

• 论著 •

早期激素干预对急性一氧化碳中毒大鼠迟发性脑病的预防作用

王宝军, 刘国荣, 李月春, 项文平, 庞江霞, 薛慧, 闫洁, 贾星
包头市中心医院神经内科, 内蒙古包头市 014040

摘要: 目的 观察早期激素干预对急性一氧化碳中毒大鼠迟发性脑病(DEACMP) 的预防作用。方法 将 132 只雄性 Wistar 大鼠随机分成 3 个实验组: CO 中毒组(COP 组)、CO 中毒 + 地塞米松 10 mg/kg 组(DSMS-10 组) 和 CO 中毒 + 地塞米松 30 mg/kg 组(DSMS-30 组), 每组 40 只。另设健康对照组(NC 组), 12 只。实验组按 150 ml/kg 腹腔内注射 CO 制备急性一氧化碳中毒动物模型, 健康对照组大鼠注射等体积的空气。在中毒后 30 min 内 DSMS-10 组腹腔内注射地塞米松剂量为 10 mg/kg/d, 共 7 d; DSMS-30 组腹腔内注射地塞米松剂量为 30 mg/kg/d, 共 7 d; NC 组和 COP 组则注射等剂量生理盐水。监测中毒后 90 min、7 d、14 d、21 d 各组大鼠血清中髓鞘碱性蛋白(MBP) 的含量, 并在上述各时间点处死大鼠取脑组织, 行 HE 及 MBP 免疫组化染色。采用 Morris 水迷宫实验评估动物的智力状态。结果 Morris 水迷宫实验结果显示, COP 组中有 8 只大鼠被判定为迟发性脑病; DSMS-10 组中有 6 只被判定为迟发性脑病; 而 DSMS-30 组和对照组未出现迟发性脑病。COP 组大鼠血清中 MBP 含量增高最显著, DSMS-10 组也有增高, DSMS-30 组接近正常。差异在中毒后 90 min、7 d 最明显。病理学检查显示 COP 组中发生迟发性脑病的大鼠在中毒 90 min ~ 21 d 后海马、皮质下出现神经元损伤、髓鞘碱性蛋白脱失等病理改变, 上述病理改变在各实验组中均可观察到, 但以 COP 组大鼠病变程度最重, DSMS-30 组最轻。结论 10 mg/kg 地塞米松可降低急性一氧化碳中毒大鼠迟发性脑病的发生率。30 mg/kg 地塞米松则可避免迟发性脑病的发生。

关键词: 急性一氧化碳中毒; 急性一氧化碳中毒迟发性脑病; 髓鞘碱性蛋白; 地塞米松; 发病机制

Preventive effect of early hormonal intervention on delayed encephalopathy in rats with acute carbon monoxide poisoning

WANG Bao-Jun, LIU Guo-Rong, LI Yue-Chun, XIANG Wen-Ping, PANG Jiang-Xia, XUE Hui, YAN Jie, JIA Xing. Department of Neurology, Center Hospital of Baotou, Baotou, Inner Mongolia 014040, China

Abstract: **Objective** To observe the preventive effect of early hormonal intervention on delayed encephalopathy after acute carbon monoxide (CO) poisoning among rats. **Methods** A total of 132 male Wistar rats were randomly divided into three experimental groups: CO poisoning group (COP group), CO poisoning + dexamethasone (10 mg/kg) group (DSMS-10 group), and CO poisoning + dexamethasone (30 mg/kg) group (DSMS-30 group), $n = 40$ for each, as well as one normal control group (NC group) ($n = 12$). The rats in experimental groups were intraperitoneally injected with CO (150 ml/kg) to establish an animal model of acute CO poisoning, while the rats in NC group were injected with an equal volume of air. The DSMS-10 group received intraperitoneal injection of dexamethasone (10 mg/kg/d) for 7 days, and the DSMS-30 group received intraperitoneal injection of dexamethasone (30 mg/kg/d) for 7 days; the treatment began within 30 min after poisoning. The control group and COP groups were injected with an equal volume of saline. At 90 min, 7 days, 14 days, and 21 days after poisoning, serum myelin basic protein (MBP) levels were measured; rats were sacrificed to collect brain tissues for HE staining and MBP immunohistochemical staining. The Morris water maze test was used to evaluate the intelligence of rats. **Results** The Morris water maze test showed that 8 rats in the COP group were judged to have delayed encephalopathy, 6 rats in the DSMA-10 group were judged to have delayed encephalopathy, and no cases of delayed encephalopathy were found in the DSMS-30 group and NC group. The COP group showed the most significant increase in serum MBP level, the DSMS-10 group also showed increase in serum MBP level, and the DSMS-30 group had almost normal serum MBP level; the most significant differences were seen at 90 min and 7 days after poisoning. The pathological examination showed that the rats judged to have delayed encephalopathy in the COP group had neuronal damage and MBP depigmentation in the hippocampus and subcortical region at 90 min

