谢产物则明显降低, 提示急性 CO中毒早期 DA代谢显著降低; 中毒 14 d后 DNS模型大鼠纹状体 MAO-B活性显著增加, 为对照组活性的 1.7倍, DA浓度则显著降低, 仅为对照组的 29%, 代谢产物浓度明显增加, 提示出现运动功能障碍的 DNS模型脑纹状体 MAO-B活性显著升高, DA代谢明显增加。结论 急性 CO中毒 DNS大鼠脑纹状体 MAO-B活性可异常升高, 加速 DA代谢, 影响 DA神经系统保持锥体及锥体外系运动协调功能, 同时生成的大量 DA代谢产物具有毒性作用, 可进一步加重脑循环障碍和氧化应激损伤, 形成恶性循环。

**关键词:** 急性一氧化碳中毒; 迟发性脑病; 单胺氧化酶 B; 多巴胺

**中图分类号:** R595.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-221X(2011)04-0243-05

Study on the dynamic changes of the dopamine system in the striatum of rats after acute carbon monoxide poisoning

LIZong-yang DING Li-hua CHEN Ming GUAN Li ZHAO Jin-yuan ZHANG Yan-lin ZHUMing-xia LIShu-qiang  
(Research Center of Occupational Medicine, The Third Hospital of Peking University, Beijing 100191, China)

**Abstract:** Objective To study on the changes of monoamine oxidase B (MAO-B), dopamine (DA) and its metabolites dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA) in the striatum of free-moving rats after carbon monoxide (CO) poisoning. Methods Experimental animal groups were as follows: (1) Control group; (2) CO exposure with 1 h group; (3) Delayed neuropsychologic sequelae (DNS) group and (4) non-DNS group. CO was injected into rats intraperitoneally at a dosage of 120 ml/kg for the first time and repeated injection of CO (60 ml/kg) was subsequently provided for 3 times at 4 h intervals. We measured HbCO levels in the blood of rats for 24 hours after the first CO administration and observed the changes of DA and its metabolites' levels in the striatum in these groups as determined by means of brain microdialysis. Results There was significant change with the activity of MAO-B and DA level in DNS model after carbon monoxide poisoning. In the prepart period after CO poisoning, the activity of MAO-B was decreased significantly and the metabolism of DA was decreased remarkably. But at the time that occurred DNS generally, the unusual elevation was found in the DNS group and the metabolism of DA was increased significantly. Conclusion These data suggested that the dysfunction of corticospinal and extracorticospinal tract might be related to the disorder of DA system in the striatum, and the metabolites of DA could further aggravate the cerebral circulation dysfunction and the oxidative damage, resulting in a vicious circle.

**Key words:** acute carbon monoxide poisoning; delayed neuropsychologic sequelae; monoamine oxidase B; dopamine

临床研究发现急性 CO中毒迟发性脑病 (DNS) 患者出现的锥体系及锥体外系功能障碍类似于帕金森病<sup>[1]</sup>, 主要表现为肌张力增高、运动减少、动作缓慢

等躯体运动障碍<sup>[2,3]</sup>。躯体运动主要由锥体系和锥体外系协同支配完成。锥体系包括皮质脊髓束和皮质核束。锥体外系则是锥体系以外所有与运动调节有关的结构及下行通路, 包括基底节、小脑及脑干等许多核团。人类锥体外系的功能以调节肌张力、协调肌肉活动、维持体态姿势和习惯性动作为主, 锥体外系功能的实现必须依赖锥体系传递信号, 而锥体系功能的顺利完成又必须有锥体外系保证稳定的肌张力。两者在功能上相互协调、互相配合, 共同完成人体各项复杂的随

收稿日期: 2011-04-27

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目 (血红素加氧酶-1异常表达对急性 CO中毒迟发性脑病致病作用研究, 编号: 7113175); 北京大学第三医院中青年骨干基金 (编号: 76498-02)。

