论著

文章编号:1000-5404(2008)16-1532-03

低氧复合氰化钠中毒对兔动脉血超氧化物歧化酶、还原型谷胱甘肽和丙二醛的影响

赵远鹏,但国蓉,董兆君 (第三军医大学军事预防医学院防化医学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨高原低氧复合氰化钠中毒对兔动脉血氧化应激的影响。**方法** 以低压氧舱模拟4 000 m高原急性缺氧环境。20只家兔按随机数字表法分为4组,高原高、低剂量组,平原高、低剂量组,每组5只。高原缺氧组动物置于低压氧舱内预处理72 h后进行实验,平原组动物于普通实验环境下进行。以戊巴比妥钠(40 mg/kg,腹腔注射)麻醉动物后进行股动脉插管,注射氰化钠(1.5、2 mg/kg,腹腔注射)。分别于中毒前10 min和中毒后5、10、15、20、30、60、120、180 min经插管采血并分离血浆,以生化方法测定超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性、还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量。**结果** 平原动物NaCN中毒60 min后血浆MDA含量增加($P<0.01$),SOD活力和GSH含量下降($P<0.05$, $P<0.01$)。高原缺氧72 h后也使MDA含量增加($P<0.01$),SOD活力和GSH含量下降($P<0.05$, $P<0.01$),高原缺氧动物注射氰化钠30 min后上述指标变化较平原动物更为显著($P<0.01$)。**结论** 单纯缺氧和单纯氰化钠中毒均明显改变氧化应激指标,二者可能具有联合效应。

关键词: 低氧;氰化钠;兔;氧化应激
中图法分类号: Q592.1;R364.4;R827.172 **文献标识码:** A

Effects of hypoxia and sodium cyanide on superoxide dismutase, reduced glutathione and malondialdehyde in arterial blood of rabbits

ZHAO Yuan-peng, DAN Guo-rong, DONG Zhao-jun (Department of Chemical Defence, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of hypoxia and sodium cyanide (NaCN) on oxidative stress in rabbit arterial blood. **Methods** An artificial hypobaric hypoxia chamber was used to simulate 4 000-meter high altitude. Twenty rabbits were randomly divided into 4 groups: hypoxia group with high- or low-dose, non-hypoxia with high- or low-dose. The animals in the non-hypoxia groups were operated under normal circumstances while those in hypoxia groups were subjected to chamber in low pressure for 72 h before receiving the hypoxia experiments. Femoral arterial cannulation was performed on all animals under anesthetization with pentobarbital sodium (30 mg/kg, iv) and NaCN(ip) at the doses of 1.5 mg/kg and 2 mg/kg. Blood samples were collected at 10 min before intoxication, and 5, 10, 15, 20, 30, 60, 120 and 180 min after intoxication and blood seperation was conducted. The activity of superoxide dismutase (SOD), contents of reduced glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) were determined. **Results** The MDA content was significantly increased ($P<0.01$), and the SOD activity and GSH level were obviously decreased by NaCN injections in the non-hypoxia animals ($P<0.05$, $P<0.01$). Similar changes were also detected under the hypoxia condition ($P<0.01$) 72 h later yet, and the changes of the aboving indices were more distinct in hypoxia groups than in non-hypoxia groups 30 min after intoxication. **Conclusion** Either hypoxia or NaCN can produce significant changes on the oxidative stress system and theg may heve a synergetic effect.

Key words: hypoxia; NaCN; rabbit; oxidative stress

氰化物是一种重要的化工原料,又是典型的速杀性化学战剂,因其具有易生产、毒性大、染毒途径多、中毒难防难治的特点,成为列装的主要化学战剂之一[1]。部队急进高原时因缺氧所致的急性高原病在造成机体功能的异常反应的同时,可加重化学毒物对心、脑、肺等耗氧量大的器官的损伤作用,并导致其他器官功能的下降[2,3]。本研究以低压氧舱模拟高原环境,通过比较高原和平原环境下氰化物中毒前后家兔

基金项目:全军医学科研"十一五"计划科技攻关项目(06G077)
Supported by the Scientific Research Foundation for Medical Science and Pablic Health of PLA(06G077)
作者简介:赵远鹏,男,辽宁省丹东市人,助教,主要从事化学毒剂复合伤防治方面的研究。电话:(023)68752356
通信作者:董兆君,电话:(023)68752285
收稿日期:2007-10-31;修回日期:2008-01-23

的氧化应激的变化情况,以期为缺氧复合氰化物中毒的救治方案研究提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　实验仪器

氰化钠(NaCN, 分析纯)购自美国 Fluka 公司,其他试剂均为国产分析纯。Sigma 3-16K 离心机(德国),TU1901 型紫外 - 可见光分光光度计(北京)。