收稿日期: 2013-05-07; 修回日期: 2013-07-05

作者简介: 王宝军, 男, 主任医师, 教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事神经康复和脑血管病的研究。

通讯作者: 刘国荣, 男, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事脑血管病的研究。

to 21 days after poisoning; these pathological changes could be observed in all experimental groups, severest in the COP group and mildest in the DSMS-30 group. **Conclusions** For the rats with acute CO poisoning, dexamethasone can reduce the incidence of delayed encephalopathy when given at 10 mg/kg and can prevent delayed encephalopathy when given at 30 mg/kg.

Key words: acute carbon monoxide poisoning; delayed encephalopathy after acute carbon monoxide poisoning; myelin basic protein; dexamethasone; pathogenesis

急性一氧化碳中毒迟发性脑病 (delayed encephalopathy after acute carbon monoxide poisoning, DEACMP) 具有高发病率、高致残率的特点, 且病程长, 治疗困难, 患者常遗留有认知、学习和记忆功能障碍, 严重影响其生存质量, 给患者带来终生痛苦, 给社会和家庭带来巨大负担。DEACMP 发病机制迄今尚未阐明, 因而给临床早期预防带来困难。关于免疫学说方面的研究多为临床实验, 动物实验研究较少。因此, 本实验采用腹腔注射法成功建立了急性一氧化碳中毒动物模型, 深入探讨 DEACMP 的发病机制及有效的防治方法。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康雄性 Wistar 大鼠 140 只, 体重 180 ~ 280 g, 购自内蒙古大学动物中心。饲养于 12 h 明-暗交替, 室温 18 ~ 23℃ 环境, 喂饲标准大鼠饲料, 自由采食、水。

1.2 动物训练及分组

实验动物经一周适应性饲养和编号后进行 Morris 水迷宫训练。首先将动物放置在平台上 10 s, 随后依次从四个象限的中点面向池壁入水, 观察并记录大鼠巡游轨迹和时间, 超过 120 s 未能找到平台记为失败, 操作者引导大鼠到达平台且停留 30 s。实验动物每日训练 3 ~ 4 次, 3 d 后以巡游轨迹为直线式或趋向式, 逃避潜伏期 (escape latency) 小于 60 s 的动物为合格。不合格动物被淘汰。训练合格动物 135 只, 选取 132 只随机分成 3 个实验组 (每组 40 只) 和健康对照组 (12 只), 即 CO 中毒组 (COP 组)、CO 中毒 + 地塞米松 10 mg/kg 组 (DSMS-10 组)、CO 中毒 + 地塞米松 30 mg/kg 组 (DSMS-30 组) 和健康对照组 (NC 组)。

1.3 急性一氧化碳中毒动物模型的建立及药物治疗

参照付守芝等^[1]报道的中毒方法及预实验结果, 实验组大鼠按 150 ml/kg 腹腔注射 CO, 对照组大鼠注射等体积的空气。参照 Atalay 等^[2]报道的地塞米松给药剂量, 在中毒后 30 min 内 DSMS-10 组腹腔注射地塞米松剂量为 10 mg/kg/d, 共 7 d;

DSMS-30 组腹腔注射地塞米松剂量为 30 mg/kg/d, 共 7 d; 对照组和 COP 组则注射与 DSMS-30 组注射剂量相同剂量的生理盐水。

1.4 Morris 水迷宫实验

上述动物分组完毕后, 第二日行水迷宫实验。将动物依次从四个象限的中点面向池壁入水, 图像自动监视系统自动记录大鼠找到平台的时间, 即逃避潜伏期。超过 120 s 未能找到平台, 则潜伏期记为 120 s。大鼠每次爬上或被引导到达平台, 让其在平台上休息 30 s。取 4 次潜伏期的平均值为基础成绩。各组大鼠分别在 7 d、14 d 和 21 d 各时相点进行空间探索实验。撤除平台, 然后选择某象限的中点面壁式入水, 记录大鼠在 120 s 内穿越平台次数, 以正确穿越平台次数少于 3 次判定为 DEACMP^[1]。