作者简介: 李宗洋 (1974-), 男, 主治医师。

责任作者: 关里, 女, 助理研究员, 博士, 研究方向: 化学中毒的分子机制。E-mail: guanli@yahoo.com.cn

意运动。目前已证实多巴胺 (DA) 神经系统在躯体运动、认知和精神活动形成过程中有重要作用。

DNS出现类似帕金森样症状可能与 DA神经系统 DA神经递质耗竭关系密切。本研究拟利用在体脑微透析技术观察急性 CO中毒早期、DNS及非 DNS大鼠纹状体 DA代谢, 以及上述时间点纹状体单胺氧化酶-B (MAO-B) 活性变化, 从而解释急性 CO中毒性 DNS帕金森样症状的神经生物化学基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 急性 CO中毒模型制备

急性 CO中毒大鼠制备: 参照王耀宏等建立的腹腔间隔注射法制备急性 CO中毒迟发性脑病模型<sup>[4]</sup>。首次经腹腔注射纯品 CO (99.95%) 气体剂量为 120 mL/kg 之后每隔 4 h追加注射一次 60 mL/kg共 4次, 保持碳氧血红蛋白 (HbCO) 浓度在 50%以上, 并维持 16~20 h为急性 CO中毒模型成功指标。

急性 CO中毒 DNS组: 阿朴吗啡诱导模型大鼠向健侧的旋转行为已作为一项公认的 DA毁损程度的行为学评价指标<sup>[5]</sup>。急性 CO中毒后 14 d为迟发性脑病多发期, 中毒模型制备成功后常规饲养第 13天用阿朴吗啡 (0.5 mg/kg ip) 诱导大鼠对侧旋转行为, 记录 30 min内旋转圈数, 大于平均 7转/min的大鼠作为成功的帕金森样大鼠, 将其列入急性 CO中毒迟发性脑病组; 其余大鼠为急性 CO中毒非 DNS组。

### 1.2 脑微透析实验方法

麻醉 SD大鼠 (戊巴比妥钠 400 mg/kg ip), 将头部脱毛的大鼠固定在立体定位仪上, 暴露头骨, 确定前卤位置, 并将 CMA/12探针套管对准此点, 按立体定位仪座标: AP0.6 mm; ML2.5 mm; DV7 mm的值得定位<sup>[6]</sup>, 使 CMA/12探针套管徐徐降至所需的深度。外科水泥固定套管, 手术后局部用青霉素抗感染, 18~24 h后进行脑微透析实验。其中急性 CO中毒大鼠早期纹状体 DA变化实验, 在手术成功后 24 h进行急性 CO染毒再行微透析实验。透析时拔出套管, 插入探针, 进口管连接 CMA/100微透析泵, 以 1.5 μL/min速度灌流, 出口管连接 HoneyComb™低温收集器, 每 30~60 min采集一个样品, 每个样品管内预先加入 5 μL 1.1 mol/L高氯酸溶液防止 DA代谢降解<sup>[8]</sup>。灌流液也为人工脑脊液, 约灌流 90 min后, 每 30 min收集一次灌流样品, 加入 5 μL 抗氧化剂 (0.4 mol/L高氯酸溶液) 立即用高效液相检测。

### 1.3 脑组织病理学检查

进行脑微透析实验后取大鼠脑组织, 行 HE染色, 光镜观察, 镜下观察纹状体形态学变化。

### 1.4 MAO-B活性检测方法<sup>[7]</sup>

参照《药理实验方法学》单胺氧化酶 B活性检测, 用 10倍体积 (V:W=1:10) 预冷的含 0.32 mol/L蔗糖的磷酸缓冲液 (10 mmol/L pH7.4) 制备脑组织匀浆, 匀浆 600×g离心 10 min取上清液 15 000×g离心 10 min沉淀用上述缓冲液悬浮, 然后 15 000×g再离心 10 min沉淀用 10 mmol/L磷酸缓冲液 (pH7.4) 稀释备用。稀释液与 MAO-B特异性底物苄胺在 37℃下温育 20 min总体积 18 mL反应应用 0.2 mL HCl (1 mol/L) 终止, 代谢产物用 3 mL 环己烷振摇抽提 1 min 4℃保存 24 h 上层液在 242 nm比色, 消光系数 ε=14 000 L/(mol·cm)。