1.2　实验动物及分组

普通级日本大耳兔 20 只(由第三军医大学实验动物中心提供,合格证号:生产 SCXK[渝 2002002]),雄性,体质量(1.93 ± 0.21)kg,编号后按随机数字表法分为 4 组,每组 5 只。高原组实验在本校高原医学研究所低压氧舱中进行,手术前实验动物置于低压氧舱中减压至 61.7 kPa(4 000 m 高原水平)饲养 72 h。平原组实验在本室普通实验室内进行(308 m, 97.7 kPa)。按染毒剂量[4]的不同依次分为高原高剂量组(2 mg/kg)、高原低剂量组(1.5 mg/kg)、平原高剂量组(2 mg/kg)和平原低剂量组(1.5 mg/kg),各组以本组动物中毒前 10 min 为对照。

1.3　右侧股动脉插管术

各组实验动物术前经耳缘静脉注射 3% 戊巴比妥钠溶液(1 ml/kg)。待麻醉完全后,取仰卧位固定于手术台上,备皮,沿右侧腹股沟作一长约 5 cm 的切口,用血管钳分离肌群,充分暴露右侧股动脉,待彻底分离附着于动脉血管壁的组织及神经后,结扎远心端,近心端上动脉夹。用眼科剪在动脉壁上作 45° 切口,约为管径的 1/3,插入充满肝素溶液的动脉导管,长度以 2 ~ 4 cm 为宜。松开动脉夹,结扎近心端,用远心端的扎线固定导管。导管末端连接三通管,并经导管注入 0.1% 肝素钠溶液(1 ml/kg)。

1.4　血样的采集

右侧股动脉插管术完成后 30 min,于腹腔一次性注射 NaCN 毒剂,取中毒前 10 min,中毒后 5、10、15、20、30、60、120、180 min 9 个时相点,分别从右侧股动脉抽取动脉血 2 ml,离心分离动脉血血浆(4 ℃, 2 500 r/min 离心 15 min), -80 ℃超低温冰箱冻存。

1.5　氧化应激指标测定

血浆超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)等指标均采用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒进行测定。应用紫外 - 可见光分光光度计测定光密度值,计算 SOD 的活性及 GSH、MDA 的含量。

1.6　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件进行双因素方差分析,组间两两比较采行 t 检验。

2　结果

2.1　兔存活情况

高原组在模拟 4 000 m 高原环境下(61.7 kPa)生活 72 h 后,精神状态尚好,毛色正常,饮食饮水略有下降,体质量由(1.96 ± 0.21) kg 降至(1.90 ± 0.17) kg。仅高原高剂量组 5 只兔在中毒后 1 ~ 2 h 内全部死亡。平原组术前、术后未见异常。

2.2　血浆 SOD 活性变化

SOD 检测结果显示,高原对照组缺氧 72 h 后兔血浆 SOD 活力较平原对照组显著降低($P < 0.05$)。平原高剂量组中毒 30 min 后兔血浆 SOD 活力较平原对照组出现显著降低($P < 0.01$)。平原低剂量组中毒 60 min 后兔血浆 SOD 活力较平原对照组出现显著降低($P < 0.01$)。缺氧复合氰化物中毒可使兔血浆 SOD 活力降低更为显著。高原高剂量组中毒 15 min 后即出现显著降低($P < 0.01$),且致伤时间越长,各实验组 SOD 活力变化越明显。平原高、低剂量组中毒 120 min 后 SOD 活力均有所恢复,但仍显著低于平原对照组水平($P < 0.05$)。中毒 30 min 后高原高剂量组兔血浆 SOD 活力相当于平原对照组的 82.49%,中毒 60 min 后相继死亡。中毒 60 min 后平原低剂量组兔血浆 SOD 活力达到最低,相当于平原对照组的 82.37%。中毒 120 min 后平原高剂量组兔血浆 SOD 活力达到最低,相当于平原对照组的 74.50%。中毒 180 min 后高原低剂量组兔血浆 SOD 活力相当于平原对照组的 67.61%。见表 1。

2.3　血浆 GSH 含量变化

GSH 检测结果显示,高原对照组缺氧 72 h 后兔血浆 GSH 含量较平原对照组出现显著降低($P < 0.01$)。平原高剂量组中毒 10 min 后兔血浆 GSH 含量较平原对照组出现显著降低($P < 0.01$)。平原低剂量组中毒 30 min 后兔血浆 GSH 含量较平原对照组出现显著降低($P < 0.05$)。缺氧复合氰化物中毒可使兔血浆 GSH 含量降低更为显著,且致伤时间越长,各实验组 GSH 含量变化越明显。平原低剂量组中毒 180 min 后 GSH 含量略有所恢复,但仍低于平原对照组水平($P < 0.05$, $P < 0.01$)。中毒 30 min 后高原高剂量组兔血浆 GSH 含量相当于平原对照组的 68.67%,中毒 60 min 后相继死亡。中毒 120 min 后平原低剂量组兔血浆 GSH 含量达到最低,相当于平原对照组的 80.68%。而中毒 180 min 后高原低剂量组、平原高剂量组兔血浆 GSH 含量分别相当于平原对照组的 63.98% 和 79.00%。见表 2。