1.5 MBP 的测定及脑组织病理学检查

分别于末次注射后 90 min、7 d、14 d 和 21 d 实验组各 8 只、对照组 3 只用 3.6% 水合氯醛 (1 ml/100 g) 由腹腔注射麻醉后, 暴露心脏, 用 5 ml 注射器在左心室内采集新鲜血液 2 ~ 3 ml (按试剂盒说明操作测定大鼠 MBP 的含量, 试剂盒由上海蓝基生物科技有限公司提供)。继而行心内插管, 用生理盐水将血液冲洗干净, 4% 多聚甲醛溶液心内灌注固定至头及四肢等均已发硬。再将其俯卧固定, 取出全脑, 放入 4% 多聚甲醛中后固定 4 h, 后将标本按所需取材放入 15% 蔗糖溶液过夜, 使组织块下沉。再放入 30% 蔗糖溶液过夜, 待其沉底后进行 -20℃ 恒冷切片机连续切片, 切片厚 8 μm。将载有标本的载玻片在 60℃ 烘干箱中烤 4 ~ 6 h 后既可行常规 HE 及 MBP 免疫组化染色。

1.6 统计学处理

数据统计采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析。计数资料采用 χ^2 检验。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 急性 CO 中毒表现

实验组大鼠腹腔注射 CO 后 5 ~ 10 min 出现烦躁不安, 15 ~ 20 min 后出现少动、四肢瘫软、呼吸

急促表浅、皮毛乍起、对外界刺激无反应、昏迷等，肢端皮肤呈樱桃红色。死亡动物尸检发现内脏重度充血伴散在出血点，脑组织充血水肿严重，符合重度急性 CO 中毒表现。

2.2 急性 CO 中毒后各组大鼠出现迟发性脑病的情况

Morris 水迷宫结果显示，COP 组中有 8 只大鼠被判定为迟发性脑病；DSMS-10 组中有 6 只被判定为迟发性脑病；而 DSMS-30 组和对照组未出现迟发性脑病（表 1、图 1）。大鼠迟发性脑病的发病时间集中在中毒后 7 d ~ 14 d。

2.3 急性 CO 中毒后各组大鼠血清中 MBP 含量的情况

COP 组大鼠血清中 MBP 含量增高最显著，DSMS-10 组也有增高，DSMS-30 组接近正常。差异在中毒后 90 min 和 7 d 最明显（表 2）。

表 1 各实验组大鼠 DEACMP 发生率的比较 (%)

组别	发生 DEACMP 的例数(n/N)	DEACMP 发生率
COP 组	8/25	32.00
DSMS-10 组	6/29	20.69
DSMS-30 组	0/36	0.00
NC 组	0/12	0.00

注：n：代表各组发生 DEACMP 的例数。N：代表各组大鼠中毒后存活例数。

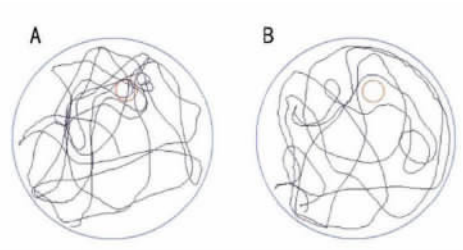


图 1 Morris 水迷宫空间探索实验，图中红色圆圈为平台位置。A：健康对照组大鼠，B：迟发性脑病大鼠。

表 2 各组大鼠血清中 MBP 含量的比较 (n; ng/ml; $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	90 min	7 d	14 d	21 d
COP 组	25	$6.98 \pm 1.14^{* *}$	$6.48 \pm 0.87^{* *}$	$5.92 \pm 1.28^{* *}$	$5.21 \pm 1.18^{*}$
DSMS-10 组	29	$6.00 \pm 1.14^{*}$	$5.44 \pm 1.18^{*}$	5.07 ± 0.83	4.65 ± 0.73
DSMS-30 组	36	4.98 ± 1.72	4.56 ± 0.70	4.60 ± 0.74	4.12 ± 0.68
NC 组	12	3.81 ± 1.11	3.68 ± 0.81	3.83 ± 0.71	3.82 ± 1.01