### 1.5 数据处理与统计分析

微透析实验首先以各标准品浓度对色谱峰面积制作标准曲线, 然后计算每组动物每个样品的基础透析浓度; 用 SPSS 11.0软件进行统计分析, 多组间比较采用方差分析, 两组间比较采用 student's t检验。

## 2 结果

### 2.1 阿朴吗啡炎症急性 CO中毒大鼠模型

实验中共取急性 CO染毒大鼠 50只, 其中在中毒早期死亡 14只, 中毒后 14 d腹腔注射阿朴吗啡 (0.5 mg/kg) 后, 30 min内向对侧旋转 > 7圈/min大鼠共 6只, 为急性 CO中毒 DNS模型; 其余 30只大鼠随机选 6只为急性 CO中毒非 DNS模型。

### 2.2 标准曲线制作及 HPLC-ECD测定 DA及其代谢产物的高效液相色谱图 (图 1、图 2)

采用外标法进行定量, 首先配制系列标准品溶液 (3.9 7.8 15.625 31.25 62.5 125 250 500 μmol/L), 各取 45 μL进样, 以峰面积对标准品浓度制作标准曲线。各标准曲线相关系数均 > 0.999。

### 2.3 对照组、急性 CO中毒 1 h组、DNS组和非 DNS组大鼠纹状体 DA及其代谢产物含量变化

对照组大鼠每 30 min透析样品中 DA及其代谢产物基础值分别为: (0.35±0.06) pmol/45 μL (16.87±3.89) pmol/45 μL (5.60±1.88) pmol/45 μL。实验发现, 与对照组比较, 急性 CO中毒后 1 h纹状体 DA浓度升高约 30%, 12 h后恢复至正常水平<sup>[8]</sup>; DNS组大鼠纹状体 DA含量较对照组明显减少, 仅为对照组 DA含量的 29% (图 3A) P<0.05 非 DNS组大鼠纹状体 DA含量与对照组比较略降低, 但差异无统计学意义。说明染毒 14 d后, DNS组大鼠纹状体 DA含量明显少于非 DNS组大鼠。观察不同组别 DA代谢产物 3,4-二羟苯乙酸 (DOPAC) 和高香草酸 (HVA) 含量发现, 急性 CO中毒后 1 h大鼠纹状体 DOPAC和 HVA含量显著增加,