表 1　缺氧复合 NaCN 中毒家兔动脉血 SOD 活力变化($n = 5$, U/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	中毒前	中毒后							
	10 min	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min	60 min	120 min	180 min
高原高剂量组	222.8 ± 13.6^{c}	212.7 ± 17.3^{c}	212.2 ± 13.9^{c}	206.7 ± 9.6^{ad}	197.9 ± 4.7^{bd}	195.1 ± 6.8^{bd}	—	—	—
高原低剂量组		220.9 ± 7.7^{c}	222.5 ± 6.1^{d}	213.0 ± 2.5^{d}	210.8 ± 7.0^{d}	208.6 ± 7.9^{ad}	195.7 ± 5.9^{bd}	178.6 ± 4.1^{bd}	159.9 ± 7.4^{bd}
平原高剂量组	236.5 ± 11.6	235.6 ± 12.1	229.8 ± 20.9	214.5 ± 17.0	208.7 ± 10.9^{c}	205.7 ± 11.4^{d}	189.6 ± 12.7^{d}	176.2 ± 16.5^{d}	196.2 ± 14.2^{d}
平原低剂量组		243.5 ± 19.7	229.3 ± 25.1	231.4 ± 24.3	231.2 ± 10.0	226.1 ± 14.1	194.8 ± 18.4^{d}	210.1 ± 11.1^{c}	211.1 ± 12.6^{c}

a:$P < 0.05$,b:$P < 0.01$,与高原对照组比较;c:$P < 0.05$,d:$P < 0.01$,与平原对照组比较;"—":动物死亡;中毒前 10 min 为各组对照

表 2 缺氧复合 NaCN 中毒家兔动脉血 GSH 含量变化($n=5$, mg/L, $\bar{x}\pm s$)

组别	中毒前	中毒后							
	10 min	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min	60 min	120 min	180 min
高原高剂量组	220.3 ± 21.6[d]	211.0 ± 29.4[d]	202.8 ± 14.1	191.9 ± 3.8[bd]	184.0 ± 3.2[bd]	175.6 ± 14.6[bd]	—	—	—
高原低剂量组		216.2 ± 14.6[d]	210.5 ± 12.5[d]	195.0 ± 5.8[ad]	191.0 ± 3.3[bd]	188.8 ± 7.0[bd]	181.9 ± 5.2[bd]	171.9 ± 4.9[bd]	163.6 ± 1.5[bd]
平原高剂量组	255.7 ± 13.4	235.3 ± 11.0[c]	225.4 ± 3.4[d]	220.1 ± 4.6[d]	217.5 ± 5.8[d]	214.6 ± 6.4[d]	209.2 ± 4.1[d]	203.0 ± 5.6[d]	202.0 ± 10.0[d]
平原低剂量组		255.2 ± 12.3	247.7 ± 5.1	235.5 ± 15.2	227.3 ± 22.9	218.4 ± 23.8[c]	212.2 ± 26.5[c]	206.3 ± 25.9[c]	213.6 ± 23.6[c]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与高原对照组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与平原对照组比较;"—":动物死亡;中毒前 10 min 为各组对照

表 3 缺氧复合 NaCN 中毒家兔动脉血 MDA 含量变化($n=5$, nmol/ml, $\bar{x}\pm s$)

组别	中毒前	中毒后							
	10 min	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min	60 min	120 min	180 min
高原高剂量组	3.44 ± 0.15[d]	3.60 ± 0.15[d]	3.76 ± 0.26[ad]	3.87 ± 0.25[ad]	3.94 ± 0.25[bd]	4.15 ± 0.28[bd]	—	—	—
高原低剂量组		3.56 ± 0.13[d]	3.63 ± 0.06[d]	3.81 ± 0.19[ad]	3.88 ± 0.21[ad]	4.08 ± 0.31[ad]	4.14 ± 0.37[ad]	4.39 ± 0.38[ad]	4.64 ± 0.17[bd]
平原高剂量组	2.36 ± 0.24	2.64 ± 0.06[c]	2.85 ± 0.09[d]	2.87 ± 0.12[d]	3.01 ± 0.21[d]	3.14 ± 0.27[d]	3.33 ± 0.16[d]	3.52 ± 0.19[d]	3.72 ± 0.26[d]
平原低剂量组		2.31 ± 0.13	2.48 ± 0.16[c]	2.76 ± 0.23[c]	2.82 ± 0.25[c]	2.93 ± 0.26[c]	3.01 ± 0.26[d]	3.14 ± 0.28[d]	3.31 ± 0.31[d]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与高原对照组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与平原对照组比较;"—":动物死亡;中毒前 10 min 为各组对照