注：* 为与对照组比较 $P < 0.05$ ；* 为与 DSMS-30 组比较 $P < 0.05$ 。

2.4 病理学检查结果

2.4.1 HE 染色结果 普通光镜下见对照组大鼠脑海马、皮质下结构及细胞正常（图 2）。迟发性脑病大鼠见脑海马、皮质下出现神经元广泛损伤，主要表现为胞体缩小、胞核固缩深染、结构不清。但未发现明显坏死灶（图 3）。

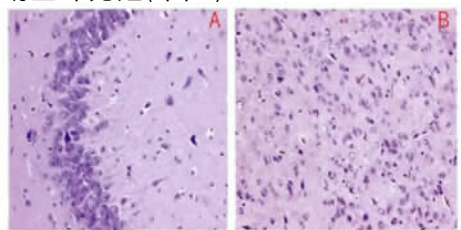


图 2 健康对照组大鼠组织结构，HE × 100 倍。A：海马；B：皮质下。

2.4.2 免疫组化染色结果 对照组大鼠在脑海马、皮质下见 MBP 阳性纤维表达致密，各时间点未见 MBP 表达减少。COP 组迟发性脑病大鼠在中毒后 90 min 可见脑海马、皮质下 MBP 表达明显减少，中毒后 7 ~ 21 d 仍见 MBP 表达减少。上述改变在

各组中均可观察到，但 COP 组大鼠病变程度最重，DSMS-30 组最轻。（图 4、图 5）

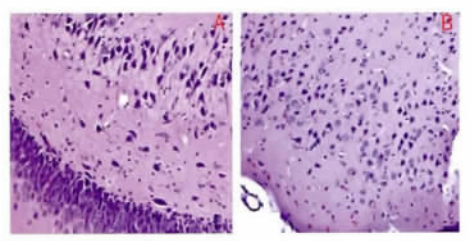


图 3 迟发性脑病大鼠组织结构，HE × 100 倍。A：海马；B：皮质下。

3 讨论

本实验采用腹腔注射 CO 建立急性 CO 中毒动物模型，虽与临床所见急性 CO 中毒的 CO 侵入途径不同，但中毒机制相符，同时满足 CO 吸入中毒模型具备的所有条件，并且无明显差异^[1]。同时我们通过对大鼠进行训练和筛选，淘汰学习记忆能力较差的大鼠，最大程度减少了由于大鼠个体差异对实验的影响，提高了结果的可靠性。

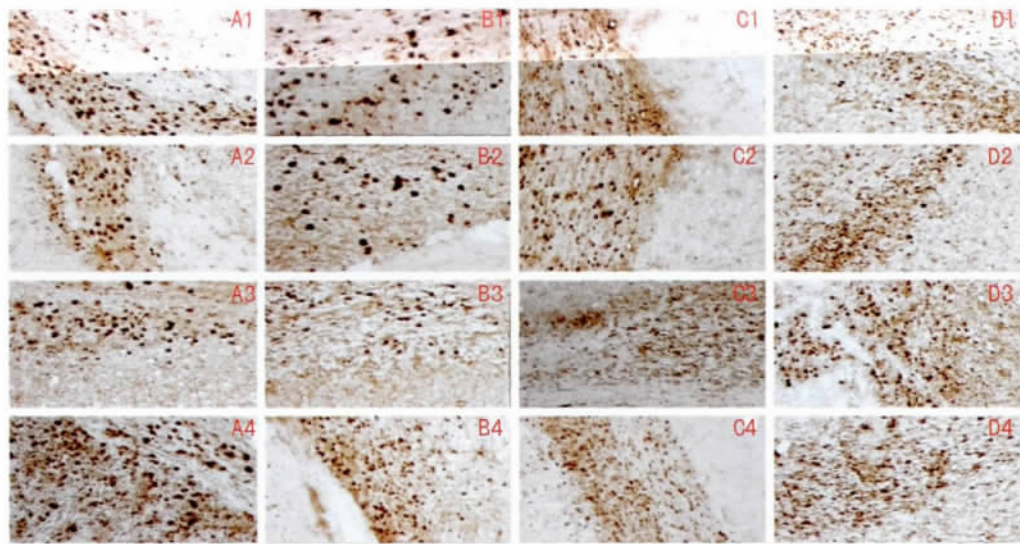


图 4 各组大鼠海马 MBP 染色 ,IHC $\times 100$ 倍(各图均为大鼠海马冠状位切面图 ,A、B、C、D 分别代表 NC 组、COP 组、DSMS-10 组和 DSMS-30 组。1、2、3、4 分别代表各组大鼠中毒后 90 min、7 d、14 d、21 d 时间点)。