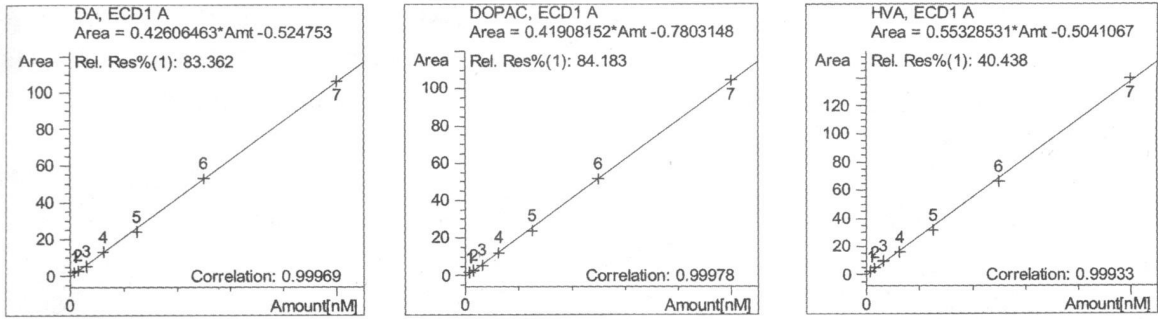
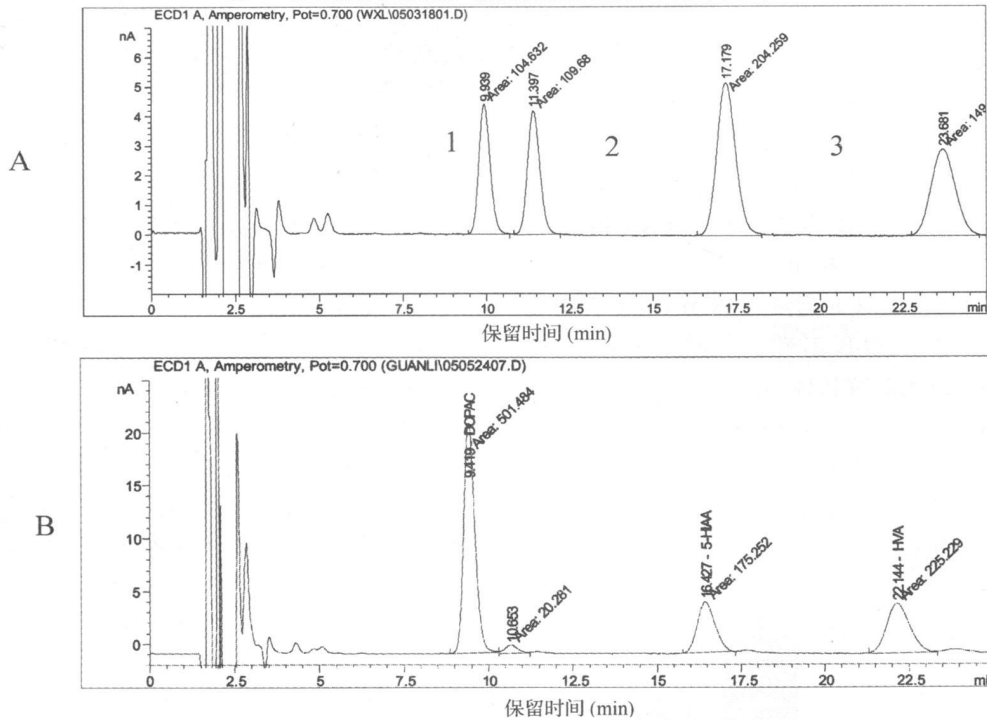


图 1 多巴胺及其代谢产物高效液相色谱检测标准曲线

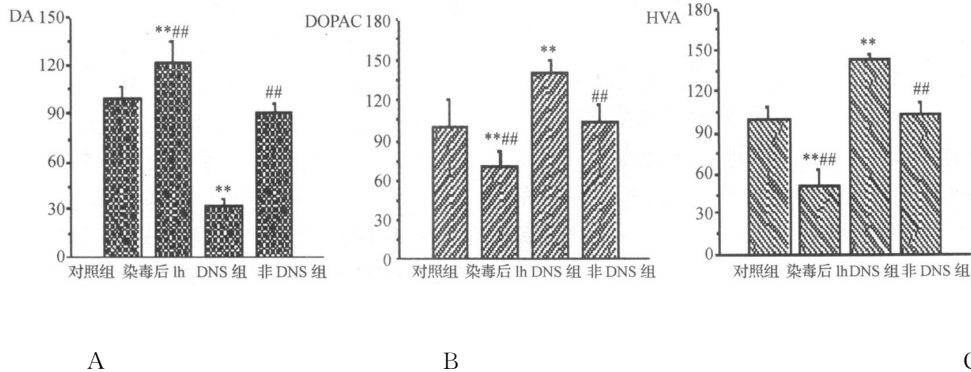


注: A 为高效液相色谱法检测多巴胺及其代谢产物标准品的保留时间, B 为高效液相色谱法检测微透析样品中多巴胺及其代谢产物的保留时间; 1—3, 4-二羟苯乙酸, 2—多巴胺, 3—高香草酸; 保留时间分别为 11.40 min, 9.34 min 和 17.18 min。

图 2 多巴胺及其代谢产物高效液相色谱法检测中的保留时间

12 h后恢复至正常水平<sup>[8]</sup>; DNS组大鼠纹状体 DOPAC 和 HVA含量较对照组和非 DNS组大鼠均明显升高, 分别升高了 40%和 43%及 37%和 40% (图 3B C),  $P <$