2.4 血浆 MDA 含量变化

MDA 检测结果显示,高原对照组缺氧 72 h 后兔血浆 MDA 含量较平原对照组出现显著升高($P<0.01$)。平原高剂量组中毒 10 min 后兔血浆 MDA 含量较平原对照组出现显著升高($P<0.01$),平原低剂量组中毒 60 min 后兔血浆 MDA 含量较平原对照组出现显著升高($P<0.01$)。缺氧复合氰化物中毒可使兔血浆 MDA 含量升高更为显著($P<0.01$),且致伤时间越长,各实验组 MDA 含量变化越明显。中毒 30 min 后高原高剂量组兔血浆 MDA 含量相当于平原对照组的 175.85%,中毒 60 min 后相继死亡。中毒 180 min 后高原低剂量组、平原高剂量组、平原低剂量组兔血浆 MDA 含量分别达到平原对照组的 196.61%、157.63% 和 140.25%。见表 3。

3 讨论

氰化物是线粒体毒物,进入机体后迅速导致细胞呼吸链功能障碍,进而引起氧化应激系统功能改变。马宝玺等[5]报道,氰暴露人员血浆 MDA 含量升高,SOD 活性、GSH 含量显著下降,且以 MDA 和 SOD 改变出现较早。本研究观察到,平原组动物 NaCN 中毒后血浆 MDA 含量呈进行性增加趋势,而 SOD 活力明显下降。表明,单纯氰化物中毒对自由基及自由基清除系统都有显著的干扰作用。我们还观察到氧化应激水平受中毒剂量的影响。2.0 mg/kg 组动物血浆氧化应激指标改变比 1.5 mg/kg 组更为严重,提示机体氧化应激系统对氰化物的反应可能具有一定的剂量依赖性。

高原低氧也明显影响氧化应激系统功能。随海拔高度的增加,血氧分压降低,组织及血液 ROS、NOS 生成增加,并可对脂质、蛋白以及 DNA 造成氧化损伤[6]。与此同时,暴露于高海拔环境下,可使抗氧化物酶系统的活性和作用下降。本研究证实,兔于 4 000 m 缺氧 72 h 后,动脉血血浆 SOD 活性,GSH、MDA 含量分别为平原对照组的 94.21%、86.15% 和 145.76%,与文献[7]报道吻合。

我们前期研究的结果表明,高原缺氧和化学毒物可对机体产生联合效应[3],但高原缺氧复合氰化物中毒是否也有这种效应尚不清楚。本研究表明,缺氧动物 2.0 mg/kg 氰化钠中毒后 5 min 和 30 min,血浆 MDA 含量分别是平原动物同剂量氰化钠中毒时的 136.36% 和 132.17%,SOD 活力分别为平原动物同剂量氰化钠中毒时的 90.28% 和 94.85%。由此可见,缺氧复合氰化物中毒动物血浆各项氧化应激指标的变化幅度大于缺氧或中毒单一因素所产生的效应。以上研究结果提示,缺氧和 NaCN 中毒这两个损伤因素可能对氧化应激系统具有联合作用。氧化应激能对心、脑、肺等耗氧量大的组织造成损伤。这可能是缺氧条件下化学中毒后症状更加严重、救治更加困难的原因之一,应加以重视并深入研究其发生机制。

参考文献:

[1] Lee E J. Pharmacology and toxicology of chemical warfare agents[J]. Ann Acad Med Singapore, 1997, 26(1): 104 - 107.

[2] 高钰琪, 黄 缄, 黄庆愿, 等. 高原军事医学基础研究进展[J]. 西南国防医药, 2003, 13(5): 561 - 564.

[3] 董兆君, 吴 强, 赵吉清, 等. 化学中毒与急性缺氧的双因素联合效应的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(12): 1029 - 1033.

[4] 朱乐明, 董兆君. 失血性休克复合氰化钠中毒对兔血清氧化应激水平的影响[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(5): 428 - 430.

[5] 马宝玺, 崔金山, 柏 松, 等. 丙烯腈对男工脂质过氧化作用研究[J]. 中国工业医学杂志, 2003, 16(1): 17 - 19.

[6] Maiti P, Singh S B, Sharma A K, *et al*. Hypobaric hypoxia induces oxidative stress in rat brain[J]. Neurochem Int, 2006, 49(8): 709 - 716.

[7] 蒋长征, 李芳泽, 孙蜀勇, 等. 抗氧化酶系统失调与脂质过氧化在急性高原反应中的意义[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2004, 22(2): 138 - 139.

(编辑 王小寒)