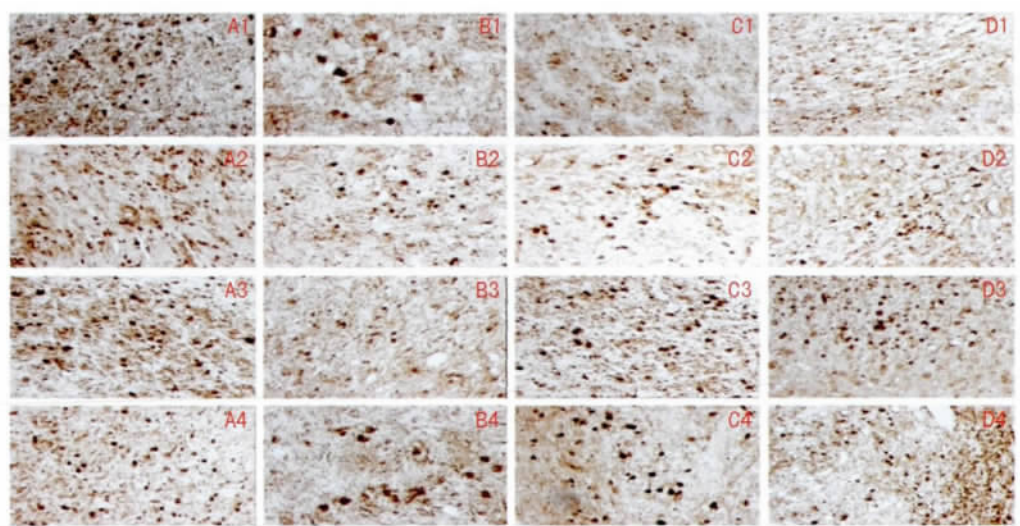


图 5 各组大鼠皮质下 MBP 染色 ,IHC $\times 100$ 倍(各图均为大鼠皮质下冠状位切面图 ,A、B、C、D 分别代表 NC 组、COP 组、DSMS-10 组和 DSMS-30 组。1、2、3、4 分别代表各组大鼠中毒后 90 min、7 d、14 d、21 d 时间点)。

海马区与大脑学习记忆功能密切相关,其损伤会对这一功能产生严重影响。而 DEACMP 患者临床表现正是以痴呆、记忆力受损等症状为主,提示海马区神经元的坏死可能是 DEACMP 发病的病理基础。因此,本研究选择检测海马区作为研究对象。实验病理学结果显示,迟发性脑病大鼠在脑海马、皮质下出现不同程度的神经元损伤、MBP 脱失等病理改变,与 Morris 水迷宫行为学检测提示中枢神经系统出现损伤的结果相符合。

DEACMP 的主要病理损伤为弥漫性大脑白质脱髓鞘,但髓鞘脱失的机制目前仍不清楚。国内外学

者均倾向于 Thom 等^[3]提出的 MBP 介导的自身免疫反应学说,大鼠 CO 中毒后脂质过氧化产物丙二醛修饰 MBP,使其抗原性发生改变,巨噬细胞、CD4⁺ 淋巴细胞以及活化的小胶质细胞攻击变性的 MBP,从而引起迟发性的脑损伤。其他研究也证实其机制与 MBP 介导的自身免疫反应相关,其机制可能涉及自由基生成,髓过氧化物酶及黄嘌呤氧化还原酶活化等,最终激活了自身免疫反应,使脑内髓鞘碱性蛋白因免疫攻击而脱失,从而启动了迟发性脑损伤的程序^[4-6]。Shprecher 等^[7]则认为其脱髓鞘主要是由于髓鞘磷脂及少突胶质细胞损伤而引

发。这些研究提示使用免疫抑制剂如糖皮质激素可能阻止迟发性脑损伤的发生^[8]。

但由于目前缺乏可靠的理论依据、规范的诊疗疗程及合适的治疗剂量。所以,糖皮质激素治疗的重要性还不能确定。因此,本实验选择检测 MBP 作为研究指标,地塞米松作为治疗。实验结果显示,COP 组大鼠在中毒后 90 min 血清中 MBP 含量明显增高,而在中毒后 7~21 d 其含量仍高于对照组,但与急性期相比逐渐下降。病理学结果也证实,在中毒后 90 min~21 d 在脑海马、皮质下出现了神经元损伤、髓鞘 MBP 脱失等病理改变。上述表现在 COP 组最重,DSMS-30 组最轻。提示大鼠 CO 中毒后 90 min 中枢神经系统即出现了严重的损害,表现为神经元损伤、髓鞘 MBP 脱失等,且这种髓鞘脱失过程具有可逆性、自限性(可能与血液中 MBP 含量随着自身循环的清除逐渐下降有关)。