0.01, 说明 DNS组大鼠纹状体 DA代谢明显增加, 非 DNS组大鼠纹状体 DOPAC和 HVA含量与对照组相比无显著变化。



注: 与对照组比较, \*  $P < 0.01$ ; 与 DNS组比较, ##  $P < 0.01$

图 3 不同组别大鼠脑纹状体多巴胺及其代谢产物水平

## 2.4 对照组、DNS组和非DNS组大鼠纹状体 HE染色结果

HE染色发现, 对照组大鼠纹状体神经元形态正常呈圆形或椭圆形, 细胞核清晰, 胞浆淡蓝色, 染毒

14 d后 DNS组大鼠纹状体可见大量坏死细胞及炎症细胞浸润, 非DNS组大鼠纹状体以形态完整的正常细胞为主, 可见少量坏死细胞 (图 4)。

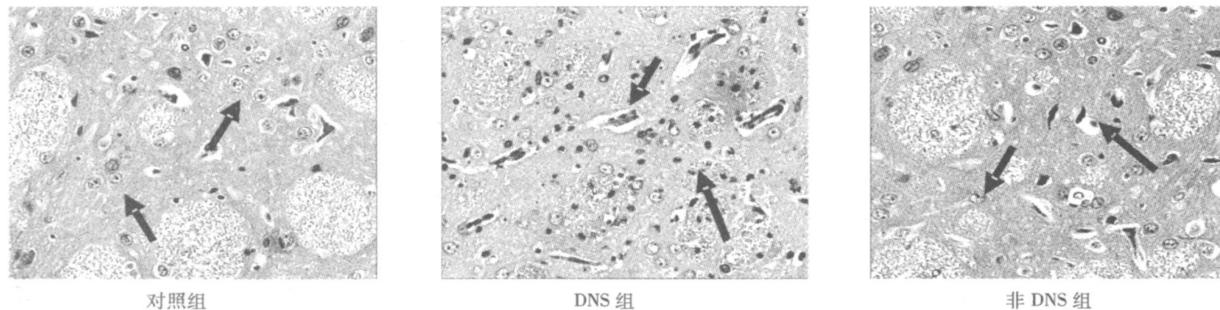
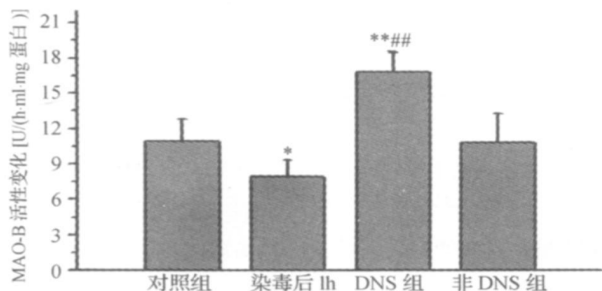


图 4 不同组别大鼠脑纹状体形态学变化

## 2.5 对照组、急性CO中毒1h组、DNS组和非DNS组大鼠脑纹状体MAO-B活性变化

图 5 可见, CO中毒 1 h后纹状体 MAO-B活性显著降低, 为对照组 MAO-B活性的 70%,  $P < 0.05$ ; 染毒 14 d后 DNS组大鼠纹状体 MAO-B活性较对照组明显增加, 升高约 47%,  $P < 0.01$ ; 非DNS组大鼠纹状体 MAO-B活性与对照组比较无明显差异。与非DNS组大鼠比较, DNS组大鼠纹状体 MAO-B活性较之高约 50%,  $P < 0.01$ 。



注: 与对照组比较, \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$ ; 与非DNS组比较,  $\#\# P < 0.01$

图 5 不同组别大鼠脑纹状体单胺氧化酶-B活性

## 3 讨论

脑机能是各种神经递质共同作用的结果, DA是一种重要的单胺类神经递质, 目前研究结果表明 DA主要参与机体运动、学习及精神等神经调节<sup>[9-11]</sup>。脑内DA能神经元的胞体主要位于中脑和间脑, 其神经纤维主要投射到纹状体及广泛的边缘系统和新皮质区。