另外,实验还发现,COP 组大鼠迟发性脑病发生率 32.00%; DSMS-10 组为 20.69%; 而 DSMS-30 组未出现迟发性脑病。其原因可能与地塞米松具有抗氧化、细胞保护及减少脂质过氧化物相关^[2,9-11]。上述研究表明在大鼠 CO 中毒后 90 min 应用地塞米松,特别是 30 mg/kg 地塞米松,可显著减轻神经元损伤、减少髓鞘 MBP 的脱失、减轻病理损伤,避免迟发性脑病的发生,值得临床应用。

需要指出的是,在出现上述病理学改变时,实验大鼠并未出现可观察到的异常表现,推测可能与染毒剂量小,大鼠血红蛋白与 CO 亲和力低、结合力不如人类等有关^[12],造成脑内病理改变较轻或范围较小,引起的症状体征不够明显之故。临床上亦常见急性 CO 中毒病人完全康复后,CT 显示上脑部苍白球的坏死灶仍十分明显,甚至持续终生,而不再出现任何症状体征^[13]。由于 CO 在体内的半减期仅为 5~6 h,染毒 1 d 后体内 CO 即大致排净,而脑内病理改变多在染毒后 1 周方渐明显,显然难用 CO 的直接毒性解释,此种“迟发性”改变推测可能是 CO 中毒引发病理性的免疫反应,从而导致髓鞘脱失,具体细节尚不清楚。可能通过以下几种机制引发髓鞘脱失:①补体激活后的膜攻击复合体形成;②髓鞘的调理素作用(通过促进巨噬细胞的噬菌作用);③抗体依赖细胞介导的细胞毒作用;④通过刺激自然杀伤细胞、巨噬细胞和肥大细胞的 Fc 受体释放炎症介质。

由于本研究的动物数目尚不多、急性 CO 中毒

动物模型的建立尚不够成熟、大鼠迟发性脑病的判断标准尚不够完善等原因,笔者将继续从事这方面的研究和观察。

参 考 文 献

- [1] 付守芝,刘勇,杨建业,等. 腹腔注射法建立一氧化碳中毒迟发性脑病大鼠模型. 中国急救医学, 2007, 27(11): 996-1003.
- [2] Atalay H, Aybek H, Koseoğlu M, et al. The effects of amifostine and dexamethasone on brain tissue lipid peroxidation during oxygen treatment of carbon monoxide-poisoned rats. *Adv Ther*, 2006, 23: 332-341.
- [3] Thom SR, Bhopale VM, Fisher D, et al. Delayed neuropathology after carbon monoxide poisoning is Immune-mediated. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2004, 101: 13660-13665.
- [4] Stephenson D, Yin T, Smalstig EB, et al. Transcription factor nuclear factor-kappa B is activated in neurons after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20: 592-603.
- [5] Thom SR, Bhopale VM, Han S T, et al. Intravascular neutrophil activation due to carbon monoxide poisoning. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 174: 1239-1248.
- [6] Han ST, Bhopale VM, Thom SR. Xanthine oxidoreductase and neurological sequelae of carbon monoxide poisoning. *Toxicol Lett*, 2007, 170: 111-115.
- [7] Shprecher D, Mehta L. The syndrome of delayed post-hypoxic leukoencephalopathy. *NeuroRehabilitation*, 2010, 26: 65-72.
- [8] Thom SR, Bhopale VM, Fisher D. Hyperbaric oxygen reduces delayed immune-mediated neuropathology in experimental carbon monoxide toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2006, 213(2): 152-159.
- [9] Cobb JP, Hotchkiss RS, Karl E, et al. Mechanisms of cell injury and death. *Br J Anaesth*, 1996, 77: 3-10.
- [10] Omaye ST. Metabolic modulation of carbon monoxide toxicity. *Toxicology*, 2002, 180: 139-150.
- [11] Rocken D, Lillichook B, Larsson R, et al. Differential anti-inflammatory and anti-oxidative effects of dexamethasone and N-acetylcysteine in endotoxin-induced lung inflammation. *Clin Exp Immunol*, 2000, 122: 249-256.
- [12] Watanabe S, Matsuo H, Kobayashi Y, et al. Transient degradation of myelin basic protein in the rat hippocampus following acute carbon monoxide poisoning. *Am J Emerg Med*, 2010, 68: 232-240.
- [13] Piantadosi CA. Carbon monoxide poisoning. *Undersea Hyperb Med*, 2004, 31: 167-177.