人类中枢DA通路可分为4个系统。其中黑质-纹状体系统其胞体位于黑质致密区(A9), 主要支配纹状体, 该通路所含有的DA占全脑含量的70%以上, 是锥体外系运动功能的高级中枢。各种原因引起

的该系统DA含量显著降低均可导致机体产生帕金森氏病样表现; 反之, 该DA神经系统功能亢进时, 则机体出现多动症的表现, 该部分DA神经系统异常, 主要影响机体运动协调功能。

本研究以急性CO中毒大鼠模型为对象, 观察了在急性CO中毒末次染毒后14 d DNS组和非DNS组的大鼠脑纹状体DA及其代谢产物的释放变化及脑纹状体MAO-B活性在上述时间的变化。实验发现, 急性CO中毒DNS组大鼠脑纹状体DA代谢在中毒后14 d出现异常变化, 表现纹状体DA含量显著降低, 代谢产物水平升高, 同时发现, 在急性CO中毒DNS期脑纹状体MAO-B活性明显增加, 提示在DNS发生过程中纹状体DA代谢显著增加。早期我们的研究曾发现在连续CO染毒后, 在高浓度HbCO恢复期间纹状体DA水平呈先升高后降低的变化过程, 其代谢产物水平则呈现显著降低又升高至正常水平的变化过程<sup>[8]</sup>。纹状体DA的代谢水平在CO染毒后呈先抑后扬的变化现象可能与脑组织恢复氧气供应过程中激活MAO-A增加DA代谢有关。

从代谢角度看, DA是MAO的主要底物, MAO在DA代谢途径中发挥重要作用。MAO在DA代谢中将DA降解为DOPAC同时生成过氧化氢( $H_2O_2$ ),  $H_2O_2$ 可转化生成羟基等自由基对神经元产生毒性作用。MAO-B还能氧化1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP), MPTP能诱导PD, 其神经毒作用主要通过MAO-B催化MPTP生成1-甲基-4-苯基吡啶盐离子( $MPP^+$ )实现的。经MAO-B氧化脱氨基作用产生的 $H_2O_2$ 与二价铁经Fenton式反应形成高活性羟自由基。研究发现DA代谢产物是老年痴呆症(AD)

发病过程中自由基的重要来源。MAO-B基因敲除的小鼠对致 HD神经毒素 MPTP则有耐受性。已证明海马有老年斑的 AD患者星状胶质细胞中 MAO-B水平升高, 脑内 MAO-A和 MAO-B mRNA水平明显升高<sup>[12]</sup>。铝过负荷小鼠痴呆模型和 CO中毒致小鼠痴呆模型中也发现 MAO-B活性升高<sup>[13]</sup>。上述内容均说明 MAO-B活性升高, 不但能加速 DA代谢, 还能进一步生成过量的过氧化产物, 对脑组织细胞造成损伤, DA神经元受损后不能代偿性增加 DA合成, DA神经系统功能减退, 因此产生恶性循环可能是神经退行性病变的主要原因。

本研究发现 DNS组大鼠纹状体 MAO-B活性明显升高, 局部 DA代谢增加。由此考虑在急性 CO中毒后血 HbCO虽然迅速降低, 但脑组织仍可存在 DA代谢异常引起的氧化应激损伤, DNS大鼠纹状体 MAO-B活性显著增加, 加速 DA代谢, 可导致生成过量的高活性自由基, 对脑组织产生神经毒性作用可能是 DNS模型出现帕金森样症状的原因之一, 同时可进一步加重脑循环障碍和氧化应激损伤, 产生恶性循环。

上述 DA在 CO中毒后的变化与急性 CO中毒后出现迟发性脑损伤和神经功能改变有何特殊关系是值得进一步研究的重要问题。有研究发现 DA在神经元缺血性坏死中有重要作用, 用 6羟基多巴胺耗竭一侧纹状体的 DA 然后使全脑暂时缺血, 发现 DA耗竭侧纹状体神经元无坏死现象, 对侧纹状体神经元出现大量坏死, 说明 DA在缺血性神经元死亡中有重要意义。在对急性 CO中毒后尤其在迟发性脑病的研究中已经证实, 脑循环障碍是导致迟发性脑病发生发展的重要因素, 因此急性 CO中毒后纹状体 DA水平升高是否参与神经元再次损伤在解释急性 CO中毒 DNS

的病理生理机制中亦具有重要价值。

## 参考文献:

- [1] Prockop DJ. Carbon monoxide brain toxicity: clinical magnetic resonance imaging, magnetic resonance spectroscopy and neuropsychological effects in 9 people [J]. *J Neuroimaging* 2005 15: 144-149.
- [2] Payne A, Eizvesper B, Blasczyk R, et al. Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential [J]. *Biochem Pharmacol* 2010 80 (12): 1895-1903.
- [3] Choi I S. Parkinsonism after carbon monoxide poisoning [J]. *Eur Neurol* 2002 48: 30-33.
- [4] 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.
- [5] Deumens R, Blokland A, Prickaerts J. Modeling Parkinson's disease in rat: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway [J]. *Exp Neurol* 2002 175 (2): 303-317.
- [6] Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* [M]. New York: Academic Press, 1986: 107.
- [7] 徐叔云, 卞如谦, 陈修, 等. *药理实验方法学* [M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 526-529.
- [8] 关里, 赵金垣. 在体微透析观察大鼠急性一氧化碳中毒后纹状体多巴胺及其代谢产物的变化 [J]. *环境与职业医学*, 2007 24 (3): 243-246.
- [9] Cenci M A, Konradi C. Maladaptive striatal plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia [J]. *Prog Brain Res* 2010 183: 209-233.
- [10] Koob G F, Bloom F E. Cellular and molecular mechanisms of drug dependence [J]. *Science* 1988 242: 715-723.
- [11] Casner SA, Williams G V, Goldman-Rakic P S. Reversal of anti-psychotic induced working memory deficits by short term dopamine D1 receptor stimulation [J]. *Science* 2000 287: 2020-2022.
- [12] Wu Y H, Fischer D E, Swaab D F. A promoter polymorphism in the monoamine oxidase A gene is associated with the pineal MAOA activity in Alzheimer's disease patients [J]. *Brain Res* 2007 1167: 13-19.
- [13] 杨俊卿, 周歧新. 尼莫地平对一氧化碳中毒致脑损伤保护作用研究 [J]. *工业卫生与职业病*, 2001 27: 19-22.

## 《职业卫生与应急救援》杂志征稿征订

《职业卫生与应急救援》杂志由国家科委批准、上海市安全生产监督管理局主管, 上海市职业安全健康研究院、上海市化工职业病防治院主办, 是以职业病防治、事故应急救援为特色内容的全国性职业卫生专业期刊, 是中华预防医学会系列杂志。本刊为中国生物医学文献数据库来源期刊, 并在万方数据库全文上网, 本刊还被中国学术期刊(光盘版)电子杂志社“中国期刊网”、“中国学术期刊(光盘版)”全文收录, 并以光盘版形式向国内外公开出版发行, 且被评为中国学术期刊(光盘版)执行规范优秀期刊。本刊宗旨是提高职业卫生水平, 普及应急救援知识。主要读者是职业卫生及职业病临床医务人员, 有关教学科研人员, 各级工矿保健、民防救灾、安全技术、劳动保护和企业管理人员等。

主要栏目有“信息动态”、“法律法规”、“知识论坛”、“应急救援”、“安全卫生监护”、“论著”、“讲座”、“调查研究”、“学术交流”、“科普知识”、“海外透视”等。欢迎广大作者投稿!

本刊为大 16开, 56页, 双月刊; 国内统一刊号 ISSN 1007-1326 CN31-1719/R 每期定价 8元, 全年 48元(含邮资)。欢迎直接来信汇款订阅。编辑部地址: 上海市中漕路 94号, 邮编: 200030 联系人: 张老师。电话: (021) 54894373 传真: (021) 54894374 投稿邮箱: zyw@chinaipuma.net.cn